



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO
A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *Cg-*
Foxl2, *OyVlg*, *og-TGF- β* y *vgt* EN DIFERENTES
CRUZAS DE *Crassostrea gigas* SOMETIDAS A
DIFERENTES TEMPERATURAS

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

Sara de las Heras Saldaña

La Paz, Baja California Sur, Mayo de 2012

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 20 del Mes de Abril del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF-β* y *vgt* EN DIFERENTES CRUZAS DE *Crassostrea gigas* SOMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS"

Presentada por la alumna:

Sara de las Heras Saldaña

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

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

LA COMISION REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sanchez
CO-TUTOR



Dr. Arnaud Huvet
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Directora

Dra. Ana María Ibarra Humphries
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

Co-tutores:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
CICESE, Ensenada, B. C.

Dr. Arnaud Huvet
Ifremer, Brest

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Dr. Arnaud Huvet

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Dr. Arnaud Huvet
Dra. María Teresa Sicard González (Suplente)

RESUMEN

El ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) es una especie diseminada en el mundo para su cultivo, y en México fue primero introducido en 1973 en Baja California y posteriormente a Baja California Sur, Sonora y Sinaloa. Su producción llegó a alcanzar las 3282 t en 1995, pero a partir de 1997 la producción disminuyó en asociación a altas mortalidades, adscritas tanto a patógenos como condiciones ambientales extremas durante años de El Niño. Respecto a esto último, en otras especies de cultivo se han encontrado interacciones significativas entre el genotipo y el ambiente, y se conoce además, que algunas poblaciones de organismos acuícolas presentan adaptaciones a las condiciones ambientales imperantes en sus zonas particulares de origen. En este contexto, es importante desarrollar conocimiento para ser aplicado en programas de selección de *C. gigas* cuando esta especie es cultivada en los diferentes ambientes del Noroeste de México. En particular, se sabe que el proceso gametogénico de esta especie es más acelerado cuando las temperaturas son mayores, y que este proceso gametogénico acelerado afecta el crecimiento. Sin embargo, no se conoce si existen diferencias genéticas en esa respuesta reproductiva. Este conocimiento puede ser logrado a través del análisis de expresión génica de algunos genes asociados a la gametogénesis, como es el caso de *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF-β* y *vtg*, mediante la comparación de diferentes grupos genéticos de ostión. En el presente estudio se evaluó la expresión de estos genes en asociación al desarrollo gonádico de diferentes grupos genéticos de ostión *C. gigas* sometidos a diferentes temperaturas. Para ello se usaron dos cruza de ostión derivadas del cruzamiento entre líneas de Estados Unidos (EU), Chile (CL) y Australia (AU): 1) la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$, con un 50% de sus genes derivados de la línea AU y 25% de cada una de las otras dos líneas; y 2) la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$, con un 50% de sus genes derivados de la línea EU, y 25% de cada una de las otras dos líneas. Las cruza fueron producidas en condiciones de laboratorio y preengordadas en la Laguna San Ignacio, BCS. Posteriormente se llevaron al Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR donde se mantuvieron en condiciones experimentales controladas durante 30d, a temperaturas de 19, 23, 27 y 31°C (n=100 ostiones por cruza y temperatura). Al concluir el experimento se hicieron biometrías y se tomó tejido gonadal para análisis histológico y de expresión génica cuantitativa. Con base en la histología, los organismos se clasificaron por sexo y estadio de desarrollo gametogénico. Finalmente mediante qPCR se analizó la expresión de los genes *Cg-Foxl2*, *OyVlg* y *og-TGF-β* en ostiones indiferenciados, en machos en estadio III y IV, y en hembras en estadio I y III. El gen *vtg* fue analizado en ostiones indiferenciados y en hembras I y III. Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticas al comparar las variables de crecimiento entre las cruza, la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó los promedios más altos mientras que la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ presentó valores inferiores. Sin importar la cruza, se vio una disminución en la biomasa en las temperaturas más altas, acompañada de un amento en el estadio de desarrollo gonádico y en el índice de área gonadal (IAG). La cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó un desarrollo gametogénico más acelerado que $EU \times F1_{(CH:AU)}$. En general el desarrollo gonádico fue mayor en las temperaturas elevadas (27°C y 31°C) que en las temperaturas bajas (19°C y 23°C). Las cruza presentaron diferencias significativas sólo en la temperatura de 23°C. El índice de madurez ovárica (IMO), estimado a través del número y tamaño de los ovocitos, mostró tener una relación más clara

con la madurez gonádica que el IAG calculado, aunque el IAG e IMO estimado solamente en hembras en estadio FIII mantenidas a 31°C permiten concluir que un mayor IAG/IMO se asocia con una mayor expresión génica de los genes *vtg*, *Oyvlg* (*vasa*) y *Cg-Foxl2*. Adicionalmente, los valores de expresión de *Cg-Foxl2* indicaron que este gen es un buen indicador del sexo una vez que se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras. Por su parte el gen *Oyvlg* probó ser un buen indicador del IAG e IMO, así como de la velocidad del desarrollo gonádico una vez que presentó mayor expresión en la craza F1_(CH:EU) x AU misma que tiene un desarrollo gonádico más rápido y una tendencia a mayor área gonadal y madurez ovárica. De manera similar el gen *vtg* puede considerarse como un buen indicador de madurez en hembras ya que es en estadios FIII cuando presenta la mayor expresión. El gen *og-TGF-β* presentó una amplia variación sin diferencias significativas. En conclusión, los resultados muestran que la craza EU x F1_(CH:AU) presenta un desarrollo gonádico más lento que la craza F1_(CH:EU) x AU bajo las mismas condiciones experimentales, y que la expresión génica de *Cg-Foxl2*, *Oyvlg* y *vtg* refleja tales diferencias entre cruzas, permitiendo contar con marcadores génicos que podrían ser utilizados en futuros programas de selección de esta especie.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, cruzas o grupos genéticos, desarrollo gonádico, expresión génica, *Cg-Foxl2*, *Oyvlg*, *vtg*, *og-TGF-β*.

ABSTRACT

Crassostrea gigas is an oyster species that has been distributed worldwide with aquaculture purposes. In Mexico it was first introduced into Baja California Norte State in 1973, and later in Baja California Sur, Sonora and Sinaloa States. Up to 1995 production reached 3282 t, but it decreased thereafter in association to increased mortalities ascribed to pathogens and/or high temperatures during El Niño years. With regard to the last factor, in other cultured species it is known that significant interactions between genotypes and environments can occur, and it is also known that some populations of aquatic organisms have developed adaptations to the environmental conditions where they occur or are originally from. In this context, and because *C. gigas* is cultured in different environmental conditions in Northwest Mexico, is important to develop knowledge for different genetic lines recently conformed in Mexico to apply those results on the future selective breeding of this species. Particularly it is known that the gametogenic process in this species is accelerated at higher temperatures, and that that process affects directly on growth. However, it is not known if different genetic groups or lines present differences in their gametogenic process in response to high temperatures. Such knowledge can be obtained through comparative analyzes between genetic groups for gene expression of specific genes known to be involved in the gametogenic process, as are the genes *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF-β* and *vtg*. In this research the quantitative expression of those genes was studied in association to gonad development for two genetic groups of *C. gigas* subjected to different and increasing temperatures. Two oyster crosses produced through repeated mating between three genetic lines obtained from the USA (EU), Chile (CL), and Australia (AU) were used: 1) the F1_(CH:EU) x AU cross, with 50% of its genes derived from the AU line, and 25% from each of the other two lines; and 2) the EU x F1_(CH:AU) cross, with 50% of its genes derived from the EU line, and 25% from each of the other two lines. The crosses were hatchery produced and pre-grown at Lagoon of San Ignacio in BCS until reaching approximately 3 cm in shell length, when individuals from each were transported back to the Aquaculture Genetics and Animal Improvement Laboratory at CIBNOR. Four temperatures treatments were used (19, 23, 27 y 31°C), feeding 4% of their body mass and maintaining 100 oysters per cross in each during 30d. At the end of the experimental time, biometrical data and gonad tissues were sampled for gonad histology and gene expression analyzes. Gametogenic stages and sexes were identified and analyzed. Relative gene expression of *Cg-Foxl2*, *OyVlg* and *og-TGF-β* was evaluated in undifferentiated (I) oysters, in male oysters in stage III and IV, and in female oysters in stages I and III. Relative expression of *vtg* was evaluated in undifferentiated (I) and female oysters in stages I and III. The results indicated differences between the crosses in some of the biometrical variables, with the cross F1_(CH:EU) x AU being larger or heavier than the cross EU x F1_(CH:AU). Regardless of the cross, a decrease in biomass or tissue weight was seen at the highest temperatures, which was accompanied by an increase in the gametogenic stage and the gonad area index. When contrasting between crosses, the F1_(CH:EU) x AU cross had more advanced gametogenic stages than the EU x F1_(CH:AU) cross, however significant differences between crosses by temperature were only seen for the 23°C temperature. When contrasting temperatures, gametogenesis was significantly more advanced in the two highest temperatures (27°C y 31°C) than in the two lowest (19°C y 23°C). When evaluating

the denominated ‘reproductive effort’, derived from a measure of the gonad area in relation to the organism area (IAG), no significant differences were found between crosses or temperatures, regardless of the clear differences in gametogenesis stages seen between crosses and temperatures. However, when this index was estimated only for females in stage III obtained from the 27°C and 31°C experimental temperatures, and contrasted with a second index, the ovary maturity index (IMO), some conclusions were reached, confirming that the F1_(CH:EU) x AU cross matured faster and presented partial spawns. These two indices also allowed concluding that larger indices in females will associate with a higher expression of three of the four marker genes studied here: *vtg*, *Oyvlg* and *Cg-Foxl2*. The *Oyvlg* gene was also a good indicator of gametogenic speed between crosses, as it showed a larger expression in the fastest maturing cross, F1_(CH:EU) x AU. The *vtg* gene can be considered as a good indicator of gonad maturity in females as the largest expression was seen for females in stage III. Finally, the *Cg-Foxl2* gene was a good marker to identify females, as significant differences between males and females in stage III were found. The only gene not showing an associated expression pattern with gametogenesis was *og-TGF-β*. In conclusion, the results showed that under the same experimental conditions, one of the crosses, EU x F1_(CH:AU), has a reduced or slower gametogenic process when contrasted with the other cross, F1_(CH:EU) x AU, and that the expression pattern of the *Cg-Foxl2*, *Oyvlg* and *vtg* genes reflects on those differences between crosses, which will allow to have marker genes to be used in future selective breeding programs of *C. gigas*.

Key-words: *Crassostrea gigas*, crosses or genetic groups, gonad development, gene expression, *Cg-Foxl2*, *Oyvlg*, *vtg*, *og-TGF-β*.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado con mucho cariño a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. de registro 290564).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por la formación académica y las instalaciones. Mil gracias al equipo de posgrado: Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Elizabeth Olachea, Beatriz Adriana por su atenta ayuda en los trámites académicos.

Agradezco de manera especial a mi tutora la Dra. Ana María Ibarra Humphries por la formación académica: gracias por el invaluable tiempo, aclarar dudas, el acceso a artículos y libros, exigencias, enseñanzas, paciencia, revisiones y atención. Como investigadora eres un increíble ejemplo a seguir de dedicación y calidad. Como persona te admiro y quiero mucho, muchas gracias por tu amistad, apoyo, consejos, ayuda, confianza y motivación. ¡Mil gracias por todo!

A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez quien además de la cotutoría también estuvo a cargo de la asesoría en el laboratorio, muchas gracias por tu tiempo, tus valiosos comentarios y revisiones, enseñanzas y paciencia; para mí fue todo un reto entrar en el laboratorio pero con tu ayuda todo fue posible. Muchas gracias por brindarme tu amistad, consejos, por entenderme y motivarme cuando lo necesité.

Al Dr. Arnaud Huvet por su contribución en el presente trabajo con sugerencias y correcciones.

Al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola a los técnicos: M. en C. Susana Ávila, M. en C. José Luis Ramírez y Gabriel González Gómez gracias por el apoyo técnico en el laboratorio para este trabajo. Muchas gracias por aclarar mis dudas y apoyar en los muestreos.

A los compañeros de laboratorio: Raúl, Betsa, Susana, José Luis, Pavel, Claudia, Rosi, Mayra, Alejandra, Nacho, Ana María Millán, Noé. Quienes compartieron su amistad y de alguna manera amenizaron la estancia en el laboratorio, además de compartir tips técnicos.

Un agradecimiento especial a Raúl Llera por brindarme consejos técnicos (que me ayudaron infinitamente) y resolver mis dudas o hacerlas más grandes. Muchas gracias Ruuul eres un excelente amigo y maestro!

Agradezco por el apoyo técnico para este trabajo a Jesús Neftali Gutiérrez Rivera y Griselda Francisca Gallegos Simental (laboratorio de Biología Molecular); María de Jesús Romero por el soporte técnico para este trabajo (Laboratorio de Patogénesis Microbiana), Julio A. Hernández González por el apoyo técnico para este trabajo (Laboratorio Biología Molecular de Plantas). Muchas gracias por las facilidades prestadas y los valiosos consejos técnicos.

A la Dra. María Teresa Sicard González por su apoyo académico en este trabajo.

Agradezco a los responsables del Laboratorio de cómputo Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga por su eficiente apoyo en el centro de cómputo.

Agradezco a quienes hacían la hora de la comida un momento especial: Clarissa, Carmen Blázquez, Pedro Cruz, José Luis Ramírez y Rosi. Gracias por su amistad y buen humor.

Agradezco a Claudia Ventura por su amistad y apoyo.

A los compañeros de generación principalmente: Claudia, Saúl-Orejas, Juan Carlos, Cristal, Carol, Ivonne, Mario y Mabilia, por su amistad y buenos momentos.

De manera especial agradezco a Luis Daniel por su amistad sincera e incondicional, por escuchar, por los consejos, por el gran apoyo, la alegría, cariño y confianza. ¡Muchas gracias por estar en todo momento!

Agradezco a Teresita (y familia), hermana incondicional e indispensable a pesar de la distancia. Gracias por todo el apoyo, consejos, ejemplo, por hacer que la distancia y el tiempo parezcan nada.

A las personas que prevalecen en todo momento brindando su apoyo y amistad: Lety, Mariano, Uriel, Nataly, Oswaldo, Rosario, Chato, Joel, José, Cea, Estefani, Estrella, Diego, Pablo, Diana, Francisco, Luis (y familia), Alejandra, Tzitziki, Ceci, Dani, Magda Lagunas, Leo, Cris, David y Emilio. Gracias a todos por su buen humor, consejos, aventuras, cariño, confianza y apoyo.

Al grupo que me enseñó a dar todo por el equipo Valeria (y familia), Yendi, Eli, Marina, Perla, Lluvia, Ivon, Liz y Carlos. Muchas gracias por ser parte importante en mi vida, por todo el apoyo y cariño.

Agradezco a mi familia por ser quienes me recuerdan de donde vengo y lo ilimitado que puede ser a donde voy. Son la parte más importante en mi vida, muchas gracias por el apoyo, cariño y guía.

Agradezco al personal de vigilancia.

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico): molécula de doble cadena de polinucleótidos que se mantienen unidos en su configuración helicoidal mediante puentes de hidrógeno entre bases de cadenas opuestas.

ADN genómico: corresponde a la totalidad del ADN aislado de una célula. Incluye al ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto.

ADNc: es el ADN complementario que se obtiene *in vitro* mediante la enzima transcriptasa inversa que utiliza como templado ARNm maduro.

Aminoácido: monómero que al unirse covalentemente mediante el enlace peptídico forma cadenas polipeptídicas.

Amplicón: conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esencialmente se trata de un clon molecular.

ARN (ácido ribonucleico): por lo general existe como un polímero monocatenario (una sola cadena) compuesto por una larga secuencia de nucleótidos unidos covalentemente. Adoptan estructuras secundarias y terciarias, con participación de secuencias dúplex, que le confiere mayor estabilidad. Clásicamente se distinguen tres clases de moléculas de ARN: ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosomal, los que participan en el proceso de traducción.

ARNm: molécula de ARN mensajero que se transcribe del ADN genómico nuclear y se traduce desde el extremo 5' al extremo 3' en una cadena polipeptídica.

Células foliculares: (análogas a las células auxiliares) células que tienen una citoestructura variable en función de la evolución de las células germinales a las cuales están estrechamente asociadas. Su característica principal es la presencia de un retículo endoplásmico granuloso.

Células germinales primordiales (PGC: *primordial germ cells*): son células fundadoras para la línea germinal. En muchos organismos, las PGCs son móviles y migran hacia la región somática de la gónada.

Células germinales: Células que se dividen por meiosis originando los gametos haploides (óvulo y espermatozoides).

Ciclo cuantitativo (Cq): el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia alcance el umbral (threshold).

Cruzas: Conjunto de organismos resultado del apareamiento entre diferentes líneas genéticas o poblaciones, producidas en una generación (=F1), dos generaciones consecutivas (=cruzas en tres vías), o más generaciones.

Curva de disociación (ver Tm): Visualiza los datos obtenidos durante la fase de la curva de disociación. Los picos de la curva de disociación pueden indicar la temperatura de desnaturalización (Tm) de un amplicón o la presencia de amplificaciones no específicas.

Curva estándar relativa: Método basado en diluciones seriales (por triplicado) de una cantidad conocida de muestra. Ayuda en el cálculo de la eficiencia de la PCR, y como control positivo al definir el rango dinámico y el límite de detección.

Diploides: condición en que cada cromosoma existe en pares con igual longitud, posición del centrómero y secuencia de genes.

DNasa (deoxirribonucleasa): clase de enzima que rompe los enlaces fosfodiésteres del ADN originando fragmentos oligonucleotídicos.

dNTP: deoxinucleósido trifosfato. Se distinguen dATP, dCTP, dTTP y dGTP. El grupo trifosfato se encuentra siempre localizado en posición 5'. Son los precursores utilizados en reacciones de polimerización de ADN.

Dominio: segmento de un polipéptido o de ADN que tiene propiedades específicas conocidas. Cualquier región de una proteína asociada a una función específica (dominio funcional), con independencia de su organización estructural. Cada dominio funcional puede contener uno o más dominios estructurales. Los dominios estructurales son

secuencias continuas de aminoácidos de una proteína que se dobla o pliega varias veces sobre sí misma hasta formar una unidad globular o compacta.

ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas): utiliza una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Expresión génica: se refiere a los procesos de replicación del ADN, transcripción y traducción.

Factor de transcripción: son proteínas específicas que requieren cada una de las ARN polimerasas eucariontes para el inicio de la transcripción.

Fagocitosis: Es una reacción de defensa celular, junto con otros mecanismos humorales constituye la primera línea de defensa inmunitaria cuando una partícula atraviesa la primera barrera de defensa. Involucra la eliminación de materiales extraños del hemocele, donde se ven involucradas varias clases de células.

Gen: unidad física y funcional que ocupa una posición específica en el genoma. Para genomas eucariontes y procariontes corresponde a una secuencia de ADN de doble hebra.

Generación filial 1: generación de individuos productos de cruzamientos. La primera generación se denomina F1.

Genes blanco: se refiere a los genes de interés en el análisis de expresión por qPCR.

Genes de referencia: se utiliza como control interno en un ensayo. Este corrige las variaciones de muestra a muestra en la eficiencia de la RT-PCR y errores en la cuantificación de la muestra.

Genotipo: constitución genética de un organismo. Generalmente no es observable a nivel del organismo vivo.

Hemocitos: fracción celular de la hemolinfa, son capaces de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad. Existen tres tipos de hemocitos: hemocitos hialinos, que no poseen gránulos; los hemocitos semigranulosos, con abundantes gránulos; y los hemocitos granulosos, cargados de gránulos.

Hemolinfa: En los crustáceos la hemolinfa es un análogo a la sangre y linfa de los vertebrados. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (proteína respiratoria). Los hemocitos constituyen la fracción celular de la hemolinfa.

Heterociguidad: La proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios loci. Es un estimador de la variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

Línea umbral (Threshold): Nivel de fluorescencia por encima de la línea basal y dentro de la región de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación durante una PCR en tiempo real.

Líneas genéticas: se entiende por línea genética un conjunto de organismos que son reproducidos entre sí únicamente, y que por procesos de deriva genética presentarán diferencias en frecuencias alélicas con otras líneas reproducidas entre sí solamente.

Localización subcelular: se refiere a la localización de orgánulos del interior de la célula (por ejemplo: el citoesquelético, núcleo, inclusiones citoplasmáticas).

Meiosis: es el proceso de la reproducción sexual mediante el cual el número de cromosomas de las células germinales diploides ($2n$) se reduce a la mitad (n) durante la formación de células reproductoras maduras o gametos. Esta reducción se logra mediante dos divisiones celulares sucesivas en las cuales los cromosomas se duplican sólo una vez.

Mitosis: corresponde a la separación de los cromosomas previamente duplicados en la fase S del ciclo celular. Cada célula hija recibe la misma cantidad de material genético.

Oligonucleótido: Secuencia corta que se sintetiza a partir de la enzima primasa. Proporciona un extremo 3' OH libre para que las enzimas DNA polimerasa prosigan el proceso de síntesis de ADN.

PCR (siglas en ingles de Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa. Es un método utilizado para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de ADN o ADNc a partir de cadenas pequeñas de muestra.

Ploidía: Se refiere al número de series de cromosomas (diploidía=dos series de cromosomas o $2n$; triploidía= tres series de cromosomas o $3n$).

qPCR: Técnica que permite la medición cuantitativa de un gen específico en una muestra de ácidos nucleicos.

RNAsa: Enzimas (nucleasas) distribuidas en todos los tejidos capaz de catalizar la hidrólisis de ARN; se dividen en endonucleasas y exonucleasas.

Temperatura de disociación (T_m): Temperatura de fusión (melting) del ADN, corresponde a la temperatura en la cual el 50% del ADN tiene sus hebras separadas.

Transcripción: Síntesis enzimática de ARN utilizando un templado de ADN catalizada por la ARN polimerasa con el auxilio de proteínas específicas (factores de transcripción). Comprende tres fases: iniciación, elongación y terminación.

Transcrito: es el producto de ARN que se obtiene inmediatamente después de la transcripción.

Triploides: se refiere a la existencia de tres conjuntos de cromosomas. La célula por lo tanto es $3n$.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
GLOSARIO	viii
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABLAS	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Características reproductivas de <i>Crassostrea gigas</i>	4
2.2. Efecto de la temperatura sobre la reproducción y crecimiento de <i>C. gigas</i>	7
2.3. Esfuerzo reproductivo de <i>C. gigas</i>	8
2.4. Genes involucrados en la reproducción de <i>C. gigas</i>	10
2.4.1. Características de los genes de la familia Fox y las proteínas Forkhead	10
2.4.2. Características de los genes de la familia DEAD-box y la proteína VASA	12
2.4.3. Características de los genes de la familia TGF- β y la proteína TGF- β	17
2.4.4. Características de los genes de la familia <i>vtg</i> y la proteína VTG	21
2.5. Conformación de un pie de cría de <i>C. gigas</i> para el Noroeste de México	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. HIPÓTESIS	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. Organismos experimentales	28
6.2. Área de preengorda	29
6.3. Preengorda	30
6.4. Diseño experimental	31
6.5. Colecta de información y tejidos	32
6.6. Análisis histológicos	33
6.6.1. Proporciones sexuales	33
6.6.2. Estadios de Desarrollo Gonádico	34
6.6.2.1. Análisis Cualitativo	34
6.6.3. Área de tejido gonadal	35
6.6.4. Índice de madurez gonádica	36
6.6.5. Biomasa de gónada	37
6.7. Análisis de expresión génica cuantitativa por PCR de tiempo real	37
6.7.1. Extracción de ARN, tratamiento con DNAsa y RT-PCR	37
6.7.2. Genes de referencia	38
6.7.2. Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR	39
6.7.3. Validación de genes de referencia para el análisis en muestras de gónada de diferentes sexos y estadios	42

6.7.4. Análisis de expresión del gene <i>vtg</i>	44
6.7.5. Análisis de expresión de los genes <i>OyVlg</i> , <i>Cg-Foxl2</i> y <i>og-TGFβ-like</i>	44
6.8. Análisis estadísticos.....	46
6.8.1. Análisis de variables morfométricas.....	46
6.8.2. Análisis del estadio de desarrollo gonádico.....	46
6.8.3. Análisis de las proporciones de sexos.....	47
6.8.4. Análisis del esfuerzo reproductivo, del diámetro y número de ovocitos, del índice de madurez gonádica y de la biomasa de gónada.....	47
6.8.5. Análisis de la expresión génica.....	47
7. RESULTADOS	49
7.1 Variables morfométricas.....	50
7.2 Desarrollo de gónada y sexos.....	54
7.2.1. Análisis cualitativo de estadios de desarrollo gonádico.....	54
7.2.2. Análisis cuantitativo de estadios de desarrollo gonádico.....	57
7.2.3. Frecuencias de sexos en las cruzas de <i>C. gigas</i>	59
7.2.4. Índice de área gonadal, número y área de ovocitos, e índice de madurez ovárica.....	61
7.3. Análisis de expresión génica.....	69
7.3.1. Estabilidad de los genes de referencia.....	69
7.3.2. Expresión de los genes <i>Cg-Foxl2</i> , <i>OyVlg</i> , <i>og-TGF-β</i> y <i>vtg</i>	77
7.3.2.1. Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>Cg-Foxl2</i> en gónada de ostión <i>C. gigas</i>	77
7.3.2.2. Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>OyVlg</i> en gónada de ostión <i>C. gigas</i>	80
7.3.2.3. Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>og-TGF-β</i> en gónada de ostión <i>C. gigas</i>	82
7.3.2.4. Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>vtg</i> en gónada de ostión <i>C. gigas</i>	84
8. DISCUSIÓN	86
8.1. La maduración gonádica y los estadios gametogénicos de dos cruzas genéticas de <i>C. gigas</i> en respuesta a la temperatura.....	88
8.3. Expresión de los genes <i>Cg-Foxl2</i> , <i>Vasa</i> , <i>Og-TGFβ</i> y <i>vtg</i> en la gónada de los grupos genéticos de <i>C. gigas</i>	94
Expresión del gen <i>Cg-Foxl2</i> entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.....	97
Expresión del gen <i>OyVlg</i> (<i>vasa-like</i>) entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.....	99
Expresión del gen <i>og-TGF-β</i> entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.....	102
Expresión del gen <i>vtg</i> entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.....	103
9. CONCLUSIONES	105
10. RECOMENDACIONES	107
11. LITERATURA CITADA	108
12. ANEXOS	120
I. Técnica histológica.....	120
II. Técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina.....	121
III. Extracción de ARN.....	122
IV. Gel MOPS.....	124

V. Tratamiento con DNAsa.....	125
VI. Síntesis de ADNc	126
VII. Eva green 1x	128
VIII. Q-PCR	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de las células germinales, desde la fecundación a la madurez sexual. Imagen modificada de Fabioux (2004).....	4
Figura 2. A) Anatomía del ostión (Galtsoff, 1964) y B) área gonádica (Naimi, 2009).....	5
Figura 3. Sección transversal de ostión que muestra el área que ocupa la gónada. M: manto; GA: área de gónada; DD: glándula digestiva; DT: tracto digestivo. Tomado de Franco et al. (2008).....	10
Figura 4. Estructura tridimensional del dominio <i>Forkhead</i> de Cg-Foxl2. Se observa el motivo hélice-giro-hélice (rosa) y tres hebras β antiparalelas (amarillo). Tomado de Naimi (2009).....	11
Figura 5. Estructura de la superfamilia de proteínas DEAD-box con un sitio de unión análogo a ATP (negro). Las secuencias de los motivos conservados están coloreados de acuerdo a su función bioquímica: rojo, unión al ATP e hidrólisis; amarillo, actividad ATPasa y unión de polinucleótidos; azul, unión de ácidos nucleicos. Imagen tomada de Jankowsky & Fairman (2007).....	13
Figura 6. Localización de la proteína Vasa dentro del ovocito y embrión temprano de <i>Drosophila melanogaster</i> . Imagen modificada de Fabioux (2004) y Lodish et al. (2004).....	16
Figura 7. Vías de señalización de los ligandos de la superfamilia TGF- β . 1) Interacción del ligando con el receptor tipo II fosforilado. 2) Formación del heterotetramero por el reclutamiento del receptor tipo I. 3) Transfosforilación del receptor tipo I por el receptor II. 4) Reclutamiento y fosforilación del receptor activo Smad. 5) Dimerización con el Smad común Smad 4. 6) Transcripción de los genes blancos por el Smad asociado con otras proteínas en el sitio de unión del ADN (Co-FT: Co-factor de transcripción. Modificado de Herpin et al. (2004).....	19
Figura 8. Conformación de un pie de cría de <i>C. gigas</i> para el Noroeste de México.....	25
Figura 9. Cruzas en tres vías a evaluar, las que están en amarillo contienen 50% genoma materno de la línea original de Australia, y 25% de cada una, la línea Chile y la línea EU en forma recíproca. Las que están en azul tienen 50% de su genoma derivado paternamente de la línea EU, y 25% de cada una, Australia y Chile en forma recíproca. Lo que varía dentro de cada color es la crucea recíproca utilizada para cruzar con Australia o EU.....	28
Figura 10. Sitio de preengorda de las cruces experimentales de <i>C. gigas</i> en Laguna San Ignacio (LSI) en Baja California Sur.....	30
Figura 11. Tratamientos de las cruces estudiados con temperaturas.....	32
Figura 12. Ostión <i>C. gigas</i> : en rojo la sección transversal tomada para análisis histológicos.....	33
Figura 13. Desarrollo gonádico de <i>C. gigas</i> . Estadios 1, 2, 3 y 4. Ovocitos adheridos (ao), tejido conectivo (ct), ovocito degradado (do), folículo (f), pared del folículo (fw), ovocito en crecimiento (go), ovocito maduro (mo), ovocito primario (po) (Imagen tomada de Lango-Reynoso et al. 2000).....	35
Figura 14. Análisis del área visceral y gonádica con el programa Imaq Vision Builder. ...	36

Figura 15. Medias significativas en variables biométricas de cruzas de <i>C. gigas</i> traídas de Laguna San Ignacio. (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa. ...	49
Figura 16. Medias significativas en variables biométricas de cruzas de <i>C. gigas</i> . (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa.	51
Figura 17. Medias de crecimiento en <i>C. gigas</i> crecidos en diferentes temperaturas. (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa; (D) índice de condición (IC).....	52
Figura 18. Crecimiento en longitud (A), peso total (B), biomasa (C) e IC (D) en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $EU \times F1_{(CH:AU)}$ de <i>C. gigas</i> crecidas en diferentes temperaturas.	53
Figura 19. Porcentaje de estadios de desarrollo gonádico por cruza en cada temperatura: (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$	54
Figura 20. Porcentaje de estadios de desarrollo gonádico por cruza (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$ en cada temperatura en cada sexo: Indiferenciados (I); machos (M); hembras (F); y hermafroditas (H).	55
Figura 21. Estadios de desarrollo gonádico en <i>C. gigas</i> . A: Indiferenciados (barra=100 μ m); I: gametogénesis temprana, II: gametogénesis tardía, III: madurez y B: hermafrodita (barra= 50 μ m). TC: tejido conectivo; F: folículo; GD: glándula digestiva; N: núcleo; OG: ovogonia; OP: ovocito previtelogénico; OV: ovocito vitelogénico; OM: ovocito maduro; EG: espermatogonia; EC: espermatocito; ED: espermátida; EZ: espermatozoide; L: lumen. Indiferenciado: A; Machos: C, E, G; Hembras: B, D, F; Hermafrodita: H.	56
Figura 22. Estadios de desarrollo gonádico promediado en ambas cruzas de <i>C. gigas</i>	57
Figura 23. Estadios de desarrollo gonádico promediado en diferentes temperaturas a las que se sometió a <i>C. gigas</i>	58
Figura 24. Estadio de desarrollo gonádico promediado en cruzas de <i>C. gigas</i> sometidas a diferentes temperaturas.	59
Figura 25. Frecuencia de sexos encontrados en <i>C. gigas</i> bajo las temperatura de cultivo. F=hembras; M= machos; H= hermafroditas; I= indiferenciados.	59
Figura 26. Frecuencia de sexos encontrados en los grupos de <i>C. gigas</i> evaluados. F=hembras; M= machos; H= hermafroditas; I= indiferenciados.	60
Figura 27. Porcentaje de sexos (hembra: rojo; macho: azul; hermafrodita: morado; indiferenciado: verde) por cruza: (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$	60
Figura 28. Área de cobertura gonadal promedio en las cruzas $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $EU \times F1_{(CH:AU)}$ de <i>C. gigas</i> . Los valores se expresan en Arcoseno.	62
Figura 29. Área de cobertura gonadal promedio de <i>C. gigas</i> sometido a diferentes temperaturas. Los valores se expresan en Arcoseno.	62
Figura 30. Área de cobertura gonadal de cada cruza de <i>C. gigas</i> sometidas a diferentes temperaturas. Los valores se expresan en Arcoseno, y las líneas con desviaciones representan los intervalos de confianza de cada media.	63
Figura 31. Número de cada tipo de ovocitos de las cruzas de <i>C. gigas</i> sometidos a 27°C. <i>pv</i> : ovocitos previtelogénicos; <i>vit</i> : ovocitos vitelogénicos; <i>ptv</i> : ovocitos post-vitelogénicos; <i>dg</i> : ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.	64

- Figura 32.** Número de cada tipo de ovocitos de las cruza de *C. gigas* sometidos a 31°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos post-vitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media..... 65
- Figura 33.** Área de cobertura por tipo de ovocito en ostiones *C.gigas* sometidos a 27°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos postvitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media..... 66
- Figura 34.** Área de cobertura por tipo de ovocito en ostiones *C.gigas* sometidos a 31°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos postvitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media..... 67
- Figura 35.** Índice de madurez ovárica (MO, μm^2) en ostiones hembras de *C. gigas* en temperaturas de 27 y 31°C. Las líneas con desviaciones denotan intervalos de confianza para cada media. 67
- Figura 36.** Área de cobertura gonadal de F III cada cruza de *C. gigas* sometidas a 27°C y 31°C. Los valores se expresan en Arcoseno, y las líneas con desviaciones representan los intervalos de confianza de cada media..... 68
- Figura 37.** Biomasa de gónada en ostiones hembras maduras de *C. gigas* en temperaturas de 27°C y 31°C..... 69
- Figura 38.** Estabilidad de expresión promedio (M) de los genes de referencia candidatos. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF- β* ; B) genes para normalizar *vtg*..... 70
- Figura 39.** Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF- β* ; B) genes para normalizar *vtg*. 71
- Figura 40.** Análisis de estabilidad de expresión génica de los genes candidatos utilizando NormFinder. El valor más bajo es otorgado al gen más estable en un conjunto de muestras. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF- β* ; B) genes para normalizar *vtg*. 72
- Figura 41.** Medias del Ciclo cuantitativo (Cq) para los genes de referencia y genes blanco evaluados en gónada de *C. gigas*. El valor Cq promedio se muestra como una línea (—), los cuadros indican el error estándar (\square) y el rango abarca la desviación estándar (\square). La línea punteada separa los genes de referencia de los genes de blanco. 76
- Figura 42.** Expresión relativa (ER) de *Cg-Foxl2* en gónada de *C. gigas* hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y cuatro (MIV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media..... 78
- Figura 43.** Expresión relativa (ER) de *Cg-Foxl2* en gónada de *C. gigas* indiferenciadas (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media. 79
- Figura 44.** Expresión relativa (ER) de *OyVlg* en gónada de *C. gigas* hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y

cuatro (MIV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.....	81
Figura 45. Expresión relativa (ER) de <i>OyVlg</i> en gónada de <i>C. gigas</i> indiferenciados (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.	82
Figura 46. Expresión relativa (ER) de <i>og-TGF-β</i> en gónada de <i>C. gigas</i> hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y cuatro (MIV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.....	83
Figura 47. Expresión relativa (ER) de <i>og-TGF-β</i> en gónada de <i>C. gigas</i> indiferenciados (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.	84
Figura 48. Expresión relativa (ER) de <i>vtg</i> en gónada de <i>C. gigas</i> indiferenciados (I), hembras en estadio uno (F I) y tres (FIII). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.	85
Figura 49. Ostiones hembras en estadio III de <i>C. gigas</i> sometidos a 31°C de las cruzas F1 _(CH:EU) x AU (A) y EU x F1 _(CH:AU) (B) (barra= 100μm). F: folículo; OG: ovogonia; OP: ovocito previtelogénico; OV: ovocito vitelogénico; OM: ovocito maduro.	101

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Función de los genes de referencia evaluados.	39
Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos-cebadores de los genes de referencia y genes blancos. T: temperatura de alineamiento; pb: pares de bases; Tm: temperatura de disociación calculada; Cq: Cq mínimo de la curva estándar; Tm: temperatura de disociación; e: eficiencia.	41
Tabla III. Número de muestras utilizadas para evaluar la estabilidad en la expresión de los posibles genes de referencia.	44
Tabla IV. Número de individuos por sexo y temperatura experimental de la que fueron tomados para ser analizados en su expresión de los genes <i>OyVlg</i> , <i>og-TGFβ-like</i> y <i>Cg-Foxl2</i>	45
Tabla V. Valores de significancia (<i>P</i>) encontrados en el análisis de varianza evaluando diferencias en caracteres morfométricos entre cruzas de <i>C. gigas</i> traídas de Laguna San Ignacio.	50
Tabla VI. Valores de significancia (<i>P</i>) encontrados en el análisis de varianza evaluando diferencias en caracteres morfométricos entre cruzas de <i>C. gigas</i> mantenidas por 31 días a diferentes temperaturas.	50
Tabla VII. Análisis de varianza con el modelo lineal generalizado (GLZ) evaluando el efecto de la craza y temperatura, así como la interacción entre estos (con biomasa como covariable) sobre los estadios de desarrollo gonádico de <i>C. gigas</i>	57
Tabla VIII. Análisis de varianza evaluando el efecto de la craza y temperatura, así como la interacción entre estos sobre el índice de área gonadal de <i>C. gigas</i>	61
Tabla IX. Valores pareados del promedio de estabilidad de expresión (M). A) genes para normalizar <i>Cg-FOXL2</i> , <i>Oyv1</i> y <i>og-TGF-β</i> ; B) genes para normalizar <i>vtg</i>	70
Tabla X. Variación entre-grupos (<i>Normfinder</i>).	72
Tabla XI. Análisis de estabilidad de expresión en <i>BestKeeper</i> de los genes de referencia para normalizar <i>Cg-FOXL2</i> , <i>Oyv1</i> y <i>og-TGF-β</i>	73
Tabla XII. Análisis de estabilidad de expresión en <i>BestKeeper</i> de los genes de referencia para normalizar <i>vtg</i>	74
Tabla XIII. Análisis de varianza evaluando el efecto de la craza, temperatura, sexo y estadio sobre la expresión relativa de <i>act-β</i> , <i>ef2α</i> y <i>28S</i>	75
Tabla XIV. Análisis de varianza evaluando el efecto de la craza, temperatura, sexo y estadio sobre la expresión relativa de <i>act-γ</i> , <i>ef2α</i>	75

1. INTRODUCCIÓN

Los ostiones pertenecientes al género *Crassostrea* son las especies de mayor importancia comercial a nivel global y tienen un alto potencial de desarrollo acuícola debido a su tolerancia a condiciones estuarinas y rápido crecimiento (Brown, 1988). *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) originaria de Japón, ha sido objeto de numerosas introducciones en aguas tropicales y actualmente es la especie más cultivada en el mundo (Cáceres-Martínez et al., 2004). El ostión del Pacífico *C. gigas* fue introducido a México en 1973 en Bahía de San Quintín en Baja California, bajo la Dirección General de Acuicultura y la Universidad Autónoma de Baja California. Este primer cultivo se llevó a cabo con semilla fijada en “concha madre” traída de los Estados Unidos de América (Islas-Olivares, 1975). Posteriormente se empezó a cultivar en algunos estados del noroeste de México, como Baja California Sur, Sonora y Sinaloa (Gallo-García et al., 2001). La producción de ostión en los estados del Noroeste de nuestro país es de unas 1,622 toneladas métricas anuales con un valor de 2.4 millones de dólares y aproximadamente 1,800 empleos sostienen esta actividad (Cáceres-Martínez et al., 2004). Actualmente a nivel mundial, la producción de esta especie es una de las más importantes en la industria acuícola (FAO, 2008).

Sin embargo, a pesar de la excelente producción histórica de *C. gigas*, a nivel mundial se empezó a reportar la ocurrencia de mortalidades masivas (50% o más de la población) durante el verano; a partir de los años 40's en Japón (Koganezawa, 1975) y posteriormente en diferentes partes del mundo, como Estados Unidos en los 50's (Cheney et al., 2000) y Francia en los 70's (Soletchnik et al., 1999). En México, en 1997 comenzaron a detectarse alarmantes mortalidades de ostión de semillas, juveniles y adultos en Sonora (Chávez-Villalba et al., 2007); y en 1998 en Bahía Falsa, BC (García-Esquivel et al., 2004).

A nivel mundial, independientemente de la localidad, las mortalidades han sido asociadas con altos niveles de nutrientes y una temperatura del agua que alcanza los 20°C o más (Malouf & Breese, 1977; Cheney et al., 2000; Malham et al., 2009). Un factor que ha sido observado asociado con el aumento de la temperatura, es la coincidencia con los meses en que los ostiones se encuentran en sus estadios de madurez sexual y desove (Mori, 1979;

Chávez-Villalba et al., 2002). Los estudios para entender las mortalidades masivas de *C. gigas* a nivel mundial han sido dirigidas hacia el análisis de los efectos de los factores ambientales sobre la fisiología del organismo (Soletchnik et al., 2005; Samain et al., 2007). De manera especial, se ha puesto particular interés en el efecto que tiene el ambiente en el crecimiento y reproducción de *C. gigas* (Pouvreau et al., 2006; Chávez-Villalba et al., 2007).

Dado que la regulación de la reproducción en *C. gigas* juega un papel primordial en la utilización de energía, diversos trabajos se han enfocado en identificar algunos de los genes que se encuentran relacionados con el desarrollo gonádico (Matsumoto et al., 2003; Fabioux et al., 2004^{ab}; Fleury et al., 2008). Por ejemplo, en *C. gigas* se caracterizó el desarrollo de células germinales mediante la expresión del gen *oyster-vasa-like* (*Oyvlg*) (Fabioux et al., 2004^a), con el cual se podría evaluar el papel de los parámetros ambientales en la regulación de la mitosis en gónada (Fabioux et al., 2004^{ab}; Fabioux et al., 2005). Investigaciones posteriores reconocieron la expresión diferencial de genes entre dos líneas de ostión (R y S), donde encontraron que respecto al desarrollo gamético el gen *og-TGF-β* (*oyster-gonadal-transforming growth factor*) (Fleury et al., 2010) tiene un efecto positivo en el desarrollo de las células germinales (Corporeau et al., 2011) y parece estar implicado en la vitelogénesis del ostión (Huvet et al., 2011). Otro gen que podría estar implicado en la vitelogénesis es *Cg-Foxl2* ya que su ARNm se ubica en ovocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos (Naimi et al., 2009). De manera similar, la vitelogenina (*vtg*), detectada solamente en el ovario es otro gen importante en el desarrollo de la gónada femenina (Matsumoto et al., 2003) se encuentra en las células foliculares donde Llera (2008) describió la expresión de *Cg-vtg1* y *Cg-vtg2* en *C. gigas* sugiriendo que podrían utilizarse como marcadores cuantitativos del esfuerzo reproductivo.

En *C. gigas* se han observado interacciones entre el fenotipo y el ambiente donde ciertas líneas genéticas (R y S) responden diferencialmente a las condiciones de verano, presentando en una línea un menor esfuerzo reproductivo y mayor resistencia a mortalidades (R) mientras que en la otra tiene un menor esfuerzo reproductivo y más susceptible (S) (Samain et al., 2007; Fleury et al., 2008). Por otra parte, en esta especie se

han señalado adaptaciones a las condiciones ambientales en distintas zonas en Francia (Enríquez-Díaz et al., 2009). Por lo tanto es importante desarrollar conocimiento para ser aplicado en programas de selección de líneas de *C. gigas* cultivadas en diferentes ambientes con el fin de, en un futuro seleccionar aquellos genotipos que determinan alguna característica fenotípica deseable desde el punto de vista comercial y/o del área o las condiciones ambientales del sitio de cultivo. Esto puede ser logrado a través de la definición de marcadores moleculares asociados al crecimiento, resistencia a temperaturas elevadas y desempeño reproductivo entre las líneas. En el presente estudio se analizó el efecto que tienen diferentes temperaturas en la reproducción y crecimiento de dos cruza genéticas de *C. gigas*, además de cuantificar la expresión de los genes *OyVlg*, *vlg*, *Cg-Foxl2* y *og-TGF- β* en relación al esfuerzo reproductivo. Estas cruza fueron obtenidas a partir del proyecto “Conformación de un pie de cría de ostión japonés para el Noroeste de México” a cargo de la Dra. Ana María Ibarra Humphries.

2. ANTECEDENTES

2.1. Características reproductivas de *Crassostrea gigas*.

En moluscos la distribución diferencial del plasma germinal durante la segmentación temprana del huevo origina la formación de las células germinales primordiales (PGC), la proliferación y diferenciación de estas posteriormente dará lugar a las células germinales que conformarán la gónada (Fig. 1) (Weidinger et al., 1999; Fabioux et al., 2004). La gónada de ostión es un órgano difuso y acinoso compuesto por lóbulos derechos e izquierdos situados entre la glándula digestiva y el epitelio exterior del manto. En ostiones maduros el acino llega a expandirse y aparece ocupando la mayor parte de la región entre el manto y la glándula digestiva (Fig. 2) (Eckelbarger & Davis, 1996).

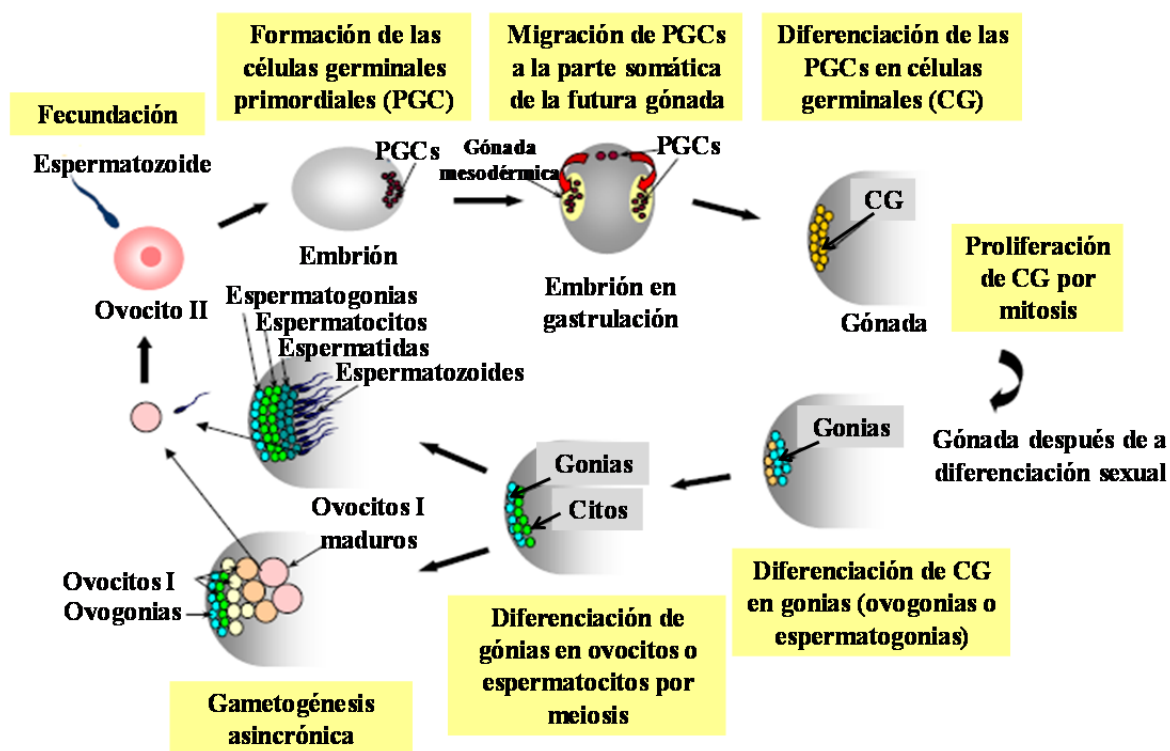


Figura 1. Desarrollo de las células germinales, desde la fecundación a la madurez sexual. Imagen modificada de Fabioux (2004).

La mayoría de los trabajos (Lango-Reynoso et al., 2000; Dridi et al., 2007; Royer et al., 2008; Castaños et al., 2009; Dutertre et al., 2009; Enríquez-Díaz et al., 2009; Jouaux et al., 2010) que reportan el desarrollo gonádico en *C. gigas* se realizan con ostiones cultivados en campo por lo que los resultados son muy variados al ser diversos los factores que influyen en la reproducción. En el caso de la salinidad, cuando esta es baja puede resultar en reducción del tamaño y reducción del desarrollo de tejido gonadal (Hofmann et al., 1994); de igual forma salinidades de 41 ups y temperaturas de 34°C resultan en poco desarrollo gonádico (Hughes-Games, 1977). Por otra parte la concentración de alimento determina la intensidad de la gametogénesis, incluso los ostiones crecidos en diferentes ambientes al inicio de un nuevo ciclo gamético pueden desarrollar diferentes estrategias reproductivas (desoves completos y sincronizados o desoves parciales no sincronizados) (Enríquez-Díaz et al., 2009). La presencia de patógenos es otro factor que influye en la reproducción, conociéndose que la infección con *Perkinsus marinus* puede afectar la reproducción de dos formas: 1) una menor frecuencia en desoves; o 2) que el número de ovocitos por desove sean menores (Choi et al., 1993). Además de que la presencia de patógenos también se han relacionados con las mortalidades de verano (Cáceres-Martínez et al., 2004; Friedman et al., 2005; Burge et al., 2006; Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans, 2008). Debido a todos los factores que influyen en la reproducción de *C. gigas* y a la amplia gama de respuestas ante los cambios, se dice que esta especie muestra una elevada plasticidad fenotípica en la reproducción (Enríquez-Díaz, 2004).

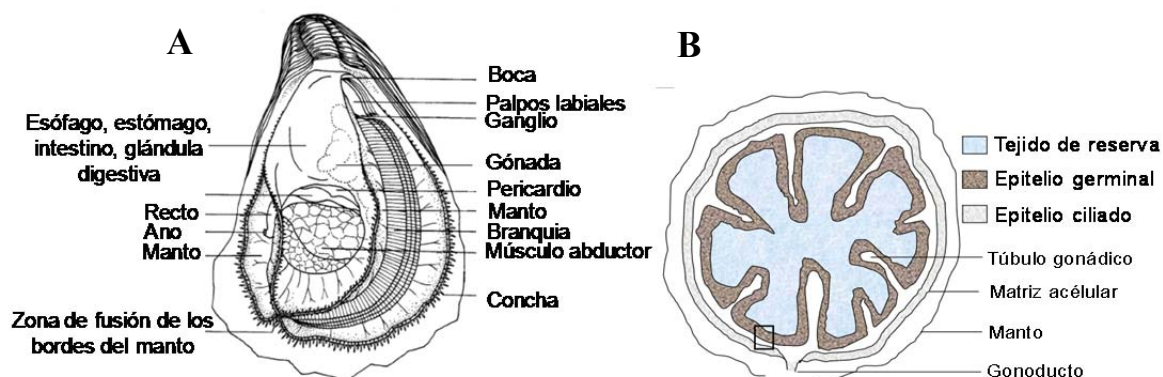


Figura 2. A) Anatomía del ostión (Galtsoff, 1964) y B) área gonádica (Naimi, 2009).

El patrón de desove también depende del sexo de los ostiones, en cultivos se ha visto que aun cuando machos y hembras inician el desove al mismo tiempo, los machos presentan un periodo de desove más prolongado que las hembras. Otro determinante en el desove es la talla del ostión, los ostiones grandes terminan de desovar antes que los ostiones medianos y pequeños que terminan hasta dos meses después (Castaños et al., 2009), los ostiones pequeños también se caracterizan por desovar más frecuentemente (Hofmann et al., 1994) ya que es menor el tiempo en que producen la cantidad de gametos que se sugiere necesaria para desovar (20% del peso seco) (Choi et al., 1993) comparada con los ostiones grandes en donde la proporción de gametos producidos es menor en relación a su tamaño y tardan más en producir la cantidad de gametos necesarios para desovar (Hofmann et al., 1992; Choi et al., 1993). La latitud, es otro factor determinante en el patrón de desove puesto que en latitudes menores con climas cálidos la temporada de desove es más larga, mientras que en latitudes altas con climas fríos las temporadas de desove son estrechas y marcadas (Hofmann et al., 1994; Baqueiro et al., 2007). En cuanto a la proporción de sexos, esta se ha explicado con base en la talla de los organismos, al observarse que los ostiones <27 mm maduran como machos, mientras que en ostiones >40mm la proporción de machos y hembras es 1:1, y finalmente los ostiones ~70-80 mm tienen una ligera predominancia a ser hembras (Castaños et al., 2009; Chávez-Villalba et al., 2008).

La actividad reproductiva se vuelve una desventaja puesto que algunas de las actividades de los hemocitos (fagocitosis y adhesión) disminuyen durante la gametogénesis, especialmente cuando la gónada se acerca a la madurez (Delaporte et al., 2006) lo que puede llevar a una disminución en las defensas contra patógenos durante la temporada reproductiva (Huvet et al., 2010). Aunado a lo anterior, la gametogénesis es un proceso que involucra un fuerte consumo de energía (Delaporte et al., 2007). En Francia describieron diferencias entre dos líneas de ostión llamadas "R" y "S", en cuanto a la intensidad de la gametogénesis y el desove, además de presentarse una correlación negativa entre la supervivencia y reproducción encontrada solamente en condiciones de poco alimento (Huvet et al., 2010). Dado que el consumo de energía resulta en una mayor actividad mitocondrial y producción de ROS (especies reactivas de oxígeno), los ostiones que invierten más en la reproducción ("S") producen una mayor cantidad de ROS que los ostiones que invierten menos en la

reproducción (“R”), lo que refleja un mayor disturbio o estrés fisiológico en “S” (Delaporte et al., 2007). También se ha descrito que los ostiones “S” tienen una menor expresión en genes que codifican para la glucosa 6P (hexoquinasa, fosfoglucomutasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) (que tiene la función satisfacer rápidamente los requisitos energéticos celulares) después de eventos de mortalidad comparado con los ostiones “R”, esta diferencia puede estar relacionada con diferentes mecanismos de adquisición y gasto de energía (Samain et al., 2007).

2.2. Efecto de la temperatura sobre la reproducción y crecimiento de *C. gigas*.

La salinidad, el alimento y la temperatura son los factores principales que controlan los procesos fisiológicos en el ostión, sin embargo, la temperatura parece ser el factor que tiene mayor efecto en los procesos fisiológicos del ostión, principalmente en el ciclo reproductivo de esta especie (Ren et al., 2003). La temperatura tiene un efecto directo sobre la fisiología de los bivalvos por lo que se le ha dado considerable atención al efecto de la temperatura sobre la reproducción y crecimiento (Shpigel et al., 1992). Los primeros estudios que relacionaron el efecto de la temperatura con la reproducción se enfocaron a aspectos bioquímicos, en los que se registró, que incrementos en la temperatura repercuten en una disminución de proteínas y carbohidratos, mientras que el contenido lipídico tiende a aumentar (Flores-Vergara et al., 2004). En cultivos de ostión se ha visto que la gametogénesis es dependiente tanto de la temperatura como del tiempo de exposición, en Francia el inicio de la gametogénesis empieza cuando el agua alcanza una temperatura de 18°C (Lango-Reynoso et al., 1999). Mientras que en Corea las temperaturas mínimas requeridas para inducir el desove van de 18°C a 20°C (Kang et al., 2000). En Argentina el crecimiento de los ovocitos coincide con un incremento en la temperatura de 14.6°C a 17.8°C (Castaños et al., 2009).

De manera similar, en experimentos de laboratorio bajo condiciones controladas se ha observado que la temperatura mínima requerida para inducir el desove es de 18°C (Mann, 1979). Mientras que el crecimiento temprano de los ovocitos se logra en condiciones aceleradas de temperatura y fotoperiodo (17.5 °C y 16 h luz) en presencia de abundante

comida (Chávez-Villalba et al., 2002^b). Una vez que se presentan ovocitos maduros en la gónada es posible alcanzar la madurez manteniendo la temperatura en un rango de entre 19°C a 25°C, por lo que se dice que la velocidad a la que crecen los ovocitos incrementa significativamente con la temperatura (Chávez-Villalba et al., 2002^a). Por otra parte con base en los análisis cualitativos y cuantitativos del ciclo gamético de *C. gigas* se ha observado que esta especie presenta una gran plasticidad fisiológica en su proceso reproductivo (Fabioux et al., 2005). Por ejemplo, en ostiones sometidos a condiciones invernales (8°C y 8 h luz/oscuridad) se presenta solo un ciclo gamético, mientras que en los sometidos a condiciones aceleradas (el doble de temperatura y fotoperiodo de las condiciones naturales) se observan dos ciclos gaméticos en un año; mientras que aquellos sometidos a condiciones “naturales” siguen un patrón gamético similar al observado en campo con un ciclo gamético unimodal cuyo incremento se observó de marzo a junio (Fabioux et al., 2005). En general, estos autores proponen que el alimento, la temperatura y el fotoperiodo dirigen el reloj interno reproductivo de *C. gigas*, el cual particularmente regula la proliferación gonádica y la maduración de células germinales.

También se ha observado un efecto de la temperatura en el peso de los ostiones, de tal forma que al tener el mismo alimento, pero someterlos a diferentes temperaturas y fotoperiodo desarrollan diferentes estrategias de crecimiento. Por ejemplo aquellos ostiones sometidos a condiciones aceleradas tienen menor índice de condición (IC) en contraste con ostiones mantenidos en condiciones invernales con mayor IC (Fabioux et al., 2005).

2.3. Esfuerzo reproductivo de *C. gigas*.

En la industria ostrícola es fundamental conocer la cantidad de gametos liberados y la fracción de producción neta empleada en el esfuerzo reproductivo (ER) para entender la historia de vida de los organismos, así como los patrones de crecimiento, susceptibilidad a patógenos, mortalidad, etc. (Choi et al., 1993; Kang et al., 2003; Delaporte et al., 2006). Con este fin se han desarrollado diversas técnicas que permiten evaluar el rendimiento reproductivo considerado como la cantidad de gametos liberados durante el desove. El cálculo del rendimiento reproductivo se cuantifica midiendo al ostión antes y después del desove, también inducido por temperatura o químicos para pesar la cantidad de gametos

liberados (Choi et al., 1993). Sin embargo estos métodos no pueden interpretarse como esfuerzo reproductivo ya que lo subestiman, puesto que los desoves no siempre son completos y pueden ocurrir varias veces durante la temporada reproductiva y con diferente intensidad. El esfuerzo reproductivo (ER) se ha definido como el número total de calorías desovadas (gametos liberados) (Hofmann et al., 1992). También se ha definido como la proporción de energía que es destinada a la reproducción (Todd & Havenhand, 1983); o la producción de gametos entre la producción total para un periodo definido (Enríquez-Díaz et al., 2009). En base a esta definición se han desarrollado técnicas histológicas, algunas de las cuales se enfocan en la dinámica de los procesos de maduración considerando el porcentaje de la gónada que ocupan los gametos, mientras que otras estiman el ER evaluando el área de la gónada comparada con el área de tejido visceral (Fig. 3) (Enríquez-Díaz, 2004; Royer et al., 2008; Enríquez-Díaz et al., 2009; Huvet et al., 2010). A pesar de la información cualitativa y semi-cuantitativa que brindan las técnicas histológicas, estas se han descrito como tardadas e inexactas (Choi et al., 1993).

También se han utilizado inmunoensayos de ELISA para cuantificar la cantidad de gametos y calcular tanto el estadio de desarrollo gonádico como el ER del ostión, además de calcular la cantidad de ovocitos o espermatozoides (Choi et al., 1993; Kang et al., 2003; Royer et al., 2008). A pesar de que el cálculo del ER obtenidos por histología se correlaciona con los resultados del ELISA (Kang et al., 2003), esta última subestima el porcentaje de la gónada una vez que emplea el peso de la masa visceral, mientras que la evaluación histológica se calcula con el peso total (Royer et al., 2008). A pesar de que la técnica de ELISA se considera suficientemente sensitiva para medir pequeñas cantidades de gametos, esta técnica tiene sus inconvenientes en cuanto a la sección de tejido que se utiliza puesto que los ovocitos no se distribuyen alrededor de todo el cuerpo del ostión sino que son más abundantes cerca del músculo abductor, además de la dificultad de evaluar en ostiones de tallas pequeñas (Choi et al., 1993; Royer et al., 2008). Otra desventaja del ELISA es que el anticuerpo pueda ligarse con otros componentes en lugar de la proteína del ovocito (reacción cruzada) (Royer et al., 2008).

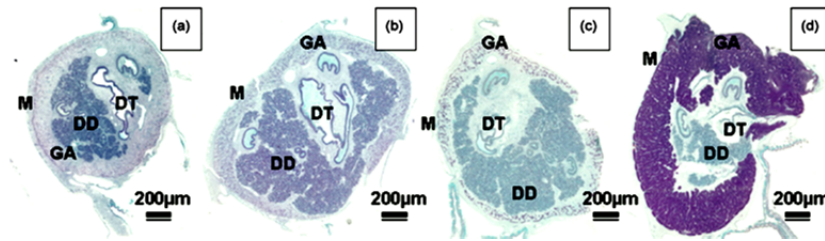


Figura 3. Sección transversal de ostión que muestra el área que ocupa la gónada. M: manto; GA: área de gónada; DD: glándula digestiva; DT: tracto digestivo. Tomado de Franco et al. (2008).

2.4. Genes involucrados en la reproducción de *C. gigas*.

2.4.1. Características de los genes de la familia Fox y las proteínas Forkhead.

La familia de genes Forkhead (Fox) comprende un gran y diverso grupo de factores de transcripción, algunos de estos genes *Fox* (como *Foxc1*, *-K1*, *-M1*, *N1* y *P3*) dan lugar a múltiples ARNm, debido a un sitio de inicio alternativo o sitios de poliadenilación, o por un empalme (*splicing*) diferencial de los transcritos primarios (Carlsson & Mahlapuu, 2002; Jonsson & Peng, 2005). En cuanto a su nomenclatura, se utiliza el término *Fox* (por “*Forkhead box*”) para referirse al mismo gen ortólogo en diferentes especies. Mientras que la literal que se incluye indica la familia (en las proteínas indica la sub-clase a la que pertenece) y dentro de las familia, cada gen (o la proteína que codifica) es identificado por un número (ej. *FoxF2*) (Kaestner et al., 2000). La mayoría de las mutaciones en los genes *Fox* se dan por sustituciones o desplazamientos del marco que deshabilita o quita el dominio de unión al ADN; estas sustituciones cambian el nivel de expresión que ocasiona la activación prematura o tardía de los genes blanco y modifica los procesos morfogénicos ocasionando trastornos en el desarrollo en los seres humano (Carlsson & Mahlapuu, 2002).

Por su parte, las proteínas Forkead tienen una gran diversidad de funciones y están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos (Carlsson & Mahlapuu, 2002). En cuanto a su estructura, se utiliza el término “winged hélix” (alas hélice) ya que posee un núcleo hélice-giro-hélice de tres α -hélices flanqueada por dos bucles o “alas” (Fig. 4). En la

mayoría de las proteínas Fox, el núcleo está conformado por el consenso RYMAAYA (R = A o G; Y = C o t M = A o C) (Carlsson & Mahlapuu, 2002; Kaestner et al., 2000). El dominio forkhead puede promover directamente la activación de los genes, mediante la apertura de la cromatina, y no sólo mediante un dominio activador de la transcripción (Carlsson & Mahlapuu, 2002).



Figura 4. Estructura tridimensional del dominio *Forkhead* de Cg-Foxl2. Se observa el motivo hélice-giro-hélice (rosa) y tres hebras β antiparalelas (amarillo). Tomado de Naimi (2009).

Mecanismos de acción de la proteína Foxl2-reproducción.

La proteína FOXL2 ha sido mayormente estudiada en humanos en donde se ubica en el núcleo lo que concuerda con su papel como factor de transcripción. FOXL2 se ha expresado en una población de células de la cresta femenina antes de la determinación sexual, mientras que en estadios tardíos FOXL2 se encuentra en altas concentraciones en células foliculares, en células del estroma (Cocquet et al., 2002) y en las células somáticas de los ovarios de fetos humanos, mientras que en gónada masculina la expresión es muy baja (Duffin et al., 2009). Las mutaciones en el gen *Foxl2* conduce al síndrome BPES (blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome), una enfermedad genética que involucran malformaciones del párpado asociada a la insuficiencia ovárica prematura (FOP) (tipo de BPES I) o que se presenta sin falla ovárica prematura (tipo II) (Baron et al., 2004; Duffin et al., 2009).

En ovarios de ratón se observó la expresión de *Foxl2* en células somáticas que potencialmente pueden ser células de la granulosa, teca o células del estroma. Sin embargo este gen no se observó en ovocitos (Pisarska et al., 2004). También en mamíferos se ha descrito que la proteína Foxl2 es un represor transcripcional del gen *Star* (un marcador de

la diferenciación en células de la granulosa) funcionando como supresor de la progresión de los folículos ováricos (Pisarska et al., 2004), sin embargo, para cumplir con estas funciones son necesarias modificaciones post-traduccionales (SUMO) (Kuo et al., 2009).

Por su parte en tratamientos de feminización en peces la expresión de *Foxl2* parece ser requerida en la gónada para su diferenciación en ovario (Baron et al., 2004). Con base en las funciones de *Foxl2* en la determinación sexual y crecimiento folicular, recientemente se ha sugerido que la expresión de *Foxl2* precede al inicio de la meiosis (Duffin et al., 2009). Esto coincide con una expresión mayor de *Foxl2* al inicio de la meiosis en los ovocitos en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Baron et al., 2004). En invertebrados existe un estudio realizado en el mosquito *Aedes aegypti* en el que se describe que *Foxl2* se requiere para la activación del gen vitelogenina (*Vn*), por lo que al inhibir *Foxl2* se reduce la deposición de huevos (Hansen et al., 2007).

Estudios del gen Foxl2 en C. gigas.

El único trabajo realizado con el gen *Foxl2* en *Crassostrea gigas* es el de Naimi et al. (2009) en el que describen la secuencia de aminoácidos de *Cg-Foxl2* (*C. gigas-Forkhead box 12*) con un dominio altamente conservado *Forkhead* característico de las proteínas de la familia FOX. Estos autores encontraron un ligero aumento en la expresión de *Cg-Foxl2* entre los 7 días post-fertilización y 1.5 meses, y posteriormente un decremento en el transcrito, a excepción del mes 3.5 cuando éste incrementó nuevamente. Mientras que en ostiones adultos el transcrito (ARNm) de *Cg-Foxl2* aumentó conforme avanzó el desarrollo gonádico y presentó la máxima expresión en el estadio de madurez, sin embargo no encontraron diferencias significativas entre sexos. El transcrito fue encontrado en células germinales, con una débil señal (por hibridación *in situ*) en ovogonias y ovocitos pre-vitelogénicos, mientras que la señal observada fue más intensa en ovocitos vitelogénicos; y en machos desde espermatogonias hasta espermatozoos (Naimi et al., 2009).

2.4.2. Características de los genes de la familia DEAD-box y la proteína VASA

El gen *vasa* se identificó primero en *Drosophila melanogaster* como un gen efector materno requerido para la formación de segmentos abdominales y en la especificación de

las células germinales (Raz, 2000). Este gen pertenece a la familia de proteínas ARN helicasas dependientes de ATP, y su proteína se caracteriza por presentar una región central de 290-360 aminoácidos, conformada por cinco u ocho elementos estructurales llamados motivos D-E-A-D box (llamados así por la secuencia Asp-Glu-Ala-Asp) (Castrillon et al., 2000). En general la estructura proteica posee dos dominios helicasa con secuencias conservadas de motivos involucrados en unión al ATP, motivos responsables de retransmitir el estado de hidrólisis de ATP hacia el sitio de unión de ácidos nucleicos (Fig. 5) (Jankowsky & Fairman, 2007).

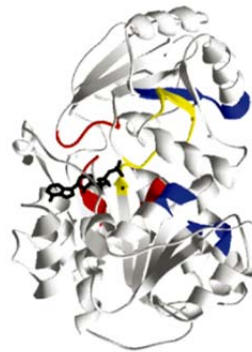


Figura 5. Estructura de la superfamilia de proteínas DEAD-box con un sitio de unión análogo a ATP (negro). Las secuencias de los motivos conservados están coloreados de acuerdo a su función bioquímica: rojo, unión al ATP e hidrólisis; amarillo, actividad ATPasa y unión de polinucleótidos; azul, unión de ácidos nucleicos. Imagen tomada de Jankowsky & Fairman (2007).

Mecanismos de acción de la proteína VASA en la reproducción.

El transcrito *vasa* así como la proteína que codifica se encuentran en las células precursoras de células germinales primordiales (PGCs) de diferentes especies, estas células se dividen durante la segmentación temprana dando lugar a células hijas de la línea somática y germinal, siendo esta última la que dará lugar a los gametos (Baat et al., 1999).

En *Drosophila* se observó que el gen *vasa* es indispensable en la especificación de células germinales y la formación de segmentos abdominales (Raz, 2000). La función de la proteína VASA es unirse al ARNm como *Oskar* y *Nanos*, así como *Gurken* durante la ovogénesis, involucrados en el establecimiento de células germinales y de esta manera controlar el inicio de su traducción (Fig. 6) (Raz, 2000; Noce et al., 2001). El ARNm *Oskar*

codifica una proteína de unión al ARN responsable del ensamblaje de los gránulos polares que controlan el desarrollo de los tejidos que surgen de las regiones posteriores del embrión temprano, incluso del abdomen y las células polares, que son las precursoras de las células germinales. Por su parte Vasa activa la traducción de *Nanos* que se acumula en el plasma polar (Lasko & Ashburner, 1990). *Nanos* establece el gradiente de concentración de la proteína Hunchback (Hb) reprimiendo la traducción del transcrito materno *hb* y desencadenando una cascada de genes blanco permitiendo así la formación del patrón de segmentación del embrión (Bradshaw & Dennis, 2003; Lodish et al., 2004). Finalmente Gurken se localiza en la pared dorsal del ovocito, esta proteína actúa en la superficie de las células foliculares dorsales en que se apoya el ovocito activando receptores y promoviendo la expresión de otros genes sólo en la parte ventral de embrión (Lodish et al., 2004).

En general *vasa* ARNm materno se localiza en el citoplasma de los ovocitos sin una distribución específica en aves y *Drosophila* (Braat et al., 1999; Tsunekawa et al., 2000), mientras que en peces estos transcritos se encuentran subcelularmente durante las primeras divisiones de la segmentación hasta el estadio de 32 células (transición de blástula a gástrula) momento en el que su localización es citoplasmática (Yoon et al., 1997; Braat et al., 1999). En el caso del pez cebra *vasa* se empieza a expresar al llegar al estadio de mórula (~30 PGCs) (Knaut et al., 2000; Yoon et al., 1997). La proteína Vasa es esencial en la formación estructural del “nauge” (agregación de proteínas y ARN parecida a una inclusión citoplásmica frecuentemente asociado a mitocondrias) específico de la línea germinal (PGC) tanto en machos como en hembras (Dohmen, 1992; Knaut et al., 2000; Gustafson & Wessel, 2010). Esta estructura se observa tanto en ovogonias, ovocitos, espermatogonias y espermátidas y su presencia se correlaciona con el tiempo en el que se diferencian las PGC de las células somáticas así como el inicio de la migración hacia la región gonádica (Braat et al., 1999; Knaut et al., 2000). En este periodo de migración las PGC se mueven por pseudopodia y permanecen en quietud mitótica en peces (Braat et al., 1999). El estado de inactividad mitótica se debe a que las PGC se encuentran en un arresto en G2-M del ciclo celular provocado por una elevada concentración de ciclinas B (Deshpande et al., 1999). Posteriormente, en el inicio de la somitogénesis las PGC forman

dos agrupaciones al nivel de la tercera a quinta somita (Yoon et al., 1997; Weidinger et al., 1999).

En humanos al igual que en otras especies *Vasa* se expresa sólo en el linaje de células germinales de ambos sexos tanto en la gametogénesis como durante la embriogénesis, sugiriendo que esta proteína es requerida en el mantenimiento y función de las células germinales (Castrillon et al., 2000); se ha encontrado *vasa* ARNm en espermatozoides, mientras que la proteína que codifica se localiza en la membrana citoplásmica de la cabeza y flagelo del espermatozoide (Guo et al., 2007). En ratón se sugiere que la aparición de *Vasa* y sus genes blanco inician una cascada de diferenciación en las PGC restringiendo su capacidad totipotencial (Braat et al., 1999). Por su parte en aves (CVH) y ratón (MVH) *Vasa* se localiza exclusivamente en el citoplasma de células germinales como espermatogonias y ovocitos primarios; mostrando una expresión decreciente conforme avanza la madurez y desaparece por completo del citoplasma de ovocitos maduros (Toyooka et al., 2000; Tsunekawa et al., 2000). En el caso del ratón la expresión de MVH en las células embrionarias se debe a la activación transcripcional del gen *Mvh* por su interacción con células somáticas de la gónada (Toyooka et al., 2000), mientras que en peces *Vasa* se localiza en la región perinuclear de los gránulos (Knaut et al., 2000).

En *Drosophila*, *vasa* es requerido en las células germinales femeninas, en el crecimiento y maduración de los ovocitos después de la diferenciación, en la determinación de las células polares y en la segmentación abdominal (Lasko & Ashburner, 1990). Los embriones que heredan *vasa* mutante de origen materno presentan fallas en la formación de la proteína para formar las células germinales, mientras que las hembras que tienen una mutación nula en *vasa* tienen defectos en la ovogénesis, por lo que su expresión es requerida también en el proceso de maduración de los ovocitos (Lasko & Ashburner, 1990; Raz, 2000). Por su parte, en ratón la pérdida de función de *vasa* afecta la diferenciación de células germinales en machos y resulta en esterilidad en hembras (Raz, 2000).

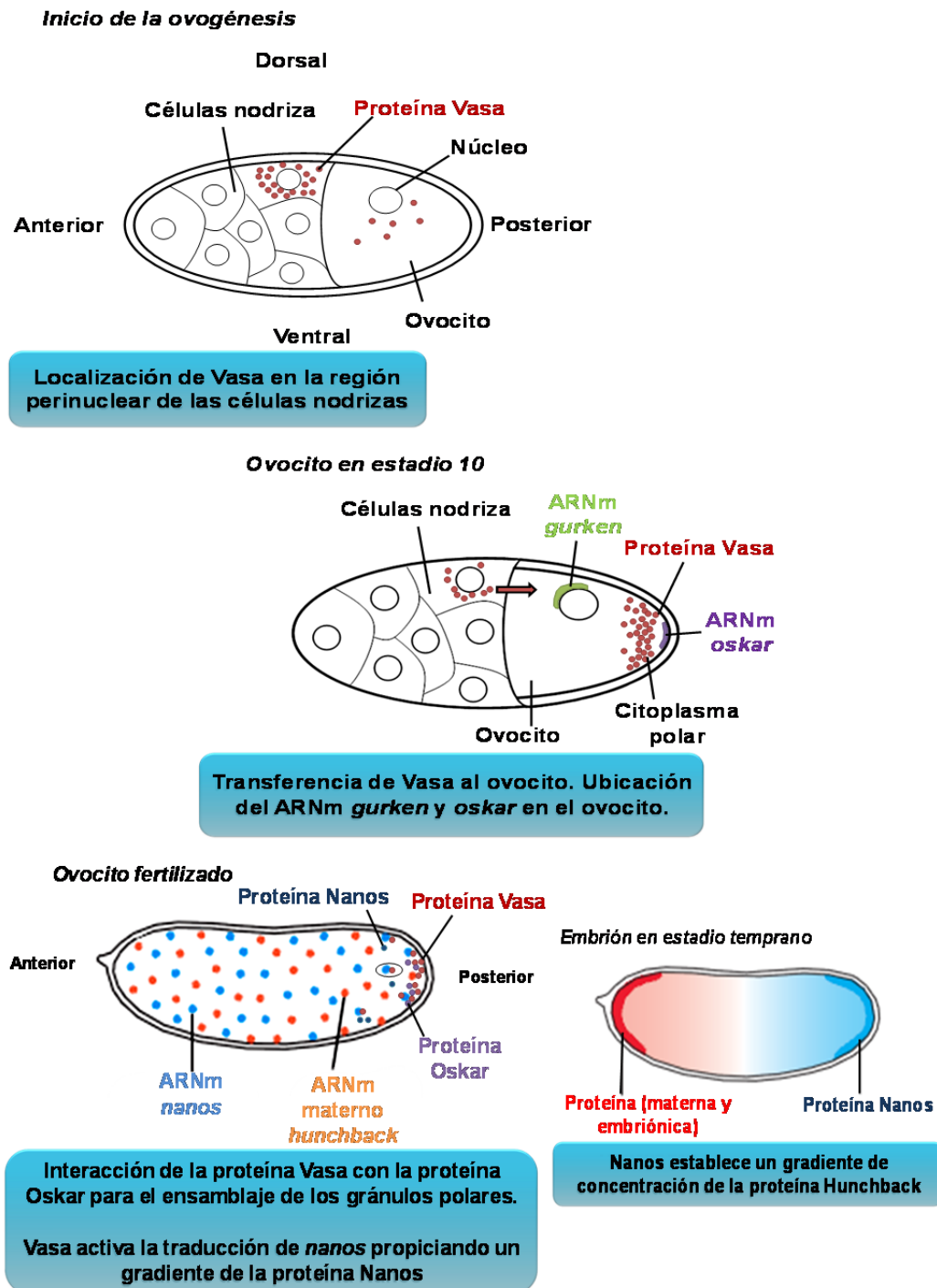


Figura 6. Localización de la proteína Vasa dentro del ovocito y embrión temprano de *Drosophila melanogaster*. Imagen modificada de Fabioux (2004) y Lodish et al. (2004).

Estudios del gen *Oyvlg* en *C. gigas*.

En *C. gigas* el gen *Oyvlg* (oyster *vasa*-like gene) tiene una expresión elevada en ovocitos no fertilizados (en gránulos del citoplasma del polo vegetal) y en el desarrollo temprano del embrión lo que indica que este transcrito es sintetizado maternalmente y posteriormente transmitido al embrión (Fabioux et al., 2004^b). En los estadios de 2 y 4 células la señal se localiza asimétricamente en el citoplasma perinuclear en un solo blastómero lo cual indica que esta región puede ser plasma germinal (Fabioux et al., 2004^b). En el estadio de mórula los niveles de *Oyvlg* ARNm disminuyen significativamente y llegan a ser indetectables a partir de larva D hasta la metamorfosis debido al poco número de PGC comparado con el número total de células en la larva de ostión. En el estadio de gástrula y larva trocófora se observa señal por hibridación *in situ* del lado derecho e izquierdo en la parte media de la larva. La proliferación de estas células dará lugar a las PGCs que después migran al lado posterior de la larva. En el estadio temprano de véliger hacia larva en metamorfosis *Oyvlg* se localiza agrupado en ambos lados del cuerpo de la larva correspondiente al primordio germinal (Fabioux et al., 2004^b). Cuando los ostiones alcanzan la madurez sexual, la expresión de *Oyvlg* se incrementa a lo largo del desarrollo gonádico en ostiones de ambos sexos sin mostrar diferencias entre sexos (Naimi et al. 2009). En un inicio las GSC proliferan intensamente formando los túbulos gonádicos que desarrollan desde la región del pericardio hacia la parte anterior del ostión (Fabioux et al., 2004^b). El transcrito *Oyvlg* se ubica con una fuerte señal en células auxiliares, en células germinales mitóticas (células madre, ovogonias y espermatogonias) y en estadios tempranos de la meiosis (ovocitos I y espermatocitos I) (Fabioux et al., 2004^a).

2.4.3. Características de los genes de la familia TGF- β y la proteína TGF- β .

Las proteínas de la superfamilia TGF- β (transforming growth factor- β) están involucradas en numerosas respuestas celulares como la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Además tienen un rol crítico durante la embriogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis en la vida adulta (ten Dijke et al., 2000). Con base en las características estructurales las proteínas de esta superfamilia se clasifican en subfamilias. La subfamilia

TGF- β , involucrada en desarrollo, hematopoyesis, reparación de tejidos y funciones en el sistema inmune; la subfamilia activin/inhibin formada por hetero- y homodimeros de subunidades α y β (Pangas & Matzuk, 2004) involucradas en regulación parácrina y autócrina del crecimiento y diferenciación (inducción del mesodermo) (Herpin et al., 2004; Ryan et al., 2000); la subfamilia de proteínas BMP (bone morphogenetic proteins), proteínas clave en la especificación del eje dorso-ventral desde vertebrados a insectos; GDF (growth and differentiation factor) que son reguladores de la diferenciación celular tanto en tejidos adultos (ovario y timo) o durante la embriogénesis (Herpin et al., 2004); GDNF (glial cell-derive neurotrophic factor) y miembros adicionales como la hormona anti-Mullerian (AMH) que presenta una baja similitud con otros miembros de la superfamilia TGF- β pero mantiene la típica arquitectura del ligando (Knight & Glistler, 2006).

Estos polipéptidos ejercen su acción sobre la célula a través de la formación de complejos heterodiméricos con receptores de tipo I y II con actividad serina/treonina-cinasa. Los receptores tipo I y II se clasifican, en base a la clase de ligando al que se unen o transducen, en tres categorías principales: receptores BMP, Activin y TGF- β (Le Quéré et al., 2009). Los receptores tipo II fosforilan y activan a los receptores tipo I que inician una señalización intracelular a través de la activación de proteínas Smad, que transmiten señales en el núcleo, donde junto con otras proteínas (factores de transcripción, co-activadores y co-represores) modulan la expresión de un gen blanco (Fig. 7) (ten Dijke et al., 2000; Knight & Glistler, 2006).

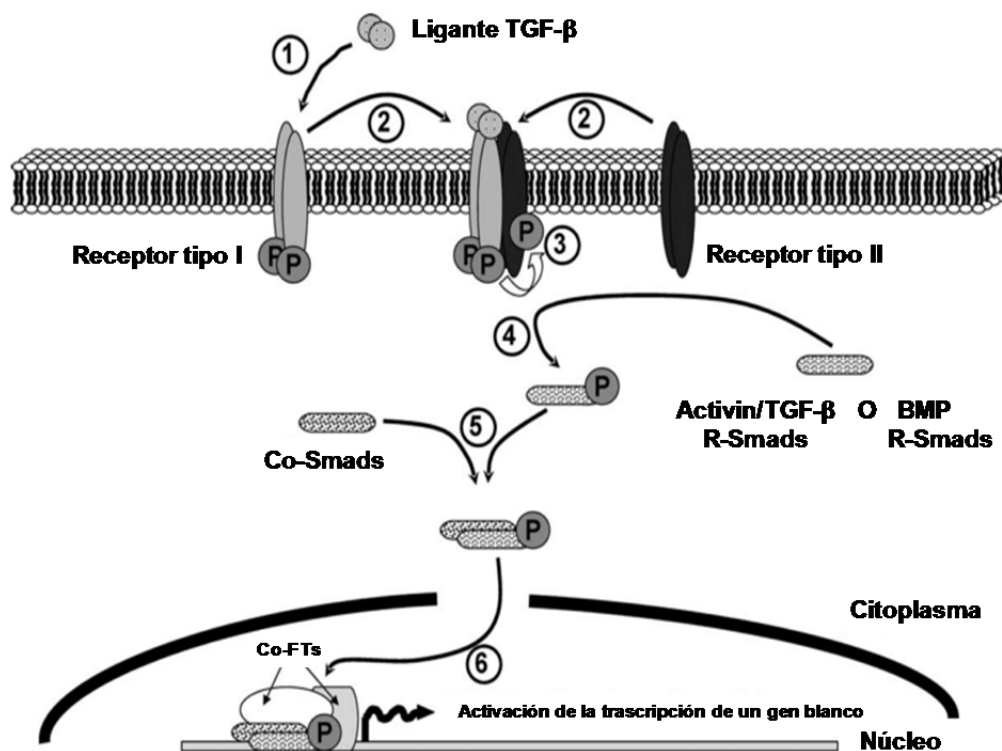


Figura 7. Vías de señalización de los ligandos de la superfamilia TGF- β . 1) Interacción del ligando con el receptor tipo II fosforilado. 2) Formación del heterotetramero por el reclutamiento del receptor tipo I. 3) Transfosforilación del receptor tipo I por el receptor II. 4) Reclutamiento y fosforilación del receptor activo Smad. 5) Dimerización con el Smad común Smad 4. 6) Transcripción de los genes blancos por el Smad asociado con otras proteínas en el sitio de unión del ADN (Co-FT: Co-factor de transcripción. Modificado de Herpin et al. (2004).

Las proteínas Smad pueden ser clasificadas en tres grupos receptor-regulado Smads (R-Smads), común-mediador Smads (Co-Smads), e inhibidor-Smads (I-Smads) (Miyazono et al., 2001). Dentro de las proteínas R-Smad se encuentran Smad 1, 5 y 8 para BMP y Smad 2 y 3 para TGF- β . Las diferencias entre Smad1/5 y Smad 2/3 pueden ser debido a la variación en la secuencia de aminoácidos de su respectiva región de enlace (Miyazono et al., 2001; Guo & Wang, 2009). La especificidad entre las rutas TGF β /activin y BMP/GDF es controlada por la interacción restringida del receptor tipo I con el subtipo de SMAD (Pangas & Matzuk, 2004).

Mecanismos de acción de la proteína TGF- β en la reproducción.

Las vías de señalización de la superfamilia TGF- β afecta múltiples tipos de células dentro de la gónada de mamíferos, tal es el caso del efecto negativo en las células somáticas y germinales de los testículos (Chang et al., 2002). En *Drosophila* TGF β actúa reprimiendo el gen *bam* (*bag-of-marbles*) que induce las células germinales femeninas para auto-renovarse en lugar de diferenciarse. Mientras que en machos la represión de *bam* posiblemente bajo el control de las señales de TGF β , permite la sobrevivencia de las células germinales regulando la transición de espermatogonias hacia la diferenciación de espermatoцитos (Schulz et al., 2004). Por su parte, en peces los niveles de *TGF- β 1* son más elevados en folículos en crecimiento en donde la proteína TGF- β 1 inhibe la actividad de 20 β -HSD (20beta-hidroxisteroide deshidrogenasa) provocando una disminución en la producción de MIH (hormona inductora de la maduración) e inhibiendo así la maduración de los ovocitos (Kohli et al., 2005).

Estudios del gen TGF- β en *C. gigas*.

La proteína TGF- β encontrada en *C. gigas* comparte estructuras secundarias con elementos que muestran una hélice- α conservada y varias cadenas β que forma la estructura de dos dedos de zinc. Esta proteína está conformada por 307 aminoácidos con un sitio de corte consenso (aminoácidos: RFKR) en la posición 183-186. La secuencia de *og-TGF- β* tiene seis de los siete residuos de cisteína característicos (Fleury et al., 2008).

El ARNm de *og-TGF- β* no tiene una expresión significativa en el desarrollo embrionario de *C. gigas*. En ostiones adultos este transcrito se expresa en la gónada y el nivel de expresión se incrementa del estadio cero al estadio de madurez, donde tiene su máxima expresión y se observa una fuerte señal en la periferia de los túbulos (correspondiendo a estadios tempranos de las células germinales) en células alargadas cercanas a los ovocitos (Fleury et al., 2008). Recientemente se ha sugerido que la proteína madura de *og-TGF- β* actúa en la gónada estimulando el desarrollo de células germinales en ostiones ya que al inyectar un anticuerpo de TGF- β en la gónada de ostiones se observó que estos presentaron una superficie de área gonádica menor (25.4%) que los controles (37%) (Corporeau et al., 2011). De manera similar, en el trabajo de Huvet et al. (2011) observaron una reducción

significativa en el área de la gónada en los ostiones inyectados con dsRNA *og-TGF-β* (22.9%) en comparación con el control (37.8%); esta reducción en el área de la gónada se debió al arresto de los ovocitos en el primer paso de la meiosis (antes de la vitelogénesis) por lo que *og-TGF-β* podría estar positivamente implicado en la vitelogénesis de ostiones hembras (Huvet et al., 2011).

2.4.4. Características de los genes de la familia *vtg* y la proteína VTG.

En el vitelo de los ovocito se almacenan los nutrientes para la embriogénesis, su conformación es uno de los pasos cruciales de la ovogénesis. En invertebrados la formación del vitelo se da de manera autosintética (por los ovocitos) y heterosintética (por tejidos extraováricos y células foliculares). En los moluscos las proteínas del vitelo surgen principalmente de manera intraovárica tanto de origen hetero y autosintético (Suzuki et al., 1992; Eckelbarger & Davis, 1996).

Mecanismos de acción de la proteína Vtg en la reproducción.

La vitelogenina (Vtg), precursor de la proteína vitelina (Vn), es una proteína de transporte y almacenamiento que sirve como ligante para distribución de nutrientes en el vitelo del ovocito (Riffeser & Hock, 2002). En *C. gigas* al igual que en mejillón, la proteína del vitelo está regulada por el estradiol, y esta hormona presenta cambios estacionales asociados con el ciclo reproductivo. En hembras el nivel de estradiol incrementa con la madurez y tiende a disminuir después del desove, mientras que en machos el nivel de estradiol permanece bajo y no se detecta la estrona (Matsumoto et al., 1997; Ciocan et al., 2011). En el ostión *C. corteziensis* se ha estudiado la concentración de Vn/Vtg en gónada de ostiones adultos encontrando bajas concentraciones en hembras previtelogénicas ($418.92 \mu\text{g g}^{-1}$), que aumenta en ostiones vitelogénicos ($578.81 \mu\text{g g}^{-1}$) y presenta su máximo en hembras post-vitelogénicas o maduras ($823 \mu\text{g g}^{-1}$) (Arcos et al., 2009). El crecimiento de los ovocitos (área y diámetro) depende de la acumulación de Vn/Vtg dentro del ovocito durante el desarrollo de la gónada por lo que se ha sugerido que puede ser un indicador de la madurez gonádica así como de la capacidad reproductiva de *C. corteziensis* (Arcos et al., 2009). Por su parte en *Litopenaeus vannamei* también se ha sugerido al gen *vtg* como un potente

candidato que indique la condición reproductiva ya que el incremento de la proteína VTG presenta una correlación positiva con el diámetro de los ovocitos (Ibarra et al., 2009). Además, en camarón puede usarse como una herramienta predictiva antes de ablacionar ya que permite seleccionar hembras en estadios más avanzados de maduración y se ha visto que un nivel mayor de vitelogenina en la hemolinfa antes de la ablación se asocia con una mayor capacidad de maduración en comparación con las hembras con baja capacidad de madurar (Ibarra et al., 2009). En estudios posteriores en *L. vannamei* se describe una correlación positiva entre el índice de madurez (que considera el área ovárica obtenida como el número y talla de ovocitos) y el nivel de VTG en hemolinfa, por lo que también confirma que es un buen indicador de la actividad reproductiva al reflejar la acumulación de vitelo en los huevos y por ende un incremento en la calidad de los nauplios producidos (Arcos et al., 2011).

Estudios del gen vtg en C. gigas.

El ARNm de *vtg* se ha encontrado solamente en células foliculares del ovario lo que sugiere que la síntesis de vitelo en *C. gigas* puede tener lugar en estas células (Matsumoto et al., 2003; Llera, 2008). Por su parte, la proteína tipo vitelina de ostión, una glicolipoproteína con un peso molecular de ~500kD, posee una estructura macromolecular que consiste en subunidades heterogéneas e inclusiones lipídicas y de carbohidratos (Suzuki et al., 1992). Las vitelinas son las proteínas que mayormente se almacenan dentro de gránulos de vitelo en el citoplasma de los ovocitos, estos gránulos son abundantes en los ovocitos postvitelogénicos, mientras que los ovocitos en desarrollo temprano presentan menor cantidad de gránulos de vitelo, indicando que el crecimiento de los ovocitos depende de la acumulación de vitelina en ellos durante la vitelogénesis (Suzuki et al., 1992; Li et al., 1998^b). En *C. gigas* las proteínas del vitelo tienen un papel importante en el desarrollo del embrión y de la larva al ser fuente de aminoácidos libres (FAAs). De tal forma que las vitelinas son progresivamente degradadas después de la fertilización, esto se refleja por incrementos en FAAs que ocurren en el estadio de blástula y tiene un pico máximo en el estadio de véliger (Li et al., 1998^a). En ostiones adultos la concentración de vitelina y estradiol-17 β , así como la expresión de *vtg* ARNm incrementan en el ovario con el avance

de la madurez y disminuye después del desove confirmando que el estradiol es uno de los factores que promueven la vitelogénesis en ostión (Matsumoto et al., 2003).

En *C. gigas* se han reportado dos transcritos de *vtg* (*Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*), cuya expresión tiene un nivel máximo en hembras maduras durante la fase tardía de la vitelogénesis, que es cuando ocurre la vitelogénesis proteica (posterior a la vitelogénesis lipídica), lo que los hace potenciales marcadores moleculares del esfuerzo reproductivo o avance vitelogénico del ostión. Mientras que en ostiones indiferenciados la expresión es apenas detectable al igual que en machos; y en el estadio de post-desove o degeneración se observa un decremento en la expresión de *vtg* hasta alcanzar niveles de expresión similares a los estadios de desarrollo temprano y maduración (Llera, 2008). Además, se ha observado también que existe un incremento significativo en la expresión de ambas *vtg* cuando los organismos son alimentados con elevadas cantidades de alimento (12%) durante su condicionamiento en laboratorio (Llera, 2008).

2.5 Conformación de un pie de cría de *C. gigas* para el Noroeste de México.

En México la producción de *C. gigas* depende en su mayoría de importaciones de semilla principalmente proveniente de laboratorios de Estados Unidos (70%) (SAGARPA, 2010), actualmente también de Chile (P. Danigo, *com. per.*) y en menor medida de laboratorios nacionales. Sin embargo, al utilizar ostiones producidos en otro país se corre el riesgo de que éstos estén adaptados a las condiciones ambientales del sitio de origen (como por ejemplo temperaturas, salinidades y disponibilidad de alimento) además de propiciar la posible introducción inadvertida de patógenos.

Efectos de las condiciones ambientales sobre la producción de *C. gigas* en el noroeste de México.

El Noroeste de México presenta una elevada variabilidad térmica con marcados eventos muy cálidos durante los años de El Niño, además de la variación estacional ocasionada por la interacción de la corriente de California durante el invierno y la contracorriente tropical Norecuatorial durante el verano (Trasviña et al., 1999; Moreno & Gómez, 2006; Sicard et

al., 2006). Dado lo anterior, la introducción en esta región de México, de ostiones adaptados a zonas templadas puede provocar una reducción en la producción e incluso ser una de las probables causas de las mortalidades reportadas para esta región (García-Esquivel et al., 2004; Carvalho, 2003; Chávez-villalba et al., 2007; Tobar, 2008; Ascencio-Michel, 2008).

Alternativas para la producción de *C. gigas* en el noroeste de México.

Una alternativa que se ha propuesto para incrementar la producción de ostión japonés es emplear triploides. Los ostiones triploides han tenido a nivel internacional menores tasas de mortalidad (Gagnaire et al., 2006) y un reducido desarrollo gonádico (Jouaux et al., 2010) lo que le permite crecer más que los ostiones diploides (Shpigel et al., 1992; Maguire et al., 1995; Gagnaire et al., 2006); además de utilizar más energía en mecanismos de defensa (Delaporte et al., 2006; Gagnaire et al., 2006). De manera similar, en México Ibarra et al. (2008^{ab}) reportan una ventaja en los triploides, debida a su esterilidad parcial, al cultivarse en ambientes con condiciones desfavorables (elevadas temperaturas). Sin embargo, durante julio y septiembre 2006 se registró una disminución en la supervivencia en ambas ploidías debida al efecto combinado de crecimiento continuo y elevada temperatura (Ibarra et al., 2008^b). A pesar de que los ostiones triploides parecen tener mejor rendimiento (crecimiento y supervivencia) en el Noroeste de México, existen límites en su tolerancia térmica durante eventos de temperatura elevada (El Niño) (Carvalho, 2003).

Debido a lo anterior, recientemente se propuso el establecimiento de un pie de cría de *C. gigas* para el Noroeste de México realizado con base en la selección de diferentes líneas de ostión que presenten diferenciación genética entre ellas, y evaluando los efectos combinados y específicos de sus cruzas sobre el desempeño (crecimiento, reproducción y sobrevivencia) bajo las condiciones ambientales variables en esta región incluyendo altas temperaturas.

Las líneas seleccionadas fueron traídas de Chile, Australia y EUA (Fig. 8) con base en que ostiones de cada uno de esos países representen variedades diferentes debido a que ha pasado tiempo suficiente (~30 años) desde su introducción en dichas regiones, lo que les confiere también una diferenciación genética óptima para la conformación de un pie de cría

con alta variabilidad genética. La diferenciación genética de las variedades fue demostrada una vez que estas fueron importadas (Galindo-Sánchez et al., 2008). El cruzamiento entre líneas ha buscado conferir mayor variabilidad y por ende ventajas productivas (crecimiento y supervivencia) en las progenies resultantes de cruzamientos múltiples.

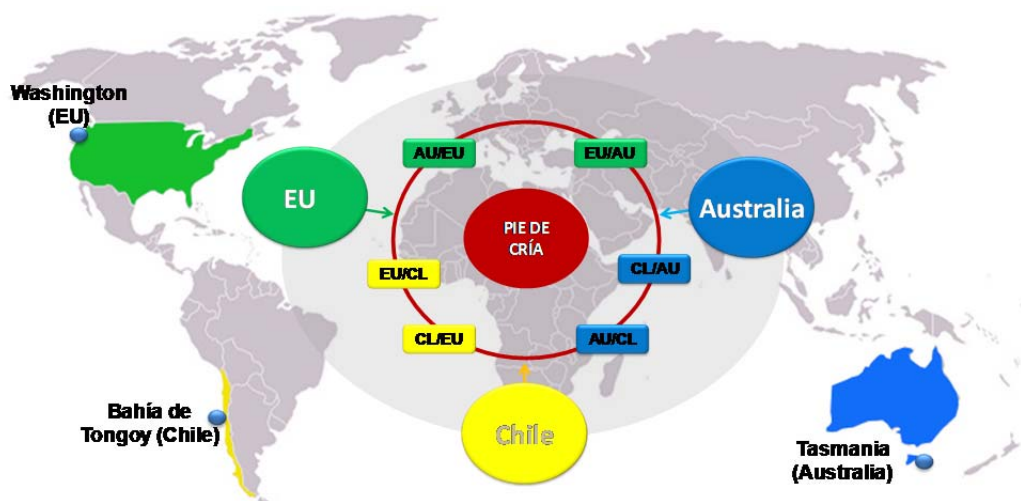


Figura 8. Conformación de un pie de cría de *C. gigas* para el Noroeste de México.

La conformación de un pie de cría involucra la evaluación de cruces en cuanto a la supervivencia, crecimiento, reproducción y el efecto de factores ambientales (temperatura) sobre esas variables productivas. En base a lo anterior, este trabajo se enfoca en analizar genes que potencialmente pueden usarse como marcadores moleculares, como es el caso de *OyVlg*, *vtg*, *Cg-Foxl2* y *og-TGF- β* , cada uno de los cuales proporciona información acerca del proceso reproductivo. Utilizando cruces de tres vías, en donde cada una de ellas difiere de la otra en un 50% de los genes/alelos presentes debido a que la mitad de su complemento cromosómico se derivó de la línea EUA o de la línea AU, se busca establecer si existen diferencias entre ellas para la expresión génica de los genes antes mencionados. Adicionalmente, dada la importancia de conocer si existen diferencias en el ciclo gametogénico entre grupos genéticos, se analizó el efecto que tiene la temperatura sobre el desarrollo gamético y el crecimiento, así como las diferencias entre las cruces.

3. JUSTIFICACIÓN

En el ostión *C. gigas* la energía almacenada se destina al crecimiento o reproducción (Hofmann et al., 1994; Chávez-Villalba et al., 2008; Normand et al., 2008; Castaños et al., 2009). El esfuerzo reproductivo es un indicador de la cantidad de energía que se destina a la reproducción, y este ha mostrado variaciones en respuesta a condiciones ambientales como la temperatura (Hofmann et al., 1992; Normand et al., 2008), así como entre distintos grupos genéticos o fenotípicos (menor y mayor esfuerzo reproductivo) (Enríquez-Díaz et al., 2009). En la acuicultura de moluscos un menor esfuerzo reproductivo es una característica fenotípica deseable en el contexto de crecimiento.

En México recientemente se conformó un pie de cría de ostión *C. gigas* para el Noroeste (Ibarra, *com. per.*) a partir de variedades demostradas como genéticamente diferentes (Galindo-Sánchez et al., 2008). Debido a que la región del Noroeste presenta una elevada variabilidad térmica (Sicard et al., 2006) y que la reproducción está directamente influenciada por la temperatura (Shpigel et al., 1992; Chávez-Villalba et al., 2002; Flores-Vergara et al., 2004; Fabioux et al., 2005) es importante evaluar características reproductivas de estas cruzas en temperaturas similares a los sitios de cultivo.

En la selección de un fenotipo deseable en ostión, como lo es un mayor crecimiento, es importante entender el efecto que tiene el esfuerzo reproductivo así como establecer la mejor forma de medir al mismo. Una de esas posibles formas es utilizar genes expresados diferencialmente de acuerdo con un bajo o alto esfuerzo. Entre los genes que se encuentran implicados en un esfuerzo reproductivo diferencial se encuentran: *Cg-Foxl2* (Naimi et al., 2009), *OyVlg* (Fabioux et al., 2004; Fabioux et al., 2009), *og-TGF- β* (Corporeau et al., 2011; Fleury et al., 2008; Huvet et al., 2011) y vitelogenina (*vgt*) (Llera, 2008; Arcos et al., 2009; Arcos et al., 2011). Debido a lo anterior en el presente trabajo se utilizaron análisis histológicos de gónada y análisis de tejido gonadal para la cuantificación de la expresión de los genes *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF- β* y *vgt* contrastando dos cruzas de *C. gigas* sometidas a diferentes temperaturas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

- Evaluar el esfuerzo reproductivo comparativo de dos cruzas diferentes de *C. gigas* mantenidas en temperaturas diferentes, y conocer si existen diferencias entre estas cruzas a través de la cuantificación de la expresión de los genes *Oyvlg*, *Cg-Foxl2*, *og-TGF- β* y *vtg*.

4.2. Objetivos específicos.

- Establecer si existen diferencias (cualitativas, semi-cuantitativas y cuantitativas) en el desarrollo gonádico de dos cruzas de *C. gigas* sometidas a diferentes temperaturas.
- Establecer si existen diferencias en la expresión de *Oyvlg*, *Cg-Foxl2*, *og-TGF- β* y *vtg* en tejido gonádico entre las dos cruzas de *C. gigas*.

5. HIPÓTESIS

Si el desarrollo gonádico se correlaciona positivamente con la temperatura, entonces el esfuerzo reproductivo será mayor en elevadas temperaturas.

Si la expresión de los genes *Oyvlg*, *Cg-Foxl2*, *og-TGF- β* y *vtg* están asociados al esfuerzo reproductivo de *C. gigas*, entonces diferencias en la expresión génica entre cruzas con diferentes esfuerzos reproductivos indicarán que éstos genes son marcadores moleculares útiles para la selección.

6. METODOLOGÍA

6.1. Organismos experimentales.

Los ostiones de *C. gigas* utilizados fueron el producto de cruzas en tres vías de líneas importadas de Estados Unidos (EU), Chile (CH) y Australia (AU). Esto es, las cruzas en tres vías evaluadas fueron resultado del cruzamiento entre una F1 (resultante del cruzamiento entre dos de las líneas), y una u otra de las líneas para las cuales no contenían parte las F1. Dos grupos de F1s fueron utilizadas, cada una con su recíproca: grupo (1) $F1_{(AU \times CH)}$ y su recíproca $F1_{(CH \times AU)}$, y grupo (2) $F1_{(CH \times EU)}$ y su recíproca $F1_{(EU \times CH)}$. El primer grupo de recíprocas fue posteriormente cruzado con organismos de origen Estados Unidos (EU), y el segundo grupo de F1 recíprocas se cruzó con los organismos de Australia (AU) (Fig. 9).

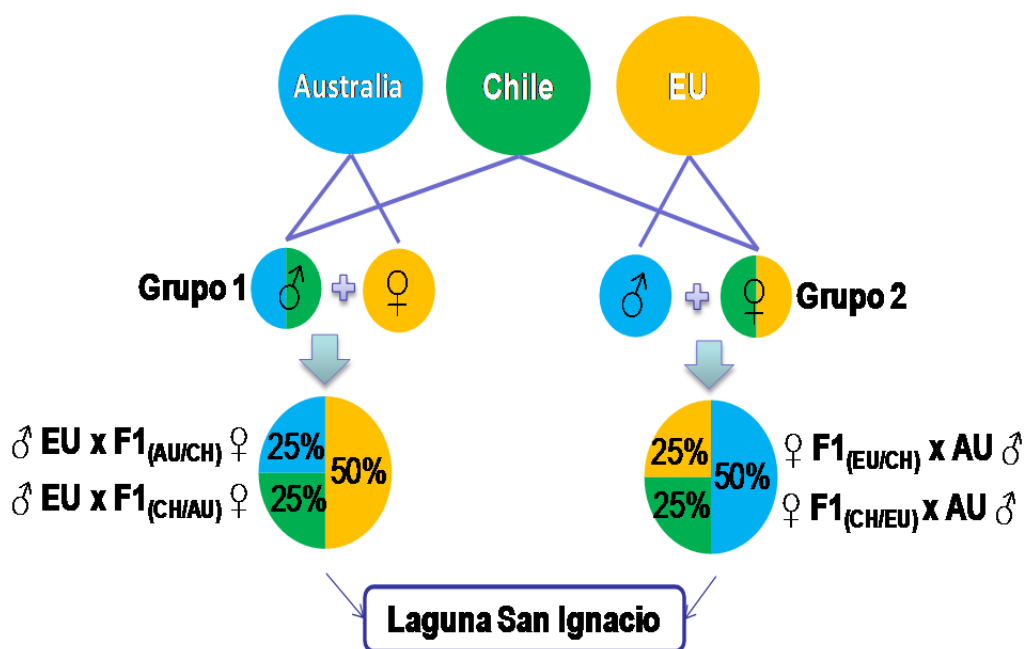


Figura 9. Cruzas en tres vías a evaluar, las que están en amarillo contienen 50% genoma materno de la línea original de Australia, y 25% de cada una, la línea Chile y la línea EU en forma recíproca. Las que están en azul tienen 50% de su genoma derivado paternamente de la línea EU, y 25% de cada una, Australia y Chile en forma recíproca. Lo que varía dentro de cada color es la cruce recíproca utilizada para cruzar con Australia o EU.

En el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste se llevó a cabo el crecimiento larvario. Durante el cual se realizaron recambios de 100% del agua cada 2 días y se alimentaron con 30 mil cel mL⁻¹ (al inicio) y 100 mil cel mL⁻¹ (al final del estadio larval) de una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*. La densidad de microalgas suministrada al llegar al estadio de semilla (2-3 mm) fue de 250 mil cel mL⁻¹. Las semillas obtenidas de ostión de cada crusa se preengordaron en la Laguna San Ignacio en las costas del Pacífico de la Península de Baja California Sur.

6.2. Área de preengorda.

Laguna San Ignacio B.C.S.

La Laguna San Ignacio (Fig. 10) está situada en la parte media de la costa occidental de la Península de Baja California, entre los 26°38' y 27°00'N de latitud norte y los 113 ° 06' y 113 ° 18' latitud oeste. La laguna se encuentra rodeada por el Desierto de Vizcaíno, ubicado en el Municipio de Mulegé, por lo que forma parte de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno (Winant & Gutiérrez de Velasco, 1999). Tiene una superficie de 152 km² con un clima semicálido, muy seco, con una temperatura que oscila entre los 18 y 22°C. La Laguna tiene una longitud de 30km. Desde el punto de vista batimétrico se describen tres áreas: en el extremo norte la laguna es muy somera presentando un canal angosto con profundidad promedio de 5 m que va desde el paso que comunica al Remate con el resto de la laguna; en el área central se encuentra un canal ancho con profundidades de 6m, mientras que en el área sur la laguna está dividida por varios canales presentando profundidades que van de los 10 a 15 m y los bajos que separan los canales quedan descubiertos durante la marea baja, éstas mareas son semidiurnas y varían de 0.9 a 2.4 m, causando fuertes corrientes en la cuenca y canales (Winant & Gutiérrez de Velasco, 1999).

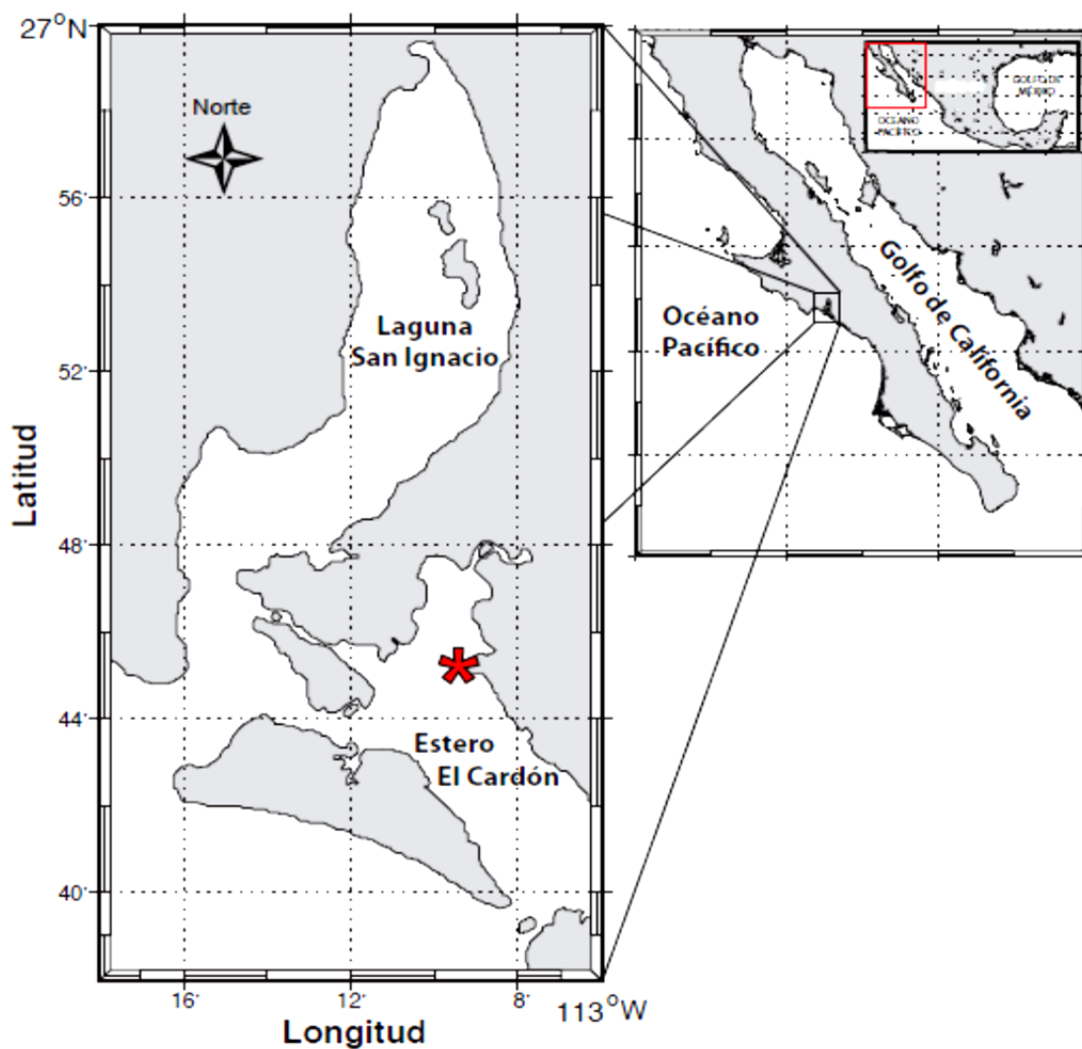


Figura 10. Sitio de preengorda de las cruces experimentales de *C. gigas* en Laguna San Ignacio (LSI) en Baja California Sur.

6.3. Preengorda.

La preengorda de la semilla se llevó a cabo del 4 de noviembre al 11 de marzo de 2009 en la Laguna San Ignacio donde se colocaron semillas (3 mm longitud promedio) correspondientes a cada cruce en bolsas de malla tipo mosquitero de 50 por 50 cm (abertura de 1 mm) introducidas dentro de canastas flotantes.

Cuando los ostiones alcanzaron una talla de 3 cm se colocaron a una misma densidad (300/costal) del 18 de Febrero al 11 de Marzo.

Una vez que los organismos alcanzaron una talla de 4-5 cm, 250 ostiones de cada una de las cruzas experimentales fueron llevados al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

6.4. Diseño experimental.

A los ostiones traídos de campo se les realizaron biometrías (longitud, peso y biomasa) y se hicieron análisis preliminares para establecer si podían agruparse las cruzas recíprocas. En estos análisis no se encontraron diferencias en las variables muestreadas entre las cruzas de tres vías recíprocas $F1_{(EU/CH)} \times AU$ y $F1_{(CH/EU)} \times AU$, así como tampoco entre las cruzas de tres vías recíprocas $EU \times F1_{(AU/CH)}$ y $EU \times F1_{(CH/AU)}$ (ver sección de resultados para más detalle). Al no encontrar diferencias significativas entre esos grupos recíprocos, estos se agruparon. Los grupos finalmente analizados se designan a partir de aquí como dos cruzas en tres vías: (1) $F1_{(CH:EU)} \times AU$, y (2) $EU \times F1_{(CH:AU)}$, en donde el sufijo indica la agrupación de las cruzas recíprocas dentro de esa F1.

Los organismos se aclimataron durante una semana, en condiciones controladas y a la temperatura que había en la laguna San Ignacio en la fecha de colecta (19°C). La fase experimental del trabajo se inició el 23 de marzo de 2010, utilizando 100 ostiones (juveniles) por craza y tratamiento de temperatura, colocando estos en un sistema de temperaturas controladas en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Se mantuvieron 31 días en los tratamientos de temperaturas experimentales de: 19, 23, 27 y 31°C (Fig. 11), realizando recambios diarios de 100% de agua y adicionando a diario la misma cantidad de microalgas a los cuatro tratamientos de cada temperatura: 250 millones de células $mL^{-1}/organismo/día$ de *I. galbana*, *C. calcitrans* y *Pavlova* sp. (correspondiente al 4% del peso seco del ostión: 1% de *C. calcitrans*, 1% de *Pavlova* sp. y 2% de *I. galbana*).



Figura 11. Tratamientos de las cruzas estudiados con temperaturas.

6.5. Colecta de información y tejidos.

Biometrías

Se realizó la biometría completa (longitud de la concha, peso total y peso de biomasa o tejidos) de 60 ostiones muestreados por cruz y tratamiento. De los 40 ostiones restantes solamente se registró la longitud de la concha y el peso total del organismo. Con la información obtenida se estimó el índice de condición (IC):

$$IC = \frac{\text{Peso de Tejidos (g)}}{\text{Peso total (g)}}$$

Muestreo de gónada

En paralelo a las biometrías, se tomó una sección transversal de la parte media de cada organismo (Fig. 12) para el posterior análisis histológico de la gónada, colocándolo en un casete para procesamiento histológico identificado por individuo y tratamiento, preservándolo en solución Davidson.

Adicionalmente se tomó otra sección de la gónada de cada individuo para la extracción de ARNm y análisis de expresión génica, congelando la muestra identificada por individuo y tratamiento en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó a -80°C .

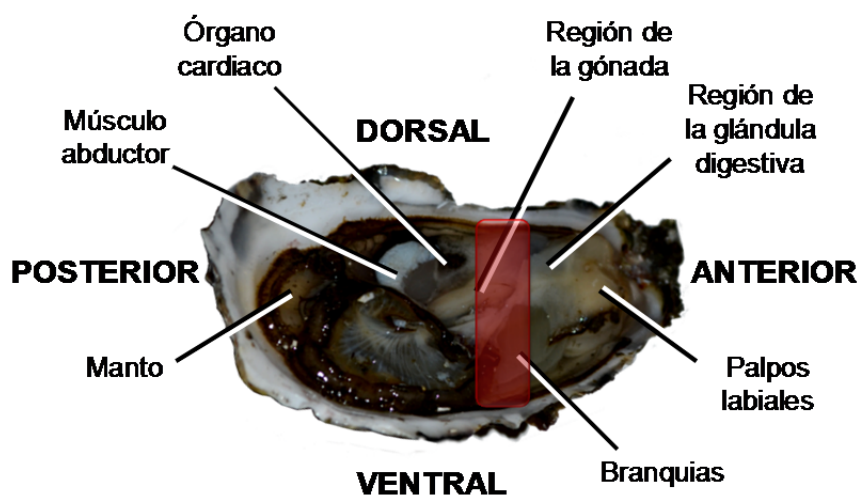


Figura 12. Ostión *C. gigas*: en rojo la sección transversal tomada para análisis histológicos.

6.6. Análisis histológicos.

Se siguió la técnica de muestreo y fijación descrita en el Anexo I. Los organismos se fijaron en una solución de Davidson modificada (Anexo I) por un lapso de 24 a 48 h a una temperatura ambiente y posteriormente fueron transferidos a alcohol al 70% (diluido en agua con DEPC, Anexo I). A continuación las muestras se trataron mediante una técnica convencional de histología (Anexo I). Se realizaron cortes histológicos de 4 μm , teñidos con Hematoxilina-Eosina (Humason, 1979; Sheehan & Hrapchank, 1973) (Anexo II).

6.6.1. Proporciones sexuales.

Se analizaron los cortes histológicos y se determinó el porcentaje de sexos de cada una de las cruces en las diferentes temperaturas mediante el establecimiento de las frecuencias de cada uno de los fenotipos observados: organismos indiferenciados (gametogénicamente inactivos), machos, hembras y hermafroditas (con gametos femeninos y masculinos independientemente del estadio de desarrollo gonádico).

6.6.2. Estadios de Desarrollo Gonádico.

6.6.2.1. Análisis Cualitativo.

Se emplearon las descripciones histológicas de Normand et al. (2008) adaptado de Lango-Reynoso et al. (2000) y Mann (1979). El estadio de desarrollo gonádico se asignó de acuerdo a las características histológicas que presentó cada ostión (Fig. 13):

- Estadio 0 (reposo sexual): estadio previo al desarrollo gonádico. Los folículos gonádicos no presentan actividad mitótica visible, no se pueden distinguir sexos (ostiones indiferenciados).
- Estadio I (gametogénesis temprana): los folículos se encuentran alargados y aislados en un abundante tejido conectivo. Se observa proliferación mitótica de numerosas espermatogonias u oogonias, ocasionalmente ovocitos o espermatozoides primarios al final del estadio I.
- Estadio II (gametogénesis tardía): se observan ovocitos en todas las etapas gametogénicas (oogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos) predominando los ovocitos vitelogénicos. En el caso de los organismos machos se observan espermatogonias, espermatozoides y espermátidas. Las células maduras se observan en el centro del folículo. Comienza a desaparecer el tejido conectivo interfolicular.
- Estadio III (madurez): los folículos se encuentran llenos de ovocitos vitelogénicos con núcleo y nucléolos distintivos, con un tamaño relativamente homogéneo. Todavía se observan algunos ovocitos previtelogénicos; en algunos casos se observan ovocitos postvitelogénicos o atresicos. Los machos presentan espermatozoides con sus caudas orientadas al lumen del folículo; ya no hay tejido conectivo interfolicular visible.
- Estadio IV (desove): con los folículos distendidos y algunos rotos; todavía se observa un gran número de gametos, en algunos casos se observa un post-desarrollo en el cual el número de gametos primarios (espermatozoides y ovocitos previtelogénicos) se incrementa.
- Estadio V (reabsorción): los folículos están semivacíos y se observan fagocitos. Los conductos de desove pueden estar presentes o ausentes ya que este estadio no indica necesariamente que hubo un desove previo.

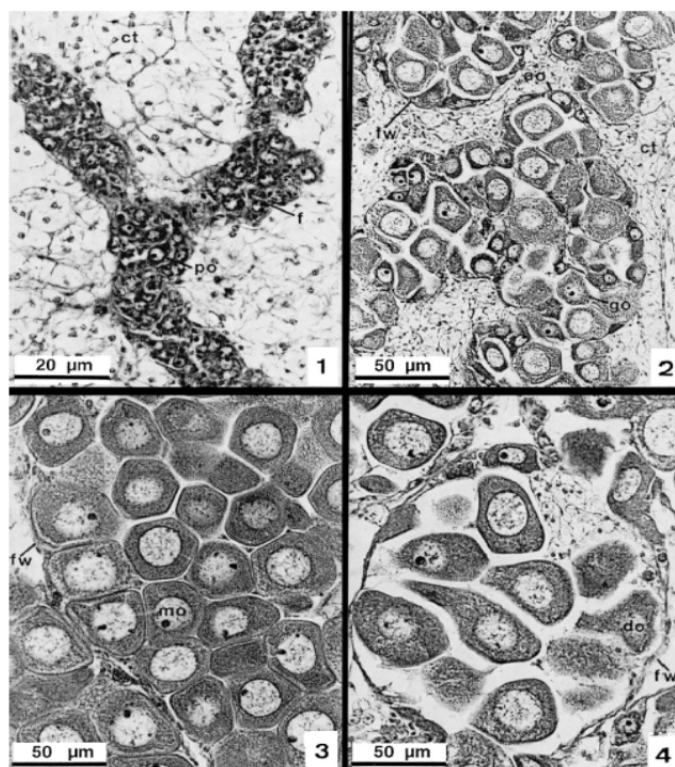


Figura 13. Desarrollo gonádico de *C. gigas*. Estadios 1, 2, 3 y 4. Ovocitos adheridos (ao), tejido conectivo (ct), ovocito degradado (do), folículo (f), pared del folículo (fw), ovocito en crecimiento (go), ovocito maduro (mo), ovocito primario (po) (Imagen tomada de Lango-Reynoso et al., 2000).

6.6.3. Área de tejido gonadal.

Se cuantificó el área de tejido gonadal en organismos hembras y machos con el fin de conocer y definir si el esfuerzo reproductivo entre las cruza experimentales evaluadas era diferente. Se utilizó una modificación del índice de área gonadal (IAG) propuesto por Enríquez-Díaz (2004), basado en una técnica estereológica en la que se emplean cortes histológicos de las laminillas de organismos con gónada. Las laminillas histológicas fueron colocadas en un escáner digital (HP ojp 7700) y las imágenes resultantes se analizaron en el software Imaq Vision Builder, National Instrument Corp. para determinar el área de cobertura de la gónada y el área visceral (Fig. 14). El IAG fue obtenido con la siguiente ecuación:

$$\text{IAG} = \frac{\text{Área de la gónada } (\mu\text{m}^2)}{\text{Área visceral } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

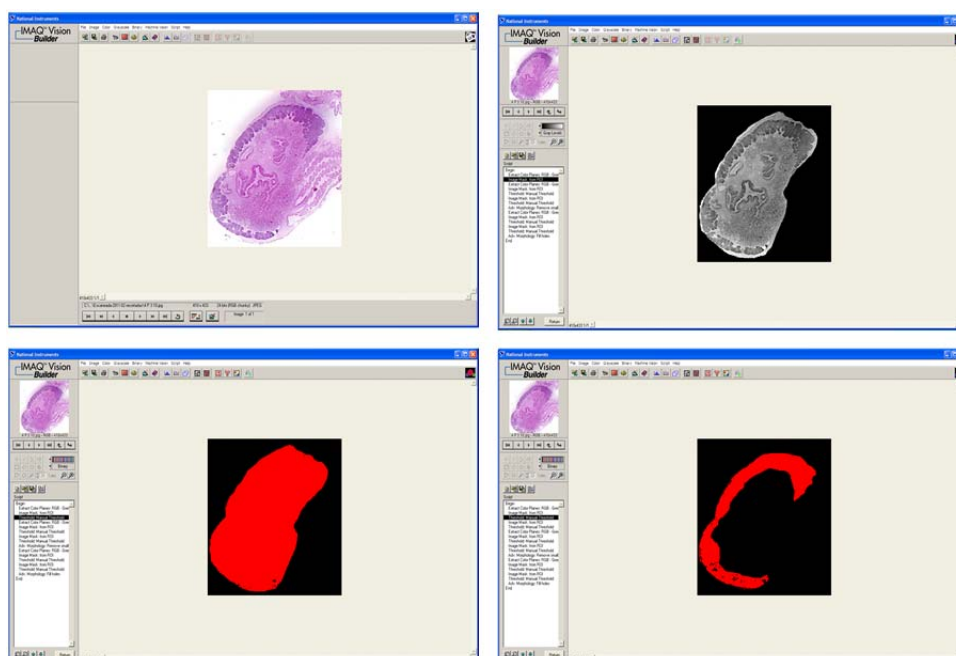


Figura 14. Análisis del área visceral y gonádica con el programa Imaq Vision Builder.

6.6.4. Índice de madurez gonádica.

En esta evaluación se analizaron cinco folículos por cada hembra en estadio III de desarrollo gonádico en ambas cruzas sometidos a las temperaturas de 27 y 31°C. Para ello se obtuvieron imágenes digitalizadas de tres regiones de la gónada del ostión a un aumento de 20X. Estas imágenes se analizaron con el programa SigmaScan Pro 5 para obtener el área y diámetro de los ovocitos. Los ovocitos se clasificaron y contaron para cada tipo: previtelogénicos, vitelogénicos, post-vitelogénicos y degenerativos con base en la escala de Lango-Reynoso et al. (2000), la cual usa el diámetro de los mismos para establecer el tipo de ovocito.

Utilizando el área y número de cada tipo de ovocito se estimó un índice de madurez ovárica o gonádica (MO: madurez de ovario), estimado con base en lo descrito por Arcos et al. (2005):

$$\mathbf{MO} = \sum [(A_{pv} \times n_{pv}) + (A_{vit} \times n_{vit}) + (A_{ptv} \times n_{ptv}) + (A_{dg} \times n_{dg})]$$

Donde:

$A_{pv,vit,ptv,dg}$: área promedio de cada tipo de ovocito

$n_{pv,vit,ptv,dg}$: número total de cada tipo de ovocito

6.6.5. Biomasa de gónada.

Se realizó una aproximación de la biomasa de gónada (BG) en base a:

$$BG = \frac{(IAG \times \text{biomasa del ostión})}{100}$$

Para lo anterior se utilizaron ostiones hembras de ambas cruzas en estadio III de desarrollo gonádico.

6.7. Análisis de expresión génica cuantitativa por PCR de tiempo real.

Una vez definido el sexo y estadio de desarrollo gonádico de los organismos (por medio de histología), la otra mitad del tejido del ostión preservado a -80°C fue utilizada en el análisis de expresión génica cuantitativa por PCR de tiempo real (qPCR), evaluando la expresión de los genes *OyVlg* (*Oyster vasa-like gene*), *og-TGF- β* (*Transforming growth factor-beta*), *Cg-Foxl2* (*Forkhead box l2*) y *vtg* (*vitelogenina*).

El análisis de qPCR se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por un intercalibrador que se une al producto de la PCR (Bustin et al., 2009). La curva resultante refleja en su fase exponencial la cantidad inicial de templado y esta se cuantifica comparando el número de ciclos de amplificaciones que se requiere para alcanzar cierto límite (*threshold*) de fluorescencia lo cual se denomina como ciclo de cuantificación (Cq) (Kubista et al., 2006).

6.7.1. Extracción de ARN, tratamiento con DNAsa y RT-PCR.

Del tejido conservado a -80°C se utilizaron 100 mg de tejido para la extracción de ARN en 1 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science). La homogenización del tejido se realizó agregando 100 mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600 μm) en el equipo FastPrep®-24 (Anexo III). El ARN se resuspendió en agua DEPC

0.1% (el volumen dependió del tamaño del pellet ya sea 15, 30 o 50 μL) y se cuantificó la concentración obtenida en cada extracción utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). La calidad del ARN se evaluó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes (Anexo IV).

De la solución de ARN total se tomaron 5 μL ($1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$) que fueron tratados con DNAsa I (RQI DNase, Promega) para eliminar contaminación por ADN genómico (ADNg) (Anexo V). Para corroborar que el tratamiento con DNAsa fue el adecuado, se realizaron cuantificaciones de expresión en tiempo real (qPCR) utilizando cebadores del gen *β -actina* con muestras de ARN tratadas con DNAsa, utilizando ADNc como control positivo. Se analizaron los valores del ciclo umbral (C_q) de las amplificaciones, considerando como libres de ADNg aquellas muestras que no presentaran amplicones a la temperatura de disociación (T_m) correspondiente para *β -actina* ($T_m = 83$) o cuyos valores del ciclo umbral C_q fueran mayores a 35 ciclos (Bustin et al., 2009); adicionalmente la amplificación (o falta de) fue corroborada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Una vez confirmada la pureza del ARN se procedió a realizar la transcripción reversa del mismo a ADN complementario (ADNc). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando 5 μL ($0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) de ARN tratado con DNAsa de cada organismo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit Improm II Reverse Transcription System (Promega) (Anexo VI).

6.7.2. Genes de referencia.

En la qPCR el nivel de expresión del gen blanco es normalizado con la expresión de uno o más genes de referencia. La cuantificación relativa normalizada por genes de referencia internos minimiza las variaciones artificiales (diferentes concentraciones de muestras, la extracción de ARN, o la eficiencia de la transcripción reversa) por lo que es la forma más precisa para detectar la expresión diferencial, especialmente cuando hay pocas copias de ARNm (Axtner & Sommer, 2009).

Para esto se requiere que los genes de referencia se expresen de manera constante en cada célula o tejido; además de que no debe sobre- o subexpresarse en las condiciones experimentales (Gutierrez et al., 2008). Sin embargo en un gran número de estudios se han encontrado variaciones en la expresión de los genes de referencia entre tejidos (Aursnes et

al., 2011; Galiveti et al., 2010; Gutierrez et al., 2008) y condiciones experimentales (McCurley & Callard 2008; Guénin et al., 2009). Debido a que no hay un gen que actúe como gen de referencia universal, es de gran importancia hacer una validación sistemática de cada condición experimental y tejido (Ling & Salvaterra, 2011).

Para la normalización de la expresión de los genes de interés en este trabajo se seleccionaron cinco genes a partir de una búsqueda bibliográfica como posibles genes de referencia para *C. gigas*: *factor de elongación (ef2 α)*, *β -actina (act- β)*, *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)*, y los genes *ribosomales 18S y 28S (18S-ARN y 28S-ARN)*. Estos genes fueron seleccionados debido a que participan en diferentes rutas metabólicas, minimizando de esta forma un posible efecto de correulación entre genes (

Tabla I). Se evaluó la estabilidad en la expresión de estos genes entre cruza, temperaturas y estadios de desarrollo gonádico.

Tabla I. Función de los genes de referencia evaluados.

Gen	Función celular
<i>ef2α</i>	Factor de traducción en eucariotas
<i>act-β</i>	Proteína esencial para estructura y cinética del citoesqueleto
<i>gapdh</i>	Deshidrogenasa, oxidoreductasa en la glicólisis y gluconeogénesis.
18S	ARN estructural (involucrado en estructura de ribosoma)
28S	ARN estructural (involucrado en estructura de ribosoma)

6.7.2. Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR.

La evaluación de la eficiencia es esencial en la cuantificación de expresión por qPCR ya que está fuertemente influenciada por los componentes de la reacción de PCR (Pfaffl, 2004). Las pequeñas diferencias en la eficiencia de amplificación pueden tener un gran impacto en la productividad de una PCR (al no obtenerse el doble de amplicones en cada ciclo), de tal forma que diferencias en la eficiencia de amplificación entre genes blanco y de referencia puede llevar a errores en cuantificación relativa (Dieffenbach & Dveksler, 2003). Debido a lo anterior es necesario conocer la eficiencia de amplificación para cada uno de los genes blanco y de referencia.

La eficiencia (*e*) del qPCR se determinó de acuerdo a Pfaffl (2001) para cada par de oligonucleótidos-cebadores de los diferentes genes evaluados (Tabla II), de referencia y

blanco o de interés en este trabajo. Se obtuvo una curva estándar para cada gen de referencia así como para los cuatro genes de interés en este trabajo (genes blanco). La amplificación se realizó por triplicado en cada una de cuatro diluciones seriales (1/5) utilizando el ADNc de muestras de gónada (pool o mezcla de ADNc de ostiones machos y hembras en todos los estadios de desarrollo gonádico). Los análisis se realizaron en el termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Se utilizó como intercalante fluorescente EvaGreen® (Biotium).

Las concentraciones de reacción fueron de: 1x EvaGreen (7.5 μ L) (Anexo VII), 0.46 μ M (0.7 μ L) de oligonucleótidos (forward y reverse), 5 μ L de ADNc y H₂O libre de RNAsas en un volumen final de 15 μ L. Las condiciones de amplificación consistieron en: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15s y 1 min de elongación a 60°C; la lectura de amplificación se hizo a 77°C. Por último la curva de desnaturalización fue de 95°C a 60°C con un decremento de la temperatura de 1°C cada 10s. Como control negativo se utilizó H₂O milliQ.

En el caso exclusivo de los análisis del gen *vtg* así como del gen *fe2 α* usado para su normalización, se utilizó 7.5 μ L de SYBER (Applied Biosystem) como intercalante. Este mismo kit de SYBER también se empleó en la curva de calibración de *vtg* y *fe2 α* . La amplificación por qPCR consistió en: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15s y un paso de elongación a 60°C por 1 min en el que se tomó la lectura. La curva de desnaturalización fue de 95°C a 60°C con un decremento de la temperatura de 1°C cada 10s. A partir de las curvas de disociación se evaluó que la amplificación de los genes mostrara un solo pico (Tabla II). A diferencia de los demás genes, en los análisis de *vtg* se utilizó una mezcla de ADNc de hembras F I y F III.

Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos-cebadores de los genes de referencia y genes blancos. T: temperatura de alineamiento; pb: pares de bases; Tm: temperatura de disociación calculada; Cq: Cq mínimo de la curva estándar; Tm: temperatura de disociación; e: eficiencia.

Genes	Dirección	Secuencia (5'→3')	T (°C)	Producto (pb)	Tm	Cq	Tm	e
<i>β-actina: act-β</i> (Cadoret et al., 1999) GenBank: AF026063; FJ669295.1	Forward Reverse	GCCCTGGACTTCGAACAA CGTTGCCAATGGTGATGA	60	100	63.9 64.4	21.69	83	1.974
<i>Factor de elongación 2a: ef2a</i> (Fabioux et al., 2004 ^b) GenBank: AB122066.1	Forward Reverse	GATTGCCACACTGCTCACAT AGCATCTCCGTTCTTGATGC	60	114	63.9 64.3	20.77	83	1.939
<i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa: gapdh</i> (Lelong et al., 2007)	Forward Reverse	TTGTCTTGCCCCCTCTTGC CGCCAATCCTTGTTGCTT	60	127	64 63.8	24.59	84	1.903
<i>28S-RNA</i> (Gutiérrez-Rivera, 2012, dato no publicado)	Forward Reverse	GATGCTGGGAAGTGTGGT CTTTGGGCTGCATTCTCAA	60	130	61.1 63.8	15.57	89	2.067
<i>18S-RNA</i> GenBank: FJ356690.1	Forward Reverse	GGGTTAGAGGTGAAATTCTTGG GTTGGCATCGTTTATGGTCAG	60	145	64 62	13.48	84	2.080
<i>Vitelogenina: vtg</i> (Matsumoto et al., 2003) GenBank: AB084783; AB084783.1	Forward Reverse	CAGCATCGTTCTCCTTCCA GGTGTCTGGGACTGTTGA	60	173	64.1 63.8	23.46	76	1.952
<i>Oyster-vasa-like gene: Oyvlg</i> (Fabioux et al., 2004 ^b) GenBank: AY423380.1	Forward Reverse	AAATGGATTTCACACCACCA TGCCACCGATGTAGCAATTA	60	115	63.8 63.9	23.45	82	2.064
<i>Transforming growth factor β-like: ogTGFβ-like</i> (Fleury et al., 2008) GenBank: CK172362 EF563990.1	Forward Reverse	TTGGACATCAGGGAAATTCTG CCAAACGAAACGACAGGAAC	60	93	63.7 64.3	23.81	81	2.071
<i>Forkhead box l2: Cg-Foxl2</i> (Naimi et al., 2009) GenBank: FJ768956.1	Forward Reverse	AATATCAGGGATGGGCACAA GTCCTTGGGTGCAGGA ACTA	60	102	62 58	28.55	83	1.992

6.7.3. Validación de genes de referencia para el análisis en muestras de gónada de diferentes sexos y estadios

La selección de los genes de referencia (β -actina, $ef2\alpha$, $gapdh$, $18S$ y $28S$; Tabla II) se llevó a cabo evaluando la estabilidad en su expresión. La expresión se examinó en ADNc (1/10) de ostiones con las diversas condiciones (madurez gonádica, sexo y temperatura) (Tabla III). Los Cq promedio obtenidos fueron utilizados para calcular la estabilidad en la expresión de cada gen de referencia candidato usando los programas *geNorm* y *NormFinder*. El valor utilizado en *geNorm* fue una transformación de los valores de Cq en cantidades relativas (Q) con un nivel de expresión máximo de 1 (*geNorm* manual, 2008):

$$Q = E^{\text{deltaCq}}$$

$$Q = E^{(\text{minCq} - \text{sampleCq})}$$

Donde:

Q : cantidad de la muestra relativa a la muestra con mayor expresión.

E : eficiencia de amplificación ($E=100\%$).

minCq : menor valor de Cq= valor de Cq de la muestra con mayor expresión.

El cálculo de *geNorm* se basa en el principio de que la tasa de expresión de dos genes control internos ideales es idéntica en todas las muestras, a pesar de las condiciones experimentales o el tipo de células. Por lo tanto, la variación de la tasa de expresión de dos genes de referencia refleja el hecho de que uno de estos genes no es expresado constantemente, con un incremento de la tasa de variación correspondiente al decremento en la estabilidad de expresión (Vandesompele et al., 2002). Además, *geNorm* calcula el valor V que indica el número de genes que se deben de utilizar para normalizar. Vandesopele et al. (2002) proponen el valor de 0.15 debajo del cual no es requerido adicionar genes de referencia. Un valor elevado de V después de incluir un gen candidato al análisis indica un efecto negativo en el factor de normalización y por lo tanto debe ser excluido del conjunto. Sin embargo, si la adición de un gen candidato resulta en un valor V reducido este gen debe de considerarse en la normalización.

NormFinder utiliza un modelo que analiza las varianzas en los datos de expresión lo cual permitió hacer una evaluación entre-grupos e intra-grupos (grupos = condiciones de este estudio, como temperatura, estadio, sexo, cruza) más robusta en caso de genes co-expresados ya que se evalúa la estabilidad de cada gen independientemente de otros genes. Para este análisis se usó el logaritmo natural de los Cq promedio por individuo o muestra (Andersen et al., 2004).

Finalmente, también se utilizó el programa *Bestkeeper* (Pfaffl et al., 2004), que es otra herramienta que determina el gen de referencia “óptimo” utilizando un análisis de correlación pareada de los genes candidatos (Pfaffl et al., 2004). BestKeeper estima la correlación del nivel de expresión entre todos los posibles candidatos. Los genes altamente correlacionados son combinados en un índice. Después de calcularse la correlación pareada entre cada candidato y el índice, se explica la relación entre el índice y la contribución del gen candidato.

Debido a inconsistencias en los resultados obtenidos con los análisis en los programas antes mencionados, se realizó un análisis de varianza para establecer si existían diferencias en estabilidad de la expresión (fue usada la cantidad relativa Q mencionada previamente) entre cruza, temperaturas, sexos y estadios para cada uno de los genes de referencia siendo evaluados. Se utilizó el valor F (Fisher) como una relación de la variación dentro y entre grupos. De tal manera que un valor bajo de F indica una variación reducida entre grupos (Kortner et al., 2011).

Para seleccionar los genes de referencia a utilizar en normalizar la expresión del gen *vtg* se realizaron amplificaciones por qPCR separadamente, utilizando ostiones en estadio de indiferenciados y hembras en estadios 1 y 3, obtenidos de los ostiones experimentales sometidos a las temperaturas de 19-23°C y 27-31°C. Como se mencionó previamente, en estos análisis se empleó un intercalante diferente (SYBER) al de los demás genes blanco en las reacciones tanto en la evaluación de las eficiencias de los oligonucleótidos así como en el análisis de expresión.

Tabla III. Número de muestras utilizadas para evaluar la estabilidad en la expresión de los posibles genes de referencia.

		SEXO					
		INDIFERENCIADO		MACHO		HEMBRA	
Temperaturas		19-23 °C	27-31°C	19-23 °C	27-31°C	19-23 °C	27-31°C
ESTADIOS	0	5	2				
	1			2		4	4
	3			5	6	4	5
	5			4		4	

6.7.4. Análisis de expresión del gene *vtg*.

Debido a que se ha observado que el contenido de la proteína VTG incrementa en la gónada a partir de hembras previtelogénicas hasta vitelogénicas (Arcos et al., 2009), en el presente estudio se evaluó la expresión del gen *vtg* tanto en hembras en estadio I de desarrollo gonádico (solamente encontradas en la temperatura de 19°C) como en hembras en estadio III (encontradas en la temperatura de 31°C) de ambas cruzas [(F1_(CH:EU) x AU) y (EU x F1_(CH:AU))]. Además, fueron incluidos organismos indiferenciados para poder comparar su expresión.

6.7.5. Análisis de expresión de los genes *OyVlg*, *Cg-Foxl2* y *og-TGFβ-like*.

La expresión de los genes *OyVlg*, *Cg-Foxl2* y *og-TGFβ-like* se analizó en ostiones indiferenciados, machos (estadios III y IV) y hembras (estadios I y III) de ambas cruzas correspondientes a la misma temperatura (Tabla IV).

Debido a que no todos los estadios de desarrollo o sexos fueron encontrados en ostiones a las diferentes temperaturas evaluadas, el efecto de la temperatura en la expresión de estos genes no pudo ser analizado.

Tabla IV. Número de individuos por sexo y temperatura experimental de la que fueron tomados para ser analizados en su expresión de los genes *OyVlg*, *og-TGFβ-like* y *Cg-Foxl2*.

Cruzas	Temperatura	Sexos:					
		Estadios:	Indiferenciados	Hembras		Machos	
			0	1	3	3	4
F1 _(CH:EU) x AU	19°C			5			
	27°C						9
	31°C					15	14
EU x F1 _(CH:AU)	19°C			17			
	27°C						12
	31°C					14	17

Resumen:

Estadio	Indiferenciados		Hembras		Machos	
	0	1	3	3	4	
F1 _(CH:EU) x AU	9	5	15	14	9	
EU x F1 _(CH:AU)	15	17	14	17	12	

Se estimó el valor de expresión relativa por medio del programa *qBase^{PLUS}*, v2.0 (Biogazelle, Bélgica). Este programa estima las cantidades relativas de expresión génica normalizada (NRQs: *Normalized relative quantities*) utilizando un modelo que toma en cuenta el o los genes de referencia seleccionados por su estabilidad para normalizar genes blanco (Hellemans et al., 2007). La ecuación de normalización utilizada es:

$$NRQ_{jk} = \frac{RQ_{jk}}{NF_k}$$

Donde:

RQ: cuantificación relativa (RQ=E^{ΔCq}).

NF: factor de normalización ($NF_k = \sqrt[f]{\prod_{p=1}^f RQ_{pk}}$)

Adicionalmente, este programa permite incluir un calibrador entre placas evaluadas con fines de corregir la variación entre las mismas. El calibrador utilizado consistió en un pool de ADNc (1/10) amplificado simultáneamente con cada uno de los genes de referencia y genes blanco. De tal forma que al final se obtiene un NRQ calibrado (CNRQ) (Hellemans et al., 2007):

$$CNRQ_{jkl} = \frac{NRQ_{jkl}}{CF_{jl}}$$

NRQ: cantidad relativa de expresión génica normalizada.

CF: factor de calibración ($CF_{jl} = \sqrt[c]{\prod_{m=1}^c NRQ_{jlm}}$).

6.8. Análisis estadísticos.

En todos los análisis descritos a continuación se empleó el programa *STATISTICA* versión 6.0 evaluando primero la normalidad de los datos (longitud de la concha, peso total, peso de biomasa e índice de condición) usando la prueba Kolmogorov-Smirnov y comprobando la homocedasticidad, para lo cual se utilizó la prueba de Cochran (Daniel, 2005).

6.8.1. Análisis de variables morfométricas.

Las diferencias en variables morfométricas entre cruzas experimentales y temperaturas fueron evaluadas con un análisis de varianza de efectos fijos (cruzas experimental y temperatura, así como su interacción), utilizando como covariable en el análisis el estadio de desarrollo gonádico de cada individuo.

Las medias fueron analizadas para establecer si existían diferencias significativas utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey. En todos los casos se empleó una significancia estadística de $P < 0.05$.

6.8.2. Análisis del estadio de desarrollo gonádico.

Para establecer si existían diferencias en el estadio de desarrollo gonádico entre grupos experimentales (cruzas de tres vías) y temperaturas se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo lineal generalizado (GLZ '*generalized linear model*'). Se asignó un

valor numérico para cada individuo dependiendo de su estadio de desarrollo gonádico: 1 = indiferenciados (en reposo sexual); 2 = gametogénesis temprana; 3 = gametogénesis tardía; 4 = madurez gonádica; 5 = desove; y 6 = reabsorción. Se asumió una distribución Poisson.

6.8.3. Análisis de las proporciones de sexos.

Para conocer si existían diferencias en los sexos observados entre cruzas experimentales así como entre las temperaturas a que fueron sometidos se utilizó un modelo log-linear.

6.8.4. Análisis del esfuerzo reproductivo, del diámetro y número de ovocitos, del índice de madurez gonádica y de la biomasa de gónada.

A partir del porcentaje de área gonadal obtenido, se obtuvo la frecuencia (p) como %gónada/100 y se calculó el arcoseno de \sqrt{p} (Sokal y Rohlf, 1981). A partir de esta transformación se evaluó el esfuerzo reproductivo entre cruzas y temperaturas utilizando un análisis de varianza de efectos fijos. Debido a que el número de organismos fue variable entre cruzas y/o temperaturas, estos análisis fueron realizados ponderando. Se utilizó la varianza estimada de cada craza en cada temperatura, obteniendo el valor de ponderación a partir de la relación siguiente: $1/\sigma^2$ (Neter et al., 1985).

Para evaluar las diferencias en tipo de ovocitos e índice MO se realizó un análisis de varianza de efectos fijos (cruza y temperatura, además de la interacción). De igual forma se utilizó la varianza estimada de cada craza y temperatura para ponderar con la fórmula: $1/\sigma^2$ (Neter et al., 1985). Finalmente las medias del tipo de ovocitos e índice MO se evaluaron con la prueba *a posteriori* de Fisher. La significancia estadística utilizada fue $P < 0.05$.

La biomasa de gónada se analizó por medio de un análisis de varianza de efectos fijos (cruza, temperatura e interacción y al igual que para los cálculos previos se utilizó la varianza estimada de cada craza y temperatura para ponderar con la fórmula: $1/\sigma^2$ (Neter et al., 1985).

6.8.5. Análisis de la expresión génica.

Este análisis se realizó para cada uno de los genes blanco evaluados, *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF- β* y *vtg*, y entre estadios de desarrollo gonádico y sexos. Al igual que con los análisis antes descritos, se utilizó $1/\sigma^2$ como factor de ponderación en los análisis (Neter et al.,

1985). Las medias en expresión génica fueron evaluadas utilizando la prueba *a posteriori* de Fisher. Para todos los casos se utilizó una significancia estadística de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

En el análisis preliminar de los grupos se encontró que no se presentaron diferencias significativas en las variables biométricas entre las cruzas de tres vías recíprocas $F1_{(EU/CH)} \times AU$ y $F1_{(CH/EU)} \times AU$, así como tampoco entre las cruzas de tres vías recíprocas $EU \times F1_{(AU/CH)}$ y $EU \times F1_{(CH/AU)}$. (Fig. 15; Tabla V).

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre esos grupos recíprocos los grupos finalmente analizados se designaron como dos cruzas en tres vías: (1) $F1_{(CH:EU)} \times AU$, y (2) $EU \times F1_{(CH:AU)}$, en donde el sufijo indica la agrupación de las cruzas recíprocas dentro de esa F1.

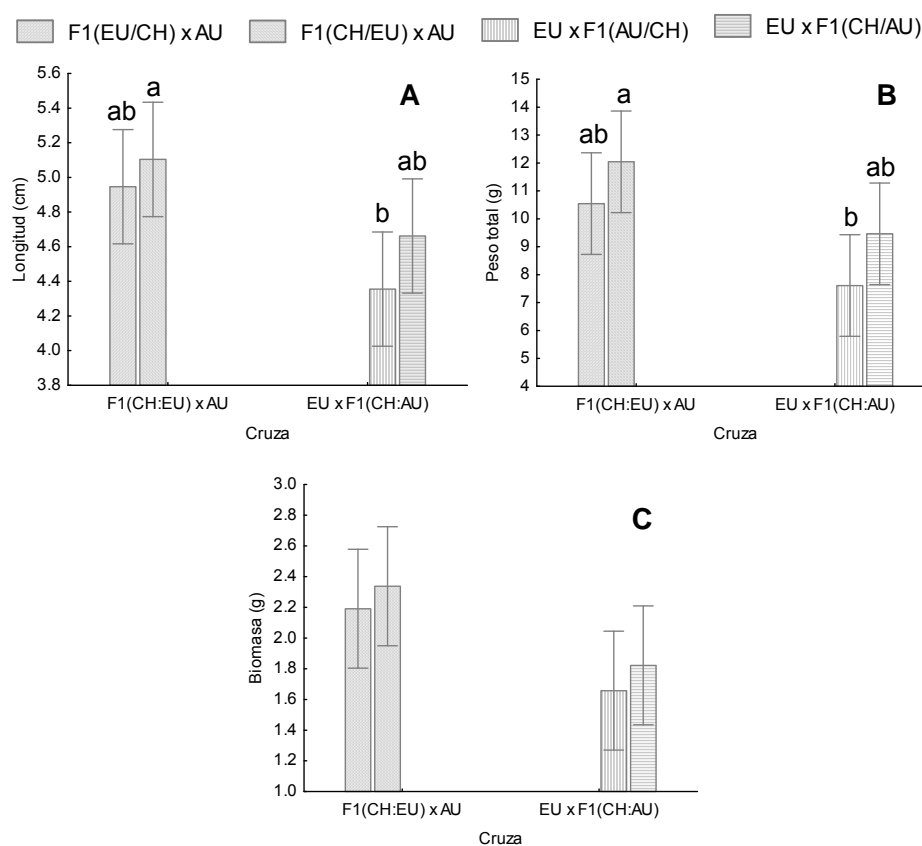


Figura 15. Medias significativas en variables biométricas de cruzas de *C. gigas* traídas de Laguna San Ignacio. (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa.

Tabla V. Valores de significancia (P) encontrados en el análisis de varianza evaluando diferencias en caracteres morfométricos entre cruza de *C. gigas* traídas de Laguna San Ignacio.

	Valor de P		
	Longitud	Peso total	Biomasa
Grupos	0.002*	0.003*	0.008*
Cruza (Grupos)	0.34	0.19	0.72

* Indica significancia al nivel establecido ($P < 0.05$).

7.1 Variables morfométricas

La evaluación de características morfométricas al concluir los 31 días de tratamiento en diferentes temperaturas se encontró que la longitud, el peso total, y la biomasa presentaron diferencias estadísticas entre las cruza de tres vías y entre temperaturas, así como también se observó una interacción significativa entre los dos efectos principales (Tabla VI). La covariable estadio, fue significativa únicamente en el caso de la biomasa.

Tabla VI. Valores de significancia (P) encontrados en el análisis de varianza evaluando diferencias en caracteres morfométricos entre cruza de *C. gigas* mantenidas por 31 días a diferentes temperaturas.

Efectos	Característica	Grados de libertad	Valor de P			
			Longitud	Peso	Biomasa	IC
Estadio		1	0.6176	0.7754	0.0000*	0.0000*
Temperatura		3	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
Cruza		1	0.0000*	0.0000*	0.0002*	0.9102
Temperatura x Cruza		3	0.0000*	0.0000*	0.0164*	0.0000*

* Indica significancia al nivel establecido ($P < 0.05$).

El índice de condición no presentó diferencias estadísticas entre las cruza de tres vías, pero si se observó una interacción entre temperaturas y cruza (Tabla VI). Al igual que con la biomasa, la covariable estadio fue significativa.

El análisis de medias indicó que la longitud promedio fue mayor en la cruza-3-vías $F1_{(CH:EU)} \times AU$, con 4.68 cm, mientras que la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ tuvo 4.30 cm (Fig. 16A). La cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ también presentó el mayor peso total promedio (10.22 g) y

biomasa (2.06 g) en contraste con EU x F1_(CH:AU) (peso total de 8.63 g y biomasa de 1.65 g) (Fig. 16B, C).

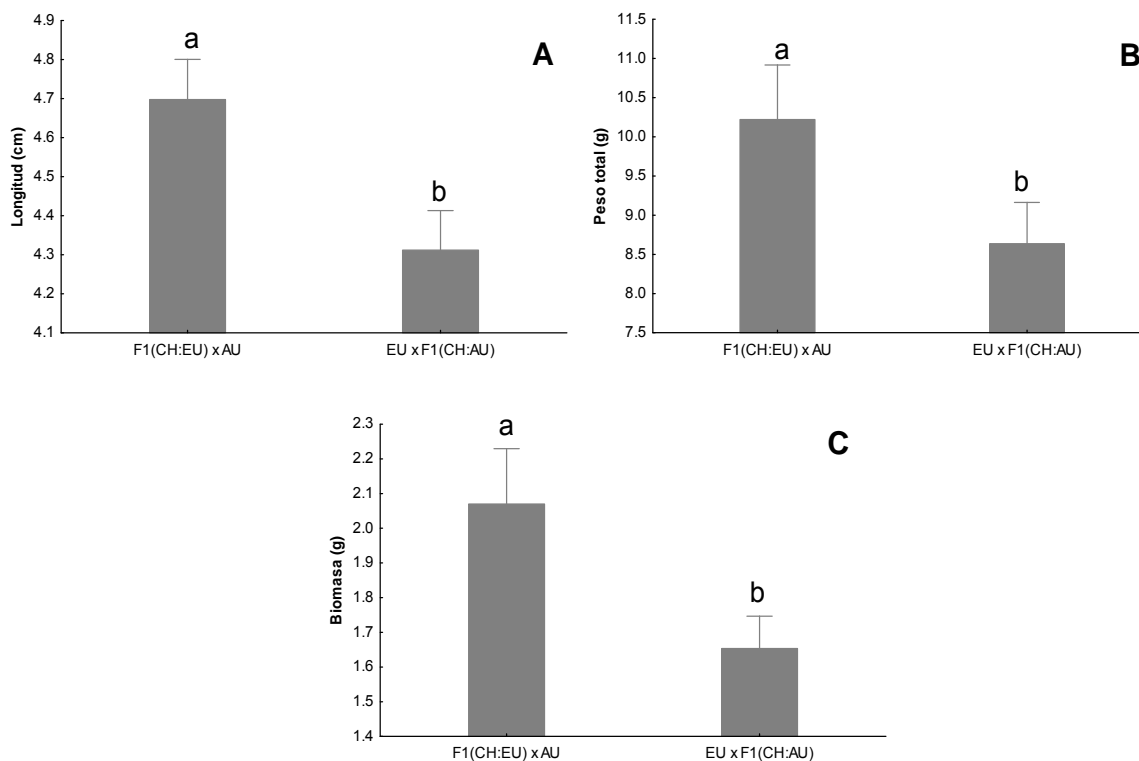


Figura 16. Medias significativas en variables biométricas de cruas de *C. gigas*. (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa.

En cuanto a las diferencias en variables biométricas entre temperaturas, se encontró que la mayor longitud y peso total promedio se alcanzaron en los organismos sometidos a una temperatura de 23°C (4.84 cm; 11.16 g), y los valores promedios más bajos en el caso de longitud de concha se obtuvieron en organismos sometidos a 27°C y 31°C (Fig. 17A y B). Sin embargo, en peso total, los organismos sometidos a 19°, 27° y 31° C no difirieron significativamente. En cuanto a la biomasa e índice de condición (IC), se observó un decremento progresivo conforme se mantuvo a los organismos a mayores temperaturas (Fig. 17C, D), con el promedio más elevado para ambos, biomasa e índice de condición observado en 19°C (2.25 g; 0.28 IC), ambos de los cuales decrecieron significativamente a

partir de la temperatura de 23°C (1.90 g; 0.22 IC), pero ya no difirieron estadísticamente de este último en las temperaturas de 27° (1.68 g; 0.21 IC) y 31°C (1.63 g; 0.19 IC).

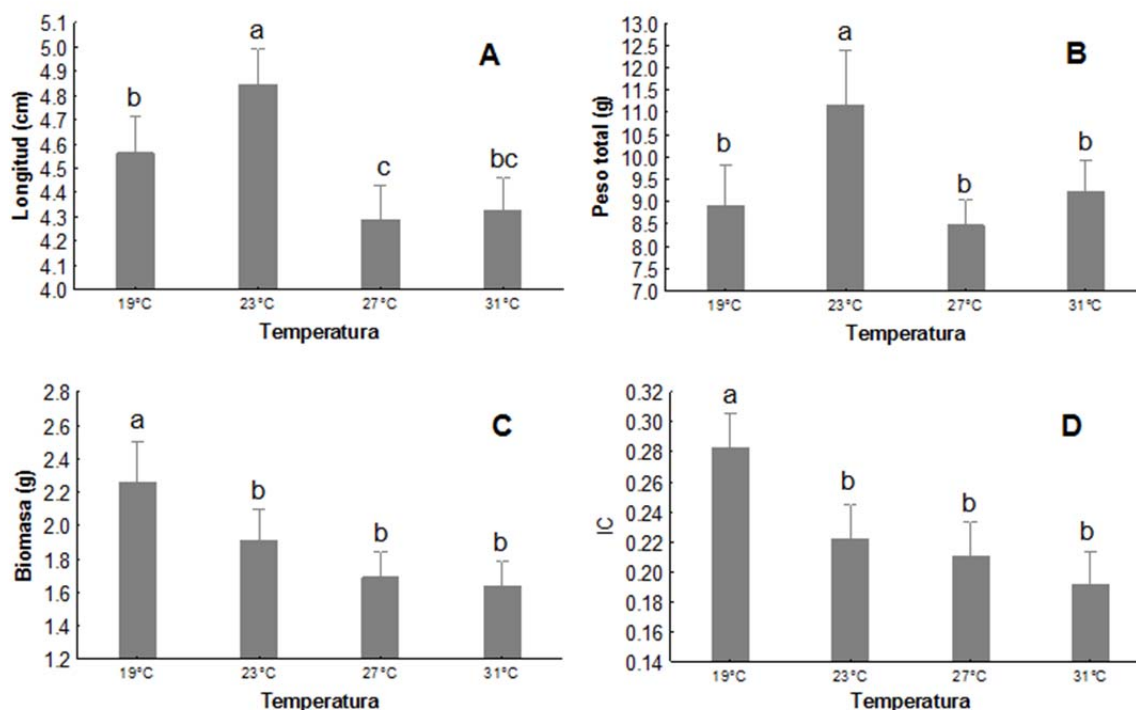


Figura 17. Medias de crecimiento en *C. gigas* crecidos en diferentes temperaturas. (A) Longitud de la concha; (B) peso total; (C) biomasa; (D) índice de condición (IC).

Al comparar las medias de las cruza en las diferentes temperaturas con fines de entender las causas de la interacción entre grupos y temperaturas se encontró que en el caso de la longitud de concha (Fig. 18A), F1_(CH:EU) x AU presentó la mayor longitud a los 19°C (5.05 cm), pero una menor longitud fue observada a partir de la evaluación a 23°C, la cual alcanzó diferencias significativas a la temperatura de 27°C. La cruce EU x F1_(CH:AU) presentó la mayor longitud de concha en la temperatura de 23°C (4.93 cm), y no se encontró diferencia en la longitud de concha a los 19°C, 27°C y 31°C. Este mismo patrón fue observado en peso total para esta ultima cruce, EU x F1_(CH:AU) (Fig. 18B), pero no para la cruce F1_(CH:EU) x AU, la cual no presentó diferencias en peso total entre las diferentes temperaturas evaluadas.

En el caso de la biomasa, la interacción entre cruza y temperaturas fue causada por las diferencias en biomasa presentadas por la cruce $F1_{(CH:EU)} \times AU$ entre las temperaturas evaluadas: la biomasa decreció significativamente de un máximo de 2.64 g a 19°C a un mínimo de 1.64 g y 1.84 g a 27°C y 31°C, respectivamente (Fig. 18C). Por otro lado, la biomasa de la cruce $EU \times F1_{(CH:AU)}$, la cual es significativamente menor que la de la cruce $F1_{(CH:EU)} \times AU$ a 19° y 23°C, solo mostro una tendencia a disminuir a mayores temperaturas pero no alcanzó diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas.

El mayor índice de condición se observó a los 19°C en ambas cruza, pero este disminuyó a 23°C significativamente solo para la cruce $EU \times F1_{(CH:AU)}$, manteniéndose igual en la cruce $F1_{(CH:EU)} \times AU$. En esta última cruce, el índice de condición disminuyó significativamente a partir de los 27°C (Fig. 18D).

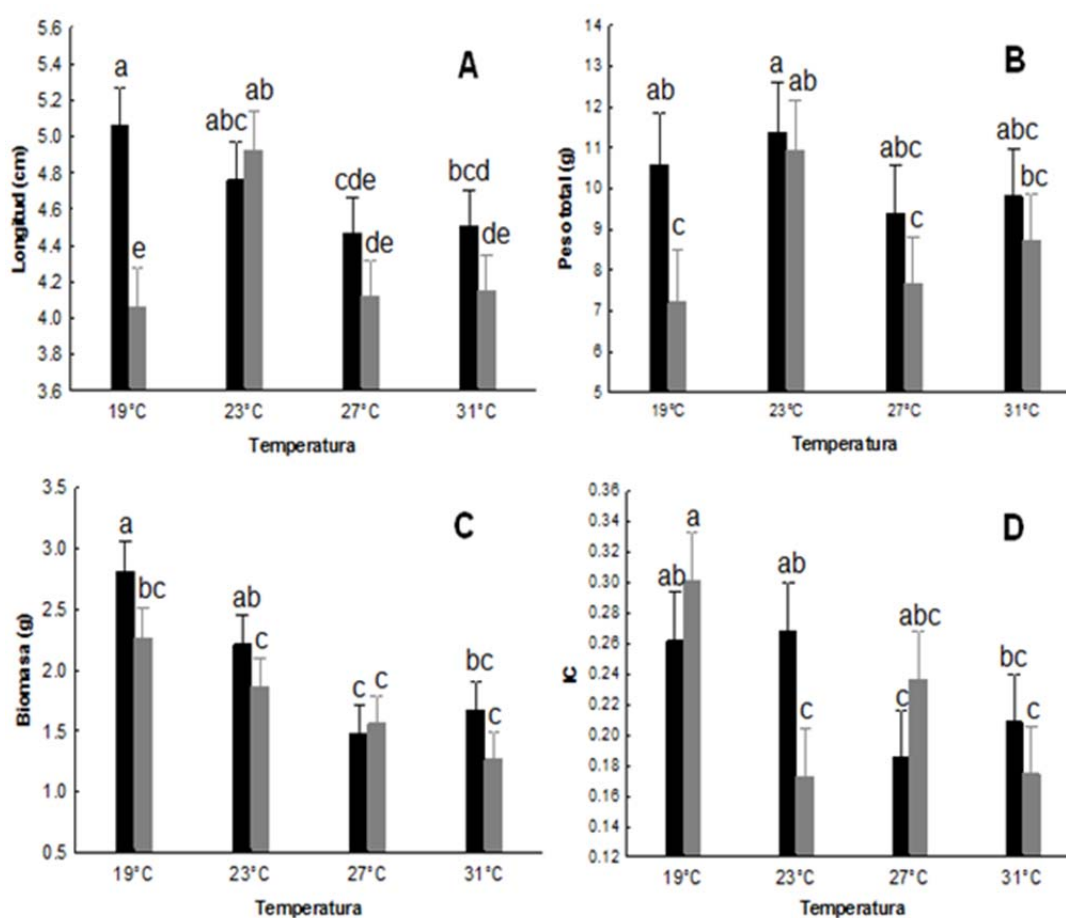


Figura 18. Crecimiento en longitud (A), peso total (B), biomasa (C) e IC (D) en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $EU \times F1_{(CH:AU)}$ de *C. gigas* crecidas en diferentes temperaturas.

7.2 Desarrollo de gónada y sexos.

7.2.1. Análisis cualitativo de estadios de desarrollo gonádico.

En la Fig. 19 se aprecia que el porcentaje de ostiones en estadio III incrementó en ambas cruzas al aumentar la temperatura, en los tratamientos de 19°C, 23°C, 27°C y 31°C la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tuvo un 23%, 31%, 53% y 75% respectivamente, mientras el porcentaje para la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ fue 6.8%, 18%, 51% y 75%. Para los primeros estadios de desarrollo se observa una disminución del porcentaje en las temperaturas altas (27°C y 31°C). El estadio II en la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ se observa en un 4%, 3%, 2% y 2% en los tratamientos de temperatura, y en $EU \times F1_{(CH:AU)}$ sólo se observa un 3% a 19°C.

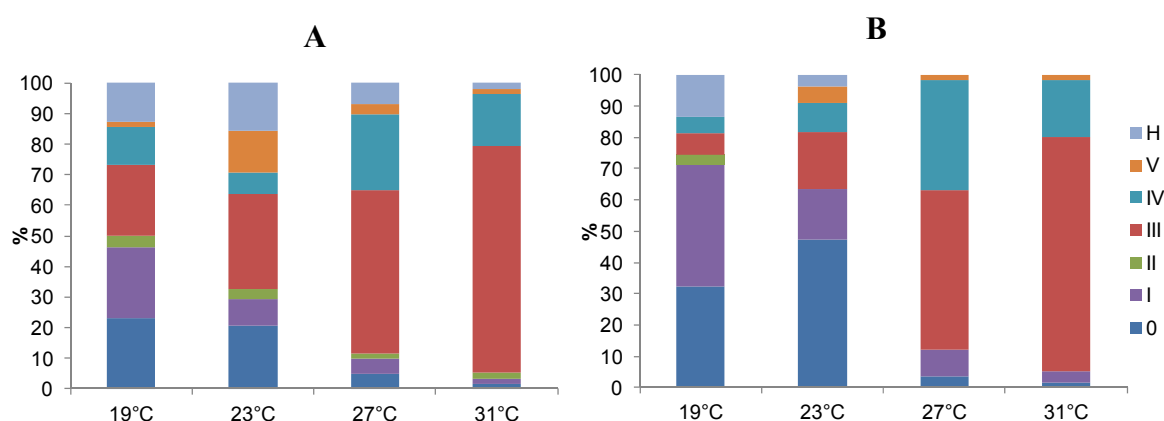


Figura 19. Porcentaje de estadios de desarrollo gonádico por craza en cada temperatura: (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

El porcentaje de hembras en estadio III de desarrollo gonádico en las temperaturas de 19°C, 23°C, 27°C y 31°C corresponden a 11%, 14%, 37% y 34% en la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$; y 2%, 4%, 37% y 32% para la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$. Por su parte en las mismas temperaturas los machos en estadio III tienen un porcentaje de 13%, 17%, 17% y 41% en la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$; y en la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (Fig. 20). Es posible observar que en cada temperatura (19°C, 23°C, 27°C y 31°C) hay una mayor proporción de ostiones machos desovados V (7%, 3%, 20% y 15% en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; y 3%, 7%, 30% y 18% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) que de hembras (5%, 3%, 5% y 2% en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; y 2%, 2%, 5% y 0% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) (Fig. 20).

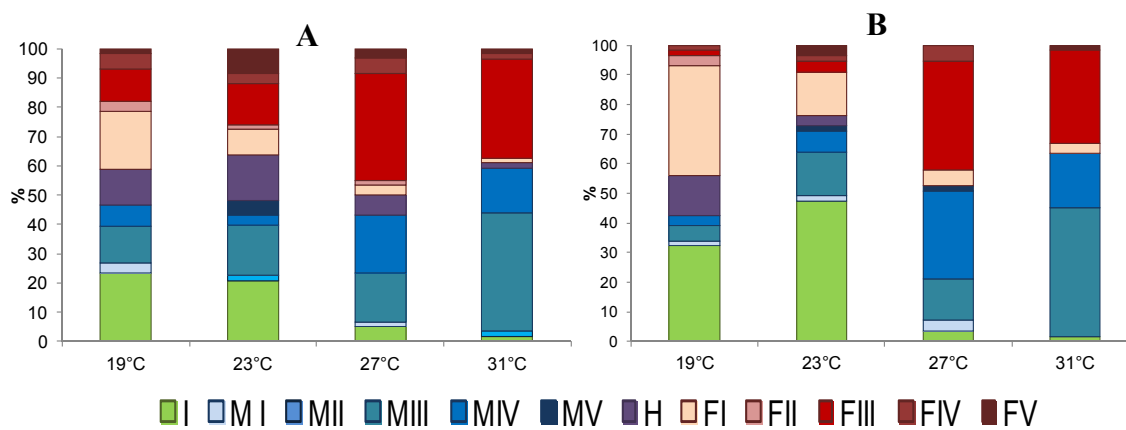


Figura 20. Porcentaje de estadios de desarrollo gonádico por cruza (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$ en cada temperatura en cada sexo: Indiferenciados (I); machos (M); hembras (F); y hermafroditas (H).

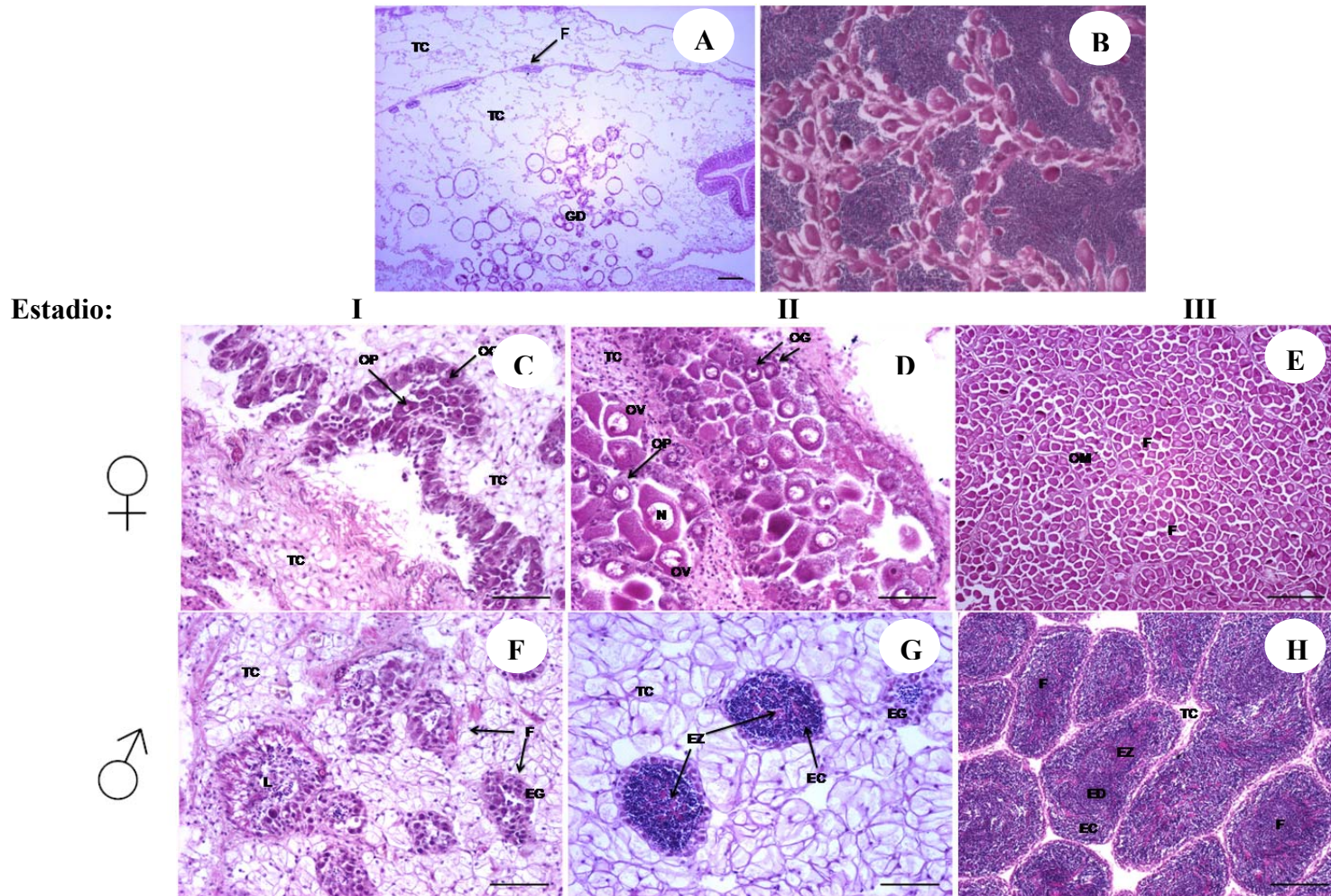


Figura 21. Estadios de desarrollo gonádico en *C. gigas*. A: Indiferenciados (barra=100 μ m); I: gametogénesis temprana, II: gametogénesis tardía, III: madurez y B: hermafrodita (barra= 50 μ m). TC: tejido conectivo; F: folículo; GD: glándula digestiva; N: núcleo; OG: ovogonia; OP: ovocito previtelogénico; OV: ovocito vitelogénico; OM: ovocito maduro; EG: espermatogonia; EC: espermatocito; ED: espermátida; EZ: espermatozoide; L: lumen. Indiferenciado: A; Machos: C, E, G; Hembras: B, D, F; Hermafrodita: H.

7.2.2. Análisis cuantitativo de estadios de desarrollo gonádico.

El ANOVA-GLZ para evaluar el efecto de cruza y temperaturas sobre el estadio de desarrollo gonádico indicó efectos significativos en cruza, temperatura y la interacci. Se observó que $F1_{(CH:EU)} \times AU$ se encontró en promedio en el estadio 3.75 mientras que $EU \times F1_{(CH:AU)}$ estuvo en 3.39 (Fig. 22) con diferencias estadísticamente significativas (Tabla VII). Al considerar el efecto de la temperatura en el desarrollo gonádico se encontró que esta tiene un efecto directo significante (Tabla VII), observándose que al aumentar la temperatura los ostiones presentaron un estadio de desarrollo gonádico más avanzado (Fig. 23).

Tabla VII. Análisis de varianza con el modelo lineal generalizado (GLZ) evaluando el efecto de la cruza y temperatura, así como la interacción entre estos (con biomasa como covariable) sobre los estadios de desarrollo gonádico de *C. gigas*.

Efectos	Grados de libertad	Estadio
Biomasa	1	0.0000*
Temperatura	3	0.0000*
Cruza	1	0.0027*
Temperatura x Cruza	3	0.0019*

* Indica significancia al nivel establecido ($P < 0.05$).

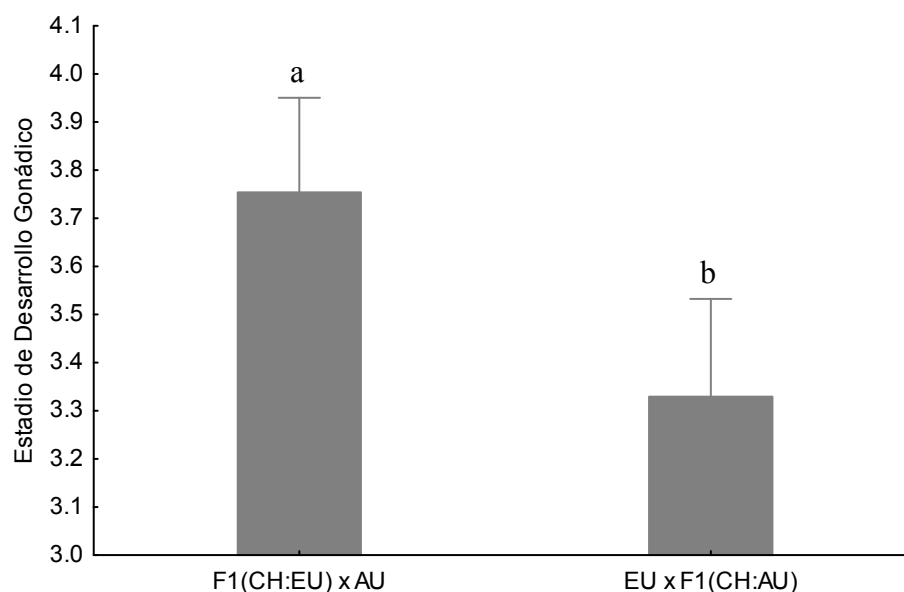


Figura 22. Estadios de desarrollo gonádico promediado en ambas cruza de *C. gigas*.

El incremento en el desarrollo gonádico (Fig. 24) se presenta para ambas cruza a las temperaturas de 27°C y 31°C (4.22 y 4.18), mismas temperaturas en las que se observaron los valores más bajos de peso total e IC promedio. En las temperaturas bajas, de 19°C y 23°C, se observó mayor IC promedio y el desarrollo gonádico fue inferior (2.7 a 3.2) comparado con las dos mayores temperaturas.

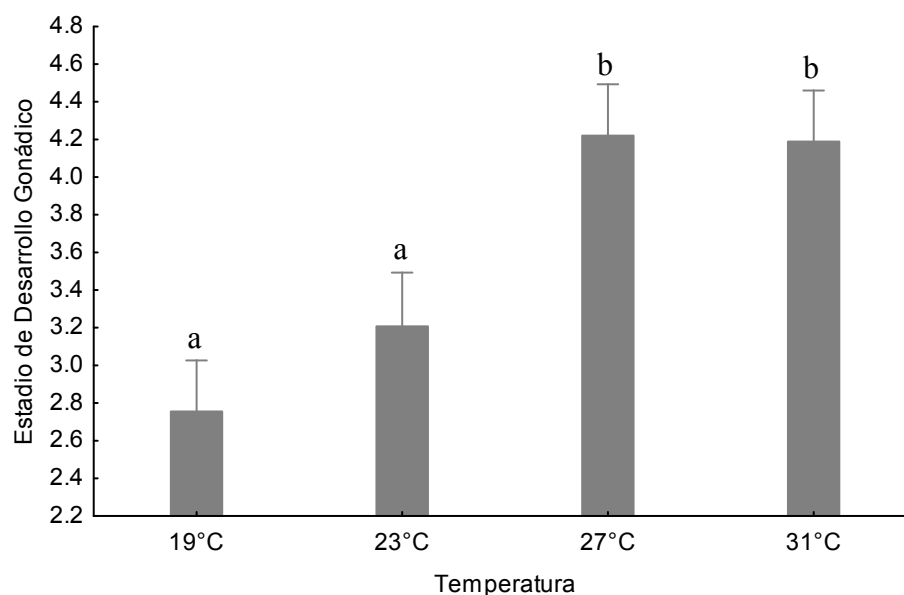


Figura 23. Estadios de desarrollo gonádico promediado en diferentes temperaturas a las que se sometió a *C. gigas*.

En las temperaturas bajas (19°C y 23°C) la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tuvo mayor desarrollo gonádico, con estadios promedio de 2.98 en 19°C y 3.79 en 23°C comparado con la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$, la cual a 19°C tuvo un promedio de 2.53 y a 23°C de 2.70. Sólo en la temperatura de 23°C se presentaron diferencias significativas entre las cruza ($P < 0.05$). Por otra parte, a temperaturas elevadas (27°C y 31°C) en ambas cruza se encontró un incremento en el estadio de desarrollo sin diferencias estadísticas. En la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ se observó el mayor estadio de desarrollo a los 27°C (4.29) y una posterior disminución en 31°C (4.07), mientras que en la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ el incremento del estadio de desarrollo gonádico fue constante hasta (4.3) (Fig. 24).

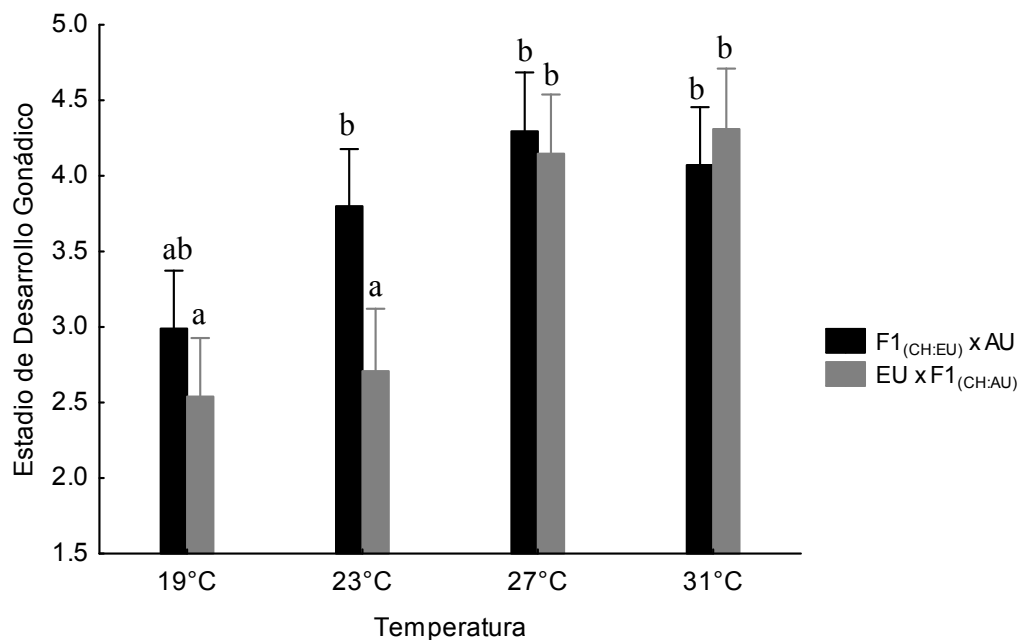


Figura 24. Estadio de desarrollo gonádico promediado en cruces de *C. gigas* sometidas a diferentes temperaturas.

7.2.3. Frecuencias de sexos en las cruces de *C. gigas*.

En cuanto a las proporciones de sexos, se observó una disminución de organismos indiferenciados y hermafroditas al incrementar la temperatura (Fig. 25), y un aumento en los ostiones machos y hembras, siendo mayor el porcentaje de machos a 31°C (60%).

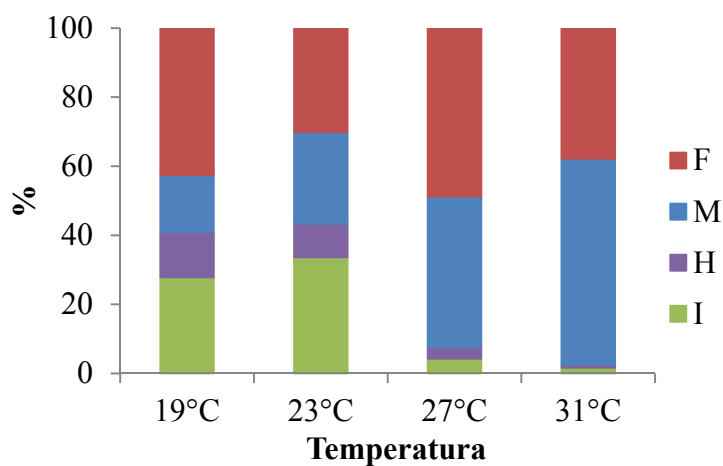


Figura 25. Frecuencia de sexos encontrados en *C. gigas* bajo las temperatura de cultivo. F=hembras; M=machos; H= hermafroditas; I= indiferenciados.

Se observa el mismo porcentaje de machos en ambas cruza (37%), mientras que hay mas hembras en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (42%) comparado con $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (38%). Los hermafroditas son más frecuentes en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (9%) mientras que los indiferenciados son más abundantes en $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (21%) (Fig. 26).

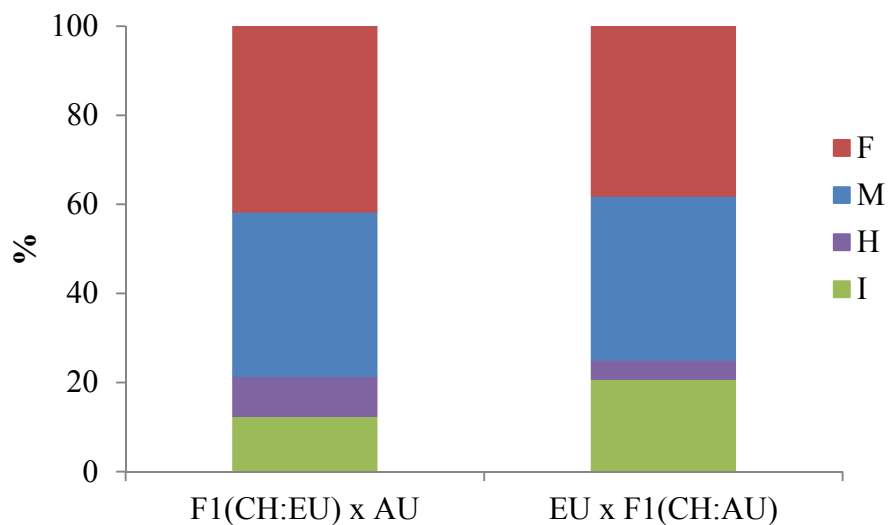


Figura 26. Frecuencia de sexos encontrados en los grupos de *C. gigas* evaluados. F=hembras; M=machos; H= hermafroditas; I= indiferenciados.

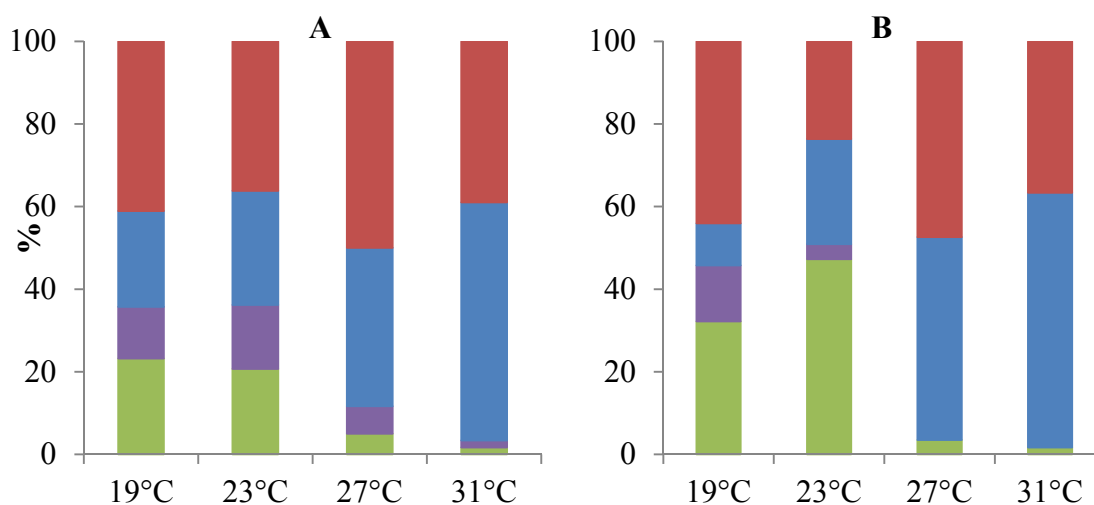


Figura 27. Porcentaje de sexos (hembra: rojo; macho: azul; hermafrodita: morado; indiferenciado: verde) por cruza: (A) $F1_{(CH:EU)} \times AU$; (B) $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

La crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó hermafroditas en todas las temperaturas (13% en 19°C; 16% en 23°C, 7% en 27°C y 2% en 31°C) mientras que la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$ sólo presentó 14% de hermafroditas en 19°C y 4% en 23°C. El porcentaje de machos incrementó en ambas cruzas consistentemente con el incremento de las temperaturas en los tratamientos a 19°C, 23°C, 27°C y 31°C; para la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ se observó un porcentaje de 23%, 28%, 38% y 58% respectivamente, mientras que en la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$ fue de 10%, 25%, 49% y 62% respectivamente (Fig. 27). Por su parte la proporción de ostiones hembras varió en las diferentes temperaturas, presentando porcentajes de 41%, 36%, 50% y 39% en la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$, y de 44%, 24%, 47% y 37% en la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

7.2.4. Índice de área gonadal, número y área de ovocitos, e índice de madurez ovárica.

El índice de área gonadal se analizó a través del área de cobertura gonadal estimada. En el análisis de variancia se evaluó el efecto de la crucea y temperatura sobre el área de tejido gonadal observado en hembras y machos en estadio 3 y 4 de *C. gigas* (Tabla VIII).

Tabla VIII. Análisis de variancia evaluando el efecto de la crucea y temperatura, así como la interacción entre estos sobre el índice de área gonadal de *C. gigas*.

Efectos	Grados de libertad	Cuadrados medios (MS)	P
Cruza	1	2.74	0.10
Temperatura	3	0.99	0.39
Temperatura x Cruza	3	0.94	0.42

* Indica significancia al nivel establecido ($P < 0.05$)

Se observó una mayor área relativa de tejido gonadal en la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (0.59) mientras que en la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$ fue menor (0.52) (Fig.28). Sin embargo, el factor crucea no tuvo un efecto significativo en el desarrollo del área gonadal (Tabla VII). En la Figura 29 se observa que el área relativa de tejido gonadal tiende a aumentar con el incremento de temperatura, sin embargo, al igual que con las cruzas, estas diferencias no son significativas (Tabla VIII).

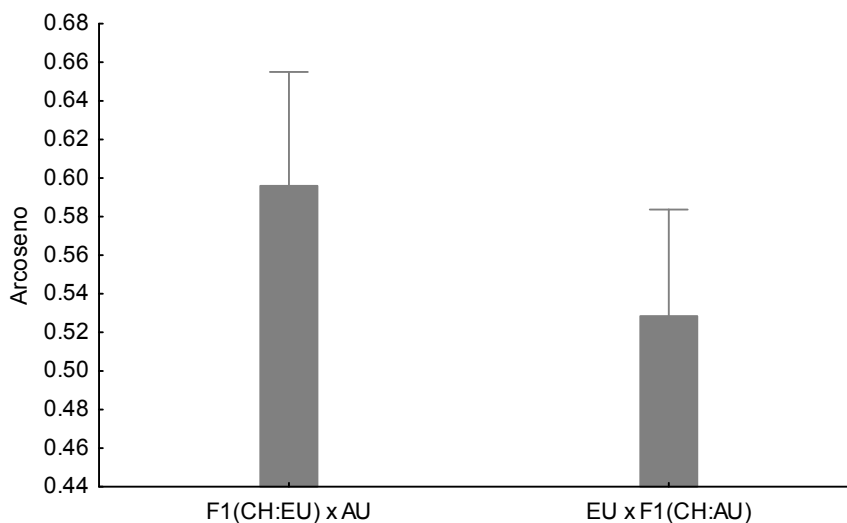


Figura 28. Área de cobertura gonadal promedio en las cruces $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $EU \times F1_{(CH:AU)}$ de *C. gigas*. Los valores se expresan en Arcoseno.

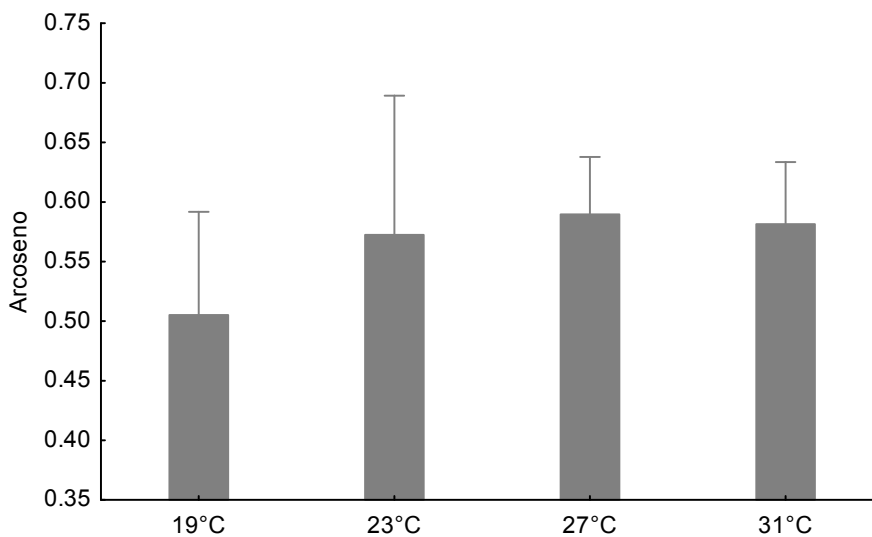


Figura 29. Área de cobertura gonadal promedio de *C. gigas* sometido a diferentes temperaturas. Los valores se expresan en Arcoseno.

En las cruces sometidas a las diferentes temperaturas se observó que en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ el área de tejido gonadal fue constante (de 0.59 en 19°, 23° y 27°C, y de 0.6 en 31°C) sin presentar diferencias estadísticamente significativas en ninguna temperatura. Mientras que el área relativa de tejido gonadal en $EU \times F1_{(CH:AU)}$ fue incrementando de la temperatura de 19°C (0.41), 23°C (0.53), a las de 27°C (0.58) y 31°C (0.56) (Fig. 30).

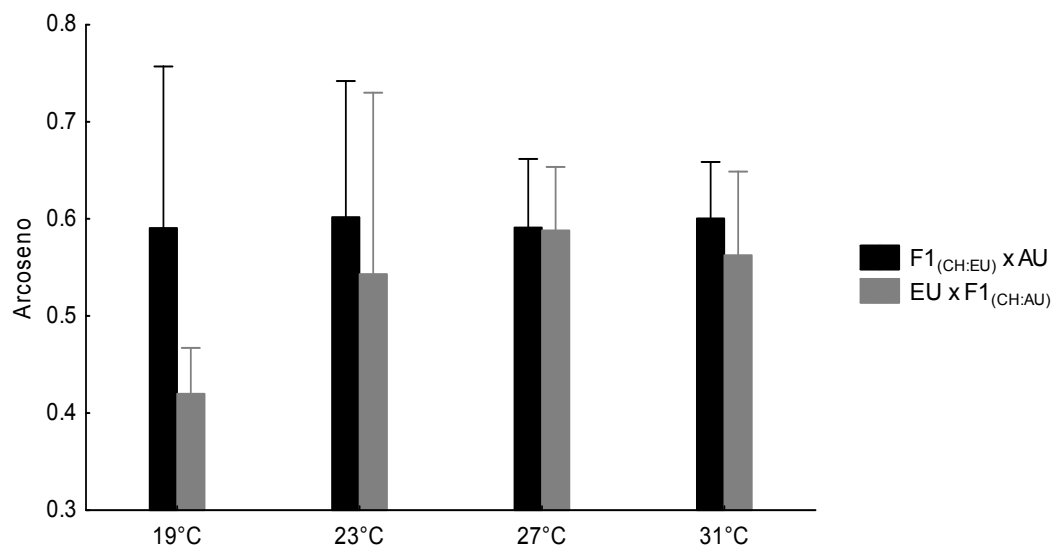


Figura 30. Área de cobertura gonadal de cada cruce de *C. gigas* sometidas a diferentes temperaturas. Los valores se expresan en Arcoseno, y las líneas con desviaciones representan los intervalos de confianza de cada media.

Al analizar el número de cada tipo de ovocito entre hembras en estadio III de desarrollo para las cruces e independientemente a cada una de las temperaturas de 27°C y de 31°C se encontró que a 27°C el número de ovocitos varió dependiendo del tipo de ovocito y la cruce, así como la interacción entre cruces y tipo de ovocitos presentó un efecto significativo sobre en el número de ovocitos ($P < 0.05$). En la Figura 31 se puede apreciar que a 27°C se presentó un reducido número de ovocitos previtelogénicos sin importar la cruce (0.15 en F1_(CH:EU) x AU y 0.17 en EU x F1_(CH:AU)). Por su parte el número de ovocitos vitelogénicos fue significativamente más abundante (2.77 en F1_(CH:EU) x AU y 2.18 en EU x F1_(CH:AU)) que los previtelogénicos, pero no difirió entre cruces. La mayor abundancia, con diferencias significativas, se encontró para los ovocitos post-vitelogénicos, con 8.78 en EU x F1_(CH:AU) y 6.36 en F1_(CH:EU) x AU, observándose en este caso también diferencias significativas entre cruces. El número de ovocitos degenerativos fue similar (1.76 en F1_(CH:EU) x AU y 1.39 en EU x F1_(CH:AU)) al de los vitelogénicos para ambas cruces (Fig. 31).

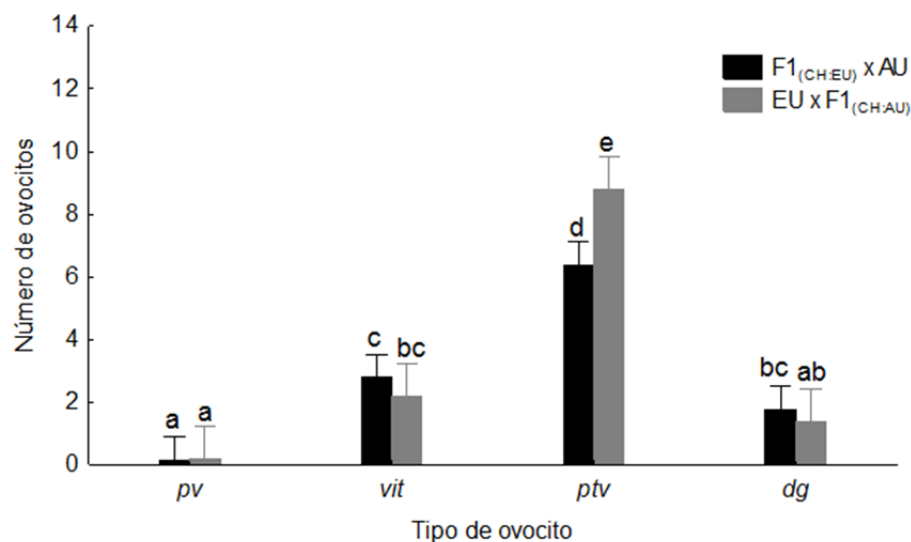


Figura 31. Número de cada tipo de ovocitos de las cruces de *C. gigas* sometidos a 27°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos post-vitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

En cuanto al número de ovocitos de *C. gigas* sometidos a 31°C, sólo el tipo de ovocitos tuvo un efecto significativo en el número de ovocitos ($P < 0.05$), no encontrándose diferencias significativas entre cruces. Se observa que el mayor número de ovocitos fue del tipo de post-vitelogénicos (10.77 en F1_(CH:EU) x AU y 9.86 en EU x F1_(CH:AU)), que fue significativamente mayor en el número de ovocitos vitelogénicos (2.17 en F1_(CH:EU) x AU y 3.46 en EU x F1_(CH:AU)), así como de los ovocitos degenerativos (1.73 en F1_(CH:EU) x AU y 1.06 en EU x F1_(CH:AU)) y de los ovocitos previtelogénicos (0.20 en F1_(CH:EU) x AU y 0.13 en EU x F1_(CH:AU)) (Fig. 32).

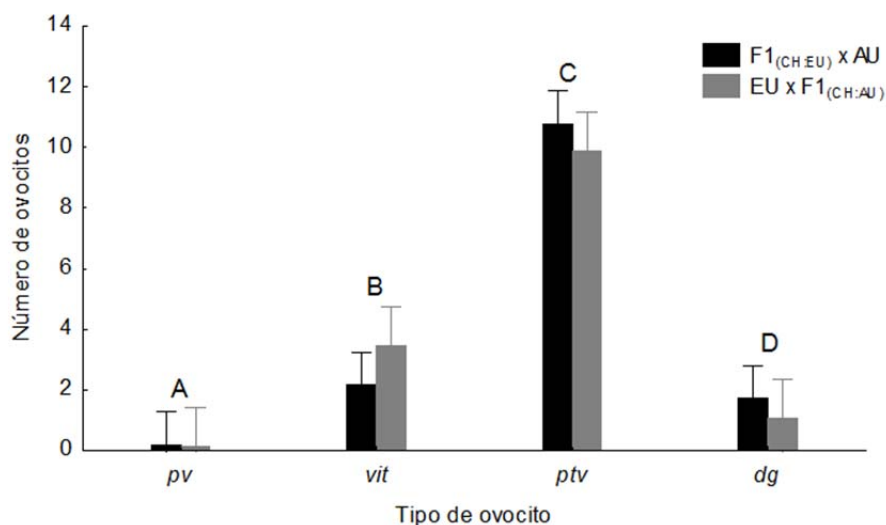


Figura 32. Número de cada tipo de ovocitos de las cruzas de *C. gigas* sometidos a 31°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos post-vitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

En los resultados referentes al área ocupada por los ovocitos de cada tipo en hembras en estadio tres de desarrollo gonádico se encontró que a la temperatura de 27°C (Fig. 33) el área ocupada por cada tipo de ovocito y la interacción de tipo de ovocito observado en cada cruce fueron diferentes ($P < 0.05$). La mayor área se observó para la cruce EU x F1(CH:AU) en ovocitos post-vitelogénicos (ptv) con una media de 8,859 μm^2 siendo significativamente diferente del área estimada para la cruce F1(CH:EU) x AU, 6,392 μm^2 . Los ovocitos previtelogénicos, con un área de 16.78 μm^2 en F1(CH:EU) x AU y de 20.5 μm^2 en EU x F1(CH:AU), no mostraron diferencias significativas entre cruces, pero mostraron la menor área entre tipos de ovocitos, siendo significativamente diferente del área de los ovocitos post-vitelogénicos y de los degenerativos, pero no de los vitelogénicos. El área ocupada por los ovocitos vitelogénicos (1,211 μm^2 en F1(CH:EU) x AU y 984 μm^2 en EU x F1(CH:AU)), así como por los ovocitos degenerativos (2,736 μm^2 en F1(CH:EU) x AU y 2,063 μm^2 en EU x F1(CH:AU)) tampoco mostraron diferencias entre las cruces evaluadas, aunque el área de los ovocitos degenerativos fue mayor que el área de los ovocitos vitelogénicos.

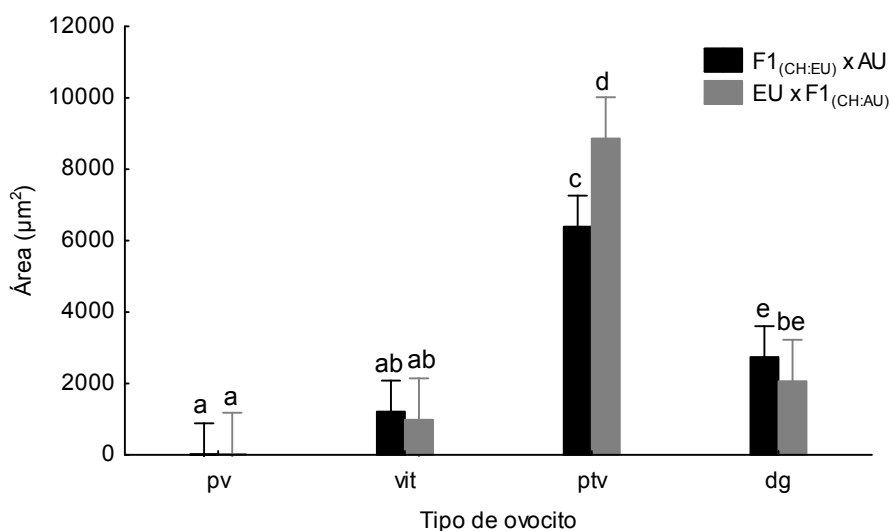


Figura 33. Área de cobertura por tipo de ovocito en ostiones *C.gigas* sometidos a 27°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos postvitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

En el caso de las hembras sometidas a 31°C, se observó que sólo el tipo de ovocitos tiene un efecto sobre el área de cobertura de los ovocitos ($P < 0.05$). En la Figura 34 se observa que no existen diferencias estadísticas entre las cruza en área para ninguno de los tipos de ovocitos. Por otro lado, los ovocitos previtelogénicos tiene la menor área ($22.12 \mu\text{m}^2$ en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $13.0 \mu\text{m}^2$ en $EU \times F1_{(CH:AU)}$); mientras que los ovocitos post-vitelogénicos tienen estadísticamente la mayor área ($10,670 \mu\text{m}^2$ en $F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $9,772 \mu\text{m}^2$ en $EU \times F1_{(CH:AU)}$).

El análisis del índice de madurez ovárica (MO) indicó que sólo la temperatura tuvo un efecto significativo en este índice ($P < 0.05$), mientras que la cruza o la interacción entre cruza y temperatura no fueron significativas ($P = 0.44$ y $P = 0.09$ respectivamente). Como se puede observar en la Figura 35, la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ mostró un índice MO de $7,619 \mu\text{m}^2$ y la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ de $9,863 \mu\text{m}^2$ en la temperatura de 27°C sin diferir significativamente entre ellas. A 31°C la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tuvo un valor significativamente mayor que a 27°C, $11,643 \mu\text{m}^2$, pero no difirió de la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$, $10,808 \mu\text{m}^2$, que también presentó un valor significativamente mayor que a 27°C (Fig. 35).

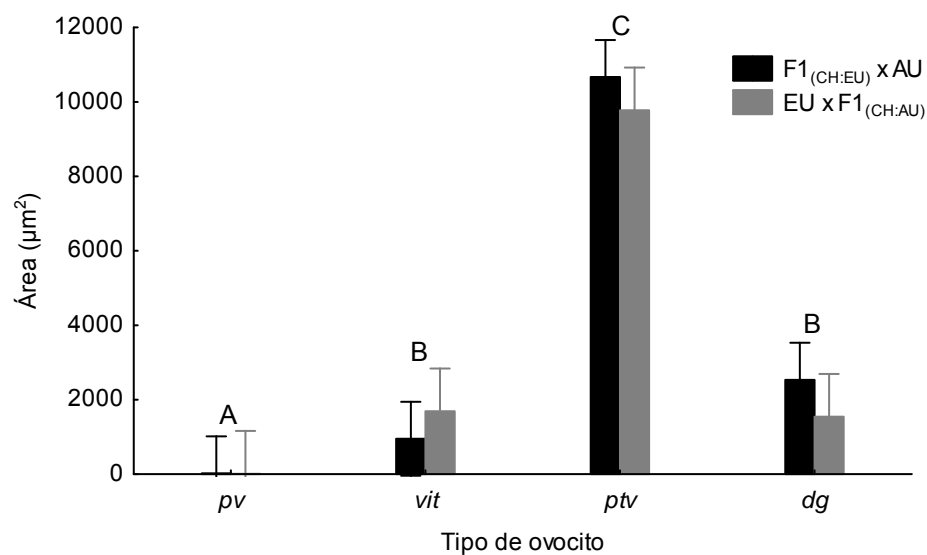


Figura 34. Área de cobertura por tipo de ovocito en ostiones *C.gigas* sometidos a 31°C. *pv*: ovocitos previtelogénicos; *vit*: ovocitos vitelogénicos; *ptv*: ovocitos postvitelogénicos; *dg*: ovocitos degenerativos. Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

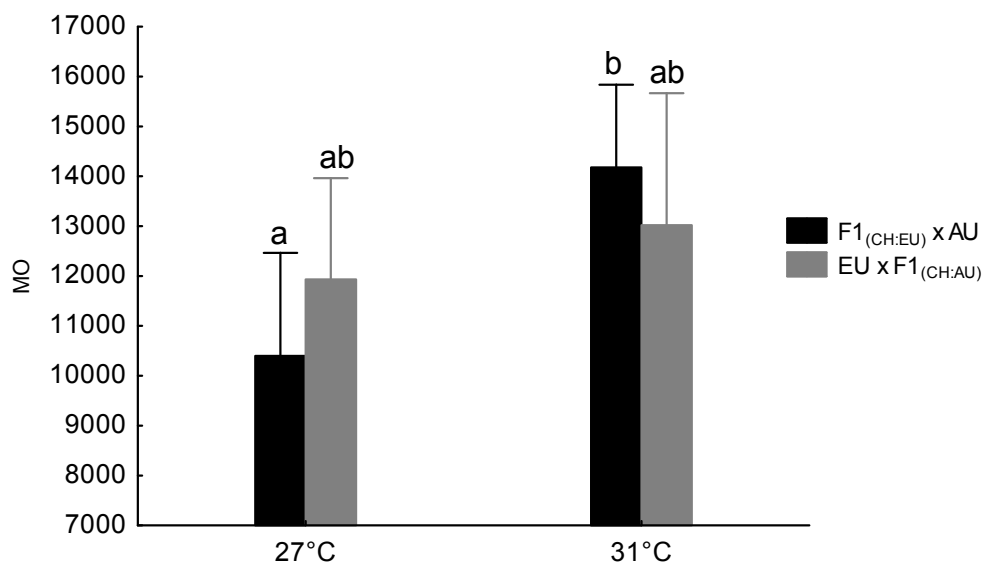


Figura 35. Índice de madurez ovárica (MO, µm²) en ostiones hembras de *C. gigas* en temperaturas de 27 y 31°C. Las líneas con desviaciones denotan intervalos de confianza para cada media.

Al evaluar el índice del área gonadal solamente en F III (Fig. 36) se observó una tendencia contraria a la encontrada en el índice de MO ya que el índice del área gonádica presenta una tendencia a ser mayor en 27°C en ambas cruces y disminuye a los 31°C. Se observaron

diferencias significativas únicamente en la cruce EU x F1_(CH:AU) ($P < 0.05$) (0.65 en 27°C y 0.42 en 31°C).

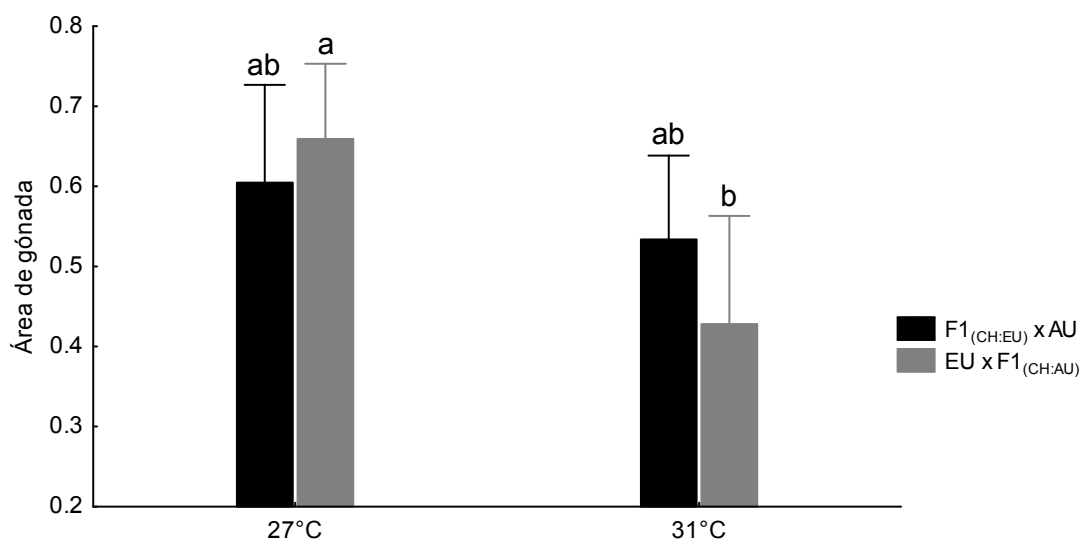


Figura 36. Área de cobertura gonadal de F III cada cruce de *C. gigas* sometidas a 27°C y 31°C. Los valores se expresan en Arcoseno, y las líneas con desviaciones representan los intervalos de confianza de cada media.

En la biomasa de gónada se presentaron diferencias significativas entre cruce ni temperatura. Ambas cruces tuvieron una tendencia a mayor biomasa de gónada a 27°C (0.70g en F1_(CH:EU) x AU y 0.77 g en EU x F1_(CH:AU)) comparado con 31°C donde F1_(CH:EU) x AU presentó 0.49g y EU x F1_(CH:AU) 0.27g (Fig. 37).

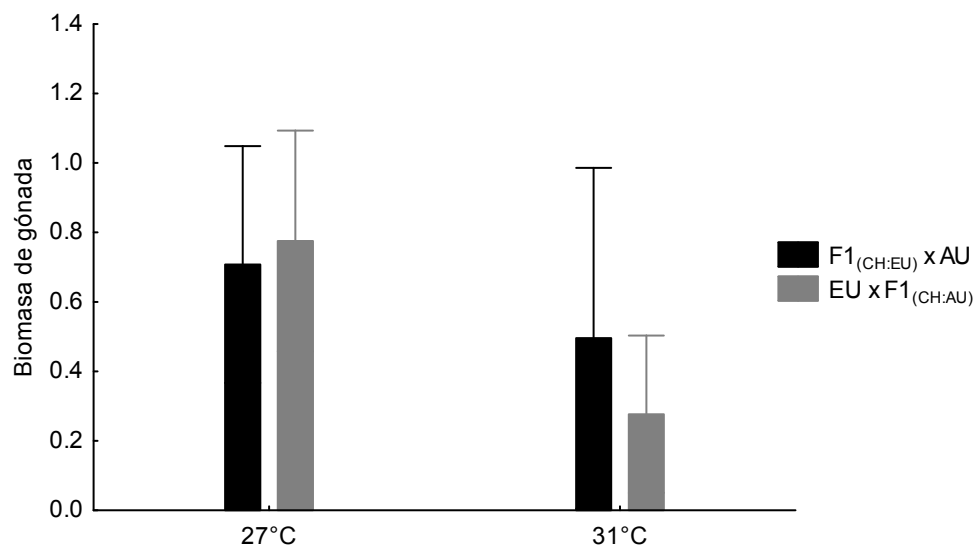


Figura 37. Biomasa de gónada en ostras hembras maduras de *C. gigas* en temperaturas de 27°C y 31°C.

7.3. Análisis de expresión génica.

7.3.1. Estabilidad de los genes de referencia.

En la Figura 38 se muestra el intervalo de valores de estabilidad (M) de los genes de referencia evaluados. El análisis con el programa *geNorm* indica que los genes *28s* y *18s* son los menos estables en las condiciones del presente estudio, caso opuesto a *ef2α* y *act-β* que son los más estables tanto en las muestras para evaluar con *Cg-Foxl2*, *Oyvl* y *og-TGF-β* (A) así como en las muestras que se evaluarán sólo con *vtg* (B). Con base en lo anterior, para *geNorm* la mejor combinación de genes de referencia fue los genes *ef2α* y *act-β* (Fig. 38A, B). Por otra parte, es importante hacer notar que *28S* y *18S* tienen el menor valor pareado de 0.766 (A) y 0.756 (B) (Tabla IX), aunque en la gráfica (Fig. 38) estos genes se observan en forma independiente como los menos estables.

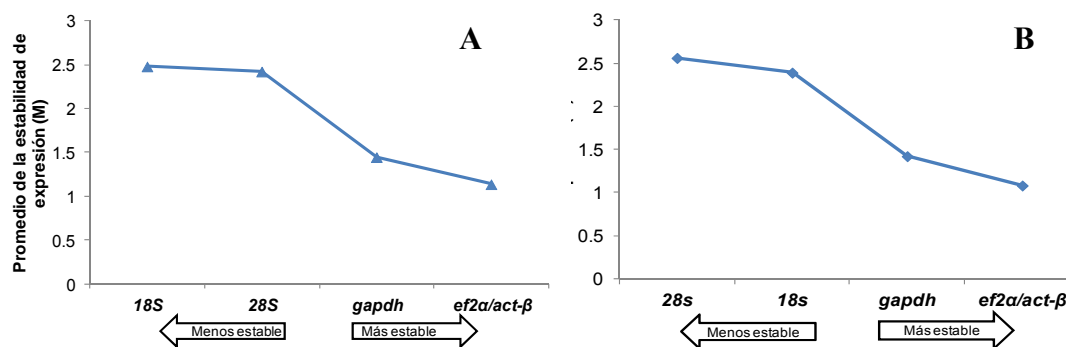


Figura 38. Estabilidad de expresión promedio (M) de los genes de referencia candidatos. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyv1* y *og-TGF-β*; B) genes para normalizar *vtg*.

Tabla IX. Valores pareados del promedio de estabilidad de expresión (M). A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyv1* y *og-TGF-β*; B) genes para normalizar *vtg*.

A					
	<i>act-β</i>	<i>ef2α</i>	<i>28S</i>	<i>gapdh</i>	<i>18s</i>
<i>act-β</i>		1.139	2.425	1.448	2.483
<i>ef2α</i>	1.139		2.294	1.199	2.227
<i>28S</i>	2.425	2.294		2.202	0.766
<i>gapdh</i>	1.144	1.199	2.202		2.251
<i>18s</i>	2.483	2.227	0.766	2.251	

B					
	<i>act-β</i>	<i>ef2α</i>	<i>28s</i>	<i>gapdh</i>	<i>18s</i>
<i>act-β</i>		1.087	2.568	1.428	2.396
<i>ef2α</i>	1.087		2.506	1.420	2.250
<i>28s</i>	2.568	2.506		2.497	0.756
<i>gapdh</i>	1.428	1.420	2.497		2.397
<i>18s</i>	2.396	2.250	0.756	2.397	

Además, con *geNorm* se estimó el número óptimo de genes de referencia a usar mediante el cálculo de la variación pareada (V) entre los genes candidatos. Este valor es obtenido por el análisis de los cambios en el factor de normalización de la qPCR por la adición sucesiva del gen de referencia candidato más estable (Aursnes et al. 2011). En la evaluación de los genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyv1* y *og-TGF-β* el valor obtenido para V2/3 y V3/4 fue de 0.400 y 0.547 (Fig. 22A), mientras que para *vtg* fue 0.439 y 0.555 (Fig. 39B), este patrón

sugiere que el factor de normalización debe de tener por lo menos dos genes de referencia ya que al incluir un tercer gen se aumenta el valor de V (Fig. 39).

En ambos casos el valor de V4/5 fue menor (0.340 y 0.377), lo cual indicaría que la adición de un cuarto gen es necesaria para tener un factor de normalización adecuado. Sin embargo, la adición de más genes de referencia es impráctica cuando son pocos los genes blancos que se van a estudiar y la cantidad de ARN es limitada (Andersen et al., 2004).

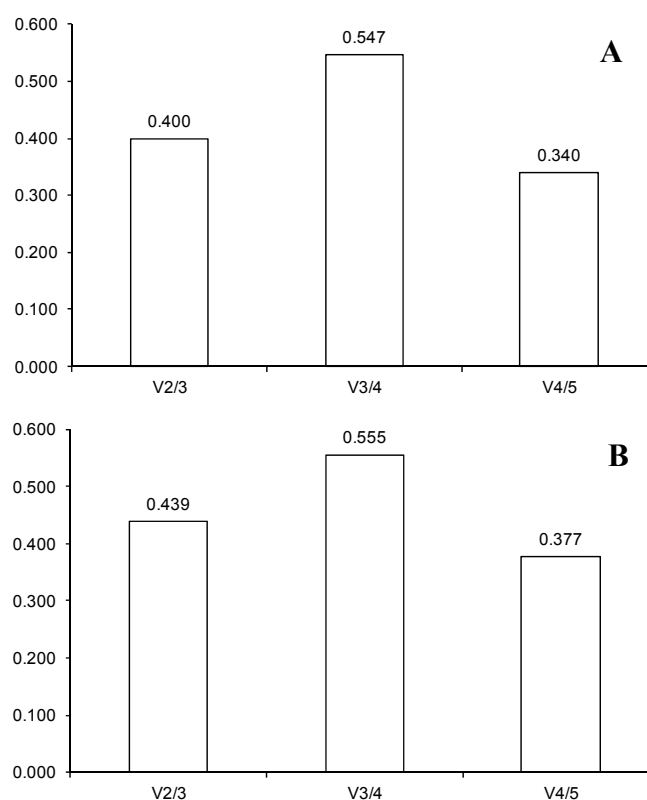


Figura 39. Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF-β*; B) genes para normalizar *vtg*.

Con *NormFinder* se calculó el valor de estabilidad de cada gen, en donde *gapdh*, *act-β* y *ef2α* tienen mayor estabilidad comparados con *28S* y *18S* cuyos valores son más elevados (Fig. 40).

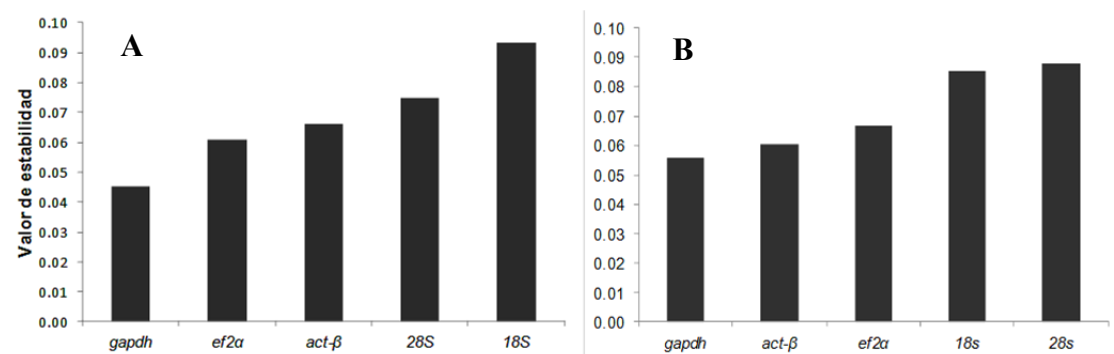


Figura 40. Análisis de estabilidad de expresión génica de los genes candidatos utilizando NormFinder. El valor más bajo es otorgado al gen más estable en un conjunto de muestras. A) genes para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF-β*; B) genes para normalizar *vtg*.

Por otra parte se usaron los genes más estables calculados por *geNorm* y *NormFinder* para evaluar la variación entre-grupos en *NormFinder*. La variación entre-grupos se midió al asignar categorías a las muestras (según su temperatura, sexo, estadio de desarrollo gonádico y craza) de tal forma que el gen más estable sería aquel cuyos valores se distribuyan más cercanos a cero. El gen con una menor variación entre las cruza fue *act-β*, entre estadios fue *ef2a* y entre temperaturas *gapdh*. En el caso de los estadios todos los genes mostraron igual variación (Tabla X). Por otra parte, los resultados de *NormFinder* señalaron que la mejor combinación de genes de referencia para las agrupaciones sexo, estadio y temperatura eran *act-β* y *ef2a*; pero en el caso de las cruza eran *ef2a* y *gapdh*.

Tabla X. Variación entre-grupos (*Normfinder*).

Genes	Cruza		Sexo			Estadio				Temperatura	
	F1 _(CH:EU) x AU	EU x F1 _(CH:AU)	I	M	F	0	1	3	4	19- 23°C	27- 31°C
<i>act-β</i>	0.002	-0.002	-0.017	0.014	0.003	-0.020	-0.011	0.006	0.026	-0.011	0.011
<i>ef2a</i>	0.006	-0.006	0.016	0.003	-0.018	0.016	-0.006	-0.003	-0.007	0.010	-0.010
<i>gapdh</i>	-0.008	0.008	0.001	-0.016	0.015	0.004	0.017	-0.003	-0.019	0.001	-0.001

A partir del análisis dentro de los grupos en las muestras para *vtg* se obtuvo que *gapdh* es el gen más estable entre grupos, temperatura, y sexo, mientras que *act-β* es el mejor gen entre estadios.

Por otro lado, en los resultados de *Bestkeeper* (Tabla XI) se observa que el coeficiente de variación y la desviación estándar fueron menores para los genes 28S y 18S, indicando que la estabilidad de expresión de estos genes es alta entre muestras y réplicas. Sin embargo, *act-β*, *ef2α* y *gapdh* muestran mayores coeficientes de correlación (Tabla XI) lo cual indica que la expresión de estos genes candidatos se correlaciona bien uno con otro y con el índice de *BestKeeper*. Al analizar solamente *act-β*, *ef2α* y *gapdh*, la combinación *act-β* y *ef2α* tienen la mayor correlación (0.942 y 0.952 respectivamente).

Tabla XI. Análisis de estabilidad de expresión en *BestKeeper* de los genes de referencia para normalizar *Cg-FOXL2*, *Oyvl* y *og-TGF-β*.

Factor	<i>act-β</i>	<i>ef2α</i>	28S	<i>gapdh</i>	18S
N	44	44	44	44	44
MG (Cq)	23.41	22.44	15.40	26.59	12.57
MA (Cq)	23.51	22.53	15.45	26.68	12.63
Min (Cq)	20.04	19.12	13.36	22.50	10.33
Max (Cq)	27.84	25.68	18.15	32.58	16.33
SD (± Cq)	1.95	1.71	1.04	1.81	1.11
CV (% Cq)	8.29	7.59	6.76	6.79	8.77
Min (x-fold)	-10.31	-10.04	-4.12	-16.98	-4.73
Max (x-fold)	21.61	9.40	6.71	63.65	13.58
SD (± x-fold)	3.86	3.27	2.06	3.51	2.15
Coefficiente de correlación (R)	0.787	0.765	0.607	0.823	0.634
Valor p	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Abreviaciones: N, número de muestras; Cq, ciclo de cuantificación; MG (Cq), media geométrica del Cq; MA (Cq), media aritmética del Cq; Min (Cq), valor mínimo de Cq; Max (Cq), valor máximo de Cq; SD (± Cq), desviación estándar del Cq; CV (% Cq), coeficiente de variación expresado en porcentaje; Min (x-fold) y Max (x-fold), los valores extremos de los niveles representados como x-fold sobre o sub-regulados del coeficiente absoluto; SD (± x-fold), desviación estándar del coeficiente de regulación absoluto.

En el caso del análisis de *Bestkeeper* para la normalización de *vlg* se obtuvo que *ef2α* y *gapdh* tuvieron los menores valores para el coeficiente variación (6.54 y 6.48 respectivamente) y el mayor coeficiente de correlación (0.64 y 0.73) al igual que *act-β* (0.81) (Tabla XII) por lo que muestran ser los genes de referencia más adecuados para la normalización.

Tabla XII. Análisis de estabilidad de expresión en *BestKeeper* de los genes de referencia para normalizar *vfg*.

Factor	<i>act-β</i>	<i>ef2α</i>	<i>28S</i>	<i>gapdh</i>	<i>18S</i>
N	21	21	21	21	21
MG (Cq)	23.41	22.54	15.72	27.21	12.93
MA (Cq)	23.50	22.61	15.77	27.29	12.98
Min (Cq)	20.17	19.76	13.52	24.62	11.22
Max (Cq)	27.63	25.68	18.15	32.58	14.89
SD (± Cq)	1.79	1.48	1.11	1.77	0.98
CV (% Cq)	7.64	6.54	7.05	6.48	7.55
Min (x-fold)	-9.41	-6.89	-4.60	-6.05	-3.28
Max (x-fold)	18.72	8.79	5.39	41.22	3.88
SD (± x-fold)	3.47	2.79	2.16	3.41	1.97
Coefficiente de correlación (R)	0.81	0.64	0.49	0.73	0.51
Valor p	0.001	0.002	0.024	0.001	0.016

Abreviaciones: N, número de muestras; Cq, ciclo de cuantificación; MG (Cq), media geométrica del Cq; MA (Cq), media aritmética del Cq; Min (Cq), valor mínimo de Cq; Max (Cq), valor máximo de Cq; SD (± Cq), desviación estándar del Cq; CV (% Cq), coeficiente de variación expresado en porcentaje; Min (x-fold) y Max (x-fold), los valores extremos de los niveles representados como x-fold sobre o sub-regulados del coeficiente absoluto; SD (± x-fold), desviación estándar del coeficiente de regulación absoluto.

De manera adicional, y debido a los diferentes resultados obtenidos con los programas previos, se hicieron ANOVAS para descartar diferencias significativas entre grupos de muestras, utilizando como variable la cantidad relativa calculada para *geNorm*. A partir de estos estadísticos se corroboró que *act-β* y *28S* no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones (cruzas, sexo, estadio de desarrollo y temperatura) además de tener valores *F* bajos, mientras que *ef2α* mostró diferencias significativas entre temperaturas ($F=3.22$), sexos ($F=3.85$) y estadios de desarrollo gonádico ($F=3.06$), por lo que fue descartado del análisis (Tabla XIII).

Tabla XIII. Análisis de varianza evaluando el efecto de la cruza, temperatura, sexo y estadio sobre la expresión relativa de *act-β*, *ef2α* y *28S*.

	<i>act-β</i>			<i>ef2α</i>			<i>28S</i>		
	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Cruza	1	0.23	0.62	1	0.08	0.77	1	0.73	0.39
Temperatura	2	1.60	0.20	2	3.22	0.04*	2	0.57	0.56
Sexo	2	1.25	0.29	2	3.85	0.02*	2	2.49	0.08
Estadio	3	1.88	0.13	3	3.06	0.03*	3	0.53	0.65

* Indica significancia al nivel establecido ($P < 0.05$)

Con base en la importancia que se le da al coeficiente de variación (CV) al clasificar los genes de acuerdo a su estabilidad total (Kortner et al., 2011), se decidió también utilizar *28S* como gen de referencia en la normalización. Además de que la expresión del gen *28S* tiene una reducida desviación estándar (Fig. 41).

En base al consenso de los tres programas de los genes que tuvieron mejores categorías se eligió *act-β* y *ef2α* y con el fin de confirmar la estabilidad de estos genes se hicieron análisis de varianza a partir de los resultados de obtenidos. En la Tabla XIV se aprecia que *ef2α* presenta valores de *F* elevados, así como diferencias significativas dentro de las categorías temperatura, sexo y estadio.

Tabla XIV. Análisis de varianza evaluando el efecto de la cruza, temperatura, sexo y estadio sobre la expresión relativa de *act-β* y *ef2α*.

	<i>act-β</i>			<i>ef2α</i>		
	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Cruza	1	0.002	0.96	1	1.13	0.28
Temperatura	1	0.12	0.72	1	6.43	0.01*
Sexo	1	2.86	0.09	1	6.84	0.01*
Estadio	2	1.61	0.20	2	4.42	0.015

En la Figura 41 se observa la distribución de los Cq tanto para los genes candidatos o de referencia como de los genes blancos. Los genes ribosomales *28S* y *18S* tienen un nivel de expresión bajo en Cq (mayor expresión), mientras que *act-β*, *ef2α* y *gapdh* tienen un nivel de expresión similar a los genes blanco.

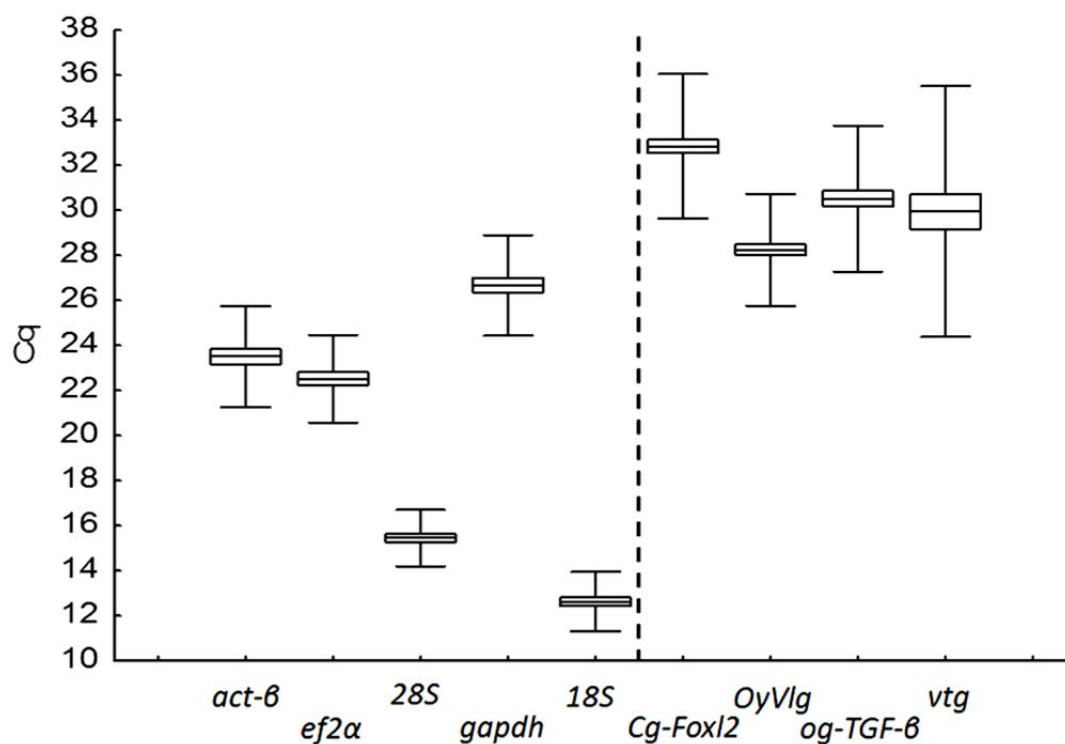


Figura 41. Medias del Ciclo cuantitativo (Cq) para los genes de referencia y genes blanco evaluados en gónada de *C. gigas*. El valor Cq promedio se muestra como una línea (—), los cuadros indican el error estándar (□) y el rango abarca la desviación estándar (⊥). La línea punteada separa los genes de referencia de los genes de blanco.

7.3.2. Expresión de los genes *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF-β* y *vtg*.

7.3.2.1. Cuantificación de la expresión relativa del gen *Cg-Foxl2* en gónada de ostión *C. gigas*.

En la Figura 42 se observa de manera general un aumento en la expresión del transcrito de *Cg-Foxl2* conforme avanza el desarrollo gonádico de indiferenciados hacia hembras en mayor estadio de desarrollo, de tal forma que este gen presentó una expresión significativamente mayor en hembras maduras (en estadio III - F III). La expresión de *Cg-Foxl2* en hembras FIII no difirió entre las cruza. Por otro lado, mientras que la cruza F1_(CH:EU) x AU sí mostró una mayor y significativamente diferente expresión que en M III (1.242) de su misma cruza, la cruza EU x F1_(CH:AU), con una tendencia a menor expresión en FIII (4.502) que la cruza F1_(CH:EU) x AU (6.651), no mostró diferencias significativas con los machos maduros (en estadio III - M III) de la cruza F1_(CH:EU) x AU. Los ostiones M IV (0.25 y 0.044) tuvieron la menor expresión de *Cg-Foxl2* pero no fueron estadísticamente diferentes a M III (1.24 y 0.89). En general y a excepción de los indiferenciados, la cruza EU x F1_(CH:AU) presentó una tendencia a menor expresión de *Cg-Foxl2* que la cruza F1_(CH:EU) x AU. La única otra diferencia significativa fue en la expresión de este gen para la cruza EU x F1_(CH:AU), entre FI y MIV, observándose una mayor expresión en FI que en MIV.

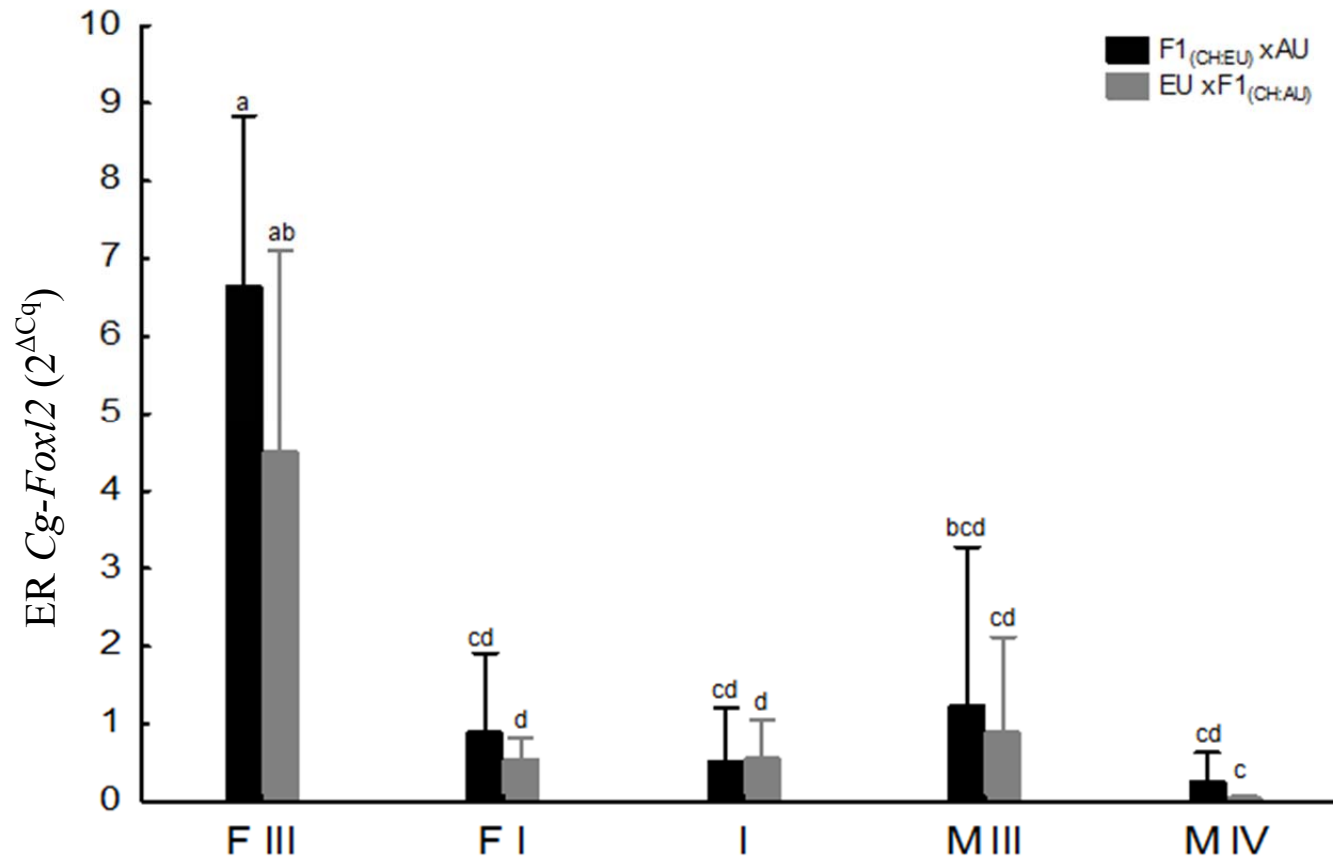


Figura 42. Expresión relativa (ER) de *Cg-Foxl2* en gónada de *C. gigas* hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y cuatro (M IV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

Independientemente de los estadios, cuando se contrasta la expresión del ARNm de *Cg-Foxl2* entre sexos en gónada de *C. gigas*, las hembras mostraron mayores niveles de expresión que los machos para cada una de las cruza evaluadas. En la Figura 43 se observa una baja expresión en ostiones indiferenciados (0.516 para la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$, y 0.559 para la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$), así como en machos de ambas cruza (0.848 para la $F1_{(CH:EU)} \times AU$ x AU, y 0.594 para la $EU \times F1_{(CH:AU)}$), sin diferencias significativas entre cruza o los organismos indiferenciados y machos. En el caso de las hembras las cruza si difirieron significativamente ($P < 0.05$), con la cruza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (5.296) presentando una expresión mayor que la cruza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (2.093).

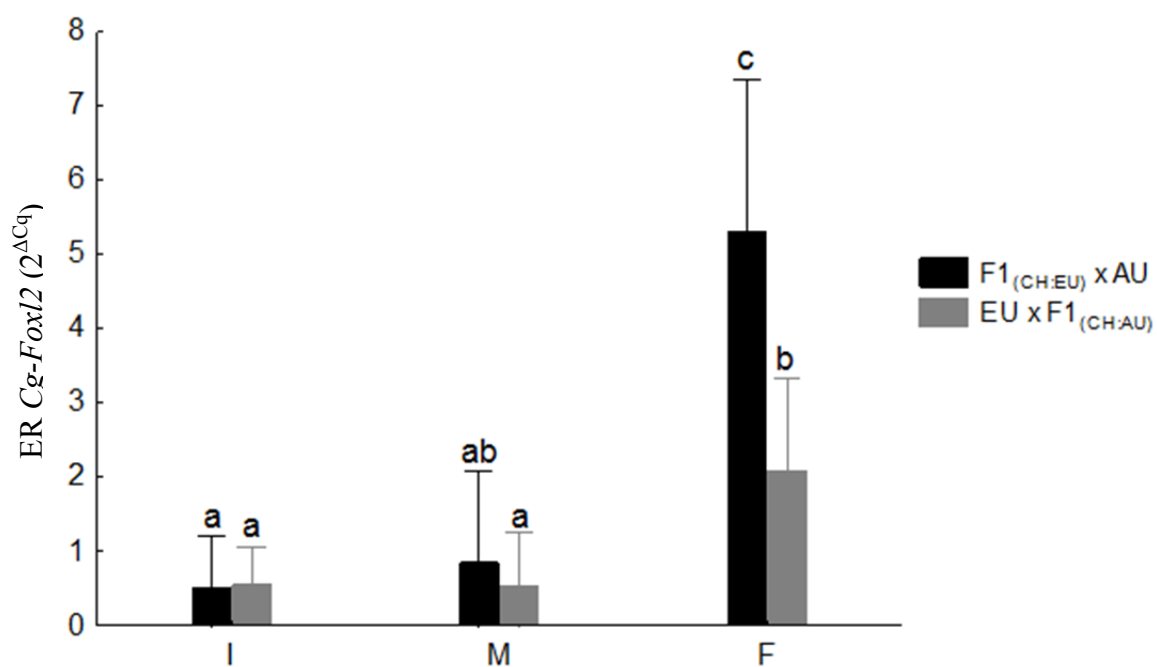


Figura 43. Expresión relativa (ER) de *Cg-Foxl2* en gónada de *C. gigas* indiferenciadas (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

7.3.2.2. Cuantificación de la expresión relativa del gen *OyVlg* en gónada de ostión *C. gigas*.

Al comparar los estadios de desarrollo gonádico se aprecia una expresión mayor del transcrito *OyVlg* conforme aumenta el desarrollo gonádico tanto para hembras como machos. Los niveles de expresión de *OyVlg* más elevados se presentaron en F III, seguido por M IV y M III. Mientras que los niveles de expresión más bajos se registraron en I y F I (Fig. 44).

En la comparación de cruzas, la expresión relativa del transcrito *OyVlg* fue significativamente mayor en hembras en estadio F III de la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (6.727) que las F III de $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (3.011) con diferencias estadísticas significativas, pero la expresión entre cruzas no difirió para ninguno de los otros estadios y sexos (Fig. 44). Por otro lado, el estadio de desarrollo gonádico también presentó un efecto significativo en la expresión del gen *OyVlg* en machos, observándose un aumento en ambas cruzas ($F1_{(CH:EU)} \times AU$ y $EU \times F1_{(CH:AU)}$) de indiferenciados (0.197 y 0.504) a machos en estadio M III (1.162 y 1.188), y a M IV (2.311 y 2.058).

En el contraste entre hembra y macho en el mismo estadio, se observó que para la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ las hembras FIII presentaron un nivel de expresión (6.727) de *OyVlg* significativamente mayor que los machos MIII (1.162), mientras que en la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ las diferencias entre FIII (3.011) y MIII (1.188) no fueron significativas (Fig. 44).

En cuanto a la comparación entre sexos para la expresión relativa del transcrito *OyVlg* en cada craza se observó que los niveles menores de expresión ocurrieron en ostiones indiferenciados (0.19 para la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$, y 0.50 para la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$), que fueron significativamente menores que la expresión observada en los machos (1.62 y 1.55, respectivamente).

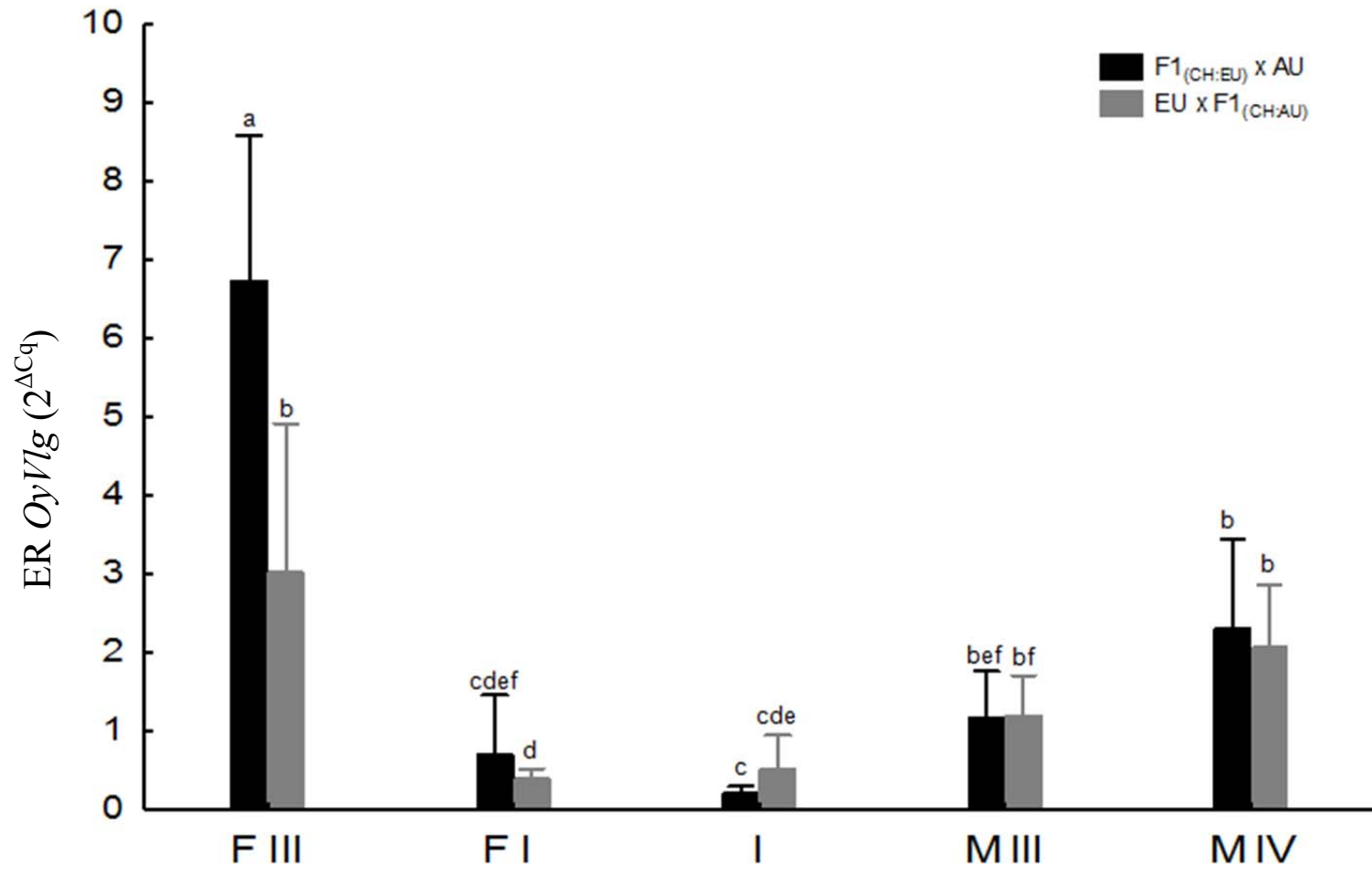


Figura 44. Expresión relativa (ER) de *OyVlg* en gónada de *C. gigas* hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y cuatro (MIV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

Mientras que no se observaron diferencias significativas entre cruzas para los dos sexos anteriores, sí se observaron para las hembras: la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tuvo una expresión mayor (5.30) que la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (1.419). Esta expresión menor en hembras de la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ resultó en que no se presentaran diferencias con la expresión en machos o en indiferenciados de la misma craza (Fig. 45).

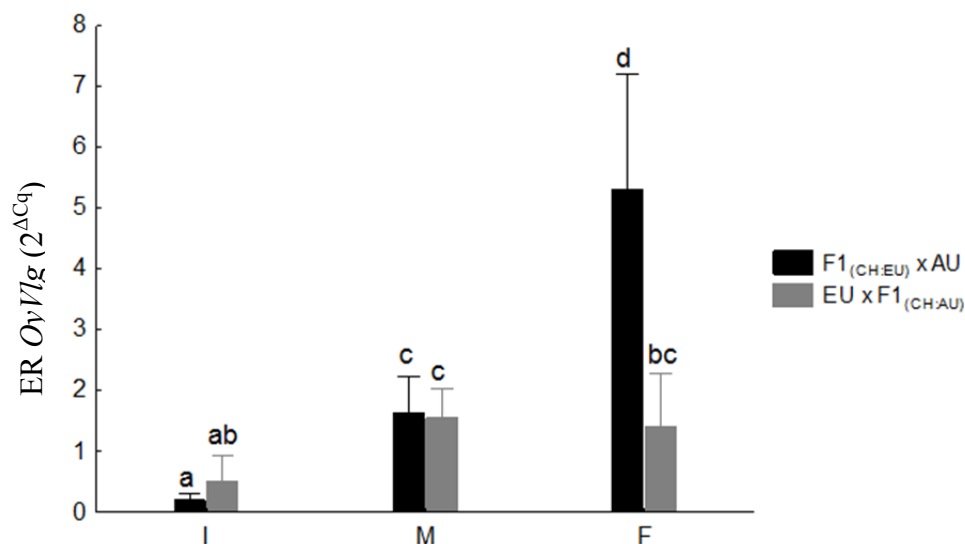


Figura 45. Expresión relativa (ER) de *OyVlg* en gónada de *C. gigas* indiferenciados (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

7.3.2.3. Cuantificación de la expresión relativa del gen *og-TGF-β* en gónada de ostión *C. gigas*.

En cuanto al gen *og-TGF-β*, en la Figura 46 se observa una tendencia a aumentar la expresión de este transcrito conforme aumenta el estadio de desarrollo gonádico tanto para ostiones machos como hembras, sin embargo ni las cruzas ni el estadio de desarrollo gonádico tuvieron un efecto significativo en la expresión de este gen.

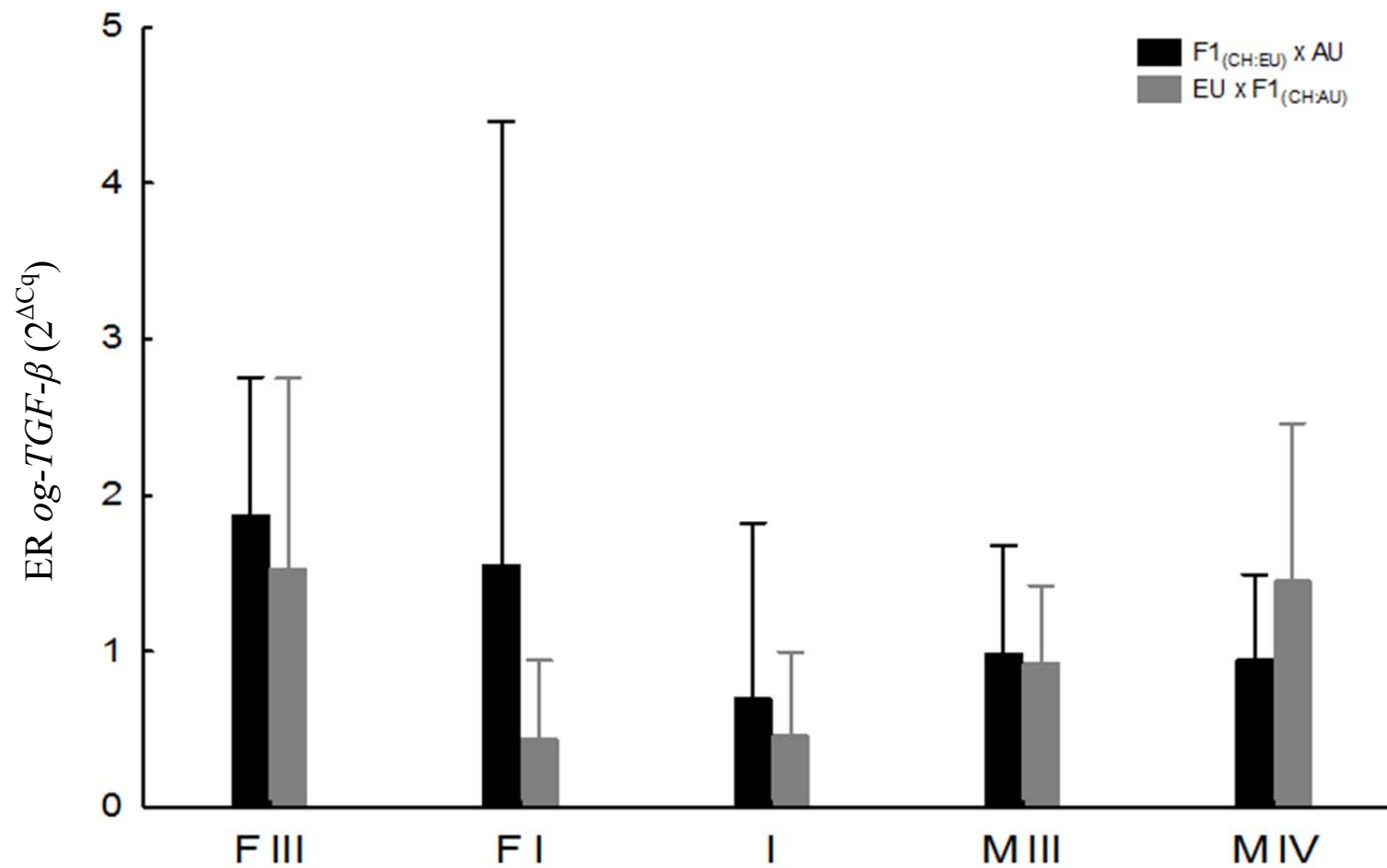


Figura 46. Expresión relativa (ER) de *og-TGF-β* en gónada de *C. gigas* hembras en estadio uno (F I) y tres (F III), indiferenciados (I) y machos en estadio tres (M III) y cuatro (MIV). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

Similarmente, en la comparación de sexos en la Figura 47 se observa que los niveles de expresión no fueron diferentes entre cruzas o sexos.

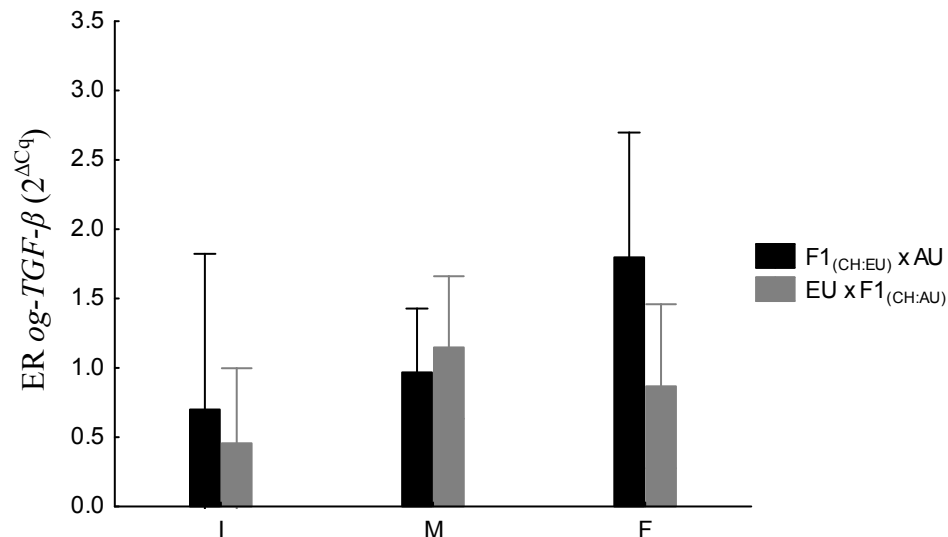


Figura 47. Expresión relativa (ER) de *og-TGF- β* en gónada de *C. gigas* indiferenciados (I), machos (M) y hembras (F). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

7.3.2.4. Cuantificación de la expresión relativa del gen *vtg* en gónada de ostión *C. gigas*.

La expresión de gen *vtg* fue significativamente mayor en FIII (Fig. 48) sin que se observaron diferencias significativas entre cruzas (16.70 en la crusa F1_(CH:EU) x AU y 6.28 en EU x F1_(CH:AU)), mientras que en ostiones indiferenciados y F I la expresión fue menor sin que estos estadios fueran diferentes estadísticamente pero sí difirieron de FIII ($P < 0.05$) (Fig. 48).

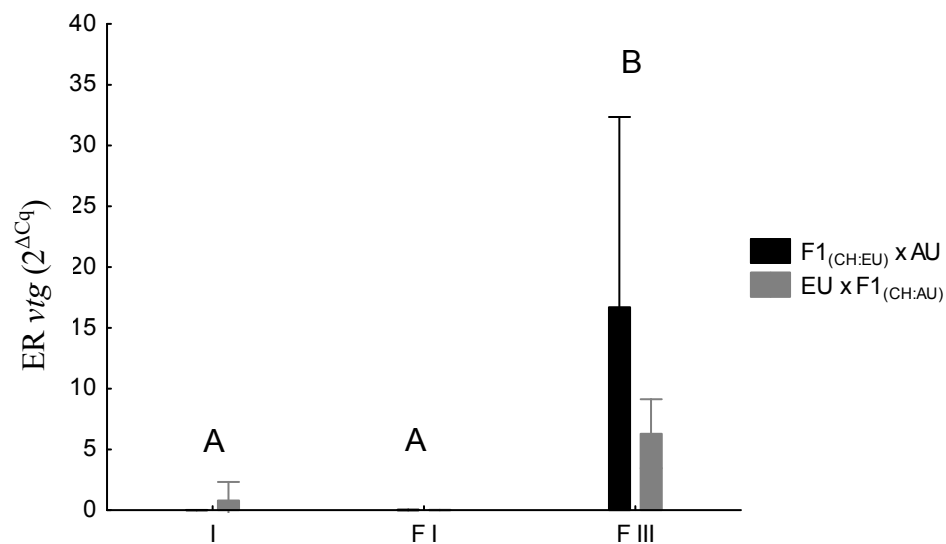


Figura 48. Expresión relativa (ER) de *vtg* en gónada de *C. gigas* indiferenciados (I), hembras en estadio uno (F I) y tres (FIII). Las líneas con desviaciones denotan Intervalos de confianza para cada media.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, y al igual que en el trabajo de Malham et al. (2009), al someter a *C. gigas* a temperaturas elevadas (más de 21°C durante 14 días) no se presentaron mortalidades. Incluso, en la temperatura de 31°C, que fue la más elevada en el presente trabajo, no se registraron mortalidades. Al comparar esta temperatura con otros trabajos, se hace aparente que no es suficientemente alta para ocasionar mortalidades (al menos bajo condiciones controladas y con un suministro constante de alimento), ya que se ha reportado que es a partir de 35°C que se puede obtener hasta el 100% de mortalidad en menos de 96 h (Carvalho, 2003).

El crecimiento de los ostiones en las granjas de cultivo está influenciado por diversos factores tanto físico-químicos (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto), ecológicos (tiempo de inmersión, disponibilidad de alimento, presencia de patógenos) y de la biología del organismo (edad, sexo, estadio de desarrollo gonádico, genética). El ostión *C. gigas* es una especie considerada como oportunista ya que tiene una dependencia directa de la disponibilidad de alimento en el ambiente para su desarrollo gonadal (Kang et al., 2000) así como para la acumulación de reservas, por lo cual los cambios en el peso del ostión están asociados con altas y bajas concentraciones de alimento (Chávez-Villalba et al., 2008). La energía requerida para la gametogénesis en condiciones naturales proviene de dos fuentes, fitoplancton y seston (protozoarios, bacterias, zooplacton, detritus, etc.) y la disponibilidad o cantidad de alimento determina la intensidad en la proliferación y calidad de los gametos (Kang et al., 2000; Fabioux et al., 2005; Chávez-Villalba et al., 2008) así como los patrones de maduración y desove (Dridi et al., 2006). En el presente estudio el alimento, al ser un factor determinante, fue mantenido con una ración fija o constante durante el experimento (4% del peso seco del ostión). Esta ración de alimento está por arriba de lo que se considera una ración baja (2%) (Llera, 2008; Frias & Segovia, 2010) y adicionalmente al haber sido una dieta polialgal posiblemente permitió el crecimiento y desarrollo de la gónada (Frias & Segovia, 2010).

Al comparar las variables morfométricas de las cruza evaluados se encontró que F1_(CH:EU) x AU presentó mayor longitud, peso y biomasa (Fig. 16). Sin embargo, esta diferencia fue observada desde el inicio del experimento, en donde la cruza mencionada previamente presentó la mayor longitud, peso y biomasa (Fig. 15). Por otro lado, para los ostiones sometidos a las temperaturas más elevadas (27°C y 31°C), se observaron menores valores en las variables morfométricas evaluadas (longitud, peso total y biomasa) (Fig. 17 y 18). Esto se explica por efecto de la temperatura ya que el intervalo o rango de temperatura, al igual que el tiempo de exposición a esa temperatura, son determinantes importantes del crecimiento (Hofmann et al., 1994). En temperaturas bajas hay una alta tasa de filtración y la producción neta se almacena en tejido somático, lo cual resulta en ostiones más grandes aún en bajos niveles de alimento (Hofmann et al., 1992; Hofmann et al., 1994). Contrariamente, en temperaturas elevadas (30°C) la tasa metabólica incrementa haciéndose evidente por un elevado consumo de oxígeno y excreción de amonio (Shpigel et al., 1992), y aunque la tasa de filtración es aun más elevada, el costo energético también incrementa lo cual afecta la producción neta (Hofmann et al., 1992; Hofmann et al., 1994); aun más, en respuesta a incrementos de temperatura la distribución de la producción total se dirige hacia el desarrollo de la gónada para la reproducción en lugar de crecimiento (Hofmann et al., 1994; Chávez-Villalba et al., 2008; Normand et al., 2008; Castaños et al., 2009). Lo anterior permite inferir que los valores menores de los caracteres biométricos observados, principalmente en peso y biomasa en las temperaturas de 27°C y 31°C, son un reflejo de la inversión de energía para la reproducción, proceso fisiológico que requiere un considerable uso de reservas (Berthelin et al., 2000^a). Estas diferencias en el tamaño del ostión debidas a la temperatura también se han visto reflejadas en una correlación negativa entre los valores de carbohidratos (glucógeno) con la temperatura, ya que ésta acelera la gametogénesis y la utilización de glucógeno como fuente de energía primaria para la misma (Asif, 1979; Kang et al., 2000; Berthelin et al., 2000^b).

8.1. La maduración gonádica y los estadios gametogénicos de dos cruza genéticos de *C. gigas* en respuesta a la temperatura.

En el presente estudio, en la menor temperatura evaluada (19°C) se encontraron ya organismos sexualmente diferenciados y en diferentes estadios gametogénicos (Fig. 19), en acuerdo con estudios previos para esta especie (bajo condiciones controladas), en los que se ha reportado que temperaturas entre 8°C-11°C propician la multiplicación de gonias y con esto el inicio de la gametogénesis (Fabioux et al., 2005). La presencia de más ostiones diferenciados en el grupo F1_(CH:EU) x AU indican que estos ostiones iniciaron primero su ciclo gametogénico o que éste fue más acelerado comparado con el grupo EU x F1_(CH:AU). Diferentes estudios han demostrado que la temperatura del agua acelera o retarda la tasa de desarrollo gonádico (Chávez-Villalba et al., 2002; Chávez-Villalba et al., 2008; Dridi et al., 2006; Fabioux et al., 2005; Kang et al, 2003). La ocurrencia de ciclos gonádicos acelerados en condiciones experimentales ha sido reportada para *C. gigas* (con gametogénesis temprana), observándose que este organismo puede alcanzar su madurez en una semana cuando es expuesto a 22°C. Los ovocitos maduros se empiezan a registrar después de 23 días de someter al ostión a 19°C y en 19 días cuando los ostiones son sometidos a 22°C (Chávez-Villalba., 2002^a). Así mismo, a partir de trabajos realizados en campo se ha reportado que los ostiones indiferenciados predominan en invierno cuando las temperaturas son bajas y que los individuos hermafroditas son más comunes en primavera cuando ocurre un cambio de sexo (Lango-Reynoso et al., 1999; Lango-Reynoso et al., 2000; Chávez-Villalba et al., 2008; Enríquez-Díaz et al., 2009).

Lo antes mencionado explica que, el número de ostiones indiferenciados así como en estadios I y II, sea mayor en las temperaturas de 19°C y 23°C y tienda a disminuir en las temperaturas elevadas de 27°C y 31°C. Adicionalmente, ostiones hermafroditas fueron encontrados en mayor proporción a las temperaturas menores, 19°C y 23°C, que a las mayores, 27°C y 31°C. Aun mas, se observó que para el grupo F1_(CH:EU) x AU el porcentaje de ostiones hermafroditas fue mayor y ocurrió en todas las temperaturas comparado con EU x F1_(CH:AU) (Fig. 19), indicando que una mayor alternancia de sexos ocurrió para el grupo F1_(CH:EU) x AU (principalmente de macho a hembra) que la observada para el grupo EU x

F1_(CH:AU). Esto se puede apreciar en la Figura 21B, en donde los ovocitos se encuentran en las paredes de los folículos mientras que las espermatidas y espermatozoides remanentes se localizan en el lumen del folículo. Aunque en el presente estudio no se detectó un desove de los ostiones durante el tiempo experimental, sí se encontraron organismos desovados en el análisis histológico, indicando que en las temperaturas de 23°C, 27°C y 31°C los ostiones presentaron desoves parciales y remaduración de gametos.

Por otra parte, el número de ostiones maduros incrementó en ambos grupos sometidos a las temperaturas elevadas de 27°C y 31°C (Fig. 19 y 20), mientras que la talla fue la menor observada (Fig. 18). Como se mencionó previamente, en temperaturas elevadas la gametogénesis se activa e induce a que los ovocitos pasen rápido de estadios tempranos a crecimiento y posteriormente a la fase de madurez (Chávez-Villalba et al., 2008). Esto pudo haber resultado en una mayor utilización de la energía de reserva o del alimento suministrado siendo destinados a desarrollo de la gónada y no a crecimiento, resultando en individuos de menores tallas (Hofmann et al., 1994; Kang et al., 2003) sin importar el grupo siendo evaluado. Alternamente, la presencia de ostiones en estadio de desove y post-desove que se observó a 27°C y 31°C para ambos grupos, puede haber sido otro causal de un menor peso total y biomasa que el observado en las temperaturas bajas, debido a la liberación de gametos durante desoves parciales pero continuos. En acuerdo con esto, se ha reportado que las temperaturas mínimas requeridas para inducir el desove en zonas frías templadas van de 18°C a 20°C (Mann, 1979) por lo que es de esperarse que hubiesen ocurrido desoves en todas las temperaturas evaluadas en este trabajo, así como un aumento de desoves en las temperaturas altas, ambos de los cuales fueron de hecho observados.

Independientemente de la temperatura de exposición, el grupo F1_(CH:EU) x AU presentó un desarrollo gonádico continuo, observándose todos los estadios de desarrollo gametogénico, mientras que en el grupo EU x F1_(CH:AU) el número de ostiones indiferenciados y en estadio I fue mayor y no se observaron todos los estadios de desarrollo gonádico. Esta gametogénesis diferencial entre los grupos se corroboró con el análisis cuantitativo de los estadios de desarrollo gonádico, en donde se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos o cruza (Fig. 22) para el promedio de todas las temperaturas: el grupo F1_(CH:EU) x

AU presentó un mayor estadio de desarrollo gonádico (3.7) comparado con EU x F1_(CH:AU) (3.4), lo que se puede interpretar como un desarrollo gonádico más acelerado en F1_(CH:EU) x AU. Mediante este análisis cuantitativo fue también posible establecer el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la gametogénesis, ya que a 19°C y 23°C el desarrollo gonádico fue significativamente menor que a 27°C y 31°C (Fig. 23). Esto confirma que la velocidad de la gametogénesis está en función de la temperatura a la que los organismos están expuestos, lo cual ha sido previamente observado en estudios de campo con esta misma especie contrastando áreas templadas y tropicales en México (Ibarra et al., 2008^{ab}). Estos autores reportaron una gametogénesis acelerada en los dos sitios tropicales caracterizados por alcanzar temperaturas desde 20°C hasta 31°C, así como una mayor proporción de hembras madurando al inicio del ciclo, y cambiando a una mayor proporción de machos a lo largo de los meses como la temperatura incrementó. En contraste, en el sitio templado (temperaturas de 18° a 26°C) la gametogénesis fue más lenta, y no se observó la alternancia de sexos de hembra a macho a lo largo de los meses de cultivo.

En cuanto a diferencias en desarrollo gonádico entre los grupos genéticos evaluados, mientras que se encontraron diferencias significativas solamente a 23°C, con la cruce F1_(CH:EU) x AU presentando un mayor desarrollo gametogénico, es posible observar la misma tendencia a 19°C que a 23°C, con la cruce F1_(CH:EU) x AU mostrando un mayor desarrollo gametogénico (Fig. 24). Aun más, debido a que el estadio de reabsorción (V) ocurre después de un desove (parcial o total) para “limpiar” la gónada, indicando el fin de un ciclo gametogénico y el inicio de otro (Fabioux et al., 2005; Chávez-Villalba et al., 2008), la presencia de ostiones en estadio V en el grupo F1_(CH:EU) x AU en todas las temperaturas fortalece la conclusión de que un desarrollo gonádico acelerado ocurrió en este grupo comparado con el grupo EU x F1_(CH:AU), para el cual no se observaron ostiones en estadio V a la temperatura de 19°C. Evidencia de la ocurrencia de ciclos gametogénicos continuos en este trabajo es también el hecho de no haber observado un estadio de reposo. Mientras que en ostiones de regiones templadas se identifica un estadio de reposo en otoño-invierno, cuando el alimento disponible permite que el ostión gane peso y almacene reservas energéticas que posteriormente serán usadas principalmente en la gametogénesis (Dridi et al., 2006; Chávez-Villalba et al., 2007), en las temperaturas que se manejaron en

los experimentos (19°C, 23°C, 27°C y 31°C) no se observó este estadio, y más bien los ostiones presentaron procesos de gametogénesis continuos.

En cuanto a la proporción de sexos, la mayor proporción de hembras que de machos en las temperaturas menores puede ser explicada por procesos metabólicos, ya que las hembras son metabólicamente más activas que los machos y requieren de un mayor gasto energético para madurar (Choi et al., 1993). En este trabajo se observó en 19°C un porcentaje mayor de ostiones hembras en ambos grupos (41%- en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; 44% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) comparado con el de machos (23% en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; 10% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) (Fig. 27), con el resto estando indiferenciados o siendo hermafroditas. De forma opuesta en ostiones sometidos a 31°C, el porcentaje de organismos indiferenciados o hermafroditas fue prácticamente nulo, y se observó un porcentaje mayor de ostiones machos en ambas cruzas (31°C: 58% en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; 62% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) comparado con las hembras (31°C: 39% en $F1_{(CH:EU)} \times AU$; 37% en $EU \times F1_{(CH:AU)}$) (Fig. 27). Lo anterior coincide con el trabajo de Shpigel et al. (1992), quienes encontraron que la proporción de machos y hembras fue 63%:37% bajo condiciones experimentales controladas en las que los ostiones fueron sometidos a la temperatura de 30°C durante 34 días.

8.2. Efecto del incremento de la temperatura en los índices de área gonadal y madurez ovárica.

En cuanto al efecto de la temperatura, se observó que al incrementar ésta (de 19°C a los 31°C) se propició un incremento del índice del área gonadal (Fig. 30). Lo anterior coincide con un aumento esperado en el esfuerzo reproductivo en ostiones durante años calientes así como en latitudes bajas con climas templado-tropicales en simulaciones realizadas por Hofmann et al. (1992). Interesantemente, estos autores también concluyen que los ostiones más pequeños presentan un mayor esfuerzo reproductivo ya que tienen repetidos pulsos de desoves, los cuales son menos pronunciados en ostiones grandes en zonas templadas.

Debido a la complejidad en la estructura de la gónada de ostión, y a los patrones de desoves tan diversos, incluyendo evidencia de desoves parciales, la estimación del área gonadal

como se realizó en este trabajo, midiendo el área de la gónada en proporción al área del organismo, así como su interpretación, debe de tomarse con cautela. Esto debido a que para este análisis se emplearon ostiones hembras y machos, pero solamente en estadios tres y cuatro (III y IV) de desarrollo gametogénico, aunque evaluando las cuatro temperaturas (19°C, 23°C, 27°C y 31°C). Una causa para no observar diferencias significativas en el índice del área gonadal entre las temperaturas podría ser el hecho de que independientemente de la temperatura, en los experimentos se mantuvo una ración fija de alimento, y en condiciones de campo se sabe que la concentración de fitoplancton presenta una correlación directa y positiva con el esfuerzo reproductivo del ostión (Royer et al., 2008; Castaños et al., 2009). Sin embargo, la concentración de alimento administrada a los ostiones fue alta (4% del peso seco inicial / día), por lo que un efecto por pobre alimentación puede ser eliminado. Adicionalmente, se puede apreciar que aunque el grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó en el promedio de todas las temperaturas un valor promedio más alto en el índice del área gonadal que el observado para el grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (Fig. 29), esto fue resultado en particular de que a las temperaturas de 19°C y 23°C el grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$ presentó una menor área de gónada, mientras que el grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó un área gonadal constante y mayor en las diferentes temperaturas (Fig. 30). Otra posible explicación a esto podría ser la diferencia de tallas, ya que la cruce $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó una mayor biomasa promedio que la del grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$, en particular a las dos menores temperaturas evaluadas (19°C y 23°C) (Fig. 18), y se sabe que el número de ovocitos producidos por el ostión incrementa proporcionalmente con la biomasa (Kang et al., 2003) y el tamaño del ostión o peso seco total (Choi et al., 1993). Dado la mayor talla y biomasa del grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ a las menores temperaturas de los experimentos, sería de esperarse que éste tenga una tendencia a mayor área de gónada comparado con el grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

Adicionalmente al índice de área gonadal, en este trabajo se estimó un índice de madurez ovárica (MO), el cual se sustenta no solo en la talla de los ovocitos presentes en la gónada sino en el número de cada uno de ellos, de manera que el área total ocupada por los ovocitos provee con una evaluación del área total de gametos en la gónada, lo cual ha sido demostrado que se correlaciona directamente con el estadio de desarrollo gonádico (Arcos

et al. 2005 & 2011). Similarmente, se ha descrito que el número de ovocitos en desarrollo avanzado aumentan en ovarios con mayor desarrollo ovárico, disminuyendo a la par el número de los ovocitos menos desarrollados (Arcos et al., 2009; Lango-Reynoso et al., 2000). Este índice de MO no se espera que evalúe lo mismo que el índice del área gonadal, ya que éste último es una evaluación que incluye toda la región ovárica, independientemente del número y talla de los ovocitos presentes en la misma (Royer et al., 2008; Huvet et al., 2010). En efecto, el índice de madurez ovárica (MO) a las dos temperaturas más altas (27°C y 31°C) no indicó lo mismo que el índice del área gonadal cuando éste se estimó únicamente para hembras en estadio III. El índice de MO mostró que las hembras del grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tenían un significativamente menor índice de MO a 27°C, y que esto fue resultado de un menor número y tamaño de ovocitos postvitelogénicos a 27°C que a 31°C. Por su lado, el índice del área gonadal no mostró diferencias entre grupos genéticos, pero sí entre temperaturas, aunque el mayor índice de área gonadal fue observado a 27°C, lo inverso a lo encontrado con el índice de madurez ovárica. Dado que la biomasa final a estas dos temperaturas no difirió entre grupos, la mejor explicación para este resultado es la ocurrencia de desoves parciales en el grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$, los cuales afectarían directamente el índice de MO pero no el índice del área gonadal. Esto es corroborado al observar los porcentajes relativos de estadios de desarrollo gonádico a partir de hembras maduras (Fig. 20), en donde se puede observar que la proporción de hembras desovadas y/o en reposo al final del experimento fue mayor a 27°C que a 31°C, y fue mayor para el grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (18.5% y 9.1%) que para el grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (12.5% y 5%), lo cual explica la diferencia observada en índice de MO entre temperaturas para hembras en estadio III, ya que éste índice sólo considera ovocitos presentes y no los ya (parcialmente) desovados para su estimación.

Los resultados anteriores proveen aun con mas evidencia de diferencias genéticas entre los grupos que la evidenciada previamente con el análisis cuantitativo de estadios gametogénicos, ya que reafirma que el grupo $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presenta una gametogénesis más acelerada que el grupo $EU \times F1_{(CH:AU)}$. Cuando se considera el índice del área gonadal evaluado en hembras y machos en estadios III y IV en todas las temperaturas, las

tendencias a presentar una menor área gonadal en el grupo EU x F1_(CH:AU) a 19° y 23°C provee evidencia adicional de diferencias genéticas entre los grupos evaluados.

En el ostión *C. virginica* se ha descrito que el esfuerzo reproductivo está en función de un determinante genético, mientras que la temperatura determina que la producción neta sea utilizada ya sea en el desarrollo de tejido somático o en la reproducción (Hofmann et al., 1994). Los resultados encontrados en este trabajo en relación a las diferencias entre los grupos genéticos en uno u otro aspecto de su desarrollo gametogénico son importantes en un contexto de las posibles variantes génicas involucradas o asociadas al proceso gametogénico. Diferencias genéticas entre los grupos evaluados en este trabajo fueron hipotetizadas debido a las marcadas distancias genéticas encontradas entre las líneas de EU y AU cuando fueron evaluadas a través de marcadores moleculares neutros (Galindo-Sánchez et al., 2008).

8.3. Expresión de los genes *Cg-Foxl2*, *Vasa*, *Og-TGFβ* y *vtg* en la gónada de los grupos genéticos de *C. gigas*.

Mientras que diferencias genéticas entre poblaciones de diversos moluscos para desarrollo gametogénico han sido descritas (Enríquez-Díaz et al. 2009), no existen trabajos previos en moluscos evaluando diferencias en la expresión de genes específicamente conocidos como involucrados en el proceso reproductivo entre poblaciones o grupos genéticos. La importancia de conocer si genes asociados con el proceso reproductivo presentan variaciones entre grupos genéticos o poblaciones en su expresión radica en que éstos podrían ser utilizados a futuro como marcadores génicos del proceso reproductivo.

Estos análisis fueron realizados en el presente trabajo una vez que se llevó a cabo la estandarización para establecer qué genes podrían ser utilizados para estandarizar la expresión de los genes de interés en relación a genes constitutiva o establemente expresados en las condiciones experimentales de este trabajo. Diversos trabajos relativamente recientes han hecho énfasis en la necesidad de evaluar genes de referencia o ‘candidato’ para ser utilizados en estimar la expresión relativa de los genes de interés para

cada condición experimental antes de utilizarlos en la estimación de la expresión relativa (Andersen et al., 2004; Gutierrez et al., 2008; Kortner et al., 2011; Morga et al., 2010).

Con el fin de conocer la estabilidad en la expresión de los genes ‘candidato’ de referencia entre los estadios de desarrollo gametogénico y los sexos a evaluar, se emplearon diversos programas diseñados para este fin, como son *geNorm*, *NormFinder* y *Bestkeeper*. Sin embargo, como se observó en este trabajo, debido a que estos utilizan diferentes algoritmos en muchos casos arrojan diferentes resultados (Kortner et al., 2011). Por ejemplo, recientemente De Santis et al. (2011) mostraron que cuando el número de genes de referencia siendo evaluados es reducido, y especialmente cuando dos genes que en realidad no son estables en su expresión pero están altamente correlacionados porque están co-regulados, la selección de genes de referencia por el programa *geNorm* puede ser incorrecta, con la consecuencia de llegar a conclusiones erróneas sobre la expresión relativa de los genes de interés si esos genes son seleccionados (Llera-Herrera et al. 2012).

En el presente trabajo, al evaluar a los genes ‘candidato’ se encontró que utilizando el programa *geNorm*, los genes *ef2 α* y *act- β* fueron definidos como los más estables, seguidos por el gen *gapdh*. Pero al emplear *NormFinder* se invirtió el orden, de tal forma que el orden de los genes más estables con este programa fue *gapdh*, *act- β* y *ef2 α* . Finalmente, con el programa *Bestkeeper*, los genes ribosomales *28S* y *18S* presentaron los valores de coeficiente de variación (CV) más bajos, mientras que los genes *act- β* y *ef2 α* presentaron una correlación mayor, lo cual es una característica recomendada en los genes de referencia siempre y cuando tal correlación no sea una consecuencia de co-regulación (Galiveti et al. 2011). Los resultados de *NormFinder* y *Bestkeeper* son útiles en el caso de que se tengan genes co-regulados ya que estos programas no son susceptibles a estas variaciones sistemáticas (Axtner & Sommer, 2009; Aursnes et al., 2011).

Lo anterior indica que la interpretación de los resultados cuando se utilizan los programas mencionados debe de hacerse con cautela, teniendo en cuenta qué evalúa cada uno de ellos. En el programa *geNorm* se evalúa el promedio de las variaciones pareadas de un gen en particular con los otros genes incluidos en el análisis (Vandesompele et al., 2002), pero como fue mencionado antes, los resultados pueden estar sesgados cuando existe una alta

correlación en la expresión de dos genes porque esos están co-regulados (Andersen et al., 2004). En este trabajo se encontró una alta correlación por *geNorm* en el caso de *act-β* y *ef2α*, genes que presentaron un patrón de expresión similar (Fig. 41), sin embargo, dado que estos genes tienen diferentes funciones metabólicas se reduce el riesgo de que estén co-regulados (Aursnes et al., 2011; Kortner et al., 2011), por lo que éstos fueron pre-seleccionados con base en este programa. Adicionalmente, los resultados en *NormFinder* indicaron una reducida variación en la expresión de estos mismos dos genes cuando se evaluaron entre y dentro de las condiciones experimentales, aunque el gen de referencia identificado con la menor variación fue *gapdh*. Este gen fue eliminado como gen de referencia debido a que se ha encontrado que éste puede estar regulado diferencialmente bajo condiciones de estrés (Zhong y Simons, 1999; Radonic et al., 2004), como las presentes en este trabajo debido a las altas temperaturas utilizadas.

A partir de los resultados del programa Bestkeeper se eligieron los genes *act-β* y *ef2α* además del gen 28S, este último por mostrar un coeficiente de variación bajo (CV) indicando la estabilidad del gen (Kortner et al., 2011). La desviación estándar (DE) es otro indicador considerado para seleccionar genes estables, en el trabajo de Axtner & Sommer (2009) se menciona que es difícil obtener una DE calculada por BestKeeper menor a uno ya que por lo general las muestras de tejido usualmente están conformadas por diferentes tipos de células y muestran una alta variación. Debido a lo anterior se debe considerar el valor más bajo de DE para seleccionar los genes de referencia, que en los resultados obtenidos corresponde a los genes 28S y 18S (Tabla XI; Tabla XII). A pesar de que el gen *18S* presenta valores de CV y DE bajos se evitó utilizarlo puesto que no es recomendable normalizar con genes que tengan un nivel de expresión altamente diferente a los genes blanco (Galiveti et al., 2011). Finalmente, debido a que el uso de métodos estadísticos no paramétricos como los empleados por los tres programas antes mencionados para validar los genes de referencia pueden afectar seriamente la normalización y por lo tanto producir errores en la determinación del patrón de expresión del gen blanco (Gutierrez et al., 2008), se realizaron análisis de varianza con el fin de corroborar que no existieran diferencias estadísticamente significativas intra-grupo (cruza, sexo, estadio de desarrollo gonádico y

temperatura), a partir de los que se descartó el gen *ef2a* ya que éste presentó diferencias significativas entre temperaturas y sexo (Tabla XIII).

Finalmente, es importante mencionar que otra función de *geNorm* es estimar el número óptimo de genes de referencia para normalizar la expresión del gen blanco. Sin embargo, a pesar de que en los resultados de *geNorm* indicaron a través del estimador V que la introducción de cuatro genes era adecuado para normalizar, el número reducido de genes disponibles para ser utilizados como genes de referencia en ostión, así como los resultados obtenidos con los otros programas no permitió considerar la introducción de cuatro genes. La elevada varianza observada posiblemente se debió a la heterogeneidad de la muestra ya que la gónada del ostión es un órgano ramificado y difuso entre la glándula digestiva y el tejido conectivo en los ostiones (Eckelbarger & Davis, 1996). Aunado a lo anterior, son muchas las fuentes de variación que se tuvieron que tomar en cuenta, incluyendo tanto los factores fijos (cruzas genéticas y temperaturas) como la condición de los ostiones (sexo y estadio de desarrollo gonádico). Teniendo en cuenta lo anterior y considerando que al utilizar un solo gen puede ocasionar errores de hasta 6 veces la expresión calculada (en el 10% de los casos) (Vandesompele et al., 2002) finalmente se utilizaron los genes *28S* y *act-β* para estimar la expresión relativa de los genes de interés ya que éstos dos genes mostraron ser los más estables a través del análisis con uno u otro de los programas utilizados así como con el análisis de varianza realizado.

Expresión del gen *Cg-Foxl2* entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.

El análisis por qPCR de *Cg-Foxl2* mostró un patrón de expresión que concuerda con lo reportado por Naimi et al. (2009) mostrando una expresión baja en ostiones indiferenciados y un aumento gradual en la expresión en el estadio de madurez (III) en ambos sexos (Fig. 42). De igual forma, en peces también se ha reportado este patrón en el incremento de expresión en *Foxl2* (Kobayashi et al., 2010). Sin embargo, y a diferencia de lo encontrado por Naimi et al. (2009) en donde describen solamente una ligera tendencia a mayor expresión en FIII pero sin diferencias significativas comparando con MIII, así como lo reportado por Kobayashi et al. (2010) donde no encontraron diferencias en la expresión de

Foxl2 entre peces machos y hembras, al comparar entre sexos en el presente trabajo se encontró que, para cada una de las cruzas, la expresión en hembras fue hasta cinco veces mayor respecto a machos (Fig. 43) lo cual concuerda con estudios en humanos y ratón donde se describe una expresión muy baja en gónada masculina (Cocquet et al., 2005; Duffin et al., 2009) al igual que en ratón. La expresión diferencial entre FIII y MIII puede explicarse con base en diferencias en la cantidad de transcritos contenidos en las células germinales de cada sexo, ya que este gen tiene una función en la diferenciación sexual hacia hembra, como ya se ha sugerido en otros estudios (Baron et al. 2004; Duffin et al. 2009). Por otro lado, es importante hacer notar que aunque cierta expresión fue detectada en machos, la expresión en machos difirió y fue menor que la expresión observada en hembras. En vertebrados y mamíferos este gen, cuando es altamente expresado (en transgénicos) inhibe la diferenciación de túbulos testiculares, y cuando no es funcional o es inhibido induce una reversión de células germinales de hembra a macho, lo cual indica que uno de los papeles principales de *Foxl2* es de inhibición del desarrollo testicular (Ottolenghi et al., 2007).

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el definir si existían diferencias en expresión de genes asociados a la gametogénesis entre grupos genéticos, en este caso las cruzas utilizadas. En la comparación entre cruzas para la expresión de *Cg-Foxl2* se encontraron diferencias significativas para el caso de las hembras (juntando FI y FIII), en donde la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó una significativamente mayor expresión de este gen que la observada para la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$. Es importante mencionar que estas diferencias no son resultado de utilizar para el análisis hembras FIII sometidas a diferentes temperaturas, ya que las hembras FIII analizadas en ambas cruzas fueron obtenidas de la temperatura de 31°C. Similarmente, las hembras FI en ambas cruzas fueron derivadas de la misma temperatura (19°C). Lo anterior permite concluir que existen diferencias genéticas en la expresión de *Cg-Foxl2*, y que este gen se expresó en mayor grado en la craza que presentó una gametogénesis más acelerada (ver sección 8.2 de discusión).

Por otra parte la expresión de *Cg-Foxl2* en MIV no había sido descrita en trabajos previos. En el presente estudio se registró una tendencia a disminución en la expresión de MIII a

MIV, alcanzando valores de expresión similares a los observados en organismos indiferenciados, lo cual podría reflejar la liberación de gametos, una vez que éste transcrito ha sido descrito como localizado en las células germinales desde espermatogonias hasta espermatidas maduras (Naimi et al., 2009). Estos autores también encontraron un incremento significativo en la expresión de *Cg-Foxl2* en machos MIII en comparación con indiferenciados, sin embargo éste incremento no difirió significativamente de hembras FIII. Una posible causa para las diferencias encontrados por esos autores y el presente trabajo es el o los genes utilizados para la normalización de la expresión de *Cg-Foxl2*, ya que Naimi et al. (2009) utilizaron únicamente el gen del factor de elongación (*efl α*), el cual fue descartado en este trabajo debido a que durante la estandarización de genes de referencia se encontró que este gen presentaba diferencias en expresión entre machos y hembras, así como entre temperaturas.

Finalmente, aunque pocos, algunos estudios han reportado la expresión de un transcrito de *foxl2* en testículo de algunos vertebrados (Pailhoux et al., 2001; Cocquet et al., 2002; Pannetier et al., 2003), lo cual podría estar asociado a la expresión de otro transcrito (antisentido) del gen que no sea traducido a proteína funcional (Cocquet et al., 2003 & 2005). La presencia de un transcrito similar tendrá que ser investigado a futuro en el caso del ostión *C. gigas*.

Expresión del gen *OyVlg* (*vasa-like*) entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.

La expresión del gen *OyVlg* o *vasa-like* en gónada de *C. gigas* fue también evaluada para su expresión entre las cruzas o grupos genéticos así como entre sexos y estadios de desarrollo gonádico ya que éste gen ha sido descrito con una función esencial en el desarrollo de las células germinales (Raz, 2000). En *Drosophila melanogaster*, donde *vasa* fue primero descrito, en adultos se encuentra expresado en ovario, tanto en células germinales como en el ovocito, y en testis se expresa en espermatoцитos tempranos y en células totipotentes de la línea germinal. Adicionalmente a la función de VASA en el desarrollo de células germinales, más recientemente se ha encontrado que la proteína codificada por este gen

tiene una función en mitosis y meiosis durante el ciclo celular en gónada, promoviendo la condensación y segregación de cromosomas (Yajima & Wessel, 2011).

Los resultados en este trabajo indicaron que la expresión de este gen aumentó como incrementó el estadio de desarrollo gonádico en ambos sexos (Fig. 44), lo cual concuerda con lo encontrado por Naimi et al. (2009) en la misma especie, quienes describieron una máxima expresión en estadio de madurez (III). Sin embargo, a diferencia del trabajo citado previamente en el presente estudio la expresión en hembras fue significativamente mayor comparada con la expresión en machos, y esta diferencia estuvo dada principalmente por una mayor expresión de este gen en hembras FIII en particular para la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$. Esta diferencia entre cruces para la expresión en hembras es aun más evidente al comparar únicamente entre sexos (Fig. 45).

Fabioux et al. (2004^a) describieron una elevada expresión de *OyVlg* en ovocitos no fertilizados de *C. gigas* indicando que este transcrito es sintetizado por la madre y posteriormente se transmite vía ovocitos al embrión para mantener el desarrollo temprano. Con base en lo anterior es de esperarse mayor expresión en FIII comparado con machos en el mismo estadio, ya que la cantidad de ovocitos maduros es elevada en éste estadio y por ende también lo es la proporción de transcritos *OyVlg* almacenados en el mismo. Por otra parte, la diferencia en la expresión de *OyVlg* entre las cruces en FIII, obtenidas a partir de organismos mantenidos a 31°C, podría explicarse en parte por los valores ligeramente mayores en la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ comparado con $EU \times F1_{(CH:AU)}$ en cuanto al número y área de ovocitos postvitelogénicos, e índice MO, indicando que los análisis por expresión génica cuantitativa (qPCR) de este gen mostraron ser más sensible al evaluar la crucea con mayor avance gametogénico. Esto es, la mayor expresión observada en la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ puede deberse a que, como se mencionó en la sección 8.2, ésta crucea tiene un desarrollo gonádico acelerado así como un mayor porcentaje de desoves parciales en comparación con la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$, lo cual podría indicar que en FIII se estuviera diferenciando una nueva cohorte de ovogonias, con lo que se esperaría que la expresión de *OyVlg* en la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ aumentaría, asociado con la función de este gen en la diferenciación de la línea germinal. Lo antes mencionado concuerda con lo encontrado al

observar las laminillas histológicas de las hembras FIII empleadas para el análisis de expresión en ambas cruzas, donde se puede observar un número mayor de ovogonias en la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ respecto a la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (Fig. 49).

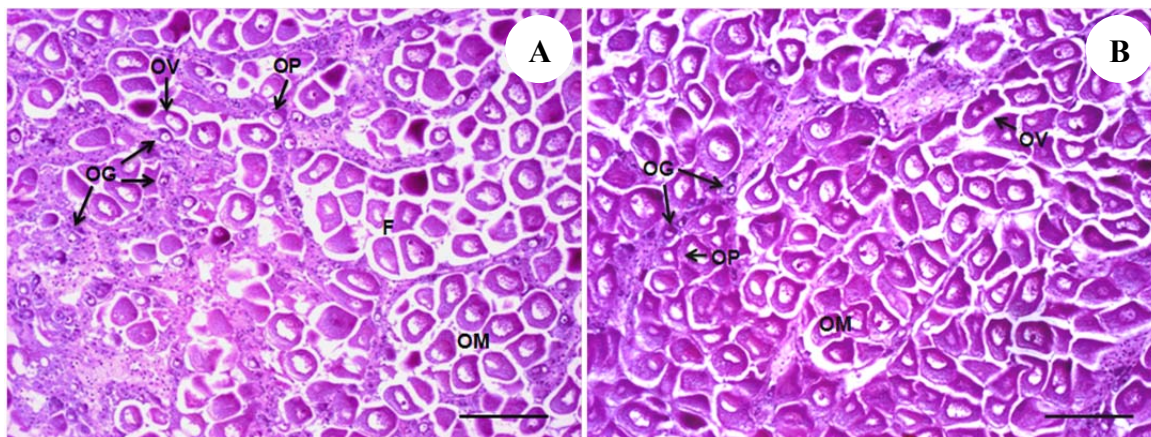


Figura 49. Ostrones hembras en estadio III de *C. gigas* sometidos a 31°C de las cruzas $F1_{(CH:EU)} \times AU$ (A) y $EU \times F1_{(CH:AU)}$ (B) (barra= 100µm). F: folículo; OG: ovogonia; OP: ovocito previtelogénico; OV: ovocito vitelogénico; OM: ovocito maduro.

Un patrón similar al observado en hembras FIII de la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ mantenidas a 31°C se ha descrito para otra especie pero de origen tropical de ostión, *C. corteziensis*, en la cual se observó que temperaturas de ~25°C favorecen la producción continua de ovocitos primarios (Chávez-Villalba et al., 2008). Lo anterior permite proponer que es probable que la evaluación de la expresión de este gen entre grupos genéticos (familias) a futuro pudiera diferenciar a las mismas por su esfuerzo reproductivo, considerando que un mayor esfuerzo se asociaría con una gametogénesis continua con desoves parciales.

En gónada de machos de *C. gigas* el transcrito *OyVlg*, evaluado por hibridación *in situ*, ha sido reportado por Fabioux et al. (2004^b) como altamente expresado en células germinales o espermatogonias, y en células en estadio de meiosis temprana como son los espermatocitos primarios y secundarios, y con una presencia prácticamente nula en espermatozoides. Lo anterior está en acuerdo con la función de *vasa* en mitosis y meiosis (Yajima & Wessel, 2011), ya que la mayor expresión ocurrió durante la mitosis en

espermatogonias así como durante la meiosis en espermatocitos, los cuales al completar dos reducciones meióticas dan lugar a los espermatozoides.

En el presente trabajo no se evaluó este gen por hibridación *in situ*, sino por expresión cuantitativa, pero la misma conclusión que antes puede ser alcanzada. Esto es, bajo el supuesto que este gen se expresa en machos tanto en células germinales como en células meióticas de la gónada masculina, la expresión de *Oyvlg* en machos MIV, con una tendencia a ser mayor que en machos MIII, aunque sin alcanzar diferencias significativas, puede deberse a la presencia de espermatogonias generando una nueva cohorte de células gaméticas. Finalmente, la expresión estimada para *Oyvlg* en machos por Naimi et al. (2009), en donde una mayor cantidad de este transcrito fue observada en machos MIII que en ostiones indiferenciados concuerda con lo encontrado en el presente trabajo, en donde ambas cruzas o grupos genéticos mostraron un incremento significativo en la expresión de *Oyvlg* de ostiones indiferenciados (I) a ostiones en estadio de madurez (MIII). Similarmente concuerda con Fabioux et al. (2004^b), quienes observan este transcrito presente en espermatogonias de la gónada masculina madura a través de análisis de hibridación *in situ*.

Expresión del gen *og-TGF-β* entre sexos, estadios gametogénicos y cruzas.

La expresión del gen *og-TGF-β* tuvo un aparente aumento en el transcrito conforme avanzó el estadio de desarrollo gonádico pero no se observaron diferencias significativas entre estadios (Fig. 46) o entre sexos (Fig. 47). Lo anterior concuerda con lo reportado por Fleury et al. (2008) que describen una máxima expresión en ostiones maduros sin diferencias significativas entre sexos.

Una característica general en la expresión de *og-TGF-β* es la elevada variación observada entre las muestras de cada tratamiento la cual puede deberse a la gametogénesis continua observada en estos ostiones, en donde hay una constante proliferación de células germinales, ya que este gen tiene un efecto positivo en el desarrollo de células germinales aumentando la proliferación de células mitóticas (como células madre y ovogonias) (Corporeau et al., 2011; Huvet et al., 2011). Aunado a lo anterior la amplia variación en la

expresión de *og-TGF-β* también podría estar relacionada con la presencia de ovocitos vitelogénicos, debido a que se ha demostrado que este gen podría estar implicado de manera positiva en la vitelogénesis de *C. gigas* (Huvet et al., 2011).

En la crucea $F1_{(CH:EU)} \times AU$ los ostiones FIII presentaron un nivel de expresión de *og-TGF-β* que no se diferencia de FI aun cuando la cantidad de ovocitos es mayor en FIII, y esto se debe a que el transcrito de este gen no se ubica en los ovocitos. Además, esta tendencia en los niveles de expresión podrían ser debidos a la intensidad en la proliferación de gametos aunado a las diferentes cohortes de ovocitos vitelogénicos (Fleury et al., 2008; Huvet et al., 2011). Dado lo anterior, es posible que en los ostiones MIII otras células gaméticas presentes, como espermatozoides y espermatoцитos, tuvieran un efecto de dilución en la cantidad de transcrito encontrado en el tejido que rodea a las espermatogonias, mientras que en ostiones desovados fuera posible apreciar una mayor expresión al menos en la crucea $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

Expresión del gen *vtg* entre sexos, estadios gametogénicos y cruza.

Se ha observado que en ostiones adultos la concentración de vitelina y la expresión del gen *vtg* incrementan en el ovario con el avance de la madurez y disminuye después del desove (Matsumoto et al., 2003). En el presente trabajo encontramos esta misma relación, donde se observó un incremento significativo en la expresión de *vtg* en hembras en estadio FIII.

Los resultados obtenidos en la expresión de *vtg* concuerdan también con lo encontrado por Llera (2008) ya que la expresión es baja en ostiones indiferenciados y FI, mientras que en FIII se observó la máxima expresión (Fig. 48). La elevada expresión encontrada en FIII se debe a la fase tardía de la vitelogénesis, en la que la mayoría de las células germinales están completamente maduras y marca el período de máxima expresión e incorporación de *vtg* (Llera, 2008). En el ostión *C. corteziensis*, se ha encontrado un aumento de la proteína VN/VTG en gónada en ostiones adultos en estadio vitelogénico, presentando su máximo en hembras post-vitelogénicas o maduras (Arcos et al., 2009)

Por su parte al comparar entre cruza se observó que $F1_{(CH:EU)} \times AU$ presentó una tendencia a mayor expresión de *vtg* comparada con $EU \times F1_{(CH:AU)}$ lo cual es un reflejo del patrón

observado en el índice del área gonadal (Fig. 29), el área que ocupan los ovocitos post-vitelogénicos (Fig. 34), el índice de madurez ovárica (Fig. 35) y la biomasa estimada de la gónada (Fig. 37). Debido a que en ostiones *C. corteziensis* el crecimiento de los ovocitos depende de la acumulación de VN/VTG en el ovocito durante el desarrollo de la gónada, se ha sugerido que ésta proteína puede ser utilizada como un indicador de la madurez gonádica, así como de la capacidad reproductiva (Arcos et al., 2009). Lo anterior se deriva del hecho que en el camarón *Litopenaeus vannamei*, el nivel de VTG en hemolinfa ha servido como un buen indicador de la actividad reproductiva, al encontrarse una correlación positiva con el índice de madurez, y reflejar de esta manera la acumulación de vitelo en huevo, dando como resultado un incremento en la calidad de los nauplios producidos (Arcos et al., 2011). Con base en lo anterior, y a pesar de que las diferencias entre cruzas para el estadio FIII no alcanzaron diferencias estadísticas, se sugiere el uso de la expresión del transcrito de *vgt* como un marcador génico adecuado para evaluar el avance gametogénico entre diferentes líneas o grupos genéticos de ostión.

9. CONCLUSIONES

Las temperaturas menores, definidas en 19°C y 23°C, fueron las temperaturas óptimas cuando se busca determinar diferencias genéticas entre cruzas o grupos genéticamente diferentes; ya que estas temperaturas se encuentran dentro de un rango aceptable de tolerancia térmica para esta especie (Carvalho, 2003).

Las temperaturas elevadas definidas en 27°C y 31°C tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de *C. gigas* mientras que en las temperaturas bajas no se observó tal efecto. Los valores menores biométricos de crecimiento en ostiones sometidos a 27°C y 31°C se debieron a un mayor desarrollo gonádico en ambas cruzas, y a la velocidad de la gametogénesis que está en función de la temperatura en el ambiente. Sin embargo si existen diferencias entre las cruzas en donde $F1_{(CH:EU)} \times AU$ tiene un desarrollo gonádico más acelerado que $EU \times F1_{(CH:AU)}$.

El índice del área gonadal considerando tanto machos como hembras tiende a aumentar con el incremento de temperatura, siendo en temperaturas elevadas (27°C y 31°C) donde el desarrollo de la gónada fue más acelerado, pero cuando se consideraron solamente a las hembras FIII, este índice de área gonadal disminuye de 27°C a 31°C particularmente para la craza $EU \times F1_{(CH:AU)}$ quien presentó menores estadios de desarrollo gonádico, mientras que el índice de madurez ovárica incrementó particularmente para la craza $F1_{(CH:EU)} \times AU$ quien presentó mayores estadios de desarrollo gonádico, por lo que se puede concluir que la evaluación de un ‘esfuerzo reproductivo’ entre cruzas o grupos genéticos con estas técnicas requiere aún de la evaluación integrada de diferentes métodos.

La expresión de *Cg-Foxl2* podría ser un indicador del sexo en desarrollo en el ostión habiéndose observado diferencias en su expresión entre FIII y MIII para ambas cruzas. Por su parte la expresión de *Oyvlg* es un posible indicador de diferencias entre grupos genéticos, indicado por las diferencias en expresión de hembras FIII en cada craza. En el caso de *vtg*, este gen es un buen indicador del desarrollo gametogénico en hembras, indicando estadios mas avanzados cuando su expresión incrementa. Finalmente, el gen *og-*

TGF β no mostró ser un buen marcador génico para evaluar diferencias entre cruzas o estadios para ostiones sometidos a las temperaturas experimentales de este trabajo, posiblemente debido a que existe un desarrollo gonádico continuo, con diferenciación de nuevas cohortes de células germinales.

10. RECOMENDACIONES

- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo es recomendable utilizar temperaturas de 19°C a 23°C para evaluar diferencias genéticas en el índice de área gonadal entre las cruzas.
- Se recomienda evaluar el índice del área gonadal de las mismas cruzas pero cultivadas en campo, así como el índice de madurez ovárica en hembras de diferentes estadios de desarrollo gametogénico. Se recomienda utilizar también un índice nuevo propuesto (Hanquet, 2009) con propósitos comparativos a los anteriores, ya que este índice mide el área folicular (tubular) en relación al área gonadal.
- Estudiar las rutas de regulación de la expresión de las proteínas Foxl2, TGF- β y Oyvlg sobre otros genes involucrados en la gametogénesis que podrían servir como marcadores genéticos.
- Evaluar la expresión de *vlg* entre un mayor número de grupos genéticos (i.e. familias) y establecer la correlación genética entre la expresión de ese gen en hembras de ostión y el índice de madurez ovárica con fines de definir si este marcador génico puede ser utilizado en programas de selección.
- Realizar simulaciones de crecimiento, gametogénesis y desove a diferentes temperaturas por periodos de tiempo mayores al utilizado en el presente trabajo.

11. LITERATURA CITADA

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., Orntoft, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data set. *Cancer Research*. 64(15): 5245-50.
- Arcos, F. G., Racotta, I. S., Palacios, E., Ibarra, A. M. 2005. Ovary development at the onset of gametogenesis is genetically determined and correlated with reproductive traits at maturity in shrimp *Litopenaeus (Penaeus) vannamei*. *Marine Biology*. 148. 339-346.
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Rodríguez-Jaramillo, M. C., García-Latorre, E. A., Vazquez-Boucard, C. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like protein in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture Research*. 40(6): 644-655.
- Arcos, G. F., Ibarra, A. M., Racotta, I. S. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture*. 316. 93-98.
- Ascencio-Michel, R. 2008. Análisis comparativo del crecimiento y superviviencia del ostión *Crassostrea gigas* diploide y triploide en diferentes medios ambientes del Noroeste Mexicano. Tesis de Licenciatura. UABCS. Mexico. 80 p.
- Asif, M. 1979. Reproductive cycle and changes in associated parts of gonad in *Crassostrea (Saccostrea) glomerata* (Gould) from the coast of Karachi. *Indian Journal of Fisheries*. 26(1-2): 13-22.
- Aursnes, I. a, Rishovd, A. L., Karlsen, H. E., Gjoen, T. 2011. Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *BioMed Central Research Notes*: 4(1): 104.
- Axtner, J., Sommer, S. 2009. Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. *BioMed Central Research Notes* 2. 264.
- Baqueiro, E. R., Aldana, D., Sevilla, M. L., Rodríguez, P. F. 2007. Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz , Mexico. *Transitional Waters Bulletin*. 2. 37-46.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., Veitia, R. A. 2004. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of molecular endocrinology*: 33(3): 705-15.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. 2000^a. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol*. 2. 136-145.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. 2000^b. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 125. 359-369.
- Braat, A. K., Speksnijder, J. E., Zivkovic, D. 1999. Germ line development in fishes. *The International Journal of Developmental Biology*. 43(7): 745-760.

- Bradshaw, R. A., Dennis, E. A. 2003. Handbook of Cell Signaling. USA. Academic Press. 709 p
- Brown, J. R. 1988. Multivariate analyses of the role of the environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine Ecology. 45. 225-236.
- Burge, C., Griffin, F. J., Friedman CS. 2006. Mortality and herpesvirus infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. Diseases of Aquatic Organisms. 72. 31-43.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. 2009. The MIQE Guideline: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. Clinical Chemistry. 55(4): 611-622.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., García-Ortega, A. 2004. Episodios de mortalidad del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Baja California y sus relaciones con bacterias. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. 2(26): 1-3.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En Lovatelli, A., Farías, A., Uriarte, I. (eds.) Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su protección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO. Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 327-337.
- Cadoret, J. P., Debón, R., Cornudella, L., Lardans, V., Morvan, A., Roch, P., Boulo, V. Transient expression assay with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. Federation of European Biochemical Societies. 460. 81-85.
- Carlsson, P., Mahlapuu, M. 2002. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. Developmental Biology. 250(1): 1-23.
- Carvalho, L. 2003. Temperatura óptima y temperatura letal superior en dos poblaciones de juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. 83 p.
- Castaños, C., Pascual, M., Pérez, A. P. 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), as a Key factor for its successful spread along the rocky shores of northern Patagonia, Argentina. Journal of Shellfish Research. 28 (4): 837-847.
- Chang, H., Brown, C. W., Matzuk, M. M. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming Growth Factor- β superfamily. The Endocrine Society. 23 (6): 787-823.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J. C., Le Pennec, M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. Aquaculture. 214(1-4): 115-130.
- Chávez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J. C., Le Pennec, M. 2002. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. Aquaculture. 210(1-4): 171-186.

- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R., Cáceres-Martínez, C. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquaculture Research*. 38: 268-278.
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M. R., Mazón-Suástegui, J. M. 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *Journal of Shellfish Research*. 27(4): 711-720.
- Cheney, D. P., MacDonald, B. F., Elston, R. 2000. Summer mortality of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research*. 19 (1): 353-359.
- Choi, K. S., Lewis, D. H., Powell, E. N., Ray, S. M. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management*, 24. 299-322.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Minier, C., Rotchell, J. M. 2011. Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PloS one*. 6(7): e22326.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messeaen, L., Cotinot, Fellous, M., Veitia, R. A. 2002. Evolution and expression of *FOXL2*. *Journal of Medical Genetics*. 39. 916-922.
- Cocquet, J., De Baere, E., Gareil, M., Pannetier, M., Xia, X., Fellous, M., Veitia, R. A. 2003. Structure, evolution and expression of the *FOXL2* transcription unit. *Cytogenetic and Genome Research*. 101. 206-211.
- Cocquet, J., Pannetier, M., Fellous, M., Veitia, R. A. 2005. Sense and antisense *Foxl2* transcripts in mouse. *Genomics*. 85. 531-541.
- Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C., Czjzek, M., Huvet, A. 2011. A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*. 13 (5): 971-980.
- Daniel, W. W. 2005. *Bioestadística*. Limusa Wiley. Cuarta edición. México. 755 p.
- De Santi, C., Smith-Keune, C., Jerry, D. R. 2011. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*. *Marine Biotechnology*. 13. 170-180.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.-F. 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*. 254 (1-4): 571-582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F. 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 353. 45-57.

- Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J. L., Schedl, P. D. 1999. Novel Functions of *nanos* in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell*. 99. 271-281.
- Dieffenbach, C. W., Dveksler, G, S. 2003 PCR Primer: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dohmen, M. R. 1992. Cell lineage in molluscan development. *Microscopy research and technique*. 22(1): 75-102.
- Dridi, S., Romdhane, M. S., Leitao, A., El Cafsi, M. H. 2006. Evidence for *Crassostrea gigas* reproduction in the Bizert lagoon of Tunisia. *Journal of Biological Research*. 5. 35-45.
- Dridi, S, Romdhane, M. S., Elcafsi, M. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*. 263. 238-248.
- Duffin, K., Bayne, R. A. L., Childs, A. J., Collins, C., Anderson, R. A. 2009. The forkhead transcription factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. *Molecular Human Reproduction*. 15(12): 771-7.
- Dutertre, M., Beninger, P. G., Barillé, L., Papin, M., Rosa, P., Barillé, A.-L., Haure, J. 2009. Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquatic Living Resources*. 22(3): 319-329.
- Eckelbarger, K. J., Davis, C. V. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Marine Biology*. 127: 79-87.
- Enríquez-Díaz, M. R. 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Université de Bretagne occidentale. Thèse de Doctorat. 216 p.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M. 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*. 17. 491-506.
- Fabioux, C. 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne occidentale. 210 p.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lenon, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., Minguant, C., Le Pennec, M. 2004. Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 320. 592-598.
- Fabioux, C, Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A. 2004. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315. 897-904.
- Fabioux, C, Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*. 250. 458-470.

- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A. 2009. *In vivo* RNA interference in oyster – vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*. 276. 2566-2573.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. http://www.fao.org/index_es.htm
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P., Huvet, A. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*. 410. 187 - 196.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J-Y, Mazurais, D. Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P. Favrel, P., Huvet, A. 2010. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Marine Biotechnology*. 12. 326-339.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A. N., Arredondo-Vega, B. O. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*. 35. 1131-1140.
- Frias, R., Segovia, M. 2010. Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system : first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of Shellfish Research*. 29(2): 303-308.
- Friedman, C. S., Estes, R. M., Stokes, N. A., Burge, C. A., Hargove, J. S., Barber, B. J., Elston, R. A., Burrenson, E. M., Reece, K. S. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oyster *Crassostreaa gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63. 33-41.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O., Renault, T. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*. 254(1-4): 606-616.
- Galindo-Sánchez, C. E., Ibarra, A. M., Cruz, P. 2008. Genetic diversity among four different world-wide lines of Pacific oyster *Crassostrea gigas* by microsatellites. *Physiomar*. Brest, Franci. September 1-4. 109 p
- Galiveti, C. R., Rozhdestvensky, T. S., Brosius, J., Lehrach, H., Konthur, Z. 2010. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA*. 16(2): 450-661.
- Gallo, M. C., García-Ulloa, M., Godínez, D., Rivera, K. 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*. 17(34): 83-91.
- García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A., Ley-Lou, F., Mejía-Trejo, A. 2004. Potencial ostrícola del brazo oeste de Bahía San Quintín: Biomasa actual y estimación preliminar de la capacidad de carga. *Ciencias Marinas*. 30(1A): 61-74.
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L. 2009. Normalization of qPT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*. 60 (2): 487-493.

- Guo, X., Gui, Y. T., Tang, A.F., Lu, L. H., Gao, X., Cai, Z. M. 2007. Differential expression of *VASA* gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian Journal of Andrology*. 9(3): 339-44.
- Guo, X., Wang, X. F. 2009. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Research*. 19:71-88.
- Gustafson, E. A, Wessel, G. M. 2010. Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays*. 32. 626-37.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J. F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerinaeu, F., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O. 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal*: 6(6): 609-18.
- Hanquet, A. C. 2009. Approches cellulaires et moléculaires de la gestion des réserves chez l'huître, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et effet du niveau trophique sur la mise en réserve. Tesis de Doctorado. Université de Caen- Basse-Normandie. France. 232 p.
- Hansen, I. A., Sieglaff, D. H., Munro, J. B., Shiao, S. H., Cruz, J., Lee, I. W., Heraty, J. M., Raikhel, A. S. 2007. Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(9): 985-97.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8(2): R19.
- Herpin, A., Lelong, C., Favrel, P. 2004. Transforming growth factor- β -related proteins : an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental and Comparative Immunology*. 28. 461-485.
- Hofmann, E. E., Powell, E. N., Klinck, J. M., Wilson, E. A. 1992. Modeling oyster population III. Critical feeding periods, growth and reproduction. *Journal of Shellfish Research*. 11(2): 399-416.
- Hofmann, E. E., Klinck, J. M., Powell, E. N., Boyles, S., Ellis, M. 1994. Modeling oyster populations II. Adult size and reproductive effort. *Journal of Shellfish Research*. 13(1): 165-182.
- Hughes-Games, W. L. 1977. Growing the japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical seawater fish ponds. I. Growth rate, survival and quality index. *Aquaculture*. 11. 217-229.
- Humanson, L. G. 1979. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and Company. Cuarta edición. U.S.A. San Francisco. 661 pp.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P. 2010. Reproductive effort of Pacific oyster: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture*. 304(1-4): 95-99.
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J. Y., Riviere, G., Boudry, P., Fabioux, C. 2011. In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*. doi:10.1007/s10126-011-9421-4.
- Ibarra, A. M., Ascencio-Michel, R., Tobar-Hurtado, S., Ramirez, J. L., Palacios, E., Manzamo-Sarabia, M., Rodríguez-Jaramillo, C. 2008. Tropical vs. subtemperate

- environments: growth, survival & biochemical composition of *Crassostrea gigas* diploids and triploids. Physiomar 08. Brest, France. Septiembre 1-4.
- Ibarra, A. M., Ascencio-Michel, R., Tobar-Hurtado, S., Ramirez, J. L., Manzano-Sarabia, M. 2008. Growth of diploid & triploid *C. gigas* at different sites/years is explained by an index of monthly productivity/temperature, but differential survival is explained by accumulated thermal degrees and productivity. Physiomar 08. Brest, France. Septiembre 1-4.
- Ibarra, A. M., Famula, T. R., Arcos, F. G. 2009. Heritability of vitellogenin in hemolymph, a pre-spawning selectable trait in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, has a large genetic correlation with ovary maturity measured as oocytes mean diameter. Aquaculture. 297(1-4): 64-69.
- Islas-Olivares, R. 1975. El ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. Ciencias Marinas. 2(1): 58-59.
- Jankowsky, E., Fairman, M. E. 2007. RNA helicases-one fold for many functions. Current opinion in structural biology, 17. 316-324.
- Jonsson, H., Peng, S. L. 2005. Forkhead transcription factors in immunology. Cellular and Molecular Life Sciences. 62(4): 397-409.
- Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaie, P., Mathieu, M., Kellner, K. 2010. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 395. 162-170.
- Kaestner, K. H., Knöchel, W., Martínez, D. E. 2000. Unified nomenclature for the winged helix / forkhead transcription factors. Genes & Development. 14.142-146.
- Kang, C. K., Park, M. S., Lee, P. Y., Choi, W. J., Lee, W. C. 2000. Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in two coastal bays of Korea. Journal of Shellfish Research. 19(2): 771-778.
- Kang, S. G., Choi, K. Sik, Bulgakov, A. A., Kim, Y., Kim, S. Y. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 282(1-2): 1-21.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., Nüsslein-Volhard, C. 2000. Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. The Journal of Cell Biology. 149(4): 875-88.
- Knight, P. G., Glister, C. 2006. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 132. 191-206.
- Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Nozu, R., Nakamura, M. 2010. Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (Foxl2) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Biology of Sex Differences. 1(1): 3.
- Koganezawa, A., 1975. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proceedings of the Third U.S.–Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan. 29–34 p.

- Kohli, G., Clelland, E., Peng, C. 2005. Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3. 53.
- Kortner, T. M., Valen, E. C., Kortner, H., Marjara, I. S., Krogdahl, Å., Bakke, A. M. 2011. Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture*. 318(3-4): 355-363.
- Kubista, M., Andrade, M. J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27. 95-125.
- Kuo, F. T., Bentsi-Barnes, I. K., Barlow, G. M., Bae, J., Pisarski, M. D. 2009. Sumoylation of Forkhead L2 by Ubc9 is required for its activity as a transcriptional repressor of the Steroidogenic Acute Regulatory Gene. *Cell Signal*. 21(12): 1935-1944.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P. J. 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebrate Reproduction and Development*. 36(1-3):141-144.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., Pennec, M. L. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 190. 183-199.
- Lasko, P. F., Ashburner, M. 1990. Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes & Development*. 4. 905-921.
- Le Quéré, H., Herpin, A., Huvet, A., Lelong, C., Favrel, P. 2009. Structural and functional characterizations of an Activin type II receptor orthologue from the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*. 436(1-2): 101-107.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quéré, H., Rodet, F., Dubos, M. P., Favrel, P. 2007. Cg-TGF- β , a TGF- β /activin homologue in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against gram-negative microbial infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 31. 30-38.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Sato, M., Mori, K. 1998. Degradation of vitellin during embryogenic and larval development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 33(1): 1-9.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Mori, K. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and efecto of estradiol-17 β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 33(1): 87-93.
- Ling, D., Salvaterra, P. M. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS ONE* 6(3): e17762. doi:10.1371/journal.pone.0017762
- Llera, R. A. (2008). Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés, *Crassostrea gigas*. Tesis de Maestría. CIBNOR. México. 91 p
- Llera, R., García-Gasca, A., Huvet, A., Ibarra, A. M. 2012. Identification of a tubulin- α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Genomics* (en prensa).

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company. 5 ta Ed. New York. U.S.A. 973 p.
- Maguire, G. B., Gardner, N. C., Nellb, J. A., Kent, G. N., Kent, A. S. 1995. Studies on triploid oysters in Australia. 2. Growth, condition index gonad area, and glycogen content of triploid and diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, from oyster leases in Tasmania, Australia. *Aquaculture*. 137. 355-358.
- Malham, S., Cotter, E., O’Keeffe, S., Lynch, S., Culloty, S. C., King, J. W., Latchford, J. W., Beaumont, A. R. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*. 287. 128-138.
- Malouf, R., Breese, W. P. 1977. Seasonal changes in the effects of temperature and water flow rate on the growth of juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 12. 1-13.
- Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 59. 95-110.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., Mori, K. 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 118(4): 811-817.
- Matsumoto, T, Nakamura, A. M., Mori, K., Kayano, T. 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological Science*. 20. 37-42.
- McCurley, A. T., Callard, G. V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*. 9. 102.
- Miyazono, K., Kusanagi, K., Inoue, H. 2001. Divergence and convergence of TGF- β / BMP signaling. *Journal of Cellular Physiology*. 187(3): 265-276.
- Moreno, G. J., Gómez, J. 2006. Estimación de temperatura potencial y salinidad promedio de la superficie de 27.0 σ_{θ} de la región sureña de la Corriente de California por el método de análisis objetivo. *GEOS*. 25(3): 408-416.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T. 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*. 1-9. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.028
- Mori, K. 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*. 53. 361-369.
- Naimi, A., Martinez, A. S., Specq, M. L., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P. 2009. Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B. 154(1): 134-42.
- Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M. H. 1985. *Applied linear statistical models*. Editorial Richard D. Irwin, Inc. Segunda Edición. USA. 1127 p.
- Noce, T., Okamoto-Ito, S., Tsunekawa, N. 2001. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Structure and Function*. 26. 131-136.

- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P. 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*. 282: 124-129.
- Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. 2007. Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Human Molecular Genetics*. 16(23): 2795-804.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Servel, N., Taourit, S., Furet, J. P., Fellous, M., Grosclaude, F., Crihiu, E. P., Cotinot, C., Vaiman, D. An 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genetics*. 29: 453-458.
- Pangas, S. A., Matzuk, M. M. 2004. Genetic models for transforming growth factor β superfamily signaling in ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 225(1-2): 83-91.
- Pannetier, M., Servel, N., Cocquet, J., Besnard, N., Cotinot, C., Pailhoux, E. Expression studies of the PIS-regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals. *Cytogenetics and Genome Research*. 101: 199-205.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*. 29(9): 2002-2007.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper — Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26: 509-515.
- Pfaffl, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3. En: A-Z of quantitative PCR. International University. USA. 87-112.
- Pisarska, M. D., Bae, J., Klein, C., Hsueh, A. J. W. 2004. Forkhead L2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*. 145(7): 3424-3433.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alummno-Bruscia, M. 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research*. 56: 156-167.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313: 856-862.
- Raz, E. 2000. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*. 1(3): Reviews 1017.1-reviews1017.6
- Ren, J. S., Marsden, I., Ross, A., Schiel, D. 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 37: 171-182.
- Riffeser, M., Hock, B. 2002. Vitellogenin levels in mussel hemolymph — a suitable biomarker for the exposure to estrogens? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 132: 75-84.

- Royer, J., Seguineau, C., Park, K. I., Pouvreau, S., Choi, K. S., Costil, K. 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture*. 277(3-4): 313-320.
- Ryan, K., Garrett, N., Bourillot, P. Y., Stennard, F., Gurdon, J. B. 2000. The *Xenopus eomesodermin* promoter and its concentration-dependent response to activin. *Mechanisms of Development*. 94(1-2): 133-46.
- SAGARPA. 2010. Plan Rector: sistema producto ostión. 37p.
- Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J. L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268. 227-243.
- Schulz, C., Kiger, A. A., Tazuke, S. I., Yamashita, Y. M., Pantalena-Filho, L. C., Jones, D. L., Wood, C. G., Fuller, M. T. 2004. A misexpression screen reveals effects of *bag-of-marbles* and TGF β class signaling on the *Drosophila* male germ-line stem cell lineage. *Genetics Society of America*. 167(2): 707-23.
- Sheehan, D. & B.B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of Histotechnology. 2nd Ed, Battelle Press. Ohio. U.S.A. 481 p.
- Shpigel, M., Barber, B. J., Mann, R. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 161. 15-25.
- Sicard, M. T., Maeda-Martínez, A. N., Lluch-Cota, S. E., Lodeiros, C., Roldan-Carrillo, L. M., Mendoza-Alfaro, R. 2006. Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. *Aquaculture Research*. 37(10): 1040-1049.
- Sokal, R. R., Rohlf, J. F. 1981. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 2nd Ed., W. H. Freeman & Company, San Francisco. U.S.A. 859 p.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P. 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12. 131-143.
- Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K. 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (THUNBERG) in relation to environmental rearing condition. *Journal of Shellfish Research*. 24(1): 197-207.
- Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K., Mori, K. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*. 113. 239-245.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C. H. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends in Biochemical Sciences*. 25(2): 64-70.

- Tobar, S. C. 2008. Estudio gonádico comparativo de diploides y triploides de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) cultivados en tres diferentes localidades del noroeste mexicano. Tesis de Licenciatura. UABCS. México. 112 p.
- Todd, C. D., Havenhand, J. N. 1983. Reproductive effort: its definition, measurement and interpretation in relation to molluscan life-history strategies. *Journal of Molluscan Studies*. 12A. 203-208.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T. 2000. Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*. 93(1-2): 139-49.
- Trasviña, A., Lluch, D., Filonovo, A. E., Gallegos, A. 1999. Oceanografía y El Niño. Los Impactos de El Niño en México. 69-101 p.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., Noce, T. 2000. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127(12): 2741-50.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Patty, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7): research0034.1-0034.11.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Klinger, M., Raz, E. 1999. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development*, 126(23): 5295-307.
- Winant, C., Gutiérrez de Velasco, G. 1999. Impacto del desarrollo de los Salitrales de San Ignacio sobre las corrientes y propiedades del agua de la Laguna San Ignacio, B.C.S. Reporte técnico final. Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, California. U.S.A. 59 p.
- Yajima, M., Wessel, G. M. 2011. The multiple hats of *Vasa*: its functions in the germline and in cell cycle progression. *Molecular Reproduction and Development*. 78(10-11): 861-867.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N. 1997. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*. 124:3157-3165.
- Zhong, H., Simons, J. W. 1999. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 259: 523-526.

12. ANEXOS

ANEXO I. Técnica histológica

Agua DEPC (1L)

- 1 L de agua destilada
- 1 mL de DEPC
- esterilizar 24 h

Solución Davidson (1 L):

- 500 mL de agua DEPC.
- 300 mL de formol (formaldehído al 40% -CarloErba-4156829).
- 150 mL de etanol absoluto (VWR -20.820.564).
- 50 mL de ácido acético glacial (CarloErba-401422) (añadir extemporáneamente).

Etanol 70 (1L):

- 700 mL de etanol absoluto.
- 300 mL de agua DEPC.

INCLUSIÓN EN PARAFINA

La inclusión en parafina realiza con la ayuda de un aparato de inclusión (histokinette) programable, en las siguientes soluciones:

Etanol 80%.....1 h
Etanol 95%.....2 h
Etanol 95%.....2 h
Etanol 95%.....1 h
Etanol 100%.....2 h
Etanol 100%.....2 h
Etanol 100%.....1 h
Xilol (Claral).....1 h
Xilol (Claral).....2 h
Parafina.....2 h
Parafina.....2 h
Tiempo total: 18h.

ANEXO II. Técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina

1. Xilol I, II y III-10 min en cada uno.
2. Alcohol etílico 96%- 2 min.
3. ROH 70I y 70 II- 2 min en cada uno
4. Agua destilada 5 min.
5. Hematoxilina de Harris 1 min (dependiendo del tiempo de uso del colorante)
6. H₂O I y II- 5 min.
7. ROH Acido- 10-15 s (250 mL de ROH 96° mas 5 gotas de HCl conc.).
8. H₂O- 5 min.
9. H₂O amoniacal-10-15 s (250 mL de H₂O mas 5 mL de hidróxido de amonio).
10. H₂O- 5 min.
11. ROH 50- 2 min.
12. ROH 70- 2 min.
13. Eosina alcohólica- 3 min (dependiendo del tiempo del colorante).
14. ROH 96 I y II, 1-2 min en cada uno.
15. ROH 100 I y II, 1 min en cada uno.
16. XILOL I, II, III (sustituto de xileno ó Hemo-De)- 5 min en cada uno.
- 17.- Montar en resina sintética o Entellan.

ANEXO III. Extracción de ARN

Previamente:

Las muestras fueron previamente guardadas de manera individual a -80°C en sobres de aluminio.

Limpiar el área de trabajo con RNaseZAP[®] o cloro.

1. Pesar 100mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600 μm) y colocarlo en un tubo ependorf.
2. Agregar 1 mL de TriPure Isolation Reagent (fenol guanidina tiocinato).
3. Maniobrar las muestras en nitrógeno líquido para evitar que se descongele el tejido mientras se pesa. Pesar no más de 50 mg de gónada y colocar el tejido en el tubo ependorf con perlas de cristal y TriPure. Mantener en hielo las muestras previamente pesadas.
4. Homogenizar el tejido en el equipo FastPrep[®]-24 durante 40 segundos a una velocidad de 6 m/s. En caso de quedar tejido homogenizar nuevamente. Mantener en hielo las muestras.
5. Centrifugar las muestras 14,000 rcf por 5 min a 4°C .
6. Transferir la fase superior a un nuevo tubo ependorf evitando la matriz (perlas cristal) y el tejido restante (recuperar aproximadamente 850 μL).
7. Incubar las muestras 5 min a temperatura ambiente.
8. Agregar 300 μL de cloroformo y 10 s en el vortex.
9. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4°C .
11. Transferir la fase acuosa (aproximadamente 450 μL) a un tubo de 1.5 mL cuidando de no tomar la fase intermedia.
12. Agregar 500 μL de etanol al 100% y mezclar por inversión 5 veces.
13. Incubar 30 min a -20°C .
14. Centrifugar 14,000 rpm por 15 min a 4°C .
15. Lavar el pellet de ARN con 500 μL de etanol al 75% (para hacer 100 mL: 75 mL de etanol absoluto y 25 mL de agua DEPC).

16. Incubar en hielo por 10 minutos.
17. Centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4⁰C y descartar el sobrenadante.
18. Repetir el lavado del pellet con etanol al 75%, incubar en hielo por 10 min., centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4⁰C.
19. Descartar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente hasta que se evapora todo el etanol.
10. Resuspender el ARN en agua DEPC (el volumen dependerá del tamaño del pellet siendo 15, 30 o 50 µL).
11. Cuantificar el ARN total en un NANODROP.

ANEXO IV. Gel MOPS

Para un gel de agarosa 1% de 100mL:

1. Disolver 1 g de agarosa, 90 mL de agua DEPC y 10 mL de MOPS 10X.
2. Cuando la mezcla se enfríe un poco agregar 6 μL de SYBR y 1 mL de formaldehído.
3. Limpiar el molde de electroforesis con RNaseZAP $\text{\textcircled{R}}$.
4. Verter la mezcla de agarosa en el molde (cuidando que no queden burbujas en el gel), cubrir de la luz y dejar solidificar por 1 h.
5. Preparar el buffer de corrida con 900 mL de agua DEPC y 100 mL de MOPS.
6. Calentar a 60°C por 10 min las muestras (5 μL de ARN total (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 9 μL de agua DEPC) y la escalera (3 μL de ARN ladder con 9 μL de agua DEPC). Colocar en hielo hasta que se carguen en el gel.
7. Limpiar la cámara de electroforesis con RNase $\text{\textcircled{R}}$ y colocar el gel cubriéndolo con el buffer de corrida MOPS 1X.
8. Agregar 2 μL de XC-BPB a las muestras y escalera y cargarlas en el gel.
9. Correr la electroforesis a 80 V por 2 h. Al finalizar obtener la imagen del gel mediante un fotodocumentador.

ANEXO V. Tratamiento con DNAsa

1. Tomar 5 μ L (1.6 μ g/ μ L) de ARN y agregar:

RQ DNAsa 5 μ L

RQI Buffer de reacción 10x 1.5 μ L

H₂O libre de nucleasas 3.5 μ L

2. Incubar a 37°C por 30 min.

3. Agregar 1 μ L de RQI DNAsa STOP.

4. Incubar a 65°C por 10 min. Colocar en hielo hasta la siguiente reacción o almacenar a -20°C.

ANEXO VI. Síntesis de ADNc

1. En caso de que las muestras de ARN libre de ADNg fueran almacenadas a -20°C , descongelarlas en hielo.
2. Cuantificar la concentración de ARN en NANODROP.
3. Realizar la combinación del ARN con oligo (dT)₁₅:

CONTROL (+)

ARN (1 μg)	2 μL
Oligo (dT) ₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\text{reac}$)	1 μL
H ₂ O libre de nucleasas	2 μL
<i>Total</i>	<i>5 μL</i>

CONTROL (-) A (sin template)

Oligo (dT) ₁₅	1 μL
H ₂ O nucleasa free	4 μL
<i>Total</i>	<i>5 μL</i>

REACCIÓN CON ARN

Oligo (dT) ₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\text{rx}$)	1 μL
ARN libre de ADNg (mínimo 1 $\mu\text{g}/\text{rx}$)	5 μL
<i>Total</i>	<i>6 μL</i>

4. Incubar a 70°C por 5 minutos.
5. Colocar inmediatamente en hielo 5 min. y centrifugar 10 s (para coleccionar lo condensado).
6. Colocar los tubos en hielo hasta la siguiente reacción.
7. Preparar las siguientes mezclas (en hielo): realizar los cálculos para el número de reacciones.

REACCIÓN CON ARN (1 Rx)

H ₂ O libre de nucleasas	5 μL
Im Prom II 5x buffer	4 μL
MgCl ₂ (concentración final 6 mM)	2 μL
dNTP Mix	1 μL
RNAsin (inhibidor de ribonucleasas)	1 μL
Improm II Transcriptasa Reversa	1 μL
<i>Total</i>	<i>14 μL</i>

CONTROL (-) sin enzima

H ₂ O libre de nucleasas	6 μ L
Im Prom II 5x buffer	4 μ L
MgCl ₂ (concentración final 6 mM)	2 μ L
dNTP Mix (concentración final 0.5 mM/dNTP)	1 μ L
<u>RNAsin (inhibidor de ribonucleasas)</u>	<u>1 μL</u>
<i>Total</i>	<i>14 μL</i>

8. Agregar 14 μ L de la mezcla al ARN con oligo (dT)₁₅ para obtener un volumen final de 20 μ L.
9. Calentar la mezcla de reacción 25°C por 10 min para realizar el alineamiento; para la extensión 42°C por 60 min; y 70°C por 15 min para la inactivación de la enzima.
10. Centrifugar y almacenar el ADNc a -20°C.

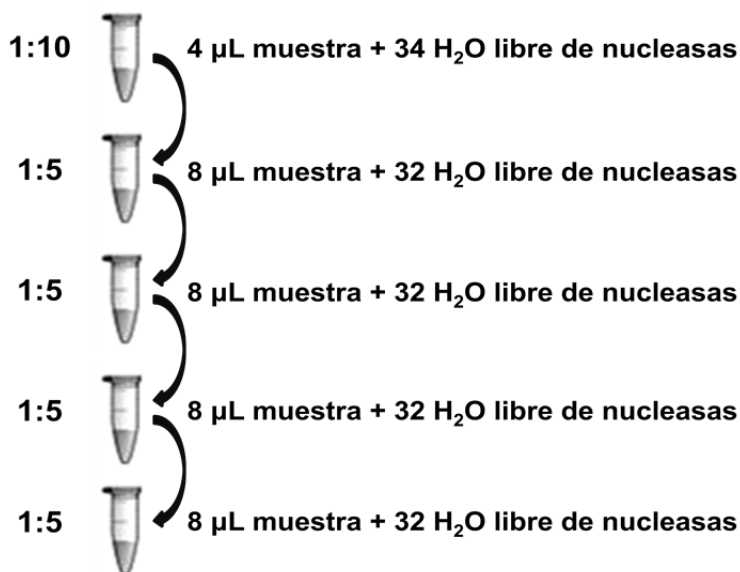
ANEXO VII. Eva green 1x

Componentes del mix casero de Eva green 1x para una reacción:

Buffer 5x	3uL
MgCl ₂ 25mM	1.5uL
dNTP	0.3uL
Taq (Promega)	0.09uL
Eva green 20x	0.75uL
<u>H₂O</u>	<u>1.86uL</u>
<i>Total</i>	<i>7.5uL</i>

ANEXO VIII. Q-PCR

1. Realizar una curva estándar con los genes constitutivos (*ef2α*, *act-β*, *gapdh*, *18S* y *28S*) a partir de ADNc para esto se utilizaron 5 diluciones con un volumen final de 40 μL : 1:10, 1:5, 1:5, 1:5 y 1:5.



2. Agregar 160 μL de H_2O libre de nucleasas para obtener un volumen final de 200 μL .

3. Prepara la mezcla siguiente (1Rx) para cada gen constitutivo:

H_2O libre de nucleasas	1.9 μL
SYBR	7.5 μL
Oligo F (10 μM)	0.3 μL
Oligo R (10 μM)	0.3 μL
<i>Total</i>	<i>10 μL</i>

4. Agregar 5 μL de la muestra diluida en la placa y posteriormente agregar 10 μL de la mezcla (volumen final 15 μL).

5. Centrifugar la placa para quitar posibles burbujas en los pozos.

6. Programar la Q-PCR de la siguiente manera:

95°C	5 min	} 35 ciclos
95°C	30 s	
58°C	30 s	
68°C	1 min	