



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EXPRESIÓN Y POLIMORFISMO DEL GEN *Hsp70* DEL
OSTIÓN DEL PACÍFICO (*Crassostrea gigas*) COMO UNA
MEDIDA DEL ESTRÉS ESTACIONAL EN
CONDICIONES DE CULTIVO

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

ADÁN VALENZUELA CASTILLO

Hermosillo, Sonora, México

Agosto de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**EXPRESIÓN Y POLIMORFISMO DEL GEN *Hsp70* DEL OSTIÓN
DEL PACÍFICO (*Crassostrea gigas*) COMO UNA MEDIDA DEL
ESTRÉS ESTACIONAL EN CONDICIONES DE CULTIVO**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

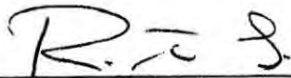
ADÁN VALENZUELA CASTILLO

Hermosillo, Sonora, México.

Agosto del 2014

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada "Expresión y Polimorfismo del Gen *Hsp70* del Ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) Como una Medida del Estrés Estacional en Condiciones de Cultivo", presentada por Adán Valenzuela Castillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dra. Reina Castro Longoria
Co-directora



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Co-director



Dr. Arturo Sánchez Paz
Sinodal



Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal

DEDICATORIA

“La alegría está en la lucha, en el esfuerzo, en el sufrimiento que supone la lucha, y no en la victoria misma. Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”
(Gandhi, 1869-1948).

A mis padres;
mi padre, quien me enseñó el amor por la ciencia;
mi madre, que me enseñó el amor por la vida.

A mi hermanas;
quienes a través de los años,
me han apoyado en cada paso dado.

A Vianey G. Espinoza Moreno;
mi inspiración para ser mejor día a día.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, al Posgrado en Biociencias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme en mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar el trabajo experimental correspondiente a expresión génica en sus instalaciones.

A mis co-directores de tesis, Dra. Reyna Castro Longoria y Dr. José Manuel Grijalva Chon, ya que sin su incondicional apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación, sin importar el día, la hora, o si había periodo vacacional de por medio, no hubiera sido posible terminarlo.

Al Dr. Arturo Sánchez Paz, sinodal, por su invaluable y constante ayuda durante la realización de esta investigación, además de sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Marco Antonio López Torres, sinodal, debido a su aporte al desarrollo de mi trabajo de tesis, así como sus correcciones y comentarios.

A la M. en C. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza, M. en C. Fernando Mendoza Cano y al Biol. Trinidad Encinas García quienes me ayudaron de manera significativa durante la estancia en CIBNOR, además de Ana Carolina Gómez Yáñez, Ana Patricia Olguín León y Leonardo Luken Vega que me apoyaron en los primeros pasos dentro del laboratorio de biología molecular.

Al Dr. Enrique de la Re Vega, M. en C. Carlos Ballesteros Córdova y Manuel Lastra Encinas, que gracias a sus aportaciones y discusión de ideas fue posible resolver distintos problemas. Así como el Dr. Alejandro Varela Romero por su ayuda con el software DnaSP 5.0, y la Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro por sus valiosos comentarios.

A Gilberto Carrillo Lozano, Carlos Daniel Sastré Velásquez y Andrea Carolina Soto Vásquez ya que gracias a su ayuda en la realización del trabajo experimental fue posible sacar adelante este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Proteínas de Choque Térmico: Características y Aspectos generales.....	11
2.2 Proteínas de Choque Térmico de 70 kDa.....	15
2.2.1 Aspectos generales.....	15
2.2.2 Función en condiciones fisiológicas.....	16
2.2.3 Síntesis de las proteínas HSP70 en respuesta ante estrés térmico.....	17
2.2.4 Polimorfismo del gen <i>Hsp70</i>	19
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos Particulares.....	24
V. METODOLOGÍA.....	25
5.1 Descripción del área de muestreo.....	25
5.2 Muestreo.....	25
5.3 Determinación de Patógenos.....	27
5.3.1 Extracción de ADN.....	27
5.3.2 Diagnóstico de patógenos.....	28
5.3.2.1 <i>Marteilia refringens</i>	28
5.3.2.2 OsHV-1.....	28
5.3.2.3 <i>Perkinsus marinus</i>	29
5.4 Síntesis de cDNA.....	29
5.4.1 Extracción de ARN.....	29
5.4.2 Determinación de la concentración de ARN.....	30
5.4.3 Digestión de ADN genómico total.....	30

5.4.4 Evaluación de la integridad del ARN.....	30
5.4.5 Retrotranscripción.....	30
5.5 Variabilidad Genética.....	31
5.6 Cuantificación de la Expresión del Gen <i>Hsp70</i>	32
5.6.1 Curva estándar del gen <i>Hsp70</i>	32
5.6.2 Curva estándar del gen <i>Actina</i>	34
5.6.3 Curva estándar del gen <i>Rpl8</i>	35
5.6.4 PCR de tiempo real.....	35
5.7 Análisis Estadístico de los Datos.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1 Detección de Patógenos.....	37
6.1.1 <i>Marteillia refringens</i>	37
6.1.2 OsHV-1.....	37
6.1.3 <i>Perkinsus marinus</i>	37
6.2 Variabilidad Genética.....	39
6.3 Evaluación de Expresión Génica.....	45
6.3.1 Curva estándar del gen <i>Hsp70</i>	45
6.3.2 Curva estándar de <i>Actina</i>	46
6.3.3 Curva estándar de <i>Rpl8</i>	46
6.3.4 Expresión estacional del gen <i>Hsp70</i>	49
6.3.5 Expresión estacional del gen <i>Actina</i>	49
6.3.6 Expresión estacional del gen <i>Rpl8</i>	51
6.3.7 Efecto de la infección por OsHV-1 sobre la expresión de <i>Hsp70</i>	51
6.3.8 Niveles de expresión de <i>Hsp70</i> asociado a genotipos.....	53
VII. DISCUSIÓN.....	56
7.1 Determinación de OsHV-1.....	56
7.2 Variabilidad Genética.....	57
7.3 Expresión del Gen <i>Hsp70</i>	58
7.3.1 Relación de la infección por el virus OsHV-1 y la expresión de <i>Hsp70</i> ..	59
7.3.2 Relación genotipo-nivel de expresión de <i>Hsp70</i> -estación climática.....	59

VIII. CONCLUSIONES.....	62
IX. RECOMENDACIONES.....	63
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	85

Resumen

Las HSP70 son proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en una gran cantidad de especies animales y vegetales y están consideradas dentro de las más conservadas en la naturaleza, tanto en su secuencia como en su función. Las mismas, forman parte la respuesta de distintos organismos ante estrés por temperatura y patógenos, entre otros. En algunas especies, las variaciones en la secuencia del gen codificante de HSP70 tienen como resultado una expresión diferencial intra-específica del mismo y con ello diferencias en la capacidad de termo-tolerancia de cada individuo. En *Crassostrea gigas*, cuyo cultivo es una importante actividad económica en México, esto no ha sido estudiado. Con el fin de tratar de encontrar una asociación entre genotipos y el nivel de expresión de este gen, se colectaron 120 especímenes de ostión japónes *Crassostrea gigas* en la Laguna Costera Santa Cruz a lo largo de un año (30 por cada estación del año). Se tomaron muestras de tejido de branquias, las cuales fueron utilizadas para determinación de patógenos por PCR, secuenciación parcial del gen *Hsp70* y determinación del nivel de expresión del mismo gen por PCR en tiempo real de transcripción reversa (RT-qPCR). Se encontraron 31 genotipos, 239 sitios polimórficos y 34 sitios de heterocigosis. Se determinó que existe una marcada variabilidad genética en la secuencia que codifica para la proteína HSP70 de *Crassostrea gigas*.

Abstract

The HSP70 proteins are widely distributed among several animal and vegetal species, and they are considered among the most conservative proteins in nature, they play an important role in the response elicited through several kinds of stress, as temperature and pathogens. In some species, the variations in the sequence of the gene encoding HSP70 result in intra-specific differential expression, and therefore there are differences in thermo-tolerance at individual level. *Crassostrea gigas* farming activity is important for the northwest Mexican coasts; but high mortalities occurring causing severe epizooties due to probably the high water temperatures. Due to this, there is necessary to know the response by stressors that permits incorporating better strategies for culturing practices. In order to find an association between genotypes and the expression level of this gene, 120 specimens of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* were collected in Santa Cruz Coastal Lagoon over one year (30 per season year). A PCR analyses were done on gill tissue samples for pathogens analyses ; also partial sequencing of *Hsp70*, and determination of the expression level were done by RT-qPCR. For the culture oyster in Sonora, México, the results indicates that *C. gigas* has 31 genotypes, 239 polymorphic sites and 34 heterozygotic sites . A significantly higher expression of this gene was observed only in summer also only one genotype had demonstrated an association with a given level of expression of the *Hsp70* gene. It is concluded that *C. gigas* resulted in a marked genetic variability in the sequence of the gene that encodes the protein HSP70.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Factores que inducen la expresión de proteínas de choque térmico. Distintos factores externos pueden desencadenar la síntesis de proteínas HSP, incluyendo los procesos celulares normales. Modificado de Malyshev (2013).....	14
2	Estructura de la proteína HSP70. La estructura de las proteínas HSP70 está conformada por 3 dominios con funciones específicas, el dominio C-terminal, un dominio N ATPasa, y otro de reconocimiento de sustratos. Tomado de Malyshev (2013).....	17
3	Modelo de activación de la síntesis de HSP70. El complejo inactivo formado por HSP70-HSP40-p23-HSP90 se disocia en presencia de proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos, permitiendo la liberación de HSF, y su posterior trimerización y la subsecuente unión a la región promotora del gen <i>Hsp70</i> (HSE), dando así inicio a la respuesta a estrés térmico. Modificado de Malyshev (2013).....	20
4	Estero Santa Cruz, Sonora. En el lado izquierdo de la imagen se muestra en un recuadro rojo el área de muestreo seleccionado; a la derecha la ubicación geográfica del Estero Santa Cruz.....	26
5	Muestras infectadas con OsHV-1. En el carril “M” se encuentra el marcador de peso molecular. En los carriles siguientes se encuentran las muestras V13, V14, V15, V26, V28, I22 e I24, en ese mismo orden. V es por verano e I es por invierno. En los carriles “POS” se ubican controles positivos, mientras que el carril “NEG” es el control negativo.....	38
6	Muestras analizadas con <i>P. marinus</i> . En el carril “M” se ubica el marcador de peso molecular, le siguen las muestras V25 y V26. El carril “POS” es un control positivo. En el carril “NEG” se encuentra el control negativo.....	38
7	Amplificación por PCR de <i>Hsp70</i> . Carril M: marcador de peso molecular. En los carriles P1-P20, se encuentran las muestras número 1-20 de primavera, en ese mismo orden. En el carril “NEG” se ubica el control negativo.....	40
8	Red de relaciones evolutivas entre genotipos, organizados por estación del año. El número por arriba, o en su defecto a la izquierda, de cada círculo representa el nombre del genotipo. El tamaño del círculo es	

	proporcional al número de individuos que posee el genotipo. Las divisiones dentro de los círculos representan la proporción de individuos con el mismo genotipo presentes en cada estación. La longitud de la línea que une a los genotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que hay entre ellos.....	42
9	Árbol filogenético general. Se utilizó el método UPGMA, con el parámetro Kimura 2, para el trazado del cladograma.....	44
10	Curva estándar del gen <i>Hsp70</i> . De izquierda a derecha se aprecian en orden descendiente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen <i>Hsp70</i>	45
11	Curva de disociación del amplicón diana del gen <i>Hsp70</i> . El amplicón del gen <i>Hsp70</i> se disocia completamente a una temperatura promedio de 77.15 °C.....	46
12	Curva estándar del gen <i>Actina</i> . De izquierda a derecha se aprecian en orden descendiente y por triplicado las curvas de amplificación de las diferentes diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen <i>Actina</i>	47
13	Curva de disociación del amplicón de <i>Actina</i> . La temperatura de disociación completa del amplicón del gen <i>Actina</i> es 78.91 °C.....	47
14	Curva estándar del gen <i>Rpl8</i> . De izquierda a derecha se aprecian en orden descendiente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen <i>Actina</i>	48
15	Curva de disociación del amplicón de <i>Rpl8</i> . La temperatura de disociación del amplicón del gen <i>Rpl8</i> es en promedio de 81.05 °C.....	48
16	Expresión de <i>Hsp70</i> según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.	50
17	Expresión de <i>Actina</i> según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.....	51
18	Expresión del gen <i>Rpl8</i> según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.....	52
19	Expresión de <i>Hsp70</i> ante la infección por OsHV-1. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.....	52

- 20 Red de relaciones evolutivas entre genotipos y nivel de expresión, conforme al criterio M1. Los pasos mutacionales entre cada genotipo están dados por el número a la izquierda, o en su defecto por arriba, de cada línea. Las distancias de 2 o menos pasos mutacionales no se muestran por motivos de diseño. Las divisiones dentro de los círculos representan la relación del número de individuos con el mismo nivel de expresión de *Hsp70*..... 54
- 21 Red de relaciones evolutivas entre genotipos y nivel de expresión, conforme al criterio M2. El número por arriba, o en su defecto a la izquierda, de cada círculo representa el nombre del genotipo. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que posee el genotipo. Las divisiones dentro de los círculos representan la relación del número de individuos con el mismo nivel de expresión de *Hsp70*. La longitud de la línea que une a los genotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que hay entre ellos..... 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tabla 1. Proteínas chaperonas que asisten en el plegamiento de proteínas. Tomado de Henderson y Pockley (2005.....	12
2	Tabla 2. Cantidad de individuos según tipo de heterocigosis por sitio. Los distintos tipos de heterocigosis encontrados se etiquetaron según el código IUPAC para ambigüedades, donde K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = C/G, y Y = C/T.....	41
3	Distribución de genotipos por número de individuos por estación del año.....	43
4	Niveles de expresión del gen <i>Hsp70</i> según el criterio M1. Los niveles de expresión se fijaron según los percentiles 33.3 y 66.6, para cada una de las estaciones del año.....	49
5	Niveles de expresión del gen <i>Hsp70</i> según el criterio M2. Los niveles de expresión se fijaron según los percentiles 33.3 y 66.6, de manera global...	50

I. INTRODUCCIÓN

La aportación de la acuicultura al comercio local e internacional ha aumentado significativamente en las últimas décadas (FAO, 2012), la contribución de esta actividad en cuanto a la generación de ingresos y fuentes de empleo para el desarrollo económico se ha incrementado a nivel mundial (Martínez-Porchas y Martínez-Córdova, 2012). La FAO (2006) reconoce ampliamente la importancia del cultivo de especies para conseguir la seguridad alimentaria de manera global. Además, señala que el abastecimiento de alimento obtenido a través de la captura de organismos marinos para atender la demanda mundial es insuficiente, por lo que presta asistencia a los gobiernos que dependen de ello como medio de vida para alcanzar las metas sociales, económicas y de sostenibilidad ambiental.

El cultivo de especies marinas en zonas costeras es una actividad común en todo el mundo. (FAO, 2012). el ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) ocupa la segunda posición a nivel global (FAO, 2012).

El ostión *C. gigas* es una especie cuyo cultivo se distribuye ampliamente en más de 39 países de Asia, Europa, América y Oceanía. Naciones como Corea, Francia, Estados Unidos de América y Japón, han desarrollado tecnologías eficientes en la producción de semilla y engorda que los ha colocado como los primeros productores a nivel mundial (GIIMB, 2007).

En México, *C. gigas* fue introducido a principios de la década de los años 70's (Paniagua-Chávez y Acosta-Ruiz, 1995). Actualmente, es cultivado en el litoral del Pacífico mexicano, en la región Noroeste del país y dentro del Golfo de California, en los estados de Sonora, Baja California, Baja California Sur (GIIMB, 2007; Ortiz-Arellano y Salgado-Barragán, 2012) en donde se encuentran distintos sistemas lagunares con producciones variables y problemáticas particulares que afectan su rendimiento (Maeda-Martínez, 2008; Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010).

En Sonora, el cultivo de *C. gigas* inició a finales de 1980 y en los últimos años la producción se ha mantenido baja y sin un crecimiento significativo. Aparentemente, esto está

asociado a varios factores, como los altos índices de mortandad periódicos que se comenzaron a presentar a partir del año 1997 (GIIMB, 2007). Estos eventos de mortalidad se relacionaron con efectos provocados por el fenómeno El Niño (ENSO) entre los que figura el aumento de la temperatura (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003).

En los sistemas lagunares establecidos en Sonora para el cultivo de ostión del Pacífico, las variaciones de temperatura interestacionales son abruptas. En particular, en la laguna costera Santa Cruz se presenta una variación térmica promedio máxima y mínima, de 32.4°C y 13.5 °C, en verano e invierno (GIIMB, 2007). Aunado a lo anterior, el tiempo de exposición de los organismos a los rayos solares puede alcanzar las dos horas aproximadamente, en donde los ostiones llegan a alcanzar una temperatura igual a la del medio ambiente, que puede sobrepasar los 40° C.

El cultivo y desarrollo de moluscos bivalvos se ve afectado por diversos factores, como: disponibilidad y calidad del alimento, nivel de exposición a factores ambientales, presencia de patógenos, estado reproductivo, entre otros (Gosling, 2003). Entre los factores ambientales, la temperatura tiene uno de los roles más importantes ya que, además de influir en la distribución de los organismos en el medio, afecta todos los factores biológicos de los mismos, incluyendo la alimentación, reproducción, crecimiento, respiración, osmoregulación e interacciones con patógenos y enfermedades (Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Gosling, 2003; Samain, 2011).

El hábitat del ostión del Pacífico *C. gigas* se encuentra en la zona intermareal por lo que se encuentra expuesto a condiciones de temperatura que varían estacionalmente (Hamdoun *et al.*, 2003). Así, se considera una temperatura de 19 °C como un umbral de riesgo crítico para los ostiones cultivados en Europa, donde se aumenta considerablemente la probabilidad de que los organismos sufran episodios de muerte de verano (Samain, 2011). En Sonora, esta temperatura se excede por aproximadamente 15 °C.

Actualmente, se reconoce que la exposición prolongada a condiciones de estrés térmico, ambientalmente inducido, disminuye significativamente la supervivencia de estos organismos, lo cual tiene consecuencias económicas devastadoras para las actividades pecuarias alrededor del mundo. Las temperaturas extremas provocan, entre otras cosas, daño celular severo, debido a la desnaturalización irreversible de proteínas (Hamdoun *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Farcy *et al.*, 2009).

Las proteínas chaperonas, conocidas genéricamente como proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) están involucradas en distintos procesos celulares, sin embargo tienen un rol importante en el control de calidad del plegamiento de proteínas (Mycko *et al.*, 2008; Silva y Borges, 2011; Corporeau *et al.*, 2012). Entre las HSP, las HSP70 tienen una masa molecular aproximada de 70 kDa, resultan especialmente interesantes debido a que son altamente conservadas en diversas especies de organismos, desde procariotas hasta humanos (Colson-Proch *et al.*, 2010; Kawabe y Yokoyama, 2011; Park *et al.*, 2012; Penarossa *et al.*, 2012; Wojstasik y Wisnik, 2012). Además, se ha demostrado que estas forman parte de la primer respuesta ante estrés térmico (Hamdoun *et al.*, 2003; Selvakumar y Geraldine, 2005).

Para poder sobrevivir, los organismos deben de ser capaces de adaptarse a cambios ambientales. En el caso de las especies marinas, existe una amplia gama de factores que afectan el medio acuático, como temperaturas extremas, cambios de pH, exposición a contaminantes, entre otros. Se considera que la temperatura es uno de los factores con mayor importancia ya que tiene un gran efecto en diversos aspectos, por ejemplo la tasa metabólica, crecimiento, reproducción, migración, entre otros, en el caso de los moluscos bivalvos que habitan en la zona intermareal, este elemento físico es uno de los de mayor importancia (Samain, 2011).

Reportes recientes han señalado la expresión diferencial intraespecífica de las HSP70 ante estímulos térmicos (Dong *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Kawabe *et al.*, 2011) lo cual se ha asociado a la existencia de polimorfismo en el gen *Hsp70* de distintas especies (Campbell y Narum, 2008; Bernabucci *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Así, se ha reportado que el extremo 3' del gen *Hsp70* concentra una mayor cantidad de sitios polimórficos (Ravaux *et al.*, 2007; Montero-Barrientos *et al.*, 2008; Bernabucci *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011) lo cual podría estar relacionado con la termo-tolerancia intrínseca de cada especie, así como la de los individuos.

Sin duda alguna el cultivo de ostión del Pacífico es de gran importancia para la región, por lo que resulta importante el entendimiento de los mecanismos moleculares que poseen los individuos de esta especie para hacer frente a los diversos estímulos ambientales, a los que están sujetos durante su cultivo, lo cual puede ser de gran ayuda para el sector productivo. Además, mediante la valoración de la respuesta individual ante las condiciones antes citadas, se pueden identificar organismos mejor adaptados a las características ambientales propias de

la región. Esta investigación está orientada a determinar la existencia de una relación entre el nivel de expresión de las HSP70 y un genotipo determinado, lo cual puede ser de utilidad en la selección de un pie de cría, aplicable a un programa de mejora genética.

II. ANTECEDENTES

2.1 Proteínas de Choque Térmico: Características y Aspectos Generales

Las proteínas son moléculas conformadas por aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos y estabilizadas por distintos tipos de enlaces e interacciones. Tanto la estructura terciaria, como la cuaternaria de los polipéptidos les confiere la funcionalidad que las caracteriza (Nelson y Cox, 2008). Estas estructuras pueden ser afectadas por cambios físicos o químicos, como temperatura y pH extremos, que pueden inducir el desdoblamiento de la cadena polipeptídica. Una vez desnaturalizadas, las proteínas pierden toda funcionalidad biológica, pudiendo ser irreversible si estas forman agregados (Li *et al.*, 2007; Farcy *et al.*, 2009; Konermann, 2012).

Por lo general, las especies cuentan con diversos mecanismos para mediar y reparar los daños sufridos por agentes causales de estrés celular. De tal manera que, cuando los especímenes se encuentran bajo dichas condiciones, además de presentar cambios en su comportamiento, se promueve la síntesis de distintas proteínas especializadas encargadas de estabilizar y evitar el desdoblamiento y posterior agregación, de los productos proteicos no propios al mecanismo antes dicho (Tabla 1).

Las proteínas encargadas de reparar el daño por estrés son llamadas proteínas de choque térmico (o HSPs) también consideradas dentro de las chaperonas moleculares (Penarossa *et al.*, 2012). Estas proteínas fueron reportadas por primera vez por Tissieres *et al.* (1974) quienes al exponer larvas de la especie *Drosophila melanogaster* a condiciones extremas de temperatura, observaron que en las glándulas salivales de los especímenes estudiados se producían distintas proteínas que no se encontraban presentes antes del tratamiento.

Las HSP pueden ser sintetizadas por la gran mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, como mamíferos (Basirico *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011), insectos (Bernabò *et al.*, 2011; Zizzari y Ellers, 2011; Calabria *et al.*, 2012), peces (Hoffman *et al.*, 2000; Narum y Campbell 2010; Dalvi *et al.*, 2012), moluscos (Jackson *et al.*, 2011; Zerebecki y Sorte, 2011;

Tabla 1. Proteínas chaperonas que asisten en el plegamiento de proteínas. Tomado de Henderson y Pockley (2005).

Familia	Otros nombres		Función
	Eucariotas	Procariontas	
HSP100	HSP104, HSP78	ClpA/B/X	Desensamble de oligómeros y agregados
HSP90	HSP83, HSP82, Grp94	HtpG	Regula el ensamblado de receptores esteroideos y proteínas de transducción de señales
HSP70	HSC70, Ssal-2, Ssb1-2, BiP, Grp75	DnaK, HSC66	Previene agregado de proteínas desnaturalizadas, y otras
Chaperoninas	HSP60, TRiC, CCT, TCP-1	GroEL, GroES	Secuestrantes de proteínas parcialmente plegadas, en ausencia de otras cadenas plegadoras
HSP40	Ydj1, Sis1, Sec63p, auxilina, zuotina	DnaJ	Promueve la actividad ATPasa de HSP70
Prefoldinas	GimC	Ausente	Previene el agregado cadenas proteicas
Factor activador	Ausente	Presente	Se une a los péptidos conforme emergen de los cromosomas
Calnexina/Calreticulina	Presente	Ausente	Se une a glicoproteínas parcialmente plegadas
Complejo asociado a cadenas nacientes	Presente	Ausente	Se une a los péptidos conforme emergen de los cromosomas

Zerebecki y Sorte, 2011; Lim *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012), equinodermos (Dong *et al.*, 2010) y crustáceos (Ravaux *et al.*, 2007). En todos esos grupos de especies la respuesta al choque térmico es altamente conservada, al igual que la secuencia de los genes que regulan el mecanismo (Kawabe y Yokoyama, 2011; Park *et al.*, 2012; Wojstasik y Wisnik, 2012).

Es importante mencionar que, se han descrito pocas especies que no cuentan con este tipo de respuesta, todas habitan regiones de clima frío extremo. Bosch *et al.* (1988) tras exponer a especímenes de *Hydra oligactis* a temperaturas pre-letales, demostraron que estos no desarrollaron termo-tolerancia, en contraste con *Hydra attenuata*, habitante de aguas más templadas, cuyos individuos son capaces de sobre-expresar proteínas de choque térmico en respuesta a estrés térmico, lo cual se asoció a la poca estabilidad del RNA mensajero de *Hsp70*. Hoffman *et al.* (2000) describieron que los peces de la especie *Trematomus bernachii* no son capaces de sintetizar HSP tras la exposición a altas temperaturas. De igual manera, Clark *et al.* (2008) reportaron la falta de respuesta a estrés térmico por parte de dos especies de invertebrados, *Odontaster validus* y *Paraceradocus gibber*.

Las HSP se clasifican con base a su peso molecular, siendo las más estudiadas la familia de las HSP70. Otras familias de gran importancia son, las HSP40 y HSP90, las cuales en conjunto con las HSP70 presentan un peso molecular de alrededor de 40, 70 y 90 kDa. Estas proteínas y un factor llamado *heat shock factor* (HSF) en células sin estrés, forman un complejo a nivel citosólico, el cual se disocia para dar inicio a la respuesta al choque térmico cuando hay proteínas en proceso de desnaturalización (Tomanek y Somero, 2002).

Existen dos formas en las que las HSP pueden ser expresadas, de manera constitutiva (HSC) o inducida (HSP) (Clark *et al.*, 2008; Witt, 2010; Jackson *et al.*, 2011). Las últimas, son producidas en respuesta a estrés celular agudo (Piano *et al.*, 2002; Farcy *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011) y las primeras son aquellas que se expresan constantemente y están involucradas en una gran cantidad de mecanismos que tienen como fin mantener la homeostasis en distintas células, como la reparación activa de proteínas en proceso de traducción y plegamiento en los ribosomas, así como enzimas y receptores hormonales intracelulares, reparación del citoesqueleto, entre otros (Figura 1) (Roberts *et al.*, 2009).

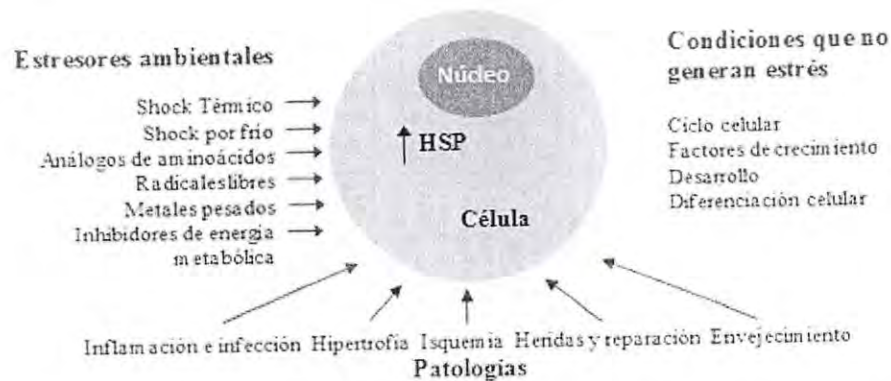


Figura 1. Factores que inducen la expresión de proteínas de choque térmico. Distintos factores externos pueden desencadenar la síntesis de proteínas HSP, incluyendo los procesos celulares normales. Modificado de Malyshev (2013).

Estas proteínas están involucradas en el mecanismo de respuesta ante invasión e infección por parte de patógenos en vertebrados e invertebrados (Roberts *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2012). Además, las mismas tienen funciones inmuno-regulatorias ya que tienen la capacidad de fungir como agente pro-inflamatorio, señal de alerta para el sistema inmune, y activan la secreción de citoquinas. Asimismo, el patrón de expresión de la familia de proteínas HSP puede verse alterado en respuesta a infecciones por patógenos (Hooper *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012). Por ejemplo, Wang *et al.* (2006) observaron una mayor expresión de *Hsp70* y *Hsp90* en especímenes de camarones de la especie *Penaeus vannamei* infectados por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en comparación con individuos sanos. Mientras que, Wei *et al.* (2012) detectaron un patrón de expresión aumentado de estas proteínas en el pez *Miichthys miiuy* infectados con una bacteria del género *Vibrio*.

Lo anterior establece que las HSP son de gran importancia para una gran cantidad de mecanismos vitales para las distintas especies. De ésta manera, el estudio de su expresión a nivel celular puede ayudar a comprender la respuesta de un individuo de una especie dada ante estímulos ambientales diversos y representa una potencial herramienta para el monitoreo de especies de interés comercial, cultivadas a pequeña y gran escala.

2.2 Proteínas de Choque Térmico de 70 kDa

2.2.1 Aspectos generales

Las HSP70 son la familia de proteínas de choque térmico más estudiadas. Esto, debido a que de las distintas HSP existentes, las HSP70 son por lo general las que se expresan en mayor cantidad cuando un individuo se somete a situaciones que desencadenen un mecanismo de respuesta a choque térmico, además de ser de las más altamente conservadas. Farcy *et al.* (2009) encontraron que los niveles de expresión del gen *Hsp70* fueron los de mayor magnitud, en comparación con la expresión de otros genes relacionados con estrés celular, de distintas índoles, cuantificados en *C. gigas* expuestos a estrés térmico.

Se ha sugerido que las HSP70 tienen relación directa con el desarrollo de termotolerancia adquirida. Es decir, una vez que un organismo se ha expuesto a una temperatura subletal, este adquiere la capacidad de poder soportar temperaturas superiores a las que se consideran dentro su rango normal. Según Spriggs *et al.* (2010) es debido a la existencia de remanentes de las HSP70 ya sintetizadas en el interior de las células, incluso cuando ya no se encuentran bajo condiciones de estrés. En estudios recientes, Park *et al.* (2012) observaron que células de *Chlamydomonas*, expuestas previamente a temperaturas subletales, se desarrollaban en condiciones que generaban efectos deletéreos en grupos control.

Diversos investigadores han demostrado que la temperatura de aclimatación tiene un efecto directo en cuanto a la temperatura umbral para la inducción de la síntesis de HSP70, así como la intensidad de la respuesta. De tal manera, los organismos presentarán variaciones con respecto a la expresión del gen *Hsp70* a lo largo del año, dependiendo de la temperatura promedio a la que hayan sido expuestos. Dalvi *et al.* (2012) determinaron que en especímenes del pez *Horabragus brachysoma* aclimatados a distintas temperaturas, presentaban diferencias en cuanto a la intensidad de la respuesta a estrés térmico, siendo muy superior en los sujetos expuestos a una mayor temperatura de aclimatación. También, Farcy *et al.* (2009) reportaron niveles de expresión de *Hsp70* variables en el ostión *C. gigas*, a lo largo de distintas épocas del año, así como de la intensidad de los cambios de temperatura.

Estas proteínas se encuentran en el citosol y en organelos como mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico y otros. En condiciones normales están relacionadas con el plegamiento *de novo* de proteínas. Mientras que bajo estrés térmico cumplen funciones de

contención y reparación de daños. Según Malyshev (2013) dichas proteínas cuentan con 3 dominios que en conjunto se denominan “ciclo ATPasa”; el dominio N ATPasa (DNATP) que hidroliza ATP; dominio de reconocimiento de sustrato (DRS) que sirve para anclar proteínas; dominio C terminal (DCT) que provee una “tapa” para el dominio ligador de sustrato (Figura 2). De acuerdo con Richter *et al.* (2010) además de que su actividad es dependiente del ATP, también es regulada por la interacción con cofactores como la familia HSP40/Proteínas J.

2.2.2 Función en condiciones fisiológicas

Bajo condiciones fisiológicas, las HSP70 junto con otras proteínas encargadas de asistir las, llamadas co-chaperonas (CoCH), tienen la función de mantener la homeostasis proteica al interior celular, ya que no es necesario entrar en estrés térmico para que existan proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos al medio (Malyshev, 2013). Durante el proceso de traducción, existe una asociación de las HSP40 con las áreas hidrofóbicas de polipéptidos sintetizados en los ribosomas, para posteriormente unirlos al DRS de las HSP70. Ulteriormente, se da un incremento de la afinidad del DRS por la parte hidrofóbica del polipéptido debido a la hidrólisis de ATP mediado por la interacción de la HSP70 con el DNATP. Al mismo tiempo, hay un cambio conformacional en DCT, de tal manera que protege los sitios hidrofóbicos de la proteína, logrando así estabilizarla (Malyshev, 2013).

La mayoría de las proteínas forma una estructura compacta y altamente ordenada en solución con pH cercano a neutral, sin la presencia de desestabilizantes, y a temperaturas moderadas, (Koner mann, 2012). Sin embargo, al interior celular las condiciones son muy distintas, debido a que existen una gran cantidad de moléculas capaces de interactuar con las proteínas desplegadas. Una vez estabilizada la proteína, el factor de intercambio de nucleótidos (NEF) promueve la regeneración del ATP unido a DNATP, provocando, nuevamente, cambios conformacionales en el DRS de HSP70 provocando la liberación del sustrato. Por lo que, una vez liberado el sustrato se da el plegado de este, evitando de esta

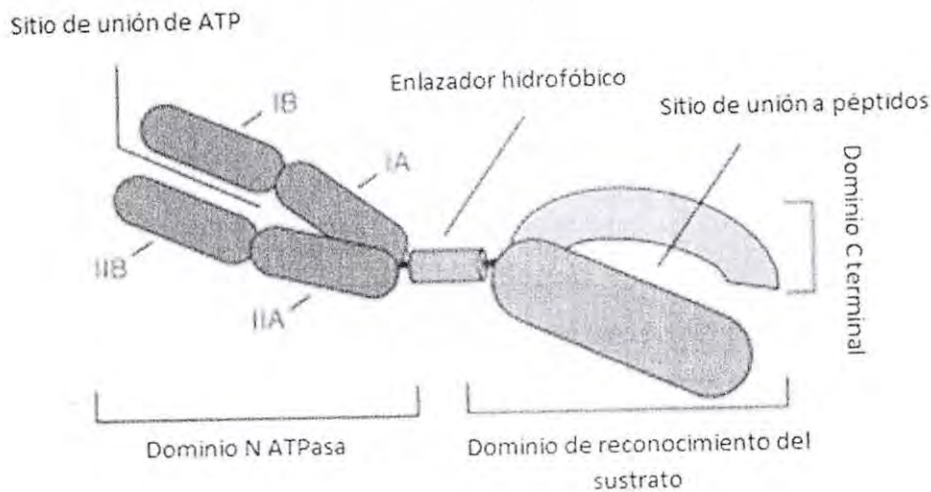


Figura 2. Estructura de la proteína HSP70. La estructura de las proteínas HSP70 está conformada por tres dominios con funciones específicas el dominio C-terminal, un dominio N ATPasa, y otro de reconocimiento de sustratos. Tomado de Malyshev (2013).

manera interacciones previas a la síntesis completa del mismo y, por consiguiente, evitando la formación de agregados (Malyshev, 2013; Willmund *et al.*, 2012).

Las HSP70 junto con CoCH forman el mecanismo de plegado de proteínas y proveen transporte a proteínas al interior de organelos. Además, las HSP70, asistidas por las proteínas antes dichas, reconocen proteínas dañadas irreversiblemente y las marcan con una molécula de ubiquitina para posteriormente ser enviadas a proteasomal. También, las HSP40 entregan las proteínas diana a las HSP70 y estimula la hidrólisis del ATP. Así mismo, el complejo HSP70/HSP90, en conjunto con otras co-chaperonas, reconocen las proteínas normales que contienen la secuencia marcadora KFPRQ y las envían a los lisosomas para su degradación (Malyshev, 2013).

2.2.3 Síntesis de las proteínas HSP70 en respuesta ante estrés térmico

El mecanismo de respuesta a estrés celular térmico de *C. gigas* implica la rápida síntesis de HSP70 en su forma inducida. El cual, tiene como fin la protección celular mediante la estabilización de proteínas en proceso de desnaturalización, además de participar en

procesos de resistencia adquirida, incluyendo la termo-tolerancia (Boutet *et al.*, 2003; Farcy *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2011).

Los cambios abruptos en las condiciones térmicas pueden generar distintos tipos de daño al sistema de organismos vivos. La exposición de organismos a condiciones rápidas de fluctuación térmica, fuera del intervalo específico de temperatura de soporte, se denomina choque térmico (Nollen y Morimoto, 2002). En relación a lo anterior, cuando la temperatura corporal de especies homeotermas excede los límites para la actividad metabólica normal, se tiene como resultado una carga total de calor que excede su capacidad de disipación, se promueven respuestas fisiológicas y de comportamiento, que tienen como fin reducir posibles daños. Lo anterior, según Bernabucci *et al.* (2010) y Nollen y Morimoto (2002) es denominado respuesta a choque térmico. En el caso de especies de invertebrados marinos que no regulan temperatura, el resultado es deletéreo, o letal.

Durante períodos de estrés térmico existe una disminución de la tasa metabólica de los animales, con ello también decrece la tasa de síntesis de proteínas constitutivas encargadas de mantener la homeostasis durante condiciones normales (que no induzcan a estrés). Esto podría provocar la degradación de componentes esenciales para la viabilidad celular. Lo anterior, según Spriggs *et al.* (2010) mencionan que se debe a la inhibición global de la síntesis de proteínas, o bien detienen los procesos de traducción proteica

La respuesta a choque térmico se caracteriza por la inducción rápida de la síntesis de distintas proteínas encargadas de reparar daños sufridos a nivel celular y ante la ausencia o disminución de las proteínas constitutivas se encargan de mantener la homeostasis en el interior de las células. Entre las proteínas encargadas de reparar este daño se encuentran las HSP, la metalotioneina, la glutatión S-transferasa sigma, y la superóxido dismutasa, entre otras (Farcy *et al.*, 2009), las cuales expresarse ante condiciones de estrés son de vital importancia para la supervivencia de distintos organismos después de ser expuestos a estrés térmico.

Uno de los principales daños sufridos a causa de temperaturas extremas se debe a la desnaturalización y posterior agregación irreversible, de proteínas. Por lo general y bajo condiciones no estresantes, las HSP encargadas de interactuar de manera inmediata con las proteínas en procesos de desnaturalización se encuentran formando un complejo inactivo (HSCI) a nivel citoplásmico, formado por el monómero HSF, el complejo HSP90-p23-inmunofilina, HSP70 y HSP40. Sin embargo, Malyshev (2013) menciona que la presencia de

proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos, causa que el HSCI se disocie y da inicio la respuesta a choque térmico (Figura 3).

Una vez disociado el complejo antes citado, se da inicio a la síntesis de la HSP70, y las demás proteínas citadas. Así, el HSF forma un complejo en forma de homotrímero compuesto por HSFs provenientes de otros HSCI. Posteriormente, el trímero de HSF interactúa específicamente con la región promotora del gen *Hsp70*, llamado *heat shock element* (HSE). Además, en la región del promotor se encuentra la denominada caja TATA, que es reconocida como punto de inicio para que la enzima RNA polimerasa recorra la secuencia del gen hasta encontrar el codón de inicio (Verghese *et al.*, 2012; Malyshev, 2013). Por último la HSP70 es sintetizada por la maquinaria ribosomal, siendo esto posible debido que el mRNA del gen *Hsp70* tiene una región de reconocimiento al interior del ribosoma, por lo que puede utilizar un sistema alternativo de transcripción (Yueh y Schneider, 2000; Spriggs *et al.*, 2010).

2.2.4 Polimorfismo del gen *Hsp70*

La función de las proteínas depende de la estructura de estas a su vez de la secuencia del gen que la codifica (Nelson y Cox, 2008). De tal manera, cada una de ellas tiene una función única, conferida por su estructura nativa. La última es dada, en gran medida, por la secuencia de aminoácidos de la proteína misma (Nelson y Cox, 2008). Además, se sabe que existen proteínas que varían su secuencia de aminoácidos, en algunos casos, sin afectar la actividad de estas debido a que existen aminoácidos que poseen propiedades similares entre sí (Swynghedauw, 1998; King, 2000). Los cambios en la secuencia de nucleótidos de un gen codificante para un tipo de proteína en particular, intra o inter-específicamente y que cuenta con una frecuencia significativa a lo largo de la población es lo que se denomina polimorfismo genético (King, 2000).

La existencia de sitios polimórficos en la secuencia de un gen en específico puede tener distintos tipos de repercusiones. Por ejemplo, se pueden generar cambios de aminoácidos con determinada carga, por otros con carga distinta, cambiando así la estructura de la proteína y su funcionalidad, pudiendo llegar a perder toda actividad. O bien, la inserción, o eliminación de una base nitrogenada puede dar pie a la formación de codones de alto, provocando la síntesis incompleta del polipéptido (Liu *et al.*, 2001). Por otra parte, considerando el hecho de que el

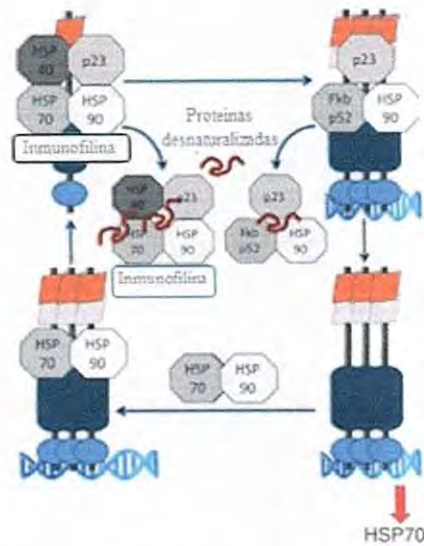


Figura 3. Modelo de activación de la síntesis de HSP70. El complejo inactivo formado por HSP70-HSP40-p23-HSP90 se disocia en presencia de proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos, permitiendo la liberación de HSF, y su posterior trimerización y la subsecuente unión a la región promotora del gen *Hsp70* (HSE) dando así inicio a la respuesta a estrés térmico. Modificado de Malyshev (2013).

cambio de aminoácido no modifique en gran medida la estructura proteica y no afecte su funcionalidad, pueden ocurrir cambios en la fuerza de enlace de la misma e inducir modificaciones estructurales al formar complejos con sustratos, lo que puede disminuir o incrementar su afinidad (Sauna *et al.*, 2007). Todo lo anterior dependerá de la región en donde se encuentren los sitios polimórficos antes citados.

Actualmente, se considera que los genes *Hsp70* de diferentes especies son altamente conservados. Por ejemplo, la única HSP70 de *Escherichia coli* tiene, aproximadamente, un 50% de identidad en comparación con las secuencias reportadas en células eucariotas de organismos superiores. Sin embargo, en diversas investigaciones se han encontrado sitios polimórficos en la secuencia de dicho gen. Narum y Campbell (2010) encontraron la existencia de sitios polimórficos tanto en el gen *Hsp70* como en el *Hsc71* de tres especies de salmones del género *Oncorhynchus*. Por su parte, Kang *et al.* (2011) determinaron la

existencia de sitios de polimorfismo simple en el pepino de mar *Apostichopus japonicus*. Asimismo, Valenzuela-Muñoz *et al.* (2013) hallaron la presencia de sitios polimórficos en el abulón *Haliotis rufescens*.

Intraespecíficamente, existe una expresión diferencial de las HSP70 ante estímulos térmicos (Tine *et al.*, 2010). Esto se ha asociado a la existencia de polimorfismo en los genes *Hsp70* de distintas especies (Bernabucci *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Dong *et al.* (2010) encontraron diferencias significativas en la expresión de *Hsp70* en diferentes variedades de *A. japonicus*. De manera similar, Basiricò *et al.* (2011) observaron la misma relación en especímenes de ganado Holstein occidental.

Además de la modificación de la estructura proteica, los cambios en la secuencia de ciertas regiones de un gen pueden tener distintas consecuencias si los sitios polimórficos se ubican en regiones cis-reguladoras se afecta directamente la tasa de expresión del gen (Narum y Campbell, 2010). Se ha comprobado que variaciones en las regiones 5'- o 3'- modifican la estabilidad del mRNA del gen *Hsp70* (Dong *et al.*, 2010). Por lo tanto, la presencia de determinados fenotipos supondría una ventaja ante condiciones de estrés para los individuos portadores del genotipo responsable de los primeros.

Las HSP70 cuentan con 3 dominios. Se considera que el dominio sitio N- terminal, o bien con actividad ATPasa, es altamente conservado a través de diferentes taxas, mientras que en los dos restantes se ha observado una variabilidad mayor (Liu *et al.*, 2010). Se ha sugerido que las variaciones presentes en la región 3' del gen antes citado podrían determinar diferencias interespecíficas en cuanto a termotolerancia se refiere. Li *et al.* (2010) identificaron mutaciones en la región 3' del gen y su relación con la termotolerancia individual de especímenes de ganado Holstein oriental. En contraste, Bernabucci *et al.* (2010) determinaron que la presencia de polimorfismo en la región 5'- UTR se encuentra asociada con la termotolerancia en ganado Holstein italiano.

En distintas especies, se han identificado interacciones entre determinados sitios polimórficos en las secuencias de diferentes genes, y el nivel de expresión de los mismos. Fuke *et al.* (2001) reportaron que la presencia de sitios polimórficos en la región 3'-UTR del locus DAT1, el cual codifica el transportador de dopamina en humanos, tiene una relación directa con la magnitud en la que se expresa dicho gen, donde la presencia de un alelo con 10 repeticiones en tándem, en la región antes citada, era causal de una mayor expresión que otros

3 genotipos. También, Basiricò *et al.* (2010) determinaron que la existencia de sitios variables, localizados en las bases 895 y 1128 del gen *Hsp70* de ganado Holstein italiano, se encuentra asociada a una regulación a la alza del gen, así como la síntesis de HSP70. De forma similar, Russell *et al.* (2004) señalan que los niveles basales de los genes codificantes de la Proteína C reactiva y el Componente amiloide P sérico, se ven afectados por la presencia de dos sitios polimórficos en los genes CRP1, CRP2 y CRP4.

Por tanto, la evaluación de la presencia de sitios polimórficos en la secuencia del gen *Hsp70*, así como el posible impacto que esto podría tener sobre la expresión de este gen, no ha sido llevada a cabo en *C. gigas*. Por lo tanto, su estudio puede ayudar al entendimiento de las diferencias intrínsecas en cuanto la expresión de las proteínas HSP70, así como esclarecer la importancia que esto representa para la especie.

III. HIPÓTESIS

Si en las lagunas costeras del Golfo de California ocurren variaciones en los patrones estacionales de temperatura, entonces la expresión del gen que codifica la proteína de choque térmico HSP70 del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* se modificará diferencialmente dependiendo de genotipos particulares.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Relacionar el polimorfismo del gen *Hsp70* de *Crassostrea gigas* con sus niveles de expresión estacional.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar el número de genotipos posibles del extremo 3' del gen *Hsp70* de *Crassostrea gigas*.
- Evaluar los niveles de expresión del gen que codifica la proteína HSP70 en *C. gigas* en diferentes estaciones climáticas.
- Establecer la relación entre genotipos y niveles de expresión del gen *Hsp70* en los organismos analizados.
- Evaluar diferencias en la expresión del gen *Hsp70* entre especímenes de *C. gigas* naturalmente infectados por distintos patógenos y no infectados.

V. METODOLOGÍA

5.1 Descripción del área de muestreo

La Laguna Costera La Santa Cruz se encuentra ubicado a una distancia de 110 Km de la ciudad de Hermosillo, presenta varios rasgos orográficos característicos: El área comprendida desde el límite norte hasta la parte central de la misma, está conformada por sedimentos de bajada con lomerío, colindando con un área de llanura deltaica salina. El límite sureste de la laguna está formado por sierra escarpada compleja. Además, la región este, donde se encuentra la boca de la laguna costera Santa Cruz, se encuentra una larga extensión de playa arenosa. Por otra parte, el fondo de la misma, se encuentra mayormente compuesto por sustrato lodoso y arena, a excepción de la boca (GIIMB, 2007).

El clima es muy seco, , durante el mes de enero la temperatura promedio oscila entre los 6 y 20 °C . Mientras que en agosto se presentan temperaturas mínimas y máximas promedio de 24 y 34 °C, en ese mismo orden, siendo en verano donde se presenta una mayor diferencia de temperaturas. En cuanto a la precipitación, esta alcanza una cantidad promedio de 122 mm, cuyo límite superior se da en agosto, y el inferior en mayo. Por otra parte, el mayor volumen de agua que se pierde por evaporación se da en junio, y el menor en diciembre; en el primer caso se registran valores de 8 mm/día, y en el segundo 2 mm/día. La evaporación anual total es de 1900 mm (GIIMB, 2007).

5.2 Muestreo

Se llevaron a cabo cuatro muestreos durante el año en la laguna costera Santa Cruz, uno por cada estación. En cada muestreo se colectaron 30 individuos de *Crassostrea gigas* del cultivo comercial en canastas suspendidas (Castro-Longoria *et al.*, 2013). En la Unidad



Figura 4. Estero Santa Cruz, Sonora. En el lado izquierdo de la imagen se muestra en un recuadro rojo el área de muestreo seleccionado; a la derecha la ubicación geográfica del Estero Santa Cruz.

Experimental Kino del DICTUS se sacrificaron los organismos y con material de disección estéril se extrajo una sección de branquias, las cuales fueron divididas en dos partes e inmediatamente preservadas por separado. Una sección se preservó en tubos estériles de 1.7 mL conteniendo 5 volúmenes de RNAlater (Qiagen) o en su defecto en TRIzol (Life Technologies). Asimismo, la otra sección se almacenó en otro tubo conteniendo etanol $\geq 95\%$. Cada una de las muestras se etiquetó según la estación del año en que se realizó el muestreo correspondiente, de tal forma se utilizó un código de etiquetado compuesto por la primera letra de la estación en que se recolectó la muestra, seguido del número de la misma; “V” para verano, “P” para primavera, “I” para invierno y “O” para otoño. Posteriormente, las muestras se transportaron a Hermosillo en hielo tipo escarcha y en el Laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS las muestras preservadas en Trizol o RNAlater se almacenaron a -80°C , mientras que las conservadas en etanol se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.3 Determinación de Patógenos

Para realizar la determinación de la infección por patógenos en los organismos muestreados primeramente se llevó a cabo la extracción del ADN de cada muestra, el cual se utilizó para la detección por medio de PCR de los protozoarios *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus*, así como de Herpes Virus de Ostreidos 1 (OsHV-1 por sus siglas en inglés).

5.3.1 Extracción de ADN

A partir de la muestra preservada en alcohol etílico y previa descongelación, se utilizó el juego de reactivos de extracción comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) según las indicaciones del proveedor. Brevemente, se colocaron 15-20 mg de tejido en un tubo de 1.5 mL con 80 μ L de PBS y cada muestra se homogeneizó mecánicamente. A continuación, se añadieron 100 μ L de buffer ATL y 20 μ L de proteinasa K a las muestras, se mezclaron por medio de *vortex* y se centrifugaron brevemente para bajar cualquier gota que pudiera estar en las paredes de los tubos. Después, las muestras se incubaron durante 15 horas a 56 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron nuevamente como se describió anteriormente, luego se agregaron 200 μ L de búfer AL y se mezcló para después incubar a 70° C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de etanol al 96% y se mezcló durante 15 s.

Después se transfirieron las muestras individualmente a una columna con un tubo colector y se centrifugaron a 6,000 \times g por 1 minuto. Enseguida, se cambiaron las columnas a un tubo colector limpio y se descartó el tubo con el líquido filtrado. Entonces, se agregaron 500 μ L de búfer AW1 y se centrifugó a 6,000 \times g por 1 min. De nueva cuenta, se cambiaron las columnas a un tubo colector limpio y se descartaron los tubos con el líquido filtrado. Una vez puestas las columnas en un tubo limpio, se agregaron 500 μ L de búfer AW2 y se centrifugó a 20,000 \times g por 3 min. Ulteriormente, se colocaron las columnas en microtubos de 1.5 mL y se agregaron 200 μ L de búfer AE. Seguido a esto, las muestras se centrifugaron a 6,000 \times g por 1 min, finalmente, se almacenaron a -20° C.

5.3.2 Diagnóstico de patógenos

Para cada uno de los patógenos se analizaron 15 organismos por estación (n = 60). Todas las reacciones de PCR para la detección de los patógenos con *PuRe Taq Ready-to-Go PCR beads* (GE Healthcare) en reacciones de 12.5 μ L. Los productos de PCR fueron visualizados en electroforesis con geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de Etidio.

5.3.2.1 *Marteilia refringens*

La detección del protozoario *M. refringens* se llevó a cabo mediante PCR anidado del espaciador intergénico (IGS) entre genes de ARN ribosomal (rRNA). Lo cual se realizó mediante los oligos propuestos por López-Flores *et al.* (2003) para una reacción anidada. Los oligos para la primera reacción fueron MT-1: 5'-GCC-AAA-GAC-ACG-CCT-CTA-C-3', MT-2: 5'-AGC-CTT-GAT-CAC-ACG-CTT-T-3', y para la reacción anidada fueron: MT-1B: 5'-CGC-CAC-TAC-GAC-CGT-AGC-CT-3' y MT-2B: 5'-CGA-TCG-AGT-AAG-TGC-ATG-CA-3'. Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, la extensión final fue de 72 °C por 10 min. Para la reacción anidada se usó 1 μ L del primer PCR y con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, la extensión final fue de 72 °C por 5 min. El tamaño esperado de amplicón es de ~350 pb.

5.3.2.2 OsHV-1

La detección de herpes virus de ostreidos 1 (OsHV-1) se hizo por medio de los oligos propuestos por Arzul *et al.* (2001) C2: 5'- CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3' y C6: 5'- GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'. Se utilizó 100 ng de ADN genómico (gDNA), 1 μ L (10 pM) de cada oligo y agua para el volumen final de 12.5 μ L. Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 45 s y 72 °C por 30 s, la extensión final fue de 72 °C por 10 min. El tamaño de banda esperado es de ~723 pb.

5.3.2.3 *Perkinsus marinus*

Para la detección del protozoario *P. marinus* se realizó una amplificación específica del espaciador transcrito interno (ITS) del complejo de genes de ARN ribosomal (rRNA) por medio de PCR. Se emplearon los iniciadores Perk-ITS85: 5'-CCG CTT TGT TTG GAT CCC-3' y Perk-ITS600R: 5'-CGA GTT TGC GAG TAC CTC KAG AG-3' (Casas *et al.*, 2002; Audemard *et al.*, 2004; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010). La reacción se realizó a partir de 100 ng de ADN, 1 μ L (10 pM) de cada oligo y agua para el volumen final de 12.5 μ L. Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, la extensión final fue de 72 °C por 7 min. El tamaño de amplicón esperado es de ~475 pb.

5.4 Síntesis de cDNA

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se realizaron varios pasos. Primeramente se llevó a cabo la extracción del ARN de cada una de las muestras, cada extracto se etiquetó y se almacenó, después se llevó a cabo la determinación de la concentración de cada uno de estos extractos. Posteriormente se realizó la digestión del ADN genómico total y se evaluó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. A continuación, se sintetizó el cDNA a partir de cada uno de los extractos de ARN

5.4.1 Extracción de ARN

Las muestras preservadas en RNAlater se descongelaron, y posteriormente se transfirieron a un nuevo tubo de 1.7 mL, donde 50-100 mg de tejido de cada muestra se homogeneizaron manualmente en 1 mL de TRIzol. Las muestras preservadas en TRIzol, se homogeneizaron directamente en el tubo y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se les agregó 200 μ L de cloroformo. Las muestras se agitaron manualmente por 15 segundos y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se centrifugaron a 12,000 \times g por 15 minutos a 4 °C y al concluir, la fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio y se le agregaron 500 μ L de 2-propanol y se mezcló suavemente, para dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las muestras se centrifugaron nuevamente a 12,000 \times g por 10 minutos a 4 °C. A continuación, se retiró el sobrenadante por decantación y a cada muestra se le agregó 1 mL de etanol al 75%.

Las muestras se centrifugaron nuevamente a $7,500 \times g$ por 5 minutos a 4°C , y el alcohol se retiró invirtiendo el tubo, se secaron por 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se les agregó 100 μL de agua DEPC y se almacenaron a -80°C .

5.4.2 Determinación de la concentración de ARN

La determinación de la concentración de las muestras de ARN se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm. Se utilizó 1 μL de muestra y cada muestra se evaluó por triplicado.

5.4.3 Digestión de ADN genómico total

A 10 μg de ARN de cada muestra se le agregaron 5 μL de $10\times$ *Incubation Buffer* (Roche) y 2 μL de *DNase MagNA PureCompact recombinant, RNase-free* (Roche) y cada muestra se llevó a un volumen total de 50 μL adicionándole el volumen adecuado de agua DEPC. Las muestras se incubaron a 37°C por 20 minutos y posteriormente se les agregaron 2 μL de 0.2 M EDTA (pH 8.0) y se incubaron a 72°C por 10 minutos, para detener la reacción. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C .

5.4.4 Evaluación de la integridad del ARN

Se seleccionó un total de 44 muestras al azar del ARN extraído y se cargaron 11 μL , con una concentración aproximada de 0.136 μg de ARN, de cada una en un gel marca E-Gel® EX Agarose Gel (Life Technologies) desnaturalizante de agarosa al 2%. Las muestras se visualizaron en un fotodocumentador marca Gel Doc EZ System (Bio Rad) con luz ultravioleta. La calidad de los extractos se determinó con base a la existencia o ausencia de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S.

5.4.5 Retrotranscripción

La síntesis de cDNA a partir de ARN de las muestras se realizó por medio del juego de reactivos *Quantitect Reverse Transcription* (QIAGEN). Previo descongelamiento, se tomó el volumen necesario de cada una de las muestras, equivalente a 1 μg de ARN y a cada tubo se le añadieron 2 μL de $7\times$ *gDNA Wipeout Buffer*. Posteriormente, el volumen de la reacción se ajustó a 14 μL con agua libre de RNasas. Las muestras se incubaron a 42°C por 10 min y una

vez transcurrido este tiempo se pusieron en hielo. Posteriormente, a cada muestra se le añadió 1 µL de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 µL de *Quantiscript RT Buffer*, y 1 µL de RT Primer Mix, después se procedió a incubar a 42 °C por 15 min. Finalmente, las muestras se incubaron a 95 °C por 3 min. y al concluir se almacenaron a -20°C.

5.5 Variabilidad Genética

Para identificar polimorfismos en la región más próxima al extremo 3' del gen *Hsp70* se amplificó, por PCR, el segmento de interés a partir de cDNA. Se utilizaron los oligos específicos 6: 5'-GCT-GTT-GCT-TAT-GGA-GCA-GCT-GT-3' y 5: 5'-TCG-ACC-TCC-TCA-ATG-GTG-GGT-CC-3' reportados previamente por Boutet *et al.* (2003) que deberán generar un amplicón de aproximadamente 850 pb. La amplificación se realizó el juego de reactivos *Ready-to-Go PCR beads* (GE Healthcare), se adicionaron 100 ng de cDNA y 2 µL de cada oligo (10 pM) hasta alcanzar un volumen final de 25 µL. Las condiciones de reacción fueron: un ciclo inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 59 °C por 2 min y 72 °C por 55 s, por último 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las muestras se corrieron en electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2%, que se tiñó con bromuro de etidio, o con GelRed (Biotium). Finalmente, los productos se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a la empresa Macrogen.

Las secuencias se editaron en ChromasPro v 1.7.6 y se alinearon con MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) tomando como referencia a la secuencia AF144646 (Gourdon *et al.*, 2000) para la búsqueda de polimorfismos. Se excluyeron, los sitios de heterocigosis fueron sustituidos de acuerdo al código de ambigüedades de la IUPAC (K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = C/G, y Y = C/T). En el último software citado, también se llevó a cabo el trazado de un cladograma con el método UPGMA con el parámetro Kimura 2 para poder determinar la relación entre los genotipos presentes en la muestra, además se calculó la razón de transición/transversión. Posteriormente, se usó el software Network 4.6.1.2, donde se sustituyeron los sitios de heterocigosis para trazar la una red de relación evolutiva. Finalmente, para identificar los sitios polimórficos y genotipos se utilizó el paquete de DnaSP V5 (Librado y Rozas, 2009).

Se excluyeron un total de 26 muestras de los análisis filogenéticos debido a la mala calidad de on en el análisis. Además, debido a la alta ambigüedad de los extremos de las secuencias recibidas se redujo región estudiada del gen *Hsp70* a 586 pb, ubicada en la región comprendida desde la base 1346 a 1931 de la extensión total del gen en cuestión.

5.6 Cuantificación de la Expresión del Gen *Hsp70*

Del cDNA sintetizado se eligió una muestra al azar para amplificar la región de interés de los genes *Hsp70*, *Actina* y *Rpl8*. Cada amplicón se purificó y se cuantificó, después se prepararon diluciones seriadas para cada uno de los genes y se obtuvieron curvas estándar por medio de PCR de tiempo real. A partir del cDNA de cada muestra y se amplificaron por triplicado cada uno de los genes *Hsp70* y *Actina* y se comparó por separado cada una de las mismas con un estándar perteneciente a la curva estándar correspondiente a cada gen para obtener la cantidad de transcritos del gen/ μL . En cuanto al gen *Rpl8*, se seleccionaron 7 muestras de cada estación y se amplificaron por triplicado, para finalmente compararlos con su curva estándar correspondiente a este gen. Los genes *Actina* y *Rpl8* se amplificaron con el objetivo de utilizarlos para normalizar los datos de expresión del gen *Hsp70*. A partir de los resultados obtenidos se establecieron dos criterios para evaluar la magnitud de la expresión del gen *Hsp70*.

5.6.1 Curva estándar del gen *Hsp70*

Para obtener el amplicón de *Hsp70* necesario para realizar una curva estándar, se utilizaron los oligos Hsp70F: 5'-AGC-AAG-CCA-GCA-CAG-CA-3' y Hsp70R: 5'- GCG-ATG-ATT-TCC-ACC-TTC-3', reportados previamente por Farcy *et al.* 2009, los cuales generan un producto de 92 pares de bases (pb). La amplificación se realizó por triplicado usando el juego de reactivos *Ready-to-Go PCR beads* (GE Healthcare) y se adicionaron 100 ng de cDNA de una muestra elegida al azar, y 2 μL de cada oligo (10 pM) hasta alcanzar un volumen final de 25 μL . Las condiciones de reacción fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 63 °C por 15 s y 72 °C por 30 s, posteriormente se realizó un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. A continuación, se verificó la presencia de una sola banda 92 pb, por medio de electroforesis en

gel de agarosa al 2 % y se tiñó con GelRed (Biotium). El producto de amplificación se envió a secuenciar en ambos sentidos a la empresa MacroGen, ubicada en Corea del Sur.

La purificación de los productos de PCR correspondientes a cada uno de los genes de los que se realizó una curva estándar se realizó de la siguiente forma: Se purificó el producto de PCR mediante el *Illustra GFX PCR DNA Gel and Purification Kit* (GE Healthcare), para lo cual se añadieron 500 μL de buffer de captura tipo 3 y 75 μL de muestra a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se mezcló y se centrifugó brevemente. Esta mezcla se depositó en una columna *GFX MicroSpin*, a su vez la columna se colocó en un tubo colector y se centrifugó a $16,000 \times g$ por 30 s, se descartó el líquido colectado. Luego, se agregaron 500 μL de buffer de lavado tipo 1 en la columna y se colocó la misma de vuelta en el tubo colector, y se centrifugó a $16,000 \times g$ por 30 s y se descartó el líquido eluido. Después, se añadieron 28 μL de buffer de elución tipo 4, se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL estéril y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente, seguido de una última centrifugación a $16,000 \times g$ por 1 min. Finalmente se determinó la concentración del producto de PCR purificado usando un NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm, se etiquetó y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. citada.

Para la preparación de las diluciones necesarias, se añadieron 45 μL de agua estéril a 8 tubos de 0.2 mL, y se etiquetaron. Posteriormente se agregaron 5 μL del producto de PCR purificado a uno de los tubos y se mezcló 5 segundos por *vortex*. La cantidad de copias por μL se realizó utilizando la siguiente fórmula: $\text{Número de copias} = (\text{concentración} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}) / (\text{longitud del amplicón} * 1 \times 10^9 * 650)$, donde concentración es la concentración del producto de PCR purificado, 6.022×10^{23} moléculas/mol es el número de Avogadro, longitud del amplicón es la longitud del amplicón diana amplificado, 1×10^9 es utilizado para transformar gramos a nanogramos, y 650 es el peso promedio de cualquier par de bases en Daltons. De esta manera, se prepararon diluciones seriadas desde una concentración de 3.46×10^{10} hasta 3.46×10^3 copias/ μL . Este procedimiento se utilizó a su vez para la preparación de las diluciones seriadas usadas para obtener las subsiguientes curvas estándar en este estudio.

Con la finalidad de obtener una curva estándar del gen *Hsp70*, se amplificaron las diluciones 3.46×10^8 - 3.46×10^3 por triplicado. Se utilizó una mezcla de reacción compuesta por 6.25 μL de FastStart SYBR Green Master (Roche), 0.5 μL (10 pM) de cada oligo y 50 ng de

cDNA, en un volumen final de reacción de 12.5 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C por 15 s, 63 $^{\circ}$ C por 30 s y 72 $^{\circ}$ C por 10 s. Al concluir la amplificación se generó una curva de fusión (*melting curve*) incubando desde 55 $^{\circ}$ C a 95 $^{\circ}$ C (80 ciclos) con incrementos de 0.5 $^{\circ}$ C durante 10 s.

5.6.2 Curva estándar del gen *Actina*

La obtención del amplicón del gen *Actina* utilizado para obtener la curva estándar respectiva, se realizó por medio de los oligos ActinaF: 5'-GCC-CTG-GAC-TTC-GAA-CAA-3' y ActinaR: 5'-CGT-TGC-CAA-TGG-TGA-TGA-3', según lo reportado previamente por Farcy *et al.* (2009), los cuales generan un producto de aproximadamente 100 pb. La amplificación se realizó por triplicado mediante el juego de reactivos *Ready-to-Go PCR beads* (GE Healthcare), se adicionaron 100 ng de cDNA y 2 μ L de cada oligo (10 pM) hasta alcanzar un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de reacción fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 95 $^{\circ}$ C por 30 s, 63 $^{\circ}$ C por 15 s y 72 $^{\circ}$ C por 30 s, seguido de un ciclo de extensión final de 72 $^{\circ}$ C por 10 min. Después, se verificó la presencia de una sola banda, del tamaño antes señalado, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se tiñó con GelRed (Biotium).

El producto de PCR se purificó y se prepararon diluciones seriadas desde una concentración de 4.4×10^{10} hasta 4.4×10^4 copias/ μ L. De las anteriores, se utilizaron las diluciones 4.4×10^8 - 4.4×10^4 copias/ μ L, que se amplificaron por triplicado. Se utilizó una mezcla de reacción compuesta por 6.25 μ L de *FastStart SYBR Green Master* (Roche), 0.5 μ L (10 pM) de cada oligo y 50 ng de cDNA, en un volumen final de reacción de 12.5 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C por 15 s, 63 $^{\circ}$ C por 30 s y 72 $^{\circ}$ C por 10 s. Al concluir la amplificación se generó una curva de fusión incubando desde 55 $^{\circ}$ C a 95 $^{\circ}$ C (80 ciclos) con incrementos de 0.5 $^{\circ}$ C durante 10 s.

5.6.3 Curva estándar del gen *Rpl8*

La obtención del amplicón del gen *Rpl8* utilizado para generar la curva estándar respectiva, se realizó mediante el uso de los oligos Rpl8F: 5'- GCC-CAT-GCT-TAA-GGC-TGG-CA -3' y Rpl8R: 5'- AGA-CGA-CCT-GTA-CGT-CTG-GCA -3', los cuales generan un producto de de tamaño aproximado de 207 pb. La amplificación se realizó por triplicado utilizando el juego de reactivos *Ready-to-Go PCR beads* (GE Healthcare), se adicionaron 100 ng de cDNA y 2 μ L de cada oligo (10 pM) hasta alcanzar un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de reacción fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s y 72 °C por 15 s. Después, se verificó la presencia de una sola banda, del tamaño antes citado, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se tiñó con GelRed (Biotium).

El producto de PCR se purificó y se procedió a la preparación de las diluciones seriadas, las mismas fueron de una concentración 1.5×10^{10} a 1.5×10^5 copias/ μ L, de las que se usaron las diluciones 1.5×10^8 - 1.5×10^5 copias/ng para la generación de la curva estándar. Para esto, se utilizó una mezcla de reacción compuesta por 6.25 μ L de *FastStart SYBR Green Master* (Roche), 0.5 μ L (10 pM) de cada oligo y 50 ng de cDNA, en un volumen final de reacción de 12.5 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 15 s, 63 °C por 30 s y 72 °C por 10 s. Al concluir la amplificación se generó una curva de fusión incubando desde 55 °C a 95 °C (80 ciclos) con incrementos de 0.5 °C durante 10 s.

5.6.4 PCR de tiempo real

Para evaluar los niveles de expresión de los genes *Hsp70*, *Actina* y *Rpl8* se utilizaron los oligos específicos usados para la generación de sus respectivas curvas estándar, así como las condiciones de reacción utilizadas para cada una de estas curvas. En cada uno de los casos, las muestras se amplificaron por triplicado. Una vez concluida la reacción de PCR, con la finalidad de cuantificar la cantidad de transcritos, se compararon los valores de ciclo umbral (Cp) de las muestras con la curva estándar correspondiente a cada gen.

Durante la realización del análisis se tomó la decisión de realizar una cuantificación absoluta de la expresión del gen *Hsp70*. Lo anterior se debió, principalmente, a que no fue posible encontrar un gen constitutivo que no tuviera una diferencia significativa, en cuanto a su expresión en las distintas estaciones del año. Se establecieron dos criterios distintos para delimitar los niveles de expresión del gen *Hsp70*. Para el criterio (M1) se fijaron niveles para cada estación, usando para ello los siguientes rangos:

Nivel bajo = $X \leq \text{Percentil } 33$

Nivel medio = $\text{Percentil } 33.33 < X < \text{Percentil } 66.66$

Nivel alto = $\text{Percentil } 66.66 \leq X$

En el criterio (M2) se utilizaron los mismos rangos, sin embargo se establecieron los mismos de manera global.

5.7 Análisis Estadístico de los Datos

Se utilizó el paquete estadístico SigmaPlot 12.0 para realizar los gráficos, y el software SYSTAT 13.0 para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. Se usó el método de la prueba exacta de Fisher para determinar si existe una relación entre genotipos y los distintos niveles de expresión establecidos. Para precisar la existencia de una diferencia en la expresión de los genes *Hsp70*, *Actina* y *Rpl8* a lo largo del año, así como para establecer la disimilitud en cuanto a la cantidad de transcritos del gen *Hsp70* entre individuos infectados por los diferentes patógenos analizados, se utilizó ANOVA en rangos de una vía (Kruskal-Wallis) seguido de la prueba de Dunn (Bonferroni t) para detectar diferencias entre estaciones.

VI. RESULTADOS

6.1 Detección de Patógenos

6.1.1 *Marteilia refringens*

Después de llevar a cabo el análisis correspondiente para el diagnóstico de *M. refringens* no se encontró la presencia de *M. refringens*.

6.1.2 OsHV-1

Al efectuar el diagnóstico de Herpes virus en los organismos muestreados se obtuvo una prevalencia de 40% en verano y 20% en invierno (Figura 5), mientras que no se detectaron individuos infectados en las estaciones de primavera y otoño. Al revelar el producto de PCR, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, se detectaron distintos organismos que presentaron bandas inespecíficas de tamaño distinto al control positivo, además de la de tamaño esperado (723 pb).

6.1.3 *Perkinsus marinus*

No se detectó la banda esperada de 475 pb como resultado de la PCR correspondiente a la detección de *P. marinus* en las muestras seleccionadas, sin embargo se obtuvieron bandas de tamaño distinto al esperado en el 6.6% de los casos analizados, tanto en verano como en otoño (Figura 6), en contraste con las estaciones de primavera e invierno, donde no fue posible obtener producto de PCR visible por electroforesis en gel de agarosa el 2%. Las bandas en cada caso son de ~400 pb. Estos productos se secuenciaron y mostraron un índice de identidad de 5% con una secuencia de RNA ribosomal de *P. marinus* reportado en Genbank con número de acceso KJ458987, por lo que no fue interpretado como resultado positivo.

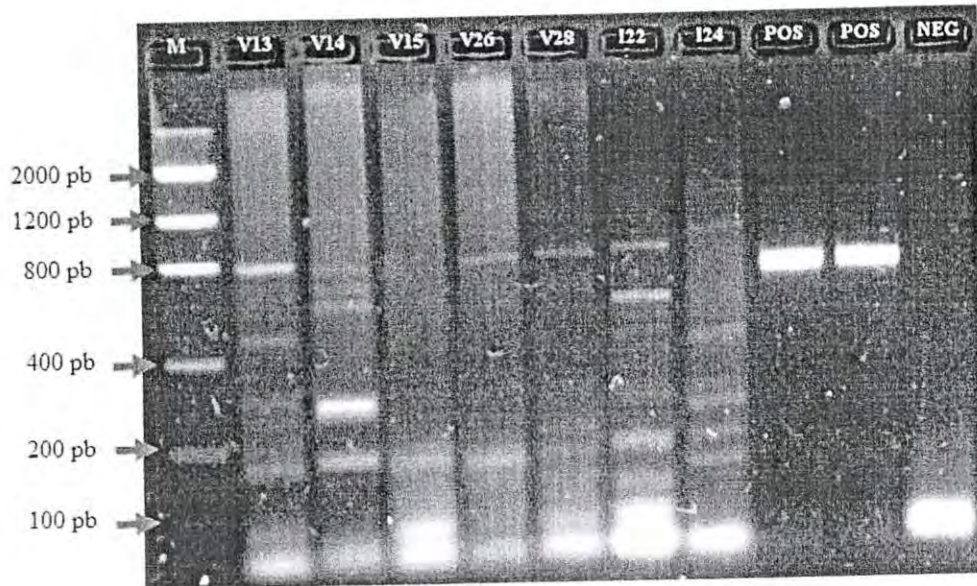


Figura 5. Muestras infectadas con OsHV-1. En el carril "M" se encuentra el marcador de peso molecular. En los carriles siguientes se encuentran las muestras V13, V14, V15, V26, V28, I22 e I24, en ese mismo orden. V = verano e I = invierno. En los carriles "POS" se ubican controles positivos, mientras que el carril "NEG" es el control negativo.

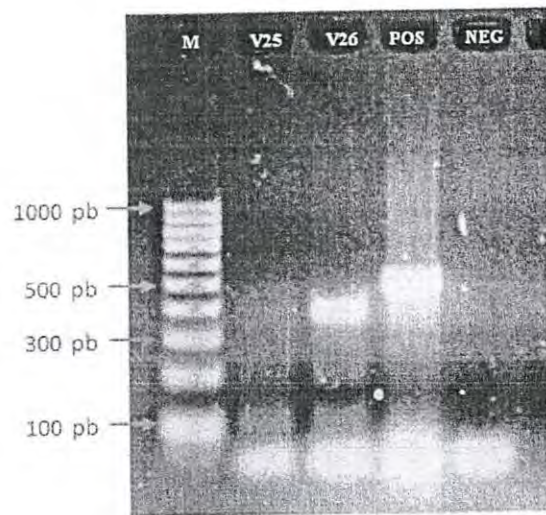


Figura 6. Muestras analizadas con *P. marinus*. En el carril "M" se ubica el marcador de peso molecular, le siguen las muestras V25 y V26. El carril "POS" es un control positivo. En el carril "NEG" se encuentra el control negativo.

6.2 Variabilidad Genética

El revelado de los productos mostró bandas con un tamaño aproximado de 850 pb, en algunos casos se presentaron en conjunto con bandas inespecíficas (Figura 7). Por otra parte, en 13 muestras no fue posible obtener el amplicón de interés.

Lase secuencias del gen *Hsp70* de los organismos muestreados tuvieron un índice de identidad entre 95 y 99% con la secuencia del gen *Hsp70* de *C. gigas* reportada previamente por Gourdon *et al.* (2000) en Genbank con número de acceso AF144646.

Se encontraron 34 sitios de heterocigosis (Tabla 2). El tipo de heterocigosis más abundante es Y (47.7%), seguido por R (45%), S (3%), M (2.45%) y K (1.83%) (la denominación se hizo de acuerdo al código de ambigüedades de la IUPAC). De esta manera, se identificaron 31 genotipos diferentes, siendo el más abundante G3 presente en 17 organismos, seguido por G2 en siete organismos, G4 en 5, G9 en 2, G13 en 2 y G15 en 2, véase el Anexo 1 para una lista de genotipos y sus secuencias. Los 25 genotipos restantes estuvieron presentes en sólo un individuo (Figura 8).

Los especímenes correspondientes al muestreo de otoño no se incluyeron en los análisis de expresión del gen *Hsp70* en relación a un genotipo determinado, por lo tanto no se secuenciaron estas muestras. La distribución de genotipos por estación del año se encuentra en la Tabla 3 en donde se puede observar que de los 31 genotipos, tres se presentaron en primavera, verano e invierno, uno en primavera y en verano, 10 se presentaron sólo en primavera y 11 sólo en verano.

Tras realizar el análisis filogenético de las muestras se encontró que las mismas se dividen en dos clados mayoritarios (Figura 9) con una distancia genética intergrupala de 359 pasos mutacionales.

Se detectaron 309 sitios monomórficos, además de 251 polimórficos. De los últimos, 239 de estos sitios contaron con dos variantes, mientras que 11 de ellos estuvieron compuestos por 3 variantes de base nitrogenada; 55 sustituciones resultaron sinónimas y 166 no sinónimas. También, se identificaron 26 posiciones con mutaciones de tipo InDel. La razón transición/transversión resultante fue $R = 0.523$.

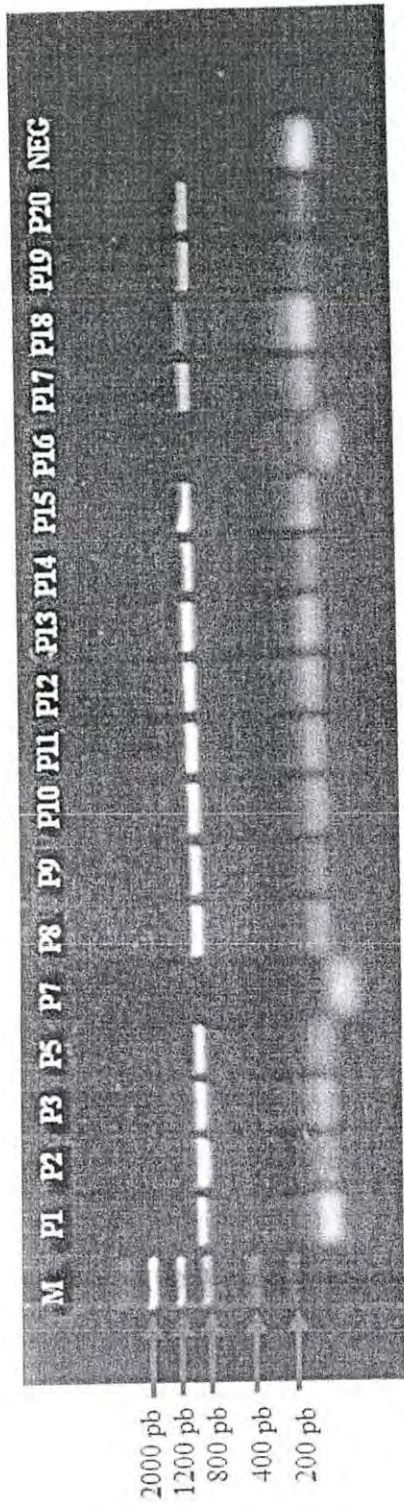


Figura 7. Amplificación por PCR de *Hsp70*. Carril M: marcador de peso molecular. En los carriles P1-P20, se encuentran las muestras número 1-20 de primavera, en ese mismo orden. En el carril "NEG" se ubica el control negativo.

Tabla 2. Cantidad de individuos según tipo de heterocigosis por sitio. Los distintos tipos de heterocigosis encontrados se etiquetaron según el código IUPAC para ambigüedades, donde K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = C/G y Y = C/T.

Sitio de heterocigosis	Cantidad de individuos según tipo de heterocigosis				
	K	M	R	S	Y
1397	-	-	-	-	5
1406	-	-	14	-	-
1409	-	-	29	-	-
1430	-	-	-	-	14
1433	-	-	16	1	-
1454	-	-	4	-	-
1466	-	-	7	-	-
1467	-	-	3	-	-
1478	-	-	-	-	6
1544	-	-	-	-	15
1550	-	-	-	1	12
1565	6	-	-	-	-
1568	-	-	8	-	-
1589	-	-	3	-	-
1601	-	-	4	-	-
1621	-	-	5	-	-
1628	-	-	2	-	6
1646	-	-	-	-	23
1667	-	-	-	-	28
1679	-	-	25	-	-
1688	-	-	-	-	9
1695	-	-	1	-	1
1697	-	-	9	-	-
1700	-	-	2	-	2
1706	-	-	4	-	-
1709	-	8	-	1	1
1718	-	-	2	-	-
1719	-	-	3	-	-
1739	-	-	-	-	5
1796	-	-	-	-	6
1799	-	-	-	-	22
1836	-	-	1	-	1
1892	-	-	5	-	-
1907	-	-	-	7	-

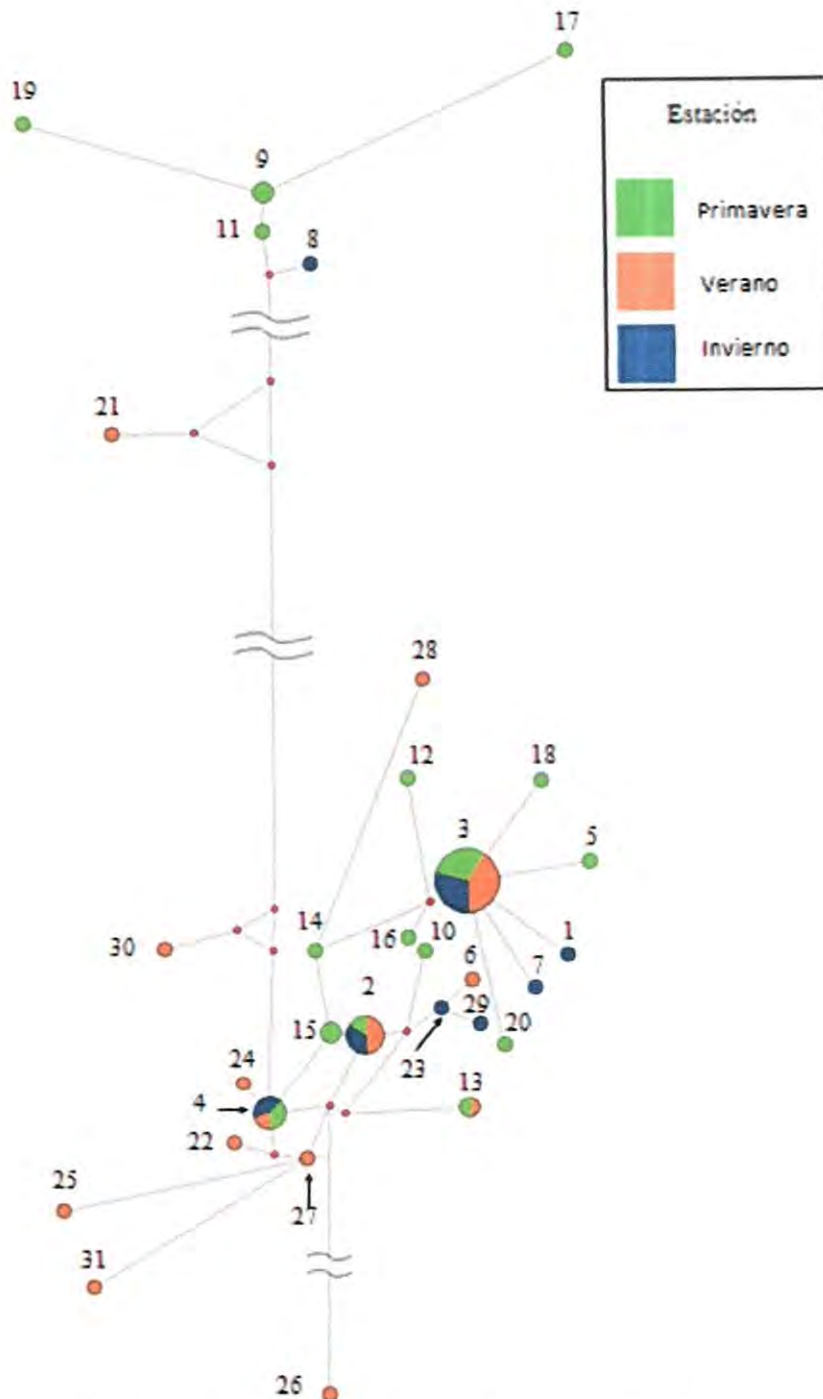


Figura 8. Red de relaciones evolutivas entre genotipos, organizados por estación del año. El número por arriba, o en su defecto a la izquierda, de cada círculo representa el nombre del genotipo. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que posee el genotipo. Las divisiones dentro de los círculos representan la proporción de individuos con el mismo genotipo presentes en cada estación. La longitud de la línea que une a los genotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que hay entre ellos.

Tabla 3. Distribución de genotipos por número de individuos por estación del año.

Genotipo	Estación		
	Primavera	Verano	Invierno
G1	-	-	1
G2	2	3	2
G3	5	7	5
G4	2	1	1
G5	-	-	1
G6	-	-	1
G7	-	-	1
G8	-	-	1
G9	2	-	-
G10	1	-	-
G11	1	-	-
G12	1	-	-
G13	1	1	-
G14	1	-	-
G15	2	-	-
G16	1	-	-
G17	-	1	-
G18	2	-	-
G19	1	-	-
G20	1	-	-
G21	-	1	-
G22	-	1	-
G23	-	1	-
G24	-	1	-
G25	-	1	-
G26	-	1	-
G27	-	1	-
G28	-	1	-
G29	-	1	-
G30	-	1	-
G31	-	1	-

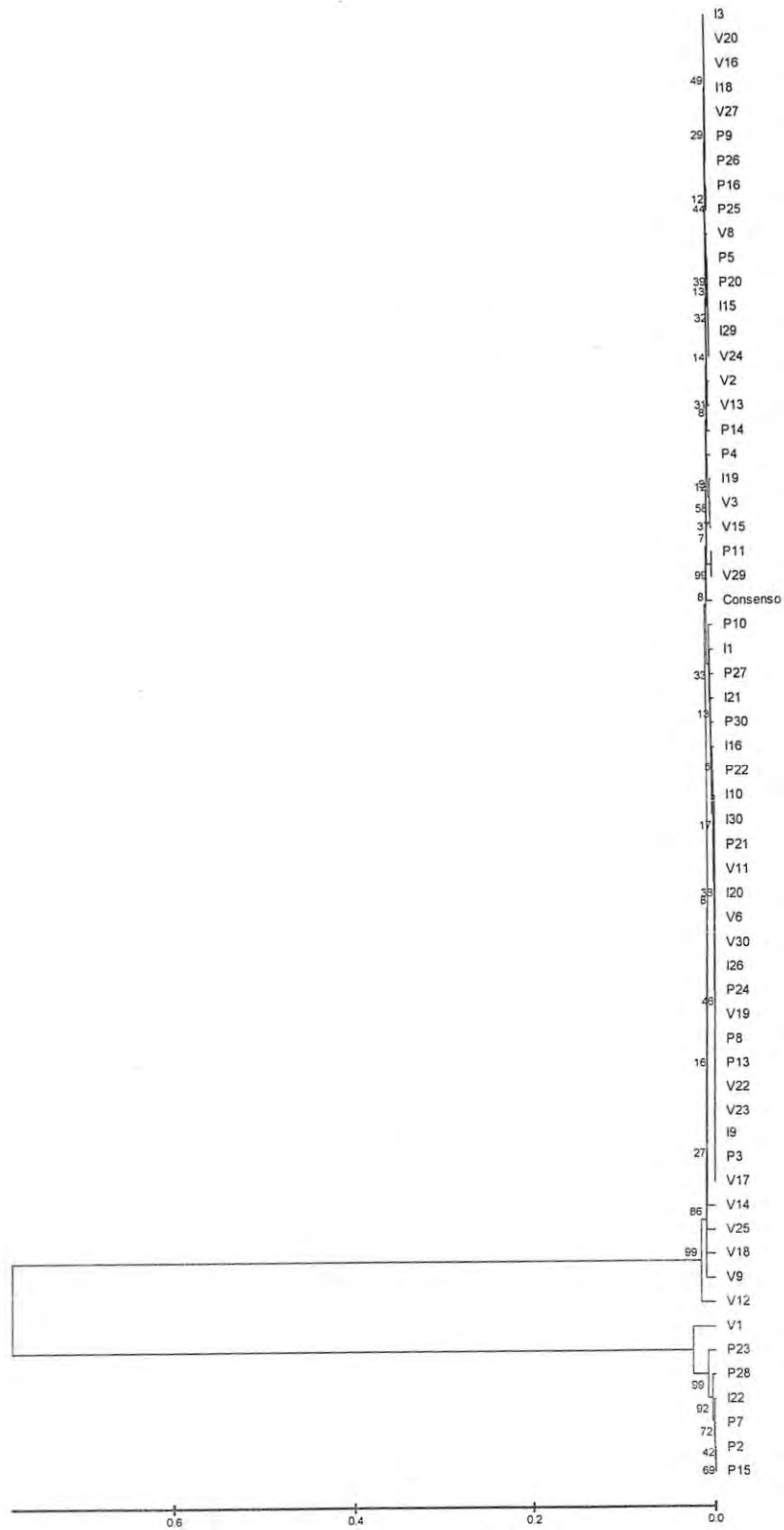


Figura 9. Árbol filogenético general. Se utilizó el método UPGMA, con el parámetro Kimura 2, para el trazado del cladograma

6.3 Evaluación de Expresión Génica

6.3.1 Curva estándar del gen *Hsp70*

La amplificación específica del gen se confirmó por la presencia de un solo pico en la curva de disociación y por la presencia de una banda en electroforesis en gel de agarosa. No se detectaron dímeros y la identidad del producto de PCR fue confirmado mediante secuenciación y posterior comparación utilizando la base de datos BLAST, obteniendo un índice de identidad del 99% con la secuencia del mRNA del gen *Hsp70* de *C. gigas* reportado anteriormente por Gourdon *et al.* (2000) en Genebank con número de acceso AF144646.

Se obtuvo una curva con una eficiencia de 90% y $R^2 = 0.99$ (Figura 10) siendo consideradas como aceptables las curvas con eficiencias entre 90 y 110%. La temperatura de desnaturalización del amplicón (T_m) resultante fue $T_m = 77.15$ °C (Figura 11).

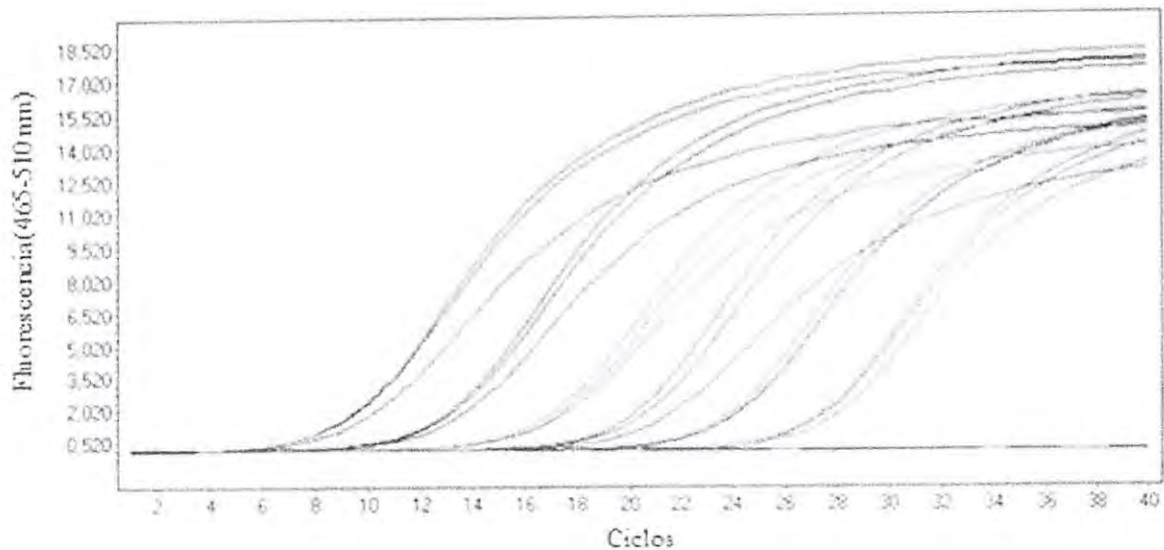


Figura 10. Curva estándar del gen *Hsp70*. De izquierda a derecha se aprecian en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen *Hsp70*.

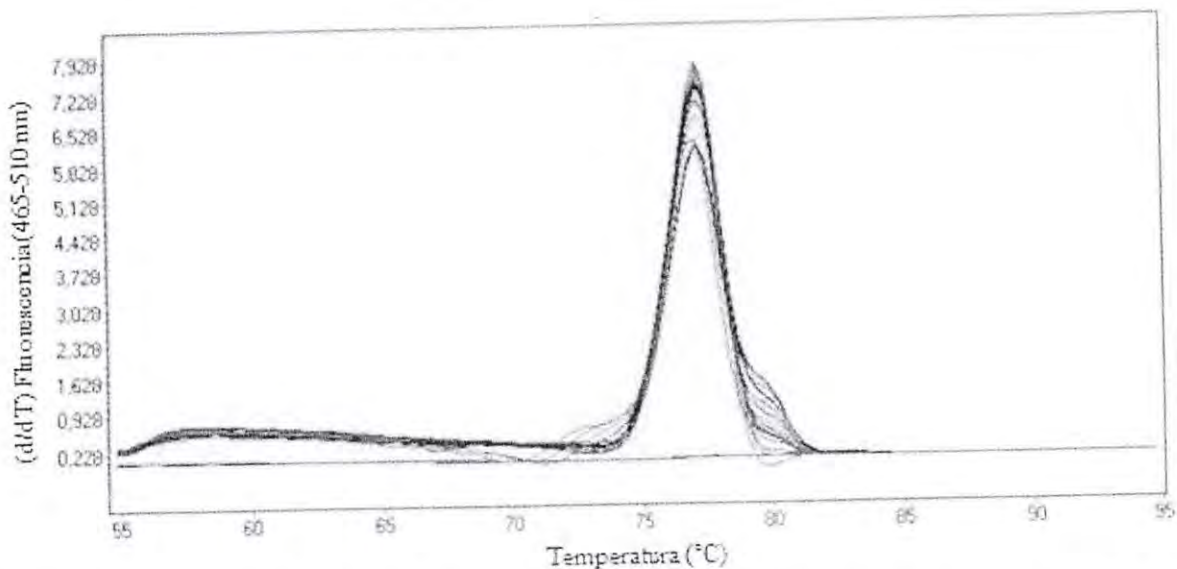


Figura 11. Curva de disociación del amplicón diana del gen *Hsp70*. El amplicón del gen *Hsp70* se disocia completamente a una temperatura promedio de 77.15 °C.

6.3.2 Curva estándar de *Actina*

Se verificó la amplificación específica mediante el revelado del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2%, en donde se apreció una sola banda del tamaño esperado, además de obtener un solo pico en la curva de disociación y no se detectaron dímeros.

Se obtuvo una curva con una eficiencia de 97.95% y $R^2 = 0.9868$ (figura 12). Mediante la curva de desnaturalización se determinó una $T_m = 78.91$ °C (Figura 13).

6.3.3 Curva estándar de *Rpl8*

Se determinó la obtención de un amplicón de tamaño esperado (207 pb) al revelar el producto de amplificación en electroforesis en gel de agarosa al 2%, así mismo se obtuvo un solo pico en la curva de disociación, donde no se detectaron dímeros. La eficiencia de la curva estándar generada fue de 96.646% y $R^2 = 0.9381$ (Figura 14). El amplicón obtenido tuvo una $T_m = 81.05$ °C (Figura 15).

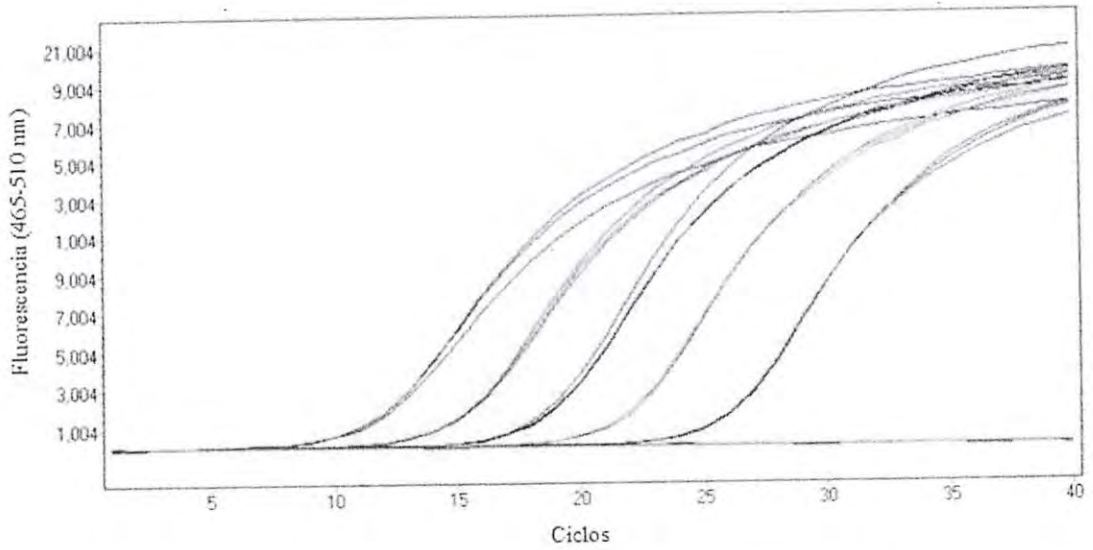


Figura 12. Curva estándar del gen *Actina*. De izquierda a derecha se aprecian en orden descendiente y por triplicado las curvas de amplificación de las diferentes diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen *Actina*

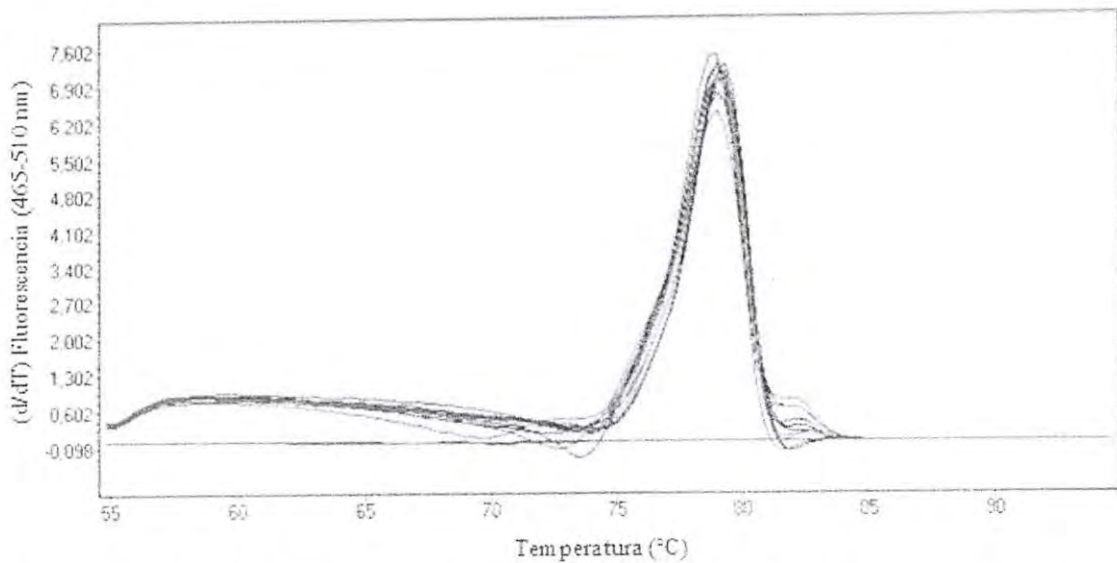


Figura 13. Curva de disociación del amplicón de *Actina*. La temperatura de disociación completa del amplicón del gen *Actina* es 78.91 °C

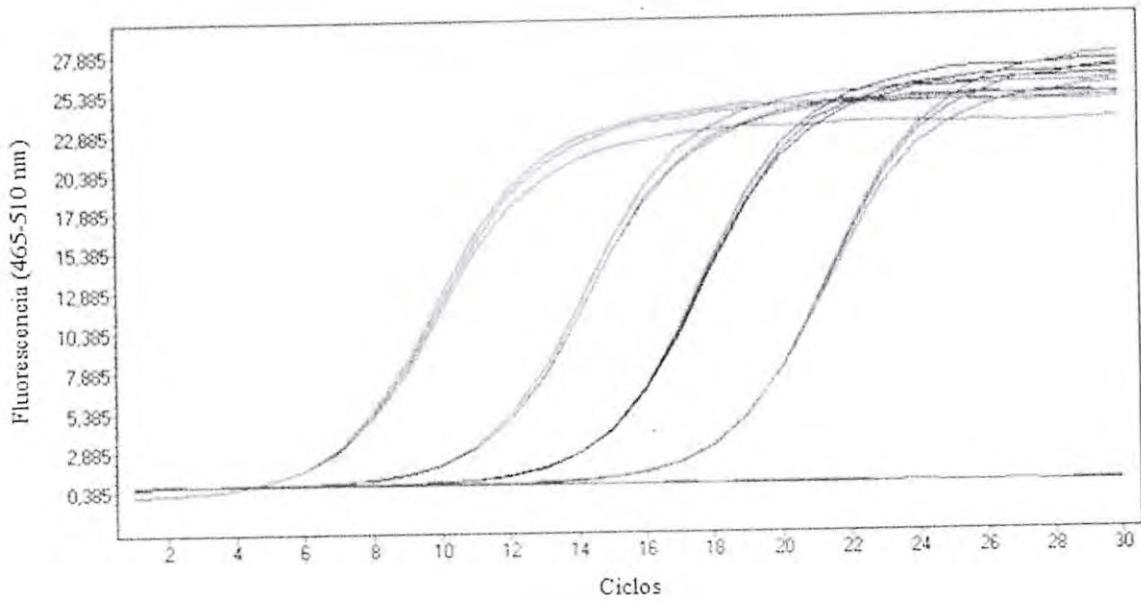


Figura 14. Curva estándar del gen *Rpl8*. De izquierda a derecha se aprecian en orden descendiente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen *Actina*.

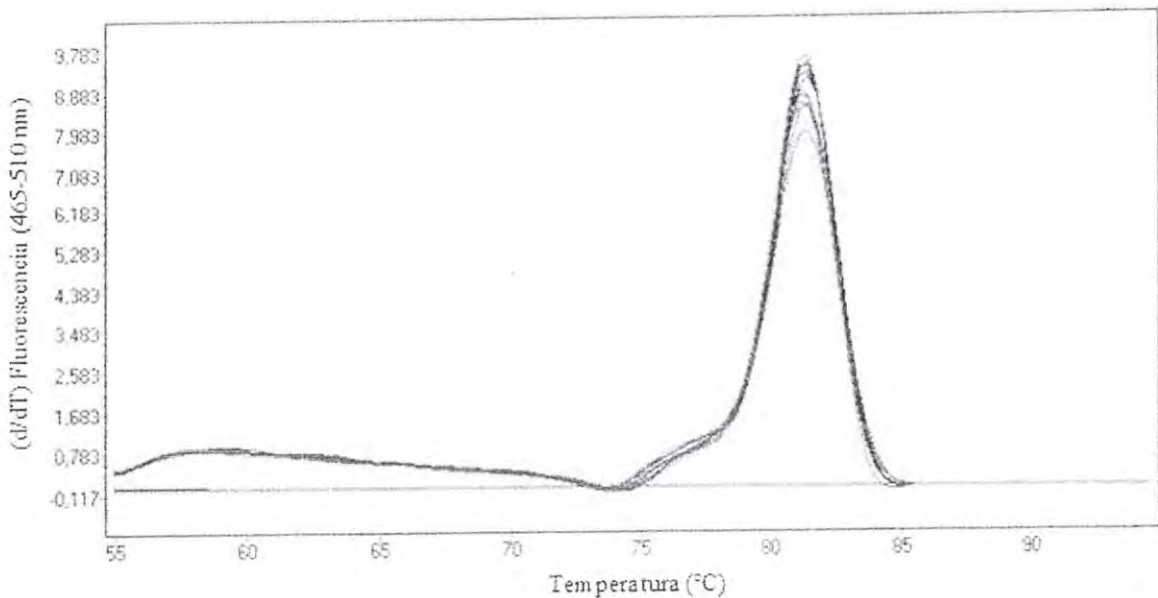


Figura 15. Curva de disociación del amplicón de *Rpl8*. La temperatura de disociación del amplicón del gen *Rpl8* es en promedio de 81.05 °C.

6.3.4 Expresión estacional del gen *Hsp70*

De la evaluación de la calidad de los extractos de ARN de las muestras correspondientes a la estación de otoño el 77.27% (n = 22) de las mismas resultaron con calidad insuficiente, por lo que no se incluyeron estas en el presente estudio.

La cantidad mínima de transcritos del gen *Hsp70* cuantificada fue 9.19×10^1 , la máxima 4.53×10^5 , y una media de 7.54×10^4 copias/ μ L. Los niveles de expresión se fijaron según los rangos establecidos en la Tabla 4 y Tabla 5. Véase Anexo 2 para una lista detallada de los valores de expresión del gen *Hsp70* en las muestras analizadas.

El análisis de varianza demostró que, en cuanto a la expresión del gen *Hsp70* por parte de los individuos, en cada estación, existe diferencia significativa ($P < 0.05$) sólo entre la estación de verano e invierno, siendo mayor en verano (Figura 16).

6.3.5 Expresión estacional del gen *Actina*

Existe diferencia significativa en la expresión de *Actina* ($P < 0.05$) entre la estación de invierno con respecto a las demás estaciones analizadas, siendo menor en invierno (Figura 17).

Tabla 4. Niveles de expresión del gen *Hsp70* según el criterio M1. Los niveles de expresión se fijaron según los percentiles 33.3 y 66.6, para cada una de las estaciones del año.

Nivel de expresión	Rangos por estaciones		
	Primavera	Verano	Invierno
Alto	$84000.65 \leq X$	$260139.1 \leq X$	$74987.36 \leq X$
Medio	$48702.01 < X < 84000.65$	$71941.07 < X < 260139.1$	$22551.91 < X < 74987.36$
Bajo	$X \leq 48702.01$	$X \leq 71941.07$	$X \leq 22551.91$

Tabla 5. Niveles de expresión del gen *Hsp70* según el criterio M2. Los niveles de expresión se fijaron según los percentiles 33.3 y 66.6, de manera global.

Nivel de expresión	Rangos
Alto	$133754.23 \leq X$
Medio	$51711.67 < X < 133754.23$
Bajo	$X \leq 51711.67$

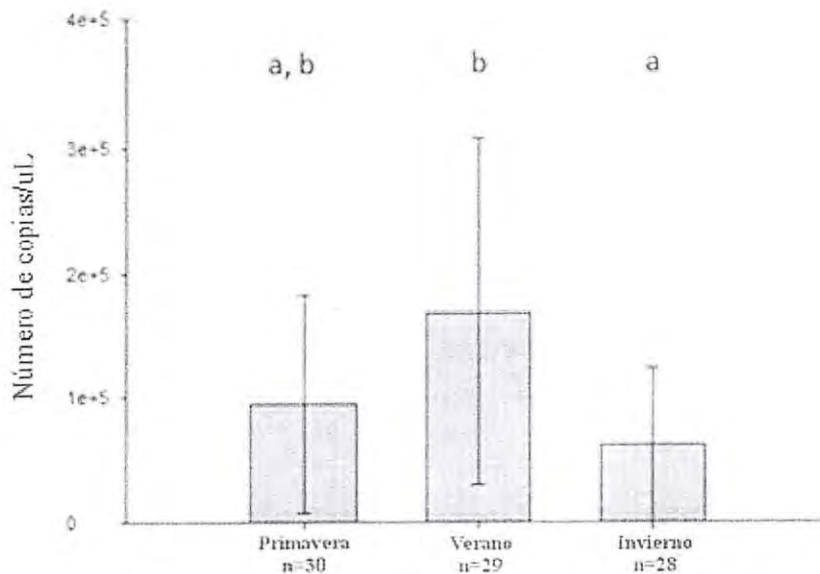


Figura 16. Expresión de *Hsp70* según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.

T-160202

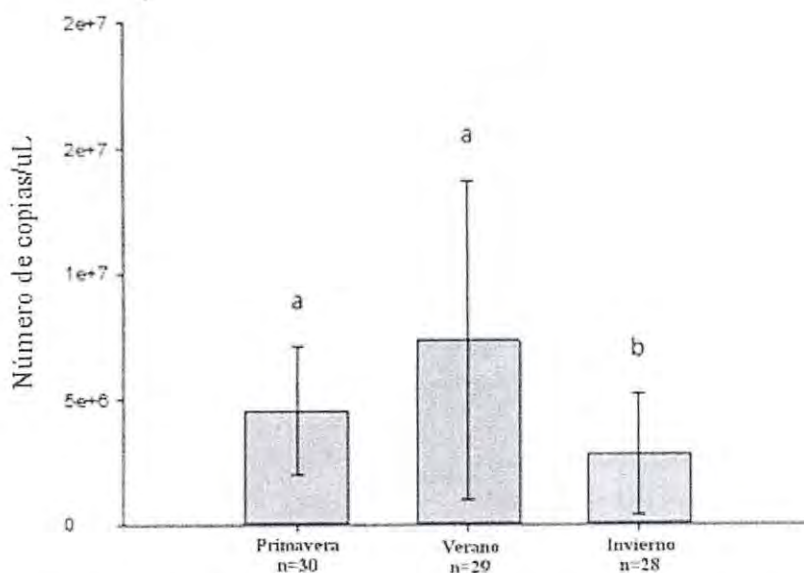


Figura 17. Expresión de *Actina* según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.

6.3.6 Expresión estacional del gen *Rpl8*

Sólo se detectó la existencia de una diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto a la expresión del gen *Rpl8* en invierno y las demás estaciones, en las que la expresión de este gen es igual (Figura 18).

6.3.7 Efecto de la infección por OshV-1 sobre la expresión de *Hsp70*

Al comparar la cantidad de transcritos del gen *Hsp70* entre individuos infectados ($n = 9$) y no infectados ($n = 36$) se encontró que existe una diferencia significativa entre ambos grupos ($P < 0.05$). El número de transcritos de *Hsp70* es mayor en los organismos infectados (Figura 19).

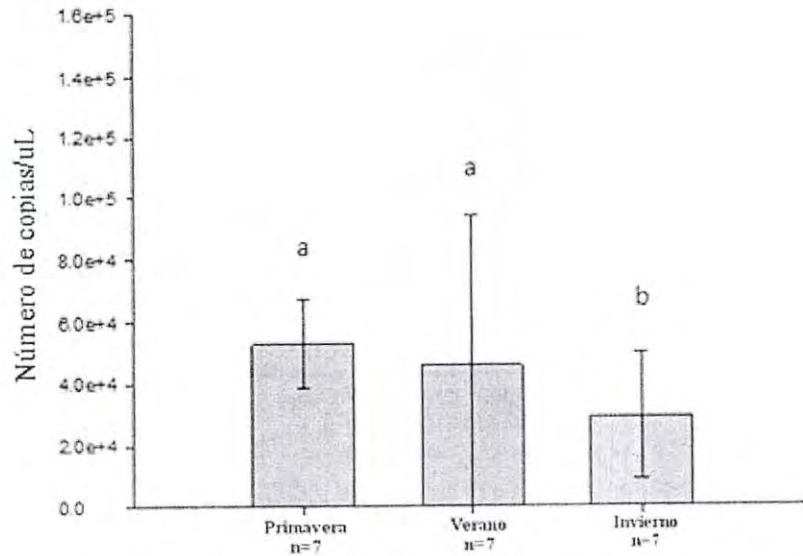


Figura 18. Expresión del gen *Rpl8* según la estación del año. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.

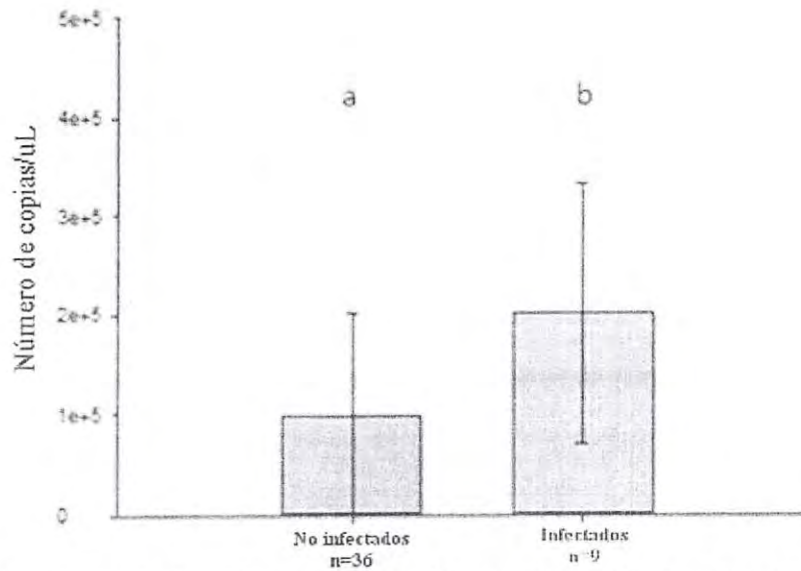


Figura 19. Expresión de *Hsp70* ante la infección por OsHV-1. Las literales sobre las barras indican las diferencias significativas.

6.3.8 Niveles de expresión de *Hsp70* asociado a genotipos

De acuerdo los resultados de la prueba exacta de Fisher, no se encontró asociación entre genotipos y el patrón de expresión del gen *Hsp70* ($P > 0.050$) con los niveles fijados tanto en el criterio M1 y M2 (Figura 20 y Figura 21).

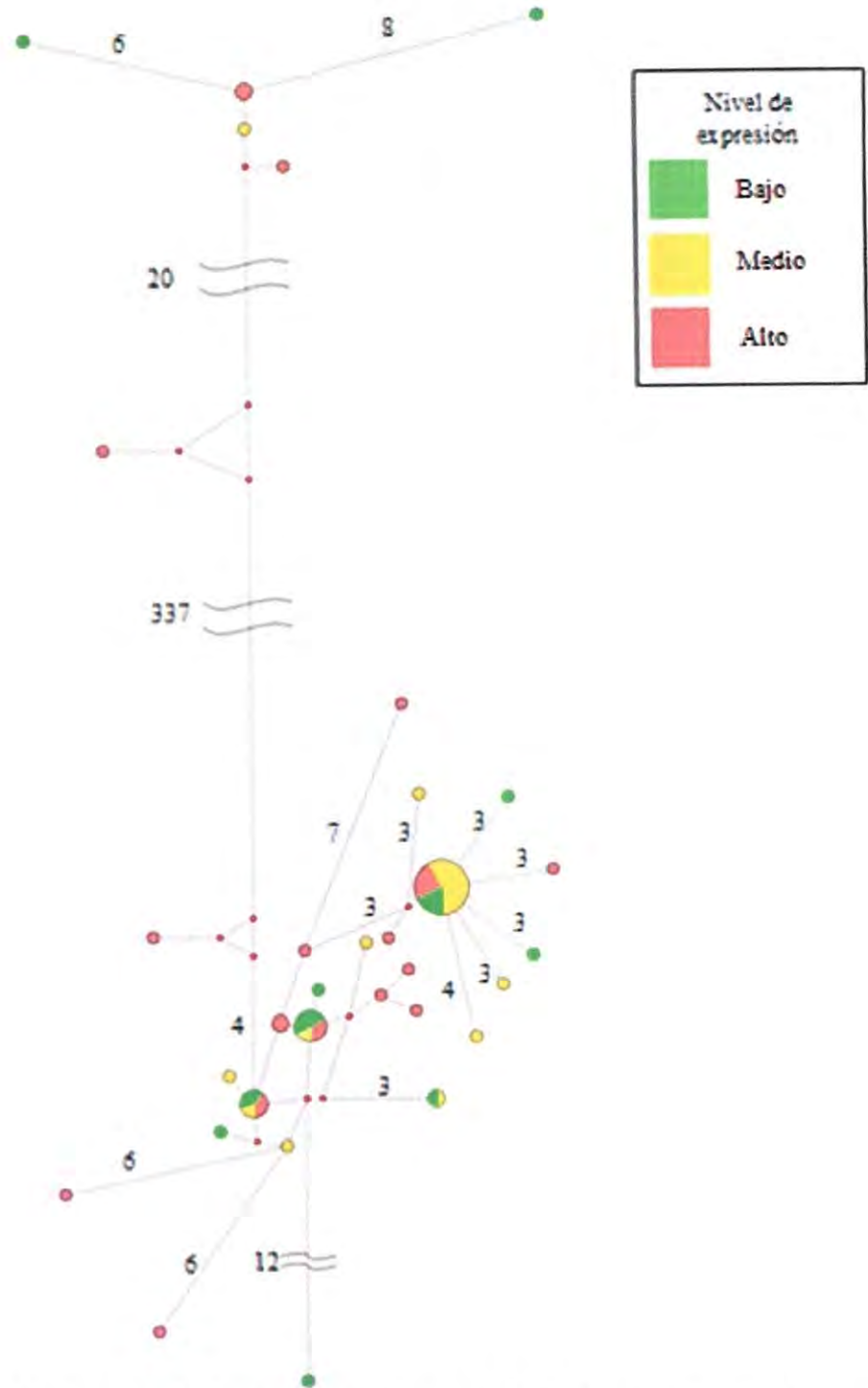


Figura 20. Red de relaciones evolutivas entre genotipos y nivel de expresión, conforme al criterio M1. Los pasos mutacionales entre cada genotipo están dados por el número a la izquierda, o en su defecto por arriba, de cada línea. Las distancias de dos o menos pasos mutacionales no se muestran por motivos de diseño. Las divisiones dentro de los círculos representan la relación del número de individuos con el mismo nivel de expresión de *Hsp70*.

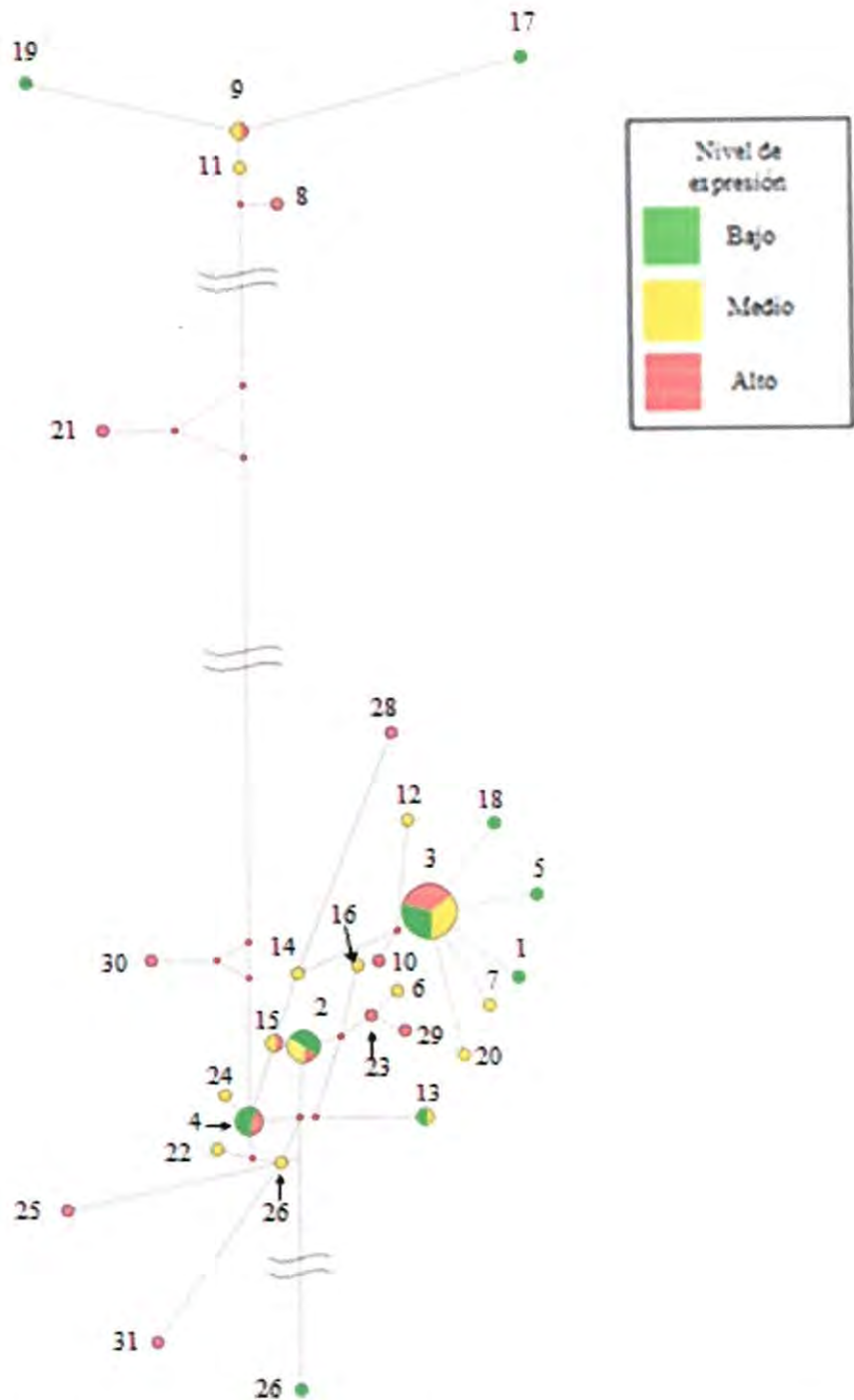


Figura 21. Red de relaciones evolutivas entre genotipos y nivel de expresión, conforme al criterio M2. El número por arriba, o en su defecto a la izquierda, de cada círculo representa el nombre del genotipo. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que posee el genotipo. Las divisiones dentro de los círculos representan la relación del número de individuos con el mismo nivel de expresión de *Hsp70*. La longitud de la línea que une a los genotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que hay entre ellos.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Determinación de OsHV-1

Como resultado del diagnóstico de la infección por OsHV-1, se obtuvieron distintos individuos que resultaron positivos para este patógeno. En la mayoría de los casos positivos se detectaron bandas ajenas al peso de 723 pb de la banda esperada, lo cual se ha reportado anteriormente para el par de oligos C2/C6. Martenot *et al.* (2011) reportaron la obtención de bandas de peso molecular de alrededor de 1000 pares de bases en algunos de sus resultados positivos. De manera similar, Batista *et al.* (2007) señalan la aparición conjunta de bandas extrañas y la banda del amplicón diana después del revelado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Es importante mencionar que las muestras que resultaron con amplificación inespecífica, además de la banda esperada, 3 contaron con bandas de tamaño aproximado al reportado por otros autores. De ésta forma, tenemos la muestra V13 con una banda de aproximadamente 680 pb; la V14 con dos fragmentos de alrededor de 520 y 680 pb; la I22 con una banda de un tamaño aproximado de 520 pb. Arzul *et al.* (2001) encontraron una variante de OsHV-1 caracterizada por un amplicón de 530 pb. También, Martenot *et al.* (2012) identificaron un subtipo del mismo virus, el cual tiene como producto de amplificación un amplicón de 694 pb. También, Segarra *et al.* (2010) reportaron un genotipo particular de herpes virus de ostreidos tipo 1, caracterizado por una banda de 696 pb. De confirmarse la identidad de las secuencias, lo anterior señalaría una posible co-infección por múltiples variantes, lo cual reportó Dundon *et al.* (2011), quienes hallaron la presencia conjunta de dos variantes de OsHV-1 en especímenes de *C. gigas*.

7.2 Variabilidad Genética

La existencia de organismos de los cuales no se pudo amplificar la región de interés del gen *Hsp70* sugiere variabilidad en la región de reconocimiento de los oligos reportados por *Boutet et al.* (2003). Como resultado del análisis de secuencias, se encontraron 239 sitios polimórficos, lo cual representa una cantidad mucho mayor al reportado para otras especies. *Zeng et al.* (2008) reportaron la presencia de 5 SNPs en individuos de la especie *Litopenaeus vannamei*. Posteriormente, *Kang et al.* (2011a) encontraron 27 sitios polimórficos en 10 especímenes de *Apostichopus japonicus*. En estudios más recientes, *Wei et al.* (2012) reportaron que la especie *Miichtys miuy* cuenta con 4 posiciones variables en la secuencia del gen *Hsp70*.

La cantidad de sitios variables encontrados en este estudio puede ser explicado debido a la gran distancia mutacional existente entre ambos clados. En relación a lo anterior, las prácticas de acuicultura, en donde se busca obtener los linajes con mejores características productivas sin erosionar la variabilidad genética, requieren el entrecruzamiento de organismos de diferentes estirpes, provenientes de distintos laboratorios, y por tanto con carga genética propia de los mismos. Esto conlleva a que con el paso del tiempo y con la inclusión de cada vez más linaje se obtenga una estirpe con características determinadas, pero con una gran variedad de genotipos disponibles. Además, según *Williams* (1975) en especies como *C. gigas*, la variabilidad genética se ve favorecida debido al gran número de divisiones celulares necesarias para producir gametos, asociado a la alta fecundidad de ovocitos, en el orden de 1×10^6 - 1×10^8 . Teniendo esto en cuenta, cada hembra de *C. gigas* puede depositar más de 50 millones de huevos en cada desove (*Kang et al.*, 2003) así como los machos producen billones de espermatozoides (*Launey et al.*, 2001), por lo que es de esperarse una gran cantidad de mutaciones en cada progenie, lo cual pudiera ser causa de los sitios 1433 R/S, 1550 S/Y, 1628 R/Y, 1695 R/Y, 1700 R/Y, 1709 M/S/Y y 1836 R/Y, así como de los demás sitios variables reportados en el presente estudio.

Se considera de interés el determinar la importancia biológica y función de los sitios polimórficos encontrados, ya que se encontraron diferentes sitios variables en los que se dan sustituciones del tipo no sinónimo, entre los que se encuentran sustituciones que provocan cambios de aminoácidos en general, lo cual pudiera alterar en mayor o menor medida la estructura tridimensional de la proteína HSP70. Se ha reportado que los polimorfismos

presentes en diferentes especies están relacionados con características específicas de los individuos portadores de determinado genotipo. Como se mencionó anteriormente, se ha determinado que la presencia de sitios polimórficos en la secuencia del gen *Hsp70* está relacionada con la termo-tolerancia intrínseca de tres especies de salmones del género *Oncorhynchus*, además de definir ciertas características fenotípicas (Narum y Campbell, 2010). Kang *et al.* (2011b) determinaron que en distintas especies de abulón existe una asociación entre ciertos sitios variables y la temperatura del agua en donde se distribuyen geográficamente las especies.

7.3 Expresión del Gen *Hsp70*

La diferencia significativa observada en la expresión de los genes *Actina* y *Rpl8* puede ser debido a que no se dio un tratamiento en específico a los organismos muestreados, por el contrario estos estuvieron expuestos a múltiples factores propios de las condiciones de cultivo, como temperatura, salinidad, hipoxia, entre otros agentes propios de la estación particular del año en donde se tomaron las muestras. Esta diferencia, hace que no sea posible utilizar dichos genes para normalizar los datos de expresión del gen *Hsp70* y por ende no se pueden emplear para llevar a cabo una cuantificación relativa. No obstante, la cuantificación absoluta ha sido utilizada con éxito anteriormente para evaluar expresión de distintos genes. Leong *et al.* (2007) realizaron una comparación entre los dos métodos y sugieren que la cuantificación absoluta es una técnica más robusta que la cuantificación relativa, debido a que no depende de ningún gen constitutivo y que además se disminuye el error mediante la normalización de la cantidad inicial de RNA, el cual es una representación del transcriptoma completo, aunado a esto señalan que la interpretación de los datos es confusa debido a que los resultados se expresan en razones, mientras que la cuantificación absoluta aporta datos acerca del número de transcritos, pudiendo discernir entre altas y bajas expresiones.

En estudios más recientes, Yeh *et al.* (2009) utilizaron aqPCR para la evaluación de la expresión de varios genes relacionados con el sistema de respuesta a patógenos en especímenes de *Litopenaeus vannamei* co-infectados con Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) obteniendo diferencias significativas, en cuanto a la expresión de dichos genes, entre individuos infectados y no infectados.

7.3.1 Relación de la infección por el virus OsHV-1 y la expresión de *Hsp70*

Los resultados indican que existe una mayor expresión en individuos naturalmente infectados que en individuos sanos. En relación a lo anterior, se ha sugerido que las proteínas HSP70 tienen un rol muy importante en el sistema de respuesta a patógenos de una gran cantidad de especies (Roberts *et al.*, 2010; Lahaye *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012). Además, éstas proteínas pueden modular la replicación viral de distintos virus, de tal manera que algunos de estos patógenos se ven beneficiados ante una alta expresión de proteínas HSP, por lo cual estimulan dicho proceso, mientras que otros se ven afectado de manera negativa, por lo que su replicación se ve disminuida ante una baja expresión de estas proteínas (Hooper *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que en individuos de la especie de camarón *Fenneropenaeus chinensis* la expresión de *Hsp70*, en conjunto con otras proteínas de estrés, se incrementa durante el proceso infeccioso de WSSV (Wang *et al.*, 2006). Lahaye *et al.* (2012) reportaron que durante el inicio de la infección de los virus de la rabia, estos estimulan una intensa síntesis de HSP70 y que la inhibición de la expresión del gen codificante de las proteínas antes dichas disminuye de manera significativa la replicación viral y la expresión de genes virales. Así mismo, Xiao *et al.* (2010) señalaron que el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) provoca un aumento en la cantidad de transcritos del gen *Hsp70* al infectar células de pulmón de cerdos. Posteriormente, Gao *et al.* (2014) demostraron que la inhibición de la expresión de *Hsp70* reduce en gran medida la replicación viral de PRRSV. Hasta el momento, el proceso por medio del cual OsHV-1 infecta las células hospederas no ha sido esclarecido del todo, sin embargo, los resultados de esta investigación sugieren que la proteína HSP70 podría tener un rol muy importante durante el proceso infeccioso de OsHV-1. No obstante, se requiere de más estudios para poder constatar esto último.

7.3.2 Relación genotipo-nivel de expresión de *Hsp70*-estación climática

Durante el desarrollo de esta investigación, se planteó establecer dos criterios distintos para determinar los niveles de expresión del gen *Hsp70*, lo cual se hizo con el fin de no sesgar los resultados. Mediante la utilización de la prueba exacta de Fisher, no fue posible reconocer

en ninguno de los casos una asociación entre genotipos y un nivel de expresión determinado, lo que sugiere que la intensidad de la expresión no está dada por la variación genética que existe en la región estudiada sino más bien en alguna otra región de este gen, o bien mutaciones -cis y -trans. En el primero de los casos se dan variaciones en las regiones aledañas al gen en cuestión, por ejemplo en la región promotora, mientras que las mutaciones -trans son cambios en la secuencia de un gen que codifica algún producto que en determinado momento interactúa con un gen en específico, por ejemplo el gen *Hsf* que codifica los monómeros HSF. Según Daugaard *et al.* (2007) la transcripción del gen *Hsp70* es regulada por HSF al interactuar con la región promotora de este gen, por lo que una mutación en cualquiera de estos podría afectar la expresión del gen *Hsp70*. Se ha reportado que la presencia de SNP's en la región anteriormente dicha está relacionada con diferencias en cuanto a termotolerancia y la magnitud de la expresión de este gen. Yang *et al.* (2014) reportaron que la diferencia interespecífica de expresión del gen *Hsp70* está asociada a la presencia de distintos sitios de polimorfismo sencillo en la región promotora de dos especies de almeja, del género *Argopectens*, lo cual está relacionado a su vez con la capacidad de termotolerancia.

Además, en diferentes investigaciones se han obtenido resultados que sugieren que la presencia de sitios polimórficos en la secuencia del gen *Hsp70* de múltiples especies está relacionada con lo antes citado. Se ha observado que en especímenes del pepino de mar de la especie *Apostichopus japonicus*, de las variantes azul y rojo, se presenta una diferencia significativa de la expresión del gen (Dong *et al.*, 2010) mientras que el color de los organismos de esta especie está definido por ciertos SNPs en el ORF de *Hsp70* (Kang *al.*, 2011a). Basiricó *et al.* (2011) reportaron que en ejemplares de ganado lechero Holstein, los individuos que cuentan con ciertos genotipos de este gen tienen una mayor producción de transcritos, y que además esto está relacionado con una mayor termo-tolerancia.

Mientras que, otros autores señalan que las mutaciones en la región promotora tiene un efecto en la regulación positiva de este gen (Kresfelder, 2006). Esta investigación representa el primer estudio en donde se trata de realizar una asociación entre el nivel de la expresión del gen *Hsp70* y un genotipo determinado en *C. gigas*, pero sin duda alguna es necesario realizar estudios en donde se analice la totalidad del gen, así como las posibles mutaciones -cis, lo cual ayudará al entendimiento de la respuesta de choque térmico de *C. gigas*.

Con respecto a la variación de la expresión de *Hsp70* según la estación climática, se observó que existe significativamente un aumento durante verano, en comparación con las demás estaciones, lo cual ha sido reportado anteriormente por otros investigadores, tanto para *C. gigas* como para otras especies. Farcy *et al.* (2009) reportaron que existe una diferencia significativa en la cantidad de mRNA de *Hsp70* que los especímenes de *C. gigas* expresan cuando estos se exponen a condiciones propias de las estaciones de verano e invierno, siendo la expresión de dicho gen mayor en verano. Similarmente, Stillman y Tagmount (2009) determinaron que existe una expresión mayor de *Hsp70* en verano, en comparación con la temporada de invierno en cangrejos de la especie *Petrolisthes cinctipes*.

El elevado número de transcritos puede estar relacionado con la desnaturalización de proteínas debido a las elevadas temperaturas propias de la región, aunado a múltiples factores que varían dependiendo de la estación, así como cambios en la salinidad del medio, entre otros. A pesar de no poderse establecer una asociación entre el nivel de expresión y un genotipo determinado, se identificaron especímenes que podrían ser utilizados como pie de cría. Estos son aquellos identificados como de nivel alto de expresión del gen *Hsp70*, ya que es de esperarse que al expresar en un alto grado el gen *Hsp70*, estos serán más aptos para hacer frente a factores que generen un estrés tal que provoque un gran número de proteínas desnaturalizadas, ya que al tener un pool de mRNA de *Hsp70* es de esperarse que la síntesis de HSP70 sea más rápida, y requiera un gasto de energía menor para hacer frente a cambios abruptos en el medio.

VIII. Conclusiones

- La magnitud con la que las proteínas HSP70 son expresadas por los organismos varía en estrecha relación con las condiciones propias de las estaciones del año, por lo que es factible su uso como biomarcador para el monitoreo de estrés en los especímenes cultivados, previo a conocer los agentes causales de dicho estrés.
- Se comprobó que sí existe la presencia de varios sitios polimórficos en el extremo 3' de la secuencia del gen *Hsp70* de *C. gigas*.
- No se pudo comprobar que exista una asociación entre secuencias particulares en la región 3' del *Hsp70* y el nivel de expresión de este gen entre los especímenes estudiados.
- La infección por OsHV-1 provoca un aumento considerable en la expresión del gen *Hsp70* en los individuos infectados,
- Se ratificó que la utilización del método de cuantificación absoluta es un método sensible, a través del cual se obtienen resultados equiparables a los obtenidos por medio del método de cuantificación relativa.
- Se determinó que los oligos utilizados 6F y 5R, propuestos por Boutet (2003) carecen de especificidad y no se recomiendan para el análisis de la secuencia del gen *Hsp70*.

IX. RECOMENDACIONES

Es recomendable el llevar a cabo un estudio de asociación genotipo-nivel de expresión, tomando en cuenta los resultados aquí presentados, en donde se tome en cuenta la variabilidad aquí reportada para determinar el número necesario de organismos.. También, se necesita de la realización de investigaciones donde se estudie el impacto que puede tener la presencia de sitios polimórficos presentes en el gen *Hsp70* sobre cualidades productivas, tales como asociación de genotipo a viabilidad celular, termo-resistencia, y resistencia a enfermedades, entre otros.

Se recomienda evaluar la presencia de mutaciones de tipo cis y trans, así como su relación con la variabilidad intra-específica de la expresión de las proteínas HSP70. De esta manera se determinaría la factibilidad de la utilización de este gen como un marcador para la elección de un pie de cría adecuado para un linaje que tenga características deseables por el sector productivo.

Es necesaria la evaluación del rol de las proteínas HSP70 durante el proceso infeccioso de OsHV-1, de tal forma se puede establecer la importancia de estas proteínas para la replicación viral y el desarrollo de su patogenicia, así como ayudar al entendimiento del mecanismo de respuesta a patógenos de *C. gigas*. Además, de este modo se puede valorar su potencial uso en el desarrollo de estrategias para el control de este patógeno.

Se recomienda analizar el impacto de las prácticas de acuicultura sobre la variabilidad presente en el gen *Hsp70* al comparar los resultados de este estudio con las poblaciones naturales, o con otras granjas acuícolas. De tal forma, se puede evaluar a que grado se ha afectado la variabilidad genética de poblaciones nativas y/o ferales. Asimismo, se puede consensar la presencia o ausencia de determinados genotipos tanto en granjas acuícolas como en poblaciones nativas y/o ferales, y determinar cuáles de estos genotipos son aptos para determinadas condiciones ambientales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Arzul, I., J.L. Nicolas, A.J. Davison y T. Renault. 2001. French Scallops: A New Host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, 290: 342-349.
- Audemard, C., K.S. Reece, M. Eugene y E.M. Burreson. 2004. Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6611-6618.
- Basiricò, L., P. Morera, V. Primi, N. Lacetera, A. Nardone y U. Bernabucci. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress and Chaperones*, 16: 441-448.
- Batista, F.M., I. Arzul, J.-F. Pepin, F. Ruano, C.S. Friedman, P. Boudry y T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *Journal of Virological Methods*, 139: 1-11.
- Bernabò, P., L. Rebecchi, O. Jousson, J.L. Martínez-Guitarte y V. Lencioni. 2011. Thermotolerance and hsp70 heat shock response in the cold-stenothermal chironomid *Pseudodiamesa branickii* (NE Italy). *Cell Stress and Chaperones*, 16: 403-410.
- Bernabucci, U., N. Lacetera, L.H. Baumgard, R.P. Rhoads, B. Ronchi y A. Nardone. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4: 1167-1183.
- Bosch, T.C., S.M. Krylow, H.R. Bode y R.E. Steele. 1988. Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 7927-7931.
- Boutet, I., A. Tanguy, S. Rousseau, M. Auffret y D. Moraga. 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress and Chaperones*, 8: 76-85.
- Breitenbach, J.E. y H.J.R. Popham. 2013. Baculovirus replication induces the expression of heat shock proteins in vivo and in vitro. *Archives of Virology*, 158: 1517-1522.

- Cáceres-Martínez, J.A. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 22: 711-714.
- Calabria, G., O. Dolgova, C. Rego, L.E. Castañeda, E.L. Rezende, J. Balanyà, M. Pascual, J.G. Sørensen, V. Loeschcke y M. Santos. 2012. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 25: 691-700.
- Campbell, N.R. y S.R. Narum. 2008. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in Chinook salmon and variation among life history types. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137: 96-106.
- Carpenetti, T.L.G., A. Aryan, K.M. Myles y Z.N. Adelman. 2012. Robust heat-inducible gene expression by two endogenous hsp70-derived promoters in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 21: 97-106.
- Casas, S.M., J.F. La Peyre, K.S. Reece, C. Azevedo y A. Villalba. 2002. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52: 217-231.
- Castro-Longoria, R., T. Rhen, J.M. Grijalva-Chon, R. Vazquez, E. Ramírez-González, J.F. Ramírez-Villa, M.R. Acedo-Valdez y L.E. Costich-González. 2013. Sistemas de línea ajustable para cultivo de ostión en Sonora: una alternativa para la producción sostenible. *Panorama Acuícola*, 18: 8-12.
- Chávez-Villalba, J., R. Villelas-Ávila y C. Cáceres-Martínez. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquaculture Research*, 38: 268-278.
- Clark, M.S., K.P.P. Fraser y L.S. Peck. 2008. Lack of an HSP70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates. *Polar Biology*, 31: 1059-1065.
- Colson-Proch, C., A. Morales, F. Hervant, L. Konecny, C. Moulin y C.J. Douady. 2010. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. *Cell Stress and Chaperones*, 15: 259-270.
- Corporeau, C., G. Vanderplancke, M. Boulais, M. Suquet, C. Quéré, P. Boudry, A. Huvet y S. Madec. 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*, 75: 5554-5563.
- Curole, J.P. y D. Hedgecock. 2005. Estimation of preferential pairing rates in second-generation autotetraploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Genetics*, 171: 855-859.

- Dalvi, R.S., A.K. Pal, L.R. Tiwari y K. Baruah. 2012. Influence of acclimation temperature on the induction of heat-shock protein 70 in the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 919–927.
- Daugaard, M., M. Rohde y M. Jäätelä. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581: 3702–3710.
- Dong, Y.W., T.T. Ji, X.L. Meng, S.L. Dong y W.M. Sun. 2010. Difference in thermotolerance between green and red color variants of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Hsp70 and heat-hardening effect. *The Biological Bulletin*, 218: 87–94.
- Dundon, W. G., I. Arzul, E. Omnes, M. Robert, C. Magnabosco, M. Zambon y G. Arcangeli, 2011. Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture*, 314: 49–52.
- Enríquez-Espinoza, T.L. y J.M. Grijalva-Chon. 2010. Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*, 36: 333–344.
- Enríquez-Espinoza, T.L., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria y J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 269–73.
- Farcy, E., C. Voiseux, J.M. Lebel y B. Fiévet. 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*, 14: 371–380.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. State of world aquaculture. FAO Fish Tech Pap 500. FAO, Roma. Disponible en www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm
- FAO. 2012. FIGIS. FishStat (Database). (Última actualización: 31 Ene 2014) Accesado (1 Jun 2014). URL: <http://data.fao.org/ref/babf3346-ff2d-4e6c-9a40-ef6a50fcd422.html?version=1.0>
- FAO. 2008-2013. Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets. Text by Jean – Francois Pulvenis. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm>. Actualizado 9 de Julio del 2012. [Citado el 12 de marzo del 2013].
- Fuke, S., S. Suo, N. Takahashi, H. Koike, N. Sasagawa y S. Ishiura. 2001. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *The Pharmacogenomics Journal*, 1: 152–156.

- Gao, J., S. Xiao, X. Liu, L. Wang, Q. Ji, D. Mo y Y. Chen. 2014. Inhibition of HSP70 reduces porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in vitro. *BMC Microbiology*, 14: 64.
- GIIMB (Grupo Interinstitucional de Investigación en Moluscos Bivalvos). 2007. Determinación de agentes causales de alta mortalidad en los cultivos del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, de las costas de sonora. Informe Final SAGARPA/Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Gosling, E. 2003. Genetics in aquaculture. Bivalve Molluscs, Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books, Blackwell, Oxford. pp. 443.
- Gourdon, I., L. Gricourt, K. Kellner, P. Roch y J.M. Escoubas. 2000. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Sequence: The Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 11: 265–270.
- Hamdoun, A.M., D.P. Cheney y G.N. Cherr. 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *The Biological Bulletin*, 205: 160–169.
- Hedgecock, D., P.M. Gaffney, P. Gouletquer, X. Guo, K. Reece y G.W. Warr. 2005. The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*, 24: 429–441.
- Hofmann, G.E., B.A. Buckley, S. Airaksinen, J.E. Keen y G.N. Somero. 2000. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae). *The Journal of Experimental Biology*, 203: 2331–2339.
- Hooper, P.L., L.E. Hightower y P.L. Hooper. 2012. Loss of stress response as a consequence of viral infection: implications for disease and therapy. *Cell Stress and Chaperones*, 17: 647–655.
- Jackson, S.A., K.R. Uhlinger y J.S. Clegg. 2011. Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of hsp/hsc70 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 317: 168–174.
- Kalosaka, K., E. Soumaka, N. Politis y A.C. Mintzas. 2009. Thermotolerance and HSP70 expression in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Journal of Insect Physiology*, 55: 568–573.
- Kang, S.G., K.S. Choi, A.A. Bulgakov, Y. Kim y S.Y. Kim. 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: 1–21.

- Kang, J.H., K.H. Yu, J.Y. Park, C.M. An, J.C. Jun y S.J. Lee. 2011a. Allele-specific PCR genotyping of the HSP70 gene polymorphism discriminating the green and red color variants sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Genetics and Genomics*, 38: 351–355.
- Kang, J.H., S.A. Appleyard, N.G. Elliott, Y.J. Jee, J.B. Lee, S.W. Kang, M.K. Baek, Y.S. Han, T.J. Choi y Y.S. Lee. 2011. Development of genetic markers in abalone through a SNP database construction. *Animal Genetics*, 42: 309–315.
- Kawabe, S. y Y. Yokoyama. 2011. Novel isoforms of heat shock transcription factor 1 are induced by hypoxia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 315: 394–407.
- King, M. 2000. *Human Blood Cells: Consequences of Genetic Polymorphisms and Variations*. Imperial College Press, River Edge, NJ. Pp 407.
- Konermann, L. 2012. *Protein Unfolding and Denaturants*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kresfelder, T.L., N. Claassen y M.J. Cronjé. 2006. Hsp70 Induction and hsp70 Gene polymorphisms as Indicators of acclimatization under hyperthermic conditions. *Journal of Thermal Biology*, 31: 406–415.
- Lahaye, X., A. Vidy, B. Fouquet y D. Blondel. 2012. Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection. *Journal of Virology*, 86: 4743–4751.
- Launey, S. y D. Hedgecock. 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159: 255–265.
- Leong, D.T., A. Bai, H.F. Gupta, G. Wan, L.F. Yoong, H.-P. Too y D.W. Hutmacher, 2007. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*, 28: 203–210.
- Li, Y., J.G. Qin, C.A. Abbott, X. Li y K. Benkendorff. 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293: 2353–2362.
- Li, Y., O. Monroig, L. Zhang, S. Wang, X. Zheng, J.R. Dick, C. You y R.T. Douglas. 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 16840–16845.
- Li, Q., J. Han, F. Du, Z. Ju, J. Huang, J. Wang, R. Li, C. Wang y J. Zhong. 2011. Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports*, 38: 2657–2663.

- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lim, D.K.Y., S. Garg, M. Timmins, E.S.B. Zhang, S.R. Thomas-Hall, H. Schuhmann, Y. Li y P.M. Schenk. 2012. Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PloS One*, 7: e40751.
- Liu, Y., L.M. Gierasch e I. Bahar. 2010. Role of Hsp70 ATPase domain intrinsic dynamics and sequence evolution in enabling its functional interactions with NEFs. *PLoS computational biology*, 6: e1000931.
- López-Flores, I., R. Herrán, M.A. Garrido-Ramos, J.I. Navas, C. Ruiz-Rejón y M. Ruiz-Rejón. 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, 129: 411–419.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección 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. pp. 91–100.
- Malyshev, I. 2013. The Functions of HSP70 in Normal Cells. *Springer Briefs in Biochemistry and Molecular Biology*, 6: 15-29.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J.-P. Malas y M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research*, 160: 25–31.
- Martenot, C., S. Fourour, E. Oden, A. Jouaux, E. Travaillé, J.P., Malas y M. Houssin. 2012. Detection of the OsHV-1 μ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture*, 338-341: 293-296.
- Martinez-Porchas, M. y L.R. Martinez-Cordova. 2012. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*, 2012: 389623
- Montero-Barrientos, M., R. Hermosa, R.E. Cardoza, S. Gutiérrez, C Nicolás y E. Monte. 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases Arabidopsis resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 167: 659–665.
- Mycko, M.P., H. Cwiklinska, A. Walczak, C. Libert, C.S. Raine y K.W. Selmaj. 2008. A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *European Journal of Immunology*, 38: 1999–2013.
- Narum, S.R. y N.R. Campbell. 2010. Sequence divergence of heat shock genes within and among 3 Oncorhynchids. *The Journal of Heredity*, 101: 107–112.

- Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2008. Lehninger principles of biochemistry. Nueva York: W. H. Freeman. pp. 1119.
- Nollen, E.A. y R.I. Morimoto. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115: 2809–2816.
- Ortíz-Arellano, M.A. y J. Salgado-Barragán. 2012. Capítulo III. Mollusca. En: Low Pfeng, A.M. y Peters Recagno, E.M. (Eds.). *Invertebrados marinos exóticos en el Pacífico mexicano*. Geomare, A. C., INE-SEMARNAT. México.
- Paniagua-Chávez, C.G. y M. Acosta-Ruiz. 1995. Desarrollo Gonadal de *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 21: 225–242.
- Park, H.S., W.J. Jeong, E. Kim, Y. Jung, J.M. Lim, M.S. Hwang, E.J. Park, D.S. Ha y D.W. Choi. 2012. Heat shock protein gene family of the *Porphyra seriata* and enhancement of heat stress tolerance by PsHSP70 in *Chlamydomonas*. *Marine Biotechnology*, 14: 332–342.
- Pennarossa, G., S. Maffei, M.M. Rahman, G. Berruti, T.A.L. Brevini y F. Gandolfi. 2012. Characterization of the constitutive pig ovary heat shock chaperone machinery and its response to acute thermal stress or to seasonal variations. *Biology of Reproduction*, 87: 1-9.
- Piano, A., C. Asirelli, F. Caselli y E. Fabbri. 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress and Chaperones*, 7: 250–257.
- Ravaux, J., J.Y. Toullec, N. Léger, P. Lopez, F. Gaill y B. Shillito. 2007. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: characterization and sequence analysis. *Gene*, 386: 162–172.
- Renault, T. y I. Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe : specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24: 161–167.
- Richter, K., M. Haslbeck y J. Buchner. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40: 253–266.
- Roberts, S., G. Goetz, S. White y F. Goetz. 2009. Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 11: 24–44.
- Roberts, R. J., C. Agius, C. Saliba, P. Bossier y Y.Y. Sung. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases*, 33: 789–801.

- Russell, A.I., D.S. Cunninghame, C. Shepherd, C. Robertson, J. Whittaker, J. Meeks y T.J. Vyse. 2004. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Human Molecular Genetics*, 13: 137–147.
- Samain, J.F. 2011. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources*, 24: 227–236.
- Sauna, Z.E., I.-W. Kim y S.V. Ambudkar. 2007. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39: 481–487.
- Segarra, A., J.F. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury y T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153: 92-99.
- Selvakumar, S. y P. Geraldine. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 140: 209–215.
- Silva, K. y J. Borges. 2011. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. *Protein and Peptide Letters*, 18: 132–142.
- Spriggs, K.A, M. Bushell y A.E. Willis. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular Cell*, 40: 228–237.
- Stillman, J.H. y A. Tagmount. 2009. Seasonal and latitudinal acclimatization of cardiac transcriptome responses to thermal stress in porcelain crabs, *Petrolisthes cinctipes*. *Molecular Ecology*, 18: 4206–4226.
- Swynghedauw, B. 1998. *Molecular Cardiology for the Cardiologist*. 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp 250.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thompson, E.L., D.A. Taylor, S.V. Nair, G. Birch, R. Coleman y D.A. Raftos. 2012. Optimal acclimation periods for oysters in laboratory-based experiments. *Journal of Molluscan Studies*, 78: 304–307.

- Tine, M., F. Bonhomme, D.J. McKenzie y J.-D. Durand. 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimated to a range of environmental salinities. *BMC Ecology*, 10: 1-8.
- Tissieres, A., H.K. Mitchell y U.M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84: 389-398.
- Tomanek, L. y G.N. Somero. 2002. Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 677-685.
- Valenzuela-Muñoz, V., J.M. Araya-Garay y C. Gallardo-Escárate. 2013. SNP discovery and High Resolution Melting Analysis from massive transcriptome sequencing in the California red abalone *Haliotis rufescens*. *Marine Genomics*, 10: 11-16.
- Wang, B., F. Li, B. Dong, X. Zhang, C. Zhang y J. Xiang. 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 8: 491-500.
- Wei, T., Y. Sun, G. Shi, R. Wang y T. Xu. 2012. Characterization and SNP variation analysis of a HSP70 gene from miiuy croaker and its expression as related to bacterial challenge and heat shock. *Fish and Shellfish Immunology*, 33: 632-640.
- Williams, G.C. 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ. Pp 200.
- Willmund, F., M. Alamo y S. Pechmann. 2013. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. *Cell*, 152: 196-209.
- Witt, S.N. 2010. Hsp70 molecular chaperones and Parkinson's disease. *Biopolymers*, 93, 218-228.
- Wojtasik, B. y D.K. Wiśnik. 2012. Temperature shock tolerance and heat shock proteins in Arctic freshwater ostracod *Candona rectangulata* – preliminary results. *Polish Polar Research*, 33: 199-206.
- Xiao, S., J. Jia, D. Mo, Q. Wang, L. Qin, Z. He y Y. Chen. 2010. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS One*, 5: e11377.
- Yang, C., L. Wang, J. Wang, Q. Jiang, L. Qiu, H. Zhang y L. Song. 2014. The Polymorphism in the Promoter of HSP70 Gene Is Associated with Heat Tolerance of Two Congener Endemic Bay Scallops (*Argopecten irradians irradians* and *A. i. concentricus*). *PLoS One*, 9: e102332.

- Yeh, S.-P., Y.-N. Chen, S.-L. Hsieh, W. Cheng y C.-H. Liu. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 582–588.
- Yueh, A. y R. Schneider. 2000. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes and development*, 14: 414–421.
- Zeng D., X. Chen, Y. Li, M. Peng, N. Ma y W. Jiang. 2008. Analysis of Hsp70 in *Litopenaeus vannamei* and detection of snps. *Journal of Crustacean Ecology*, 28: 727–730.
- Zerebecki, R.A. y C.J.B. Sorte. 2011. Temperature tolerance and stress proteins as mechanisms of invasive species success. *PloS one*, 6, e14806.
- Zhang, F., K. Jiang, M. Sun, D. Zhang y L. Ma. 2013. Multiplex immune-related genes expression analysis response to bacterial challenge in mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 712–716.

ANEXO 1
Listado de Genotipos

Genotipo 1

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 2

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 3

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 4

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 5

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGTGCGAT
AAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGAACATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAGT
TCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 6

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTGAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGTAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAA
CGGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCG

ATAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGA
GTTTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 7

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACGACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 8

GTGGTGCTGATGGGGTTCAACCAAACCTCGCGTTCCTTCTGTTCTGCTCGGACATCCTTGTAGGTGTGTTGATCC
AGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGCCTTGA
GTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTCATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCTGC
TCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGCTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTGTC
AACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAATG
CCACTTGTAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAAATCAGCTCGGAGTTTGAAGTCAGT
TGTTGACAAGTGTGATGGACGCTCTCGCGGTACACCAGAACAACCTGGCCGACGTAGTATCTCGAGATATAGT
GAAGGTCTTCGTGGGTTTCTTTGGAACGGTGGTGCTAA

Genotipo 9

GTGGTGCTGATGGGGTTCAACCAAACCTCGCGTTCCTTCTGTTCTGCTCGGACATCCTTGTAGGTGTGTTGATCC
AGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGCCTTGA
GTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTCATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCTGC
TCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGCTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTGTC
AACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAATG
CCACTTGTAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAAATCAGCTCGGAGTTTGAAGTCAGT

TGTTGACAAGTGTGTCATGGACGCTCTCGCGGATACACCAGAACAACCTGGCCACGTAGTATCTCGAGATATAGTG
AAGGTCTTCGTGGGTTTCTTTGGAACGGTGGTGCTAA

Genotipo 10

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 11

GTGGTGCTGATGGGGTTCAACCAAACCTCGCGTTCCTTCTGTTCTGCTCGGACATCCTTGTAGGTGTGTTGATCC
AGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGTCCTTGA
GTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTCATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCTGC
TCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGTTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTGTC
AACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAATG
CCACTTGTAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAAATCAGCTCGGAGTTTCGAAGTCAGT
TGTTGACAAGTGTGTCATGGACGCTCTCGCGGGTACACCAGAACAACCTGGCCACGTAGTATCTCGAGATATAGT
GAAGGTCTTCGTGGGTTTCTTTGGAACGGTGGTGCTAA

Genotipo 12

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCATAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 13

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAATAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAGCCCCATCTCACCAA

Genotipo 14

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 15

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 16

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 17

GAGCTACAGAAGGGGTTCAACCAAACTCGCGTTCCTTCTGTTCTGCTCGGACATCCTTGATAGGTGTGTTGATC
CAGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGCCTTG
AGTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCT
GCTCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGCTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTG
TCAACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAAT
GCCACTTGTAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAATCAGCTCGGAGTTTCGAAGTCAG
TTGTTGACAAGTGTGATGGACGCTCTCGCGGATACACCAGAACAACCTGGCCCATTTAGTATCTCGAGATATAGT
GAAGGTCTTCGTGGGTTTCTTTGGAACGGTGGTGCTAA

Genotipo 18

GAGAATGACCACCATTCCAACCAAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 19

GTGGTGCTGATGGGGTTCAACCAAACCTCGCGTTCCTTCTGTTTCGTGCTCGGACATCCTTGATAGGTGTGTTGATCC
AGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGTCCTTGA
GTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTCATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCTGC
TCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGCTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTGTC
AACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAATG
CCAATTGTAAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAATCAGCTCGGAGTTTCGAAGCCAGT
TGTTGACAAGTGTGATGGACCCTCTCGTGGATACACCAGAACAACCTGGCCACGTAGTATCTCGAGATATAGTG
AAGGTCTTCGTGGGTTTCTTTGGAACGGTGGTGCTAA

Genotipo 20

GGGAGACACCAGCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGCACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAACACAAGCAGGAAAACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 21

GTGGTGCTGATGGGGTTCAACCAAACCTCGCGTTCCTTCTGTTTCGTGCTCGGACATCCTTGATAGGTGTGTTGATCC
AGGCGTTCCTACTGAGTGATCTCCTCAAACATGTACAACATTGTCTTCGTGAAGCCCTCGCTGATTGTGTCCTTGA
GTTTCTAGTCATGGACCCAGATTGATGTCACATGTGTCATCCAACCCATCCTTGGCTTCGATGCTCTCACTCTGC
TCCACATGTTACTACTTCTATTTCTCCGCTTCATAGGACAACGGTCGCTTCAATACTTATTGAAGCGACCGTTGTC
AACGAAACTGATGATTTTATTACGTTTACTATGATCAGCGGCTGAGACTTTCAGGATAGCATTGGCTTGAATG
CCAATTGTAAACGAAATCCAGGGCAGATGCCTAGGTGCTGAGGATAAAATCAGCTCAGAGTTTCGAAGTCAGT

TGTTGACAAGTGTCATGGACGCTCTCGCGGGTACACCAGAACAACCTGGCCGACGTAGTATCTCGTGATATAGT
GAAGGTATTCGAGGGAGTCTGTAACACGATCTCACCAA

Genotipo 22

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 23

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGTAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 24

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGTTGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 25

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGTCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGAAAAGTTCGAGCTGACTGGATCCC
CCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCGC
TGTCGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTGA
CCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAAACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAACG
GGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGATA
AGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAGTT
CGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 26

CACCAAGACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
AGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGAAAAGTTCGAGCTGACTGGATCCC
CCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATTCTGGATGTGTCAGC
AGTCGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTGA
CCCTTGTCAACGAAGCTTAGAAAACAAGCAGGAAGACGAGAAGTAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAACG
GGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGATA
AGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAGTT
CGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 27

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGAAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAAACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 28

ATTCTACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATTC
AGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCCC
CCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCGC
TGTCGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTGA
CCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAAACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 29

GAGAAACACCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATT
CAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGCTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAAACGAGAAGTAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAAGACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 30

GTGAGACACCACGGGTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGGGTTGAT
TCAGGTGTATGAGGCAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA

TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

Genotipo 31

GAGAAACAGCACCATTCCAACCAAACACGCAGACCTTCACCACATACTCCGACAACCAACCAGGTGTGTTGATG
CAGGTGTATGAGGGAGAGCGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTACTCGGAAAGTTCGAGCTGACTGGATCC
CCCCGCACCCAGGGGTGTGCCCCAGATTGAGGTCACATTTGACATTGATGCCAACGGTATCCTGAATGTGTCCG
CTGTGACCCACAGGAAAGGAGAACAAAATCACCATTACCAATGACAAAGGTCGCCTCAGCAAGGATGAAATTG
ACCGTTGTCAACGAAGCTTAGAAATACAAGCAGGAAGACGAGAAGCAGCGTGAGAGGATCGCAGCCAAGAAC
GGGTTGGAATACGCCTTCAACATGAAATCCACCGTCGATGACGAGAACTCAGGACAAGATCAGCGGGGCGA
TAAGAACACAATCCTTGACAAGTGTGAGAGATCATCAAGTGGATGGACCAGAACAACCTGGCCGACGGAGGAG
TTCGAGACAAACAGAAGGAACTGGAGGGAGTCTGTAACCCCATCTCACCAA

ANEXO 2

Desglose de Resultados Experimentales

Muestra	Genotipo	Número de transcritos de <i>Hsp70</i> /μL	Criterio M1	Criterio M2
I 1	G1	10692	Bajo	Bajo
V 16	G2	76561	Medio	Medio
V 20	G2	374833	Alto	Alto
V 27	G2	65361	Bajo	Medio
P 9	G2	23471	Bajo	Bajo
P 26	G2	28765	Alto	Bajo
I 3	G2	2483	Bajo	Bajo
I 18	G2	145523	Alto	Alto
V 6	G3	135347	Medio	Alto
V 11	G3	24831	Bajo	Bajo
V 17	G3	71948	Medio	Medio
V 19	G3	240501	Medio	Alto
V 22	G3	216759	Medio	Alto
V 23	G3	222525	Medio	Alto
V 30	G3	78291	Medio	Medio
P 3	G3	257126	Alto	Alto
P 8	G3	54749	Medio	Medio
P 13	G3	90910	Alto	Medio
P 21	G3	45692	Alto	Bajo
P 24	G3	279514	Alto	Alto
I 9	G3	29668	Medio	Bajo
I 10	G3	6296	Bajo	Bajo
I 20	G3	24356	Medio	Bajo
I 26	G3	103189	Alto	Medio
I 30	G3	61771	Medio	Medio
V 24	G4	296474	Alto	Alto
P 5	G4	4450	Bajo	Bajo
P 20	G4	368727	Alto	Alto
I 15	G4	22558	Medio	Bajo
I 29	G4	2893	Bajo	Bajo
I 16	G5	36601	Medio	Bajo
I 19	G6	114417	Alto	Medio
I 21	G7	75001	Alto	Medio
I 22	G8	156378	Alto	Alto
P 2	G9	157396	Alto	Alto
P 15	G9	130598	Alto	Medio

Muestra	Genotipo	Número de transcritos de <i>Hsp70</i> /μL	Criterio M1	Criterio M2
P 4	G10	75306	Medio	Medio
P 7	G11	75374	Medio	Medio
P10	G12	57056	Medio	Medio
V 29	G13	94438	Medio	Medio
P 11	G13	36941	Bajo	Bajo
P 14	G14	103257	Alto	Medio
P 16	G15	84159	Alto	Medio
P 25	G15	19912	Alto	Alto
P 22	G16	260178	Alto	Alto
V10	G17	7673	Bajo	Bajo
P 23	G18	33277	Alto	Bajo
P 27	G18	32870	Bajo	Bajo
P 28	G19	21065	Bajo	Bajo
P 30	G20	69268	Medio	Medio
V 1	G21	354141	Alto	Alto
V 2	G22	56717	Bajo	Medio
V 3	G23	284602	Alto	Alto
V 8	G24	115265	Medio	Medio
V 9	G25	260178	Alto	Alto
V 12	G26	852	Bajo	Bajo
V 13	G27	132973	Medio	Medio
V 14	G28	453192	Alto	Alto
V 15	G29	286298	Alto	Alto
V 18	G30	411706	Alto	Alto
V 25	G31	276122	Alto	Alto