CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

TRANSCRIPTÓMICA ASOCIADA A LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y AL ARRESTO MEIÓTICO EN *Nodipecten subnodosus*

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en acuicultura)

Presenta

Pavel Eduardo Galindo Torres

La Paz, Baja California Sur, febrero del 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 17 del Mes de enero del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Transcriptómica asociada a la diferenciación sexual y al arresto meiótico en *Nodipecten subnodosus*."

Presentada por el alumno:

Pavel Eduardo Galindo Torres

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

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

LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Co-director de Tesis

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Co-director de Tesis

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Co-Tutor

Dr. Cei Abreu Goodger
Co-Tutor

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de comités

Comité Tutorial

Co-Directoras

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

Co-Tutores

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Cei Abreu Goodger

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Comité Revisor de Tesis

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

Dr. Cei Abreu Goodger

Jurado de Examen

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dr. Raúl Llera Herrera.

Dr. Pedro Cruz Hernández

Suplente

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Resumen

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, representa un recurso pesquero de importancia a lo largo de la costa del Pacífico, en la península de Baja California, México. Su valor económico se debe al gran tamaño de su músculo aductor, que va desde 65 a 108 g en adultos silvestres, situándolo como un recurso potencial acuícola. Es un molusco hermafrodita funcional, en el cual ambos gametos maduran simultáneamente, aunque la región testicular inicia primero su desarrollo. A diferencia de otros moluscos, en *N. subnodosus* la inducción a la triploidía resulta en una esterilidad total que representa un obstáculo cuando se busca generar organismos tetraploides para la producción de triploides biológicos, ya que la inducción a tetraploidía depende de primero contar con triploides fértiles en cierto grado. Una de las hipótesis con mayor aceptación sugiere que esta condición de esterilidad podría ser el resultado de la activación de genes de control -*checkpoints*- de errores durante la meiosis I, los cuales verifican la integridad del genoma, y en su caso inducen un arresto meiótico cuando esta última se ve comprometida. Dado que la presencia de ambos sexos en un único saco gonadal resulta de interés, el presente estudio se centró por una parte en la identificación de genes que participan en la determinación y/o diferenciación sexual de cada región sexual de la gónada (testículo y ovario) y, por otro lado, en la identificación de genes que inducen el arresto meiótico en organismos triploides. Además, se exploró mediante dsRNA la función de los genes blanco *dmrt1 y p33 ringo* cuya función ha sido asociada a la diferenciación sexual y al control del ciclo celular respectivamente, así como de un control positivo *gapdh*, en ambos casos empleando ARN de doble cadena (dsRNA). Para el primer objetivo, se secuenció ARN (Illumina MiSeq) a partir de dos estadios de desarrollo (larva con mancha y semilla 3mm), dos tejidos somáticos (músculo aductor y glándula digestiva) y tejido gametogénico representado por la gónada indiferenciada completa, seguido de una reconstrucción *de novo* del transcriptoma. Del conjunto de genes con anotación ontológica ligada a determinación y/o diferenciación sexual, se seleccionaron diez genes y fueron evaluados por PCR punto final. Cinco de estos genes: *Ns-dmrta2*, *Ns-sox9*, *Ns-wnt4*, *Ns-sfrp2* y *Ns-sex-1*, mostraron expresión mayormente en la región testicular, lo que sugiere una participación en la determinación y/o diferenciación sexual de la región masculina de la gónada. Interesantemente, el gen, *Ns-sex-1* es ortólogo del nemátodo *C. elegans sex-1* que se expresa en el desarrollo temprano durante la determinación del sexo, el cual da lugar a la condición hermafrodita del nemátodo. Para el segundo objetivo, se secuenció ARN (Illumina NexSeq500) de gónada en la etapa de gametogénesis inactiva e inicial tanto en organismos diploides (2n) como triploides (3n). Para cada condición de ploidía se realizaron análisis de expresión génica diferencial para identificar los genes que se activan durante la gametogénesis inicial. En organismos diploides se encontraron genes asociados a la recombinación homóloga (*msh5* y *kdm8*), organización del huso (*nup62*), formación del centrosoma (*cenp-T*), y diferenciación sexual (*Ns-dmta2* y *pum3*). Interesantemente, el gen *Ns-dmrta2*, involucrado en la diferenciación sexual se encontró altamente expresado. Este gen mostró previamente ser testículo específico, lo que confirma que es uno de los genes más importantes que participan en los eventos de diferenciación sexual en la región testicular de este molusco. En contraste, en organismos triploides (3n), se encontraron genes implicados en la respuesta al daño del ADN y reparación de rupturas de doble cadena

(*rad51*, *xpc*, *myoVI*), en la transición de metafase/anafase de la mitosis (*slp1* y *nuf2*), así como inductores y ejecutores de la apoptosis (*caspase-3*, *icad/dffa*, *bmcc1/prun2*). Los resultados observados en organismos triploides al inicio de la gametogénesis sugieren un daño al ADN significativo, probablemente como consecuencia de una reparación fallida de las rupturas de doble cadena durante la replicación del ADN. Estos resultados coinciden con las observaciones previas en las cuales pocos organismos triploides muestran un desarrollo más allá de ovogonia o espermatogonia. Finalmente, el silenciamiento génico por ARN de doble cadena para los genes *dmrt1*, *p33 ringo Speedy* y *gapdh* no mostró disminución del transcrito en ninguno de los genes comparado con los controles. Este resultado coincide con el hecho de que hasta el momento en moluscos se han reportado pocos estudios exitosos empleando dsRNA, lo que podría traducirse en las dificultades de interrogar genes empleando dsRNA en moluscos, incluyendo *N. subnodosus.*

Palabras clave: RNA-Seq, genes ováricos-testiculares, triploidía, meiosis, esterilidad, daño del ADN, estrés durante replicación del ADN, moluscos.

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Vo. Bo

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Vo. Bo

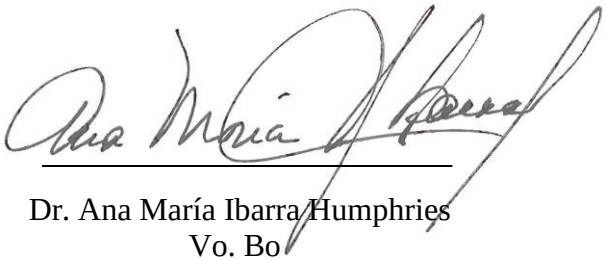
Co-Directoras

Summary

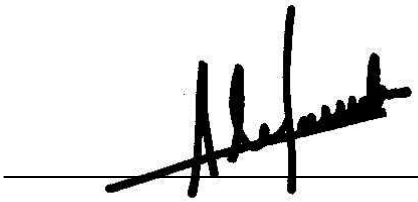
The lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, represents an important fishery resource along the Pacific coast of the Baja California Peninsula in Mexico. Its economic value is due to its large adductor muscle, ranging from 65 to 108g in wild adults placing it as a potential resource for aquaculture. This scallop is a functional hermaphrodite, in which both male and female gametes mature simultaneously, though the testis begins developing first. Unlike other mollusks, in *N. subnodosus* triploid induction results in total sterility, which represents a problem when the objective is to generate tetraploid scallops for the production of biological triploids, since the induction to tetraploid depends on first having partially fertile triploids. One of the most accepted hypotheses suggests that this condition of sterility could be the result of activation of control *checkpoint* genes during meiosis I. Such genes verify the genome integrity, and if necessary, lead to a meiotic arrest when the genome integrity is compromised. Since the presence of both sexes in a single gonadal sac is of interest, the present work was focused firstly on the identification of genes participating in the sexual determination and/or differentiation of each sexual region of the gonad (testis and ovary) and, second in finding genes that might lead to a meiotic arrest in triploid organisms. Furthermore, the functions of selected target genes, *dmrt1* and *p33 ringo*, was explored through dsRNA; their functions are associated with sex differentiation and cell cycle control, including a positive control gene (*gapdh*) in both cases. For the first goal, RNA samples from two developmental stages (eyed-larvae and 3mm spat), two somatic tissues (adductor muscle and digestive gland), and gametogenic tissue represented by the whole undifferentiated gonad were sequenced (Illumina MiSeq), followed by a *de novo* transcriptome assembly. Among the set of genes with ontological annotation associated to sex determination and/or differentiation, ten genes were selected for further evaluation by end-point PCR. Five of those genes: *Ns-dmrta2*, *Ns-sox9*, *Ns-wnt4*, *Ns-sfrp2*, and *Ns-sex-1* showed a mostly testicular expression, which suggest that they might be participating in sex determination and/or differentiation of the testis. Interestingly, the gene, *Ns-sex-1* is an ortholog of the nematode *C. elegans sex-1*, which is expressed early in the development when sex determination takes place, resulting in the hermaphrodite condition of the nematode. For the second goal, RNA from gonad tissue in inactive and initial stages of gametogenesis stages were sequenced (Illumina NexSeq500 system) in both diploid (2n) and triploid (3n) scallops. Differential gene expression analyses were performed within ploidy in order to discover the genes that are activated during initial gametogenesis. In diploids, genes associated with homologous recombination during meiosis (*msh5* and *kdm8*), spindle organization (*nup62*), centrosome formation (*cenp-T)*, and sex differentiation (*Ns-dmta2* and *pum3*), were found. Interestingly, *Ns-dmrta2*, a gene involved in sex differentiation was found highly expressed. This gene previously showed to be testis specific, which confirms that it is one of the most important genes participating in sex differentiation events in the testicular region of this mollusk. Conversely, in triploid organisms, genes involved in DNA damage response and double strand break repair (*rad51-C*, *xpc*, *myoVI*), in the transition of metaphase/anaphase of mitosis (*slp1* and *nuf2*), as well as genes that trigger and execute apoptosis (*caspase-3*, *ica/dffa*, *bmcc1/prun2)* were found. The results for initial gametogenesis in triploids point towards significant DNA damage, possibly as a consequence of a failure to repair large numbers of double-strand

breaks during DNA replication. This coincides with previous observations in which few triploid scallops showed gametic stages farther than oogonia or spermatogonia. Finally, the genetic silencing by double-stranded RNA for the *dmrt1*, *p33 ringo Speedy*, and *gapdh* genes did not show a decrease in expression of any of the genes when compared with the controls. So far, few successful studies using mRNAs in mollusks have been reported, which could translate into difficulties to interrogate genes using dsRNA in mollusks, including *N. subnodosus*.

Key words: RNA-Seq, ovarian-testicular genes, triploidy, meiosis, sterility, DNA damage, stress during DNA replication, mollusk.



Dr. Ana María Ibarra Humphries
Vo. Bo



Dr. Silvia Alejandra García Gasca
Vo. Bo

Co-Directoras

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado con mucho cariño para mi hijo Alan Galindo, para mi esposa Verónica De La Vega y para toda mi familia.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. y a todo el personal perteneciente a la Dirección de Estudios de Posgrado por atender a las solicitudes de apoyos para realizar estancias de investigación así como para la impresión de este documento de tesis. Externo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado asignada con número de registro 260432.

Al proyecto SEP-CONACyT 166573. "Genómica del molusco *Pectínido Nodipecten subnodosus* en condición diploide y triploide: Mecanismos genéticos de determinación sexual, del control de la fidelidad de la meiosis y del crecimiento muscular".

Agradezco ampliamente a mis co-directoras: la Dra. Ana María Ibarra Humphries por brindarme apoyo académico de excelencia y, por proporcionarme todos los recursos necesarios para mi formación y la realización de este trabajo. Por sus clases de genética cuantitativa. Además, agradezco sus consejos en las situaciones difíciles durante la realización de este trabajo. Estaré siempre en deuda. A la Dra. Alejandra García Gasca por brindarme de igual forma los recursos necesarios para la realización de este trabajo, y por las muchas sugerencias para el desarrollo de la tesis. A mis co-tutores: al Dr. Raúl Llera Herrera por las oportunas sugerencias y/o recomendaciones para hacer que este trabajo se desarrollara de la mejor forma. Además agradezco sus valiosas aportaciones en el desarrollo de librerías y cuestiones bioinformáticas. A la Dra. Cristina Escobedo Fregoso por las tantas recomendaciones para mejorar el trabajo así como por la facilidad en el uso de equipos de laboratorio. Al Dr. Cei Abreu Goodger, que sin duda alguna fomentó en mí el gusto por aprender a programar. Agradezco también toda su ayuda durante el procesamiento y análisis de datos de secuenciación masiva así como por todas las sugerencias durante la realización de este trabajo y escritura de los artículos. Le agradezco también por su trato ameno durante mi estancia en su laboratorio en el Cinvestav Irapuato.

Al responsable del Laboratorio de Genética Acuícola, Susana Avila, quien me proporcionó todos los recursos y realizó todas solicitudes necesarias para la realización de este trabajo.

Agradezco también su ayuda en el procesamiento de muestras para su cuantificación por qPCR. Además le agradezco por los buenos momentos y/o consejos durante mi estadía en el laboratorio, los cuales hicieron de ella muy amena. También agradezco a José Luis Ramírez Arce y su equipo de trabajo, quienes siempre me apoyaron con salidas de campo, en el mantenimiento de organismos durante el experimento de interferencia y en los diversos muestreos realizados durante este trabajo.

Agradezco a Araceli Fernández Cortés por atender mis dudas y solicitudes en el uso del clúster “mazorka” del Cinvestav-Irapuato.

Agradezco al Dr. Pedro Cruz Hernández y al Dr. Ricardo Pérez Enríquez por sus comentarios y sugerencias, así como por su disponibilidad en el préstamo de reactivos y consumibles cuando fue necesario.

Agradezco al Dr. Eduardo Quiroz por hacer posible mi asistencia al congreso internacional “National Shellfisheries Association-Comparative Genomics Workshop”.

A los Dres. Humberto Mejía, Ricardo Vázquez y Dariel Tovar Ramírez por las facilidades prestadas en el requerimiento de equipo de laboratorio y reactivos.

A la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y a Eulalia Meza por su ayuda y pronta disposición en el procesamiento histológico.

A Claudia Ventura López por sus comentarios y recomendaciones, así como por su ayuda en el laboratorio cuando fue requerida. Por ser mi compañera de desvelos durante jornadas largas en el laboratorio y por ser una buena amiga en todo este tiempo.

A Rosa María Morelos Castro, quien desde mi llegada al laboratorio mostró siempre disposición en ayudarme, ofreciéndome recomendaciones que en todos los casos fueron

muy útiles. Además le agradezco su disposición y trato durante mi estancia en el congreso realizado en Mazatlán así como por ser una buena compañera y amiga.

A mis compañeros del laboratorio, Víctor López e Itzia López por su amistad y los momentos amenos en el laboratorio. A Gabriel, Octavio, Adriana, Roberto, Alba y Armando.

A los responsables del laboratorio de cómputo Ing. Horacio Sandoval Gómez e Ing. José Manuel Melero Astorga. Al Ing. Edgar Yuen Salas por el soporte técnico brindado durante mis reuniones de comité.

Resumen ..... **II**
Summary ..... **IV**
Dedicatoria ..... **VI**
Agradecimientos ..... **VII**
Contenido ..... **X**
Lista de figuras ..... **XIII**
Lista de tablas ..... **XVI**

1. INTRODUCCIÓN **1**

2. ANTECEDENTES **6**

2.1 MECANISMOS DE DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN LOS ORGANISMOS MODELO *CAENORHABDITIS ELEGANS* Y *DROSOPHILA MELANOGASTER* 6
2.1.1 Determinación y diferenciación sexual en C. elegans *6*
2.1.2 Determinación y diferenciación sexual en Drosophila melanogaster *9*
2.2 MECANISMOS DE DETERMINACIÓN DEL SEXO EN BIVALVOS 10
2.3 ASPECTOS REPRODUCTIVOS EN *NODIPECTEN SUBNODOSUS* 12
2.3.1 La triploidía como biotecnología y sus consecuencias reproductivas *13*
2.4 GENES DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y DE MEIOSIS CONOCIDOS EN *NODIPECTEN SUBNODOSUS* 14

3. JUSTIFICACIÓN **18**

4. HIPÓTESIS **19**

5. OBJETIVO GENERAL **19**

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES 19

6. MATERIALES Y MÉTODOS **20**

6.1 TRANSCRIPTOMA GLOBAL *DE NOVO* DE *NODIPECTEN SUBNODOSUS* GENERADO A PARTIR DE DIFERENTES EDADES-TEJIDOS (SEMILLA, LARVA CON MANCHA OCULAR, GÓNADA INDIFERENCIADA, GLÁNDULA DIGESTIVA Y MÚSCULO ADUCTOR DE JUVENILES) 20
6.1.1 Material biológico y aislamiento de ARN para la reconstrucción del transcriptoma *20*
6.1.2 Construcción de librerías y secuenciación del transcriptoma *21*
6.1.3 Evaluación de la calidad, ensamblado y predicción de la región codificante *21*
6.1.4 Anotación funcional del transcriptoma *22*
6.1.5. Genes expresados diferencialmente *23*
6.1.6 Enriquecimiento de términos ontológicos (GO) *25*
6.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR PCR PUNTO FINAL PARA TRANSCRITOS ASOCIADOS A LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL 25
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos, obtención del fragmento parcial por PCR y secuenciación subsecuente *25*
6.2.2 Material biológico, asilamiento de ARN y síntesis de ADNc *26*

6.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE GENES DE DETERMINACIÓN/DIFERENCIACIÓN SEXUAL ...29
6.4 IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE ASOCIADOS AL ARRESTO MEIÓTICO EN TRIPLOIDES A TRAVÉS DEL ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO AL INICIO DE LA GAMETOGÉNESIS EN DIPLOIDES Y TRIPLOIDES 31
6.4.1 Material biológico y aislamiento de ARN para la reconstrucción del transcriptoma 31
6.4.2 Calidad de las lecturas, ensamblado e inferencias de las regiones codificantes. 34
6.4.3 Anotación funcional del transcriptoma 34
6.4.4 Análisis de expresión diferencial 34
6.4.5 Análisis de vías KEGG 35
6.5 BLOQUEO ESPECÍFICO DE LOS GENES *DMRT1* Y *P33-RINGO* A TRAVÉS DE DSRNA EN ALMEJAS DIPLOIDES 35
6.5.1. Diseño de oligonucleótidos para generar doble cadena de ARN (dsRNA por sus siglas en inglés) 35
6.5.2 Aislamiento y secuenciación del transcrito parcial del gen de gapdh en Nodipecten subnodosus 36
6.5.3 Material biológico 38
6.5.4 Generación de moldes de transcripción para dmrt1, p33, gapdh y egfp para la síntesis in vitro de ARN de doble cadena 38
6.5.5 Diseño experimental para el silenciamiento génico por dsRNA 40
6.5.6 Validación del silenciamiento por PCR cuantitativo (RT-qPCR) 41

7. RESULTADOS 43

7.1 GENERAR INFORMACIÓN TRANSCRIPTÓMICA *DE NOVO* A PARTIR DE LARVA CON MANCHA OCULAR, SEMILLA, GÓNADA INDIFERENCIADA, GLÁNDULA DIGESTIVA Y MÚSCULO ADUCTOR DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN *N. SUBNODOSUS* 43
7.1.1 Secuenciación del transcriptoma global, reconstrucción y predicción de regiones codificantes 43
7.1.2 Eficiencia en la eliminación de ARN ribosomal 44
7.1.3 Anotación funcional 46
7.1.3 Genes involucrados en procesos de determinación/diferenciación sexual 47
7.1.4 Análisis de expresión diferencial en cada estado o tejido 53
7.1.5 Análisis de enriquecimiento de términos GO para los genes expresados diferencialmente en cada edad-tejido 55
7.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PARA TRANSCRITOS PRESUNTAMENTE ASOCIADOS A LA DETERMINACIÓN / DIFERENCIACIÓN SEXUAL 57
7.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE ASOCIADOS AL ARRESTO MEIÓTICO A TRAVÉS DEL ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DURANTE LA GAMETOGÉNESIS TEMPRANA EN DIPLOIDES Y TRIPLOIDES 59
7.3.1 Secuenciación del transcriptoma, ensamblado y anotación funcional 59
7.3.2 Genes de meiosis en el transcriptoma de Nodipecten subnodosus y sus abundancias en condición diploide y triploide 62
7.3.3 Análisis de expresión diferencial 64

7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INTERFERENCIA POR ARN DE DOBLE CADENA DE LOS GENES *DMRT1* Y *P33 RINGO* EN ORGANISMOS DIPLOIDES 69
7.4.1 Estandarización del uso de $MgCl_2$ como anestésico en N. subnodosus 69
7.4.2 Mortalidad y análisis biométricos desarrollados durante cada muestreo 70
7.4.2 Efecto de la interferencia sobre el peso de la gónada 71
7.4.3 Validación del silenciamiento por PCR en tiempo real 75
8. DISCUSIÓN 78
8.1 ENSAMBLADO DEL TRANSCRIPTOMA GLOBAL Y SU ANOTACIÓN FUNCIONAL 78
8.2 GENES DE DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL 79
8.3 GENES ASOCIADOS CON LA MEIOSIS EN EL TRANSCRIPTOMA DE *NODIPECTEN SUBNODOSUS* Y SUS ABUNDANCIAS EN CONDICIONES DIPLOIDES Y TRIPLOIDES 87
8.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE MEIOSIS EN DIPLOIDES Y TRIPLOIDES 90
8.4.1 Genes que aseguran la progresión correcta del ciclo celular se encontraron sobre-regulados en la etapa inicial de la gametogénesis en organismos diploides 90
8.4.2 La imposibilidad de reparar el daño del ADN resultante de rupturas de la doble cadena desencadena la apoptosis y esto a su vez podría explicar la esterilidad en organismos triploides 93
8.5 SILENCIAMIENTO POR DSRNA DE LOS GENES *DMRT1* Y *P33 RINGO* EN ORGANISMOS DIPLOIDES 99
9. CONCLUSIONES 102
10. LITERATURA CITADA 104
11. ANEXOS 124
Anexo I 124
Anexo II 127
Anexo III 130
Anexo IV 132

Lista de figuras

Figura 1. Macroestructura de la gónada de la almeja mano de león (*N. subnodosus*).....4

Figura 2. Inducción química para la generación de organismos triploides en *N. subnodosus*. CB = Citocalacina B. (Tomado de Ibarra A. M. y Hernández-Ibarra N. K., no publicada)...5

Figura 3. Generación de tetraploides a partir de triploides.....6

Figura 4. Genes involucrados en la regulación de línea germinal. Proteínas son mostradas con la letra inicial en mayúscula; los nombres de los genes son mostrados en itálicas. Interacciones positivas son indicadas con una flecha "→", e interacciones negativas por "-|". Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis. Fog-1, Fog-3 y las proteínas Fem promueven la espermatogénesis en machos X0 (Modificado de Ellis, 2007). 9

Figura 5. Flujo de trabajo general denotando los métodos bioinformáticos y el programa de cómputo empleado en los análisis transcriptómicos. El computo que requirió mayor recurso fue realizado usando el cluster "mazorka" del Cinvestav-Irapuato. 24

Figura 6. Estadios gametogénicos de *Nodipecten subnodosus* seleccionados en este estudio. Estadios gametogénicos para diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F). Gónada de diploide inactiva (A), y triploide inactiva (B), gónada de diploide inicial (C, E) y triploide inicial (D, F). Tejido conectivo = ct; Acino vacío = ea; gonias = g. 33

Figura 7. Diseño experimental para RNAi. (A) Dosis y número de organismos interferidos. N = número total de organismos inyectados por tratamiento. (B) Escala temporal (días) en la cual se realizaron las inyecciones/electroporaciones y las disecciones. 41

Figura 8. Resumen de anotación del transcriptoma global de *N. subnodosus*. (A) Distribución de especies top-hit contra la base de datos Uniref90, mostrado como el porcentaje del total de secuencias homólogas con corte en un valor-E de 1×10^{-5}. (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTx contra la base de datos SwissProt (C) Distribución de la longitud de contigs ensamblados. (D) Distribución del valor-E para los transcritos que tuvieron una identidad contra la base de datos SwissProt, con un valor de corte en 1×10^{-5}. 49

Figura 9. Relación entre la longitud de contigs y la proporción de los mismos con un BLASTx para el transcriptoma global de *N. subnodosus*. NoBlast = no Blastx hits. 50

Figura 10. Análisis filogenéticos de los genes dmrta2 y sox9 (A). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *N. subnodosus* dmrta2/dmrt5 con varias proteínas Dmrt indicando los dominios DM y DMA. Aminoácidos marcados con asterisco representan el módulo CCHC y HCCC Zn2+. (B) Árbol filogenético de secuencias proteicas de Dmrt. (C) Alineamientos de aminoácidos de *N. subnodosus* Sox9 mostrando el dominio HMG con varias proteínas Sox (D) Árbol filogenético de secuencias proteicas Sox. 52

Figura 11. Número de transcritos encontrados expresados en cada edad o tejido, y el número de transcritos compartidos entre ellos. 53

Figura 12. Visualización de genes expresados diferencialmente (en rojo) para cada edad-tejido contrastados con el resto. (A) Larva con mancha ocular; (B) Semilla; (C) Gónada indiferenciada; (D) Número de genes sobre-regulados y sub-regulados. 54

Figura 13. Análisis de enriquecimiento de términos GO para genes Sobre-regulados en cada edad y tejido comparado con el resto (A) = Larva fijadora vs. Resto, (B) = semilla vs. Resto. BP = Proceso Biológico, CC = Componente Celular, MF = Función Molecular. 56

Figura 14. Expresión tisular por PCR punto final para diversos genes de determinación/diferenciación sexual en *N. subnodosus*. El gen ef-α1 fue utilizado como control de referencia. (A) Tejidos de almejas con una gónada inactiva. (B) Tejidos de almejas con una gónada madura. NC = Control negativo. 58

Figura 15. Resumen de anotación del transcriptoma en gónadas de diploides y triploides. (A) Distribución de especies top-hit contra la base de datos Uniref90, mostrando el porcentaje del total de secuencias homólogas con corte en un valor-E de 1×10^{-5}. (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTx contra la base de datos SwissProt. (C) Distribución de la longitud de contigs ensamblados. (D) Distribución del valor-E para los transcritos que tuvieron una identidad contra la base de datos SwissProt, con un valor de corte en 1×10^{-5}. 61

Figura 16. Abundancias de genes de meiosis. Genes seleccionados a partir del transcriptoma con términos GO relacionados a "meiosis/meiotic", "recombination", meiosis checkpoint", "DNA damage response", y "meiotic arrest". (A) Diploides (B) Triploides. TPM = Transcritos por millón. La abundancia es estimada a nivel de gen. 63

Figura 17. Resumen de la anotación del transcriptoma. (A) Diagrama de Venn mostrando el número de transcritos expresados en cada estadio gametogénico por ploidías. (B) Número de genes sobre- y sub regulados en cada contraste. (C) Genes expresados diferencialmente para cada ploidía mostrando transcritos únicos y compartidos (solo se consideraron transcritos anotados).....65

Figura 18. Mapa de calor a través de todas las muestras usando los primeros 55 transcritos que fueron expresados diferencialmente y que además presentaban anotación. (A) Contraste Inicial vs. Inactiva en diploides; (B) Contraste Inicial vs. Inactiva en triploides. 66

Figura 19. Nivel de expresión de algunos genes sobre-regulados en estapa inicial de la gametogeneisis para cada ploidía cuando se compararon las etapas de gónada Inicial vs. Inactiva. (A) Diploides. (B) Triploides. $Log_2FC = Log_2$ de fold-change. Ver tabla VIII para los nombres completos de proteínas. 68

Figura 20. Diseño experimental para evaluación de $MgCl_2$, inyección y electroporación en *N. subnodosus*. 69

Figura 21. Mortalidad acumulada por tratamiento. 71

Figura 22. Variación de pesos en gónadas a lo largo de las cinco etapas temporales durante 30d. (A) Organismos inyectados con dsRNAdmrt1 (B) Organismos inyectados con dsRNAp33. Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05; prueba post-hoc Fisher LSD para diferencias entre tratamientos). d.p.i = días post inyección. Línea horizontal representa la mediana. Asterico indica la media. 73

Figura 23. Variación de pesos en gónadas a lo largo de las cinco etapas temporales durante 30d. (A) organismos inyectados con 20µg dsRNAgapdh, (B) Organismos inyectados con 60µg dsRNAgapdh. d.p.i = días post inyección. Línea horizontal representa la mediana. Asterisco indica la media. 74

Figura 24. Valores de estabilidad para los genes de referencia seleccionados. 75

Figura 25. Expresión relativa de genes interferidos por dsRNA. (A) Organismos interferidos con dsRNAdmrt1. (B). Organismos interferidos con dsRNAgapdh. En ambos casos se empleó el peso de la gónada como covariable. d.p.i = días post-inyección. d = días. Las barras de dispersión muestran el error estandar. 76

Figura 26. Expresión relativa de dmrt1 y gapdh de organismos interferidos por dsRNAegfp. (A) dmrt. (B) gapdh. d.p.i = días post-inyección. d = días. Las barras de dispersión muestran el error estandar. 77

Figura 27. Vía de determinación/diferenciación sexual hipotetizada en *N. subnodosus* comparado con organismos modelo y *C. gigas*. Modificado de Zhang et al. (2014). 83

Lista de tablas

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión tisular por PCR de genes putativos de diferenciación/determinación sexual durante la gametogénesis. Sobre la línea se muestra el gen control utilizado. 29

Tabla II. Lista de las especies usadas en el análisis filogenético. 30

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de interferencia génica para la generación de sondas de ARN de doble cadena (dsRNA) y su cuantificación por qPCR. T: temperatura de alineamiento. 37

Tabla IV. Número de lecturas pareadas de RNA-Seq antes y después de la limpieza. 45

Tabla V. Estadísticas del proceso de ensamblado y anotación del transcriptoma global de *N. subnodosus*. 46

Tabla VI. Genes asociados a procesos de determinación/diferenciación sexual, identificados en *N. subnodosus*. 51

Tabla VII. Estadísticas del proceso de ensamblado y anotación del transcriptoma de *N. subnodosus* obtenido con lecturas de gónadas de ambas ploidías en estadios gametogénicos tempranos y de organismos maduros diploides. 60

Tabla VIII. Algunos de los genes que fueron encontrados significativamente sobre-regulados en diploides y triploides. 67

Tabla IX. Mortalidades observadas en los diferentes tratamientos evaluados. 70

Tabla X. Resultado del ANOVA en el que se evaluó el efecto de interferir organismos con dsRNA de dmrt1, usando como controles inyecciones con dsRNA del gen exógeno egfp y solución salina. 72

1. **INTRODUCCIÓN**

El Pectínido *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) es un organismo hermafrodita funcional con importancia económica y ecológica. Su valor económico se debe al tamaño que su músculo aductor, que puede alcanzar desde 65 a 108 g en adultos silvestres. Asimismo, este molusco es caracterizado por alcanzar tallas de 22.5 cm de longitud antero-posterior (Reinecke-Reyes, 1996) y pesos (con concha) de hasta 1,863 g, lo que la posiciona como la especie más grande y de mayor peso en América tropical (Peña, 2001). Debido a la importancia económica y la complicada situación actual, en la que la población de Laguna Ojo de Liebre está presentando altas mortalidades, que han ocasionado desde el 2011 el cierre temporal de las pesquerías, el cultivo de esta especie en condiciones adecuadas podría resultar en una verdadera alternativa para el aprovechamiento de la misma. En este sentido, es importante dirigir esfuerzos para generar conocimiento asociado a procesos reproductivos con fines de mejorar la producción, además del desarrollo y optimización de biotecnologías actuales que mejoren las capacidades de cultivo. Dentro de los campos de interés a estudiar en este molusco se encuentran los mecanismos de determinación y diferenciación sexual que ocurren en *N. subnodusus*. Estos mecanismos resultan de interés debido a la presencia de ambos sexos dentro de un único saco gonadal, así como por los eventos reportados previamente en *Argopecten ventricosus*, en donde ocurre una pérdida de las regiones sexuales en organismos triploides (Maldonado-Amparo e Ibarra 2002a, 2002b; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000, 2001). La anatomía de *N. subnodosus* permite diferenciar la región ovárica y testicular, a diferencia de otros moluscos donde la gónada se encuentra embebida dentro de la masa visceral (Arellano-Martínez *et al.*, 2004) (Fig. 1). En organismos invertebrados modelo, el sexo es determinado por un mecanismo de conteo cromosómico que distingue la presencia de un cromosoma sexual de dos (Meyer, 2005). Por ejemplo, en el nemátodo hermafrodita *Caenorhabditis elegans*, la señal inicial de determinación del sexo se basa en la relación de cromosomas X a autosomas, designada como relación X:A (Madl y Herman, 1979), en donde organismos con dos cromosomas X (XX) se desarrollan como hermafroditas, mientras que aquellos con un solo cromosoma X se desarrollan como machos. Esta señal inicial X:A, desencadena la expresión de algunos

genes que terminan regulando la expresión del gen *mab-3*, un regulador negativo de la producción de vitelogenina en machos (Shen y Hodgkin, 1988). En *Drosophila melanogaster*, uno de los modelos de determinación sexual propuestos también establece la presencia de una señal primaria dado por una relación del tipo X:A (Bridges, 1916, 1921), y el gen *sex-lethal* es el objetivo posterior inmediato de un mecanismo de conteo de cromosomas que distingue un cromosoma X de dos. En moscas con dos cromosomas X (XX), *sex-lethal* es activado y este dirige el corte y empalme del gen *doublesex* (*dsx*) específico de hembras dsx^F (Burtis y Baker, 1989; Salz y Erickson, 2010).

A pesar que los estudios dirigidos a descubrir y entender la función de los genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en moluscos han ido en aumento, la información aún es limitada, y los mecanismos permanecen sin ser comprendidos totalmente. Genes que pertenecen a la familia de los genes *dmrt* (*doublesex and mab-3 related transcription factors*) han sido reportados en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, en ostras perleras como *Pinctada margaritifera* y *Pinctada martensii*, así como en *Chlamys farreri* y *N. subnodosus* (Feng *et al.*, 2010; Llera-Herrera *et al.*, 2013; Naimi *et al.*, 2009a; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). En *C. gigas*, se ha sugerido que el sexo es determinado a través de un sistema mixto el cual es basado en temperatura y en un control genético (Guo *et al.*, 1998; Hedrick y Hedgecock, 2010; Santerre *et al.*, 2013). Mientras que en *C. gigas* la presencia de cromosomas sexuales no ha sido reportada, en *C. farreri,* una especie gonocórica, la presencia de estos últimos ha sido sugerida después de que un marcador ligado al sexo se encontró sólo en el mapa materno, lo que sugiere que las hembras pueden presentar un sistema sexual heterogamético (Li *et al.*, 2005). En *N. subnodosus* recientemente se identificaron genes específicamente expresados durante la meiosis durante la espermatogénesis mediante la pirosecuenciación de librerías por hibridación sustractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés, Suppression Subtractive Hybridization) generadas y sustraídas recíprocamente entre dos estadios reproductivos diferentes (inactivos *vs*. en maduración) (Llera-Herrera *et al.*, 2013). Entre los genes descubiertos se encontraron algunos genes anotados en procesos relacionados con la diferenciación sexual, sin embargo, la región ovárica no ha sido aún estudiada.

Por otra parte, biotecnologías como la inducción a la triploidía se han utilizado en esta especie debido a la ventaja en el crecimiento y la supervivencia generalmente observada en triploides en comparación con los diploides (Allen y Downing, 1986; Ibarra *et al.*, 2017; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Tabarini, 1984; Yang *et al.*, 2000), encontrando que su desempeño también se ve afectado por variables ambientales como la disponibilidad de alimento (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004). La triploidía, es lograda ya sea por el cruzamiento de organismos diploides y tetraploides, o por inducción química al momento de la fertilización inhibiendo la extrusión del segundo cuerpo polar antes de la formación del cigoto (Allen y Downing, 1986; Beaumont y Fairbrother, 1991) (Fig. 2). Particularmente en *N. subnodosus* la inducción de la triploidía por métodos químicos muestra baja frecuencia de éxito, pero cuando es lograda confiere una ventaja en crecimiento respecto a los organismos diploides si estos son mantenidos en ambientes de baja productividad primaria (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009). Una alternativa empleada en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, es la producción de triploides biológicos a través de la cruza entre organismos diploides y tetraploides, donde este último es producido usando un triploide inducido químicamente que no es completamente estéril (Guo *et al.*, 1996). Sin embargo, independientemente del sitio de cultivo y productividad del mismo, a diferencia de otros moluscos la condición de triploidía en *N. subnodosus* le confiere una esterilidad total (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004), y dicha esterilidad resulta en un obstáculo al momento de buscar generar almejas tetraploides para la producción de triploides biológicos (Fig. 3). Se ha propuesto que la esterilidad observada en *N. subnodosus* puede ser resultado de la activación de genes de tipo "checkpoint" durante la meiosis, induciendo un arresto de la meiosis I en estadios de cigoteno–paquiteno (Maldonado-Amparo e Ibarra, 2002a, 2002b). Hasta ahora, solo un trabajo ha abordado el problema de la esterilidad triploide empleando un microarreglo para dilucidar los genes involucrados en los triploides fértiles en el ostión del Pacífico *C. gigas* (Dheilly *et al.*, 2014). Particularmente en *N. subnodosus*, la pirosecuenciación de librerías SSH antes descrita produjo de igual forma genes potenciales involucrados en la meiosis (Llera-Herrera *et al.*, 2013), sin embargo, hasta ahora no se ha realizado ningún trabajo transcriptómico en moluscos triploides estériles como *N. subnodosus*.

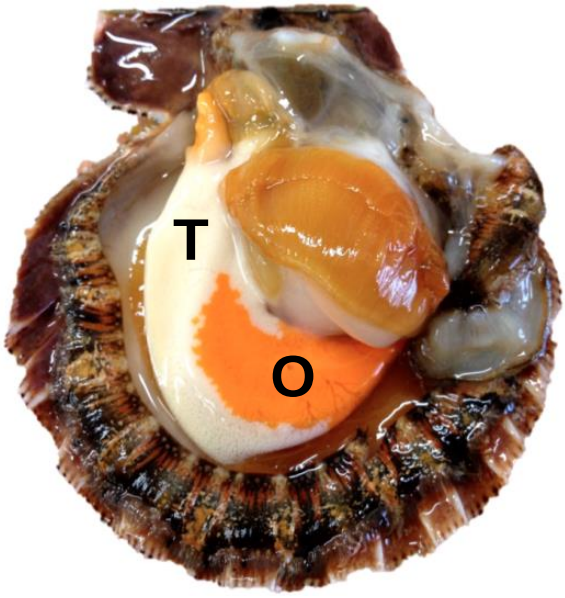


Figura 1. Macroestructura de la gónada de la almeja mano de león (*N. subnodosus*). **T**; Testículo, **O**; Ovario. (Tomado de López-Flores, 2015).

En el presente estudio se realizó una caracterización transcriptómica en diversos tejidos a diferentes edades con la finalidad de identificar entre otros, genes involucrados en procesos de determinación y diferenciación sexual. Por otro lado, también se abordó la esterilidad en organismos triploides analizando su transcriptoma durante la gametogénesis temprana empleando el sistema Illumina NexSeq500. Tanto para organismos diploides como para triploides se realizó un análisis de expresión diferencial a gran escala con la finalidad de descubrir cuáles genes son activados al inicio de la gametogénesis en cada ploidía. Finalmente se realizó un experimento de silenciamiento genético empleando ARN de doble cadena (dsRNA) para un gen asociado a la diferenciación sexual y otro asociado al ciclo celular, ambos identificados previamente (Llera-Herrera *et al.*, 2013). En este contexto se discuten los resultados observados empleando esta técnica en este molusco hermafrodita funcional.

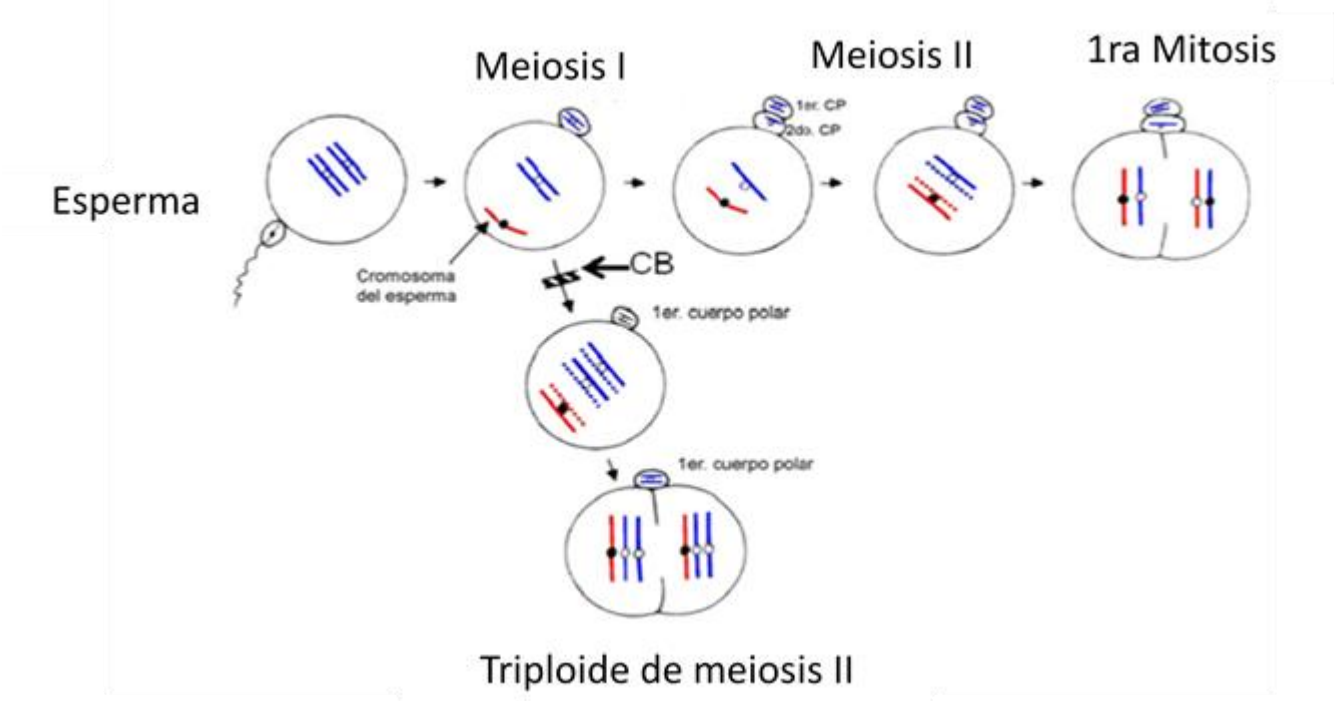


Figura 2. Inducción química para la generación de organismos triploides en *N. subnodosus*. CB = Citocalacina B. (Tomado de Ibarra A. M. y Hernández-Ibarra N. K., no publicada).

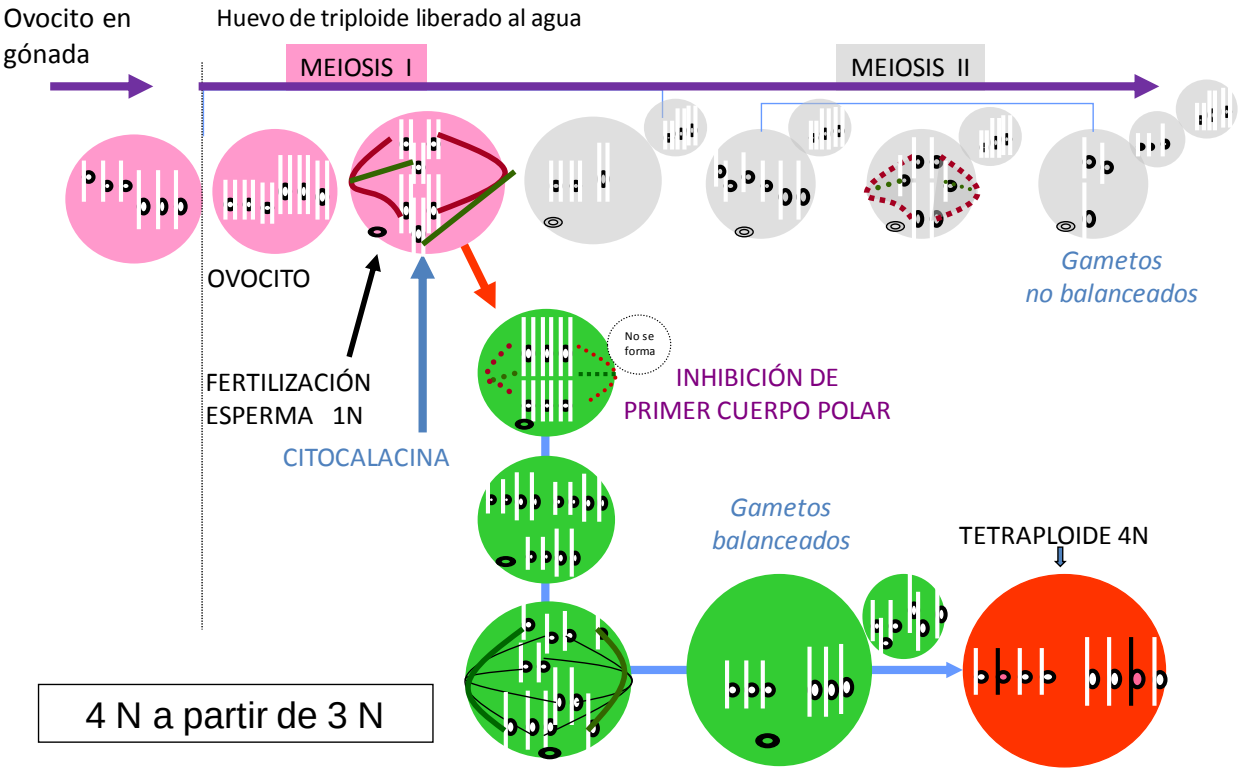


Figura 3. Generación de tetraploides a partir de triploides.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos de determinación y diferenciación sexual en los organismos modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Determinación y diferenciación sexual en *C. elegans*

Los sistemas sexuales heterogaméticos para macho y hembra (la notación XX hembra /XY macho es reservada para machos heterogaméticos, ZW hembras /ZZ machos para hembras heterogaméticas) son probablemente los mecanismos de determinación sexual más conocidos en animales, dado que estos han sido descubiertos en una gran variedad de organismos invertebrados y vertebrados (Bull, 1983). Sin embargo, en el nemátodo terrestre *C. elegans*, el hermafroditismo funcional se establece por un balance genético-cromosómico el cual genera dos condiciones sexuales naturales, hermafrodita y macho, en donde los hermafroditas son en realidad "hembras modificadas" porque es solamente durante el cuarto estadio larvario que producen y almacenan esperma en un soma femenino, el cual es requerido posteriormente para la autofertilización (Herman, 2005). La

determinación sexual en *C. elegans* es iniciada temprano en el embrión y es dada por la proporción entre el número de cromosomas X y los conjuntos de autosomas (X: A; Nigon, 1951). Organismos con dos cromosomas sexuales X (XX) y dos conjuntos de autosomas exhiben características somáticas de hembra y hermafroditismo en la línea germinal una vez que los procesos de diferenciación sexual ocurren; en el caso de los machos, estos solo presentan un cromosoma sexual X (X0) como resultado de la no-disyunción durante la segregación cromosómica, y dos conjuntos de autosomas, lo que le confiere características de macho tanto en el soma como en la línea germinal. Aunque existen importantes similitudes entre la determinación del sexo en el soma y en la línea germinal, estos dos procesos difieren en formas fundamentales debido a que en la línea germinal de hermafroditas existe la necesidad de generar ambos gametos en distintas fases temporales del desarrollo. Un conjunto de genes forma parte de las vías que actúan tanto en el soma como en la línea germinal. Uno de los genes iniciales es *xol-1* (X0 lethal 1), el cual es reprimido en organismos hermafroditas (XX) y su expresión es permitida en un nivel bajo en machos (X0). La regulación de *xol-1* es dada por genes que han sido identificados en el cromosoma X, denominados *X-signal components*, entre los cuales se encuentran *fox-1* y *sex-1*. La proteina Sex-1 reprime la transcripción del gen *xol-1* mediante la unión directa al promotor de este gen (Carmi y Meyer, 1999). Xol-1 a su vez reprime al gen *sdc* (***S****ex determination and* ***d****osage* ***c****ompensation*). Las proteínas SDC reducen la transcripción de genes en organismos hermafroditas e intervienen de manera simultánea en el control de la diferenciación del sexo por la unión al promotor del gen *her-1*. En machos X0, Her-1 (***her****maphroditization*) inhibe la expresión de *tra2*a (Kuwabara *et al.,* 1992; Kuwabara y Kimble, 1995; Okkema y Kimble, 1991), mientras que en hembras XX, *her-1* es silenciado por las proteínas SDC antes mencionadas (Schauer y Wood, 1990; Trent *et al.,* 1991). Tra-2a, a través de su dominio citoplasmático (Mehra *et al.,* 1999), captura a la proteína Fem-3 (***fem****inization of XX and XO animals*), lo que da como resultado su inactivación (Hodgkin, 1986). Fem-3 se encuentra formando un complejo con otras dos proteínas llamadas Fem-1 y Fem-2, las cuales en conjunto inactivan a la proteína Tra-1, proceso mediado por un complejo ubiquitin-ligasa Cul-2, en donde Fem-1 es reconocido como el substrato, y Fem-2- Fem-3 actúan como co-factores (Starostina *et al.,* 2007) (Fig. 3). En la línea germinal

genes adicionales específicos son requeridos tanto para la espermatogénesis como ovogénesis. Durante la fase de la espermatogénesis son requeridos los genes *fog-1* y *fog-3* (nombrados así por el fenotipo del mutante: ***f****eminization* ***o****f* ***g****ermline*) (Fig. 3) así como *gld* (*defective in germ line development*). Mutaciones en *fog-2* feminizan la línea germinal, y contrario a las mutaciones de *fog-1* y *fog-3,* la feminización ocurre sólo en organismos XX (Schedl y Kimble, 1988). El breve periodo de espermatogénesis es logrado a través de Fog-2, el cual interactúa con la proteína Gld-1 y ambas se unen a la región UTR 3´del transcrito de *tra-2* inhibiendo su traducción (Clifford *et al.,* 2000). Por otro lado, la fase de ovogénesis es activada por los genes *fbf-1* y *fbf-2* (***f****em-3* ***b****inding* ***f****actor*), los cuales inhiben la traducción del gen *fem-3* mediante la unión a su UTR 3' (Ahringer y Kimble, 1991). Asimismo, otros seis genes llamados *mog-1-6* (*masculinization of germ line*) están asociados con la producción de ovocitos (Graham *et al.,* 1993; Graham y Kimble, 1993). A diferencia de lo observado en genes *fog*, una pérdida de función por mutación en cualquiera de los genes *mog* desencadena la producción de gametos masculinos en la línea germinal. Finalmente, la espermatogénesis en machos X0 a diferencia de hermafroditas requiere de la actividad de *her-1* (*hermaphroditation of XO animals*) en donde su expresión constante es necesaria para mantener la espermatogénesis en la línea germinal de los machos. Al igual que en la fase de la espermatogénesis en hermafroditas, en machos los genes *fog-1* y *fog-3* son necesarios únicamente en la línea germinal (Barton y Kimble, 1990; Ellis y Kimble, 1995).

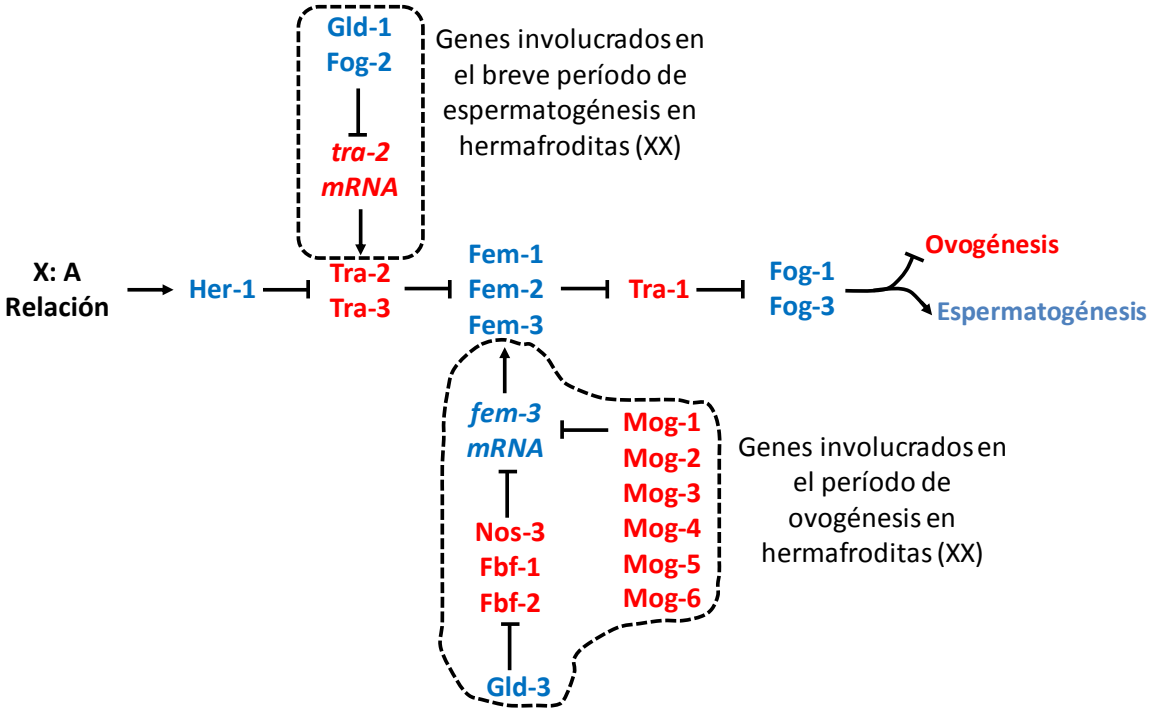


Figura 4. Genes involucrados en la regulación de línea germinal. Proteínas son mostradas con la letra inicial en mayúscula; los nombres de los genes son mostrados en itálicas. Interacciones positivas son indicadas con una flecha "→", e interacciones negativas por "-|". Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis. Fog-1, Fog-3 y las proteínas Fem promueven la espermatogénesis en machos X0 (Modificado de Ellis, 2007).

2.1.2 Determinación y diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster*

En *D. melanogaster* se han propuesto dos modelos de determinación sexual. El primero se basa en la relación entre el número de cromosomas X (X) con respecto al número de autosomas (A) (relación X: A) (Bridges, 1921, citado por Belote, 1989) al igual que en *C. elegans*, mientas que en el segundo se propone un modelo dosis-dependiente de los genes ligados al cromosoma X (XSE por sus siglas en inglés, X-linked signals elements XSE) (Salz y Erickson, 2010). Moscas con dos cromosomas X (XX) se desarrollan como hembras, mientras que moscas con un cromosoma X se desarrollan como machos (Belote, 1989). La presencia del cromosoma Y en machos no tiene función en la diferenciación sexual somática, sin embargo, es requerido para una espermatogénesis normal. En el cromosoma X se encuentran 4 genes importantes que codifican para los factores de

transcripción: *scute, sisA, runt y unpaired* (que comprenden los colectivamente llamados X-linked signals elements). En hembras (XX), la presencia de estas proteínas en una dosis alta desencadena la activación del gen *sxl* (*Sex-lethal*) (Gempe y Beye, 2010) y este a su vez conduce al desarrollo femenino, mientras que en machos la proteína Sxl resultante no es funcional. La proteína de Sxl dirige la transcripción del ARNm de *tra* específico de hembras tra^F (*transformer*) dando lugar a una proteína funcional (Boggs *et al.,* 1987; Nagoshi *et al.,* 1988). La proteína Tra en conjunto con el producto de *transformer-2* (Tra-2) lleva a la transcripción primaria del gen *doublesex* (*dsx*) con la configuración específica de hembras, dsx^F (McKeown *et al.,* 1987; Nagoshi *et al.,* 1988). En machos X0 la ausencia de una proteína funcional Sxl se traduce en un *tra* RNAm con un codón prematuro de paro y como consecuencia productos funcionales de los genes *tra* y *tra-2* no son traducidos, por lo que el gen *dsx* resulta en un transcrito funcional dsx^M (default). Homólogos de *dsx* han sido identificados en un amplio rango de insectos incluyendo *Bactrocera tryoni* (Sherman y Frommer, 1998), *Megaselia scalaris* (Kuhn *et al.,* 2000), *Bombyx mori* (Ohbayashi *et al.,* 2001), *Antheraea assama* y *Antheraea mylitta* (Shukla y Nagaraju, 2010), *Musca domestica* (Hediger *et al.,* 2004), *Anopheles gambiae* (Scali *et al.,* 2005) y *Nasonia vitripennis* (Oliveira *et al.,* 2009).

2.2 Mecanismos de determinación del sexo en bivalvos

Las estrategias que determinan el sexo en bivalvos son bastante diversas. Estas estrategias han sido abordadas empleando estudios citogenéticos y de proporción de sexos, identificando y/o aislando marcadores de ADN específicos del sexo a través de análisis de expresión diferencial, mediante análisis comparativos entre genomas y/o transcriptomas (Breton *et al.,* 2017). En moluscos, factores ambientales como la temperatura, disponibilidad de alimento y factores sociales han sido reportados por tener un impacto sobre la determinación del sexo (ver Breton *et al.,* 2017). Dentro de los aspectos genéticos, ha sido propuesto un sistema de determinación sexual en el que las hembras del molusco *Mulina lateralis* presentan una configuración XX y los machos XY (Guo y Allen, 1994b). Asimismo, en otro molusco *Mya arenaria*, la determinación del sexo parece ajustarse a un modelo X: A como lo observado en insectos (Allen *et al.,* 1986). Dicha conclusión fue

basada en las proporciones sexuales observadas en triploides, donde 77% de los triploides fueron hembras. En *Crassostrea gigas*, una especie protándrica, un primer modelo sugería la presencia de un alelo masculino dominante (M) y uno femenino protándrico (F), de tal forma que organismos FM se desarrollan como verdaderos machos mientras que organismos FF se desarrollaban como hembras protándricas con la capacidad de cambiar de sexo, sin embargo estas hembras también podrían estar sujetas a genes secundarios así como a factores ambientales (Guo *et al.,* 1998). Posteriormente un segundo modelo fue propuesto debido a que el modelo anterior no explicaba las variaciones en las proporciones de sexos observadas en familias de medios hermanos producidas por un macho y diferentes hembras. Este modelo propone un sistema de 3 genotipos con dos tipos de hembras, una fija denominada FF y una protándrica FM además del macho MM (Hedrick y Hedgecock, 2010).

Asimismo, a través de estudios transcriptómicos se han identificado genes ortólogos en bivalvos que son conocidos por participar en la determinación y diferenciación sexual de algunos organismos modelo. Sin embargo, a la fecha ninguno de estos estudios ha demostrado la función de estos genes en bivalvos. En la almeja Manila *Ruditapes philippinarum*, una especie gonocórica, se ha establecido un modelo de herencia doblemente uniparental de las mitocondrias (DUI por sus siglas en ingles) para explicar la diferenciación de la línea germinal. Además, en esta especie se identificaron 1,575 genes sexo-sesgado con una expresión elevada. De estos, 935 fueron sesgados hacia el macho mientras que 640 hacia hembra. De forma interesante, uno de estos genes fue del tipo *sry* (sex determining region-y)-box 30, *sox30* (*sry box 30*), el cual no solo fue encontrado en testículos, sino que también en hembras que generaban progenies con una proporción mayor de machos, sugiriendo que este gen podría jugar un papel en la masculinización de futuros embriones (ver Ghiselli *et al.,* 2012). La presencia de este gen también ha sido reportada en *C. gigas,* en donde su expresión fue testículo específica. Además de *sry*, en *C. gigas* se han reportado otros genes como *sox9*, *wnt4*, *dmrt1*, *fem-1*, *foxl2*, *b-catein*, *Oyvlg*, etc (Fabioux *et al*., 2004, 2009; Naimi *et al.,* 2009a, 2009b; Santerre *et al.,* 2014; Zhang *et al.,* 2014).

En otro molusco, *Pinctada margaritifera*, una ostra perlera protándrica, se han reportado genes específicos de macho como *fem-1* y *dmrt1*, así como específicos de hembra como *foxl2* (Teaniniuraitemoana *et al.*, 2014). De igual forma, en *Pinctada martensii* un miembro de la familia de *dmrt* fue reportado, *dmrt2,* el cual mostró una expresión macho específica (Yu *et al.,* 2011). Finalmente en el Pectínido *Chlamys farreri*, pero gonocórico, se identificó un gen ovario específico, *foxl2* (Liu *et al.,* 2012). Si bien, no se ha establecido con certeza la función de estos genes, los patrones de expresión similares entre bivalvos a los reportados en otros organismos sugieren una función conservada en la diferenciación sexual.

2.3 Aspectos reproductivos en *Nodipecten subnodosus*

La maduración gonádica en la almeja *N. subnodosus* inicia cuando esta alcanza una altura de concha mayor a 5 cm (Arellano-Martínez, 2005), y ocurre alrededor del mes de abril extendiéndose hasta alcanzar su máxima madurez en el mes de agosto, mientras que su periodo de inactividad ocurre desde diciembre a marzo (Arellano-Martínez *et al.,* 2004; Maldonado-Amparo *et al.,* 2004; Racotta *et al.,* 2003; Ramírez-Arce, 2009). Lo anterior muestra una estacionalidad relacionada con la temperatura del agua, donde la maduración gamética ocurre durante la temporada cálida (Arellano-Martínez, 2005). En este organismo los gametos femeninos como los masculinos inician el proceso de maduración de manera paralela en el tiempo, aunque no necesariamente desovan de forma simultánea, esto posiblemente como un mecanismo para evitar la autofecundación. La característica anatómica y del color de la gónada permite diferenciar el tejido masculino del femenino a simple vista (Fig. 1). La región ovárica posee un rango de coloración desde un crema pálido hasta un anaranjado oscuro, mientras que la porción testicular inicia en un color crema hasta beige, considerando en ambos casos que la coloración de las regiones está ligada al grado de madurez (Arellano-Martínez, 2005). La gametogénesis en *N. subnodosus* es llevada a cabo en una estructura funcional dentro de la gónada, llamada acino, en la que los gametos se producen a partir de células germinales primordiales localizadas en el margen interno del acino. En la región testicular todos los estadios meióticos se encuentran representados con un patrón radial, sin embargo, en el ovario, los ovocitos se encuentran

arrestados en la profase I desde el inicio de la vitelogénesis hasta su fertilización externa. Los reportes dirigidos hacia su estrategia reproductiva son variados, mostrando que esta especie puede ser del tipo oportunista cuando los organismos crecen en ambientes con alta disponibilidad de alimento (Racotta *et al.,* 2003), pero de tipo conservativa cuando el alimento es limitado durante ciertos periodos (Racotta *et al.,* 2008; Ramírez-Arce, 2009). La movilización de reservas del músculo aductor y de otros tejidos hacia la gónada durante su maduración es una característica común en Pectínidos (Barber y Blake, 1991) y de igual forma observada en *N. subnodosus*, donde se ha establecido que existe una movilización y metabolismo de algunos compuestos bioquímicos, como son algunas clases de lípidos y carbohidratos (Arellano-Martínez *et al.,* 2004b; Palacios *et al.*, 2005, 2007; Racotta *et al.,* 2003, 2008). Lo anterior es considerado como factor importante en el fenotipo asociado al mayor crecimiento del músculo aductor en organismos triploides cuando la disponibilidad de alimento en el medio es baja.

2.3.1 La triploidía como biotecnología y sus consecuencias reproductivas

El uso de organismos triploides es considerado útil en la acuicultura debido a que estos presentan esterilidad, mejor calidad de carne, y algunas veces un crecimiento superior (Guo *et al.,* 1996). Asimismo, son considerados útiles para la acuicultura al no generar un impacto genético sobre las poblaciones silvestres (Guo *et al.,* 1996; Ibarra, 2006). Los efectos reproductivos de la triploidía en la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* muestran diferencias en la sincronización del proceso de maduración de la gónada, ya que se puede observar que la formación de gametos en la región testicular solo es vista durante los primeros días cuando los procesos de gametogénesis son iniciados (Maldonado-Amparo e Ibarra, 2002a, 2002b; Ruiz-Verdugo *et al.,* 2000), para posteriormente ser suprimidos y remplazados por las estructuras germinales de hembras (Ruiz-Verdugo *et al.,* 2000), denotando así una esterilidad parcial como consecuencia. Se cree que la esterilidad parcial observada es el resultado de la incapacidad de cromosomas para aparearse y completar la sinapsis debido a la formación de multivalentes. No obstante ha sido demostrado que en al menos una especie la formación de trivalentes no es la causa de la esterilidad, como lo reportado en *C. gigas* (Guo y Allen, 1994a). A nivel genético-molecular, el grupo de Ana

M. Ibarra ha propuesto que la presencia de mecanismos de revisión "Checkpoints", operando en el ciclo celular durante el proceso de meiosis, podrían estar causando el arresto meiótico, dado que su función entre otras, es asegurar que exista una correcta replicación, recombinación y segregación. Cuando se detectan conflictos en dichos procesos se inicia la activación de genes que pausan el proceso meiótico para evitar la formación de meiocitos aneuploides. Sin embargo, a diferencia de lo observado en *A. ventricosus*, en *N. subnodosus* adultos la condición triploide resulta en un arresto temprano de la gametogénesis, lo que resulta en una esterilidad casi completa en ambas partes de la gónada (Maldonado-Amparo *et al.,* 2004).

2.4 Genes de diferenciación sexual y de meiosis conocidos en *Nodipecten subnodosus*

A través de librerías de tipo SSH generadas y sustraídas recíprocamente entre dos estadios reproductivos diferentes en la región testicular (inactivos vs maduros) (Llera-Herrera *et al.*, 2013) fue posible identificar una variedad de genes de importancia reproductiva. Por ejemplo, el gen MAGO NASHI fue encontrado en ambas condiciones reproductivas. Su homólogo funcional en el nemátodo *Caenorhabditis elegans, mag-1,* funciona como un interruptor en la línea germinal para la transición de espermatogénesis-ovogénesis en organismos hermafroditas, regulando (sin ser claro aún cómo) dos posibles rutas en las que intervienen los genes de masculinización, *gld, fog2* y *fem* (Li *et al.,* 2000). Asimismo, en librerías de testículo en maduración fueron descubiertos varios genes implicados en la diferenciación del sexo. Uno de esos genes fue anotado como *dmrt1 (doublesex and mab-3 related transcription factor),* conocido por ser uno de los genes más conservados desde invertebrados hasta vertebrados (Gempe y Beye, 2010). Una de las funciones de particular interés de *dsx,* es la regulación del gen de la *vitelogenina*. En machos la proteína Dsx reprime la transcripción de este gen mientras que la variante proteica en hembras activa la transcripción de la vitelogenina (Coschigano y Wensink, 1993). Otro homólogo funcional de *dmrt1*, *mab-3,* es encontrado en el nemátodo *C. elegans* conteniendo un motif de unión al DNA que de igual forma es encontrado en *D. melanogaster* y en el gen asilado en *N. subnodosus* (Llera-Herrera *et al.,* 2013). *mab-3* también es un controlador de la expresión del gen de la vitelogenina aunque mostrando mecanismos molecularmente distintos a los

establecidos en *D. melanogaster*, donde en machos la presencia de *mab-3* reprime la transcripción del gen de la vitelogenina y en *C. elegans* hermafroditas, *mab-3* es reprimido por *tra-1* conllevando a que la expresión de la vitelogenina ocurra (Yi y Zarkower, 1999). Otro de los genes encontrados con función en la diferenciación sexual fue *dual specificity protein kinase, clk-2,* en donde su proteína Clk2 previene el uso de los exones 2 y 3 en el homólogo humano de Tra-2 en *Drosophila*, Tra2-BETA 1, una proteína SR-like que regula el corte-empalme alternativo (Stoilov *et al.,* 2004). En *Drosophila*, mutaciones en el homólogo de *clk (doa*) resultan en la alteración del corte-empalme del pre-ARNm de *dsx* (Du *et al.,* 1998), cuya configuración depende de Tra y Tra-2.

Adicionalmente a los genes encontrados en la región testicular de la gónada madura, en la librería de la gónada inactiva se encontraron genes relacionados a procesos de control y mantenimiento de la línea germinal, como *notch homolog 2*. En el nemátodo *C. elegans* también se han identificado dos proteínas llamadas Glp-1 y Lin-12 de la familia Notch, las cuales llevan funciones de interacción celular a través de estos últimos receptores durante el desarrollo embrionario y post-embrionario. Por ejemplo, señales del tipo Notch controlan la inducción del mesodermo durante el desarrollo embrionario además de controlar también aspectos de la mitosis en células germinales durante el desarrollo post-embrionario (Priess, 2005). Glp1, en conjunto con las proteínas FBF, funcionan para promover la continua división mitótica en la línea germinal e inhibir la entrada a la meiosis (Kimble y Crittenden, 2007). Las proteínas FBF (***f****em-3* ***b****inding* ***f****actors*) reprimen la traducción del gen *fem-3* en organismos hermafroditas provocando la transición de espermatogénesis a ovogénesis. El gen Pumilio en *D. melanogaster* representa en contraparte el homólogo a las proteínas FBF. De manera interesante un transcrito encontrado en la gónada inactiva fue anotado como *Pumilio domain containing protein.* Otro transcrito de interés fue *btg member 2*, una proteína de tipo Tob/BTG que en vertebrados controla aspectos del crecimiento y diferenciación, su homólogo en *C. elegans* FOG-3, regula aspectos de la línea germinal promoviendo la espermatogénesis (Ellis, 2007). Actualmente no es conocido si la línea germinal de *N. subnodosus* usa mecanismos regulatorios similares a aquellos observados en el nematodo hermafrodita o en algún otro organismo modelo, sin embargo, la presencia de transcritos en posiciones importantes dentro del flujo establecido como controlador de la

diferenciación sexual en *C. elegans* y, en el control de la transición reproductiva, indican la existencia de mecanismos similares interviniendo en la línea germinal (Llera-Herrera *et al.,* 2013). Por otra parte, genes involucrados en la recombinación meiótica y el complejo sinaptonémico fueron encontrados en la librería de testículo maduro. Dos genes codificando para proteínas del complejo sinaptonémico fueron identificadas, *scp2* y *scp3,* los cuales forman los filamentos axiales del complejo sinaptonémico durante la meiosis-I y son esenciales para la sinapsis de los cromosomas (Pelttari *et al.,* 2001). Otro gen involucrado en el complejo sinaptonémico fue *hormad1*, el cual incrementó su expresión desde estadios tempranos hasta el testículo maduro. De igual forma se identificó al gen *dmc1*, el cual fue expresado de la misma manera que los antes mencionados, incrementando su expresión desde estadios tempranos a maduros en el testículo. *dmc1* es expresado exclusivamente en meiosis y es requerido para el apareamiento normal de homólogos y la formación del complejo sinaptonémico (Bishop *et al.,* 1992). Otro de los genes anotados como genes de meiosis, *e3 ubiquitin ligase ccnblip1* (también conocido como *human enhancer of invasion 10 –Heil10*), fue encontrado sobre-expresado en la región testicular y a diferencia de los anteriores este no presentó un incremento de expresión de estadios tempranos a maduros, lo que podría indicar que su principal función es durante el inicio de la meiosis, y durante la formación del entrecruzamiento "crossing-over" de las cromátidas hermanas, además, dado que su expresión solo fue detectada en la región testicular, podría considerarse un gen testículo-específico en la almeja *N. subnodosus. p33-ringo* fue otro gen anotado como participante en la meiosis y el único con expresión específica en estados tempranos de ovario y testículo. Este gen, también conocido como *speedy,* fue asociado en primera instancia por participar en el proceso de iniciación de la maduración de ovocitos por la inducción de la transición G2/M en ovocitos de *Xenopus*. *p33-ringo* también participa en la fase de progresión G1/S cuando es sobre-expresado en diferentes tejidos humanos, así como en la promoción de tumores posiblemente por su capacidad en la inactivación de *checkpoints* (McAndrew *et al.*, 2009). Recientemente en *N. subnodosus* se ha establecido que *p33-ringo* es un gen expresado y localizado únicamente en la línea germinal durante las primeras etapas de la gametogénesis y después del desove en machos en organismos diploides, mientras que en triploides su expresión se localizó en estadios de

gametogénesis inactivo-inicial. Su localización celular en ambas ploidías por hibridación *in situ* fue observada exclusivamente en gonias lo que sugiere funciones conservadas a las descritas en *Xenopus* (López-Flores, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Mientras que la información genómica en otros moluscos de interés comercial como *C. gigas*, *Saccostrea glomerata* y *Crassostrea virginica* ha ido en aumento constante, donde incluso el genoma de dos de estas especies han sido recientemente secuenciados (Powell *et al.,* 2018; Zhang *et al.,* 2012), en *N. subnodosus*, hasta ahora, solo se ha realizado un trabajo (Llera-Herrera *et al.,* 2013). Entre las limitaciones actuales se encuentra la falta de información genómica de la región ovárica para este organismo no modelo con importancia económica, así como lo limitado del uso de nuevas tecnologías de secuenciación que permitan obtener mayores rendimientos de secuenciación y por consecuencia una mejor resolución transcriptómica. En este contexto, resulta indispensable generar información genómica-transcriptómica empleando nuevas plataformas como las ofrecidas por Illumina y, además dirigirlas a procesos de interés como el estudio de los procesos de determinación y diferenciación sexual, en los cuales la información es limitada en esta almeja. Otro de los temas que resulta de interés, son las consecuencias reproductivas en moluscos inducidos a la triploidia. Particularmente en *N. subnodosus* la triploidia induce una esterilidad total, y aunque algunas hipótesis han sido propuestas para explicar este fenómeno, no existe hasta el momento un estudio completamente dirigido a tratar de elucidar los genes responsables de este arresto, por lo que el análisis transcriptómico tanto en organismos diploides como triploides propuesto en este trabajo permitirá establecer una hipótesis más clara de los genes participes en la gametogénesis inicial en diploides (normal) versus triploides (arrestada). Finalmente, el uso de genómica funcional para interrogar genes sentará las bases para el desarrollo de nuevas biotecnologías que en un futuro puedan ser dirigidas en beneficio a la productividad de este molusco.

4. HIPÓTESIS

1. Los mecanismos genéticos involucrados en la diferenciación sexual de la gónada de *Nodipecten subnodosus* podrán ser elucidados a través del análisis del transcriptoma global y mediante su expresión en las regiones ovárica y testicular.
2. Múltiples genes implicados en el arresto meiótico podrán ser identificados en *N. subnodosus* en condición triploide a través de la secuenciación masiva y el análisis de la expresión diferencial en diploides y triploides.
3. La función de genes relacionados a la diferenciación sexual y el arresto meiótico podrán ser determinadas mediante silenciamiento génico postranscripcional, dichas funciones serán evidenciadas a través de análisis de expresión así como con fenotipos resultantes.

5. OBJETIVO GENERAL

Generar información transcriptómica y funcional asociada a la diferenciación sexual y arresto meiótico en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

5.1 Objetivos Particulares

1. Generar información transcriptómica *de novo* a partir de semilla, larva con mancha ocular, gónada inactiva, glándula digestiva y músculo aductor en condición diploide de la almeja mano de león *N. subnodosus*.

2. Evaluar la distribución tisular de genes de diferenciación sexual identificados en el transcriptoma global de *N. subnodosus*.

3. Generar información transcriptómica *de novo* a partir de tejido obtenido de la región gonadal inactiva e inicial en condición diploide y triploide, y en desove de la región ovárica y testicular de almeja mano de león *N. subnodosus* en condición diploide.

4. Determinar mediante análisis de expresión diferencial genes que se activan en una gametogénesis inactiva e inicial tanto en organismos diploides como triploides.

5. Evaluar el efecto de la interferencia por ARN de doble cadena de genes relevantes en el desarrollo sexual de la gónada y de la meiosis utilizando organismos diploides.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Transcriptoma global *de novo* de *Nodipecten subnodosus* generado a partir de diferentes edades-tejidos (semilla, larva con mancha ocular, gónada indiferenciada, glándula digestiva y músculo aductor de juveniles)

6.1.1 Material biológico y aislamiento de ARN para la reconstrucción del transcriptoma

Un total de 50 mg de larva con mancha ocular, etapa donde se espera que ocurra la metamorfosis, y seis muestras de semilla (0.12 g; altura promedio de concha: 3 mm; ~60 días post-fertilización) fueron preservados como organismos completos en solución de RNAlater. Adicionalmente, glándula digestiva, gónada indiferenciada (como lo descrito en Arellano-Martínez *et al.,* 2004) y músculo aductor fueron colectados a partir de seis organismos juveniles (peso medio 1.4 g; longitud media: 1.5 cm) preservando los tejidos de forma individual en solución RNAlater. El ARN total fue obtenido a partir de 100 mg de tejido homogenizado por disrupción celular con el uso del reactivo comercial TriPure Isolation Reagent (Roche Life science), después de adicionar 0.2 volúmenes de cloroformo, la fase acuosa conteniendo el ARN fue obtenida y purificada mediante el sistema de purificación SV Total RNA purification system (Promega) como se describe a continuación: la fase acuosa fue mezclada con 3 volúmenes de solución de unión al ARN (RNA binding solution) y posteriormente transferida a columnas de silica provistas en el kit. El resto del protocolo incluyendo el tratamiento de digestión con DNAse I fue realizado siguiendo las instrucciones descritas en el kit hasta la elusión del ARN en 30 µL de agua libre de RNAse. La calidad del ARN fue evaluada mediante electroforesis, y cuantificada usando NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). Un total de 10 µg fueron precipitados con diez volúmenes de etanol y 1:10 de 3M de acetato de amonio a -20 °C y centrifugados a 10000×*g*. El precipitado obtenido fue sometido a lavados con etanol al 75%. Grupos de seis muestras de ARN de igual concentración fueron realizadas para las semillas y por cada tejido (glándula digestiva, gónada indiferenciada y músculo aductor) para posteriormente ser enviados al laboratorio Yale Center for Genome Analysis core (UC Yale, Yale, CA) para la preparación de librerías y secuenciación.

6.1.2 Construcción de librerías y secuenciación del transcriptoma

La calidad (RIN, RNA Integrity Number) de las muestras de ARN fue evaluada con el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Las librerías de ARN fueron construidas usando el protocolo estándar TruSeq library system, donde de manera breve, el ARNm total de todas las muestras fue purificado a partir de 500 ng de ARN total con perlas magnéticas de oligo-dT en condiciones de agitación constante e incubación a 94°C, lo anterior en presencia de cationes divalentes. Con el propósito de capturar aquellos transcritos no poliadenilados, una muestra adicional de semilla fue sometida a un proceso de depuración del ARN ribosomal (adicionalmente a la librería creada por la selección de Poly-A) usando Ribo Zero rRNA removal kit (Illumina). La primera cadena de ADNc fue sintetizada con oligonucleótidos aleatorios (*random primers*) e incorporando dUTP para la segunda cadena, generando así librerías para secuenciación de cadena específica (*strand-specific*). Adaptadores indexados fueron ligados a los ADNc y posteriormente la segunda cadena fue digerida mediante Uracil-DNA-Glycosylase. Las librerías se amplificaron utilizando 8 ciclos de PCR y fueron purificadas con Qiagen PCR purification Kit (Qiagen). El tamaño del inserto a ser secuenciado fue verificado usando el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer y cuantificado con Qubit Fluorometer (Thermo Scientific). Finalmente, las seis librerías indexadas se ecualizaron en concentración y fueron secuenciadas en la plataforma Illumina MiSeq 2×250 run.

6.1.3 Evaluación de la calidad, ensamblado y predicción de la región codificante

La calidad de las lecturas crudas producidas por MiSeq (2×250pb) (“Raw reads”) fue evaluada utilizando FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). La depuración de secuencias adaptadoras de Illumina y el filtrado de lecturas con baja calidad fue realizado usando el programa Trimmomatic (Bolger *et al.,* 2014). Dado que no existe un genoma de referencia para *N. subnodosus,* las lecturas pareadas (*paired-end reads*) depuradas resultantes del filtrado fueron ensambladas usando Trinity (v2.0.6) (Grabherr *et al.,* 2011), siguiendo el protocolo para un ensamblado *de novo* (Haas *et al.,* 2013) con los parámetros por defecto excepto por la inclusión de *normalize_reads* y *normalize_max_read_cov 30*. Se identificaron las regiones candidatas codificante de los

transcritos ensamblados con el programa TransDecoder v3.0.0 (https://transdecoder.github.io/) utilizando los criterios por defecto (*default*).

6.1.4 Anotación funcional del transcriptoma

Una vez reconstruido el transcriptoma, los contigs generados fueron analizados en NCBI Transcriptome Shotgun Assembly (TSA), donde fueron filtrados a través de UniVec (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/) para descartar contaminaciones como vectores, adaptadores, primers de PCR y otro tipo de contaminación como secuencias mitocondriales, secuencias de levadura y de *Escherichia coli* . El filtrado encontró 5, 937 contigs con algún tipo de contaminación, los cuales fueron removidos en su totalidad mediante un *script* en Perl (0_remove_sequences_with_errors.pl; todos los scrips mencionados en esta tesis pueden ser accesados en: https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1ddE43LB-AXwWEfOQD8glqnFGjx1n3-AI).

Los contigs restantes fueron anotados por medio de una serie de pasos integrados en Trinotate v3.0.1 (https://trinotate.github.io/). Búsquedas de homología contra las bases de datos SwissProt/Uniref90/C. gigas (Zhang *et al.*, 2012) fueron realizadas con BLAST 2.2.31+ usando BLASTx y BLASTp (Altschul *et al.*, 1990). Dominios de proteínas conservadas fueron identificados con el programa HMMER utilizando la base de datos de dominios Pfam (Finn*et al.*, 2011; Punta *et al.*, 2012). Se utilizó SignaIP 4.1 (Krogh *et al.*, 2011) para predecir la presencia de péptido señal y tmHMM (Petersen *et al.*, 2011) para predecir regiones transmembranales en proteínas. RNAMMER (Lagesen *et al.*, 2007) fue empleado para identificar secuencias ribosomales en el transcriptoma. Finalmente se realizó una anotación contra las bases de datos de EMBL Uniprot eggNOG/GO/KEGG Pathways (Ashburner *et al.*, 2000; Kanehisa *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2012), dicha información fue previamente cargada dentro de una base de datos SQL (de acuerdo al procedimiento descrito por Trinotate). Posteriormente, toda la anotación del transcriptoma generada previamente fue integrada dentro de una base de datos SQLite, para crear un reporte completo de anotación. El *tophit-blast* de especies se realizó tomando como referencia los nombres de las especies de SwissProt (http://www.uniprot.org/docs/speclist.txt) así como el archivo de alineamientos generado mediante BLASTx-Uniref90; posteriormente se

desarrolló un *script* en Perl (1_ make_spec_table.pl) para procesar este último archivo y convertirlo a una tabla que pudiera ser procesada en R. Posteriormente se realizó un segundo *script* en R (2_count_blast_species.R) manteniendo solo un hit para cada isoforma con la finalidad de generar una nueva tabla con la cuantificación de los tophits y el porcentaje que estos representaron para cada especie. Los porcentajes resultantes son mostrados en un gráfico tipo *pie* (Fig. 8A). Para las distribuciones de identidad y valor-E, se desarrolló un *script* en Perl (3_Iden_distri.pl; 4_Evalue_distri.pl) para filtrar los respectivos valores provenientes del archivo BLASTx-SwissProt generado previamente y posteriormente graficados en R. Finalmente, el diagrama de Venn fue elaborado utilizando el paquete de R VennDiagram (Chen y Boustros, 2011) (Fig. 5).

6.1.5. Genes expresados diferencialmente

A pesar de que este transcriptoma no fue diseñado con réplicas biológicas, lo cual resulta en un subóptimo análisis de expresión diferencial, la incorporación de esta última estrategia representa una mejor aproximación para conocer qué términos ontológicos se encuentran enriquecidos en las distintas edades-tejidos evaluados, a diferencia de solo evaluar globalmente las categorías presentes. En este sentido, las lecturas pareadas correspondientes a cada edad-tejido fueron mapeadas contra el transcriptoma usando el programa Kallisto v0.42.5 (Bray *et al.*, 2016). Dado que se tenían dos tipos de librerías para el mismo ARN de semilla (PolyA y rRNA depurada), solo la librería polyA fue usada para evitar sesgo adicional en la estimación de la expresión. La columna sin normalizar (est_counts) de los archivos generados por Kallisto fue seleccionada para cada edad-tejido y concatenada dentro de una tabla de cuentas general para realizar los análisis de expresión diferencial. Los perfiles de expresión fueron realizados a través de comparaciones para cada edad-tejido contra el promedio del resto de los mismos, obteniendo al final un total de tres contrastes de interés para expresión diferencial.

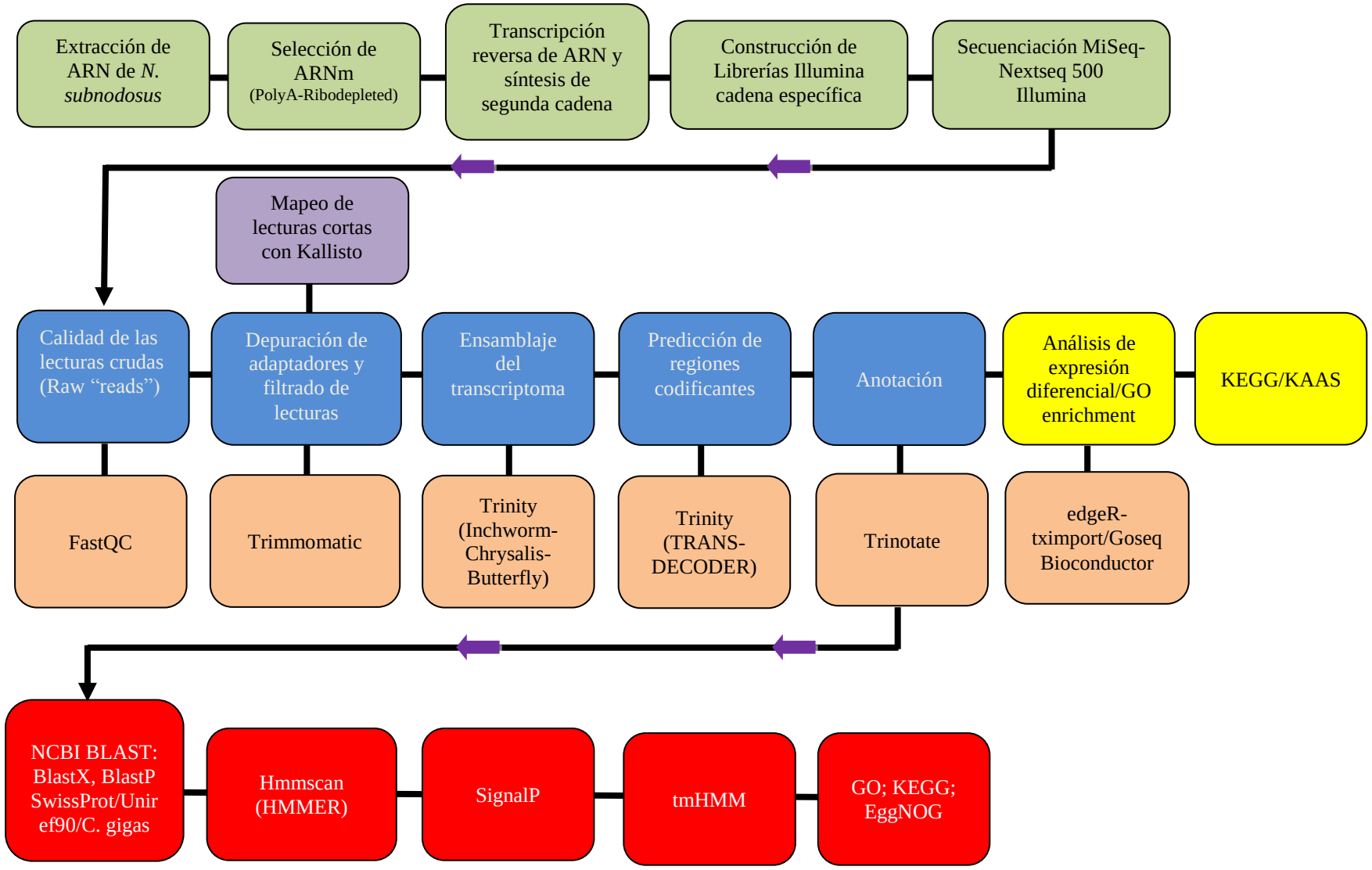


Figura 5. Flujo de trabajo general denotando los métodos bioinformáticos y el programa de cómputo empleado en los análisis transcriptómicos. El computo que requirió mayor recurso fue realizado usando el cluster "mazorka" del Cinvestav-Irapuato.

Dichos contrastes fueron realizados utilizando el paquete de Bioconductor edgeR (Robinson *et al.*, 2010), el cual usa un modelo general linealizado (GLMs), y asume que la expresión de los conteos para cada gen sigue una distribución binomial negativa. Los transcritos fueron primeramente filtrados manteniendo únicamente aquellos que presentaban >1 cuentas por millón (cpm) para al menos dos muestras. Ya que como se mencionó antes, nuestro diseño experimental no contaba con replicas biológicas, se fijó un valor de dispersión de 0.1 que es el valor recomendado por edgeR cuando no se cuenta con réplicas biológicas. Contigs con un múltiplo (*fold change* FC) mayor a 2 y un valor-*P* ajustado (FDR) < 0.05 (para pruebas múltiples de acuerdo al método de Benjamini y Hochberg, 1995) fueron considerados como diferencialmente expresados.

6.1.6 Enriquecimiento de términos ontológicos (GO)

Para cada conjunto (contrastes) de genes expresados diferencialmente en cada edad-tejido, se realizó un análisis de enriquecimiento de términos ontológicos (Gene Ontology, GO). La anotación completa de términos GO fue extraída del archivo integrado de anotación, incorporando todos los términos parentales para cada transcrito. El análisis de enriquecimiento fue realizado mediante el paquete de R goseq (Young *et al.*, 2010) empleando el método de aproximación de Wallenius e incorporando la corrección por longitud. Términos GO con un valor-*P* ajustado <0.25 fueron considerados significativamente enriquecidos. Gráficos tipo GOBubble fueron obtenidos usando el paquete de R GOplot v1.0.2 (Walter *et al.*, 2015), incluyendo la opción "*reduce_overlap"* con la finalidad de reducir el número de términos redundantes.

6.2 Análisis de expresión por PCR punto final para transcritos asociados a la determinación y diferenciación sexual

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos, obtención del fragmento parcial por PCR y secuenciación subsecuente

Los oligonucleótidos (Tabla I) se diseñaron con el programa en línea primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) partiendo de una secuencia consenso

generada a través de múltiples alineamientos de las isoformas potencialmente distintas reconstruidas por Trinity y, optando por regiones conservadas dentro del marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) para las isoformas de cada gen. Partiendo de ADNc-RACE de gónada como templado, el cual fue generado como lo descrito en López-Flores (2015), se realizó la amplificación de todos los fragmentos con las condiciones de PCR que se describen a continuación: 1 U de GoTaq R Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq^{R} Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 µM de cada par de primer (Tabla I) y 1 µL de ADNc-RACE en un volumen final de reacción de 15 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador C1000 TM Bio-Rad con el programa siguiente: 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 30 s a 63°C, 15 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de amplificación se visualizó en gel de agarosa 1% en TBE. Los productos de PCR obtenidos fueron ligados al vector pGEM®-T-Easy (Promega). El producto de ligación se insertó en bacterias JM109 (Promega). Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB-Agar-Ampicilina por 18 horas a 37°C para la propagación de las colonias. Se seleccionaron colonias positivas, y se procedió a la recuperación del ADN plasmídico por medio de lisis alcalina, posteriormente se verificó la presencia del inserto mediante una PCR de punto final utilizando los oligonucleótidos universales M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R_pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') con las condiciones descritas previamente en esta sección y 1 µL de ADN plasmídico diluido 1/50, con un volumen final de reacción de 15 µL. La reacción de amplificación se realizó con el siguiente programa: 3 min a 94°C, 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C por 25 ciclos, y una extensión final por 5 min a 72°C. Se realizó una electroforesis en agarosa (1%) para verificar los insertos de las clonas, y los productos de PCR de los insertos positivos fueron enviados a secuenciar como producto de PCR a Macrogen, Corea.

6.2.2 Material biológico, asilamiento de ARN y síntesis de ADNc

Organismos diploides generados en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola (LGyMAA) a partir de reproductores colectados en Laguna Ojo de Liebre, que han sido mantenidos en el estero de Rancho Bueno, Bahía Magdalena (BCS) fueron

confirmados como verdaderos diploides por citometría de flujo usando Partec PAII (Sysmex) y posteriormente diseccionados, procesados histológicamente y analizados en un microscopio para seleccionar organismos en estado indiferenciado de gametogénesis y en madurez. A un total de cinco organismos se les tomó músculo, pie, gónada indiferenciada y/o madura (de acuerdo a Arellano-Martínez *et al.,* 2004), manto y branquia, los cuales fueron colocados en solución preservadora de ácidos nucleicos y almacenados a -20°C. El ARN total fue aislado partiendo de ~100 mg de tejido, el cual fue homogenizado con 1 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics), usando ~ 100 mg de perlas de vidrio de 425-600 μm (SIGMA-Aldrich) como una matriz disruptiva en el instrumento FastPrep-24 (MP Biomedicals), y aplicando tres pulsos oscilatorios de 40s a una velocidad de 6.0 m/s con intervalos de 5 min. El ARN total obtenido en la fase acuosa fue precipitado y lavado en dos ocasiones con etanol al 75%, resuspendiendo el precipitado (*pellet*) en ~30-50 μL de agua libre de nucleasas. La concentración del ARN fue determinada con un NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). Relaciones de absorbancia (260/280 y 260/230) superior a 1.9 fueron considerados como indicador de un ARN puro. La integridad del ARN fue evaluada observando la proporción ribosomal en un gel de agarosa al 1% con 1×TBE buffer (Tris-Boric-EDTA). Para evitar la contaminación de cualquier traza de ADN genómico, un total de 3 μg de ARN preparado fue incubado por 30 min a 37°C con 2 U de RQ1 RNAse-free DNAse (Promega) en un volumen de reacción de 10 μL, para posteriormente ser inactivada a 65°C por 10 min con 1 μL de stop solution (20 mM EGTA, pH 8.0). Para verificar un tratamiento efectivo con DNAse, cada muestra de DNAse-RNA fue sometida a una reacción de PCR usando oligonucleótidos de *ef-α1* (Tabla I) a 0.2 μM y las mismas concentraciones antes descritas (Sección 6.2.1). Finalmente, la síntesis de ADNc fue llevada a cabo con el ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor, partiendo de 20 pmol de oligo-dT (18) como iniciador de la transcripción y 500 ng de RNA-libre de ADNg. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C.

Posteriormente se evaluó la presencia o ausencia de los transcritos seleccionados (Tabla I) a través de una PCR punto final utilizando al gen constitutivo *ef-1α* como control. Se preparó una mezcla única para amplificar todos los genes, conteniendo lo siguiente: 0.1 U de

GoTaq R Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq^{R} Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 0.15 μM de cada par de primer (Tabla I) y 0.5 μL de ADNc en un volumen final de reacción de 15 μL. El programa de amplificación fue el mismo que el mencionado en la sección 6.2.1. Los productos de PCR fueron teñidos con GelRed (Biotium) y resueltos en un gel de agarosa (1%). Las imágenes fueron capturadas en el sistema FMBIO III (Hitachi).

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión tisular por PCR de genes putativos de diferenciación/determinación sexual durante la gametogénesis. Sobre la línea se muestra el gen control utilizado.

Genes		**oligonucleótido (5'- 3')**	**Temperatura de alineamiento (°C)**	**Tamaño (pb)**
ef-1α	Fw	GTGCCAGTGGGTAGGGTAGA	60	199
	Rv	CTCCAGCAACGTTTCCTCTC	60	
Ns-dmrta2	Fw	CTACCCACCTGCATTTCCTG	62	159
	Rv	AGGCAGCCAGACTTGTCACT	62	
Ns-ovo	Fw	TAGTCCGAAAACCCAAGACG	62	176
	Rv	GTCGGTCATTCCCATACCAC	62	
Ns-vir	Fw	CCCTTGCCTCTCCCTCTTCA	63	175
	Rv	GGCGCAGGACATGCTGTAAC	63	
Ns-wnt4	Fw	CACCCCGTCAGAAGCAGTTG	63	159
	Rv	GGAGGACTTTGCCGAAGACG	63	
Ns-tra2a	Fw	ACACACAGGAGCGGGACCTT	63	226
	Rv	GTGGGCGTGTGTGCTCTTTC	63	
Ns-pbx1	Fw	ATTCGCCAGGTCTACCAAAC	60	145
	Rv	GTATGATGCCAACCATACGC	60	
Ns-sfrp2	Fw	AGTTCATGGAGCGTTTCTGG	60	142
	Rv	ATACAACCTTCCCGACATGG	60	
Ns-doa	Fw	GGCAAACAAAGGGAGATAACC	60	124
	Rv	GATCCCAGAATCCTCTCCATC	60	
Ns-sex-1	Fw	CCTTCCATCACCTGTCAATG	60	148
	Rv	TGAAGCTTTCTCGCCACAC	60	
Ns-sox9	Fw	CGTCCACGGAACAGCTTCTG	63	198
	Rv	GACCCCTTTGGGGCATAGGT	63	

6.3 Análisis filogenéticos de genes de determinación/diferenciación sexual

Dos de los genes involucrados en la determinación del sexo en otros organismos, y encontrados en la almeja mano de león fueron sujetos a un análisis filogenético con la finalidad de establecer su homología dentro de los miembros de los genes *dmrt* y *sox.* Secuencias homólogas de proteínas para cada análisis fueron obtenidas de la base de datos GenBank-NCBI (Tabla II) y posteriormente alineadas con el programa MUSCLE (Edgar, 2004). La historia evolutiva fue inferida en MEGA 6 usando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo matricial de Jones-Tylor Thornton (JTT) el cual fue

Tabla II. Lista de las especies usadas en el análisis filogenético.

Especie	Orden	Familia	Nombre del gen/número de acceso
Alligator mississippiensis	Crocodila	Alligatoridae	*Sox-9/KYO30924*
Pinctada fucata	Pterioida	Pteriidae	*Sox-9/AGI96396*
			Dmrt4/AIW04133
Pinctada Margaritifera	Pterioida	Pteriidae	*Sox-9/AIE16096*
Rattus norvegicus	Rodentia	Muridae	*Sox-9/NP_536328*
Mus musculus	Rodentia	Muridae	*Sox-9/NP_035578*
			Sox-7/NP_035576
			Dmrt1/NP_056641
			Dmrt2/AAH27669
			Dmrt3/NP_796334
			Dmrt4/NP_783578
			Dmrt5/NP_758500
Takifugu rubripes	Tetraodontiformes	Tetraodontidae	*Sox-9/XP_003979726*
			Sox-8/NP_001072112
			Sox-7/ AAQ18504
			Dmrt3/NP_001033034
			Dmrt5/NP_001033039
Xenopus laevis	Anura	Pipidae	*Sox-9-B/ NP_001087942*
			Sox-8/ NP_001083964
			Dmrt4/NP_001084923
			Sox-7/NP_001079337
Gallus gallus	Galliformes	Phasianidae	*Sox-9/AAB09663*
			Sox-8/NP_990062
Homo sapiens	Primates	Hominidae	*Sox-9/NP_000337*
			Sox-8/NP_055402
			Sox-7/NP_113627
			Dmrt1/NP_068770
			Dmrt2/NP_870987
			Dmrt3/NP_067063
			Dmrt4/NP_071443
			Dmrt5/NP_115486
Crassostrea gigas	Ostreoida	Ostreidae	*Sox-8-like/NP_001295801*
			Dmrt5/NP_001295834
Danio rerio	Cypriniformes	Cyprinidae	*Sox-8/NP_001020636*
			Sox-7/ NP_001074219
			Dmrt1/ NP_991191
			Dmrt2/NP_571027
			Dmrt3/AAU89440
			Dmrt5/NP_001007065
Taeniopygia guttata	Passeriformes	Estrildidae	*Dmrt1/ ABE65385*
Eriocheir sinensis	Decapoda	Grapsidae	*Dmrt-like/ADH15934*
Nodipecten subnodosus			*Dmrt5/ TR47626_c2_g1_i1*
			Sox-9/ TR35450_c0_g1_i1

determinado con la opción modeltest (Tamura *et al.*, 2013). El soporte de "bootstrap" fue fijado en 1000 iteraciones y las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas fueron colapsadas.

6.4 Identificación de genes potencialmente asociados al arresto meiótico en triploides a través del análisis transcriptómico al inicio de la gametogénesis en diploides y triploides

6.4.1 Material biológico y aislamiento de ARN para la reconstrucción del transcriptoma

Se utilizaron organismos diploides y triploides generados como se menciona en la sección 6.2.2. Se realizaron colectas mensuales desde febrero del 2013 hasta agosto del mismo año (López-Flores, 2015) con fines de capturar todos los estadios de desarrollo gonádico en ambas ploidías por duplicado n=12 (inactiva, inicial, y solo en diploides, desove de la región ovárica y testicular) (Fig. 6). Cada mes se colectaron alrededor de 100 organismos presuntos triploides y 50 diploides; todas las muestras obtenidas se preservaron en RNAlater a -20°C hasta su uso. Se diseccionó la gónada y se colocó en solución preservadora de ácidos nucleicos (RNAlater). Adicionalmente una porción de gónada fue diseccionada para análisis histológicos y así confirmar el estadio de desarrollo gonádico capturado. Dentro del grupo de los triploides solamente se procesaron histológicamente aquellos organismos que fueron certificados como triploides mediante citometría de flujo con el analizador de Ploidía Partec PAII (Sysmex). Una vez iniciada la maduración sexual en campo se continuó con las colectas con el objetivo de obtener organismos desovados. Los procedimientos de extracción de ARN, construcción de librerías y posterior secuenciación fueron desarrollados en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA de la UNAM, y se describen brevemente a continuación: para la extracción del ARN se utilizó el kit Quick-RNA™ MiniPrep de Zymo Research siguiendo las instrucciones descritas en el mismo. Las bibliotecas de RNA-Seq fueron construidas con el kit TruSeq Stranded mRNA Sample Prep HT siguiendo las recomendaciones del fabricante. A partir de 2 μg de ARN total, se realizó una captura de ARNm utilizando un oligonucleótido Poly-T acoplado a perlas magnéticas. Una vez capturado y eluido, el ARN fue fragmentado en

pequeñas piezas con la presencia de un catión divalente a 94°C durante 8 min. El ARN fragmentado fue hibridado mediante hexanucleótidos semialeatorizados (*random primer*) y se generó la primera cadena de ADNc utilizando una enzima reverso-transcriptasa (RT). La especificidad de la cadena se logró al remplazar dTTP con dUTP seguido de la síntesis de la segunda cadena con el uso de RNase H y una DNA polimerasa I. El producto fue purificado utilizando ampure XP beads (Beckman coulter) y se resuspendió en una solución amortiguadora. El ADN de doble cadena se adeniló el extremo 3’ de cada fragmento con la ayuda de la enzima klenow exo, y se ligaron los adaptadores de doble cadena a cada extremo. Se purificó con ampure XP beads y se amplificó utilizando oligonucleótidos complementarios a secuencias adaptadoras. El producto de la amplificación fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y las bandas entre 260 y 400 pb fueron cortadas. Una vez purificado el producto de la reacción de PCR, se cuantificó pcon el fluorometro Qubit 3.0 (ThermoFisher, US), y el tamaño de las bibliotecas fue analizado por electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100). Se calculó la concentración nanomolar de la biblioteca y se preparó una solución 4 nM que posteriormente fue la base para generar una segunda solución a 1.8 pM de ADN desnaturalizado que fue cargada en el sistema NexSeq 500 2×75.

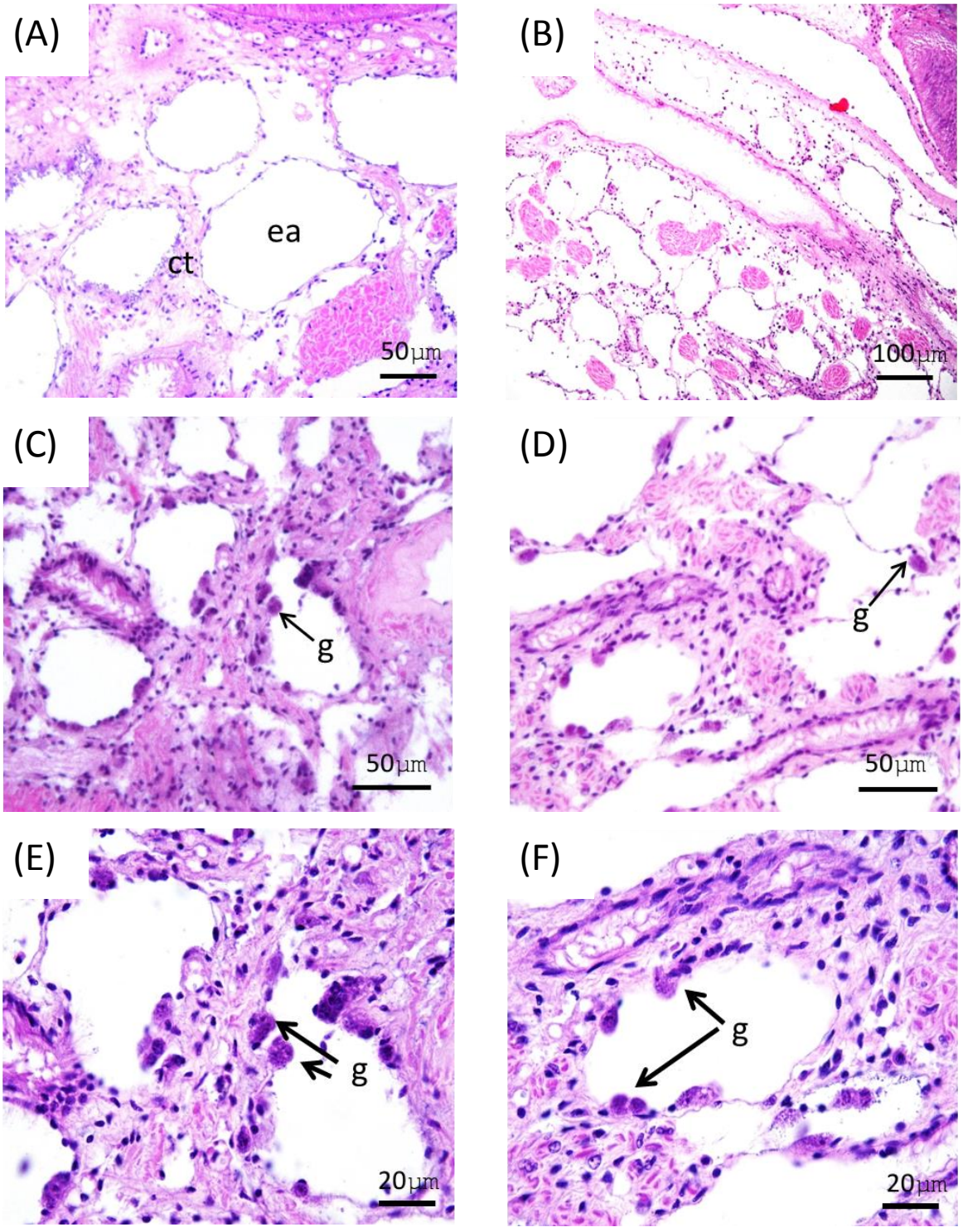


Figura 6. Estadios gametogénicos de *Nodipecten subnodosus* seleccionados en este estudio. Estadios gametogénicos para diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F). Gónada de diploide inactiva (A), y triploide inactiva (B), gónada de diploide inicial (C, E) y triploide inicial (D, F). Tejido conectivo = ct; Acino vacío = ea; gonias = g.

6.4.2 Calidad de las lecturas, ensamblado e inferencias de las regiones codificantes.

Los análisis bioinformáticos se realizaron como lo descrito en la sección 6.1.3 a excepción de las versiones usadas de Trimmomatic-v0.36 (Bolger *et al.,* 2014), Trinity (v2.4.0) y TransDecoder (V3.0.0). Adicionalmente, se incluyó la opción --*SS_lib_type RF* durante el ensamblado *de novo* por Trinity. En el caso de TransDecoder se incluyeron búsquedas por BLASTp-HMMER usando las bases de datos de UniRef90 y Pfam con la finalidad de incrementar la sensibilidad en la identificación de ORFs. Finalmente, para evaluar que tan completo había sido reconstruido el transcriptoma se utilizó el programa Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO v 3.0.2) (Simão *et al.,* 2015) usando la base de datos Metazoa_obd9 Metazoa_odb9 la cual contenía 978 BUSCO grupos.

6.4.3 Anotación funcional del transcriptoma

El proceso de anotación funcional fue conducido utilizando el mismo flujo bioinformático (programas y parámetros) descritos en la sección 6.1.4 pero excluyendo la base de datos de *Crassostrea gigas* dado que esta se encuentra incluida en la de UniRef90. Adicionalmente, el encabezado de la base de datos de UniRef90 fue modificado usando un script en Perl (5_custom_uniref90.pl, ver sección 6.1.4) con la finalidad de sustituir el identificador por el nombre de la proteína, de tal forma que las búsquedas en la base de datos fueran más amigables con el usuario.

6.4.4 Análisis de expresión diferencial

Las lecturas depuradas fueron mapeadas contra el transcriptoma *de novo* y cuantificadas usando Kallisto v0.42.5 (Bray *et al.,* 2016). Las abundancias de los transcritos fueron importadas usando el paquete de R tximport (v1.6.0) (Soneson *et al.,* 2015) empleando el método de "original counts and offset method". Una vez obtenida la tabla de conteos, incluyendo dos replicas biológicas, se desarrollaron contrastes pareados de expresión diferencial durante la transición inactivo-inicial para organismos diploides y triploides. Este análisis fue realizado con el paquete de R, edgeR (v3.20.8) (Robinson *et al.*, 2010), usando un enfoque de modelo lineal generalizado. Contigs con un múltiplo Log*fold change* (FC) mayor a 4 y un valor-*P* ajustado <0.05 (para pruebas múltiples de acuerdo al método de

Benjamin y Hochberg, 1995) fueron considerados como diferencialmente expresados. Finalmente se realizó un mapa de calor "heat map" usando los valores normalizados de expresión log_2cpm de los primeros 55 transcritos expresados diferencialmente en el contraste de diploides y triploides (inicial *vs* inactivo) con el valor-*P* más bajo y con anotación funcional. Para esta visualización se utilizó el paquete de R gplots v.3.0.1. (Warnes *et al.*, 2016) (https://CRAN.R-project.org/package=gplots).

6.4.5 Análisis de vías KEGG

El servidor de anotación automática KEGG (http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main) fue empleado para mapear vías KEGG de los ortólogos de almeja asignados. Dichas asignaciones de ortología KEGG (KO) fueron realizadas utilizando el método de "bidireccional best hit" (BHH) de BLAST partiendo del archivo de ORF inferidos por TransDecoder.

6.5 Bloqueo específico de los genes *dmrt1* y *p33-ringo* a través de dsRNA en almejas diploides

6.5.1. Diseño de oligonucleótidos para generar doble cadena de ARN (dsRNA por sus siglas en inglés)

A partir de la información transcriptómica previa generada durante la espermatogénesis de *N. subnodosus* (Llera-Herrera *et al.*, 2013) se seleccionaron los genes, *dmrt1* y *p33*, caracterizados previamente por Llera-Herrera (2013) y López-Flores (2015) con funciones relevantes en procesos de diferenciación sexual y meiosis respectivamente. Se seleccionaron un par de oligonucleótidos existentes (Tabla III) y se generó la sonda de ARN de doble cadena (dsRNA) de cada gen, mismos que se encuentran dentro o cerca de la región codificante (Anexo I). Para el gen *gapdh*, utilizado como control positivo de la interferencia, se aisló un transcrito de 562 pb (Fuente-Gómez, 2016) a partir de una secuencia parcial del transcriptoma global obtenido de *Nodipecten subnodosus*. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron con base al alineamiento de diferentes especies de pectínidos (contig de 1586 pb de transcriptoma de *Nodipecten subnodosus*

TR50035|c0_g3_i2; *Azumapecten farreri* GenBank KC573783; *Mizuhopecten farreri* GenBank GR86768; *Pecten maximus* GenBank DN794150) utilizando el programa MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) con fines de seleccionar una región conservada entre las especies. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa en línea primer3 plus (http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi) (Untergasser *et al.*, 2012). Por último, se usó el vector pKGWFS7 (http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pKGWFS7/search/index/) para obtener un fragmento del gen *egfp (enhanced Green Fluorescence Protein)*, el cual fue utilizado como control negativo de silenciamiento (Galindo-Torres, 2014).

6.5.2 Aislamiento y secuenciación del transcrito parcial del gen de *gapdh* en *Nodipecten subnodosus*

Se realizó PCR punto final en un termociclador C1000 Touch TM ThermalCycler para aislar el fragmento esperado con los cebadores previamente diseñados (Tabla III). Se utilizó un volumen final de 12 µl conteniendo 1X de buffer de PCR, 0.2 de dNTPs, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 de Nsub_gapdh_F y Nsub_gapdh_R, 025 U de GoTaq y 2 µL (~100 ng) de ADNc de tejido muscular de *N. subnodosus*. Las condiciones de la amplificación fueron: 3 min a 94 °C seguidos de 20 ciclos, cada uno de 30 s a 94°C, 30 s a 61.6°C y 40 s 72°C, con una extensión final de 12 min a 72°C. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en TBE 1X (90 V, 30 min); se utilizó un marcador de tamaños de 50 a 10,000 pb (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker (Sigma-Aldrich), confirmando el tamaño esperado del amplicón de 562 pb. El transcrito obtenido (~560 pb) se ligó en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega) y se clonó en bacterias competentes *E. coli* JM109 (Promega); las colonias positivas se seleccionaron y se crecieron en medio LB-Agar con ampicilina durante ~18 horas, y posteriormente se realizó una extracción de ADN plasmídico con el protocolo de MiniPreps. Utilizando este ADN se realizó una amplificación con los oligonucleótidos M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R_pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') con las mismas concentraciones antes descritas. Las condiciones de la amplificación fueron: 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 40 s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de interferencia génica para la generación de sondas de ARN de doble cadena (dsRNA) y su cuantificación por qPCR. T: temperatura de alineamiento.

Oligonucleótidos	**Secuencia 5'-3'**	**T (°C)**	**Tamaño**	**Sondas dsRNA**
Nsub_dmrt1_F	CCATCGGTATCCCCACTATG	60	616	Objetivo
Nsub_dmrt1_R	TGTGAGAAGTCCCTCTGTGC	60		
Nsub_p33_F	ACATGGGAGGCTTTTCTCGG	60	461	Objetivo
Nsub_P33_R	CCATTATCTCTTCACAGCATCGCT	60		
Nsub_gapdh_F	TCCACACATGGCTGCTACAA	60	562	Control positivo
Nsub_gapdh_R	GGACACGGAAAGCCATACCA	60		
eGFP_F	GACGTAAACGGCCACAAGTT	50	609	Control negativo
eGFP_R	GAACTCCAGCAGGACCATGT	50		
T7	TAATACGACTCACTA	60		
Oligonucleótidos usados en la cuantificación de la expresión génica por qPCR				
Nsub_qdmrt1_F	GCGCCAATACCCGTTAATACAG	60	243	Objetivo
Nsub_qdmrt1_R	AAACCCCATGCCAACACTTC	60		
Nsub_qp33_R	ATGGGCTCTTGGTCACAAATGG	60	215	Objetivo
Nsub_qp33_R	CCATCGTCATCAGGGTCTTT	60		
Nsub_qgapdh_F	TATTGGCCGTCTCGTGTTAC	60	126	Control
Nsub_qgapdh_R	TAGCAGCCATGTGTGGAATC	60		
Nsub_q18s_F	GAAATTCTTGGATCGCCGTA	60	168	Endógeno
Nsub_q18s_R	GCCGAGTCATTGAAGCAACT	60		
Nsub_qef-1α_F	GTGCCAGTGGGTAGGGTAGA	60	199	Endógeno
Nsub_qef-1α_R	CTCCAGCAACGTTTCCTCTC	60		
Nsub_qact-β_F	CAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACC	60	209	Endógeno
Nsub_qact-β_R	GTTGAAGGTCTCGAACATGATCTG	60		
Nsub_qrp-l8_F	CGTCATGGATACATCAAGGGT	60	153	Endógeno
Nsub_qrp-l8_R	CAAACAGTCCAGTGTACATGCC	60		

Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X, utilizando el marcador de tamaños Direct Load™ Wide Range DNA Marker (Sigma-Aldrich) y confirmando el tamaño esperado del fragmento. Se realizó una amplificación con las mismas condiciones y concentraciones utilizadas anteriormente para la confirmación del fragmento insertado en las clonas usando un volumen de 50 μL para su posterior secuenciación. La secuenciación se realizó en ambos sentidos por Macrogen

(Corea). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit v.7.2.5 y se realizó un análisis de similitud con otras secuencias nucleotídicas ya existentes con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para corroborar su similitud.

6.5.3 Material biológico

Organismos diploides de almeja mano de león de ~5 cm de altura de concha, caracterizados por estar al inicio de la gametogénesis, y sin observar macroscópicamente desarrollo de gametos, fueron mantenidos en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola en condiciones de maduración (Temp: 21°C, alimentación $2x10^9$cel/org), proporcionándoles un alimento combinado (1:1) de microalgas (*Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*).

6.5.4 Generación de moldes de transcripción para *dmrt1*, *p33, gapdh* y *egfp* para la síntesis *in vitro* de ARN de doble cadena

La amplificación de cada fragmento para ser utilizado como molde inicial se efectuó con 1 U de GoTaq^R Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq^R Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 µM de cada par de oligonucleótidos (Tabla III) y 1 µL de ADNc-RACE de gónada. Para el caso de *gapdh* fueron utilizados 2 µL de ADNc-RACE de tejido muscular, con un volumen final de reacción de 15 µL. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 TM Bio-Rad con el siguiente programa de PCR: 94°C por 3 min, seguida de 94°C por 30s, X°C (ver Tabla III para las temperaturas de alineamiento) por 40 s, 72°C por 30 s (desnaturalización - alineación - extensión) por 30 ciclos para *dmrt1* y *p3*3 y 20 ciclos para *gapdh*, y una extensión final a 72°C por 10 min. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium).

A los fragmentos obtenidos para cada gen les fue adicionado la región promotora T7 usando la siguiente estrategia: el producto de PCR obtenido de cada gen fue ligado a adaptadores T7 en ambas regiones flanqueantes 5'utilizando el kit BLOCK-iTRNAi TOPO Transcription kit (Life Technologies) usando 1 µg del producto de PCR y 0.5 µL del T7-

TOPO linkers, seguido de una incubación por 5 min a temperatura ambiente. El producto ligado fue usado en amplificaciones consecutivas por PCR asimétricas a través de la combinación de los cebadores X_F o X_R (la X se refiere a cualquier oligonucleótido de la Tabla III) con un cebador T7 utilizando 1 μL del producto de PCR ligado al TOPO-Linker. Los moldes generados previamente fueron utilizados para la generación de dsRNA utilizando el MEGAscript RNA kit (Life Technologies), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

6.5.5 Diseño experimental para el silenciamiento génico por dsRNA

Para el experimento funcional, un total de 33 organismos al inicio de la diferenciación sexual (~5 cm alto de concha) fueron colocados para cada tratamiento en diez contenedores con agua marina (35 ups). Posteriormente, grupos de seis almejas fueron inyectadas consecutivamente los días 1, 7 y 12 en tejido gonádico con dsRNA (Fig. 7) de uno u otro de los siguientes genes: genes blanco (*dmrt1* y *p33*), el gen *egfp* como control negativo de silenciamiento inespecífico, *gapdh* como control positivo, y solución salina (20 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.4) como control negativo. Las dosis utilizadas para cada gen fueron; 20 y 60 µg para los genes *dmrt1, gapdh* y *egfp*, y para *p33-ringo*, 5 y 20 µg (Fig. 7), todas diluidas en un volumen total de 100 µL de solución salina. Las concentraciones usadas de los genes blanco fueron establecidas de acuerdo a los niveles de expresión reportados en Llera-Herrera (2013) para los mismos. Los tiempos para la aplicación de la inyección del dsRNA fueron realizados como se muestra en la figura 7B.

Una vez inyectados en la gónada, y con la finalidad de aumentar la eficiencia de entrega del dsRNA al interior de la célula, se aplicaron inmediatamente después a la inyección 5 pulsos eléctricos de 50V con una longitud de pulso de 50 milisegundos, presentando intervalos de 100 milisegundos utilizando un generador de pulsos eléctricos (ECM 830, BTX) y electrodos tipo pinza de 5 mm (BTX, Tweezertrodes, 45-0489). Los organismos fueron mantenidos en condiciones óptimas para el desarrollo gonadal durante 30 días, realizando muestreos los días 3, 9, 15, 21 y 30. En cada muestreo se evaluaron los efectos fenotípicos en el crecimiento gonadal (peso de la gónada) y del desarrollo gametogénico a través de análisis histológicos preservando tejido gonadal en solución Davidson. Para evaluar el efecto de la interferencia y posible silenciamiento génico, en cada muestreo se tomaron muestras de gónada para evaluar los efectos potenciales de la interferencia mediante la cuantificación del ARNm específico para cada gen por PCR en tiempo real. Los tejidos destinados para el aislamiento de ARN total fueron preservados en solución fijadora de ácidos nucleicos (RNAlater). Los pesos de las gónadas fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías, considerando como factores el tratamiento y el número o día de muestreo. Esto con la finalidad de entender si los tratamientos tuvieron un efecto en la madurez, reflejada en el peso de la gónada. Como análisis post-hoc, se utilizó el método de

LSD de Fisher para establecer las diferencias entre las medias. La significancia establecida para todos los análisis fue de $P<0.05$.

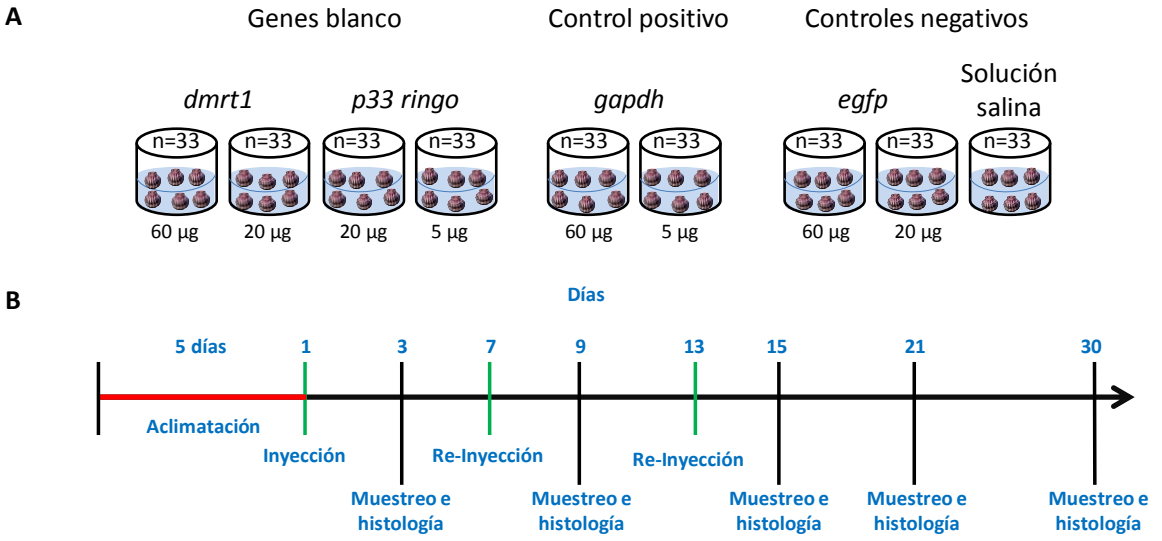


Figura 7. Diseño experimental para RNAi. (A) Dosis y número de organismos interferidos. N = número total de organismos inyectados por tratamiento. (B) Escala temporal (días) en la cual se realizaron las inyecciones/electroporaciones y las disecciones.

6.5.6 Validación del silenciamiento por PCR cuantitativo (RT-qPCR)

6.5.6.1 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y cuantificación por qPCR

La extracción de ARN y la síntesis de ADNc se realizó como lo descrito en la sección 6.2.2 empleando el sistema Improm-II Reverse Transcription system (Promega), partiendo de 400 ng de ARN-libre de ADN. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C.

Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pozos con cubiertas plásticas, empleando el instrumento CFX96 Touch™ C1000TM ThermalCycler (Bio-Rad). Se utilizó al sistema de detección fluorescente con EvaGreen en una mezcla de PCR como se describe en Llera-Herrera *et al.* (2012). Cada reacción de PCR se desarrolló por triplicado para cada muestra. Capturas de disociación de 60 a 94ºC con un incremento térmico de 0.5ºC/s fueron graficadas; las curvas únicas representaron una especificidad correcta de la reacción. Las eficiencias para cada gen fueron determinadas de acuerdo al cálculo de la pendiente

obtenida a través de cuatro diluciones seriadas, expresada como el cambio de la concentración (log) con respecto al Ct (lineal) usando la ecuación $E = (10^{(-1/slope)}-1)$ (Bustin *et al.,* 2009). Cinco genes potenciales para ser utilizados en la normalización de la expresión relativa (*rpl8, 18s, ef, β-Actina*) (Tabla III) fueron sometidos a una validación de su estabilidad haciendo uso de la plataforma en línea RefFinder (http://fulxie.0fees.us/?type=reference&ckattempt=1) (Xie *et al.,* 2012.), la cual integra los algoritmos de estabilidad geNorm (Vandesompele *et al.,* 2002), Normfinder (Andersen *et al.,* 2004), Bestkeeper (Pfaffl *et al.,* 2004) y el método comparativo delta-Ct (Silver *et al.,* 2006). Finalmente, la expresión relativa se obtuvo a partir de la transformación de valores de Cq a cantidades relativas (RQ por sus siglas en inglés) para cada gen (sea gen de interés o gen de referencia) para cada muestra, mediante la ecuación $RQ = E^{Cq(min)-Cq}$ (Hellemans *et al.,* 2007). Una vez transformados los valores de expresión en cantidades relativas, la expresión relativa (RE por sus siglas en inglés) para cada gen de interés es calculada mediante la ecuación RE = RQ/NF, donde RQ es como antes indicado la cantidad relativa del gen de interés, y NF es el factor de normalización obtenido como la media geométrica de las cantidades relativas de los genes de referencia encontrados como los más estables. Determinados los valores de expresión relativa para cada gen, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el programa Statistica V8.0 (StatSoft). Las diferencias significativas en su caso son presentadas con un valor de significancia de $P<0.05$. Diferencias entre condiciones gametogénicas fueron evaluadas usando una prueba *post-hoc* LSD Fisher.

7. RESULTADOS

7.1 Generar información transcriptómica *de novo* a partir de larva con mancha ocular, semilla, gónada indiferenciada, glándula digestiva y músculo aductor de la almeja mano de león *N. subnodosus*

7.1.1 Secuenciación del transcriptoma global, reconstrucción y predicción de regiones codificantes

A partir de la secuenciación por medio de la plataforma Illumina-MiSeq de librerías de larva, semilla, glándula digestiva, gónada inactiva y músculo se generó un total de 27’137,390 lecturas crudas pareadas (“paired-end raw-reads”) de 2×250 pb de longitud. Cada conjunto de lecturas de las librerías, fueron depositadas en los archivos de lecturas cortas (SRA por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con los números de acceso: SAMN05912826, SAMN05912827, SAMN05912828, SAMN05912829, SAMN05912830 y SAMN05912831. Después de someter las lecturas a un proceso de depuración de adaptadores y de lecturas de baja calidad, se ensamblaron un total de 22’307,373 (82%) (Tabla IV) lecturas de al menos 50 nucleótidos de longitud con una calidad mínima (Phred Score) superior a 25 usando Trinity (v2.0.6). En total y a partir de esas lecturas se ensamblaron, 249,768 contigs, y después de un filtrado por secuencias contaminadas, 243,774 contigs con una longitud media de 775 nt y un valor N50 = 980 nt fueron retenidos. El transcriptoma fue depositado en DDBJ/EMBL/GenBank con el número de acceso GFNL00000000-GFNL01000001:GFNL01243774 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GFNL01&display=contigs&page=1). La longitud de todos los contigs osciló entre 224 a 38,039 nt (Tabla V). La distribución de las longitudes de los contigs es mostrada en la figura 8C. Un total de 196, 835 contigs tuvieron un soporte de lecturas mayor o igual a un transcrito por millón (TPM). TransDecoder identificó 43, 252 transcritos con al menos una región codificante candidata, representando el 17.74% del total de los contigs ensamblados. De estos transcritos con potencial región codificante, 36,521 transcritos (84%) tuvieron identidad por BLASTx cuando se realizaron búsquedas en UniRef90.

7.1.2 Eficiencia en la eliminación de ARN ribosomal

Con el propósito de comparar la eficiencia en la depuración de RNAr utilizando los protocolos Ribo-Zero y PolyA en la muestra de semilla, se realizó un mapeo de las lecturas ("reads") de ambas librerías empleando el programa Kallisto V0.42.5 (Bray *et al.,* 2016) contra la subunidad ribosomal menor (SSU, 18s) así como contra la subunidad mayor (LSU, 28S), mismas que fueron obtenidas de la base de datos SILVA rRNA https://www.arb-silva.de/. Debido a la disponibilidad, para la subunidad menor se utilizaron secuencias de Pectínidos y para la subunidad mayor se utilizaron secuencias de *N. subnodosus* y *nodosus*. Después de contabilizar los reads mapeados, la librería Ribo-Zero mostró cerca de dos veces el número de reads mapeados a ARNr (1.26%) comparado con la librería de Poly-A (0.64%). Sin embargo, ambos protocolos mostraron un alto grado en excluir los ARN ribosomales.

Tabla IV. Número de lecturas pareadas de RNA-Seq antes y después de la limpieza.

Métrica	**L**	**SP**	**SRZ**	**IG**	**M**	**GD**	**Total**
Lecturas crudas (PE)	4’024,844	4’325,100	3’885,086	5’578,326	4’174,812	5’148,622	27’136,790
Lecturas limpias (PE)	3’605,112	3’242,830	3’311,598	4’181,092	3’945,284	4’021,457	22’307,373

Abreviaciones: L, Larva con mancha; **SP**, Semilla (usando Poly-A); **SP-SRZ** (-Ribo-Zero selección); **GD**, Glándula digestiva; **IG**, Gónada inactiva **M**, Músculo aductor.

Tabla V. Estadísticas del proceso de ensamblado y anotación del transcriptoma global de *N. subnodosus.*

Ensamble	**Número**
Genes-Trinity totales	223,481
Transcritos-Trinity totales	243,774
Contenido de GC (%)	37.39
Contig N_{10}	4,280
Contig N_{20}	2,631
Contig N_{30}	1,818
Contig N_{40}	1,325
Contig N_{50} (Considerando todos los contigs)	980
Contig N_{50} (Solo considerando el contig de mayor longitud)	785
Contig de mayor longitud (nt)	38,039
Contig de menor longitud (nt)	224
Longitud mediana de contig	498
Longitud media de contig	775.83
Contigs mayores a 5Kb	1,941
Contigs mayores a 3Kb	6,765
Contigs mayores a 1kb	45,150
Total de bases ensambladas	189,128,039
Número de proteínas inferidas	43,252 (17.74%)
ORF de mayor longitud	12,159
Longitud media de ORF	331
Anotación de todos los transcritos (243,774)/ únicos	
SwissProt top BLASTX hit	36,103 (14.8%)
Uniref90 top BLASTX hit	55,187 (22.63%)
C. gigas top BLASTX hit	41,033 (16.8%)
Anotación de los ORFs predichos (43,252)	
Pfam	27,226 (62%)
Péptido señal	3,018 (6.9%)
Hélices transmembranales	7,165 (16.5%)
EggNOG	29,313
KEGG	30,096
Secuencias con anotaciones GO genes/transcritos	29,965/36,251

7.1.3 Anotación funcional

Un total de 36,103 transcritos presentaron al menos un alineamiento significante por BLASTx usando la base de datos SwissProt, 41,033 contra *C. gigas*, y 55,180 contra UniRef90, para los cuales fue establecido un corte de E-value de 1×10^{-5}. De los transcritos que tuvieron una similitud con la base de datos UniRef90, 22,995 (41.76%) presentaron

coincidencias con proteínas del ostión del Pacífico *C. gigas*, seguido por 6,535 (11.86%) del gasterópodo *Lottia gigantea*. El ~49% de las coincidencias contra proteínas presentaron un porcentaje de identidad de entre el 20%-40%. Cerca del 40% de los transcritos con coincidencias presentaron un rango de valores-E entre $1e^{-20}$ y $1e^{-05}$ (Fig. 8). Asimismo, fue más probable el obtener una coincidencia por BLAST para los contigs más largos (Fig. 9). De los transcritos que mostraron una identidad contra UniRef90, 18,666 no fueron inferidos por TransDecoder. Estas secuencias presentaban una región codificante corta (<100 aminoácidos) o no pasaron los criterios métricos (descritos en https://transdecoder.github.io/) de TransDecoder. La longitud del marco de lectura abierto (ORF) del total de proteínas predichas osciló de 100 a 12,159 aminoácidos (aa), con una longitud media de 331 aa (Tabla V). Alrededor del 62% del total de proteínas inferidas mostraron identidad contra dominios proteicos Pfam; asimismo 8% fueron inferidas por contener sitios de corte por un péptido señal, y 16.5% por contener hélices transmembranales. Adicionalmente, 36,251 transcritos tuvieron al menos una asignación de términos GO, 29,313 de EggNOG y 30,096 de KEGG (Tabla V).

7.1.3 Genes involucrados en procesos de determinación/diferenciación sexual

Debido a que uno de los objetivos principales de este trabajo fue identificar genes que estuvieran asociados a procesos de determinación/diferenciación sexual, se realizaron búsquedas con la palabra “sex determination/differentiation”, “development”, “germ line”, “spermatogenesis” y “oogenesis” dentro de las descripciones encontradas en el archivo de anotación generado previamente por Trinotate. Adicionalmente se hicieron búsquedas manualmente con homólogos potenciales conocidos en un rango amplio de taxa por participar en es los procesos de determinación/diferenciación sexual (*foxl2, tra2a, vir y sfrp2*). Todos los genes encontrados son mostrados en la tabla VI. A pesar que las funciones de esos genes son desconocidas en *N. subnodosus*, la mayoría de ellos ya han sido identificados en otros organismos participando en importantes aspectos durante la determinación/diferenciación sexual. Algunos de los genes encontrados fueron *doublesex and mab-3-related transcription factor A-2 (dmrta2)*, para el cual se identificaron dos potenciales Trinity isoformas presentando una longitud de 2660 *(TR47626_c2_g1_i1*) y

2037 nucleótidos (nt) (*TR47626_c2_g1_i2)* respectivamente. Ambos transcritos codifican proteínas de 369 y 156 amino ácidos. Para ambas proteínas un dominio CUE_DMA DMA fue identificado, y un dominio DM adicional solo para el primer transcrito. Después de efectuar el análisis filogenético, se encontró agrupado con otros genes *dmrta* de bivalvos (Fig. 10). Otro gen relevante encontrado fue *Transcription factor sox9 (sox9),* para el cual un transcrito (*TR35450_c0_g1_i1)* de 2,594 nt fue obtenido. La longitud del ORF es de 1,410 nt, codificando una proteína de 470 amino ácidos. Su proteína se caracterizó por la presencia de un dominio de unión al ADN HMG (high mobility group). Los análisis filogenéticos mostraron que estaba relacionada a proteínas Sox8 y Sox9 (Fig. 10). Asimismo, otro de los genes identificados fue *protein ovo (ovo)*, el cual presentó dos potenciales isoformas *(TR43276_c0_g1_i1)* y *(TR43276_c0_g1_i2)* con una longitud de 633 y 2362 nt respectivamente. La primera isoforma no codificó para ninguna proteína, mientras que la segunda mostró un ORF de 1320 nt de longitud codificando una proteína de 440 amino ácidos misma que contenía un domino del tipo *zinc-finger*. Finalmente, un gen conocido por estar involucrado en el proceso de determinación sexual en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, *sex-1* fue anotado (*TR129411_c0_g1_i1),* presentando una longitud de 906 pb con un ORF de 807 nt y codificando una proteína parcial de 269 amino ácidos. Dicha proteína contiene un dominio de unión al ADN de receptores de hormonas nucleares y otro de tipo *zinc-finger*.

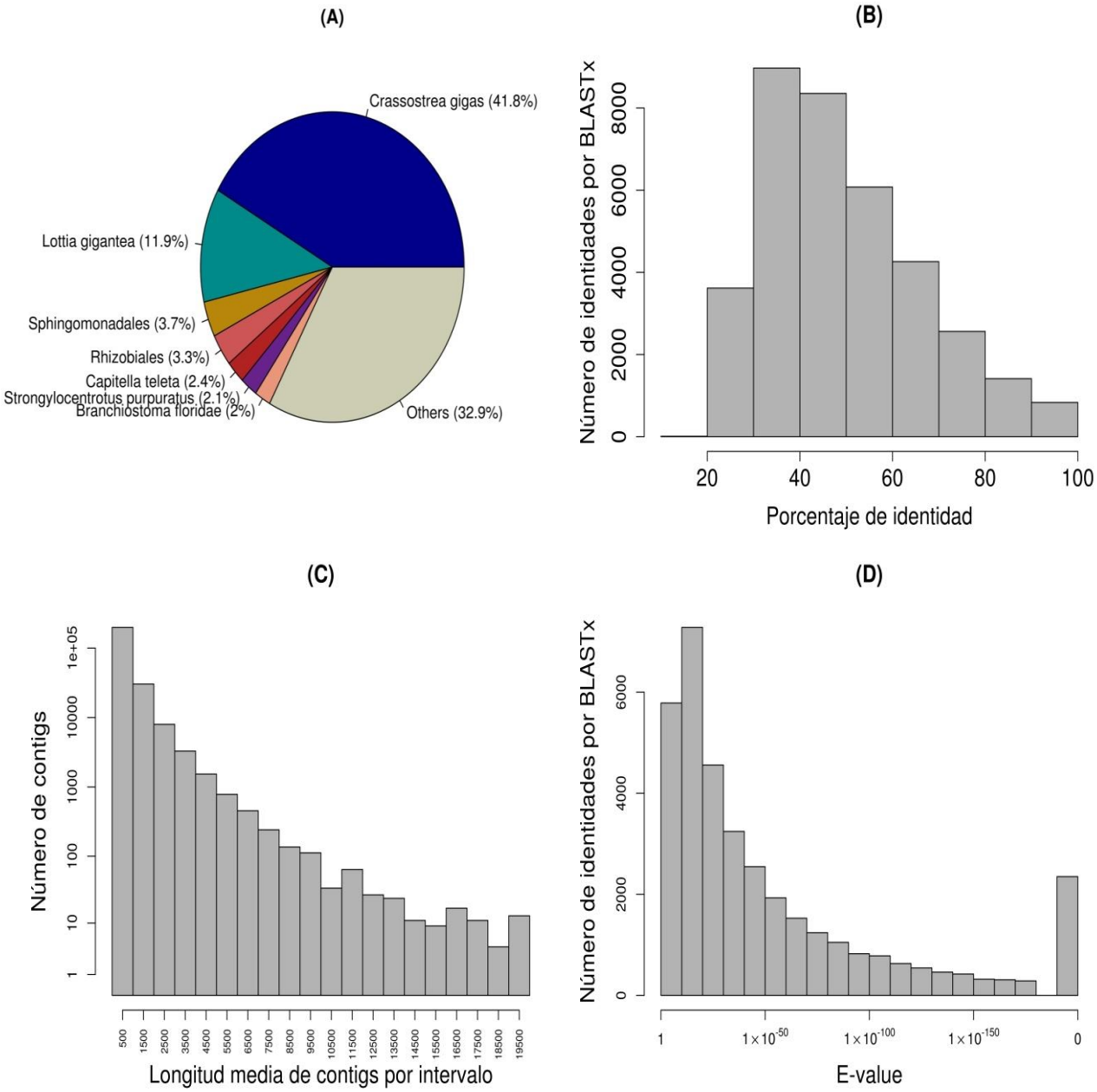


Figura 8. Resumen de anotación del transcriptoma global de *N. subnodosus*. (A) Distribución de especies top-hit contra la base de datos Uniref90, mostrado como el porcentaje del total de secuencias homólogas con corte en un valor-E de 1×10^{-5}. (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTx contra la base de datos SwissProt (C) Distribución de la longitud de contigs ensamblados. (D) Distribución del valor-E para los transcritos que tuvieron una identidad contra la base de datos SwissProt, con un valor de corte en 1×10^{-5}.

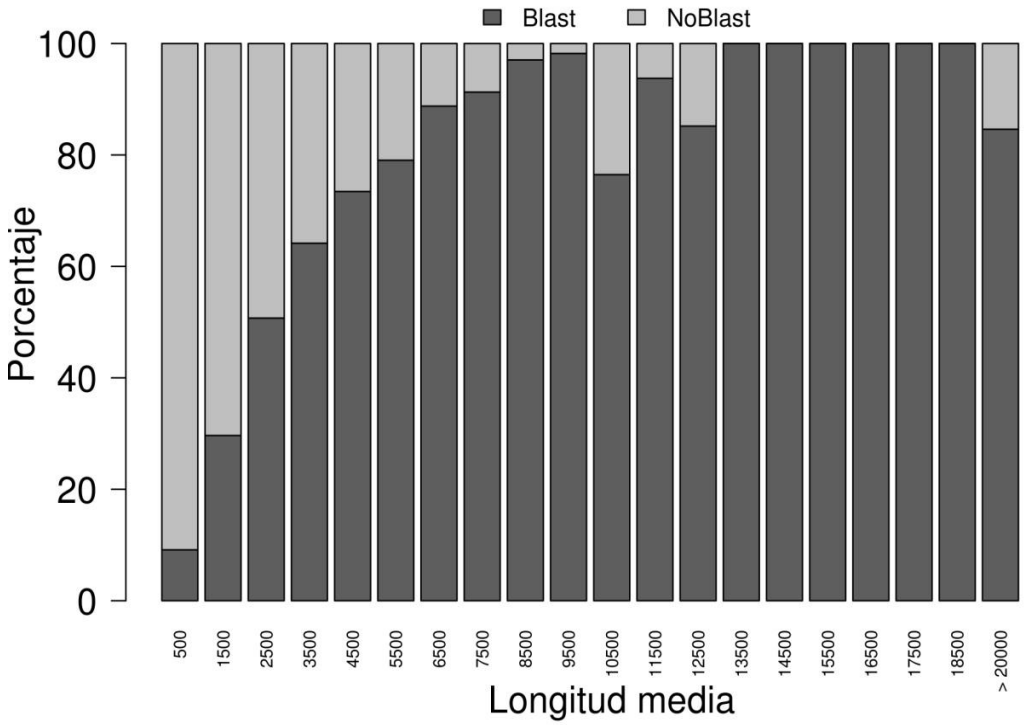


Figura 9. Relación entre la longitud de contigs y la proporción de los mismos con un BLASTx para el transcriptoma global de *N. subnodosus*. NoBlast = no Blastx hits.

Tabla VI. Genes asociados a procesos de determinación/diferenciación sexual, identificados en *N. subnodosus.*

Contigs más largos	Transcritos	Especie	Valor E	Transcrito expresado en:	Términos GO /referencia
TR43276_c0_g1_i2	*protein ovo*	*D. melanogaster*	1^{e-66}	SP, y SPZ	GO:0019099;GO:0018992
TR129273_c0_g1_i1	*forkhead box protein l2*	*M. musculus*	2^{e-10}	G,L y SP	Otolenghi *et al.*, 2007.
TR50873_c2_g2_i1	*transformer-2 protein homolog alpha*	*M. musculus*	4^{e-41}	DG,G,L y SPZ	Hoshijima *et al.*, 1991; Nagoshi *et al.*, 1988; Baker y Belote, 1983.
TR129411_c0_g1_i1	*sex-1/cnr14*	*C. elegans*	1^{e-24}	SPZ	GO:0007538
TR35450_c0_g1_i1	*transcription factor sox-9*	*M. musculus*	4^{e-70}	DG,G,L, SP y SPZ	GO:0019100
TR36602_c0_g1_i3	*protein virilizer homolog*	*M. musculus*	1^{e-92}	SPZ	Hilfiker *et al.*, 1995
TR47626_c2_g1_i1	*doublesex- and mab-3-related transcription factor a-2*	*X. tropicalis*	2^{e-41}	DG,G,L, SP y SPZ	GO:0007548
TR48371_c0_g1_i1	*protein wnt-4*	*G. gallus*	3^{e-103}	G,L y SPZ	GO:0007548;GO:2000019;GO:0008585;GO:0030237
TR137510_c0_g1_i1	*protein groucho*	*D. melanogaster*	6^{e-19}	SPZ	GO:0007541
TR50996_c1_g2_i1	*serine/threonine-protein kinase doa*	*D. melanogaster*	1^{e-10}	L,G y M	GO:0048477
TR42551_c1_g2_i8	*pre-b-cell leukemia transcription factor 1(pbx1)*	*M. musculus*	3^{e-134}	SPZ	GO:0007548
TR37355_c0_g1_i1	*mediator of rna polymerase ii transcription subunit 13*	*D. melanogaster*	1^{e-152}	SPZ	GO:0006357
TR26821_c0_g1_i1	*insulin-like growth factor 1 receptor*	*M. musculus*	1^{e-26}	G y SPZ	GO:0030238
TR26500_c0_g1_i1	*apoptosis regulator bax*	*M. musculus*	2^{e-33}	G,L y SPZ	GO:0007548
TR41435_c0_g1_i1	*homeobox protein nkx-2.1*	*H. sapiens*	2^{e-53}	DG y L	GO:0046545
TR140650_c0_g1_i1	*3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1*	*M. musculus*	5^{e-90}	G,L,SP y SPZ	GO:0007548
TR128470_c0_g1_i1	*protein kinase c-binding protein nell2*	*R. norvegicus*	5^{e-39}	G y SPZ	GO:0046543
TR47205_c0_g1_i1	*homeobox protein six4*	*H. sapiens*	1^{e-94}	DG,G,L,SP y SPZ	GO:0030238;GO:0046661
TR45081_c1_g1_i1	*pre-mrna-splicing regulator wtap*	*D. rerio*	1^{e-17}	Todos	GO:0019099;GO:0007530
TR81838_c0_g1_i1	*beta-1,4-galactosyltransferase 1*	*M. musculus*	7^{e-28}	L	GO:0045136
TR45968_c0_g1_i1	*secreted frizzled-related protein 2*	*M. musculus*	1^{e-13}	Todos	Warr *et al.*, 2009.

SP=Semilla; SPZ=Semilla ribo-depurada; G=Gónada inactiva; L=Larva con mancha; M=Músculo aductor; DG=Glándula digestiva.

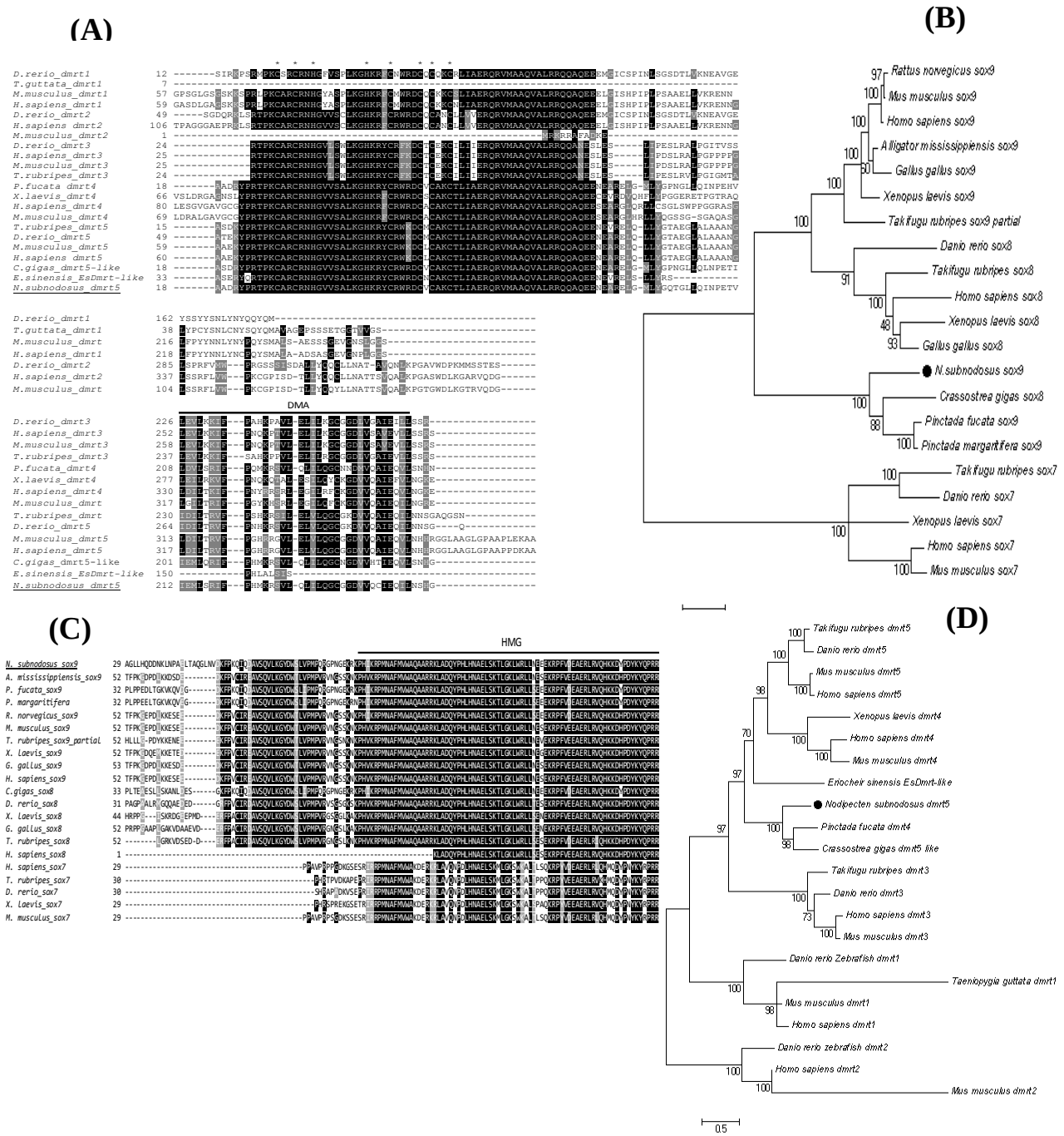


Figura 10. Análisis filogenéticos de los genes *dmrta2* y *sox9* (A). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *N. subnodosus dmrta2/dmrt5* con varias proteínas Dmrt indicando los dominios DM y DMA. Aminoácidos marcados con asterisco representan el módulo CCHC y HCCC Zn2+. (B) Árbol filogenético de secuencias proteicas de Dmrt. (C) Alineamientos de aminoácidos de *N. subnodosus* Sox9 mostrando el dominio HMG con varias proteínas Sox (D) Árbol filogenético de secuencias proteicas Sox.

7.1.4 Análisis de expresión diferencial en cada estado o tejido

Un gran número de contigs tuvo una expresión detectable en solo uno de las edades o tejidos. Un total de 12,243 contigs fueron expresados únicamente en larva con mancha ocular, 9,027 en semilla, y para las muestras de juveniles, 10,231 en glándula digestiva, 22,743 en gónada indiferenciada y finalmente 8,455 en músculo aductor (Fig. 11). Considerando todos los genes reportados como expresados diferencialmente de manera significativa por edgeR (ver métodos), hubo un total de 16,765 genes sobre-regulados y 2,342 sub-regulados entre los estadios y tejidos evaluados (larva con mancha ocular, semilla de 3mm, y gónada indiferenciada, Fig. 12). Muchos de los contigs sobre-regulados son aquellos detectados exclusivamente en una muestra, por lo tanto, una secuenciación de mayor profundidad, así como el muestreo de otros tejidos o estadios sería requerido para establecer si verdaderamente estos genes son estadio-tejido-específico.

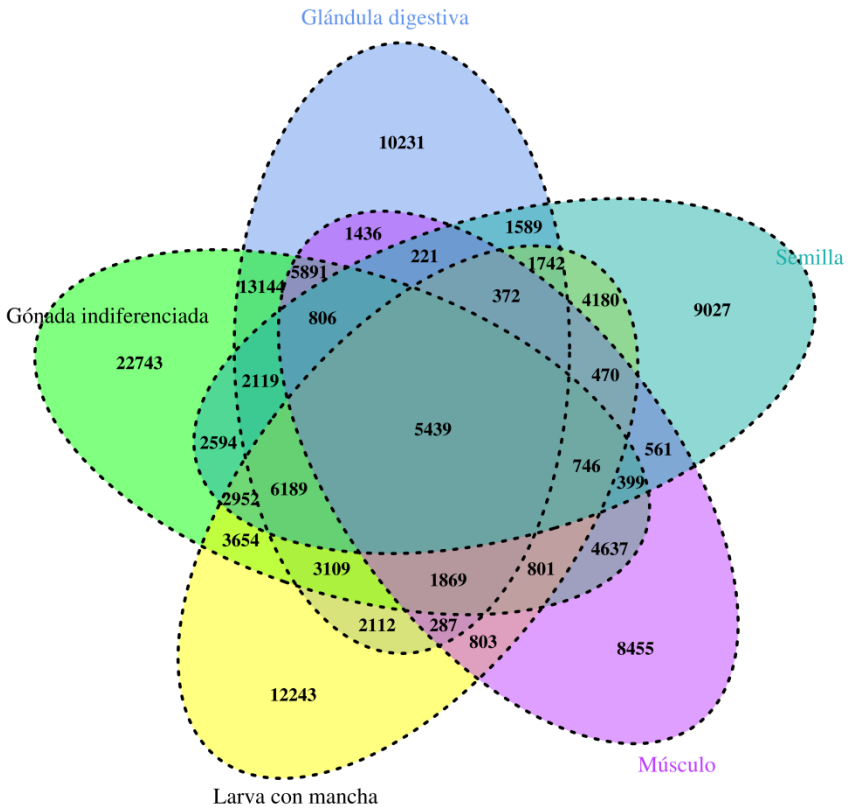


Figura 11. Número de transcritos encontrados expresados en cada edad o tejido, y el número de transcritos compartidos entre ellos.

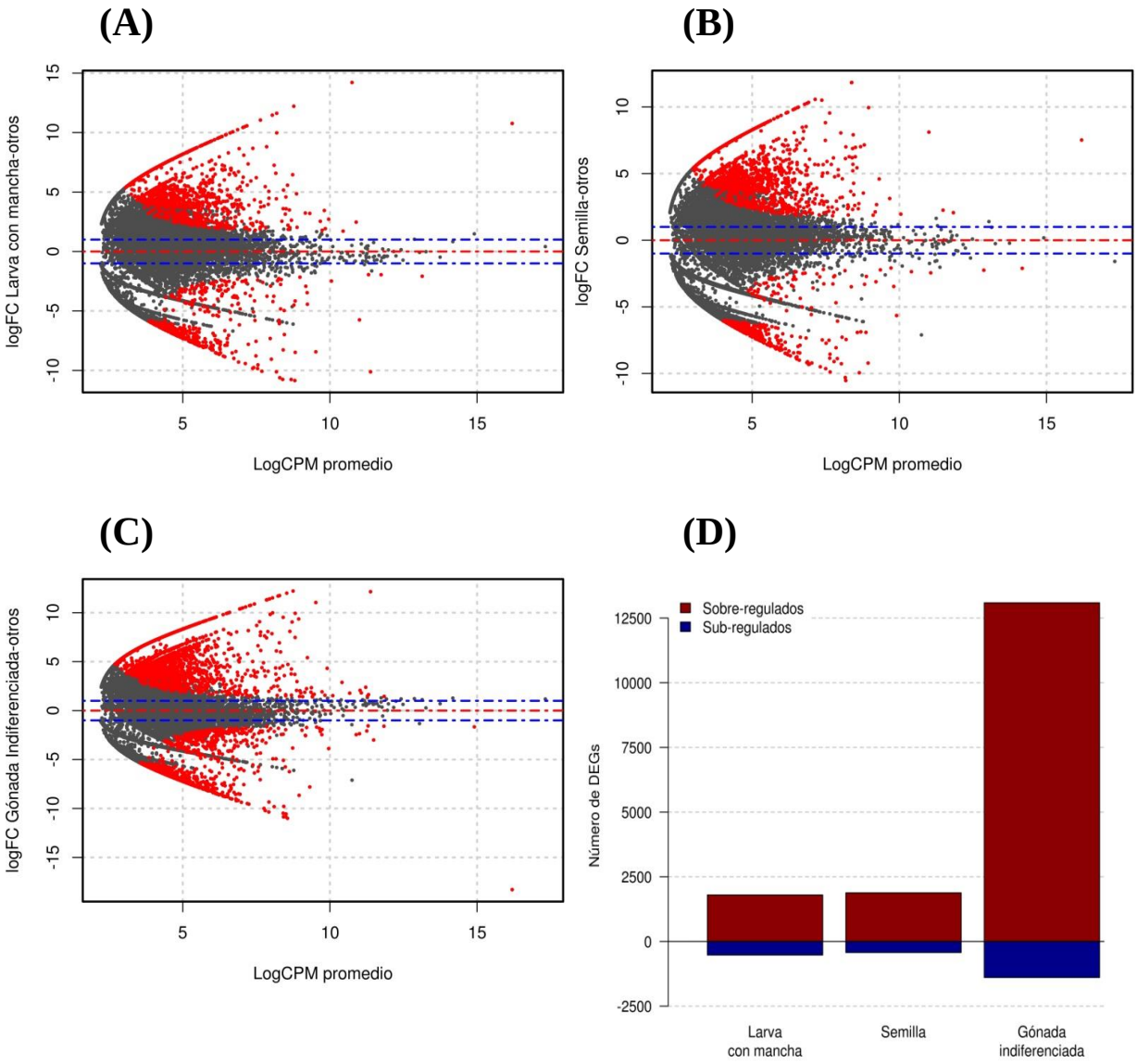
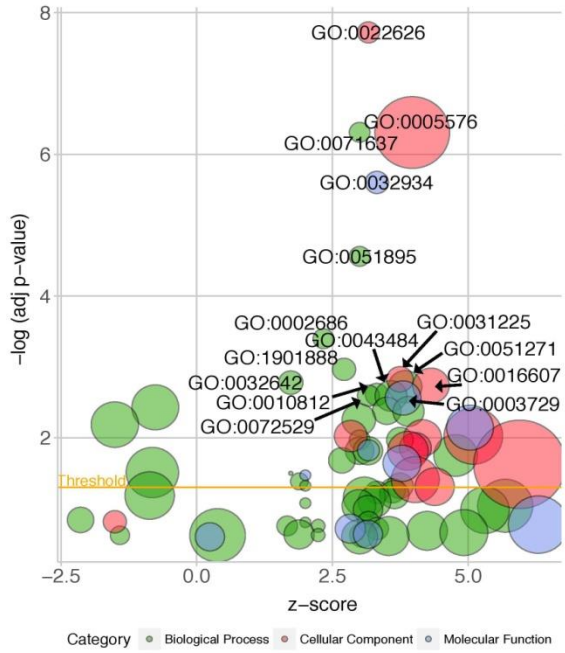


Figura 12. Visualización de genes expresados diferencialmente (en rojo) para cada edad-tejido contrastados con el resto. (A) Larva con mancha ocular; (B) Semilla; (C) Gónada indiferenciada; (D) Número de genes sobre-regulados y sub-regulados.

7.1.5 Análisis de enriquecimiento de términos GO para los genes expresados diferencialmente en cada edad-tejido

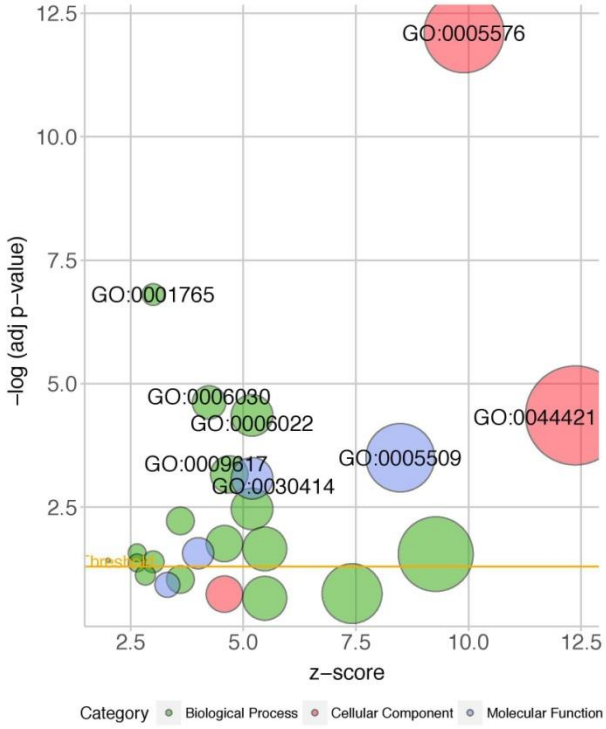
Para cada grupo de genes significativamente sobre-regulados y sub-regulados se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO. En todos los contrastes a excepción de la gónada indiferenciada, se encontraron términos enriquecidos pero para efectos de genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual, únicamente se muestran aquellos encontrados en larva con mancha ocular (larva fijadora) y en semilla (Fig. 13).

(A)



ID	Description
GO:0071637	regulation of monocyte chemotactic protein−1 production
GO:0051895	negative regulation of focal adhesion assembly
GO:0002686	negative regulation of leukocyte migration
GO:1901888	regulation of cell junction assembly
GO:0032642	regulation of chemokine production
GO:0051271	negative regulation of cellular component movement
GO:0010812	negative regulation of cell−substrate adhesion
GO:0072529	pyrimidine−containing compound catabolic process
GO:0043484	regulation of RNA splicing
GO:0022626	cytosolic ribosome
GO:0005576	extracellular region
GO:0031225	anchored component of membrane
GO:0016607	nuclear speck
GO:0032934	sterol binding
GO:0003729	mRNA binding

(B)



ID	Description
GO:0001765	membrane raft assembly
GO:0006030	chitin metabolic process
GO:0006022	aminoglycan metabolic process
GO:0009617	response to bacterium
GO:0005576	extracellular region
GO:0044421	extracellular region part
GO:0005509	calcium ion binding
GO:0030414	peptidase inhibitor activity

Figura 13. Análisis de enriquecimiento de términos GO para genes Sobre-regulados en cada edad y tejido comparado con el resto (A) = Larva fijadora *vs*. Resto, (B) = semilla *vs*. Resto. BP = Proceso Biológico, CC = Componente Celular, MF = Función Molecular.

7.2. Análisis de expresión para transcritos presuntamente asociados a la determinación / diferenciación sexual

A diferencia del resto de los genes analizados por PCR punto final, los cuales fueron expresados en todos los tejidos de la almeja con una gónada indiferenciada, la expresión de los genes *Ns-wnt4* y *Ns-doa* estuvo limitada a la branquia. En almejas con gónada diferenciada, la expresión de *Ns-wnt4*, *Ns-dmrta2* y *Ns- sex-1* fue exclusiva para la región testicular (solamente comparando la gónada hermafrodita). De forma similar, *Ns-sox9* y *Ns-sfrp2* mostraron una expresión dominante en la región testicular de la gónada hermafrodita. Sin embargo, estos genes también fueron encontrados expresados en algunos tejidos somáticos; la mayoría tuvo nula o muy baja expresión en el pie, pero todos estuvieron en branquia (Fig. 14). Además, algunos genes como *Ns-vir*, *Ns-tra2a*, *Ns-pbx1*, *Ns-ovo* y *Ns-doa* fueron expresados en ambas regiones de la gónada. Asimismo, estos últimos genes también mostraron una expresión en tejidos somáticos. *Ns-vir*, *Ns-tra2a* y *Ns-pbx1* se expresaron en todos los tejidos, mientras que la expresión de *Ns-ovo* no fue detectada en pie o músculo, y *Ns-doa* fue ligeramente expresado en todos los tejidos de organismos inmaduros con una gónada indiferenciada, aunque, a excepción del pie, este gen fue altamente expresado en todos los otros tejidos de organismos maduros con una gónada diferenciada.

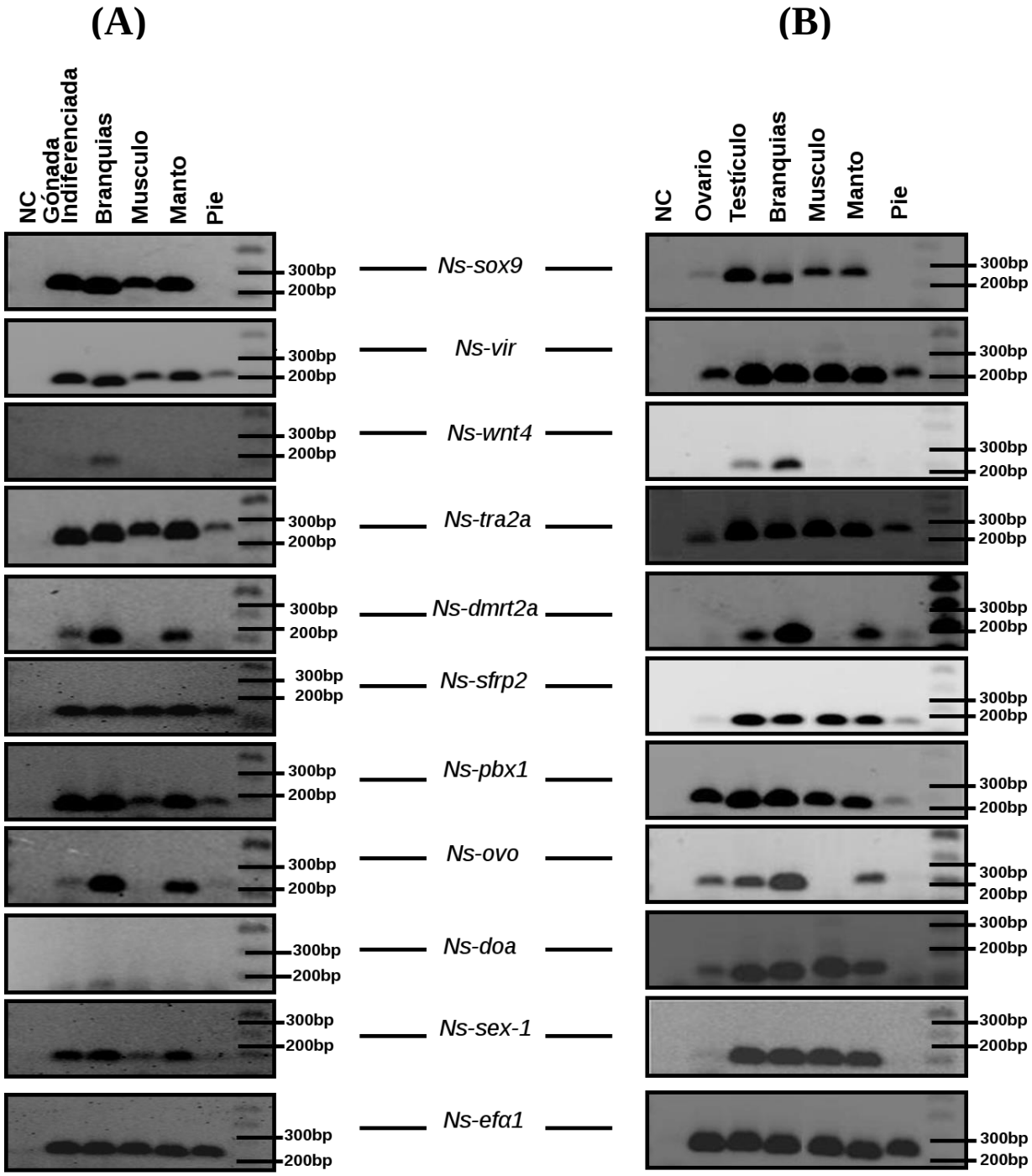


Figura 14. Expresión tisular por PCR punto final para diversos genes de determinación/diferenciación sexual en *N. subnodosus*. El gen e*f-α1* fue utilizado como control de referencia. (A) Tejidos de almejas con una gónada inactiva. (B) Tejidos de almejas con una gónada madura. NC = Control negativo.

7.3 Identificación de genes potencialmente asociados al arresto meiótico a través del análisis transcriptómico durante la gametogénesis temprana en diploides y triploides

7.3.1 Secuenciación del transcriptoma, ensamblado y anotación funcional

Se obtuvieron un total de 251’287,250 lecturas pareadas y se ensamblaron un total de 214’097,712 (85%) lecturas de al menos 50 nucleótidos (nt) y con una calidad mínima (Phred Score) de 25 después de descartar secuencias adaptadoras de Illumina y lecturas de baja calidad (Tabla VII). En total, 118,337 contigs con una longitud promedio de 981 nt y un N50 = 1,573 fueron ensamblados. Cuando los datos de expresión fueron considerados, el valor Ex90N50 fue de 2,017 nt. La longitud de los contigs osciló entre 201 nt a 40, 485 nt (Tabla VII). Un total de 866 genes completos BUSCO (único = 60.7%; duplicados = 27.8%; de un total de 978 BUSCO genes) fueron encontrados en el transcriptoma, 8.4% fueron coincidencias con algún grado de fragmentación y solo el 3.1% fueron genes BUSCO sin identificar. Un gran número de contigs (103,510) fueron expresados en al menos 1 transcrito por millón (TPM) en una de las muestras (https://drive.google.com/drive/folders/1Ej5rouoHp45yMWo6vmN_NGX-tNDhW4nw?usp=sharing). A un total de 41,138 transcritos se les fue inferida al menos una región candidata codificante, representando el 34% del total de los transcritos ensamblados. De estos transcritos con una región codificante potencial, 31,585 (76%) también mostraron una identidad cuando se empleó BLASTX contra la base de datos de UniRef90 (Tabla VII). Para aquellos transcritos que resultaron anotados, un total de 2,531 mostraron la mayor anotación asignada. Por último, un total de 310 vías KEGG fueron encontradas en *N. subnodosus*. Transcritos involucrados en la recombinación homóloga y en la replicación del ADN son mostrados en el anexo II, y las vías completas pueden ser encontradas en (https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1b8XJ8B_UW3D7r7fcJVCR_pdDaYYudQfy) (Figs. 15 y 17 para resumen de anotación del transcriptoma).

Tabla VII. Estadísticas del proceso de ensamblado y anotación del transcriptoma de *N. subnodosus* obtenido con lecturas de gónadas de ambas ploidías en estadios gametogénicos tempranos y de organismos maduros diploides.

Métricas	**Número**
Lecturas crudas	251’287,250
Lecturas depuradas	214’097,712 (85%)
Ensamble	
Total de genes	68,243
Total de transcritos	118,337
Contenido de GC (%)	38.61
Contig N_{10}	4,477
Contig N_{20}	3,382
Contig N_{30}	2,683
Contig N_{40}	2,172
Contig N_{50} (Basado en todos los transcritos)	1755
Contig N_{50} (Basado en la isofroma de mayor longitud)	1573
Contig de mayor longitud (nt)	40,085
Contig de menor longitud (nt)	201
Longitud mediana de contig	526
Longitud media de contig	981.38
Contigs mayores a 10 Kb	54
Contigs mayores a 5 Kb	1,339
Contigs mayores a 3 Kb	6,867
Contigs mayores a 1 Kb	37,238
Total de bases ensambladas	116,134,136
Número de proteínas inferidas	41,138 (34.76%)
ORF de mayor longitud	11,577
Contig de menor longitud (b)	100
Longitud media de ORF	344.79
Anotación de todos los transcritos (118,337)/ únicos	
SwissProt BLASTx hit	29,616 (25%)
UniRef90 BLASTx hit	40,355 (34.10%)
Anotación de ORFs predichos (41,138)	
Pfam	24,235 (59%)
Péptido señal	2,653 (6.4%)
Hélices transmembranales	7,332 (18.8%)
EggNOG	25,060
KEGG	26,401
Secuencias con anotaciones GO genes/transcritos	29,242

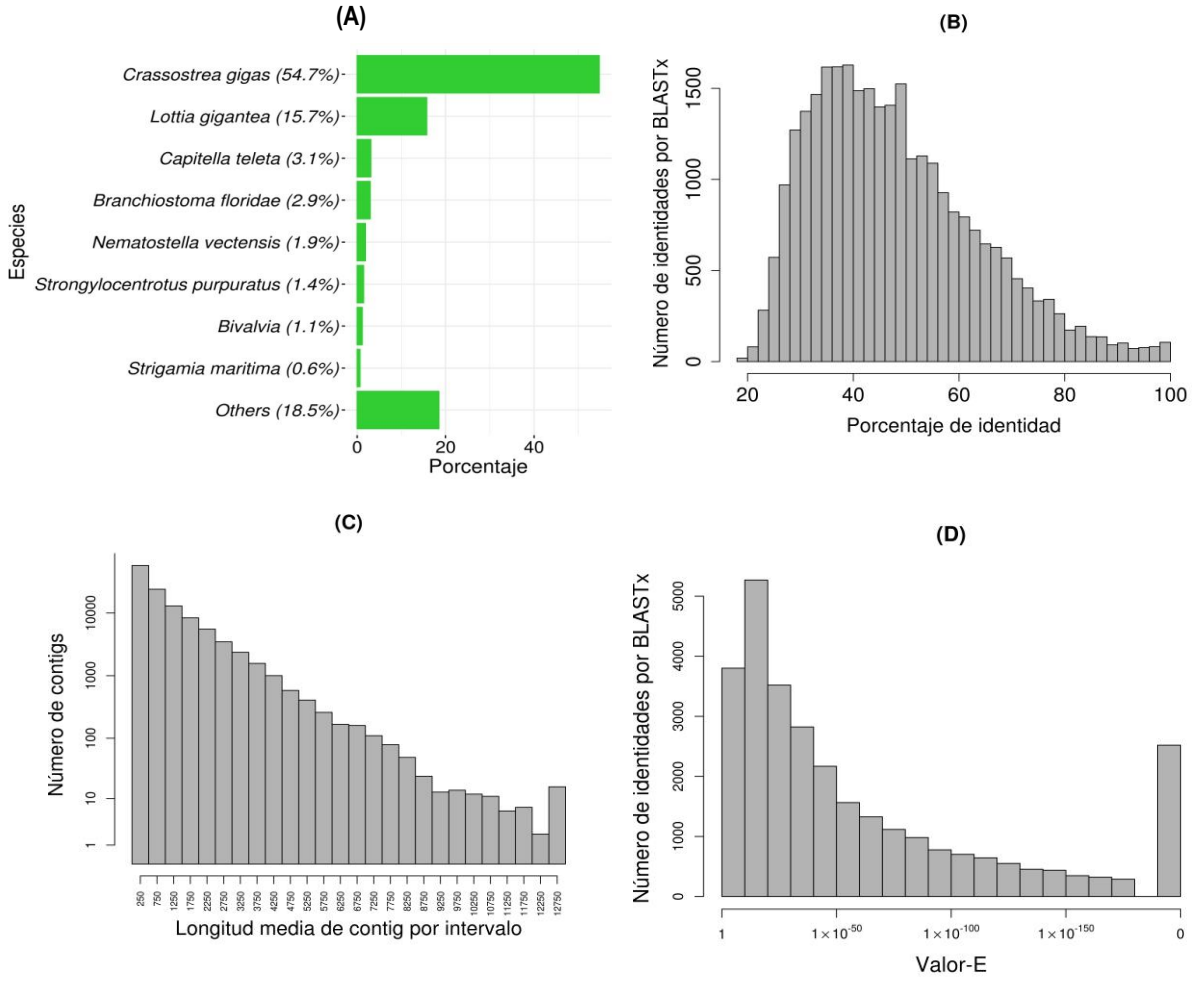


Figura 15. Resumen de anotación del transcriptoma en gónadas de diploides y triploides. (A) Distribución de especies top-hit contra la base de datos Uniref90, mostrando el porcentaje del total de secuencias homólogas con corte en un valor-E de 1×10^{-5}. (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTx contra la base de datos SwissProt. (C) Distribución de la longitud de contigs ensamblados. (D) Distribución del valor-E para los transcritos que tuvieron una identidad contra la base de datos SwissProt, con un valor de corte en 1×10^{-5}.

7.3.2 Genes de meiosis en el transcriptoma de *Nodipecten subnodosus* y sus abundancias en condición diploide y triploide

Con el objetivo de identificar los posibles genes conocidos que participan en procesos de meiosis, se realizaron búsquedas en el reporte de anotación empleando palabras como: “meiosis/meiotic”, “recombination”, “meiosis checkpoint”, “DNA damage response”, y “meiotic arrest”. Las abundancias comparativas de algunos de los transcritos asociados con recombinación meiótica tanto para diploides como triploides en un estadio inactivo e inicial de la gametogénesis son mostradas en la figura 16 y 18.

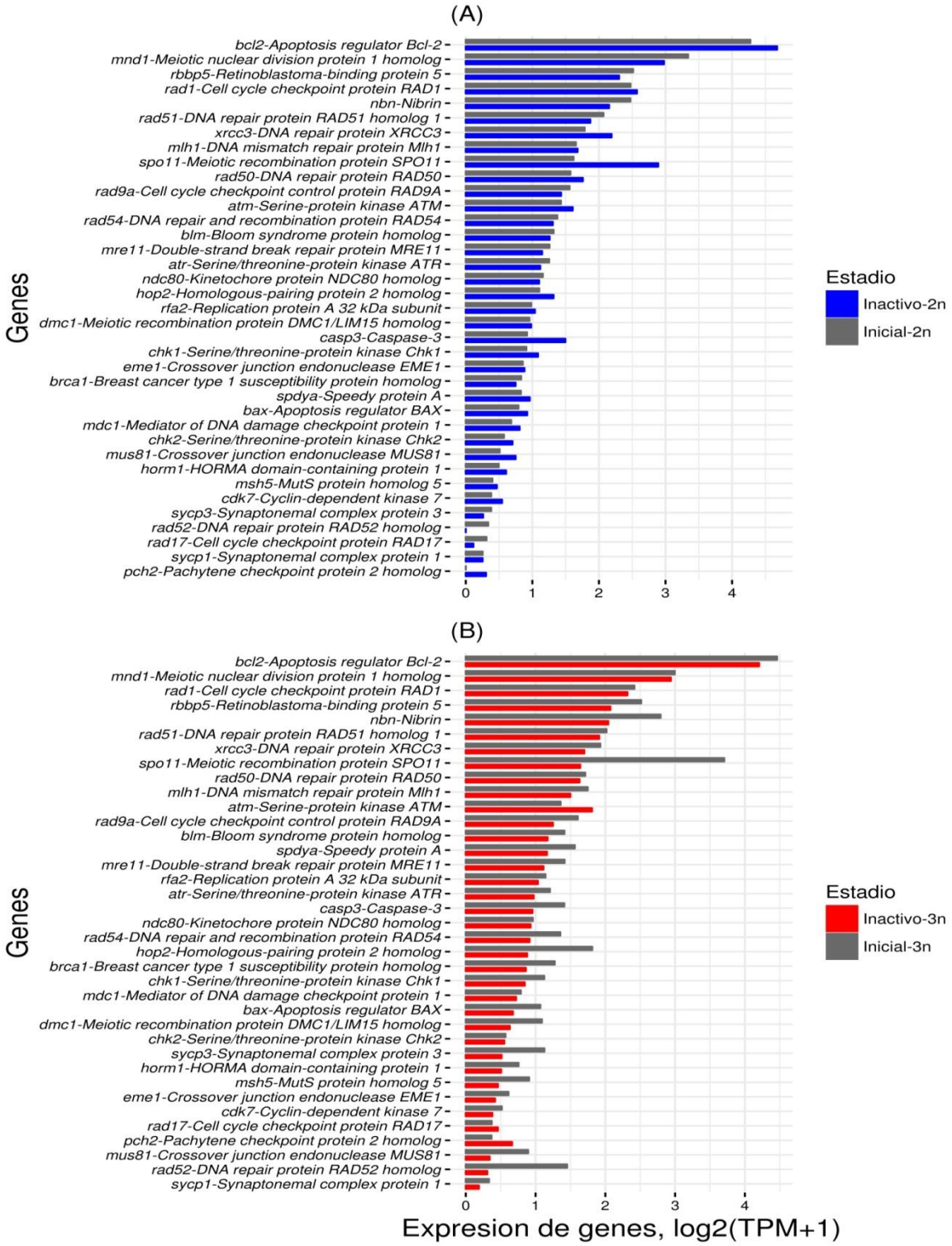


Figura 16. Abundancias de genes de meiosis. Genes seleccionados a partir del transcriptoma con términos GO relacionados a "meiosis/meiotic", "recombination", meiosis checkpoint", "DNA damage response", y "meiotic arrest". (A) Diploides (B) Triploides. TPM = Transcritos por millón. La abundancia es estimada a nivel de gen.

7.3.3 Análisis de expresión diferencial

7.3.3.1 Contrastes inicial *vs*. inactiva en diploides y triploides

Genes que participan en la recombinación homóloga (*msh5* y *kdm8),* en la organización del huso (*nup62),* en la formación del centrosoma (*cenp-T),* en la diferenciación sexual (*Ns-dmta2* y *pum3),* entre otros fueron algunos de los genes sobre-expresados en una gónada inicial en organismos diploides (Tabla VIIIa). Por otro lado, en organismos triploides, se encontraron genes sobre-regulados involucrados en la respuesta al daño del ADN y reparación de las dobles cadenas (*rad51-C*, *xpc*, *myoVI),* genes involucrados en la transición de metafase/anafase de la meiosis (*slp1* y *nuf2),* así como genes que desencadenan la apoptosis (*caspase-3, icad/dffa, bmcc1/prun2)* (Tabla VIIIb) (Fig. 19). La lista completa de genes sobre-regulados y sub-regulados puede ser encontrada en https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1ddE43LB-AXwWEfOQD8glqnFGjx1n3-AI

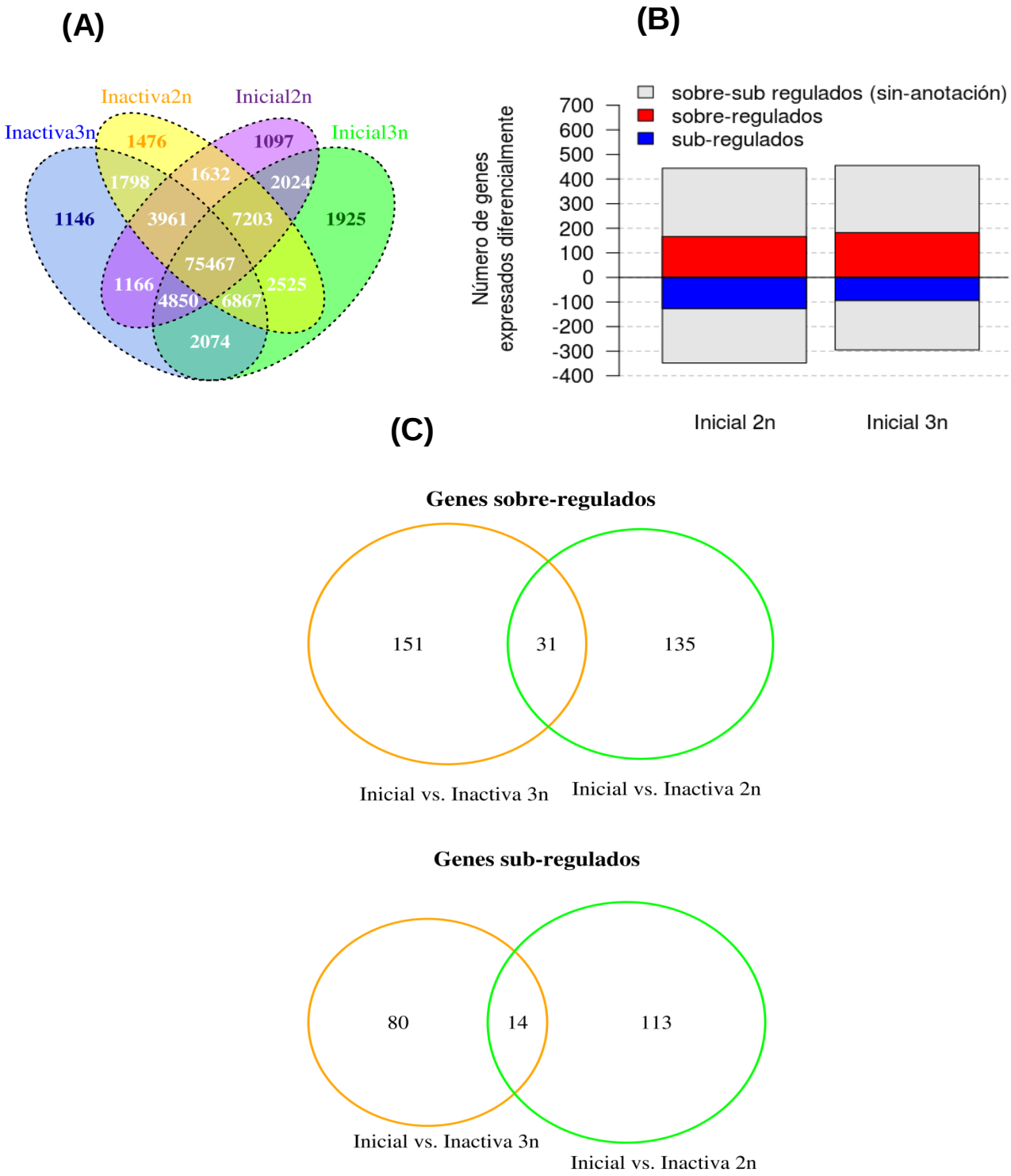


Figura 17. Resumen de la anotación del transcriptoma. (A) Diagrama de Venn mostrando el número de transcritos expresados en cada estadio gametogénico por ploidías. (B) Número de genes sobre- y sub regulados en cada contraste. (C) Genes expresados diferencialmente para cada ploidía mostrando transcritos únicos y compartidos (solo se consideraron transcritos anotados).

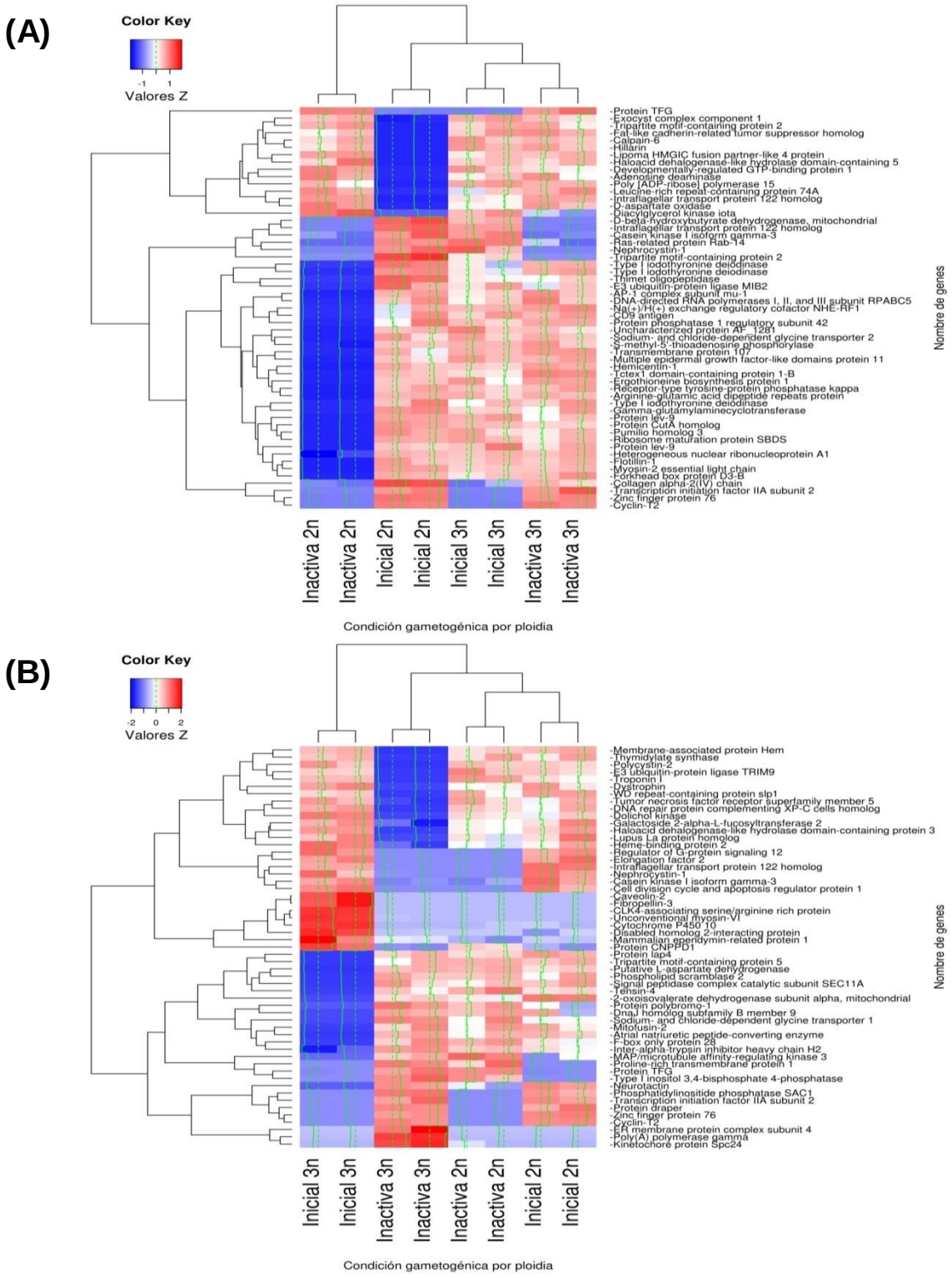


Figura 18. Mapa de calor a través de todas las muestras usando los primeros 55 transcritos que fueron expresados diferencialmente y que además presentaban anotación. (A) Contraste Inicial *vs*. Inactiva en diploides; (B) Contraste Inicial *vs*. Inactiva en triploides.

Tabla VIII. Algunos de los genes que fueron encontrados significativamente sobre-regulados en diploides y triploides.

(a) Contraste de expresión diferencial Inicial vs. Inactiva en 2n			
Contig	**Uniprot ID**	**Proteína**	**FDR**
TRINITY_DN30145_c0_g1_i3	BAG1_MOUSE	AG family molecular chaperone regulator 1	8.57^{e-18}
TRINITY_DN36417_c1_g1_i7	CP17A_SQUAC	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	2.15^{e-04}
TRINITY_DN30336_c0_g1_i3	CENPT_CHICK	Centromere protein T	2.43^{e-03}
TRINITY_DN35559_c0_g3_i1	KDM8_HUMAN	Lysine-specific demethylase 8	4.58^{e-03}
TRINITY_DN32354_c0_g1_i2	MSH5_MOUSE	MutS protein homolog 5	5.66^{e-03}
TRINITY_DN37384_c0_g1_i2	MLC2_DROME	Myosin-2 essential light chain	5.66^{e-03}
TRINITY_DN28889_c0_g1_i2	DMTA2_XENTR	Doublesex- and mab-3-related transcription factor A2	5.97^{e-03}
TRINITY_DN31108_c0_g1_i3	PATS1_DICDI	Probable serine/threonine-protein kinase pats1	6.05^{e-03}
TRINITY_DN31394_c0_g1_i1	SPAT6_MOUSE	Spermatogenesis-associated protein 6	1.04^{e-02}
TRINITY_DN36174_c0_g1_i1	PUM3_RAT	Pumilio homolog 3	3.19^{e-02}
TRINITY_DN34797_c0_g1_i9	NUP62_HUMAN	Nuclear pore glycoprotein p62	3.90^{e-02}
TRINITY_DN37683_c1_g1_i2	TCB2_CAEBR	Transposable element Tcb2 transposase	9.84^{e-02}
TRINITY_DN23596_c0_g1_i1	YTX2_XENLA	Transposon TX1	9.97^{e-02}
(b) Contraste de expresión diferencial Inicial vs. Inactiva en 3n			
TRINITY_DN34548_c0_g1_i1	SLP1_SCHPO	WD repeat-containing protein slp1	1.07^{e-04}
TRINITY_DN32683_c0_g1_i5	DAB2P_MOUSE	Disabled homolog 2-interacting protein	1.95^{e-04}
TRINITY_DN37482_c0_g1_i2	XPC_MOUSE	DNA repair protein complementing XP-C cells homolog	1.95^{e-04}
TRINITY_DN36539_c0_g1_i1	MYO6_CHICK	Unconventional myosin-VI	6.01^{e-04}
TRINITY_DN33077_c0_g2_i3	TNR5_PIG	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	1.42^{e-03}
TRINITY_DN35845_c0_g1_i9	ZBT17_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 17	2.07^{e-02}
TRINITY_DN35761_c0_g1_i7	RA51C_CRIGR	DNA repair protein RAD51 homolog 3	2.19^{e-02}
TRINITY_DN33093_c0_g1_i5	MCAF1_CHICK	Activating transcription factor 7-interacting protein 1	3.32^{e-02}
TRINITY_DN37053_c0_g1_i3	NUF2B_XENLA	Kinetochore protein Nuf2-B	3.89^{e-02}
TRINITY_DN31588_c0_g1_i5	DFFA_MOUSE	DNA fragmentation factor subunit alpha	4.70^{e-02}
TRINITY_DN35168_c6_g1_i1	PRUN2_PONAB	Protein prune homolog 2	5.20^{e-02}
TRINITY_DN25833_c0_g1_i3	CASP3_PANTR	Caspase-3	5.95^{e-02}

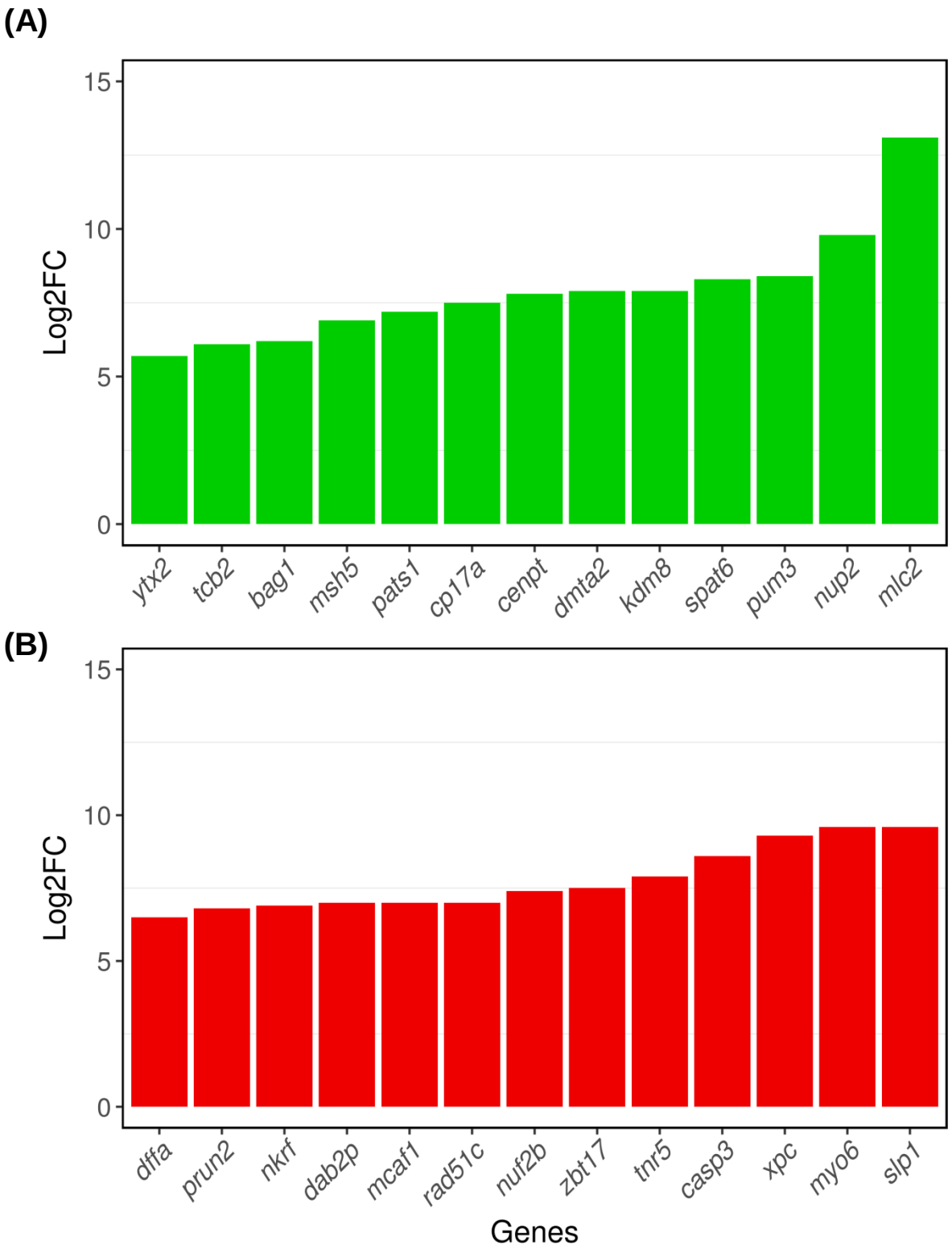


Figura 19. Nivel de expresión de algunos genes sobre-regulados en estapa inicial de la gametogeneisis para cada ploidía cuando se compararon las etapas de gónada Inicial vs. Inactiva. (A) Diploides. (B) Triploides. $Log_2FC = Log_2$ de fold-change. Ver tabla VIII para los nombres completos de proteínas.

7.4 Evaluación del efecto de la interferencia por ARN de doble cadena de los genes *dmrt1* y *p33 ringo* en organismos diploides

7.4.1 Estandarización del uso de $MgCl_2$ como anestésico en *N. subnodosus*

Se evaluó con cloruro de magnesio ($MgCl_2$) a 50 g/L siguiendo el protocolo en Fabioux *et al.* (2009) para determinar si este funcionaba como anestésico en la almeja mano león. Se realizaron tres pruebas por separado en donde se evaluaron las variables anestesia, electroporación e inyección. La administración de $MgCl_2$ permitió la relajación del músculo aductor aproximadamente a los 5-10 min después de que la almeja fue sumergida en la solución, y posteriormente su recuperación (evaluada por el cierre de las valvas) se alcanzó aproximadamente a los 20 min de haber estado en agua marina sin cloruro de magnesio. Una vez establecido el funcionamiento del anestésico, se realizaron tratamientos combinando anestesia, inyección y electroporación (Fig. 20) con el propósito de evaluar si la adición consecutiva de las variables repercutía en la mortandad del organismo. Se encontró después de 30 días de haber sido tratados que ninguna condición presentó mortalidades.

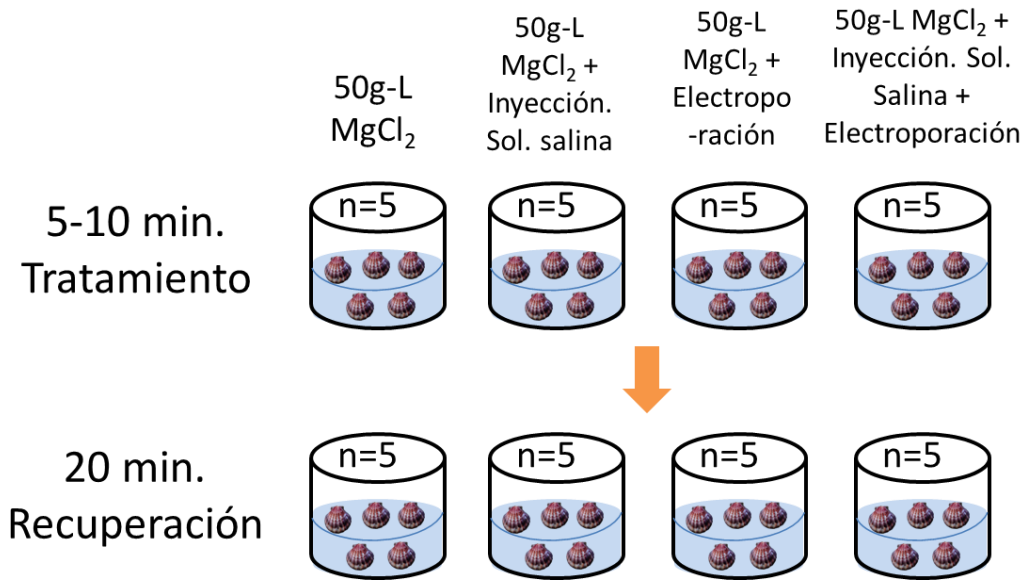


Figura 20. Diseño experimental para evaluación de $MgCl_2$, inyección y electroporación en *N. subnodosus.*

7.4.2 Mortalidad y análisis biométricos desarrollados durante cada muestreo

Se presentaron mortalidades en todos los organismos inyectados con material de dsRNA, pero fue en los tratamientos con 20 µg de dsRNA-*dmrt1*, 20 µg de dsRNA-*gapdh* y 60 µg de dsRNA-*egfp* los que mayor número de organismos (n=6) muertos presentaron. Para el gen *p33 ringo*, la dosis de 20 µg presentó dos organismos muertos, y en la dosis de 5 µg solo un organismo. Los controles con solución salina fueron los únicos que no presentaron mortalidad (Tabla IX y Fig. 21).

Tabla IX. Mortalidades observadas en los diferentes tratamientos evaluados.

Concentración	**RNAi-*dmrt1***	**RNAi-*p33***	**RNAi-*gapdh***	**RNAi-*egfp***	**Solución Salina**
0 µg					
5 µg ***p33***		3%			
20 µg ***p33, dmrt1, gapdh & egfp***	18%	6%	18%	3%	
60 µg ***dmrt1, gapdh & egfp***	6%		3%	18%	
Medias	**21%**	**4.5%**	**10.5%**	**10.5%**	**0%**

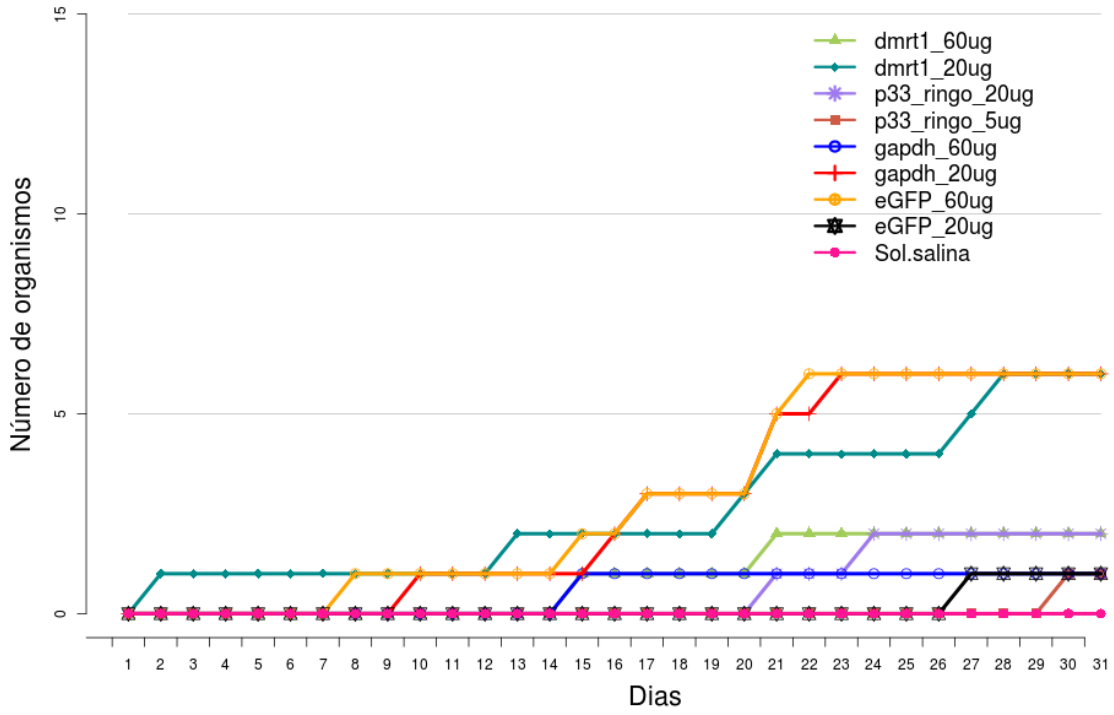


Figura 21. Mortalidad acumulada por tratamiento.

7.4.2 Efecto de la interferencia sobre el peso de la gónada

El peso de la gónada para los organismos inyectados con *dmrt1* permaneció sin aumento de masa durante el transcurso del experimento de 30 días, mientras que los controles salinos y *egfp* muestran una tendencia normal de aumento de peso con diferencias significativas entre estos contra ambas concentraciones de dsRNA-*dmrt1* (Fig. 22A) (Tabla X). Por otra parte, las dosis evaluadas para el gen *p33-ringo* se comportaron de manera irregular pero con tendencia de aumento como en los controles, lo que resultó en observar diferencias significativas ($P<0.05$) únicamente en peso de la gónada a lo largo de las etapas temporales de muestreos, pero no entre los diferentes tratamientos de dsRNA ($P>0.05$) (Fig. 22B).

Tabla X. Resultado del ANOVA en el que se evaluó el efecto de interferir organismos con dsRNA de *dmrt1*, usando como controles inyecciones con dsRNA del gen exógeno *egfp* y solución salina.

Efectos	**Valor de *P***
Tratamiento	0.000
Muestreo	0.092
Tratamiento - Muestreo	0.489

Cuando se evaluó el efecto de interferir el gen endógeno *gapdh* en ambas dosis con el resto de los controles (Fig. 23) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (*P* >0.05), aunque se puede apreciar una tendencia para el tratamiento dsRNA-*gapdh* a mantener el mismo peso de gónada durante el tiempo para ambas dosis mientras que los controles incrementan ligeramente. El incremento observado al final para la dosis de *gapdh* de 20μg pudiera estar relacionado con el alto error en esta media debido a que en esta dosis se presentó una mortalidad del ~18% durante el experimento. Por otro lado podría ser un efecto natural dado que en los últimos muestreos (que coincide con el aumento de peso) no se aplicaron reinyecciones, por lo que el efecto de inyectar dsRNA pudo haberse perdido. Finalmente, el comportamiento de los pesos del control *egfp* mostró tendencias al aumento de peso, sin embargo este no fue consistente (Fig. 23).

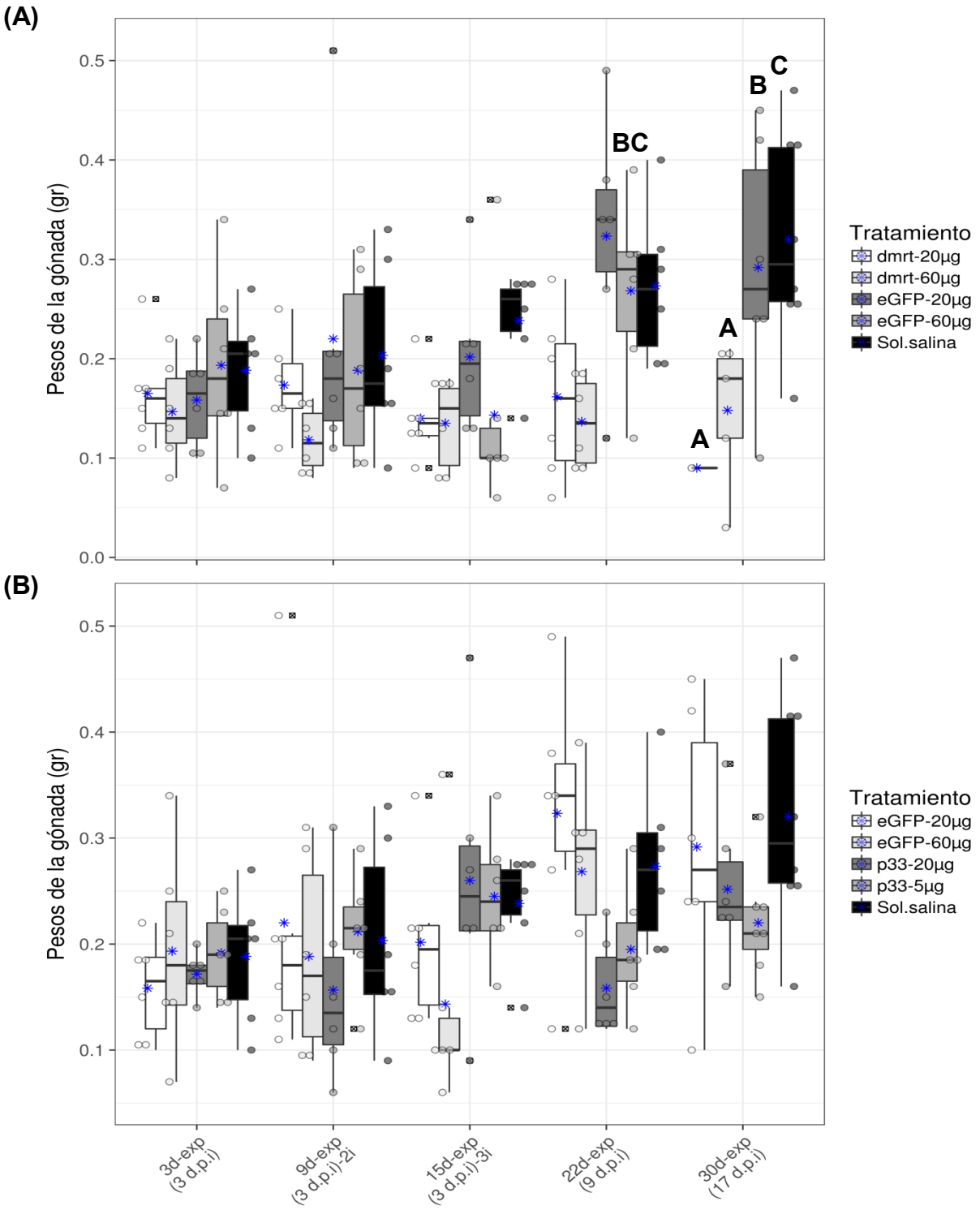


Figura 22. Variación de pesos en gónadas a lo largo de las cinco etapas temporales durante 30d. (A) Organismos inyectados con dsRNA*dmrt1* (B) Organismos inyectados con dsRNA*p33*. Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05; prueba post-hoc Fisher LSD para diferencias entre tratamientos). d.p.i = días post inyección. Línea horizontal representa la mediana. Asterico indica la media.

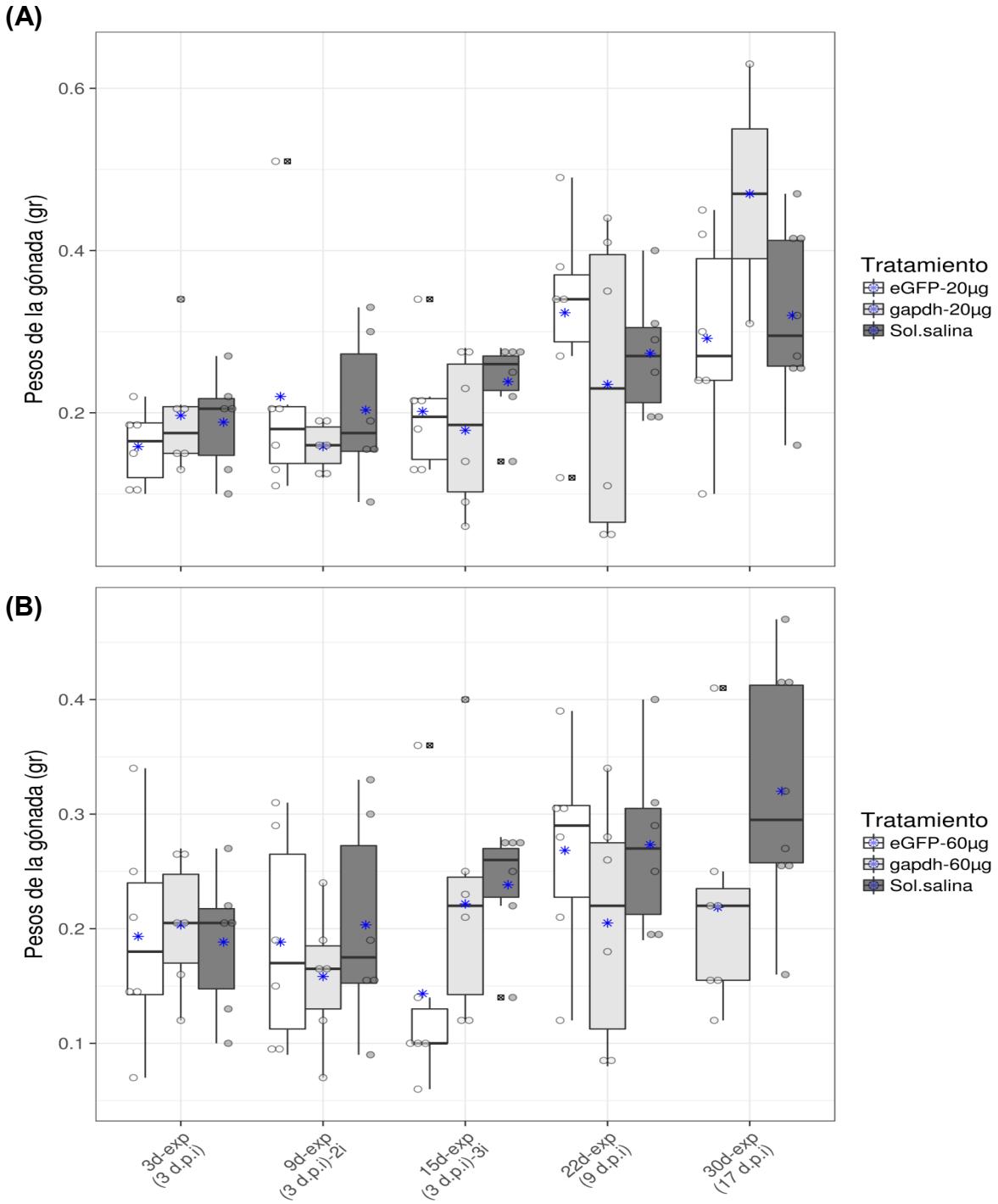


Figura 23. Variación de pesos en gónadas a lo largo de las cinco etapas temporales durante 30d. (A) organismos inyectados con 20µg dsRNA*gapdh*, (B) Organismos inyectados con 60µg dsRNA*gapdh*. d.p.i = días post inyección. Línea horizontal representa la mediana. Asterisco indica la media.

7.4.3 Validación del silenciamiento por PCR en tiempo real

7.4.3.1 Análisis de estabilidad para la selección de genes de referencia

Los genes más estables a lo largo del diseño experimental fueron *18s* y *efα1* y, por lo tanto su media geométrica fue empleada para estimar la expresión relativa de los genes *dmrt1* y *gapdh* (Fig. 24).

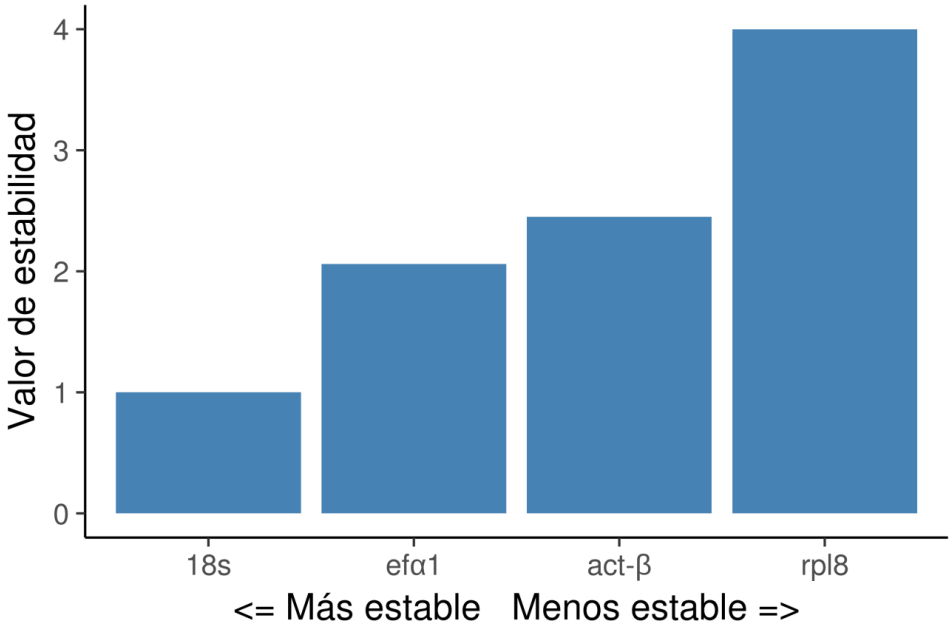
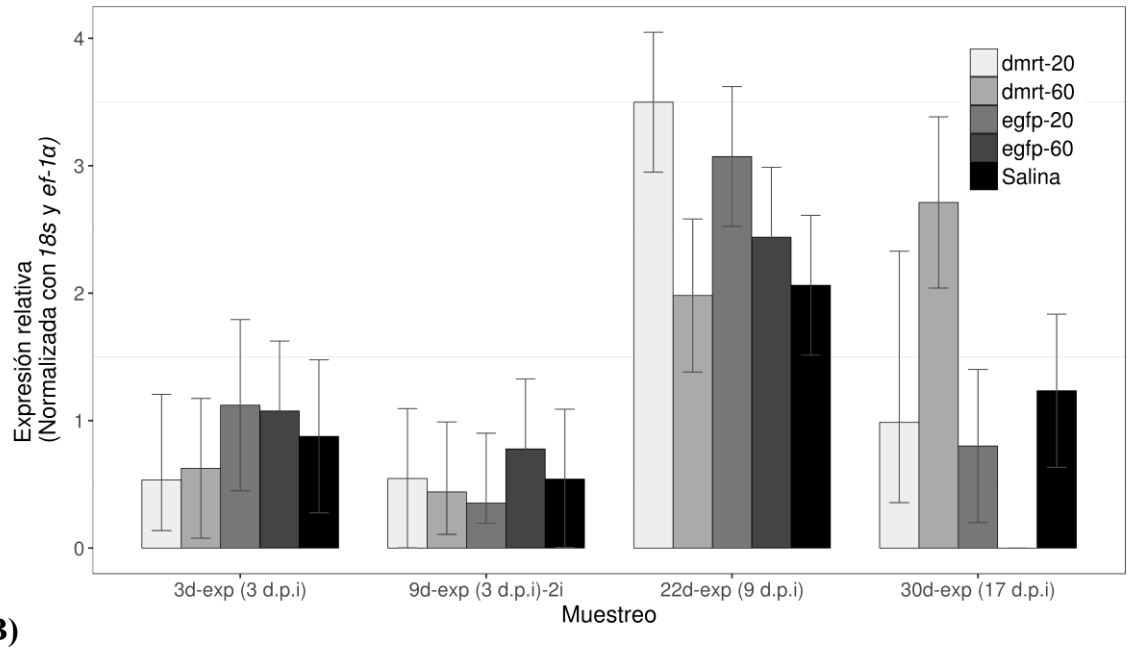


Figura 24. Valores de estabilidad para los genes de referencia seleccionados.

7.4.3.2 Expresión relativa de los genes *dmrt1*, *gapdh* y *p33-ringo*

No se presentaron disminuciones en la expresión de los genes *dmrt1* y *gapdh* en las dos dosis empleadas cuando estos fueron comparados con los controles salinos (Fig. 25A, B, 26A, B). Para el gen *p33-ringo* no se encontró expresión en ninguna de las muestras evaluadas. Se sabe que este gen no es expresado en una gónada inactiva (Llera-Herrera, 2013), por lo que la ausencia de transcritos de este gen sugiere que la gametogénesis de los organismos no progresó lo suficiente durante el mes del experimento para que este gen se expresara y, de hecho, la mayoría de los organismos al finalizar el experimento se encontraban en un estadio inactivo de la gametogénesis (datos no mostrados). Finalmente se estableció que el gen control negativo *egfp* no mostró variaciones significativas tanto para el experimento de interferencia con *dmrt1* como para el de *gapdh*.

(A)



(B)

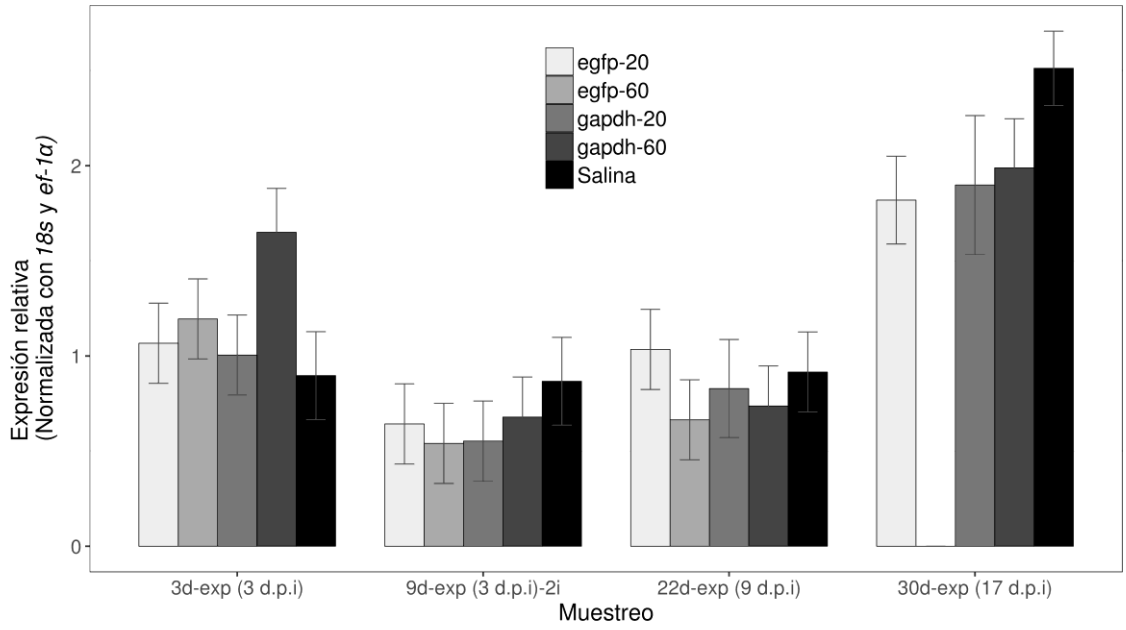
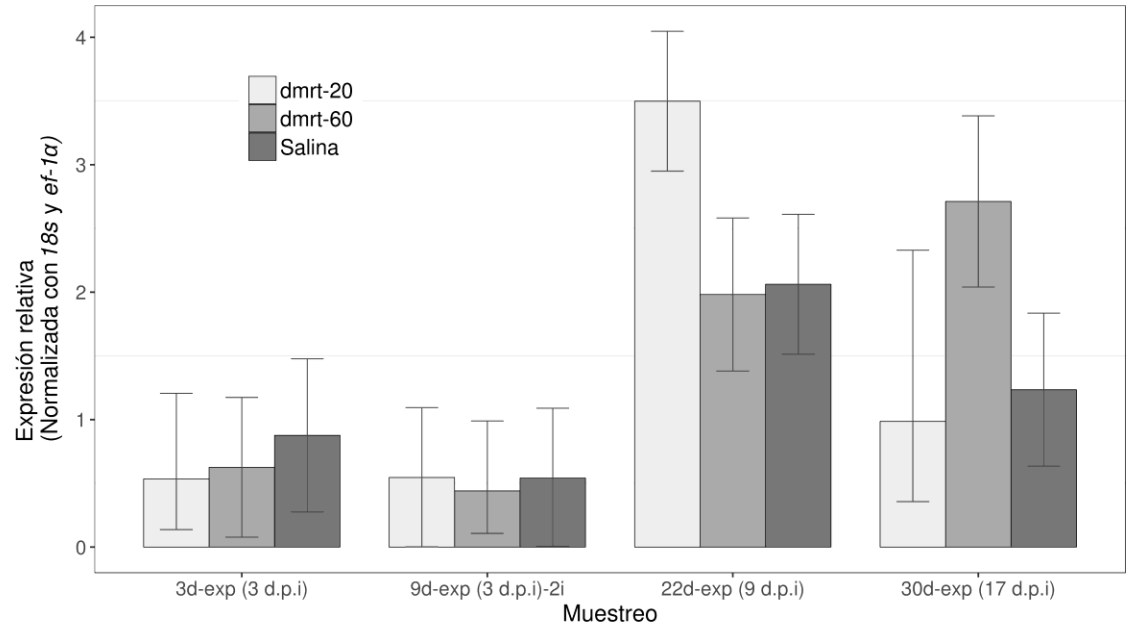


Figura 25. Expresión relativa de genes interferidos por dsRNA. (A) Organismos interferidos con dsRNA*dmrt1*. (B). Organismos interferidos con dsRNA*gapdh.* En ambos casos se empleó el peso de la gónada como covariable. d.p.i = días post-inyección. d = días. Las barras de dispersión muestran el error estandar.

(A)



(B)

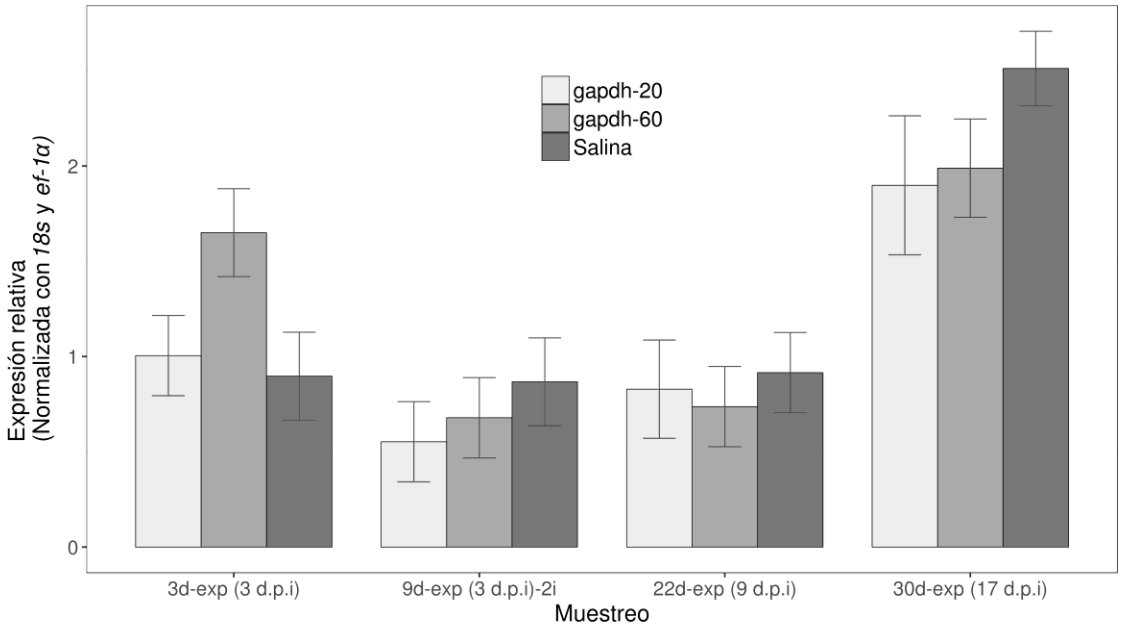


Figura 26. Expresión relativa de *dmrt1* y *gapdh* de organismos interferidos por dsRNAegfp. (A) *dmrt*. (B) *gapdh*. d.p.i = días post-inyección. d = días. Las barras de dispersión muestran el error estandar.

8. DISCUSIÓN

8.1 Ensamblado del transcriptoma global y su anotación funcional

El ensamblado *de novo* de secuencias de RNA-Seq, permite realizar estudios de expresión de todo del transcriptoma de organismos que carecen de un genoma disponible. Tal es el caso del molusco pectínido *Nodipecten subnodosus*, un organismo no modelo con importancia ecológica y económica en la costa del Pacífico en la península de Baja California, en México. Aunque también distribuido dentro del Golfo de California, en donde las condiciones ambientales tales como elevadas temperaturas resultan en pequeñas y dispersas agregaciones de almejas las cuales no son capaces de sustentar una pesquería. En el presente estudio se realizó una aproximación transcriptómica que, por una parte tenía el objetivo de generar información que permitiría el estudio de la respuesta fisiológica reproductiva de *N. subnodosus* a las condiciones medioambientales contrastantes observadas entre las costas de la Península de Baja California, y por otro lado, establecer los mecanismos por los cuales este molusco hermafrodita determina y mantiene ambas regiones sexuales de la gónada, en donde la región testicular y ovárica desarrollan gametos simultáneamente. En este contexto, se muestrearon dos estadios del desarrollo: Larva con mancha ocular y semilla, dos tejidos somáticos: músculo aductor y glándula digestiva, y un tejido reproductivo: gónada indiferenciada. El ensamblado *de novo* permitió extender y mejorar la información transcriptómica disponible para este organismo, obteniendo mayor número de contigs (243,774) y con mayor longitud (N50 = 980) a aquellos reportados durante la espermatogénesis de *N. subnodosus* (Llera-Herrera *et al.,* 2013). Aunque un mayor número de contigs fueron ensamblados, alrededor del 80% de los contigs no reportó alguna anotación funcional. Esta baja proporción de contigs con anotación ha sido también documentado en otros estudios transcriptómicos de moluscos bivalvos (Artigaud *et al.,* 2014; Huang *et al.,* 2013; Wang *et al.,* 2013; Zhao *et al.,* 2012), misma que se ha atribuido a un número insuficiente de secuencias en bases de datos públicas de especies filogenéticamente cercanas (Hou *et al.,* 2011). Asimismo, fue posible establecer que el nivel de expresión de genes así como el tamaño de los contigs tiene un efecto en la relación de contigs anotados, mismas variables que han sido reportadas en otros estudios transcriptómicos (Wang *et al.,* 2010; Wei *et al.,* 2011; Zhao *et al.,* 2012). Por ejemplo,

aproximadamente el 60% de los contigs con una expresión mayor a 100 transcritos por millón (TPM) fueron anotados contra la base de datos de UniRef90, mientras que solo el 15% de los contigs con un TPM <1 fueron anotados. Muchos de estos contigs a los cuales no se les asignó alguna anotación podrían representar proteínas nuevas únicas de moluscos, genes evolucionando de una forma acelerada, regiones no traducidas, ARN no codificante (Wang *et al.,* 2013), incluso pseudogenes altamente mutados. De forma interesante cuando las lecturas fueron mapeadas contra el transcriptoma se observó que 65,414 transcritos provenían de la librería que fue depurada de ribosomal (ribo-depleted), de los cuales ~12,000 presentaron anotación de acuerdo a las búsquedas por BlastX. Dado a lo que se esperaría encontrar enriquecido en una librería "ribo-depleted" (Kukurba y Montfomery, 2015), es posible que parte de los ~53,000 transcritos no anotados pertenezcan al grupo de los llamados ARN largos no codificantes. Además, como una cuestión técnica, ambos métodos de preparación de librerías (Ribo-Zero y PolyA) fueron comparados con la finalidad de evaluar qué tan eficientes eran en la eliminación de ARNr en esta especie. De lo anterior se logró concluir que en ambas librerías el porcentaje de contaminación por ARNr detectado fue muy bajo (<1.5% para secuencias 18S/28S), indicando que ambos procedimientos mostraron una alta eficiencia en la exclusión del ARNr en *N. subnodosus*.

8.2 Genes de determinación y diferenciación sexual

En contraste a la limitada información disponible en moluscos marinos, en el nemátodo modelo *Caenorhabditis elegans* las vías involucradas en la determinación y diferenciación sexual han sido extensamente estudiadas. Un gen importante encontrado temprano durante la ruta de determinación sexual de *C. elegans* es *sex-1*, un gen que se encuentra en el cromosoma X, el cual actúa durante la embriogénesis. Este gen regula la determinación sexual y la compensación de dosis al suprimir la transcripción del gen *xol-1* en embriones con una configuración cromosómica XX, mismos que posteriormente se desarrollan como organismos hermafroditas. Cuando el nivel de la proteína Sex-1 es bajo (configuración X0), Xol-1 es sobre-expresado, y el nemátodo se desarrolla como macho (Carmi *et al.,* 1998). En la almeja hermafrodita funcional *N. subnodusus* los mecanismos que rigen la determinación sexual son desconocidos, y aunque el número de cromosomas ha sido

establecido (2n = 38), cromosomas sexuales no han sido identificados (Ibarra *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de los genes potencialmente asociados a procesos de determinación y diferenciación sexual encontrados en el transcriptoma de este molusco (incluido *Ns-sex-1*, el ortólogo del gen *sex-1* en el nemátodo) se expresaron únicamente en semilla. De forma interesante, la edad de semilla ha sido propuesta como un estadio del desarrollo clave en el control de la determinación sexual en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Santerre *et al.*, 2013). En moluscos, este estadio coincide con el término de la metamorfosis, dando origen a una vieira anatómicamente joven. Sin embargo, en *N. subnodosus* aún no se conoce si la determinación sexual ocurre durante el estadio de semilla, por lo que investigación adicional centrada en esta etapa debe desarrollarse. Inesperadamente, la expresión de *Ns-sex-1*, medida por PCR, fue observada en una gónada indiferenciada en juveniles de *N. subnodosus*, y posteriormente su expresión fue mayormente testículo-específica en hermafroditas adultas. Este resultado sugiere que este gen podría actuar de forma opuesta a la observada en el nematodo: manteniendo la condición sexual masculina e inhibiendo el desarrollo del ovario o la condición femenina. Estudios funcionales posteriores deben ser realizados para comprender la función de *Ns-sex-1* en este molusco hermafrodita. Adicionalmente, los genes *Ns-dmrta2*, *Ns-sox9*, *Ns-wnt4*, *Ns-sfrp1* y *Ns-sex-1* fueron expresados principalmente en la región testicular, sin embargo, no fueron específicos de la región gonadal, dado que su expresión fue encontrada de igual forma en tejidos somáticos. Dentro de la familia de los genes *dmrt* se encuentran los genes *dsx* de *D. melanogaster* y *mab-3* de *C. elegans* lo cuales fueron los primeros genes *dmrt* (del inglés DM domain-doublesex and mab3 related family of transcriptions factors) identificados (Erdman y Burtis, 1993). Posteriormente fue identificado un homólogo de *dmrt1* en vertebrados (Raymond *et al.*, 1998, 2000). Todos los genes *dmrt* son caracterizados por la presencia de un dominio de unión al ADN llamado DM (Kopp, 2012), el cual consiste de un módulo Zinc N-terminal y un desorganizado C-terminal (Narendra *et al.*, 2002). En *D. melanogaster*, el gen *dsx* controla la decisión binaria en la diferenciación sexual entre machos y hembras (Burtis y Baker, 1989); en *C. elegans*, *mab3* regula múltiples aspectos de la diferenciación masculina y el comportamiento (Shen y Hodgkin, 1988; Yi *et al.*, 2000) y, en vertebrados, *dmrt1* es requerido para la diferenciación de

testículos de mamíferos y además participa en la diferenciación de la gónada masculina en tortugas con una diferenciación sexual por temperatura (Ge *et al.,* 2017; Raymond *et al.,* 1999; Raymond *et al.,* 2000). En *N. subnodosus*, el gen *Ns-dmrta2/dmrt5* aislado es diferente del reportado recientemente como *Ns-dmrt1* (Llera-Herrera *et al.,* 2013), pero es parte de la misma familia de genes *dmrt*, aunque los últimos poseen un dominio DMA adicional en su región C-terminal. Diversos estudios realizados específicamente con el gen *dmrta2* han mostrado que su expresión es mayormente testicular que ovárica, aunque en algunas circunstancias también es encontrado en tejidos somáticos. Por ejemplo, en el pez cebra (*Danio rerio*), este gen fue expresado específicamente durante el desarrollo embrionario, pero también en cerebro, testículo y ovario (con una mayor expresión observada en el testículo que en el ovario), pero no fue expresado en otros tejidos como músculo, hígado o intestino (Guo *et al.,* 2004). En humanos, *dmrta2* solo fue detectado en testículo de adultos (Ottolenghi *et al.,* 2002). Sin embargo, en *N. subnodosus* las lecturas mapeadas a este gen fue de tejidos somáticos (glándula digestiva), así como en larva con mancha ocular, semilla, y en la gónada indiferenciada (Tabla VI). Además, este gen fue expresado en la gónada de adultos, donde fue mayormente testículo específico, así como en gónadas de juveniles indiferenciados (Fig. 14).

En el ostión del Pacífico *C. gigas* un gen filogenéticamente relacionado a la familia de *dmrta1* y *dmrta2* denominado *dmrt-like* (*Cg-dm1*) fue expresado en ambos géneros y, aunque estudios recientes han asociado su función al desarrollo de órganos (Zhang *et al.,* 2014), su expresión es mayor en gónadas de machos que de hembras (Naimi *et al.,* 2009a). Entre los crustáceos como el cangrejo *Eriocheir sinensis*, un gen llamado *Esdmrt1* ha sido reportado por tener de igual forma expresión testículo específica (Zhang y Qiu, 2010). Dado que los tres reguladores sexuales, esto es *dsx*, *mab-3* y el *dmrt1* de vertebrados carecen todos de un dominio DMA, se ha propuesto que este último no es necesario para su función como factor de transcripción por unión al ADN durante la regulación del desarrollo sexual (Zhang y Qiu, 2010). Se ha sugerido que el dominio DMA ha sido perdido en proteínas ancestrales con un dominio DM durante el progreso de la evolución, por lo que los miembros de esta familia se volvieron especializados en funciones específicas, tal como *dmrt1* en la diferenciación sexual (Miller *et al.,* 2003).

Otro de los genes importantes encontrado en *N. subnodosus* fue *Ns-sox9*, el cual pertenece a la familia de proteínas con unión al ADN con un dominio HMG (por sus siglas en inglés High Mobility Group). Este gen codifica una proteína de entre 70 y 80 aminoácidos, con una secuencia similar (50%) al dominio HMG del factor de determinación sexual Sry, el cual está localizado en el cromosoma Y de mamíferos (Wegner, 1999). *sox9* es un gen involucrado en la diferenciación y en el mantenimiento de la función de las células de Sertoli, y es expresado en las etapas más tempranas a la formación de crestas genitales en ambos sexos de mamíferos. Posteriormente, su expresión se vuelve abundante en las crestas genitales de los embriones de ratón XY, pero está ausente en los embriones XX, para finalmente expresarse en un nivel alto únicamente en los testículos en desarrollo (Morais da Silva *et al.*, 1996). Las gónadas de ratón que carecen completamente de expresión de *sox9* no muestran signos de diferenciación masculina, y sus gónadas expresan marcadores específicos de hembras (Chaboissier *et al.*, 2004). Patrones de expresión similar (por ISH o qPCR) a los observados en ratón han sido también observados en la tortuga *Trachemys scripta* (Shoemaker *et al.*, 2007), en la tilapia *Oreochromis niloticus* (Kobayashi *et al.*, 2008), y en el gallo *Gallus gallus* (Kent *et al.*, 1996). En el ostión *C. gigas*, 32 proteínas han sido identificadas por contener un dominio HMG, sin embargo, solo 10 de ellas fueron clasificadas como genes tipo *sox*, y de estas últimas solo una mostró una expresión testículo-específica, la cual es filogenéticamente agrupada con genes *sry* (Zhang *et al.*, 2014). Al igual que en *C. gigas*, genes *sox* han sido identificados en otros moluscos, sin embargo, la expresión de estos genes no fue específica de machos, y un papel aparente en la determinación o diferenciación sexual no ha podido ser concluído (He *et al.*, 2013; Santerre *et al.*, 2014). En *N. subnodosus*, los patrones de expresión de *Ns-sox9* observados en una gónada indiferenciada y en la región testicular en gónadas maduras son muy similares a los reportados en otros organismos en los que este gen tiene alguna función probable en la determinación o diferenciación sexual. Estos resultados sugieren que el gen *Ns-dmrta2* así como *Ns-sox9*, tienen una función activa en la diferenciación de la región testicular en *N. subnodosus*, sin embargo, sus niveles jerárquicos en la cascada de diferenciación sexual permanecen desconocidos, una vía hipotetizada para *N. subnodosus* es mostrada en la figura 27.

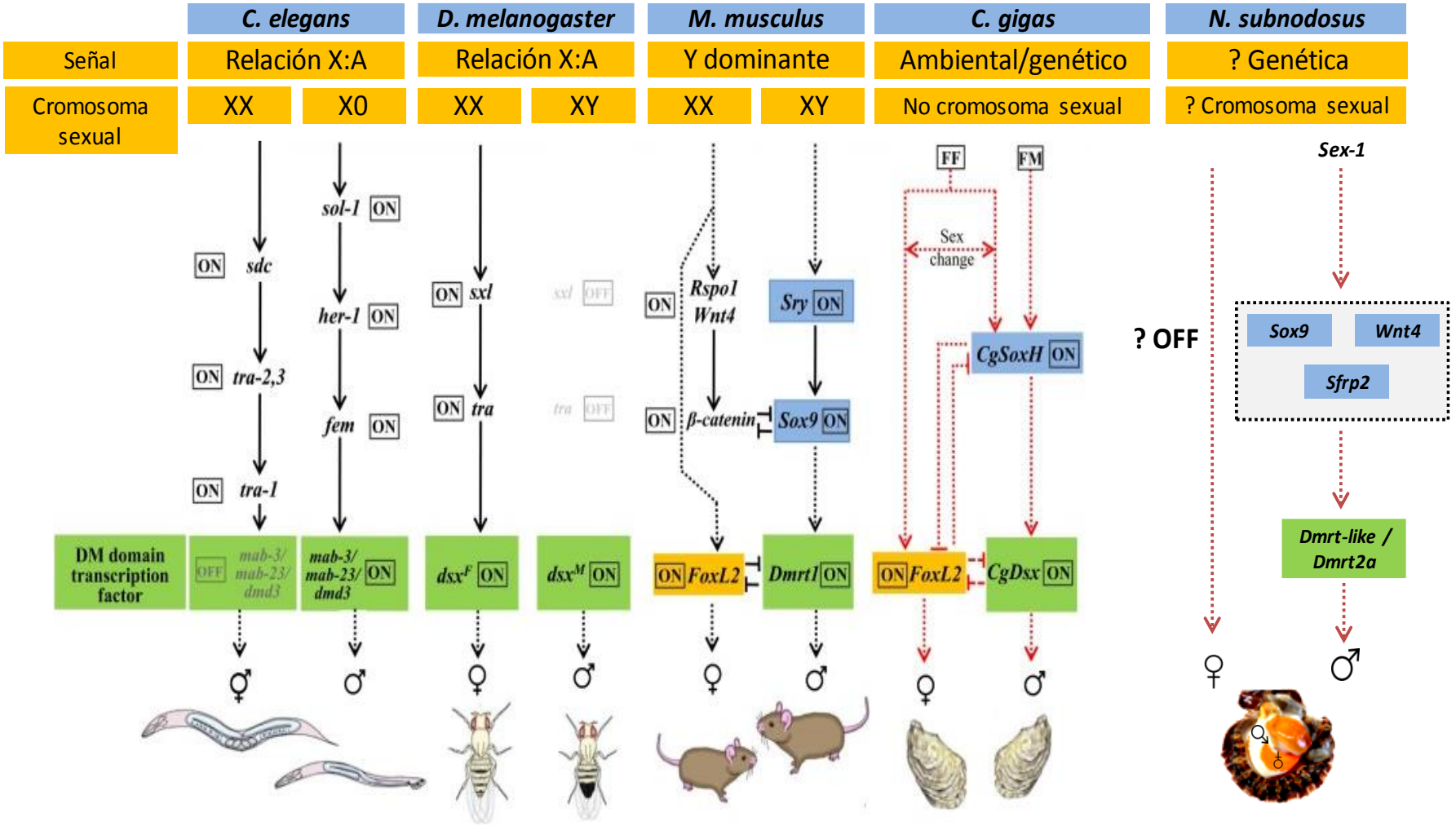


Figura 27. Vía de determinación/diferenciación sexual hipotetizada en *N. subnodosus* comparado con organismos modelo y *C. gigas*. Modificado de Zhang *et al*. (2014).

Otro de los genes encontrados fue *wnt4*, el cual cuando fue descubierto se creía desempeñaba un papel durante el desarrollo de la gónada femenina en ratones debido a que la expresión de *wnt4* es subregulada en gónadas de machos, pero mantenida en gónadas de hembras hasta que los géneros se vuelven morfológicamente diferentes, y mutaciones en este gen resultan en una reversión sexual solo en hembras (Vainio *et al.,* 1999). Sin embargo, posteriormente fue descubierto que *wnt4* era también necesario para una adecuada diferenciación temprana de los testículos (Jeays-Ward *et al.,* 2004). En *N. subnodosus*, este gen fue expresado en branquias en organismos con una gónada indiferenciada, y solo en la región testicular en gónadas diferenciadas, lo cual es aparentemente diferente de los patrones reportados en vertebrados. Su expresión testículo específica sugiere una participación en el mantenimiento de la región testicular en la gónada hermafrodita. Adicionalmente, fue posible establecer que *Ns-wnt4* es expresado en semilla, larva con mancha, y en una gónada indiferenciada mediante el mapeo de lecturas cortas contra el transcriptoma. La causa por la cual no se observó expresión de *Ns-wnt4* en una gónada indiferenciada cuando se evaluó por PCR punto final podría ser que los organismos usados para generar el transcriptoma en este objetivo fueron de menor edad que aquellos usados en el análisis de PCR punto final.

Otros dos de los genes encontrados, *sfrp2* y *pbx1*, son expresados durante la embriogénesis en ratón (Lescher *et al.,* 1998; Schnabel *et al.,* 2003), y durante el desarrollo urogenital. El gen *sfrp2* en conjunto con *sfrp5* está implicado en la regresión del conducto de Müller específica de los machos durante el desarrollo de mesonefros en ratones (Cox *et al.,* 2006). Los embriones masculinos que no expresan *sfrp1-2* exhiben múltiples defectos en la morfología de la gónada, la maduración del tracto reproductivo y la posición de la gónada, lo que indica que este gen participa en el desarrollo sexual normal en ratones (Warr *et al.,* 2009). Por otro lado, *pbx1* participa en la proliferación celular en las crestas genitales, así como en la correcta morfogénesis urogenital (Schnabel *et al.,* 2003). Estas funciones son consistentes con lo que es conocido en *N. subnodosus*, ya que los ductos gonadales primarios se encuentran conectados al acino que finalmente conduce al riñón, a través del cual se liberan los gametos (Lora-Vilchis *et al.,* 2003; Widowati *et al.,* 1995). Por lo tanto,

estos genes podrían desempeñar una función en la organogénesis urogenital de *N. subnodosus* de forma similar a lo conocido en vertebrados.

Dos genes más asociados con la diferenciación sexual, *Ns-tra2a* y *Ns-vir*, fueron encontrados en el transcriptoma de *N. subnodosus*. Ambos participan en las vías de la diferenciación sexual en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *tra2a* codifica una proteína de unión al ARN y participa en el correcto desarrollo de la espermatogénesis, así como en la correcta diferenciación sexual en el soma femenino (Amrein *et al.,* 1988; Belote y Baker, 1982; Watanabe, 1975). La expresión de *tra2a* es encontrada en los tejidos somáticos de ambos sexos, sin embargo, su expresión es mayor en gónadas, y más abundante en gónada de hembra que machos (Amrein *et al.,* 1988). Las proteínas Tra2 y Tra actúan al final de las vías de determinación sexual en la mosca de la fruta, formando un complejo que se une al exón 4 del transcrito del gen *dsx*, resultando en que este último sea retenido, lo que resulta en un transcrito y proteína de *dsx* específico de hembras (Hoshijima *et al.,* 1991; Ryner y Baker, 1991). En invertebrados no modelo como el camarón *Fenneropenaeus chinensis*, se han caracterizado tres isoformas de *tra2*, las cuales muestran una mayor expresión en ovarios que en testículos (Li *et al.,* 2012). De manera particular, una de las isoformas, la denominada FCtra2n, también se expresó en tejido somático. En el pez cebra, *Oryzias latipes*, dos isoformas fueron reportadas, *tra2a* y *tra2b*, ambas expresadas en tejidos somáticos, pero además *tra2b* fue expresada tanto en testículo como ovario. Asimismo, ambas isoformas se expresaron en la gónada embrionaria antes y durante la diferenciación sexual. De forma consistente a lo que se observa en *D. melanogaster*, niveles bajos de ambos transcritos (*tra2a-b*) fueron encontrados en el soma de *O. latipes* mientras que niveles altos fueron observados en la línea germinal en ambos sexos (Shiraishi *et al.,* 2004). En *N. subnodosus*, la expresión de *Ns-tra2a* fue encontrada en una gónada indiferenciada, y fue mayor en la región testicular que ovárica en una gónada hermafrodita madura, lo cual podría estar asociado con el estadio específico de cada región de la gónada, dado que el testículo madura primero. De manera interesante para un organismo hermafrodita, este gen también se expresó en tejidos somáticos, sin embargo actualmente su función es desconocida, y un esfuerzo a futuro es necesario para comprender su papel en el soma. Similar a *tra2*, el gen *vir* está involucrado en la

compensación de dosis cromosómica en hembras de *D. melanogaster* y en la determinación del sexo (Hilfiker *et al.,* 1991). Además, se ha establecido que participa en un proceso vital debido a que mutaciones en el mismo resultan en no viabilidad en ambos sexos, aunque aún no se conoce cual proceso es el afectado (Hilfiker *et al.,* 1995). En un nivel molecular, *vir* juega un papel en el corte y empalme alternativo de los genes *sxl* y *tra* que son específicos de hembras. En ovocitos, el producto materno de *vir* es necesario para la regulación de *sxl* en la progenie femenina, así como para la viabilidad de ambos sexos. Su función está restringida a la ovogénesis, lo cual contrasta con lo encontrado en *N. subnodosus*, en donde *Ns-vir* presentó una expresión mayormente testicular. Como en el caso de *Ns-tra2a*, análisis adicionales son necesarios con el objetivo de establecer si *Ns-vir* participa en las vías de determinación o diferenciación sexual en este molusco hermafrodita.

Otro gen ortólogo de los involucrados en determinación y diferenciación sexual, encontrado en el transcriptoma, fue *Ns-ovo*. En *D. melanogaster ovo* participa en el correcto desarrollo de la línea germinal femenina, pero también durante la gametogénesis en hembras adultas. Aunque su expresión es detectada en gónada de machos (Mével-Ninio *et al.,* 1991; Mével-Ninio *et al.,* 1995), esta última no parece ser esencial, aunque en algunos casos una ligera reducción en el tamaño de las gónadas de macho ha sido documentada en moscas que carecen del gen (Oliver *et al.,* 1987). En ratones, un gen ortólogo, *movo*, tiene tres isoformas denominadas, *movo-a*, *-b* y *-c* (Masu *et al.,* 1998; Unezaki *et al.,* 2004). Todas estas isoformas son expresadas en testículos desde el embrión hasta la adultez, sin embargo, *movo-a* es expresada en un mismo nivel en ovario como en los testículos adultos, mientras que *movo-b* y *-c* están presentes en niveles muy bajos. En testículos, movo ARNm fue detectado en espermatocitos en los túbulos testiculares (Unezaki *et al.,* 2004). De forma similar a *movo-a*, el ortólogo encontrado en *N. subnososus Ns-ovo* mostró una expresión en ambas regiones de la gónada pero con una mayor expresión en la región testicular.

Otro de los genes encontrados en *N. subnodosus* que podría tener una función en la diferenciación sexual es *Ns-doa*, una proteína quinasa. En *D. melanogaster*, *doa* es esencial para el desarrollo embrionario, en la ovogénesis temprana y en la línea germinal femenina. Además, es un gen importante en la determinación del sexo tanto en tejido somático como

germinal (Du *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 1994; Yun *et al.*, 2000). Particularmente en la región testicular, *doa* es requerido en la proliferación de espermatocitos a partir de espermatogonias, esto es, durante el inicio de la meiosis (Zhao *et al.*, 2013).

8.3 Genes asociados con la meiosis en el transcriptoma de *Nodipecten subnodosus* y sus abundancias en condiciones diploides y triploides

Con el objetivo de identificar todos los posibles genes conocidos por participar en meiosis, se realizaron búsquedas en el reporte de anotación empleando palabras claves como: "meiosis/meióticos", "recombinación", "meiosis checkpoint", "respuesta al daño de ADN" y "arresto meiótico". Todos los genes encontrados fueron mapeados a las vías KEGG de replicación y recombinación (Anexo II). Estas vías muestran que el transcriptoma de *N. subnodosus* exitosamente capturó la mayoría de los genes conocidos por estar involucrados en procesos de replicación del ADN y recombinación. La lista completa de estos genes son incluidos en https://drive.google.com/drive/folders/1ddE43LB-AXwWEfOQD8glqnFGjx1n3-AI?usp=sharing. Las abundancias comparativas de algunos de los transcritos de genes involucrado en la meiosis para diploides y triploides en los estadios inactivo e inicial son mostrados en la figura 19. Entre estos genes, se encontró uno anotado como *spo11*, el cual fue expresado en un estadio inactivo en gónadas de organismos diploides, y en triploides en un estado inicial de la gametogénesis. Debido a que *spo11* es conocido por participar al inicio de la recombinación homóloga generando las rupturas de doble cadena de ADN (DSB), su presencia en organismos triploides podría indicar que estos últimos se encontraban retrasados en el proceso meiótico. Asimismo, tres genes (*rad50*, *mre11* y *nbn/nbs1*), miembros del complejo MRN fueron encontrados en el transcriptoma de *N. subnodosus*. El complejo MRN es clave en la activación de genes de tipo "checkpoint" mediante la inducción de la actividad de la proteína quinasa Atm, el cual a su vez fosforila y activa diversos genes blanco como aquellos asociados en la reparación del ADN, activación de genes tipo "checkpoint" y apoptosis (Lamarche *et al.*, 2010; Lee y Paull, 2004; Shiloh, 2003). Excepto por *rad50*, los otros dos miembros del complejo MRN fueron más abundantes (Fig. 16) en la etapa inicial de gametogénesis tanto en diploides

como en triploides, una etapa en la cual se cree que la recombinación homóloga ocurre en otro molusco, *Argopecten ventricosus* (Maldonado-Amparo e Ibarra, 2002a, 2002b).

Otros dos genes específicos de meiosis, *disrupted meiotic cDNA* (*dmc1)* y *homologous-pairing protein 2 (hop2)* fueron expresados abundantemente en la etapa inicial de gametogénesis en organismos triploides, mientras que en diploides se expresaron de manera similar en ambas etapas gametogénicas. En *S. cerevisiae,* el gen *dmc1*, un homólogo de la proteína Rad51, es requerido durante la profase para la recombinación meiótica y la formación del complejo sinaptonémico (SC) normal; cuando este complejo es inactivado, una acumulación de rompimientos de la doble cadena (DSB) así como la formación incompleta del complejo sinaptonémico (SC) son observados (Bishop *et al.*, 1992). Asimismo, la función del gen *hop2* consiste en asegurar una correcta interacción entre cromosomas homólogos. Dicha interacción es lograda por la formación de un heterodímero estable entre la proteína Hops y Mnd1, lo cual a su vez estimula la expresión de Dmc1 para lograr resolver las rupturas de dobles cadenas de ADN (DSB) (Chen *et al.*, 2004; Leu *et al.,* 1998). Otro de los genes altamente expresado en los estadios inicial de la gametogénesis en triploides fue *rfa2* (*Replication protein A*), un componente del heterotrimero Rpa que participa tanto en procesos de estrés replicativo del ADN como en la activación de genes "checkpoints" en respuesta al daño de ADN (Olson *et al.,* 2006; Shi *et al.,* 2010). En respuesta a las roturas de doble cadena del ADN, *rpa2* interactúa con los factores de reparación Rad51 y Rad52 para mediar la reparación durante la recombinación homóloga (Lee *et al.,* 2010; Park *et al.,* 1996). Interesantemente, *rad52* también se encontró abundantemente expresado en gametogénesis inicial de triploides. Este gen, así como *rad51*, está involucrado en la recombinación y reparación de roturas de doble cadena (Park, 1995; Park *et al.,* 1996) a través del reconocimiento de homólogos y el intercambio de cadenas durante la recombinación homóloga (Baumann *et al.,* 1996).

Otros genes ortólogos encontrados en *N. subnodosus* son conocidos por participar como genes de "punto de control" o "checkpoint" durante la meiosis. Por ejemplo se anotó un gen como *pachytene checkpoint protein 2* (*pch2*), el cual se expresó de forma abundante tanto en una gónada inactiva como durante el inicio de la gametogénesis en organismos triploides, sin embargo, su expresión no fue observada al inicio de la gametogénesis en

diploides (Fig. 16). En *Saccharomyces cerevisiae*, *pch2* previene la segregación de cromosomas cuando la recombinación y la formación de complejos sinaptonémicos presentan irregularidades (San-Segundo y Roeder, 1999). Su abundancia en triploides sugiere que este "checkpoint" fue activado en gran medida, un hecho que concuerda con lo propuesto en Maldonado-Amparo e Ibarra (2002a), quienes propusieron que este gen específico de la meiosis podría estar asociado con el arresto del desarrollo de ovocitos previtelogénicos en *Argopecten ventricosus*s, ya que un gran número de ellos no son capaces de avanzar a etapas más allá del paquiteno de la meiosis I. En *N. subnodosus*, el arresto es casi completo y otros genes "checkpoint" podrían estar operando para detener el proceso meiótico. De hecho, otro gen anotado como *rad9a*, un componente del complejo 9-1-1, que es requerido para la reparación de las rupturas de dobles cadenas durante la fase S del ciclo celular (Bessho y Sancar, 2000; Cotta-Ramusino *et al.,* 2011), se expresó de manera similar en la gametogénesis inicial e inactiva de los diploides, pero fue más abundante durante la gametogénesis inicial de los triploides que en la gametogénesis inactiva, un indicador de un retraso del proceso meiótico en los triploides, incluída la replicación del ADN.

Por otro lado, hubo otros dos genes "checkpoints" en el transcriptoma cuya expresión fue invertida entre estadios gametogénicos de diploides y triploides, encontrándolos expresados en gónadas inactivas de diploides y en la etapa gametogénica inicial de triploides. Uno de esos genes fue el *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (*mdc1*), un gen que regula la localización y fosforilación de Brca1 y que se requiere para la detención del ciclo celular cuando se produce daño en el ADN en cualquiera de las fases S o G2/M (Goldberg *et al.,* 2003; Lou *et al.,* 2003). Otro gen encontrado de punto de control, el gen *cell cycle checkpoint protein Rad17* (*rad17*), codifica una proteína involucrada en el reclutamiento del complejo 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) como respuesta a un evento de daño al ADN, el cuál posteriormente cuando es fosforilado, induce el arresto del ciclo celular G2 (Rauen *et al.,* 2000; Zimmerman *et al.,* 2004). La expresión de este gen en *N. subnodosus* fue más abundante en los triploides inactivos que en la gametogénesis inicial, mientras que en los diploides se expresó menos abundante durante la gametogénesis inactiva. Finalmente, el gen *atm* se encontró altamente expresado en la etapa inactiva de la gametogénesis triploide.

Esta proteína es el iniciador de la respuesta al daño de ADN, fosforilando a otras proteínas de punto de control como Chk2, Rad1, Rad9 y p53 (Bao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 2000; Mirzayans y Murray, 2008).

8.4 Análisis de expresión diferencial de genes de meiosis en diploides y triploides

Las comparaciones de abundancias de transcritos entre estadios gametogénicos en organismos diploides y triploides permitieron concluir que diferentes genes de meiosis se expresaron entre ploidías en la gametogénesis inactiva e inicial. Por lo tanto, con el fin de probar estadísticamente esas abundancias, se realizó una expresión génica diferencial que contrasta a los organismos diploides y triploides para identificar genes específicos que participan en una meiosis normal contra una arrestada o detenida**.**

8.4.1 Genes que aseguran la progresión correcta del ciclo celular se encontraron sobre-regulados en la etapa inicial de la gametogénesis en organismos diploides

En gónadas de almejas diploides, genes participando durante la recombinación homóloga, división celular, transposición, apoptosis, diferenciación sexual, entre otros, fueron encontrados sobre-expresados al inicio de la gametogénesis. Algunos de estos genes son mostrados en la tabla VIIIa y la lista completa es incluida en https://drive.google.com/drive/folders/1ddE43LB-AXwWEfOQD8glqnFGjx1n3-AI?usp=sharing**.** Dentro de los genes sobre-regulados se encontraron dos conocidos por participar en la recombinación homóloga (HR), anotados como *msh5* y *kdm8*. El primero facilita el intercambio entre cromosomas homólogos durante la meiosis. Cuando en *S. cerevisiae msh5* es inactivado, un incremento en la no-disyunción cromosómica es observado durante la primera división meiótica (Hollingsworth *et al.*, 1995). Además, en ratones se ha sugerido que *msh5* promueve la sinapsis de cromosomas homólogos en la profase de la meiosis I. Independientemente del sexo, la deficiencia de *msh5* conduce a un arresto de la meiosis en cigoteno que se caracteriza por la formación limitada de complejos sinaptonémicos normales (SC), así como una sinapsis frecuente entre cromosomas no homólogos lo cual resulta en esterilidad (De Vries *et al.*, 1999). Con respecto al gen *kdm8*, que traduce a una demetilasa H3K36me2 (Hsia *et al.*, 2010), se sabe que esta es necesaria

para la reparación adecuada de daños en el ADN. La inactivación de *kdm8* da como resultado productos intermedios de la recombinación entre homólogos cargados con Rad51 que no pueden resolverse correctamente, lo que a su vez provoca inestabilidad cromosómica, ya que se sabe que Kdm8, junto con otras dos proteínas, facilita la remoción de Rad51 del ADN, evitando la formación de productos intermedios de la recombinación entre homólogos arrestados y promueve la culminación exitosa de la reparación de HR y roturas de doble cadena. Se ha sugerido que Kdm8 modula la desmetilación de H3K36 y una reducción de este último facilita la eliminación de Rad51, lo que permite la progresión de la reparación de daños en el ADN (Amendola *et al.,* 2017). También se ha demostrado que Kdm8 es requerido para la progresión del ciclo celular en la fase G2/M activando la ciclina A1 mediante la desmetilación de H3K36me2 (Hsia *et al.,* 2010), y modulando negativamente la actividad transcripcional de p53, lo que resulta en la modulación del control del ciclo celular y la proliferación celular en condiciones normales, así como en células cancerosas (Huang *et al.,* 2015).

Otro de los genes encontrados que se sabe son importantes durante la mitosis fue *nup62*, el cual juega un papel importante en la regulación de la homeostasis del centrosoma; cuando *nup62* es inactivado, las células se detienen en la fase G2/M, y también se observa una amplificación del centrosoma no controlada, así como una separación anormal del centriolo. Este gen también es esencial para la organización y orientación del huso mitótico (Hashizume *et al.,* 2013). Además, un gen que forma parte del centrómero, *cenp-T*, también fue sobre-expresado en una gametogénesis inicial de diploides. Cenp-T funciona como un receptor del complejo Ndc80, y esta interacción es predominantemente detectable en la anafase del ciclo celular, cuando las cromátidas hermanas migran a los polos celulares. Sin embargo, dicha interacción no parece ser estrictamente necesaria para una correcta segregación, ya que la inactivación de Cenp-T no produce efectos perjudiciales sobre el crecimiento o la segregación de cromosomas (Schleiffer *et al.,* 2012).

Asimismo, se encontraron dos genes que participan en garantizar una división celular adecuada, *pats1* y *mlc2*. El primero es encontrado en *Dictyostelium discoideum*, y se sabe que la alteración de este gen da como resultado un defecto de citocinesis (Abysalh *et al.,* 2003). En el caso del gen *mlc2*, cuya expresión fue la más alta (Log2FC = 13.16, ver Fig.

19A), su acción depende de la fosforilación de la ciclina-p34 durante la profase y la metafase, lo que retrasa la citocinesis hasta la segregación del cromosoma, en la anafase (Satterwhite *et al.,* 1992). Además, en ovocitos de ratón, un estudio reciente mostró que la interrupción de la actividad de Mlc2 afectó el ensamblaje de actina y la extrusión del cuerpo polar (Duan *et al.,* 2016). Otro gen encontrado fue *bag1*, cuya proteína interactúa con el gen anti-apoptótico *bcl2* mejorando su función anti-muerte (anti-apoptosis) celular, y por lo tanto tiene un impacto en la supresión de la apoptosis (Takayama *et al.,* 1995) probablemente debido a su capacidad para disociar al complejo Hsp90-p53 (King *et al.,* 2001). Este gen podría ser uno de los más importantes en la regulación del proceso apoptótico en *N. subnodosus.*

Dos genes anotados como elementos transponibles, *tx1* y *tcb2* se encontraron en la etapa inicial de diploides. *tx1* fue encontrado inicialmente en el genoma de *Xenopus laevis* (Garrett y Carroll, 1986). Este gen codifica una proteína transcriptasa inversa, lo que la ubica en la clase I de los elementos transponibles, los cuales se transponen mediante la transcripción inversa de un intermediario de ARNm (Finnegan, 1992). En contraste, *tcb2*, un gen que recientemente fue reportado en *N. subnodosus* (Llera-Herrera *et al.,* 2013) pertenece a la clase II, los cuales se transponen directamente de ADN a ADN y codifica una transposasa, la enzima necesaria para su propia transposición (Finnegan, 1992). Anteriormente, se sugirió que una posible causa de la esterilidad en el triploide podría ser consecuencia del daño al ADN resultante de elementos móviles sobre-regulados (Llera-Herrera *et al.,* 2013); sin embargo, la sobre-regulación de los elementos transponibles observados solo en diploides sugiere que no son la causa de la esterilidad triploide.

De manera interesante, el gen *dmta2/dmrt5,* un gen que previamente mostró tener una expresión testículo-específica fue encontrado sobre-expresado en la etapa inicial de la gametogénesis de los diploides, lo cual sugiere un papel en la diferenciación de los testículos en esta almeja hermafrodita (Galindo-Torres *et al.,* 2018). Su sobre-expresión en una etapa inicial de la gametogénesis refuerza las conclusiones previas en las que se propone que este gen puede ser uno de los genes de mayor importancia involucrados en la diferenciación sexual de la región testicular. Posteriores estudios funcionales ayudarán a

comprender qué genes desempeñan un papel importante en la diferenciación de cada región gonadal de esta almeja hermafrodita funcional.

Otro gen que podría estar participando en la diferenciación sexual encontrado en diploides fue *pum3*, un homólogo del gen *fbf* (factor de unión a fem-3) (Wickens *et al.*, 2002). Fbf es necesario para el cambio de la espermatogénesis a ovogénesis, a través de su unión a la región UTR 3' del RNAm del gen masculinizante *fem-3* en el hermafrodita *C. elegans* (Zhang *et al.*, 1997). Esta proteína de la familia PUF (Pumilio y FBF) también participa en el mantenimiento de la identidad de las células madre de la línea germinal en hembras de *Drosophila*, así como en la represión del gen *gld1* para controlar a las células madre de la línea germinal en *C. elegans* (Crittenden *et al.*, 2002; Forbes y Lehmann, 1998; Lin y Spradling, 1997). En este momento, se desconoce si en *N. subnodosus* este gen forma parte de un mecanismo para inactivar la diferenciación masculina que permita el desarrollo de la región gonadal femenina (ovario). Sin embargo, el hecho de que se haya sido encontrado una proteína que contiene el dominio pumilio en una gónada inactiva (Llera-Herrera *et al.*, 2013) y este gen *pum3* sobre-expresado en la etapa inicial de la gametogénesis sugiere roles importantes que deben investigarse más a fondo.

De acuerdo con estos resultados, genes que participan en la recombinación homóloga durante la meiosis, la organización del huso cromático, la formación del centrosoma, la citocinesis, la transposición, la diferenciación sexual y la inhibición de la apoptosis son activados al inicio de la gametogénesis en organismos diploides.

8.4.2 La imposibilidad de reparar el daño del ADN resultante de rupturas de la doble cadena desencadena la apoptosis y esto a su vez podría explicar la esterilidad en organismos triploides

Se sabe que un solo rompimiento de la doble cadena no reparada puede estimular a los checkpoints del ciclo celular y causar muerte celular (Bennett *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996), y en contraste con los genes sobre-expresados en diploides, en los triploides se encontraron genes implicados principalmente en la reparación del ADN y la apoptosis. Los nombres completos de algunos de esos genes se presentan en la tabla VIIIb y una lista completa de genes se incluyen en https://drive.google.com/drive/folders/1ddE43LB-

AXwWEfOQD8glqnFGjx1n3-AI?usp=sharing. Uno de los genes más interesantes fue un segundo *rad51, rad51C*. En humanos, este gen es uno de los cinco parálogos del gen *rad51* que han sido identificados (Dosanjh *et al.,* 1998). El gen *rad51* de humano comparte homología con los genes *recA* de *Escherichia coli* y con el *rad51* de *S. cerevisiae*, ambos involucrados en la reparación de las rupturas de doble cadena (DSB) que ocurren en la mitosis y la meiosis (Benson *et al.*, 1994; Shinohara *et al.,* 1992). Al igual que los otros parálogos de *rad51,* se cree que *rad51C* se originó a partir de *rad51* por duplicación de genes, adquiriendo nuevas funciones (Lin *et al.,* 2006). En células de mamíferos, Rad51C se encuentra en sitios de daño del ADN, por lo que se ha establecido que participa en la recombinación de homólogos (HR) y en la reparación del ADN, migración de cadenas (ramificaciones) y resolución de la unión de Holliday, y también en el control del número correcto de centrosomas en la mitosis (Badie *et al.,* 2009; Kuznetsov *et al.,* 2007; Liu *et al.,* 2004; Liu *et al.,* 2007; Renglin-Lindh *et al.,* 2007). Se sabe que su inactivación produce un número reducido en la formación de agrupaciones de proteínas de Rad51 (Rodrigue *et al.,* 2013; Takata *et al.,* 2001), y en ratones se sabe que es esencial para el desarrollo embrionario (Kuznetsov *et al.,* 2009). Su ortólogo Atrad51C en *Arabidopsis* es crucial para la meiosis y también para la reparación eficiente del ADN dañado inducido en células somáticas (Abe *et al.,* 2005). Interesantemente, Rad51C requiere otras dos proteínas para su acoplamiento correcto al ADN dañado. Esas proteínas, Atm (ataxia telangiectasia) y Nbs1 (nibrina), participan como detectores iniciales de las rupturas de doble cadena (MacQueen y Hochwagen, 2011), y ambos genes se encontraron en el transcriptoma de *N. subnodosus*, en donde el gen *nbs1* se expresaba más abundantemente en la gametogénesis inicial de los triploides (Fig. 16B). Además, Rad51C es también requerido para la activación del punto de control Chk2 el cual es dependiente de la fosforilación por Atm (Badie *et al.,* 2009). En las células de la línea germinal, la recombinación es llevada a cabo para el intercambio de genes y la propia segregación cromosómica durante la meiosis, mientras que en células somáticas es uno de los mecanismos para la reparación de las rupturas de doble cadenas del ADN. El hecho que Rad51C se encuentre sobre-expresado en triploides cuando se sabe que está presente en sitios de ADN dañado sugiere que en triploides las rupturas de doble cadena están presentes en una proporción mayor que en los organismos diploides, y que

además estas no están siendo reparadas. Se ha propuesto que el arresto de la meiosis en moluscos triploides ocurre durante la HR durante la etapa de cigoteno-paquiteno en la meiosis I debido a que se encontró que la gametogénesis se detuvo en ovocitos previtelogenicos en estadios de paquiteno-cigoteno en otro molusco triploide, *Argopecten ventricosus* (Maldonado-Amparo e Ibarra, 2002b). Sin embargo, los mecanismos de arresto no parecen estar ocurriendo de la misma magnitud en ambos moluscos, una conclusión derivada del hecho que *A. ventricosus* no es completamente estéril y, de hecho, se han producido tetraploides utilizando gametos de triploides (Maldonado *et al.,* 2003), mientras que en *N. subnodosus* se observa una esterilidad casi completa. Dados los genes expresados en triploides, existe claramente la posibilidad de que la condición triploide también induzca estrés durante la replicación del ADN. Por ejemplo, se sabe que la aneuploidía aumenta el estrés de replicación en forma de DSB durante la fase S (Passerini *et al.,* 2016; Zhu *et al.,* 2018), y la aneuploidía también desencadena la regulación negativa de proteínas involucradas en la replicación del ADN que a su vez, aumentan el daño en el ADN en forma de acumulación de DSB que son una consecuencia de las bifurcaciones de replicación retardadas o estancadas (Stingele *et al.,* 2012, citado por Zhu, 2018). Además, se ha demostrado que la poliploidización, particularmente la tetraploidía en células cancerosas, conducen a un aumento del daño en el ADN durante la fase S como resultado del estrés de replicación, que a su vez provoca inestabilidad genómica. Se ha observado en células tetraploides un aumento de la fosforilación de Chk1 y Rpa32, así como de los marcadores de ADN, 53BP1 y H2AX (Wangsa *et al.,* 2018). Interesantemente, el gen *ce164* fue encontrado sobre-expresado en la gónada inactiva de los triploides, y se sabe que su proteína es fosforilada por Atr/Atm en respuesta al daño en el ADN y al estrés de replicación, y que una vez activada, participa en la fosforilación de H2AX, Rpa, Mdc1, Chk2 y Chk1 con el propósito de preservar la estabilidad del genoma (Sivasubramaniam *et al.,* 2008).

Asimismo, se encontró otro parálogo de Rad51 sobre-regulado en una etapa inactiva de la gónada en triploides, anotado como Rad51D. Se sabe que este gen forma un complejo con el Rad51C (Masson *et al.,* 2001) discutido anteriormente. Dado que en una etapa de gónada inactiva no se esperan células al comienzo de la meiosis I, estos dos genes pueden

expresarse más bien como consecuencia del estrés durante la replicación del ADN. Aún más, mientras que en los triploides se encontraron dos genes *rad51*, en los diploides no se encontró ninguno, independientemente de la etapa gametogénica, lo que sugiere un papel importante de este gen en el arresto del ciclo celular gamético de las almejas triploides.

Otro gen interesante que estuvo sobre-regulado en triploides durante la gametogénesis inicial, y que se sabe que participa en la reparación del ADN, fue *xeroderma pigmentosum complementation group C* (*xpc*), específicamente requerido en el reconocimiento de DNA y la activación de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés *nucleotide excision repair*) (Sugasawa *et al.,* 1998). La vía NER es un mecanismo de reparación de ADN que es activada para participar en la eliminación de lesiones masivas de ADN inducidas por radiación UV, mutágenos y agentes quimioterapéuticos (Schärer, 2013).

El mal funcionamiento de cualquier gen *xp*, incluido *xpc*, desencadena la enfermedad de Xeroderma pigmentosum, caracterizada por los cambios de pigmentación en la piel inducidos por la luz solar y piel seca (Lehmann, 2003). Dado que se sabe que el gen *xpc* está regulado transcripcionalmente por la proteína codificada por el gen supresor de tumores p53, y que p53 responde a varios tipos de reparación de daños en el ADN (Bálint y Vousden, 2001), *xpc* podría estar expresado en triploides debido a la respuesta al daño en el ADN activada por las posibles rupturas de doble cadena no reparadas como se mencionó anteriormente. Del mismo modo, otro gen conocido por ser blanco de p53 fue la *miosina no convencional myo6* (Miosina VI), un gen que está específicamente sobre-regulado por el supresor de tumores p53 durante el daño en el ADN, que se une directamente al promotor del gen *myo6* y regula transcripcionalmente su expresión. Se cree que *myo6* protege la integridad del complejo de Golgi para la supervivencia celular (Jung *et al.,* 2006).

De igual forma se encontró sobre-expresado un gen que participa en otra etapa del ciclo celular, *miz-1/Zbt17*, el cual regula la expresión de *p15ink4b*, inhibidor de *cdk4* y *cdk6*, mismo que a su vez detiene el ciclo celular en G1 y promueve una senescencia celular prematura como resultado de señales de ADN dañado (Staller *et al.*, 2001; Malumbres *et al.,* 2000). En los organismos triploides, esta vía de regulación podría evitar el desarrollo no controlado de gametos anormales. Sin embargo, la sobre-expresión concurrente en

triploides del gen *mcaf1*, el cual desempeña un papel importante como regulador prematuro de la senescencia celular, podría indicar más bien la presencia de un sistema equilibrado (Sasai *et al.,* 2013), que a su vez permite que unas pocas células puedan avanzar pasos adicionales en el ciclo celular como ocurre en triploides, incluso si no se forman gametos funcionales (véase Maldonado-Amparo *et al.,* 2004).

Otro de los genes sobre-expresados en la gametogénesis inicial de triploides fue *slp1*, un gen que comparte homología con *p55cdc* de humano (*cdc20*), *fizzy* de *D. melanogaster* y *cdc20* de *S. cerevisae,* los cuales funcionan en la transición de la metafase/anafase (Dawson *et al.*, 1993; Matsumoto, 1997; Sethi *et al.*, 1991) al activar el complejo promotor de la anafase (APC) (Izawa y Pines, 2012). Además, un gen *nuf2*, que forma parte de la estructura del cinetocoro, también fue sobre-expresado durante la gametogénesis inicial de triploides. Este gen es necesario para la correcta segregación de los cromosomas y, como *slp1*, se requiere para el arresto de la metafase, proceso que es dependiente de *mad2-dependent spindle checkpoint* (Nabetani *et al.*, 2001).

A diferencia de los diploides, en donde se encontraron genes que intensifican la función antiapoptótica del gen *bcl2*, en los triploides se encontraron varios genes que, en conjunto, podrían conducir a la apoptosis. Uno de estos genes, es un miembro del receptor del factor de necrosis tumoral (*tnfr1*), el cual es el primer efector del factor de necrosis tumoral (*tnf*), y ambos están involucrados en varias funciones biológicas que incluyen la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Locksley *et al.,* 2001), además de funcionar como punto de control del ciclo celular, reduciendo los niveles de ciclina durante la fase G1 e induciendo un arresto del ciclo celular en G0/G1. Se sabe que cuando Tnf no está presente, Tnfr1 se asocia con Aip1/Dab2ip, una proteína activadora de Ras GTPasa (GAP) que actúa como una proteína supresora de tumores. Cuando Tnf está presente, Aip1/Dab2ip se disocia de Tnfr1, lo que desencadena la activación apoptótica específica a través de la vía ASK1-JNK, y participa en la inhibición de la señalización IKK-NF-kb (Xie *et al.*, 2009; Zhang *et al.,* 2004). Consistente con procesos apoptóticos ocurriendo en los triploides, un gen anotado como *dab2ip* también se encontró sobre-expresado en la etapa inicial de la gametogénesis. Sin embargo, en triploides la proteína Nf-kb que desempeña funciones importantes como factor de transcripción pro-supervivencia en la mayoría de las

condiciones, induciendo la expresión de genes antiapoptóticos como son los miembros de la familia *bcl2* (Karin y Lin, 2002; Luo *et al.*, 2005) no fue inducido únicamente en triploides, por lo que su participación podría no ser propia de los eventos de esterilidad ocurriendo en los triploides.

Otro gen encontrado fue el anotado como *prune/bmcc1*, que se sabe que se une al gen *bcl2* y regula negativamente al gen de señal de supervivencia *akt*, induciendo a la apoptosis (Tatsumi *et al.*, 2015). Se ha propuesto que Bcl2 mantiene inactivo al citocromo C para prevenir la apoptosis (Yang *et al.*, 1997). Cuando se libera el citocromo C, este interactúa con Apaf-1 (*factor 1 de activación de la proteasa de la apoptosis*), -también un blanco de p53 durante la respuesta al daño del ADN-, se unen a Caspasa-9 formando el Apoptosoma, que a su vez activa a la Caspasa-3, otro gen que también se encontró sobre-expresado en triploides (Robles *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 1997). La Caspasa-3 a su vez desencadena la fragmentación del ADN al activar a Dffa/iCad (subunidad alfa del factor de fragmentación del ADN (Dffa), también conocido como inhibidor de la DNasa activada por caspasa (icad)) por escisión (Jänicke *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998; Tang y Kidd, 1998); el gen *dffa/icad* también se encontró sobre-expresado en triploides, lo que sugiere un papel activo de la Caspasa-3 en la escisión de Dffa/iCad en triploides que finalmente conduce a la fragmentación del ADN.

A diferencia de *N. subnodosus*, en la que la triploidía induce la esterilidad total, en al menos otros dos bivalvos, gametos completamente desarrollados pueden ser producidos por triploides (Allen y Downing, 1986; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). En uno de esos moluscos, el ostión del Pacífico *C. gigas*, se ha propuesto que una sobre-expresión de los genes implicados en la replicación del ADN, la recombinación y el punto de control (checkpoints) del paquiteno pueden ser responsables del éxito en la producción de gametos a largo plazo a pesar de su condición triploide (Dheilly *et al.*, 2014). En un contexto general, se puede sugerir que en organismos triploides de *C. gigas* un sistema equilibrado entre la reparación del ADN y la apoptosis, que permite la producción de gametos esté presente. Esto se debe a que en las ostras triploides, los genes asociados con el complejo NF-kB pro-supervivencia se encontraron sobre-expresados cuando se compararon con los diploides, sin embargo, los genes proapoptóticos como *caspasa-3* y *-7*, así como *hint1*, también se encontraron sobre-

expresados (Dheilly *et al.*, 2014). La presencia de NF-kappaB, un inhibidor de caspasa, así como otros inhibidores de la apoptosis encontrados en los ostiones triploides, sugieren que existe una respuesta apoptótica de menor magnitud en la condición triploide de *C. gigas* que en organismos triploides de *N. subnodosus*.

8.5 Silenciamiento por dsRNA de los genes *dmrt1* y *p33 ringo* en organismos diploides

El mecanismo de ARN de interferencia fue descubierto por primera ocasión en plantas como un fenómeno de silenciamiento genético (Napoli *et al.,* 1990), posteriormente fue descrito en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en el cual se observó un silenciamiento génico de mayor magnitud al suministrar ARN de doble cadena (Fire *et al.,* 1998). Este mecanismo puede ser inducido de forma exógena mediante la inyección o adición de ARN de doble cadena (dsRNA) (por ejemplo, por virus, o *in vivo*) y de forma endógena mediante micro-RNAs primarios (pri-miRNAs) que son codificados en el genoma de un organismo (He y Hannon, 2004; Meister y Tuschl, 2004). Los pri-miRNAs son transcritos largos que forman estructuras secundarias de tipo tallo y asa. Estas estructuras son reconocidas y procesadas en el núcleo por Drosha, una RNAse III, cortando la base del tallo y liberando el miRNA precursor (pre-miRNA). Ambos precursores (pre-miRNA o dsRNA) son procesados en el citoplasma por otra endonucleasa RNAse III llamada Dicer, dando dsRNA de ~20-25bp de largo designados miRNA y siRNA respectivamente. Posteriormente solo una de las cadenas cortas del duplex miRNA o siRNA se ensambla en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC por sus siglas en inglés), el cual actúa sobre su transcrito objetivo con secuencia complementaria provocando la represión de la traducción (en el caso de miRNA) o la fragmentación del ARNm, lo cual induce un silenciamiento (He y Hannon, 2004). Aunque el uso de dsRNA ha sido empleado en diversos grupos taxonómicos para determinar la función de genes (Jiang *et al.,* 2006; Ramuru *et al.,* 2012; Terova *et al.,* 2013; Wang *et al.,* 2011), en moluscos bivalvos, el uso de esta técnica ha sido reportada de forma exitosa en pocos estudios realizados, únicamente en *Crassostrea gigas*, en la ostra perlera *Pinctada fucata* y recientemente en *Chlamys farreri* (Fabiux *et al.,* 2009; Fang *et al.,* 2011; Huvet *et al.,* 2012; Liang *et al.,* 2018; Pauletto *et al.,* 2017). Particularmente en *N. subnodosus*, en al menos un estudio se reportó una disminución de

expresión en los genes interferidos (*gapdh*-gen control y *mstn*-gen regulador negativo del crecimiento), sin embargo, esta disminución solo fue observada en dos puntos durante el desarrollo experimental (comparado con el control), inclusive cuando re-inyecciones de dsRNA a lo largo de este fueron realizadas. Aunque una disminución de la expresión de *mstn* fue observada, los análisis histológicos mostraron que esta inhibición no se tradujo en un cambio en el tamaño y número de fibras musculares (Fuente-Gómez. 2016). Además del presente estudio, donde el objetivo fue silenciar genes involucrados en la diferenciación sexual y ciclo celular, en otro trabajo donde el objetivo fue de igual forma silenciar genes involucrados en la diferenciación sexual, no se obtuvieron resultados que evidenciaran un silenciamiento génico (Llera-Herrera e Ibarra, 2014. Datos no publicados), inclusive cuando distintas dosis y tipos de entrega celular de dsRNA fueron empleados. Lo anterior llevó a proponer que el mecanismo de silenciamiento génico no existía en moluscos por lo que se realizó una búsqueda en nuestros transcriptomas para identificar algunos de los genes ortólogos que participan en el silenciamiento genético, encontrando los genes *ago2, dicer1* y *trbp.* Ortólogos de estos genes también fueron identificados en los genomas de *C.gigas* y *Chlamys farreri*. Sin embargo, en *C. farreri*, a diferencia de *N. subnodosus*, se encuentran en su genoma dos *endoribonuclease Dicers*, pero no así en *C. gigas*. Se sabe que algunos organismos contienen más que un gen *dicer*, en el que cada uno procesa dsRNA que provienen de una fuente específica (exógena o endógena). Por ejemplo, en *Drosophila melanogaster,* Dcr-1 presenta mayor afinidad al procesamiento de precursores miRNA (Lee *et al.*, 2004), mientras que Dcr-2 es requerida para el procesamiento de dsRNA (Lee *et al.,* 2004; Pham *et al.,* 2004). Otro ejemplo es observado en *Arabidopsis thaliana* donde tres de las cuatro proteínas Dicer-like (Dcl) identificadas están involucradas en el procesamiento de dsRNA que provienen de diferentes fuentes (Xie *et al.,* 2004). Debido a los resultados contrastantes observados en *N. subnodosus*, hasta ahora, no es posible concluir que en este organismo los resultados poco favorables empleando la metodología de dsRNA sean una consecuencia de posibles *dicer* especializadas no presentes en este organismo, dado que su identificación en nuestro transcriptoma es susceptible a la profundidad de secuenciación, pero esta posibilidad debería ser considerada para futuros experimentos de ARNi por dsRNA. Una alternativa, es emplear siRNAs de

cadenas dobles previamente procesados (ver https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rnai-sirna/tech-notes/five-ways-to-produce-sirnas.html) en lugar de dsRNA largos y, de esta forma, mitigar la incertidumbre de la posible ausencia de una enzima Dicer especializada en este molusco. Asimismo, el uso de siRNAs podría evitar el potencial desencadenamiento de una respuesta del interferón (Elbashir *et al.,* 2001). Esta respuesta en su caso podría también explicar el desempeño de dsRNA observado en *N. subnodosus*, ya que este mecanismo de respuesta inmune podría reducir las eficiencias del silenciamiento génico (Machitani *et al.,* 2017). Aunque esta respuesta inmune no ha sido totalmente caracterizada en moluscos, al menos un mecanismo similar es reportado como presente en *C. gigas*, donde incluso es aprovechado para estimular el sistema inmune de este molusco infectado con herpes virus 1 (Pauletto *et al.,* 2017). Al igual que en *C. gigas*, en el transcriptoma de *N. subnodosus* fueron encontrados varios genes anotados como involucrados en una respuesta del interferón.

Por otro lado, mientras que en *D. melanogaster* y *A. thaliana* existen proteínas Dicer especializadas, en *Saccharomyces pombe* y *C. elegans* solo ha sido reportada la presencia de una Dicer-1 (Meister y Tuschi, 2004; Provost *et al.,* 2002; Sigova *et al.,* 2004), la cual parece funcionar en el procesamiento de dsRNA tanto de fuentes exógenas como endógenas (Bernstein *et al.,* 2001; Grishok *et al.,* 2001; Hutvágner *et al.,* 2001; Ketting *et al.,* 2001). Lo anterior resulta interesante debido a que la proteína Dicer-1 encontrada en *N. subnodosus* se agrupa con la Dicer-1 de *S. pombe* (Anexo III), lo cual podría sugerir, contrario a lo antes planteado, que esta Dicer-1 podría mediar el procesamiento de dsRNA provenientes de diferentes fuentes. Asimismo, mecanismos alternos de reconocimiento aún no descubiertos podrían estar participando, como aquellos reportados en *C. elegans* donde se ha propuesto un modelo que permite reconocer dsRNA exógeno. En principio, este mecanismo es mediado por las proteínas Rde-4 y Rde-1 las cuales se unen a dsRNA exógenos y sirven como marcajes de reconocimiento para su procesamiento por la Dcr1 (Tabara *et al.,* 2002). Sin embargo, ninguna de estas proteínas fueron encontradas anotadas en el transcriptoma de *N. subnodosus*, pero tampoco en el genoma de *C. gigas* y *Chlamis farreri*. Hasta el momento resulta complicado establecer una hipótesis que pueda explicar

los resultados contrastantes observados en *N. subnodosus*. Si bien en este documento se sugiere evaluar experimentos empleando siRNAs, el descubrimiento relativamente reciente de nuevas tecnologías para interrogar la función de genes como lo es el sistema CRISPR/Cas9, resulta naturalmente la siguiente mejor opción para ser empleada en este molusco hermafrodita funcional, además que el uso de esta tecnología ya ha sido reportado de manera exitosa en el molusco *Crepidula fornicata* (Perry y Henry, 2015).

9. CONCLUSIONES

La información transcriptómica generada a partir de dos estadios de desarrollo temprano, tres tejidos de juveniles y gónada madura permitió el descubrimiento de genes ortólogos de algunos involucrados en los mecanismos de determinación y diferenciación sexual en otras especies, y de igual forma ha provisto de información transcriptómica valiosa para investigaciones futuras que impliquen diversos campos de estudio en este molusco. De acuerdo a los patrones de expresión de los genes *Ns-dmrta2*, *Ns-wnt4*, *Ns-sex-1*, *Ns-sfrp2* y *Ns-sox9*, es posible sugerir que su función está asociada con la diferenciación testicular así como el mantenimiento de la misma, mientras que en la región ovárica, mecanismos de diferenciación sexual por defecto (default) podrían estar sucediendo. Sin embargo, dada la profundidad de secuenciación empleada en este objetivo, esta propuesta de diferenciación sexual en la región ovárica deberá ser confirmada empleando mayores profundidades de secuenciación, y preferentemente en un estudio comparativo con la región testicular.

Por otra parte, el análisis transcriptómico en organismos diploides al inicio de la gametogénesis mostró que este molusco expresa un conjunto de genes que participan en la diferenciación sexual, recombinación homóloga y hasta la conclusión de la meiosis. En contraste, en organismos triploides, genes mayormente asociados con respuesta al daño de ADN fueron sobre-expresados. Dicha respuesta puede ser el resultado de rupturas de doble cadena del ADN que no son reparadas y que se acumulan durante el proceso de replicación del ADN, lo cual resulta en un estrés replicativo que finalmente desencadena apoptosis. Estudios posteriores deberán ser desarrollados con el objetivo de confirmar un incremento apoptótico en triploides a comparación de diploides al inicio de la gametogénesis.

El descubrimiento de genes importantes tanto en la determinación y diferenciación sexual, así como aquellos probablemente involucrados en la esterilidad en organismos triploides, son candidatos potenciales para ser interrogados mediante estudios funcionales empleando tecnologías como CRISPR/Cas9, lo cual permitirá tener un mayor panorama de cómo estos genes están actuando en cada uno de estos procesos biológicos.

Finalmente, aunque el uso de tecnologías de silenciamiento como dsRNA ha sido usado exitosamente en algunos moluscos, los pocos resultados favorables y la magnitud de los resultados observados en este molusco, sugiere que en *N. subnodosus* nuevas tecnologías de genómica funcional (como la antes descrita) deben ser evaluadas.

10. LITERATURA CITADA

Abe, K., K. Osakabe, S. Nakayama, M. Endo, A. Tagiri, S. Todoriki, H. Ichikawa, S. Toki. 2005. Arabidopsis *RAD51C* gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. Plant Physiol 139(2):896–908.

Abysalh, J. C., L. L. Kuchnicki, A. Larochelle, A. 2003. The identification of pats1, a novel gene locus required for cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell 14(1):14–25.

Ahringer, J., J. Kimble. 1991. Control of the sperm–oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the fem-3 3′untranslated region. Nature 349(6307):346–348.

Allen, S. K., S. L. Downing. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. J Exp Mar Biol Ecol 102(2-3):197–208.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myres, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403–410.

Amendola, P. G., N. Zaghet, J. J. Ramalho, J. Vilstrup Johansen, M. Boxem, A. E. Salcini. 2017. JMJD-5/KDM8 regulates H3K36me2 and is required for late steps of homologous recombination and genome integrity. PLoS Genet. 13(2):e1006632.

Amrein, H., M. Gorman, R. Nöthiger. 1988. The sex-determining gene tra-2 of Drosophila encodes a putative RNA binding protein. Cell 55(6):1025–1035.

Andersen, C. L., J. L. Jensen, T. F. Ørntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64(15):5245–5250.

Arellano-Martínez, M., B. P. Ceballos-Vázquez, M. Villalejo-Fuerte, F. García-Domínguez, J. F. Elorduy-Garay, A. Esliman-Salgado, I. S. Racotta. 2004b. Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. J Shellfish Res 23(2):723–729.

Arellano-Martínez, M., I. S. Racotta, B. P. Ceballos-Vázquez, J. F. Elorduy-Garay. 2004a. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion´s paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México. J Shellfish Res 23(1):15–23.

Arellano-Martínez. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (Pectinidae) en la laguna ojo de liebre, B.C.S., México. Tesis (Doctorado en Ciencias) Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz B.C.S., México. 167pp

Artigaud, S., M. A. Thorne, J. Richard, R. Lavaud, F. Jean, J. Flye-Sainte-Marie, L. S. Peck, V. Pichereau, M. S. Clark. 2014. Deep sequencing of the mantle transcriptome of the great scallop Pecten *maximus*. Mar Genomics 15:3–4.

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, G.

Sherlock. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 25(1):25–29.

Badie, S., C. Liao, M. Thanasoula, P. Barber, M. A. Hill, M. Tarsounas. 2009. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylations. J Cell Biol 185(4):587–600.

Bálint, E. E., K. H. Vousden. 2001. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. Br J Cancer 85(12):1813–1823.

Bao, S., R. S. Tibbetts, K. M. Brumbaugh, Y. Fang, D. A. Richardson, A. Ali, S. M. Chen, R. T. Abraham, X. F. Wang. 2001. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. Nature 411(6840):969–974.

Barber, B. J., N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. In. Scallops: Biology. Ecology and Aquaculture, edited by S. E. Shumway, Elsevier Science, Amsterdam. pp. 377–428.

Barton, M. K., J. Kimble. 1990. fog-1, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 125(1):29–39.

Baumann, P., F. E. Benson, S. C. West. 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. Cell 87(4):757–766.

Beaumont, A. R., J. E. Fairbrother. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish; a review. J Shellfish Res 10(1):1–18.

Belote, J. M. 1989. The control of sexual development in *Drosophila melanogaster*: genetic and molecular analysis of a genetic regulatory hierarchy. Gene 82(1):161–167.

Belote, J. M., B. S. Baker. 1982. Sex determination in *Drosophila melanogaster*: analysis of transformer-2, a sex-transforming locus. P Natl Acad Sci USA 79(5):1568–1572.

Benjamin, Y., Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Roy Stat Soc B Met 57:289–300.

Bennett, R. J., H. J. Dunderdale, S. C. West. 1993. Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion. Cell 74(6):1021–1031.

Benson, F. E., A. Stasiak, S. C. West. 1994. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of the E. coli RecA. EMBO J 13(23):5764–5771.

Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409(6818):363–366.

Bessho, T., A. Sancar. 2000. Human DNA damage checkpoint protein hRAD9 is a 3' to 5' exonuclease. J Biol Chem 275(11):7451–7454.

Bishop, D. K., D. Park, L. Xu, N. Kleckner. 1992. DMCI: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. Cell 69(3):439–456.

Boggs, R. T., P. Gregor, S. Idriss, J. M. Belote, M. McKeown. 1987. Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. Cell 50(5):739–747.

Bolger, A. M., M. Lohse, B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30(15):2114–2120.

Bray, N. L., H. Pimentel, P. Melsted, L. Pachter. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. Nat Biotechnol 34:525–527.

Breton, S., C. Capt, D. Guerra, D. Stewart. 2017. Sex determining mechanisms in bivalves. Preprints 2017, 2017060127.

Bridges, C. B. 1916. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics 1(1):1–52.

Bridges, C. B. 1921. Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. Science 54(1394):252–254.

Bull, J. J. 1983. Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc Menlo Park, California. USA. 315pp.

Burtis, K. C., B. S. Baker. 1989. *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. Cell 56(6):997–1010.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley. J. Vandesompele, C. T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55(4):611–622.

Carmi, I., B. J. Meyer. 1999. The primary sex determination signal of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 152(3):999–1015.

Carmi, I., J. B. Kopczynski, B. J. Meyer. 1998. The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. Nature 396(6707):168–173.

Chaboissier, M. C., A. Kobayashi, V. I. Vidal, S. Lützkendorf, H. J. van de Kant, M. Wegner, D. G. de Rooij, R. R. Behringer, A. Schedl. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. Development 131(9)1891–1901.

Chen, H., P. C. Boutros. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. BMC. Bioinformatics 12:35.

Chen, M. J., Y. T. Lin, H. B. Lieberman, G. Chen, E. Y. Lee. 2001. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. J Biol Chem 276(19):16580–16586.

Chen, Y. K., C. H. Leng, H. Olivares, M. H. Lee, Y. C. Chang, W. M. Kung, S. C. Ti, Y. H. Lo, A. H. Wang, C. S. Chang, D. K. Bishop, Y. P. Hsueh, T. F. Wang. 2004. Heterodimeric complexes of Hop2 and Mnd1 function with Dmc1 to promote meiotic homolog juxtaposition and strand assimilation. P Natl Acad Sci USA 101(29):10572–10577.

Clifford, R., M. H. Lee, S. Nayak, M. Ohmachi, F. Giorgini, T. Schedl. 2000. FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline. Development 127(24):5265–5276.

Coschigano, K. T., P. C. Wensink. 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of Drosophila. Genes Dev 7(1):42–54.

Cotta-Ramusino, C., E. R. McDonald, K. Hurov, M. E. Sowa, J. W. Harper, S. J. Elledge. 2011. A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. Science 332(6035):1313–1317.

Cox, S., L. Smith, D. Bogani, M. Cheeseman, P. Siggers, A. Greenfield. 2006. Sexually dimorphic expression of secreted Frizzled-related (SFRP) genes in the developing mouse Müllerian duct. Mol Rep Dev 73(8):1008–1016.

Crittenden, S. L., D. S. Bernstein, J. L. Bachorik, B. E. Thompson, M. Gallegos, A. G. Petcherski, G. Moulder, R. Barstead, M. Wickens, J. Kimble. 2002. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. Nature 417(6889):660–663.

Dawson, I. A., S. Roth, M. Akam, S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Mutations of the fizzy locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. Development 117(1):359–376.

De Vries, S. S., E. B. Baart, M. Dekker, A. Sienzen, D. G. de Rooij, P. de Boer, H. te Riele. 1999. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. Gene Dev 13(5):523–531.

Dheilly, N. M., A. Jouaux, P. Boudry, P. Favrel, C. Lelong. 2014. Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Towards an understanding of partial sterility associated with triploidy. PLoS One 9(11):e112094.

Dosanjh, M. K., D. W. Collins, W. Fan, G. G. Lennon, J. S. Albala, Z. Shen, D. Schild. 1998. Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. Nucleic Acids Res 26(5):1179–1184.

Du, C., M. E. Mcguffin, B. Dauwalder, L. Rabinow, W. Mattox, W. 1998. Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in Drosophila. Mol Cell 2(6):741–750.

Duan, X., J. Liu, C. C. Zhu, Q. C. Wang, X. S. Cui, N. H. Kim, B. Xiong, S. C. Sun. 2016. RhoA-mediated MLC2 regulates actin dynamics for cytokinesis in meiosis. Cell Cycle 15(3):471–477.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32(5):1792–1797.

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411(6836):494–498.

Ellis, R. E., J. Kimble. 1995. The fog- 3 gene and regulation of the cell fate in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 139(2):561–577.

Ellis, R. E., T. Scheld. 2007. Sex determination in the germ line. WormBook ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook.

Erdman, S. E., K. C. Burtis. 1993. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel finger related DNA binding domain. EMBO J 12(2):527–535.

Fabioux, C., C. Corporeau, V. Quillien, P. Favrel, A. Huvet. 2009. *In vivo* RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development. FEBS J 276(9):2566–2573.

Fabioux, C., S. Pouvreau, F. Le Roux, A. Huvet. 2004. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. Biochem Biophys Res Commun 315(4):897–904.

Fang, D., G. Xu, Y. Hu, C. Pan, L. Xie, R. Zhang. 2011. Identification of genes directly involved in shell formation and their function in pearl oyster, *Pinctada fucata*. PLoS One 6(7):e21860.

Feng, Z., M. Zhao, D. Sun, Z. Zhang. 2010. Cloning, characterization and expression analysis of cf-dmrt4-like gene in *Chlamys farreri*. J Fish Sci China 17:930–940.

Finn, R. D., J. Clements, S. R. Eddy. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucleic Acids Res 39:w29–w37.

Finnegan, D. J. 1992. Transposable elements. Curr Opin Genet Dev 2(6):861–867.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Diver, C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669):806–811.

Forbes, A., R. Lehmann. 1998. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. Development 125(4):679–690.

Fuente-Gómez, M. G. 2016. Evaluación del silenciamiento génico de la miostatina en el musculo aductor de *Nodipecten subnodosus*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz B.C.S, Mexico. 110pp

Galindo-Torres, P. E. 2014. Caracterización del transcrito del gen *fem-1* en *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y análisis de su función en la reproducción mediante RNA de interferencia. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz B.C.S, México. 113pp

Galindo-Torres, P., A. García-Gasca, R. Llera-herrera, C. Escobedo-Fregoso, C. Abreu-Goodger, A. M. Ibarra. 2018. Sex determination and differentiation genes in a functional hermaphrodite scallop, *Nodipecten subnodosus*. Mar Genomics 37:161–175.

Garrett, J. E., D. Carroll. 1986. Tx1: a transposable element from *Xenopus laevis* with some unusual properties. Mol Cell Biol 6(3):933–941.

Ge, C., J. Ye, H. Zhang, Y. Zhang, W. Sun, Y. Sang, B. Capel, G. Qian. 2017. *Dmrt1* induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. Dev 144(12):2222–2233.

Gempe, T., M. Beye. 2010. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. Bioessays 33(1):52–60.

Ghiselli, F., L. Milani, P. L. Chang, D. Hedgecock, J. P. Davis, S. V. Nuzhdin, M. Passamonti. 2012. De novo assembly of the manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination. Mol Biol Evol 29(2):771–786.

Goldberg, M., M. Stucki, J. Falck, D. D'Amours, D. Rahman, D. Pappin, J. Bartek, S. P. Jackson. 2003. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. Nature 421(6926):952–956.

Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotech 29:644–652.

Graham, P. L., J. Kimble. 1993. The mog-1 gene is required for the switch from spermatogenesis to oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 133(4)919–931.

Graham, P. L., T. Schedl, J. Kimble. 1993. More mog genes that influence the switch from spermatogenesis to oogenesis in the hermaphrodite germline of *Caenorhabditis elegans*. Dev Genet 14(6):471–484.

Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, L. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, C. C. Mello. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* development timing. Cell 106(1):23–34.

Guo, X., D. Hedgecock, W. K. Hershberger, K. Cooper, S. K. Jr. Allen. 1998. Genetic determinants of protandric sex in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Evolution 52(2):394–402.

Guo, X., G. A. DeBrosse, S. K. Allen Jr. 1996. All-triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture 142:149–161.

Guo, X., S. K. Allen Jr. 1994a. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). Biol Bull 187(3):309–318.

Guo, X., S. K. Allen. 1994b. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). Genetics 138(4):1199–1206.

Guo, Y., Q. Li, S. Gao, X. Zhou, Y. He, X. Shang, H. Cheng, R. Zhou. 2004. Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of Dmrt5 of zebrafish. Biochem Biophys Res Commun 324(2):569–575.

Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. MacManes, et al. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat Protoc 8(8):1494–1512.

Hashizume, C., A. Moyori, A. Kobayashi, N. Yamakoshi, A. Endo, R. W. Wong. 2013. Nucleoporin Nup62 maintains centrosome homeostasis. Cell Cycle 12(24):3804–3816.

He, L., G. J. Hannon. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet 5(7):522–531.

He, Y., Z. Bao, H. Guo, Y. Zhang, L. Zhang, S. Wang, J. Hu, X. Hu. 2013. Molecular cloning and characterization of *SoxB2* gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Chinese J Oceanol Limnol 31(6):1216–1225.

Hediger, M., G. Burghardt, C. Siegenthaler, N. Buser, D. Hilfiker-kleiner, A. Dübendorfer, D. Bopp. 2004. Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex. Dev Genes Evol 214(1):29–42.

Hedrick, P. W., D. Hedgecock. 2010. Sex determination: Genetic models for oysters. J Hered 101(5):602–611.

Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biol 8(2):R19.

Herman, R. K. 2005. Introduction to sex determination. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook.

Hilfiker, A., H. Amrein, A. Dübendorfer, R. Schneiter, R. Nöthiger. 1995. The gene virilizer is required for female-specific splicing controlled by Sxl, the master gene for sexual development in *Drosophila*. Development 121(12):4017–4026.

Hilfiker, A., R. Nothiger. 1991. The temperature-sensitive mutation vir (virilizer) identifies a new gene involved in sex determination of *Drosophila*. Roux Arch Dev Biol 200(5):240–248.

Hodgkin, J. 1986. Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of tra-3 supressors and characterization of fem genes. Genetics 114(1):15–52.

Hollingsworth, N. M., L. Ponte, C. Halsey. 1995. MSH5, a novel Muts homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. Gene Dev 9(14):1728–1739.

Hoshijima, K., K. Inoue, I. Higuchi, H. Sakamoto, Y. Shimura. 1991. Control of doublesex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. Science 252(5007):833–836.

Hou, R., Z. Bao, S. Wang, H. Su, Y. Li, H. Du, J. Hu, S. Wang, X. Hu. 2011. Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. PLoS One 6(6):e21560.

Hsia, D. A., C. G. Tepper, M. R. Pochampalli, E. Y. Hsia, C. Izumiya, S. B. Huerta, M. E. Wright, H. W. Chen, H. J. Kung, Y. Izumiya. 2010. KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation. P Natl Acad Sci 107(21):9671–9676.

Huang, L. C., K. C. Clarkin, G. M. Wahl. 1996. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependet G1 arrest. P Natl Acad Sci USA 93(10):4827–4832.

Huang, X. D., M. Zhao, W. G. Liu, Y. Y. Guan, Y. Shi, Q. Wang, S. Z. Wu, M. X. He. 2013. Gigabase-scale transcriptome analysis on four species of pearl oysters. Mar Biotechnol 15(3):253–264.

Huang, X., S. Zhang, H. Qi, Z. Wang, H. W. Chen, J. Shao, J. Shen. 2015. JMJD5 interacts with p53 and negatively regulates p53 function in control of cell cycle and proliferation. Biochim Biophys Acta 1853:2286–2295.

Hutvágner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, P. D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 293(5531):834–838.

Huvet, A., E. Fleury, C. Corporeau, V. Quillien, J. Y. Daniel, G. Riviere, P. Boudry, C. Fabioux. 2012. In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor-B in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar Biotechnol 14(4):402–410.

Ibarra, A. M., 2006. Propuesta de investigación aplicada, CONVOCATORIA SEMARNAT 2006-01: Modelo biológico para alcanzar un balance entre la conservación y el aprovechamiento sustentable de los recursos marinos en reservas y parques naturales. Caso de estudio: almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Fondo S0010. Convocatoria S0010-2006-1. Solicitud 23397.

Ibarra, A. M., R. Ascencio-Michel, J. L. Ramírez, M. Manzano-Sarabia, C. Rodríguez-Jaramillo. 2017. Performance of diploid and triploid *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) grown in tropical versus temperate natural environmental conditions. J Shellfish Res 36(1):119–139.

Ibarra, A., C. Alfonsi, J. E. Pérez. 2011. Genética y biotecnologías para el mejoramiento del cultivo y la conservación del recurso *Nodipecten* spp. In: Maeda-Martinez A. N, C. Ceijo-Lodeiros. Biología y cultivo de los moluscos Pectinidos del genero Nodipecten. La Paz, México: Limusa – Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. pp.135–144.

Izawa, D., J. Pines. 2012. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. J Cell Biol 199(1):27–37.

Jänicke, R. U., M. L. Sprengart, M. R. Wati, A. G. Porter. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem 273(16):9357–9360.

Jeays-Ward, K., M. Dandonneau, A. Swain. 2004. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. Dev Biol 276(2):431–440.

Jiang, Y., E. S. Loker, S. I. Zhang. 2006. *In vivo* and *in vitro* knockdown of FREP2 gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. Dev Comp Immunol 30(10):855–866.

Jung, E. J., G. Liu, W. Zhou, X. Chen. 2006. Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway. Mol Cell Biol 26(6):2175–2186.

Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, M. Tanabe. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res 40:109–114.

Karin, M., A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat Immunol 3(3):221–227.

Kent, J., S. C. Wheatley, J. E. Andrews, A. H. Sinclair, P. Koopman. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. Development 122(9):2813–2822.

Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, R. H. Plasterk. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. Gene Dev 15(20):2654–2659.

Kimble, J., S. L. Crittenden. 2007. Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. Annu Rev Cell Dev Biol 23: 405– 433.

King, F. W., A. Wawrzynow, J. Höhfeld, M. Zylicz. 2001. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. EMBO J 20(22):6297–6305.

Kobayashi, T., H. Kajiura-Kobayashi, G. Guan, Y. Nagahama. 2008. Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev Dyn 237(1):297–306.

Kopp, A. 2012. Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. Trends Genet 28(4):175–184.

Krogh, A., B. Larsson, H. G. Von, E. L. Sonnhammer. 2011. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305(3):567–80.

Kuhn, S., V. Sievert, W. Traut. 2000. The sex-determining gene doublesex in the fly *Megaselia scalaris*: Conserved structure and sex-specific splicing. Genome 43(6):1011–1020.

Kukurba, K. R., S. B. Montgomery. 2015. RNA sequencing and analysis. Cold Spring Harb Protoc 2015(11):951–969.

Kuwabara, P. E., J. Kimble. 1995. A predicted membrane protein, TRA-2a, directs hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. Development 121:2995–3004.

Kuwabara, P. E., P. G. Okkema, J. Kimble. 1992. tra-2 encodes a membrane protein and may mediate cell communication in *Caenorhabditis elegans* sex determination pathway. Mol Biol Cell 3(4):461–473.

Kuznetsov, S. G., D. C. Haines, B. K. Martin, S. K. Sharan. 2009. Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. Cancer Res 69(3):863–872.

Kuznetsov, S., M. Pellegrini, K. Shuda, O. Fernandez-Capetillo, Y. Liu, B. K. Martin, S. Burkett, E. Southon, D. Pati, L. Tessarollo, S. C. West, P. J. Donovan, A. Nussenzweig, S. K. Sharan. 2007. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. J Cell Biol 176(5):581–592.

Lagesen, K., P. F. Hallin, E. A. Rodland, H. H. Staerfeldt, T. Rognes, D. W. Ussery. 2007. RNammer: consistent and rapid annotation of rRNA genes. Nucleic Acids Res 35(9):3100–3108.

Lamarche, B. J., N. I. Orazio, M. D. Weitzman. 2010. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. FEBS Lett 584(17):3682–3695.

Lee, D. H., Y. Pan, S. Kanner, P. Sung, J. A. Borowiec, D. Chowdhury. 2010. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. Nat Struct Mol Biol 17(3):365–372.

Lee, J. H., T. T. Paull. 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. Science 304(5667):93–96.

Lee, S. Y., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer, R. W. Carthew. 2004. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell 117(1):69–81.

Lehmann, A. R. 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. Biochimie 85(11):1101–1111.

Lescher, B., B. Haenig, A. Kispert. 1998. sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. Dev Dyn 213(4):440–451.

Leu, J. Y., P. R. Chua, G. S, Roeder. 1998. The meiosis-specific Hop2 protein of S. cerevisiae ensures synapsis between homologous chromosomes. Cell 94(3):375–386.

Li, L., J. Xiang, X. Liu, Y. Zhang, B. Dong, X. Zhang. 2005. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. Aquaculture 245:63–73.

Li, S., F. Li, R. Wen, J. Xiang. 2012. Identification and characterization of the sex-determiner transformer-2 homologue in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Sex Dev 6(5):267–278.

Li, W., R. Boswell, W. B. Wood. 2000. mag-1, a homolog of Drosophila mago nashi, regulates hermaphrodite germ-line sex determination in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 218(2):172–82.

Liang, S., D. Liu, X. Li, M. Wei, X. Yu, Q. Li, H. Ma, Z. Zhang, Z. Qin. 2019. SOX2 participates in spermatogenesis of Zhikong scallop Chlamys farreri. Sci Rep 9:76.

Lin, H., A. C. Spradling. 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. Development 124(12):2463–2476.

Lin, Z., H. Kong, M. Nei, H. Ma. 2006. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. P Natl Acad Sci USA 103(27):10328–10333.

Liu, X. L., Z. F. Zhang, M. Y. Shao, J. G. Liu, F. Muhammad. 2012. Sexually dimorphic expression of foxl2 during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates. Dev Genes Evol 222(5):279–286.

Liu, Y., J. Y. Masson, R. Shah, P. O'regan, S. C. West. 2004. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. Science 303(5655):243–246.

Liu, Y., M. Tarsounas, P. O'regan, S. C. West. 2007. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. J Biol Chem 282(3):1973–1979.

Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, A. Huvet, A. M. Ibarra. 2012. Identification of tubulin-α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Mar Genomics 6:33–44.

Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, C. Abreu-Goodger, A. Huvet, A. M. Ibarra. 2013. Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. PLoS One 8(9):e73176.

Locksley, R. M., N. Killeen, M. J. Lenardos. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104(4):487–501.

López-Flores, V. J. 2015. Evaluación del patrón de expresión y localización de células de expresión del gel p33-RINGO/Speedy durante la gametogénesis de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) diploide y triploide. Tesis (Maestría en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S México. 111pp

Lora-Vilchis, M. C., P. Saucedo, C. Rodríguez-Jaramillo, A. N. Maeda-Martínez. 2003. Histological characterization of the spawning process in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) induced by thermal shock and serotonin injection. Inver Rep Dev 44(2):79–88.

Lou, Z., C. C. Chini, K. Minter-Dykhouse, J. Chen. 2003. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. J Biol Chem 278(16):13599–13602.

Luo, J. L., H. Kamata, M. Karin. 2005. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death- a new approach to cancer therapy. J Clin Invest 115(10):2625–2632.

Machitani, M., F. Sakurai, K. Wakabayashi, K. Takayama, M. Tachibana H. Mizuguchi. 2017. Type I interferons impede short harpin RNA-mediated RNAi via inhibition of dicer-mediated processing to small interfering RNA. Mol Ther Nucleic Acids 17(6):173–182.

MacQueen, A. J., A. Hochwagen. 2011. Checkpoint mechanisms: the puppet masters of meiotic prophase. Trends Cell Biol 21(7):393–400.

Madl, J. E., R. K. Herman. 1979. Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 93(2):393–402.

Maldonado, A. R., A. M. Ibarra, J. L. Ramírez. 2003. Induction to tetraploidy in catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) Cienc Mar 29:229–238.

Maldonado-Amparo, R., A. M. Ibarra. 2002a. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure. J Shellfish Res 21(2):597–603.

Maldonado-Amparo, R., A. M. Ibarra. 2002b. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). J Shellfish Res 21:93–101.

Maldonado-Amparo, R., J. R. Ramírez, S. Ávila, A. M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallops (*Nodipecten subnodosus*); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies, when grown at a high food availability site. Aquaculture 235:185–205.

Malumbres, M., I. Pérez De Castro, M. I. Hernández, M. Jiménez, T. Corral, A. Pellicer. 2000. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). Mol Cell Biol 20(8):2915–2925.

Masson, J. Y., M. C. Tarsouna, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M. J. McIIwraith, F. E. Benson, S. C. West. 2001. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. Gene Dev 15(24):3296–3307.

Masu, Y., S. Ikeda, E. Okuda-Ashitaka, E. Sato, S. Ito. 1998. Expression of murine novel zinc finger proteins highly homologous to Drosophila ovo gene product in testis. FEBS Lett 421(3):224–228.

Matsumoto, T. 1997. A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34cdc2. Mol Cell Biol 17(2):742–750.

Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai, S. J. Elledge. 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. P Natl Acad Sci USA 97(19):10389–10394.

McAndrew, C. W., R. F. Gastwirt, D. J. Donoghue. 2009. The atypical CDK activator Spy1 regulates the intrinsic DNA damage response and is dependent upon p53 to inhibit apoptosis. Cell Cycle 8(1):66–75.

Mckeown, M., J. M. Belote, B. S. Baker. 1987. A molecular analysis of transformer, a gene in *Drosophila melanogaster* that controls female sexual differentiation. Cell 48(3):489–499.

Mehra, A., J. Gaudet, L. Heck, P. E. Kuwabara, A. M. Spence. 1999. Negative regulation of male development in *Caenorhabditis elegans* by a protein-protein interaction between TRA-2A and FEM-3. Gene Dev 13(11):1453–1463.

Meister, G., T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431(7006):343–349.

Mével-Ninio, M., R. Terracol, C. Salles, A. Vincent, F. Payre. 1995. *ovo*, a *Drosophila* gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with *shavenbaby*, a gene involved in embryo patterning. Mech Dev 49(1-2):83–95.

Mével-Ninio, M., R. Terracol, F. C. Kafatos. 1991. The ovo gene of *Drosophila* encodes a zinc finger protein required for female germ line development. EMBO J 10(8):2259–2266.

Meyer, B. J. 2005. X-Chromosome dosage compensation. WormBook 1–14.

Miller, S. W., D. C. Hayward, T. A. Bunch, D. J. Miller, E. E. Ball, V. J. Bardwell, D. Zarkower, D. L. Brower. 2003. A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. Evol Dev 5(3):251–258.

Mirzayans, R., D. Murray. 2008. Human genetic disorders associated with genome instability, premature aging cancer predisposition. The Open Cancer Journal 2:42–52.

Morais da Silva, S., A. Hacker, V. Harley, P. Goodfellow, A. Swain, R. Lovell-Badge. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet 14(1)62–68.

Morris, J. Z., C. Navarro, R. Lehmann. 2003. Identification and analysis of mutations in bob, Doa and eight new genes required for oocyte specification and development in *Drosophila melanogaster*. Genetics 164(4):1435–1446.

Nabetani, A., T. Koujin, C. Tsutsumi, T. Haraguchi, Y. Hiraoka. 2001. A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. Chromosoma 110(5):322–334.

Nagoshi, R. N., M. Mckeown, K. C. Burtis, J. M. Belote, B. C. Baker. 1988. The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in *D. melanogaster*. Cell 53(2):229–236.

Naimi, A., A. S. Martinez, M. L. Specq, A. Mrac, B. Diss, M. Mathieu, P. Sourdaine. 2009a. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 152(2):189–196.

Naimi, A., A. S. Martinez, M. L. Specq, B, Diss, M. Mathieu, P. Sourdaine. 2009b. Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 154(1):134–42.

Napoli, C., C. Lemieux, R. Jorgensen. 1990. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. The Plant Cell 2:279–289.

Narendra, U., L. Lingyang, B. Li, J. Wilken, M. A. Weiss. 2002. Sex-specific gene regulation. The doublesex DM motif is a bipartite DNA-binding domain. J Biol Chem 277(45)43463–43473.

Nigon V. 1951. Effects de la polyploidie chez un nematode libre. C.R. des Seances de l'Academie des Sciences Serie D. 1949b. 228:1161–1162.

Ohbayashi, F., M. G. Suzuki, K. Mita, K. Okano, T. Shimada, T. 2001. A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 128(1):145–158.

Okkema, P. G., J. Kimble. 1991. Molecular analysis of tra-2, a sex determining gene in *C. elegans*. EMBO J 10(1):171–176.

Oliveira, D. C., J. H. Werren, E. C. Verhulst, J. D. Giebel, A. Kamping, L. W. Beukeboom, L. van de Zande. 2009. Identification and characterization of the doublesex gene of Nasonia. Insect Mol Biol 18(3):315–324.

Oliver, B., N. Perrimon, A. P. Mahowald. 1987. The ovo locus is required for sex-specific germ line maintenance in *Drosophila*. Gene Dev 1(9):913–923.

Olson, E., C. J. Nievera, V. Klimovich, E. Fanning, X. Wu. 2006. RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. J Biol Chem 281(51):39517–39533.

Ottolenghi, C., M. Fellous, M. Barbieri, K. McElreavey. 2002. Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. Genomics 79(3):333–343.

Palacios, E., I. S. Racotta, E. Kraffe, Y. Marty, J. Moal, J. F. Samain. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. Aquaculture 250:270–282.

Palacios, E., I. S. Racotta, O. Arjona, Y. Marty, J. R. Le Coz, J. Moal, J. F. Samain. 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis 2. Lipid classes and sterols. Aquaculture 266:266–273.

Park, M. S. 1995. Expression of human RAD52 confers resistance to ionizing radiation in mammalian cells. J Biol Chem 270(26):15467–15470.

Park, M. S., D. L. Ludwig, E. Stigger, S. H. Lee. 1996. Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. J Biol Chem 271(31):18996–19000.

Passerini, V., E. Ozeri-Galai, M. S. de Pagter, N. Donnelly, S. Schmalbrock, W. P. Kloosterman, B. Kerem, Z. Storchová. 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. Nat Commun 7:10754.

Pauletto, M., A. Segarra, C. Montagnani, V. Quillien, N. Faury, J. Le Grand, P. Miner, B. Petton, Y. Labreuche, E. Fleury, C. Fabioux, L. Bargelloni, T. Renault, A. Huvet. 2017. Long dsRNA promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. J Exp Biol 220:3671–3685.

Pelttari, J., M. R. Hoja, L. Yuan, J. G. Liu, E. Brundell, et al. 2001 A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. Mol Cell Biol 21(16):5667–5677.

Peña, J. 2001. Taxonomía, morfología, distribución y abundancia de los pectínidos iberoamericanos. En: Maeda-Martínez AN (Ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Editorial Limusa. México. 1-25 pp.

Perry, K. J., I. Q. Henry. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusc, *Crepidula fornicata*. Genesis 53(2):237–244.

Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8(10):785–786.

Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet, T. P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett 26(6):509–515.

Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew, E. J. Sontheimer. 2004. A dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in drosophila. Cell 117(1):83–94.

Powell, D., S. Subramanian, S. Suwansa-Ard, M. Zhao, W. o'Connor, D. Raftos, A. Elizur. 2018. The genome of the oyster *Saccostrea* offers insight the enviromental resilence of bivalves. DNA Res 25(6):655–665.

Powell, S., D. Szklarczyk, K. Trachana, A. Roth, M. Kuhn, J. Muller, R. Arnold, T. Rattei, I. Letunic, T. Doerks, L. J. Jensen, C. von Mering, P. Bork. 2012. eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. Nucleic Acids Res 40:284–289.

Priess, J. R. 2005. Notch signaling in the *C. elegans* embryo. WormBook: The Online Review of *C. Elegans* Biology, 1–16.

Provost, P., R. A. Silverstein, D. Dishart, J. Walfridsson, I. Djupedal, B. Kniola, A. Wright, B. Samuelsson, O. Radmark, K. Ekwall. 2002. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. P Natl Acad Sci USA 99(26):16648–16653.

Punta, M., P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric., J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman, R. D. Finn. 2012 The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 40:290–301.

Racotta, I. S., E. Palacios, A. M. Ibarra, J. L. Ramírez, F. Arcos, O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. Mar Biol 153(3):1245–1256.

Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra. M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño, E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus.* Aquaculture 217:335–349.

Ramírez-Arce, J. L. 2009. Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) como alternativa para el cultivo en el parque nacional Bahía de Loreto, Golfo de California. Tesis (Maestría en Ciencias). Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz B.C.S. México. 94pp.

Rauen, M., M. A. Burtelow, V. M. Dufault, L. M. Karnitz. 2000. The human checkpoint protein hRad17 interacts with the PCNA-like proteins hRad1, hHus1, and hRad9. J Biol Chem 275(38):29767–29771.

Raymond, C. S., C. E. Shamu, M. M. Shen, K. J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin, D. Zarkower. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. Nature 391(6668):691–695.

Raymond, C. S., J. R. Kettlewell, B. Hirsch, V. J. Bardwell, D. Zarkower. 1999. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. Dev Biol 215(2):208–220.

Raymond, C. S., M. W. Murphy, M. G. O'Sullivan, V. J. Bardwell, D. Zarkower. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. Gene Dev 14(20):2587–2595.

Reinecke-Reyes, M. A. 1996. Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México. En: Castro-Aguirre C. E. (Ed.). Boletín Pesquero SEMARNAP/INP-CRIP-La Paz, B.C.S., México. 17–20 pp.

Renglin-Lindh, A., N. Schultz, N. Saleh-Gohari, T. Helleday. 2007. RAD5IC (RAD51L2) is involved in maintaining centrosome number in mitosis. Cytogenet Genome Res. 116(1-2)38–45.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26(1):139–140.

Robles, A. I., N. A. Bemmels, A. B. Foraker, C. C. Harris. 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. Cancer Res 61(18):6660–6664.

Rodrigue, A., Y. Coulombe, K. Jacquet, J. P. Gagné, C. Roques, S. Gobeil, G. Poirier, J. Y. Masson. 2013. The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. J Cell Sci 126:348–359.

Ruiz-Verdugo, C. A., S. K. Allen, A. M. Ibarra. 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). Aquaculture 201:19–33.

Ruiz-Verdugo, C., J. L. Ramírez, S. K. Allen, A. M. Ibarra. 2000. Triploid Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. Aquaculture 186:13–32.

Ryner, L. C., B. S. Baker. 1991. Regulation of doublesex pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. Gene Dev 5(11):2071–2085.

Sakahira, H., M. Enari, S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391(6662):96–99.

Salz, K. H., W. J. Erickson. 2010. Sex determination in *Drosophila*. Fly 4(1):60–70.

San-Segundo, P. A., G. S. Roeder. 1999. Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. Cell 97(3):313–324.

Santerre, C., P. Sourdaine, B. Adeline, A. S. Martinez. 2014. Cg-SoxE and Cg- β -catenin, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comp Biochem Physiol A 167:68–76.

Santerre, C., P. Sourdaine, N. Marc, C. Mingant, R. Robert, A. S. Martinez. 2013. Oyster sex determination is influenced by temperature - first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 165(1):61–69.

Sasai, N., N. Saitoh, H. Saitoh, M. Nakao. 2013. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. PLoS One 8(7):e68478.

Satterwhite, L. L., M. J. Lohka, K. L. Wilson, T. Y. Scherson, L. J. Cisek, J. L. Corden, T. D. Pollard. 1992. Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. J Cell Biol 118(3):595–605.

Scali, C., F. Catteruccia, Q. Li, I. Querrero. 2005. Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae* doublesex gene. J Exp Biol 208:3701–3709.

Schärer, O. D. 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes. Cold Spring Harb Perspect Biol 5(10): a012609.

Schauer, I. E., W. B. Wood. 1990. Early *C. elegans* embryos are transcriptionally active. Development 110(4):1303–1317.

Schedl, T., J. Kimble. 1988. Fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 119(1):43–61.

Schleiffer, A., M. Maier, G. Litos, F. Lampert, P. Hornung, K. Mechtler, S. Westermann. 2012. CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex. Nat Cell Biol 14(6):604–613.

Schnabel, C. A., L. Selleri, M. L. Cleary. 2003. Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. Genesis 37(3):123–130.

Sethi, N., M. C. Monteagudo, D. Koshland, E. Hogan, D. J. Burke. 1991. The CDC20 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, a β-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes. Mol Cell Biol 11(11):5592–5602.

Shen, M. M., J. Hodgkin. 1988. *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. Cell 54(7):1019–1031.

Sherman, D. C., M. Frommer. 1998. The Bactrocera tryoni homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene doublesex. Insect Mol Biol 7(4):355–366.

Shi, W., Z. Feng, J. Zhang, I. Gonzalez-Suarez, R. P. Vanderwaal, X. Wu, S. N. Powell, J. L. Roti-Roti, S. Gonzalo, J. Zhang. 2010. The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. Carcinogenesis 31(6):994–1002.

Shiloh, Y. 2003. ATM and related kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer 3(3):155–169.

Shinohara, A., H. Ogawa, T. Ogawa. 1992. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. Cell 69(3):457–470.

Shiraishi, E., H. Imazato, T. Yamamoto, H. Yokoi, S. Abe, T. Kitano. 2004. Identification of two teleost homologs of the *Drosophila* sex determination factor, transformer-2 in medaka (*Oryzias latipes*). Mech Dev 121(7-8):991–996.

Shoemaker, C., M. Ramsey, J. Queen, D. Crews. 2007. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. Dev Dyn 236(6):1055–1063.

Shukla, J. N., J. Nagaraju. 2010. Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of dsx, and are required for female sexual differentiation in two wild silkmoth species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae). Insect Biochem Mol Biol 40(9):672–682.

Sigova, A., N. Rhind, P. D. Zamore. 2004. A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. Gene Dev 18(19):2359–2367.

Silver, N., S. Best, J. Jiang, S. L. Thein. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol 7:33.

Simão, F. A., R. M. Waterhouse, P. Loannidis, E. V. Kriventseva, E. M. Zdobnov. 2015. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31(19):3210–3212.

Sivasubramaniam, S., X. Sun, Y. R. Pan, S. Wang, E. Y. Lee. 2008. Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1. Gene Dev 22(5):587–600.

Soneson, C., M. I. Love, M. D. Robinson. 2015. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. F1000Res 4:1521.

Staller, P., K. Peukert, A. Kiermaier, J. Seoane, J. Lukas, H. Karsunky, T. Möröy, J. Bartek, J. Massagué, F. Hänel, M. Eilers. 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. Nat Cell Biol 3(4):392–399.

Starostina, N. G., J. M. Lim, M. Schvarzstein, L. Wells, A. M. Spence, E. T. Kipreos. 2007. A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. Dev Cell 13(1):127–139.

Stingele, S., G. Stoehr, K. Peplowska, J. Cox, M. Mann, Z. Storchova. 2012. Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. Mol Syst Biol 8:608.

Stoilov, P., R. Daoud, O. Nayler, S. Stamm. 2004. Human tra2-beta1autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. Hum Mol Genet 13(5):509–524.

Sugasawa, K., J. M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers. 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. Mol Cell 2(2):223–232.

Tabara, H., E. Yigit, H. Siomi, C. C. Mello. 2002 The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. Cell 109(7):861–871.

Tabarini, C. L. 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquaculture 42(2):151–160.

Takata, M., M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson, S. Takeda. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. Mol Cell Biol 21(8):2858–2866.

Takayama, S., T. Sato, S. Krajewski, K. Kochel, S. Irie, J. A. Millan, J. C. Reed. 1995. Cloning and functional analysis of BAG1-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. Cell 80(2):279–284.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6. Mol Biol Evol 30(12):2725–2729.

Tang, D., V. J. Kidd. 1998. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. J Biol Chem 273(44):28549–28552.

Tatsumi, Y., R. Takano, M. S. Islam, T. Yokochi, M. Itami, Y. Nakamura, A. Nakagawara. 2015. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. Cell Death Dis 6e1607.

Teaniniuraitemoana, V., A. Huvet, P. Levy, C. Klopp, E. Lhuillier, N. Gaertner-Mazouni, Y. Gueguen, G. Le Moullac. 2014. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster

Pinctada margaritifera: identification of potential sex differentiation and sex determining genes. BMC Genomics 15:491.

Terova, G., S. Rimoldi, G. Bernardini, M. Saroglia. 2013. Inhibition of myostatin gene expression in skeletal muscle of fish by in vivo electrically mediated dsRNA and shRNAi delivery. Mol Biotechnol 54(2):673–684.

Trent, C., B. Purnell, S. Gavinski, J. Hageman, C. Chamberlin, W. B. Wood. 1991. Sex-specific transcriptional regulation of the *C. elegans* sex determining gene her- 1. Mech Dev 34(1):43–56.

Unezaki, S., M. Nishizawa, E. Okuda-Ashitaka, Y. Masu, M. Mukai, S. Kobayashi, K. Sawamoto, H. Okano, S. Ito. 2004. Characterization of the isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of Drosophila Ovo, as transcription factors. Gene 336(1):47–58.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40(15):e115.

Vainio, S., M. Heikkilä, A. Kispert, N. Chin, A. P. McMahon. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature 397(6718):405–409.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3(7) research0034.1–0034.11.

Walter, W., F. Sánchez-Cabo, M. Ricote. 2015. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis with functional analysis. Bioinformatics 31(17):2912–2914.

Wang, M., J. Yang, Z. Zhou, L. Qiu, L. Wang, H. Zhang, Y. Gao, X. Wang, L. Zhang, J. Zhao, L. Song. 2011. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Dev Comp Immunol 35(4):511–520.

Wang, S., R. Hou, Z. Bao, H. Du, Y. He, H. Su, Y. Zhang, X. Fu, W. Jiao, Y. Li, L. Zhang, S. Wang, X. Hu. 2013. Transcriptome sequencing of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and comparative transcriptomic analysis with Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). PLoS One 8(5):e63927.

Wang, Z., B. Fang, J. Chen, X. Zhang, Z. Luo, L. Huang, X. Chen, Y. Li. 2010. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (Ipomoea batatas). BMC Genomics 11:726.

Wangsa, D., I. Quintanilla, K. Torabi, M. Vila-Casadesús, A. Ercilla, G. Klus, Z. Yuce, C. Galofré, M. Cuatrecasas, J. J. Lozano, N. Agell, D. Cimini A. Castells, T. Ried, J. Camps. 2018. Near-tetraploid cancer cells show chromosome instability triggered by replication stress and exhibit enhanced invasiveness. FASEB J 32(7):3502–3517.

Warnes, G. R., B. Bolker, L. Bonebakker, R. Gentleman, W. H. A. Liaw, T. Lumley, M. Maechler, A. Magnusson, S. Moeller, M. Schwartz, B. Venables. 2016. gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 3.0.1

Warr, N., P. Siggers, D. Bogani, R. Brixey, L. Pastorelli, L. Yates, C. H. Dean, S. Wells, W Satoh, A. Shimono, A. Greenfield. 2009. Sfrp1 and Sfrp2 are required for normal male sexual development in mice. Dev Biol 326(2):273–284.

Watanabe, K. T. 1975. A new sex-transforming gene on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. Japan J Genetics 50(3):269–271.

Wegner, M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic Acids Res 27(6):1409–1420.

Wei, W., X. Qi, L. Wang, Y. Zhang, W. Hua, D. Li, H. Lv, X. Zhang. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. BMC Genomics 12:451.

Wickens, M., D. S. Bernstein, J. Kimble, R. Parker. 2002. A PUF family portrait: 3' UTR regulation as a way of life. Trends Genet 18(3):150–157.

Widowati, I., G. Dorange, M. Le Pennec, J. C. Cochard. 1995. Genital tract and oocytic pathway during spawning in *Pecten maximus* (Molluscs, Bivalvia). Inver Rep Dev 28(3):153–160.

Xie, D., C. Gore, J. Zhou, R. C. Pong, H. Zhang, L. Yu, R. L. Vessella, W. Min, J. T. Hsieh. 2009. DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis. P Natl Acad Sci USA 106(47):19878–19883.

Xie, F., P. Xiao, D. Chen, L. Xu, B. Zhang. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol Biol 80(1):75–84.

Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen, J. C. Carrington. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol 2(5):e104.

Yang, H., F. S. Zhang, X. Guo. 2000. Triploid and tetraploid Zhikong Scallop, Chlamys farreri Jones et preston, produced by inhibiting polar body I. Mar Biotechnol 2(5):466–475.

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 275(5303):1129–1132.

Yi, W., D. Zarkower. 1999. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. Development 126(5):873–81.

Yi, W., J. M. Ross, D. Zarkower. 2000. Mab-3 is a direct *tra-1* target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behavior. Development 127(20):4469–4480.

Young, M. D., M. J. Wakefield, G. K. Smyth, A. Oshlack. 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. Genome Biol 11(2):R14.

Yu, F. F., M. F. Wang, L. Zhou, J. F. Gui, X. Y. Yu. 2011. Molecular cloning and expression characterization of *dmrt2* in akoya pearl oysters, *Pinctada martensii*. J Shellfish Res 30(2):247–254.

Yun, B., K. Lee, R. Farkas, C. Hitte, L. Rabinow. 2000. The LAMMER protein kinase encoded by the Doa locus of *Drosophila* is required in both somatic and germline cells and is expressed as both nuclear and cytoplasmic isoforms throughout development. Genetics 156(2):749–761.

Yun, B., R. Farkas, K. Lee, L. Rabinow. 1994. The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in *Drosophila melanogaster*. Gene Dev 8(10):1160–1173.

Zhang, B., M. Gallegos, A. Puoti, E. Durkin, S. Fields, J. Kimble, M. P. Wickens. 1997. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. Nature 390(6659):477–484.

Zhang, E. F., G. F. Qiu. 2010. A novel Dmrt gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Dev Genes Evol 220(5-6):151–159.

Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, et al. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490(7418):49–54.

Zhang, H., R. Zhang, Y. Luo, A. D'Alessio, J. S. Pober, W. Min. 2004. AIP1/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation. J Biol Chem 279(43):44955–44965.

Zhang, N., F. Xu, X. Guo. 2014. Genomic analysis of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a Mollusc. G3 (Bethesda) 4:2207–2217.

Zhao, S., D. Chen, Q. Geng, Z. Wang. 2013. The highly conserved LAMMER/CLK2 protein kinases prevent germ cell overproliferation in *Drosophila*. Dev Biol 376(2):163–170.

Zhao, X., Q. Wang, Y. Jiao, R. Huang, Y. Deng, H. Wang, X. Du. 2012. Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of Pearl sac in Pearl Oyster *Pinctada martensii*. Mar Biotechnol 14(6)730–739.

Zhu, J., H. J. Tsai, M. R. Gordon, R. Li. 2018. Cellular stress associated with aneuploidy. Dev Cell 44(4):420–431.

Zimmerman, E. S., J. Chen, J. L. Andersen, O. Ardon, J. L. Dehart, J. Blackett, S. K. Choudhary, D. Camerini, P. Nghiem, V. Planelles. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. Mol Cell Biol 24(21):9286–9294.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, X. Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 90(3):405–413.

11. ANEXOS

Anexo I

SECUENCIAS EMPLEADAS EN EL RETO DE RNAi

Secuencia nucleotídica y proteína inferida. La secuencia codificante está representada por las letras minúsculas y la traducción en aminoácidos en letras mayúsculas. (A) gene *dmrt1*, el dominio DM está marcado en gris obscuro. (B) gene *p33ringo*, dominio SPY está marcado en gris (C) gene *gapdh (*Tomada de Fuente-Gómez (2016)). La región utilizada para la síntesis del dsRNA está marcada en azul.

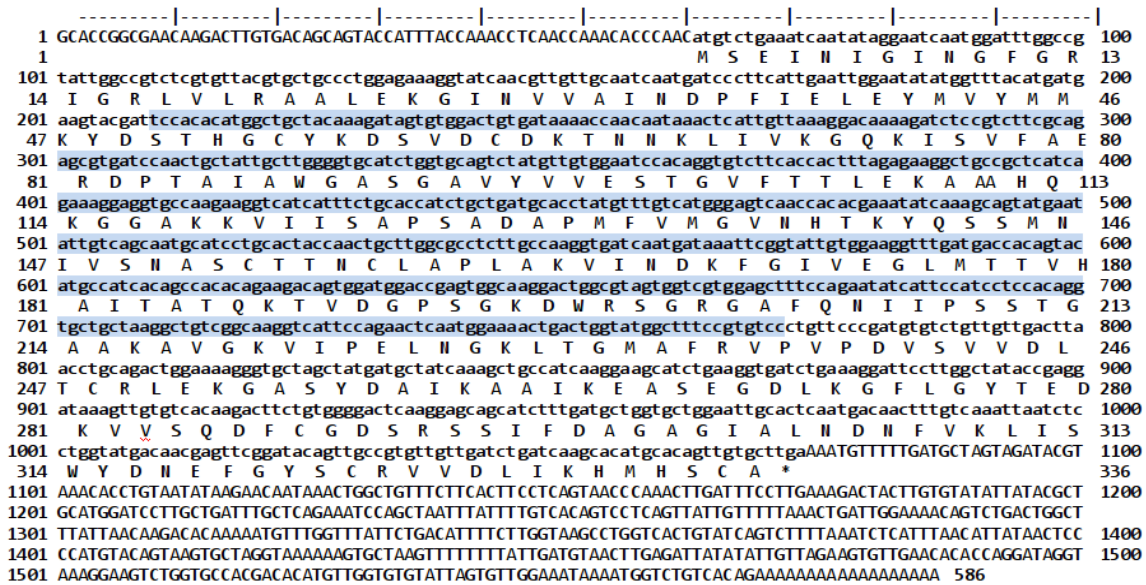
(A)

```
   ---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
   1 ATGGGTGGATCACAGAGTGCACCATCATCGGAAAAAAGCTAACTACATCCGAAAGCTGTTGGACCACCCATTCAATATTTACAGCCTatgtcctccaaga  100
   1                                                                                   M  S  S  K  K  5
 101 aggaatcgaagcatgcggtgggcttatccccactgcgctcccctaaatgctgtcgctgtcgaaaccatggaattattaccgtcttgaaggggcacaaacg  200
   6   E  S  K  H  A  V  G  L  S  P  L  R  S  P  KC  C  R  C  R  N  H  G  I  I  T  V  L  K  G  H  K  R  38
 201 attctgtcagtggaagaactgcacgtgcgaaaattgccttctacttatgaagcgccaacaaaattcaaaagaacagattgctctcaggcgcctctggaaa  300
  39  F  C  Q  W  K  N  C  T  C  E  N  C  L  LL  M  K  R  Q  Q  N  S  K  E  Q  I  A  L  R  R  L  W  K   71
 301 caggaggaagatatgggtcttgtggcgccaatacccgttaatacagattccttacaggtccttatccatcggtatccccactatgacgtggagaagttga  400
  72 Q  E  E  D  M  G  L  V  A  P  I  P  V  N  T  D  S  L  Q  V  L  I  H  R  Y  P  H  Y  D  V  E  K  L  S  105
 401 gcgtcattttaaagtcgtctgatggagacactcagaaggctatagaaaagatagacgccgccacgaacagagccctggacaacattacgactgaagccaa  500
 106   V  I  L  K  S  S  D  G  D  T  Q  K  A  I  E  K  I  D  A  A  T  N  R  A  L  D  N  I  T  T  E  A  K  138
 501 gtcggacctgacacctacgtgcgctggggacatgcgtgtatcgccaggaagtgttggcatggggtttattggatttcaaggttataactctggattccac  600
 139  S  D  L  T  P  T  C  A  G  D  M  R  V  S  P  G  S  V  G  M  G  F  I  G  F  Q  G  Y  N  S  G  F  H   171
 601 acccctctaccctcgccccacacgagcgtcaatccactctccccccgggccagtatgccgatgtaccccagggcgccctacatgtacccgtatagtcctc  700
 172 T  P  L  P  S  P  H  T  S  V  N  P  L  S  P  R  A  S  M  P  M  Y  P  R  A  P  Y  M  Y  P  Y  S  P  P  205
 701 cctcgcgattcttccccgccactcaacaggacataacatacagtggagatttccatggtccggtgtcccggtctggacagtctgctcaagacttcccgac  800
 206   S  R  F  F  P  A  T  Q  Q  D  I  T  Y  S  G  D  F  H  G  P  V  S  R  S  G  Q  S  A  Q  D  F  P  T  238
 801 atctcggaatgccttttattcggaatgtcaaagttcaatggaatccttaattggctatcccaaagcatcagaagtgggcgtgttccagcctcgcccctca  900
 239  S  R  N  A  F  Y  S  E  C  Q  S  S  M  E  S  L  I  G  Y  P  K  A  S  E  V  G  V  F  Q  P  R  P  S   271
 901 cctgccaactccgagacggagggaaacctagtcatagatatgaaggacgaggagggcgcatgcacagagggacttctcacaaactacacctctcagtgaC  1000
 272 P  A  N  S  E  T  E  G  N  L  V  I  D  M  K  D  E  E  G  A  C  T  E  G  L  L  T  N  Y  T  S  Q  *    303
1001 ATGATTATTAATCGTCTTAAAGACATTTAGGGACGATTGTACTGGCCACTTTGAAGATAAACACTAATTATTAATTTTGGTTAAGTAAGAACACAGCATA  1100
1101 ATGATACTATGTTTCAGTGCAATCTGCCAATATCCTTAAAGTGTGGCTATAGCATGTGACCACAGTGGGTAACTATAGCATGTGACCACAGTGGGTAACT  1200
1201 ATAGCATGTGACCACAGTGTGTAACTATAGCATGTGACCACAGTGTGTGACTATAGCATGTGACCACAGTGTGTGATTTCAGGATGTGACTAGTGTGACT  1300
1301 ATAGCATGTAACCATAGTGTGTGACTATAGCATGTGACCATATTGCACGACTATAGCATGTAACCATATTGCGTGACTATAGCATTTGACCATATTGTGA  1400
1401 CTACAGCATGTGACCACAGTGTGCGACTATGGCATGTCACCATAGTGTATGACTGTGGCCTGTGACCATATTGTGACTATAGCATGCAATTTTAGTGTGT  1500
1501 GACGATAGCATATGCCCATATTGTGTGGCTATAGCATGTGACTGAATTCTGTGATTATAGCATGCGACTAAAGTGTGACTATAGTGTGGGACTAAAGCAT  1600
1601 GTGACCAAAATGTGTGACTAAAACATGTGACCAAAATGTGTGACTAAAGCATGTGACTATAGTGTGACTATAGCATGCGACTAGAGTGTGTGACTATAGC  1700
1701 ATGCGACTATAGTGTGTGACAATAACATGCGATTGTAGTGTGTGACTGTAGCATGCGACCATAGTGTGTGACTACAGCATGCGACTTTAGTGTGTCTTGC  1800
1801 TGATAAATTTTCAAAAGTGTTTATTAAAACATTTTGATGTCATGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAA                                    1865
```

(B)

```
   ---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
   1 TGGAAGTTCGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGAGGCTTTTCTCGGGAACAGGGatgaaatgttctacaaacaggcctatgccaatatcg  100
   1                                                                   M  K  C  S  T  N  R  P  M  P  I  S   12
 101 gaagtaaaccagtcaacgcaacagtgtttcgttgtcaaagaaagggaaatgactgccttttttaaacttatgaatgatgagcatctgcaagatttccttt  200
  13 E  V  N  Q  S  T  Q  Q  C  F  V  V  K  E  R  E  M  T  A  F  F  K  L  M  N  D  E  H  L  Q  D  F  L  Y  46
 201 acatggacaagtgtaaaagaatttctgacaagtatctgattgccatggtgtttgccttttttaaaagagcacaattaaagattagagagtacaccaagat  300
  47   M  D  K  C  K  R  I  S  D  K  Y  L  I  A  M  V  F  A  F  F  K  R  A  Q  L  K  I  R  E  Y  T  K  M   79
 301 gaacttcttcattggtttatatttggcaaatgacatggaagaagatgacgaagaggctaaatatgaaatttttccatgggctcttggtcacaaatggaga  400
  80  NF  F  I  G  L  Y  L  A  N  D  M  E  E  D  D  E  E  A  K  Y  E  I  F  P  W  A  L  G  H  K  W  R   112
 401 gacagatttcccagattccttcgaagaagagacttgttctgggctaagatcggttacaaagctgttgtgagcaagcgatgctgtgaagagataatggaaa  500
 113 D  R  F  P  R  F  L  R  RR  D  L  F  W  A  K  I  G  Y  K  A  V  V  S  K  R  C  C  E  E  I  M  E  I  146
 501 tagacaaggaatctctattatggatgaggaatcgcccacttcatcatggtggagcggtaaggagttacaataaagaccctgatgacgatggaatcactag  600
 147   D  K  E  S  L  L  W  M  R  N  R  P  L  H  H  G  G  A  V  R  S  Y  N  K  D  P  D  DD  G  I  T  S  179
 601 tgaatccaagaatctgaagcgtcatcaaggtccttttcagactgcaacaaagctaacaatggcaatcaactcaccaggtatgttctatgcgactatcaaa  700
 180  E  S  K  N  L  K  R  H  Q  G  P  F  Q  T  A  T  K  L  T  M  A  I  N  S  P  G  M  F  Y  A  T  I  K   212
 701 ttctacctctccaaaaatactatacaaaattgtgaaaataaaatcttttttcttcagaaatgccccatgtactctgcgtggataccactgcttatatcata  800
 213 F  Y  L  S  K  N  T  I  Q  N  C  E  N  K  I  F  FF  R  N  A  P  C  T  L  R  G  Y  H  C  L  Y  H  M 246
 801 tgttataccgcgaatgtatacagaggtatttaaaccgttatattctttatcgtatgttataccgcgaacctatacagagatatttaaaccgttatattct  900
 247   L  Y  R  E  C  I  Q  R  Y  L  N  R  Y  I  L  Y  R  M  L  Y  R  E  P  I  Q  R  Y  L  N  R  Y  I  L  279
 901 atatcgtatgttataccgcgaacctatacagagatatttaaaccgttatattctatatagtatgttataccgcggacgtatacatagatattcaaatcgt  1000
 280  Y  R  M  L  Y  R  E  P  I  Q  R  Y  L  N  R  Y  I  L  Y  S  M  L  Y  R  G  R  I  H  R  Y  S  N  R   312
1001 tatattttatatcgtatcttttaccgcgaatatatagagagatacttaaaccgtttcctcatccgcattccatttaattgaCGTAAATAATCCAAGTTAA  1100
 313 Y  I  L  Y  R  I  F  Y  R  E  Y  I  E  R  Y  L  N  R  F  L  I  R  I  P  F  N  *                    338
1101 AAATTTTAGATAATAATGGACATTATAAATACACTAGTGCCAATAATTGCAGTTGAAACGGGAACTTTATCTAACTCGGTATGTTTCAAATTTGTATGTA  1200
1201 GTGAGAGGCCGGAAATTATGCAATTTGTAACTTTCTGTTTATGAGCTGATGATATATATATTCACCCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1288
```

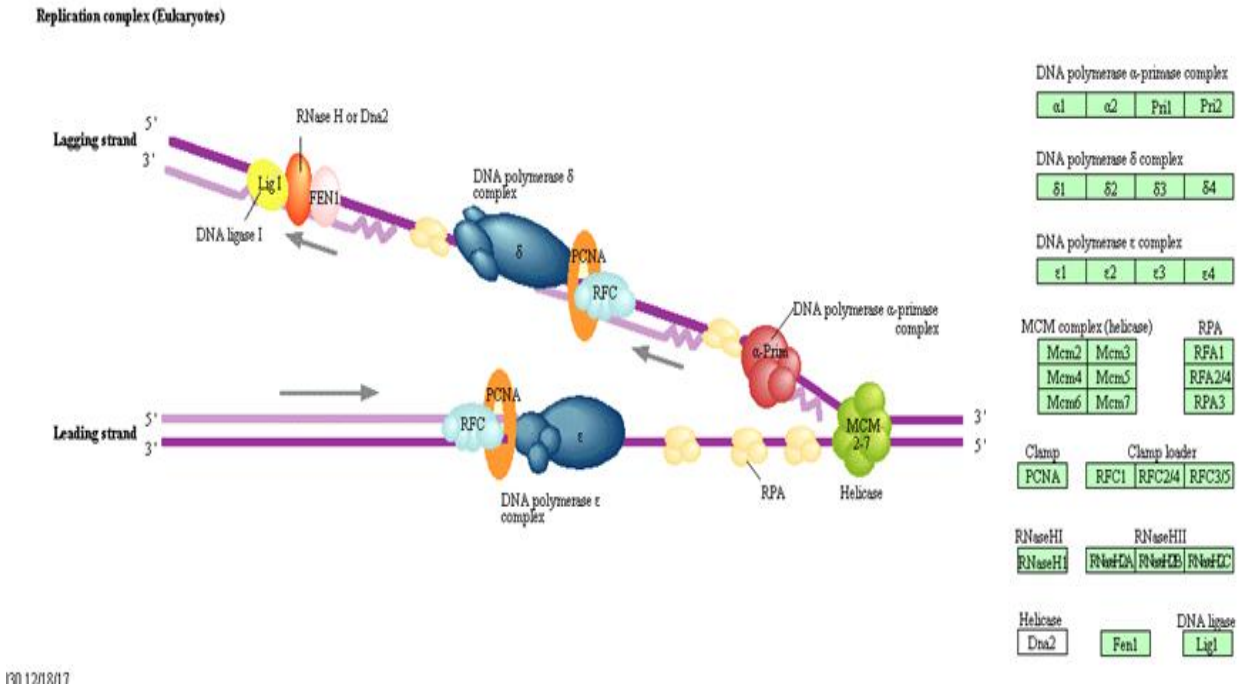
(C)


1 GCACCGGCGAACAAGACTTGTGACAGCAGTACCATTTACCAAACCTCAACCAAACACCCAACatgtctgaaatcaatataggaatcaatggatttggccg 100
1 M S E I N I G I N G F G R 13
101 tattggccgtctcgtgttacgtgctgccctggagaaaggtatcaacgttgttgcaatcaatgatcccttcattgaattggaatatatggtttacatgatg 200
14 I G R L V L R A A L E K G I N V V A I N D P F I E L E Y M V Y M M 46
201 aagtacgattccacacatggctgctacaaagatagtgtggactgtgataaaaccaacaataaactcattgttaaaggacaaaagatctccgtcttcgcag 300
47 K Y D S T H G C Y K D S V D C D K T N N K L I V K G Q K I S V F A E 80
301 agcgtgatccaactgctattgcttggggtgcatctggtgcagtctatgttgtggaatccacaggtgtcttcaccactttagagaaggctgccgctcatca 400
81 R D P T A I A W G A S G A V Y V V E S T G V F T T L E K A AA H Q 113
401 gaaaggaggtgccaagaaggtcatcatttctgcaccatctgctgatgcacctatgtttgtcatgggagtcaaccacacgaaatatcaaagcagtatgaat 500
114 K G G A K K V I I S A P S A D A P M F V M G V N H T K Y Q S S M N 146
501 attgtcagcaatgcatcctgcactaccaactgcttggcgcctcttgccaaggtgatcaatgataaattcggtattgtggaaggtttgatgaccacagtac 600
147 I V S N A S C T T N C L A P L A K V I N D K F G I V E G L M T T V H 180
601 atgccatcacagccacacagaagacagtggatggaccgagtggcaaggactggcgtagtggtcgtggagctttccagaatatcattccatcctccacagg 700
181 A I T A T Q K T V D G P S G K D W R S G R G A F Q N I I P S S T G 213
701 tgctgctaaggctgtcggcaaggtcattccagaactcaatggaaaactgactggtatggctttccgtgtccctgttcccgatgtgtctgttgttgactta 800
214 A A K A V G K V I P E L N G K L T G M A F R V P V P D V S V V D L 246
801 acctgcagactggaaaagggtgctagctatgatgctatcaaagctgccatcaaggaagcatctgaaggtgatctgaaaggattccttggctataccgagg 900
247 T C R L E K G A S Y D A I K A A I K E A S E G D L K G F L G Y T E D 280
901 ataaagttgtgtcacaagacttctgtggggactcaaggagcagcatctttgatgctggtgctggaattgcactcaatgacaactttgtcaaattaatctc 1000
281 K V V S Q D F C G D S R S S I F D A G A G I A L N D N F V K L I S 313
1001 ctggtatgacaacgagttcggatacagttgccgtgttgttgatctgatcaagcacatgcacagttgtgcttgaAAATGTTTTTGATGCTAGTAGATACGT 1100
314 W Y D N E F G Y S C R V V D L I K H M H S C A * 336
1101 AAACACCTGTAATATAAGAACAATAAACTGGCTGTTTCTTCACTTCCTCAGTAACCCAAACTTGATTTCCTTGAAAGACTACTTGTGTATATTATACGCT 1200
1201 GCATGGATCCTTGCTGATTTGCTCAGAAATCCAGCTAATTTATTTTGTCACAGTCCTCAGTTATTGTTTTTAAACTGATTGGAAAACAGTCTGACTGGCT
1301 TTATTAACAAGACACAAAAATGTTTGGTTTATTCTGACATTTTCTTGGTAAGCCTGGTCACTGTATCAGTCTTTTAAATCTCATTTAACATTATAACTCC 1400
1401 CCATGTACAGTAAGTGCTAGGTAAAAAAGTGCTAAGTTTTTTTTATTGATGTAACTTGAGATTATATATTGTTAGAAGTGTTGAACACACCAGGATAGGT 1500
1501 AAAGGAAGTCTGGTGCCACGACACATGTTGGTGTGTATTAGTGTTGGAAATAAAATGGTCTGTCACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAA 586

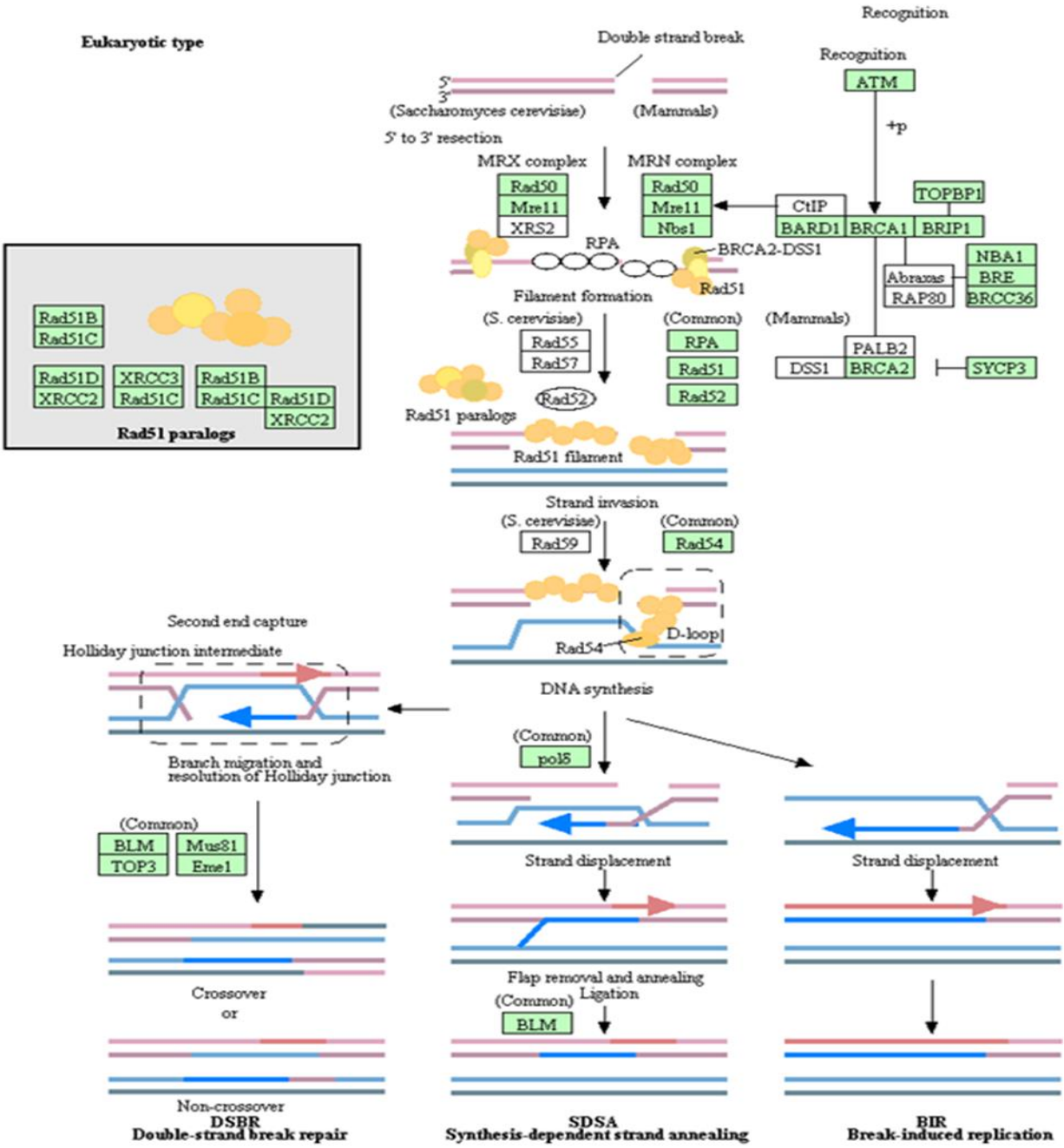
Anexo II

TRANSCRITOS INVOLUCRADOS EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y EN LA REPLICACIÓN DEL ADN

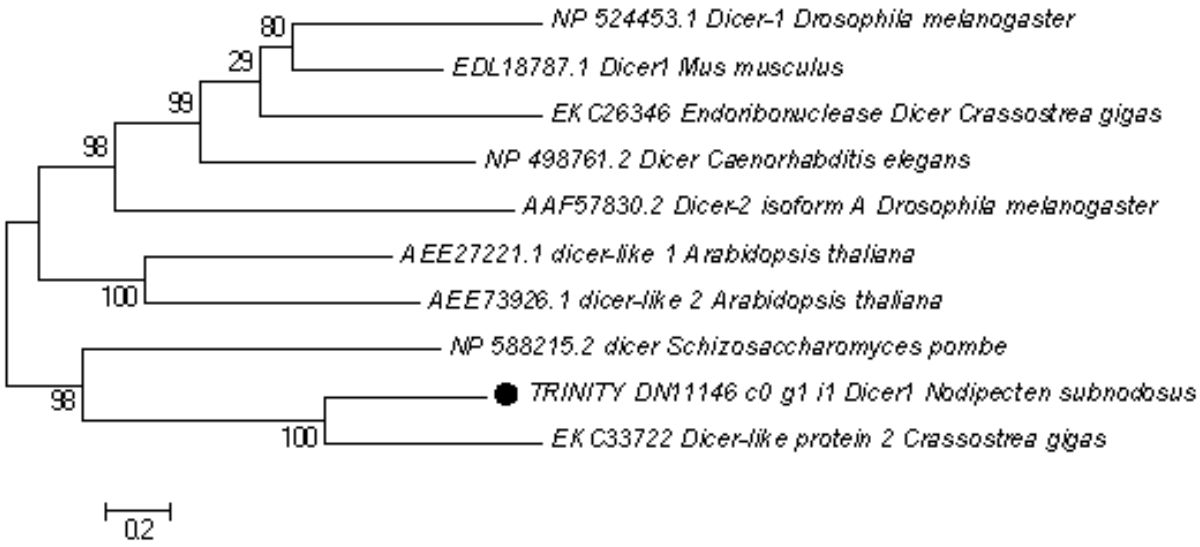
Replicación del ADN en *N. subnodosus*. Análisis de vías KEGG muestra genes ortólogos en *N. subnodosus* (verde) involucrados en la replicación del ADN. Cajas blancas muestran genes que no fueron encontrados en el transcriptoma de este molusco.



Recombinación homóloga en *N. subnodosus*. Análisis de vías KEGG muestra genes ortólogos en *N. subnodosus* (verde) involucrados en la recombinacion homóloga. Cajas blancas muestran genes que no fueron encontrados en el transcriptoma de este molusco



Anexo III

ÁRBOL FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS DICER-1

Proteinas Dicer 1. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de probabilidad máxima basada en el modelo en la matriz JTT. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (Maximum Likelihood). El análisis involucró 10 secuencias de aminoácidos. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6.