



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DEL GEN *Sex-lethal (Sxl)* EN CAMARÓN
BLANCO DEL PACÍFICO *Penaeus vannamei* (Boone,
1931).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

P r e s e n t a

Itzia López Cuadros

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 26 del Mes de Abril 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:

“Estudio del gen *Sex-lethal (Sxl)* en camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)”.

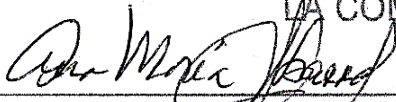
Presentada por el alumno:

Itzia López Cuadros

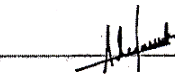
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

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. S. Alejandra García Gasca
Co-Director de Tesis



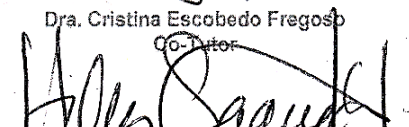
Dra. Gracia J. Gómez Anduro
Co-Tutor



Dra. Ethel A. García Latorre
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

Dra. Ana María Ibarra Humphries (CIBNOR, S.C.) Co-Directora
Dra. Silvia Alejandra García Gasca (CIAD-U. Mazatlán) Co-Directora
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (CIBNOR, S.C.) Cotutora
Dra. Cristina Escobedo Fregoso (CONACYT-CIBNOR, S.C.) Cotutora
Dra. Ethel Awilda García Latorre (ENCB-IPN) Cotutora

Comité revisor de tesis

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Ethel Awilda García Latorre

Jurado de exámen

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Ethel Awilda García Latorre


Suplentes

Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Ricardo Pérez Enriquez

Resumen

El camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* es la especie de camarón más cultivada en todo el mundo. Debido a que las hembras crecen más que los machos, el cultivo de "solo hembras" es de gran interés, por lo que el conocimiento sobre la determinación y diferenciación del sexo es necesario para producir solo hembras. En un esfuerzo por obtener información asociada a la reproducción en *P. vannamei*, se generaron datos transcriptómicos de gónadas femeninas y se identificaron secuencias parciales de transcritos con elevada similitud al gen *Sex-lethal (Sxl)* de *Drosophila melanogaster*, especie en la que se ha descrito a *Sxl* como el controlador maestro de la feminización, mostrando patrones de expresión diferenciales resultantes de corte y empalme alternativo sexo-específico. La expresión de este y otros genes (involucrados en la cadena génica de determinación sexual descrita en insectos) está relacionada con eventos críticos de diferenciación sexual larvaria y postlarvaria de algunos crustáceos, lo que sugiere su participación en este proceso. En el presente trabajo se planteó el objetivo de elucidar la posible función de *Sxl* a través de la caracterización de los transcritos, así como el análisis de expresión y de proteínas, durante el desarrollo embrionario, larvario, postlarvario y gonádico de ambos sexos en edad subadulta y adulta. La caracterización de *Sxl* en *P. vannamei* indicó que hay seis isoformas del transcrito *Sxl* en *P. vannamei* (*PvanSxl1-6*), a diferencia de otros peneidos en los que se han aislado sólo dos isoformas de este gen. Estas seis isoformas resultan de un empalme alternativo en tres sitios de empalme (SS1, SS2, SS3). SS1 y SS3 son exclusivos de *P. vannamei*, ya que no se han reportado en otras especies de artrópodos; SS2 es común entre los crustáceos, SS3 siempre es escindido junto con SS2. *Sxl* se expresa en la mayoría de los tejidos del camarón blanco, con mayor expresión en la gónada, el tallo ocular y el intestino de las hembras. Todas las isoformas (*PvanSxl 1-6*) se expresan durante la embriogénesis, el desarrollo larvario, en las postlarvas, y en la gametogénesis de ambos sexos, demostrando que *PvanSxl* no es específico para el sexo. Sin embargo, se observaron diferencias en la expresión y la traducción entre las diferentes isoformas durante el desarrollo y entre los sexos de *P. vannamei*. Estos resultados, junto con los resultados de expresión obtenidos en otros crustáceos en embriones, larvas, postlarvas y en diferentes tejidos, sugieren que *Sxl* desempeña un papel importante en la diferenciación sexual y la gametogénesis de peneidos.

Palabras clave: isoformas, corte-empalme alternativo, diferenciación sexual, embriogénesis y gametogénesis.



Vo.Bo. Dra. Ana M. Ibarra Humphries

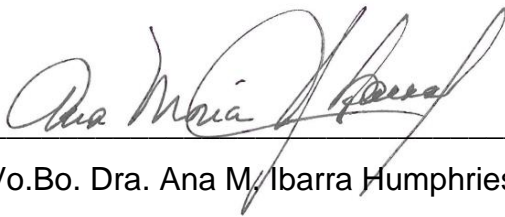


Vo.Bo. Dra. S. Alejandra García Gasca

Summary

The Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* is the most cultured shrimp species around the world. Because females grow larger than males, the culture of 'only females' is of great interest, but knowledge on sex determination and differentiation is required for producing only females. In an effort to obtain information associated with reproduction in *P. vannamei*, transcriptomic data from female gonads was generated, and partial sequences of a transcript were identified as *Sex-lethal (Sxl)* with high similarity to *Drosophila melanogaster Sxl*, for which it has been described as the master switch of feminization, showing differential expression patterns resulting from alternative sex-specific splicing. The expression of this and other genes (involved in the gene chain of sexual determination described in insects) is related to critical events of larval and post-larval sexual differentiation, suggesting their participation in this process. *Sxl* characterization in *P. vannamei* indicated six isoforms of the *Sxl* transcript (*PvanSxl1-6*), differently from other penaeids in which has been isolated two isoforms for this gene. These six isoforms result from alternative splicing at three splice sites (SS1, SS2, SS3). The first splice site is unique to *P. vannamei*, as it has not been reported for other Arthropod species; the second splice-site (SS2) is common among crustaceans, and the third splice-site (SS3) is also unique to *P. vannamei* and when spliced-out, it is always together with SS2. *Sxl* is expressed in most tissues of white shrimp, with greater expression in gonad, eye-stalk, and intestine of females. All isoforms (*PvanSxl 1-6*) are expressed during embryogenesis, larval development, post-larvae, and during gametogenesis in both genders, suggesting that *PvanSxl* is not sex-specific. However, differences in transcript and protein expression were observed between the isoforms at different stages of development and between genders. These results are in agreement with the expression results obtained in other crustaceans during embryonic, larval, post-larval development, as well as in different tissues, suggesting that in shrimp, *Sxl* plays an important role in sexual differentiation and gametogenesis.

Key words: isoforms, alternative-splicing, sexual-differentiation, embryogenesis, gametogenesis.



Vo.Bo. Dra. Ana M. Ibarra Humphries



Vo.Bo. Dra. S. Alejandra García Gasca

Dedicatoria

A mi familia

**Especialmente a los dos seres de luz que la vida y Dios me prestó,
que más amo y son mi motor día a día,
por y para mis niños:
Rodolfo y Lucio**

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado con el número de registro 414013, así como las Beca Mixta 2018 de Movilidad Nacional para la realización de estancia de investigación; al CIBNOR y al personal de la Dirección de Estudios de Posgrado, por recibirme como estudiante, por los apoyos económicos y por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

Al proyecto SAGARPA-CONACyT 126427 (2010-2012): “Aplicación de la genómica funcional como estrategia para la mejora continua de la industria del camarón-Módulo Reproducción”, y al proyecto CONACyT-CIENCIA BÁSICA 157584; que financiaron parcialmente este trabajo.

A mis Co-Directoras de tesis: Dra. Ana María Ibarra, por permitirme seguir formando parte de su grupo de trabajo, por su atención, sobre todo por su paciencia, tolerancia y comprensión durante estos años de trabajo a su lado, la respeto y admiro profundamente. A la Dra. Alejandra García, por aceptar la codirección, sus enseñanzas, por recibirme cálidamente en su laboratorio y por su apoyo durante mi estancia en Mazatlán, gracias por sus comentarios y por las pláticas amenas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Gracia Gómez, por sus atinados comentarios y sugerencias durante todo el proceso de este trabajo, gracias por esas conversaciones catárticas y de apoyo; a la Dra. Ethel García, por aceptar formar parte del comité, por recibirme para estancia en su laboratorio para la realización de análisis de proteínas y por su apoyo económico para el cambio de regreso a la Paz, aprendí mucho con usted y su equipo de trabajo; y a la Dra. Cristina Escobedo, por su amistad, sus preguntas y comentarios que ayudaron a mejorar y fortalecer este trabajo, por su apoyo en los muestreos. Gracias a las cinco por su apoyo y enseñanzas a nivel académico y personal, las admiro y respeto.

Las empresas: Maricultura (Sin.), Acuicultura Mahr (La Paz): Gustavo Pineda, Cristian Robles, Jesús, personal de maduración; Granmar (La Paz): Andrea, Noel, Samuel, Manuel, Raúl y Martín; y a los Doctores del Programa de Cátedras CONACyT: Eduardo Q., Alberto P., Liliana R.; por su apoyo en la obtención de muestras.

A los investigadores Dr. Ricardo Pérez y Dr. Pedro Cruz, los técnicos M. en C. Susana Ávila y M. en C. José Luis Ramírez, y compañeros del laboratorio de GENMAA: los ya Doctores Raúl, Rossy, Pavel y Claudia; y a los que están en proceso Adriana, Víctor y Janet; por su apoyo, sugerencias y comentarios en los muestreos, seminarios, reuniones y en el trabajo diario en el laboratorio. Al Dr. Raúl Llera, por su apoyo durante la estancia en Mazatlán, sus comentarios y aportaciones para el artículo, por las pláticas y las porras al final.

A mis amigas y compañeras de doctorado, Andressa, Lili, Ana y Paty, por su apoyo durante estos años en el doctorado, por compartir juntas alegrías, estrés, angustia, euforia, y todos los sentimientos que salen a flor de piel en este proceso, gracias por su ejemplo.

Al Laboratorio de Biología Molecular del CIAD Mazatlán, a la técnica responsable Rubí, y a las chicas del laboratorio Dra. Itzel, Dra. Julia y Patsy, por su apoyo y amistad durante la estancia. Al Laboratorio de Inmuno Química I de la ENCB IPN: Dra. Lilia, Dr. Jiménez, Pablo, David, Paty, Cindy, José Luis, Julio, Marco: A todos ustedes, gracias por su hospitalidad e interés por un tema tan diferente a lo que ustedes trabajan.

A mis suegros Armando y Bertha, y mi cuñada Olga; a mis tíos Beto y Cecy, Yu e hijos, gracias por abrirme las puertas de su casa para que comenzara este largo viaje y por apoyarme con los hijos; a Gloria, Paco e hijas, por su amistad y apoyo

para cuidar de mis hijos cuando se necesito; y a mis amigas Angie, Tatis y Myrna, por sus palabras, porras y fe en mi, nuestra amistad supera toda distancia.

A mi mamá y mi papá (qepd), gracias por qué siempre han estado presentes, aún en la distancia, su apoyo y sus palabras de aliento las llevo tatuadas en el alma y en el corazón. Los dos son mis mejores y mas grandes ejemplos, gracias por todo su apoyo y amor incondicional e infinito.

A Liz y Yuri; más que mis hermanas, amigas, cómplices, confidentes, etc., gracias por ser siempre un gran apoyo y por estar a mi lado mas alla de la distancia, por sus porras, ánimos y por todo lo que son y representan en mi vida.

Armando, te agradezco infinitamente el apoyo que me has brindado como amigo, compañero, pareja, esposo y padre de dos hermosos hijos; por todos los momentos divertidos, felices, tristes, de estrés y presión; con nuestros grandes aciertos y desaciertos, hemos prevalecido. Siempre has sabido decir las palabras correctas para no darme por vencida y seguir adelante, gracias por todo.

A mis valientes y fuertes hijos: Rodolfo y Lucio, gracias por su amor, paciencia, apoyo, besos y abrazos que me llenan de energía y razones para seguir dando lucha en todos los momentos, a pesar de su corta edad, me han enseñado mucho. Rodolfo, gracias por que supiste dar una sonrisa y un abrazo siempre a tiempo, por la gran madurez que me muestras y por estar tan al pediente junto a mi en la última etapa del doctorado.

Los tres me han dado la motivación necesaria para inciar, continuar, terminar este trabajo y salir adelante, los amo con todo mi corazón.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Mecanismos de determinación y diferenciación sexual.....	3
2.2 ¿Qué tipo de gen es <i>Sex-lethal</i> y cómo funciona?.....	6
2.3 <i>Sxl</i> en insectos no Drosofilidos.....	10
2.4 Genes de determinación y diferenciación sexual en invertebrados marinos.....	11
2.4.1 Genes de determinación y diferenciación sexual en <i>P. vannamei</i>	13
2.5 Diferenciación sexual en camarón blanco.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos particulares	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. Verificación de secuencias de transcritos <i>Sxl</i> sexo-específicas de camarón blanco <i>P. vannamei</i>	20
6.1.1. Material biológico.....	20
6.1.2. Aislamiento y verificación de variantes <i>Sxl</i>	20
6.1.3. Análisis filogenético.....	24
6.2. Evaluar la ubicuidad de <i>Sxl</i> en tejidos y/o órganos de ambos sexos de camarón blanco <i>P.vannamei</i>	26
6.2.1. Material biológico.....	26
6.2.2. Análisis de expresión entre sexos y tejidos.....	26
6.3. Identificar y cuantificar las diferencias de expresión de <i>Sxl</i> en el desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos del camarón blanco <i>P.vannamei</i>	27
6.3.1. Material biológico.....	27
6.3.2. Análisis de expresión <i>Sxl</i>	28
6.4. Identificar y cuantificar las diferentes proteínas de <i>Sxl</i> en el desarrollo	

ontogénico y entre ambos sexos del camarón blanco <i>P.vannamei</i>	29
6.4.1. Diseño y síntesis de anticuerpos.....	29
6.4.2. Extracción de proteínas totales.....	30
6.4.3. Detección y cuantificación de proteínas SXL.....	32
6.5. Cuantificación y análisis estadísticos.....	33
7. RESULTADOS	34
7.1. Verificación de secuencias de transcritos <i>Sxl</i> sexo-específicas de camarón blanco <i>P. vannamei</i>	34
7.2. Análisis filogenéticos.....	41
7.3. Análisis de expresión de <i>Sxl</i> entre tejidos y/o órganos de ambos sexos de camarón blanco <i>P. vannamei</i>	43
7.4. Análisis semicuantitativo de expresión de <i>Sxl</i> en el desarrollo ontogénico y gametogénico de hembras y machos de camarón blanco <i>P.</i> <i>vannamei</i>	43
7.5. Identificación de las variantes de <i>PvanSxl</i> traducidas a diferentes proteínas en camarón blanco	50
7.6. Comparación de análisis de abundancia entre transcritos y proteínas.....	57
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIONES	72
10. LITERATURA CITADA	73
11. ANEXOS	81

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Determinación sexual en especies de insectos modelo, con sus relaciones filogenéticas representadas ~300 millones de años de evolución.....	4
Figura 2. Esquema de regulación génica sexual somática en el nematodo hermafrodita <i>C. elegans</i>	6
Figura 3. Esquema de corte-y-empalme sexo específico temprano y tardío de <i>Sxl</i> en <i>Drosophila</i>	7
Figura 4. Expresión de <i>Sex-lethal</i> en diferentes etapas del desarrollo en hembras de <i>Drosophila</i>	8
Figura 5. Cascada de genes desencadenada por la actividad de <i>Sxl</i> en la diferenciación sexual en <i>D. melanogaster</i>	10
Figura 6. Esquema de variantes nucleotídicas y proteicas de <i>Sxl</i> aisladas en <i>P. vannamei</i>	14
Figura 7. Línea de tiempo de la diferenciación sexual de camarón blanco.....	16
Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida de seis variantes <i>Sxl</i> de <i>P. vannamei</i> en gónadas de ambos sexos y embriones.....	35
Figura 9. Secuencias nucleotídicas y de aminoácidos para los diferentes transcritos del gen <i>Sex-lethal</i> de <i>P. vannamei</i> (<i>PvanSxl</i>).....	37
Figura 10. Traducción conceptual y alineamiento de seis diferentes variantes <i>SXL</i> de <i>P. vannamei</i> presentes en gónada masculina, femenina y durante el desarrollo embrionario.....	40
Figura 11. Árbol filogenético de secuencias proteicas de <i>Sex-lethal</i>	42
Figura 12. Electroforesis de productos obtenidos con oligonucleótidos Ubicuidad_ <i>Sxl</i> y 18 S en los diferentes tejidos de hembras y machos adultos de camarón blanco	43
Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes <i>Sxl</i> durante la ontogenia de <i>P. vannamei</i>	44
Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes <i>Sxl</i> durante el desarrollo postlarvario de <i>P. vannamei</i>	44

Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes de <i>Sxl</i> en <i>P. vannamei</i> resultantes de tres cortes-y-empalmes diferentes en hembras, y machos.....	45
Figura 16. Medias del porcentaje relativo de expresión para cada isoforma <i>PvanSxl</i> dentro de los distintos estadios de desarrollo embrionario y larvario temprano.....	47
Figura 17. Medias del porcentaje relativo de expresión para cada isoforma <i>PvanSxl</i> en los distintos estadios de desarrollo postlarvario (PL) progresivo.....	48
Figura 18. Medias del porcentaje relativo de cada isoforma de <i>PvanSxl</i> expresada en gónadas de hembra y machos en distintos estadios de desarrollo gametogénico o edades.....	49
Figura 19. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot durante el desarrollo embrionario y larvario de <i>P. vannamei</i>	52
Figura 20. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot durante el desarrollo postlarvario de <i>P. vannamei</i>	52
Figura 21. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot en gónada de hembra y macho subadultos de <i>P. vannamei</i>	53
Figura 22. Detección de proteínas SXL por Western blot en gónada de hembra y macho adultos de <i>P. vannamei</i>	53
Figura 23. Porcentaje relativo de abundancia de cada proteína PvanSXL detectada por western blot en el desarrollo embrionario y larvario.....	54
Figura 24. Porcentaje relativo de abundancia de cada proteína PvanSXL detectada por western blot en desarrollo postlarvario.....	55
Figura 25. Comparación de medias del porcentaje relativo de cada isoforma de la proteína de PvanSXL detectada por Western blot en gónadas de hembras y machos (subadultos y adultos).	56
Figura 26. Comparación de abundancias de isoformas <i>Sxl</i> de <i>P. vannamei</i> : durante el desarrollo embrionario y larvario temprano.....	57
Figura 27. Comparación de abundancias de isoformas <i>Sxl</i> de <i>P. vannamei</i> durante el desarrollo postlarvario.....	58

Figura 28. Comparación de abundancias de isoformas Sxl de <i>P. vannamei</i> en gónada de hembra y macho en diferentes edades (Subadulto y adulto)	60
Figura 29. Comparación de estructura exón-intrón entre Sxl de <i>D. pulex</i> y <i>P. vannamei</i>	63

Lista de tablas

	Pàg.
Tabla I. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para verificación de inserción/delección en secuencias obtenidas a partir de hembra y embrión.....	21
Tabla II. Análisis de regiones con potencial antigénico y características para el diseño y síntesis de anticuerpos SXL.....	30
Tabla III. Tamaño esperado de transcritos Sxl de acuerdo al patrón de corte-y-empalme.....	35
Tabla IV. Características de transcritos <i>PvanSxl</i> con la respectiva proteína conceptual.....	39

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de *Penaeus vannamei* ha incrementado a nivel mundial en los últimos diez años (FAO, 2014). Gran parte del avance camaronícola ha sido por las investigaciones que han permitido el desarrollo de tecnologías que contribuyen al mejoramiento de la rentabilidad de los cultivos. En este sentido, las investigaciones que involucran mecanismos de determinación y diferenciación sexual son de alto interés por su potencial aplicación en el mejoramiento del cultivo. Lo anterior es debido a que *P. vannamei* presenta marcado dimorfismo sexual, en donde las hembras presentan mayor tasa de crecimiento en comparación con los machos. Así, el aislamiento y caracterización de genes expresados, específica y diferencialmente en machos y hembras de peneidos, particularmente camarón blanco, es un paso importante para la comprensión de los procesos de determinación y diferenciación sexual en especies de importancia económica. Lo anterior permitirá la aplicación de tecnologías enfocadas al incremento productivo a través de cultivos “monosexo”, al mejoramiento del desempeño reproductivo de la especie o a la formación de individuos estériles que dirijan la energía adquirida al crecimiento.

En este sentido, estudios dirigidos a la comprensión y análisis del sistema cromosómico de determinación sexual en crustáceos y particularmente en peneidos (Baranski *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2014; Staelens *et al.*, 2008; You *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006) sugieren que este corresponde al ZW/ZZ, donde las hembras son heterogaméticas (ZW) y los machos son homogaméticos (ZZ). El estudio más reciente (Yu *et al.*, 2017) mostró evidencias concluyentes al encontrar marcadores sexuales en hembra, indicando que en *P. vannamei* las hembras son heterogaméticas y los machos son homogaméticos.

El sistema de determinación y diferenciación sexual ha sido ampliamente estudiado y descrito en la especie modelo de estudio *Drosophila melanogaster*, en el que se describe al gen *Sex-lethal* (*Sxl*) como el gen controlador de la feminización, mediante la transcripción de variantes sexo-específicas. Sin

embargo, aunque en insectos no drosofilidos se conocen los sistemas cromosómicos de determinación sexual, aún no se conoce la ruta génica completa de diferenciación sexual, ni la función de variantes no sexo-específicas de *Sxl*.

Por otro lado, en diferentes crustáceos, se ha observado la presencia de genes que se encuentran involucrados en las cascadas génicas de diferenciación sexual ya descritas en insectos, por ejemplo: *Sxl* en *Daphnia pulex* (Colbourne *et al.*, 2011), *Penaeus monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2006), *Marsupenaeus japonicus* (Leelatanawit *et al.*, 2009), *Macrobrachium nipponense* (Zhang *et al.*, 2013a), *Eriocheir sinensis* (Shen *et al.*, 2014); *Tra* en *Daphnia magna* (Kato *et al.*, 2010); *Tra-2* en *Penaeus monodon* (Leelatanawit *et al.*, 2009), *Fenneropenaeus chinensis* (Li *et al.*, 2012), *Macrobrachium nipponense* (Zhang *et al.*, 2013b); *Dsx* en *Daphnia magna* (Kato *et al.*, 2011) y *Dmrt* (misma familia de *Dsx*) en *Eriocheir sinensis* (Zhang y Qiu, 2010). Recientemente se obtuvieron secuencias de transcritos *Sxl* (López-Cuadros, 2014) y *fem-1* (Galindo-Torres, 2014) en gónada femenina, masculina y embriones de *P. vannamei*. Es importante resaltar que la participación de *fem-1* ha sido descrita en la ruta génica de diferenciación sexual del nematodo hermafrodita funcional *Caenorhabditis elegans*, la cual es diferente a la descrita en *D. melanogaster* y otros insectos no drosofilidos como se verá más adelante.

Debido a que aún no se conoce la ruta génica de diferenciación sexual ni la función precisa de los genes aislados en el proceso de determinación y diferenciación sexual de crustáceos se planteó el objetivo principal de este estudio, el cual fue profundizar en el entendimiento de la expresión de las diferentes variantes del gen *Sxl*, como una aproximación a dilucidar la posible función de las mismas en el proceso de determinación y/o diferenciación sexual del camarón blanco *P. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos de determinación y diferenciación sexual

Los mecanismos de determinación sexual pueden variar ampliamente incluso entre especies filogenética y estrechamente relacionadas. Por ejemplo, los insectos corresponden al grupo taxonómico más estudiado en cuanto a sistemas de determinación y diferenciación sexual, en los que se ha observado una diversidad sorprendente de mecanismos (Gempe y Beye, 2011).

Así, se sabe que en insectos los sistemas de determinación sexual descritos incluyen: 1) dosis de cromosomas X, donde dos cromosomas X determinan feminización y un cromosoma X masculinización (Erickson y Quintero, 2007); 2) presencia de cromosoma Y que determina machos: XX son hembras y XY son machos (Dübendorfer *et al.*, 2002); 3) presencia de cromosoma W que determina feminización: ZW son hembras y ZZ machos; 4) en sistemas XY el número de cromosomas Y puede variar sustancialmente (Marin y Baker, 1998); 5) en otras especies las hembras son XX/XX y los machos son XX/Y (Sánchez, 2008); y 6) otras especies emplean determinadores de sexo sin diferencias visibles en los cromosomas (Kraemer y Shmidt, 1993).

Esta gran variedad a nivel cromosómico también ha dado lugar a una gran diversidad de genes de determinación sexual; así, en sistemas en donde la presencia del cromosoma Y determina masculinización, inactiva la expresión del gen *transformer (tra)* dando lugar al macho, y a su vez la activación o inactivación de *tra* da lugar a formas sexo específicas del gen *doublesex (dsx)*. Por otro lado, se sabe que en especies en las que el nivel de ploidía determina el sexo, los genes involucrados son *complementary sex determiner (csd)*, *feminizer (fem)* y *dsx*. Por otro lado, la dosis de cromosomas X en algunos insectos activa o no al gen *Sex-lethal (Sxl)* y este a su vez a *tra* y *dsx*.

En todos los casos anteriores, se ha observado que la activación de los genes cascada arriba da lugar a la variante del gen *doublesex (dsx)* sexo-específico de

hembras, mientras que la inactivación de los mismos da lugar a la variante del gen *dsx* sexo específica de machos (Fig. 1).

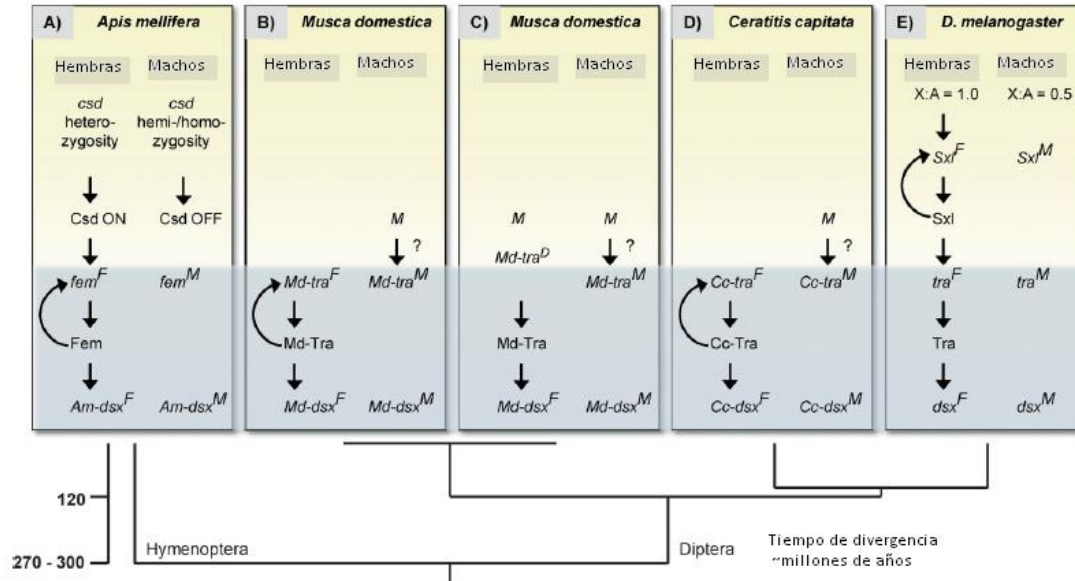


Figura 1. Determinación sexual en especies de insectos modelo, con sus relaciones filogenéticas representadas ~300 millones de años de evolución. Las especies presentadas comparten una ruta en común (en gris) compuesto por el gen *transformer* (*tra*) y su gen objetivo cascada abajo *doublesex* (*dsx*). Tomado y modificado de Gempe y Beye (2011).

Sin embargo, existen otros mecanismos cromosómicos y génicos de determinación y diferenciación sexual, dentro de los cuales se ha descrito el correspondiente al modelo de estudio hermafrodita funcional *Caenorhabditis elegans*, en el que este proceso inicia con una señal primaria constituida por genes sensibles a dosis cromosómica donde organismos con dos cromosomas X (XX) presentan características somáticas de hembra y hermafroditismo en la línea germinal, mientras que en organismos con un cromosoma X (X0) se presentan características de macho tanto en el soma como en la línea germinal (Hansen y Pilgrim, 1999; Hodgkin, 2002).

En *C. elegans* la expresión de genes ligados al cromosoma X, como *fox-1* y *sex-1*, reprimen transcripcional y post-transcripcionalmente al gen *xol-1*, por el contrario los genes ligados a autosomas, como *sea-1* (*autosomal signal elements*), promueven la actividad del gen *xol-1* (Carmi y Meyer, 1999; Nicolle *et al.*, 1997), el cual a su vez suprime al sistema de compensación de dosis y determinación sexual (SDC por sus siglas en inglés: *sex determination and dosage compensation*), el cual controla la determinación del sexo mediante la unión específica al promotor del gen *her-1* (*hermaphroditization*).

En machos, *her-1* inactiva a la proteína transmembranal TRA-2 (Kuwabara *et al.*, 1992; Kuwabara y Kimble, 1995; Okkema y Kimble, 1991), mientras que en hembras *her-1* es reprimido por genes *sdc* (Schauer y Wood, 1990; Trend *et al.*, 1991). La proteína TRA-2 inactiva a la proteína FEM-3 (*feminization of XX and XO animals*) (Hodgkin, 1986), la cual forma un complejo proteico con FEM-1 y FEM-2, por lo que cuando HER-1 se une al dominio extracelular de TRA-2, afecta la capacidad de unión intracelular de TRA-2, lo que impide que este inactive a las proteínas FEM.

Asimismo, las proteínas FEM (1, 2 y 3) inactivan a la proteína TRA-1 el cual es un factor de transcripción similar al de *D. melanogaster* y otros insectos (Koebernick y Pieler, 2002). Así, los genes activados y suprimidos por cromosomas X conducen a la feminización, y los genes activados y suprimidos por los cromosomas autosómicos conducen a la masculinización en *C. elegans* (Fig. 2).

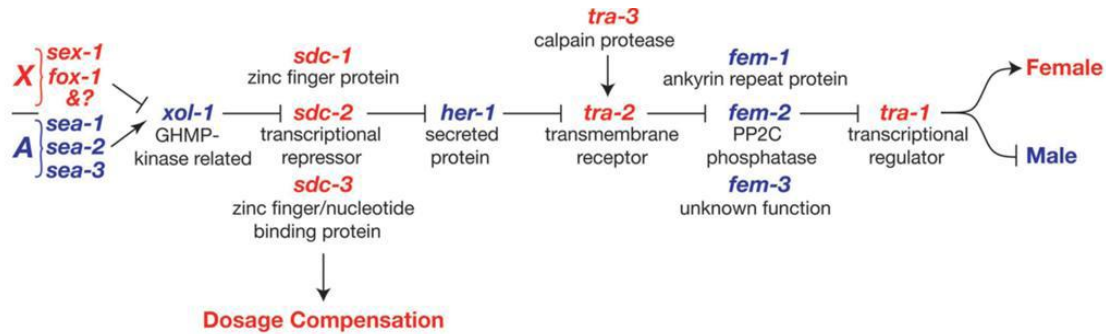


Figura 2. Esquema de regulación génica sexual somática en el nematodo hermafrodita *C. elegans*. Las proteínas se muestran en mayúsculas, los genes en minúsculas itálicas; las interacciones positivas con flecha “→” e interacciones negativas con “⊥”; los genes en azul promueven masculinización y en rojo la feminización. Tomado de Zarkower (2007).

2.2 ¿Qué tipo de gen/proteína es *Sex-lethal* y cómo funciona?

Durante años se ha estudiado profundamente el modelo de determinación y diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster*, en donde se ha observado que las células diploides con un cromosoma X (XY) son machos y aquellas con dos cromosomas XX son hembras. En esta especie, el número de cromosomas X y proteínas regulatorias actúan en conjunto para activar el gen *Sex-lethal* (*Sxl*), el cual funciona como controlador de la feminización durante el desarrollo embrionario (Cline, 1984).

La actividad de *Sxl* es controlada por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales que adaptan su función a escenarios específicos de desarrollo, mediante expresión sexo-específica de variantes resultantes de corte-y-empalme (splicing) alternativos (Cline *et al.*, 2010). Es decir, en animales XX, *Sxl* está encendido y su expresión dirige todos los aspectos del desarrollo femenino. Por otro lado, la expresión de *Sxl* también previene la activación del sistema de compensación de dosis específica en hembras, mientras que en animales XY, *Sxl* permanece apagado dando lugar a la masculinización y activa la compensación de dosis incrementando la transcripción del único cromosoma X (Salz y Erickson, 2010).

En *Drosophila* el gen *Sxl* codifica diferentes productos de transcripción (<http://flybase.org/reports/FBgn0264270.html>), que pueden ser divididos en tres grupos: tardío específico de hembras, tardío específico de machos, y temprano específico de hembras (Fig. 3). Los ARN mensajeros tardíos de macho y hembra se expresan por el promotor de “mantenimiento” (*SxlPm*), a partir de células blastodérmicas y hasta etapa adulta. Aunque ambos tienen la misma terminación hacia 5' (exón L1), difieren como resultado de corte-y-empalme alternativo que producen diferencias potenciales de codificación. Así en machos todos los transcritos incluyen el tercer exón, el cual contiene un codón de paro de la traducción y por ende codifica proteínas truncadas e inactivas. En hembras, el corte-y-empalme alternativo omite el exón 3 y genera ARNm que codifica proteínas funcionales (Salz y Erickson, 2010).

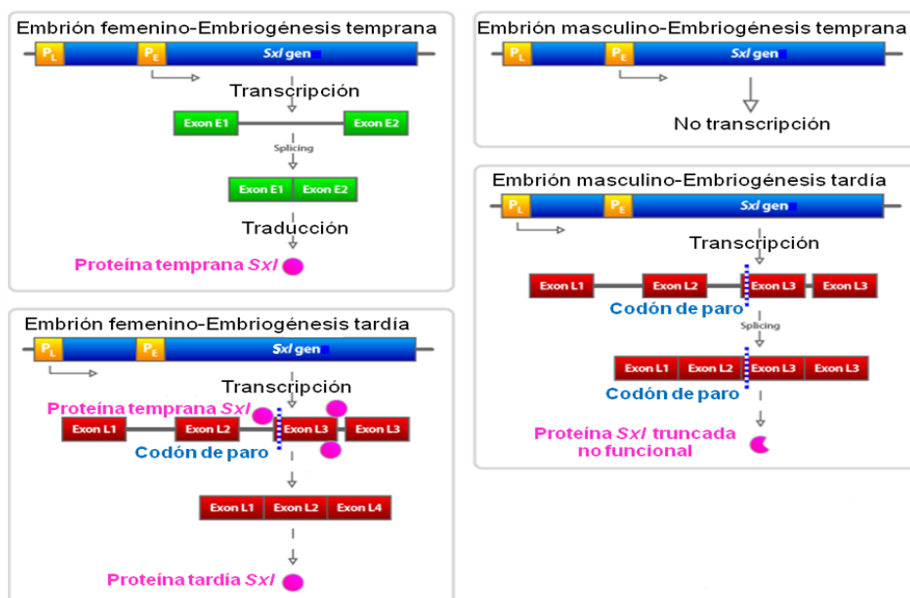


Figura 3. Esquema del corte-y-empalme sexo específico temprano y tardío de *Sxl* en *Drosophila*. La proteína *Sxl* temprana se une junto al exón 3, entonces bloquea el sitio de corte-y-empalme, esto causa la omisión del exón 3 en hembras. La proteína funcional tardía *Sxl* se retroalimenta y se produce otra proteína *Sxl* tardía a través del desarrollo femenino. Modificado de Lodish *et al.* (2002).

Por otro lado, el ARNm temprano específico de hembras se expresa transitoriamente en el blastodermo sincicial (estado del desarrollo embrionario en el que no existen membranas celulares entre los núcleos multiplicados) a partir de un segundo promotor: promotor de “establecimiento” (*SxlPe*), el cual es específico de hembras. Estos ARNs también difieren entre sí en la terminación 3' y tienen en común el exón E1 en la región 5' que se une directamente al exón 4 omitiendo los exones 2 y 3 (Fig. 4). Entonces el ARNm temprano codifica las mismas proteínas que los productos del ARNm específico de hembra tardío, con tan solo una diferencia de 25 aminoácidos en su extremo amino o N terminal (Salz y Erickson, 2010).

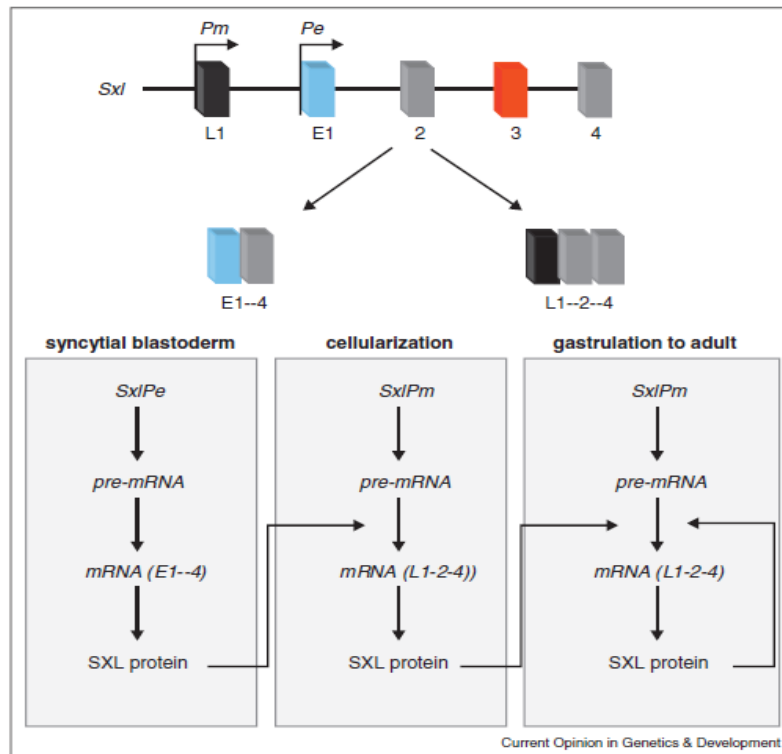


Figura 4. Expresión de *Sex-lethal* en diferentes etapas del desarrollo en hembras de *Drosophila*, Tomado de Salz (2011).

La actividad de *Sxl* y sus proteínas de unión al ARN específicas de hembras, dirigen el desarrollo de estructura y comportamiento sexo específico mediante la modulación de la expresión en cascada de un conjunto de genes (Fig. 5). Así las proteínas SXL activan a *tra*, que regula la mayoría de los caracteres y comportamientos de dimorfismo sexual; SXL reprime la actividad de *male-specific-lethal-2 (msl-2)*, un componente clave en el complejo de compensación de dosis macho-específico (Salz y Erickson, 2010).

La expresión de proteínas TRA de unión a ARN específicas de hembras controla el corte-y-empalme de los genes *doublesex (dsx)* y *fruitless (fru)* para producir factores de transcripción sexo específicos que controlan la mayoría de los aspectos de diferenciación sexual y comportamiento. A pesar de la ubicuidad de la expresión de proteínas SXL, la ejecución del programa *dsx/fru* está restringida a cierto tipo de células (ej. células somáticas) (Salz, 2011).

Lo descrito anteriormente describe la diferenciación sexual de células somáticas, sin embargo, la diferenciación sexual de células primordiales de la línea germinal, además de estar determinada por su constitución cromosómica, parece estar influenciada por la interacción de células germinales y somáticas (Van Doren, 2011). Por otro lado, Hashiyama *et al.* (2011), mostraron evidencia de que: 1) *Sxl* inicia el destino sexual de la línea germinal durante el desarrollo sexual temprano; 2) las células germinales tienen identidad sexual antes de ser influenciadas por señales sexo específicas de la gónada somática durante el desarrollo embrionario, algo recientemente descubierto al determinar que *Sxl* se expresa transitoriamente en las células germinales durante su migración a las gónadas; y finalmente 3) la sub-actividad de este gen (mediante ARN de interferencia) condujo a la formación de hembras adultas agaméticas y con tumores ya que *Sxl* tiene también alguna función en gónada y en la gametogénesis. De hecho, *Sxl* también ha sido implicado en la proliferación de células germinales, diferenciación y recombinación meiótica durante la ovogénesis temprana en *Drosophila* (Vied *et al.*, 2003; Vied y Horabin 2001).

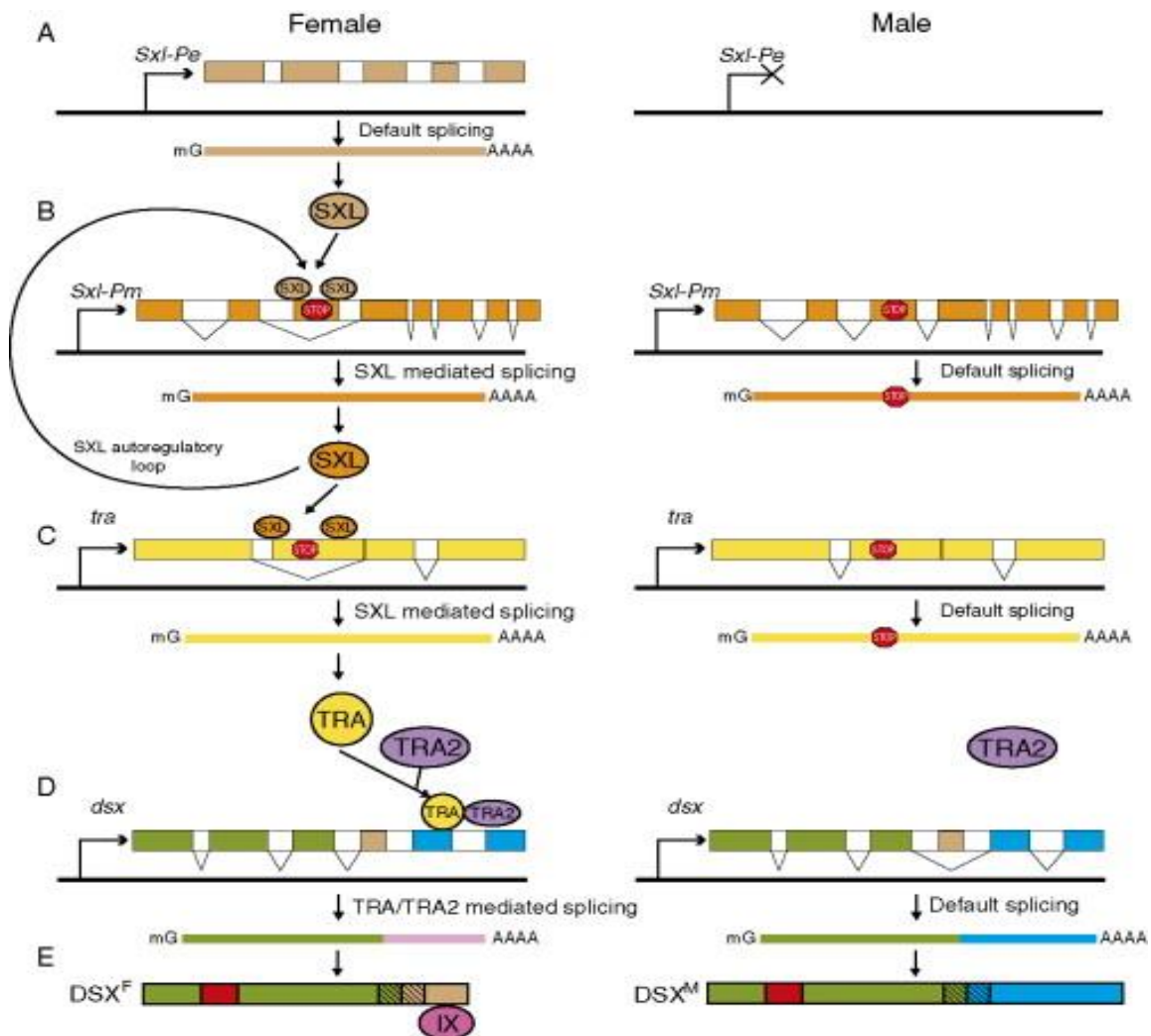


Figura 5. Cascada de genes que se desencadena por la actividad de *Sxl* en la diferenciación sexual en *D. melanogaster*. Tomado de Camara *et al.* (2008).

2.3 *Sxl* en insectos no Drosófilidos

En otras especies de insectos no Drosófilidos se han descrito transcritos *Sxl* que presentan patrones de corte-y-empalme que dan lugar a diferentes variantes proteicas con RRM conservados como en *Drosophila*. Sin embargo, éstos no tienen función clave discriminante en la determinación sexual y compensación de dosis que desempeña en *Drosophila* (Traut *et al.*, 2006), no son sexo-específicas,

es decir, el mismo transcrito *Sxl* codifica la proteína funcional SXL en ambos sexos. Por ejemplo, en diferentes especies del orden de los dípteros suborden Brachycera: *Crysomya ruffifacies* (Müller-Holtkamp, 1995), *Megaselia scalaris* (Sievert *et al.*, 2000) y *Musca domestica* (Meise *et al.*, 1998); tefrítidos como *Ceratitis capitata* (Saccone *et al.*, 1998) y *Bactrocera oleae* (Lagos *et al.*, 2005); en el suborden Nematocera: *Sciara ocellaris* (Ruiz *et al.*, 2003), *Sciara coprophila*, *Rynchosciara americana*, *Trichosia pubescens* (Serna *et al.*, 2004); y en el orden Lepidóptera: *Bombyx mori* (Niimi *et al.*, 2006), otros genes como *Tra* en *C. capitata* y el gen *F* en *M. domestica* desempeñan este papel (Sánchez, 2008).

2.4 Genes de determinación y diferenciación sexual en invertebrados marinos

A la fecha se conoce poco sobre la determinación sexual en crustáceos, sin embargo, dado que estos tienen estrecha relación evolutiva con insectos (Budd y Telford, 2009; Glenner *et al.*, 2006) es posible observar mecanismos de regulación sexual similares. En este sentido, en diversos crustáceos se han aislado y caracterizado secuencias nucleotídicas con similitud a genes involucrados en la cascada génica de determinación sexual descritos en *D. melanogaster*, por ejemplo:

- En *Daphnia magna* se observaron secuencias de *Tra* (Kato *et al.*, 2010), y de *Dsx* (Kato *et al.*, 2011)
- En *Daphnia pulex* se ha descrito que a nivel genómico *Sxl* está conformado por cinco exones que dan lugar a dos variantes que codifican secuencias de 297 y 263 aa (Colbourne *et al.*, 2011).
- En *Penaeus monodon* se encontraron secuencias parciales de *Sxl* en librerías EST de hemocitos (Tassanakajon *et al.*, 2006), y se aisló una secuencia de 2673 pb de *Tra-2* que codifica una secuencia de 267 aa (Leelatanawit *et al.*, 2009).

- En *Marsupenaeus japonicus* observaron secuencias parciales de *Sxl* en librerías EST (Aoki, datos no publicados).
- En *F. chinensis*, se aisló y caracterizó *Tra-2*, el cual consiste de siete exones y seis intrones, y se identificaron tres variantes resultantes de corte-y-empalme alternativo (Li *et al.*, 2012).
- En *Macrobrachium nipponense* se aislaron y caracterizaron dos variantes *Sxl* (1214 y 1138 pb) que codifican secuencias de 241 y 308 aa (Zhang *et al.*, 2013a), y un transcrito de *Tra-2* de 1724 pb que codifica una secuencia de 192 aa (Zhang *et al.*, 2013b).
- En *Eriocheir sinensis* se aisló y caracterizó el gen *Dmrt* (que pertenece a la misma familia de *Dsx*) (Zhang y Qiu, 2010); y se observaron dos variantes del gen *Sxl* resultantes de corte-y-empalme alternativo (Shen *et al.*, 2014).

Los análisis de expresión de estos genes mostraron patrones diferentes en distintas especies: *Tra-2* con mayor cantidad de transcrito en testículos y ovarios que en otros tejidos de *P. monodon* (Leelatanawit *et al.*, 2009); *Tra-2* con mayor nivel de expresión en ovario que en otros tejidos, así como incremento repentino de expresión en mysis de *F. chinensis* (Li *et al.*, 2012a); en *M. nipponense* los genes *Tra-2* y *Sxl* mostraron expresión más baja en ovario que en otros tejidos e incrementos significativos en gástrula, nauplio y post-larva 5 y 20 días (Zhang *et al.*, 2013a y b); y finalmente en *E. sinensis* se observó mayor expresión de *Sxl* en testículos y en larva zoea (Shen *et al.*, 2014).

La mayoría de estos genes en crustáceos muestran alta similitud y regiones de unión al ARN característicos de sus correspondientes en insectos, sin embargo, aún no se ha descrito la cascada génica de determinación sexual, ni se ha definido el papel que estos desempeñan en la de determinación sexual de crustáceos.

2.4.1 Genes de determinación y diferenciación sexual en *P. vannamei*.

En estudios recientes, se aislaron y caracterizaron cinco transcritos del gen *fem-1* (Galindo-Torres, 2014) y cinco transcritos *Sxl* aparentemente sexo-específicos (López-Cuadros, 2014) en camarón blanco *P. vannamei* con similitud a secuencias de otros invertebrados.

Las secuencias *Sxl* de *P. vannamei* aisladas a partir de tejido gonádico (masculino y femenino) y del desarrollo embrionario son el resultado de la inclusión o exclusión de tres regiones potenciales de corte-y-empalme alternativo: el primero corresponde a un fragmento de 50 pb, el segundo a un fragmento de 76 pb y el tercero, que incluye el segundo de 154 pb (Fig. 6).

La traducción conceptual de los transcritos tardíos da lugar a secuencias de aminoácidos de diferentes tamaños que tienen en común una RRM en la región N-terminal, mientras que hacia la región C-terminal las variantes de hembra se diferencian de las de macho por la presencia de otra RRM.

Se observó que la variante proteica presente en embrión y hembra tiene el marco de lectura más corto (188 aa) causado por la delección de una adenina en el sitio 612. Esta variante contiene únicamente a la RRM común en todas las variantes (Fig. 6), y sorprendentemente está constituida por los dos primeros exones observados en *Sxl* de *D. pulex*, por lo que es necesario realizar análisis posteriores con el fin de validar esta variante.

A pesar de que lo antes descrito puede sugerir la presencia de variantes sexo-específicas de *Sxl* en *P. vannamei*, no existe evidencia de que estas no estén presentes en el sexo opuesto y/o en los diferentes estadios de vida de *P. vannamei*, por lo que es necesario realizar análisis que permitan validar o refutar la sexo-especificidad del gen en esta especie.

Por otro lado, el análisis de localización de transcritos *Sxl* y *fem-1* mediante ISH mostró que *Sxl* está presente desde el inicio de la embriogénesis (ovocito sin fecundar hasta previo a la eclosión del nauplio, observando regiones de mayor

señal de hibridación en las regiones que potencialmente darán lugar a línea germinal y gónada en embriones de *P. vannamei* (Galindo-Torres, 2014; López-Cuadros, 2014).

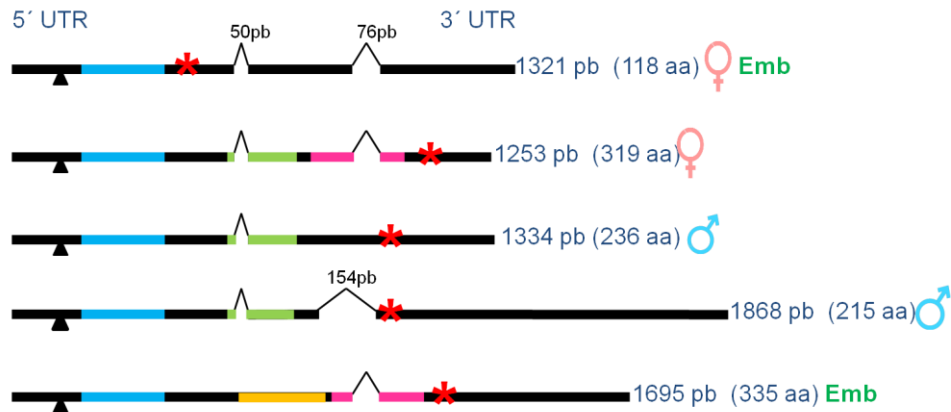


Figura 6. Esquema de variantes nucleotídicas y proteicas de *Sxl* aisladas en *P. vannamei*, con regiones no codificantes (UTR's) en dirección 5' y 3', el triángulo negro representa la señal de inicio de la traducción, * indica codón de paro de traducción, las líneas hacia arriba indican sitios posibles de corte-y-empalme: 50 pb, 76 pb y 154 pb; las barras de color representan las diferentes RRM: azul-RRM1, verde-RRM2, rosa- RRM3 y amarillo-RRM4. Tomado de López-Cuadros (2014).

Transcritos de *Sxl* también mostraron expresión en gónada femenina y masculina (López-Cuadros, 2014). Particularmente en el caso de *Sxl* se observaron cambios en la distribución de los transcritos dentro del ovocito durante la gametogénesis, siendo de mayor concentración en el núcleo al inicio, y de mayor concentración en citoplasma al final de la gametogénesis (López-Cuadros, 2014). Dado que *Sxl* desempeña un patrón de expresión complejo y dinámico subcelular durante la ovogénesis (Bopp *et al.*, 1993), es probable que el patrón de distribución y transporte de *Sxl* del núcleo al citoplasma en la línea germinal sea importante para la regulación de la ovogénesis (Hinson y Nagoshi, 2002).

La presencia de transcritos *Sxl* en ovocitos sin madurar, pre-maduros y en las primeras etapas del desarrollo embrionario, sugiere que la determinación sexual

de *P. vannamei* tiene un componente transferido por la madre como se ha observado para otros genes de origen materno como el gen *Vasa* en *D. magna* (Sagawa *et al.*, 2005), *Macrobrachium rosenbergii* (Nakkrasae y Damrongphol, 2007), *Pahryale hawaiianensis* (Extavour, 2005 y Özhan-Kizil *et al.*, 2009), *P. vannamei* (Aflalo *et al.*, 2007), *P. japonicus* (Sellars *et al.*, 2007) y *F. chinensis* (Feng *et al.*, 2011); el gen *tra* en *Ceratitidis capitata* (Pane *et al.*, 2002), *Bactrocera* (Lagos *et al.*, 2007) y *Anastrepha* (Ruíz *et al.*, 2007); y el gen *F* en *Musca domestica* (Dübendorfer y Hediger, 1998).

Interesantemente, Robinson y colaboradores en el 2014, observaron la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados fuertemente al sexo en un grupo de ligamiento (LG30) del camarón blanco *P. vannamei*, tres de ellos mapeados dentro de una distancia de 0.8 cM, y un SNP en particular se ubicó en un transcrito que comparte homología con el gen *feminization-1 (fem-1)*, regulador de la señal de transducción en el nematodo *C. elegans* antes mencionado. Transcritos de origen materno de *fem-1* han mostrado prevenir el silenciamiento epigenético de *fem-1*, éste potencialmente ayuda a proteger la identidad e integridad de la línea germinal (Johnson y Spence, 2011).

2.5 Diferenciación sexual en camarón blanco

En algunos crustáceos marinos la determinación sexual está controlada por factores ambientales como temperatura (copépodos), densidad y ayuno (cladóceros), o fotoperiodo (anfípodos) (Legrand *et al.*, 1987, Korpelainen, 1990). Sin embargo, en *P. vannamei* no es influenciada por factores ambientales (Campos-Ramos *et al.*, 2006) y aparentemente consiste en un sistema genético estable de determinación sexual.

El proceso de diferenciación sexual de *P. vannamei* comienza aproximadamente a partir de postlarva de 12 días (PL12), en donde ya se observa el lóbulo bilateral de la gónada y conductos sexuales en ambos sexos (oviductos o vasos deferentes);

en PL32 se pueden observar los primeros indicios de diferenciación sexual externa, posteriormente en PL44 se logra observar el petasma y apéndices masculinos, y para PL48, el tético está completamente formado en la hembra. Finalmente, entre PL55 y 72, los individuos machos y hembras están completamente diferenciados (Garza-Torres *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009) (Fig. 7).

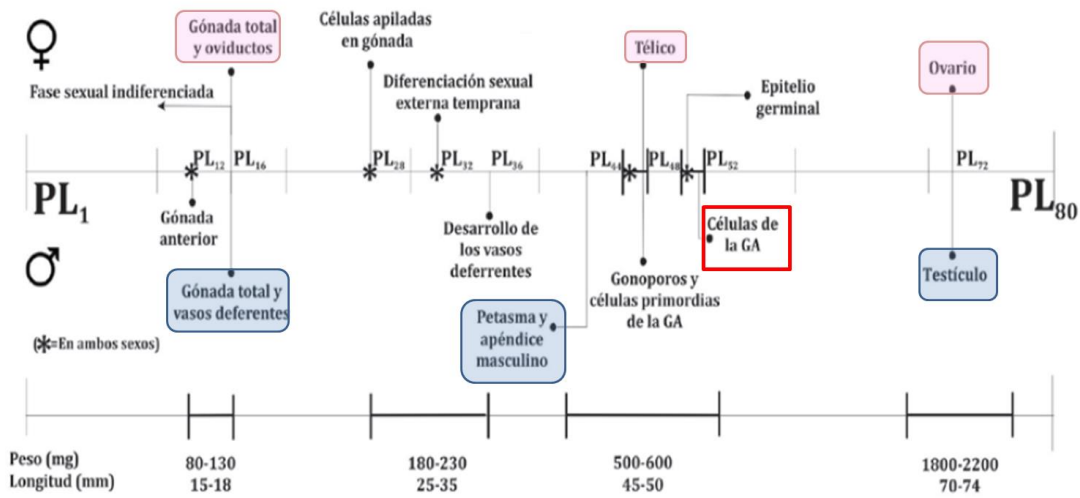


Figura 7. Línea de tiempo de la diferenciación sexual de camarón blanco. Modificado de Garza-Torres *et al.* (2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de *P. vannamei* por acuicultura ha tenido un gran empuje a nivel mundial en los últimos veinte años (FAO, 2014), superando al menos en un 40% a la producción por pesca en mar abierto y esteros (SAGARPA, 2012). Este incremento ha sido gracias a las investigaciones que han favorecido el desarrollo de tecnologías que contribuyen al mejoramiento de la rentabilidad de los cultivos. En este sentido, las investigaciones que involucran mecanismos de determinación y diferenciación sexual, son de alto interés por su potencial aplicación en el mejoramiento del cultivo. Lo anterior es debido a que *P. vannamei* presenta marcado dimorfismo sexual, en donde las hembras tienen mayor tasa de crecimiento en comparación con los machos.

Actualmente existen diversos trabajos dirigidos a crustáceos en los que se ha reportado la presencia y/o expresión de algunos genes previamente descritos como participantes en la cadena génica de diferenciación sexual de artrópodos, sin embargo, aun no se tiene conocimiento de los procesos génicos de determinación y diferenciación sexual en camarón blanco. El aislamiento y caracterización de *Sxl* y otros genes involucrados en la diferenciación sexual de peneidos, particularmente camarón blanco, representa el primer paso para la comprensión de estos procesos en esta y otras especies de importancia económica. Lo anterior permitirá la aplicación de tecnologías enfocadas al incremento productivo a través de cultivos “monosexo”.

Estudios previos dirigidos al silenciamiento de genes involucrados en la cascada génica sexual de insectos han mostrado resultados interesantes al lograr la inversión sexual por ejemplo de *Musca domestica* (Burghardt *et al.*, 2005), *Ceratitis capitata* (Salvemini *et al.*, 2009) y *Anastrepha* (Sarno *et al.*, 2010); o la alteración en el desarrollo de órganos reproductivos de *Tribolium castaneum* (Shukla y Palli, 2013) y en *Bombyx mori* (Suzuki *et al.*, 2012); la formación de individuos agaméticos y con tumoraciones gonádicas en *D. melanogaster* (Hasiyama *et al.*, 2011); individuos con menor desempeño reproductivo en

especies predatoras como *Metaselius occidentalis* (Pomerantz y Hoy, 2014); y finalmente la producción de neohembras en camarón de agua dulce con la posterior descendencia 100% masculina (Lezer *et al.*, 2014; Ventura *et al.*, 2009, Ventura y Sagi, 2012), siendo el macho de esta especie el que presenta mayor talla y peso que las hembras. Estos estudios sugieren que los genes en cuestión no solo participan en la diferenciación sexual, también están involucrados en el desarrollo adecuado de la gónada y en la gametogénesis.

El conocimiento antes generado abre la posibilidad de desarrollar tecnologías para inducir a la reversión sexual fenotípica y con ello poder realizar cultivos monosexo mediante cruza de organismos revertidos con organismos normales. Adicionalmente, abre oportunidades para utilizar el gen *Sxl* como candado reproductivo mediante la producción de hembras infértiles para la protección de organismos genéticamente mejorados o conservación de especies nativas.

Lo anterior nos llevó a plantear el objetivo principal de este estudio, el cual fue conocer si existen diferentes transcritos del gen *Sxl*, si algunos son sexo-específicos en diferentes etapas ontogenéticas durante el desarrollo embrionario, larvario, postlarvario, así como en tejido gonádico de hembras y machos de *P. vannamei*, así como el patrón de expresión de los mismos y conocer si todos los transcritos son traducidos a proteína en camarón blanco.

La realización de este trabajo contribuirá a sentar las bases sobre la expresión de *Sxl* durante los estadios del camarón blanco en donde se sabe que ocurren eventos de diferenciación y desarrollo sexual de la especie.

4. HIPÓTESIS

Si el gen *Sxl* está involucrado en los procesos de diferenciación sexual de *P. vannamei*, se observarán diferencias de expresión entre variantes, etapas de desarrollo y sexos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Elucidar la posible función del gen *Sex-lethal* (*Sxl*) en el proceso de determinación y diferenciación sexual de camarón blanco *P. vannamei*.

5.2 Objetivos particulares

1. Verificar las variantes de transcritos *Sxl* sexo-específicas de camarón blanco *P. vannamei*.
2. Evaluar la ubicuidad de *Sxl* en tejidos y/o órganos de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*.
3. Identificar y cuantificar las diferencias de expresión de *Sxl* en el desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*.
4. Identificar y cuantificar las diferentes isoformas de las proteínas *Sxl* en el desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Verificar variantes de transcritos *Sxl* sexo-específicas de camarón blanco *P. vannamei*

6.1.1 Material biológico

Se obtuvieron muestras de camarón blanco del laboratorio de producción comercial FITMAR, Sinaloa, de: 1) gónada de tres machos inmaduros y tres maduros, 2) gónada de hembra en pre-vitelogénesis, vitelogénesis primaria y vitelogénesis secundaria, según la clasificación de Tan Fermin y Pudadera (1989) y Yano (1988), y 3) del laboratorio comercial Acuacultura Mahr se obtuvieron muestras en diferentes etapas del desarrollo embrionario (desde primera división celular hasta antes de eclosión a nauplio).

Las muestras de tejido gonádico fueron preservadas en RNAlater (Ambion), manteniéndolas a 4° C por 24 horas, y almacenándolas a -20° C, mientras que las muestras de desarrollo embrionario fueron tomadas en Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (40% fenol, 24% guanidina de tiocinato) y almacenadas a -80 ° C hasta su utilización para extracción de ARN.

6.1.2 Aislamiento y verificación de variantes *Sxl*

El ARN de todas las muestras obtenidas se extrajo mediante el protocolo Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor, y se re-suspendieron en 20-30 µL de agua libre de nucleasas. La integridad, pureza y concentración del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE y mediante la relación 260/280 y 260/230 obtenidas a través de un espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop 1000).

Para eliminar residuos de ADN genómico, el ARN se trató con *DNAsa I* (RQ1 DNase, Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Una vez obtenido el ARN de calidad y cantidad requerida, se utilizaron de 2 µg de cada

organismo y se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el sistema de transcripción reversa *Improm II Reverse Transcription System* con oligo (dT) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Promega).

El ADNc obtenido fue empleado para evaluar la presencia de transcritos similares en ambos sexos y en embriones. Para ello se utilizaron oligonucleótidos diseñados en el programa en línea Primer3 (Rozen y Sakaletsky 2000) a partir de secuencias previamente obtenidas con similitud al gen *Sxl* de otros invertebrados incluyendo crustáceos marinos y dulceacuícolas. Los dos pares de oligonucleótidos diseñados (Tabla I) delimitan: la región donde se encuentra potencialmente una inserción/delección de adenina que en el trabajo realizado previamente (López-Cuadros, 2014) dio lugar a variantes específicas de hembra y embrión, y el primer sitio de corte-y-empalme alternativo de 50 pb.

Tabla I. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para verificación de inserción/delección en secuencias obtenidas a partir de hembra y embrión.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño esperado
Sxl612A-F	5'-ATTGAACAACCTCCCAGTGC-3'	212
Sxl612A-R	5'-GGACAATCTGGCCATATGAAG-3'	
Sxl612B-F	5'-GGAAACGCGAACAAACCTTA-3'	552
Sxl612B-R	5'-TTAACCACTAGGGGCTCAGTC-3'	

Previa estandarización se seleccionaron los oligonucleótidos Sxl612B F y R para la verificación de variantes pequeñas de hembra y embrión. Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en punto final bajo las siguientes condiciones, reacciones de 12.5 μ L con Buffer 1x, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.24 de cada oligonucleótido y 0.1 U/ μ L de GoTaq DNA Polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 4 min para desnaturalización inicial, 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C y 30 s a 72 °C cada uno, y 10 min a 72 °C para extensión final.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X (100 volts; 30 min), teñidos con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) y comparando el tamaño con el marcador de peso molecular Directload Wide Range DNA Marker (50 pb-10,000 pb) de SIGMA. Los productos fueron visualizados y fotodocumentados en un transiluminador con luz UV (BioDoc-It Imaging System, UVP BioImaging Systems). Posteriormente se procedió a obtener los dos fragmentos amplificados por PCR para cada muestra (con y sin sitio de corte-y-empalme- diferencia de 50 pb); para ello, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 1.5% teñidos con SYBR Gold para cortar las bandas correspondientes a cada producto de amplificación por muestra.

Las bandas independientes obtenidas se verificaron por electroforesis y se re-amplificaron con las mismas condiciones y concentraciones empleadas previamente, pero con sólo 20 ciclos con la finalidad de incrementar la concentración de los productos y maximizar la eficiencia de la posterior reacción de ligación.

Una vez verificada la presencia de bandas únicas de los productos de re-amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, los productos se ligaron empleando 2.5 µL de Buffer de ligación 2x, 0.5 µL de pGem-T Easy Vector (Promega), 1 µL de producto de PCR, 0.5 µL de Ligasa y 1 µL de agua para obtener un volumen final de 5.5 µL; esta reacción se dejó a 4°C toda la noche.

Los productos obtenidos de ligación fueron empleados para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* JM109 (Promega) de la siguiente forma: se colocaron 30 µL de bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se les agregaron 3 µL de reacción de ligación y se dejaron incubar 20 min en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico a 43 °C por 42 s y se pasaron inmediatamente a hielo incubando por 2 min, se agregaron 250 µL de medio SOC y se incubaron en agitación horizontal a 37 °C durante 1.5 hrs. Se prepararon placas con medio LB/ampicilina/XGal/IPTG y se incubaron a 37 °C, posteriormente para cada

fragmento transformado, se sembraron 50 μ L de cultivo bacteriano en una placa y el resto del cultivo en otra y se utilizó una placa como control negativo a la cual se le aplicó 50 μ L de medio SOC sin bacterias; se dejaron crecer durante 18 horas a 37 °C.

Se levantaron las clonas positivas (de color blanco) y se dejaron crecer por 18 horas en 3 mL de medio LB-Agar líquido con ampicilina; se extrajo el ADN plasmídico (ADNp) por método de lisis alcalina y se verificó la presencia del inserto de tamaño esperado mediante amplificación con oligonucleótidos M13 y electroforesis en gel de agarosa al 1% de 2 μ L de producto obtenido a partir de la reacción de PCR M13 del ADNp de cada clona. Las clonas que mostraron tener el inserto de tamaño esperado fueron enviadas a secuenciar a MacroGen Inc. (Corea del Sur); en total se enviaron a secuenciar 11 muestras diferentes.

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y editadas eliminando los fragmentos correspondientes al plásmido mediante el programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen>), para su posterior análisis de similitud por alineamientos locales por homología con secuencias *Sxl* depositadas en la base de datos del GenBank, empleando los programas BLASTn (nucleótido) y BLASTx (nucleótidos traducidos) (Altshul *et al.*, 1990), en el sitio del NCBI para este fin (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Una vez verificada la similitud de las secuencias obtenidas con *Sxl*, se determinó el sentido de las mismas mediante alineamientos hechos con el programa en línea MAFFT versión 7.0 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con las previamente caracterizadas (por RACE) en el programa MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2016) y MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988), para verificar los transcritos específicos de cada sexo y los embrionarios. Una vez obtenidos los transcritos definidos se realizó la traducción conceptual a aminoácidos en el sitio del Swiss Institute of Bioinformatics para este fin (<http://web.expasy.org/translate/>), identificando el marco de lectura abierto y el codón de paro de traducción.

Para evaluar las variantes de *Sxl* resultantes de corte-y-empalme se llevó a cabo amplificación por PCR con un par de oligonucleótidos que delimitan ambos sitios de corte-y-empalme: *Sxl*612B-F (Tabla I) y *Lvan*7723-R1 5'-TGTAGCGGTTGGCGGTTCCGG-3' empleando como ADNc molde el obtenido a partir de los diferentes estadios de desarrollo gonádico de hembras y machos, así como de desarrollo embrionario.

Se emplearon las siguientes condiciones de PCR: 0.5 de GoTaq buffer, 3.0 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTPs, 0.2 μM de cada oligonucleótido, 0.1 U *Taq* polimerasa GoTaq (Promega) en un volumen final de reacción de 11 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94° C por 5 min, 40 ciclos de 94° C por 30 s, 64.2° C durante 30 s y 72° C por 1.5 min, y 10 min de extensión final.

Los productos de amplificación fueron verificados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X como se mencionó antes. Una vez verificados, los productos de amplificación fueron separados por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 5% y 7.5 M de urea en una cámara de secuenciación (Thermo Scientific). Los productos de amplificación se prepararon con buffer de carga (formamida 98%, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.025% y xilencianol 0.025%) y se utilizó como marcador de peso molecular Directload Wide Range DNA Marker (50-10,000 pb); la electroforesis se llevó a cabo durante 3.5 h a 2000V, 70 W y 70 mA. Para visualizar los productos de amplificación se colocó una capa de agarosa al 1% sobre el gel de poliacrilamida para realizar la tinción con 0.1 x de SybrGold (Invitrogen). El gel se colocó en un escáner FM BIO III (Hitachi) donde se foto-documentó.

6.1.3 Análisis filogenéticos

Las secuencias de aminoácidos traducidas a partir de las seis isoformas de los transcritos *Sxl* aisladas a partir de camarón blanco *P. vannamei* y las previamente reportadas de otros artrópodos en la base de datos de GenBank del NCBI, fueron alineadas y comparadas mediante alineamientos múltiples mediante ClustalW en

el programa MEGA (Kumar *et al.*, 2016). Se identificó el mejor modelo de proteínas para construir un árbol de Máxima verosimilitud en el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) empleando el análisis de bootstrap con submuestreo de 1000 réplicas. Se construyó automáticamente un árbol inicial para realizar la búsqueda heurística aplicando los algoritmos de Neighbor-Joining y BioNJ en una matriz de distancias pareadas estimadas empleando el modelo JTT, y después seleccionando la topología con el mayor valor de verosimilitud (likelihood). Se empleó distribución Gamma como modelo evolutivo de tasa de diferencias entre sitios (categoría 1[+G, parámetro=0]). El análisis incluyó 28 secuencias de aminoácidos y un total de 551 posiciones en el conjunto de datos.

Las secuencias SXL proteicas empleadas en el análisis con su respectivo número de acceso GenBank son los siguientes: *D. melanogaster* sister-of-Sex-letal (ssx) isoforma D (número de acceso GenBank NP_569908.1), y dos isoformas Sxl (isoforma A: AAO41638.2, e isoforma 1: AAA28922.1), mosca de la fruta *D. subobscura* (Drsu) Sxl (AA67016.1), la mosca *Megaselia scalaris* (Mesc) Sxl (AJ245662.1), mosca de las ovejas australianas *Lucilia cuprina* (Lucu) Sxl1 (AAK20025.1) y Sxl2 (AAK20026.1), la mosca doméstica *Musca domestica* (Mudo) Sxl (AAB81985.1), la mosca de la fruta del olivo *Bactrocera oleae* (Baol) Sxl (CAG29242.1), la partera marrón *Nilaparvata lugens* (Nilu) Sxl (AGC79110.1), mosca del hongo *Rhynchosciara americana* (Rham) Sxl (AAS45604.1), mosca *Trichomegalosphys pubescens* (Trpu) Sxl (AAS45605.1), moscas del hongo *Bradysia coprophila* (Brco) Sxl (AAS45603.1), *Sciara (Bradysia) ocellaris* (Scoc) Sxl (AAO19468.1), camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* (Pvan) Sxl 1-6 (KY498656-KY498661) el cangrejo chino *E. sinensis* (Ersi) Sxl1 (AHA33391.1) y Sxl2 (AHA33390.1), camarón de aguadulce *M. nipponense* (Mani) Sxl1 (AGI44577.1) y Sxl2 (AGI44578.1), y *M. rosenbergii* (Maro) Sxl1 (APO14321.1), Sxl2 (APO14322.1) y Sxl3 (APO14323.1), pulga de aguadulce *D. pulex* (Dapu) Sxl-1 (EFX75394.1) y Sxl-2 (EFX75395.1), y *D. magna* (Dama) Sex-letal-1 (JAI85205.1) y Sex-letal-2 (JAL31183.1), gusano de la seda *Bombyx mori* (Bomo) Sxl-S (NP_001166854.1) y Sxl-L (NP_001036780.1), mariposa monarca *Danaus*

plexippus (Dapl) *Sxl* (EHJ79210.1), abeja de miel asiática *Apis cerana* (Apce) Proteína Sex-lethal 1 (AEY57088.1) y Sex-lethal 2 (AEY57089.1), hormiga saltadora de la India *Harpegnathos saltator* (Hasa) Proteína Sex-lethal (EFN79874.1), y hormiga carpintera de Florida *Camponotus floridanus* (Cafl) *Sxl*-like (EFN65860.1).

6.2 Evaluar la ubicuidad de *Sxl* en tejidos y/o órganos de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*

6.2.1 Material biológico

Para el análisis de expresión de *Sxl* entre sexos y los diferentes tejidos de camarón blanco se muestrearon reproductores: 20 machos adultos y 20 hembras adultas con pesos promedio de 26.6 ± 5.2 g y 41.8 ± 7.8 respectivamente, de los cuales se tomó muestra de tallo ocular, cerebro, branquia, corazón, hepatopáncreas, gónada (testículo u ovario), intestino y músculo. En el caso de machos se tomó por separado el vaso deferente y ámpula terminal. En paralelo, se identificó el estadio de muda mediante la observación del telson, y se preservó tejido gonadal en solución de Davidson (Bell y Lightner, 1988) por 24 h, los cuales se utilizaron para incluir en una mezcla de parafina/paraplast para identificar el estadio de madurez gonádico mediante análisis histológicos según la clasificación de Tan Fermin y Pudadera (1989) y Yano (1988). De ambos sexos se seleccionaron las muestras que se encontraron en estadio de intermuda y en hembras el mismo estadio de madurez gonádica (vitelogénesis secundaria con gránulos de vitelo).

6.2.2 Análisis de expresión entre sexos y tejidos

Para el análisis de expresión ente sexos y tejidos, la extracción de ARN y la síntesis de ADNc se realizaron como se menciona en el apartado 6.1.2, haciendo dos pools por tejido/órgano de cinco machos y cinco hembras respectivamente, lo cuales fueron seleccionadas previamente según su estadio de muda y madurez

gonádica. Se amplificó por PCR con los oligonucleótidos Ubicuidad-sxl-F 5' - CGTGGCGTTGGATTTGTGAG - 3', y Ubicuidad-sxl-R 5' - TGCTGAGGCCAGCATGGTAA - 3' que amplifican una región de 172 pb común entre las seis variantes *Sxl*. Como gen de referencia se empleó el gen ribosomal 18S utilizando los oligonucleótidos 18s-F 5'- AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA-3' y 18s-R 5'- ATGCTTTCGCAGTAGGTCTGT-3'

Para ambos oligonucleótidos se emplearon las siguientes condiciones de PCR: 1x de GoTaq buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 0.1 U *Taq* polimerasa GoTaq (Promega) en un volumen final de reacción de 11 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94° C por 5 min, 33 ciclos de 94° C por 30 s, 63° C durante 30 s y 72° C por 5 min. Los productos de amplificación se verificaron y fotodocumentaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X como se menciona anteriormente (sección 6.1.2).

6.3 Identificar y cuantificar las diferencias de expresión de *Sxl* en el desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*.

6.3.1 Material biológico

El material biológico se obtuvo en el laboratorio comercial Acuicultura Mahr y se preservó en RNAlater (Ambion), manteniéndolas a 4° C por 24 horas, y almacenándolas a -20° C hasta su utilización para extracción de ARN. Las muestras se obtuvieron como se describe a continuación:

Para el análisis de expresión de variantes de transcritos *Sxl* durante la ontogenia de camarón blanco, se obtuvieron 10 desoves individuales con base en los tiempos post-fertilización descritos para obtener embriones en las diferentes etapas del desarrollo embrionario (Biffis *et al.* 2009; Hertzler *et al.*, 2005; López-Cuadros, 2014; Pawlak *et al.*, 2010): huevo sin dividir, 2-células (1ª división

celular), 4-células (2^a división celular), mórula, formación del blastoporo, gástrula temprana (G2) y gástrula tardía (G3). Desarrollo larvario y post-larvario: se tomaron 10 muestras en cada uno de los siguientes estadios larvarios de camarón blanco: nauplio, mysis y de postlarvas a tiempos progresivos de hacerse bentónicas: de 1d, 5d, 10d (1.8 mg), 15d (2.4 mg), 20d (16.6 mg), 25d (21.1 mg), 30d (33.7 mg), 35d (55.2 mg), 40d (63.4 mg), 45d (58.9 mg), 50d (89.2 mg) y 55 días (127.75 mg) de cultivo.

Además, para analizar la expresión de variantes *SxI* durante el desarrollo gametogénico, se empleó el material biológico previamente descrito en el apartado 6.1, que consiste en tejido de gónada femenina en previtelogénesis, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria y en madurez, así como gónada de macho subadulto y macho adulto en madurez.

6.3.2 Análisis de expresión *SxI*

La extracción de ARN y la síntesis de ADNc se realizaron como se menciona en el apartado 6.1.2. El ADNc obtenido se empleó para el análisis de expresión por PCR semi-cuantitativo de *SxI* durante la ontogenia y desarrollo gametogénico, empleando los oligonucleótidos *SxI*612B-F (Tabla I) y *Lvan*7723-R1 5'-TG TAGCGGTTGGCGGTTCCGG-3') que amplifican las dos diferentes regiones que dan lugar a las seis variantes de *SxI* (630, 681, 704, 755, 784 y 835 pb). Las reacciones de PCR se desarrollaron por triplicado para cada estadio de desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos; bajo las siguientes condiciones de PCR: 1 x de GoTaq buffer, 3.0 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTPs, 0.2 μM de cada oligonucleótido, 0.1 U *Taq* polimerasa GoTaq (Promega) en un volumen final de reacción de 11 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94° C por 5 min, 40 ciclos de 94° C por 30 s, 64.2° C durante 30 s y 72° C por 1.5 min.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida como se menciona en la sección 5.1.2, empleando

cuatro marcadores de pesos moleculares: DNA Simplyload 20 pb extra range DNA ladder (Lonza), DNA quantladder (Lonza), Low DNA mass ladder (Invitrogen) y Directload Wide Range DNA Marker (50 pb - 10,000 pb. SIGMA).

Los geles fueron foto-documentados con el documentador Gel Doc™ XR (Bio-Rad) y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image Lab Versión 5.2.1 (Bio-Rad).

6.4 Identificar y cuantificar las diferentes proteínas SxI en el desarrollo ontogénico y gametogénico de ambos sexos de camarón blanco *P. vannamei*

6.4.1 Diseño y síntesis de anticuerpos

Para el diseño y síntesis de anticuerpos SXL específicos a partir de la secuencia consenso de aminoácidos, esta se envió a la empresa GenScript, donde se realizaron análisis para predicción de regiones con mayor antigenicidad, evitando las regiones variables que se muestran subrayadas y en negritas:

>SXL_consenso

MSFESSSSPSSALPDGETRTNLIINYLPQTLTDQEFYKIFVVVGPIKNCRIMKDLK**Q**
 TGYSFGFGFVEYQKPEDAAKAILQLNLPVQHKRIKVSYPARPPGEDIKETNLYIQNI
 PR**KETDSKETNLYIANVPR**SYTLDQLEELFSSYGQIVQKNLLKDKVTGLPRGVGF
 VRFDKKSQAEAAIVGMNGVVPEGG**I**EPLVVKVAEEHGMKAAYYAGYH**A**GLSTT
KGGGGVGRGRGN**Y**

Con base en los valores de antigenicidad, factibilidad de síntesis y disimilitud con el organismo hospedero, se seleccionaron las regiones antigénicas cuatro y cinco de la tabla II.

Tabla II. Análisis de regiones con potencial antigénico y características para el diseño y síntesis de anticuerpos SXL.

No.	Inicio	Determinante Antigénico	Tamaño	Antigenicidad/ Superficie/ Hidrofilicidad	Nivel de desorden	Síntesis	Mus_musculus Rattus_norvegicus Oryctolagus_cuniculus
1	6	<u>SSSPSSALPDGETRC</u>	14	2.85 / 0.86 / 0.44	0.1350	Hard	57% 57% 56%
2	221	<u>CSTTKGGGVGRGRG</u>	14	2.56 / 0.93 / 0.35	0.1722	Hard	64% 71% 57%
3	112	<u>CQNIPRKETDSKETN</u>	14	2.50 / 0.93 / 0.90	0.1547	Easy	56% 49% 49%
4	90	<u>CKRIKVSYARPPGED</u>	14	1.62 / 0.86 / 0.59	0.1365	Easy	70% 70% 70%
5	164	<u>CPRGVGFVRFDKKSQ</u>	14	1.39 / 0.57 / 0.41	NONE	Easy	64% 64% 64%
6	191	<u>CEGGTEPLVVKVAEE</u>	14	1.16 / 0.64 / 0.29	NONE	Easy	64% 70% 64%
7	45	<u>PIKNCRIMKDLKQTC</u>	14	1.12 / 0.57 / 0.42	NONE	Hard	56% 56% 56%

Nota: Se agrega una C para facilitar la conjugación del antígeno, residuos con carga positiva se muestran en azul y con carga negativa en rojo.

Las dos regiones seleccionadas SXL1-CKRIKVS~~Y~~ARPPGED; y SXL2-CPRGVGFV~~R~~FDKKSQ fueron empleadas para la inmunización de conejos y síntesis de anticuerpos SXL para su uso en la detección de proteínas SXL. Su posición en la secuencia de aminoácidos SXL se muestra subrayada en la secuencia a continuación.

>SXL-consenso

MSFESSSSPSSALPDGETRNLIIINYLPQTLTDQEFYKIFVVVGPIKNCRIMKDLKQ
 TGYSFGFGFVEYQKPEDAAKAILQLNNLPVQHKRIKVS~~Y~~ARPPGEDIKETNL~~Y~~IQNI
 PRKETDSKETNL~~Y~~IANVPRSYTL~~Q~~LEELFSSYGQIVQKNLLKDKVTGLPRGVGFV
RFDKKSQAEAAIVGMNGVVPEGGTEPLVVKVAEEHGKMKAAYYAGYHAGLSTTK
 GGGGVGRGRGN~~Y~~.

6.4.2 Extracción de proteínas totales

Material biológico

El material biológico fue obtenido por donación, el desarrollo embrionario y larvario se obtuvo en Laboratorio comercial GAM Larvas GranMar (San Juan de la Costa,

B.C.S.); y los subadultos y adultos en la empresa Camarón Sureño, San Juan de la Costa, B.C.S. Las muestras se obtuvieron como se describe a continuación.

Para el análisis de expresión de proteínas Sxl durante la ontogenia de camarón blanco se obtuvieron 5 desoves individuales con base en los tiempos post-fertilización descritos para obtener embriones en las diferentes etapas del desarrollo embrionario (Biffis *et al.*, 2009; Hertzler *et al.*, 2005; López-Cuadros, 2014; Pawlak *et al.*, 2010): huevo sin dividir, 2-células (1ª división celular), mórula, formación del blastoporo, gástrula temprana (G2) y gástrula tardía (G3). En el caso del desarrollo larvario y post-larvario se tomaron de 3 a 6 muestras en cada uno de los siguientes estadios larvarios de camarón blanco: nauplio, mysis, y postlarvas de 1d, 5d, 10d (0.9 mg), 15d (2.4 mg), 20d (16.6 mg), 25d (25 mg), 30d (55.7 mg), 35d (74.6 mg), 40d (123.4 mg), 45d (150.5 mg) y 50d (202.2 mg) de edad en cultivo. Las postlarvas fueron trasladadas al laboratorio húmedo de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola a partir de PL 10 para ser muestreadas en los días mencionados. Fueron mantenidas a 30°C y 35 ups en tanques de 1000 L, con aireación constante y recambio de agua al 90% diario, proveyendo *ad libitum* alimento tres veces diarias (Camaronina Purina® con 35% de proteínas).

Para el análisis de expresión de las isoformas de las proteínas Sxl durante el desarrollo gametogénico, se obtuvo gónada de 10 individuos de cada sexo en edad subadulto (20 a 25 g) y 10 individuos de cada sexo en edad adulta (30 a 35 g). Todas las muestras se preservaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización para extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se lavaron las muestras con 300 µL de PBS 1x, se centrifugaron a 16060 rcf durante 10 min y se eliminó el sobrenadante; posteriormente las muestras se maceraron con 300 µL de buffer de lisis (NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, Glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM, PVP 1% y Mercaptoetanol) y regulador RIPA; se sometieron a sonicación en pulsos durante 10 s con un tono de 20 (amplitud) utilizando un microprocesador ultrasónico Vibra-Cell (Sonics & Materials Inc., Connecticut EUA) hasta homogeneizar cada muestra. En muestras

de desarrollo embrionario y en nauplios se emplearon 2 ciclos (20 s total); en los estadios larvarios, postlarvas y tejidos, se aplicaron 5 ciclos (50 s total), colocándolas en hielo inmediatamente entre cada ciclo. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4° C, y se recuperó el sobrenadante en tubos previamente enfriados. Finalmente se cuantificó la concentración de proteína total empleando BCA Protein Assay kit (Cell Signaling Technologies, Massachusetts, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.4.3 Detección y cuantificación de proteínas SXL

A partir de las variantes del gen aislado y caracterizado, se calculó el peso molecular esperado (kDa) y el punto isoeléctrico (pI) de las variantes SxI a través de la herramienta en línea PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam>) para evaluar la viabilidad de separación de las diferentes proteínas.

Se preparó el volumen de proteínas correspondiente a 30 µg con regulador de corrimiento 2x (Laemmli 4x = Tris-HCl, pH=6.8, 0.5 M; glicerol 10%; SDS 10%, azul de bromofenol al 0.05%; β-mercaptoetanol al 4%) en relación 1:1, se incubaron a ebullición en baño maría por 5 min y se separaron en geles SDS-PAGE al 15% (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, SDS 10%; Acrilamida 30%; APS 10%; TEMED) de 1.5 mm de grosor, durante 2.5 h a 150 V. Como referencia de tamaño se empleó un marcador de peso molecular Amersham ECL Rainbow Marker-Full Range (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Una vez separadas las proteínas por tamaño molecular en gel de poliacrilamida, éstas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BIORAD, Alemania), por medio de electro-transferencia a 100 mA (0.1 A) durante 1.5 h, manteniendo en frío. Para verificar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau y se destiñó con agua destilada, se bloqueó la membrana con solución de bloqueo A (BSA en TBS-T) durante una hora, se incubó con anticuerpo primario (Anti-SXL) en dilución 1:100 en solución de

bloqueo A durante toda la noche; la membrana se lavó 2 veces rápidas y 5 veces durante 5 min cada una en solución de bloqueo B (leche en TBS-T) y se incubó con el anticuerpo secundario (mouse anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa) en dilución 1:2000 en solución de bloqueo B durante una hora; se lavó la membrana 2 veces rápidas y 5 veces durante 5 min cada una con TBS-T. Se colocó en el sistema de captura de imágenes ChemiDoc Touch Imaging System (BIORAD) empleando el filtro para quimioluminiscencia y luz UV, agregando 1.5 mL de reactivo Luminol -SignalFire ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EUA) y la detección de luz emitida por la reacción entre la peroxidasa y el luminol se fotodocumentó; las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageLab (BIORAD). La cuantificación de cada una de las proteínas detectadas se realizó como se indica en el apartado 6.3.2.

6.5 Cuantificación y análisis estadísticos

La abundancia relativa por cada muestra (estadio de desarrollo o edad) y los correspondientes productos de los transcritos amplificados (apartado 6.3) o proteínas esperadas (apartado 6.4) para cada una de las seis isoformas se detectaron automáticamente por el programa y en algunos casos manualmente; el ruido de fondo o background se eliminó automáticamente. Se cuantificó cada fragmento (producto de PCR o proteína) para determinar su abundancia relativa en cada estadio y edad. El volumen cuantificado de cada isoforma, fue expresado en porcentaje relativo en relación a todas las isoformas analizadas en cada estadio o edad. Los análisis estadísticos se realizaron transformando a arcoseno la raíz cuadrada de los porcentajes relativos (expresados como fracción o 'p'). Se realizaron análisis de varianza para identificar diferencias significativas entre los porcentajes de las isoformas en los diferentes estadios de desarrollo embrionario, larvario, postlarvario, y en la gónada de machos y hembras en diferentes estadios gametogénicos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica versión 7.

7. RESULTADOS

7.1 Verificación de secuencias de transcritos *Sxl* sexo-específicas de camarón blanco *P. vannamei*

Con el par de oligonucleótidos empleados para la verificación de variantes sexo-específicas de *Sxl* se obtuvieron dos fragmentos con diferencia de 50 pb en todas las muestras analizadas (hembras, machos y embriones); esta diferencia corresponde al primer sitio posible de corte-y-empalme alternativo (SS1). Estas secuencias mostraron que la posible inserción/delección en el sitio 612 pb (AA) no existe ya que todas las secuencias contienen el triplete AAA y por lo tanto no ocurre la modificación en el marco de lectura al incluir codón de paro conluciendo a la posible variante pequeña de *Sxl* (118 aa) en hembras y embriones observada por López-Cuadros (2014).

Para verificar la presencia de variantes únicas o sexo-específicas, se realizó una amplificación por PCR a partir de ADNc de gónada femenina, masculina y embriones con un par de oligonucleótidos que amplifican una región que flanquea ambas regiones de corte-y-empalme (Lvan612-F (Tabla I) y Lvan7723-R1 5'-TGTAGCGGTTGGCGGTTCCGG-3'). Se observó la presencia de seis productos de amplificación de diferentes tamaños, los cuales corresponden al tamaño esperado de las diferentes combinaciones de los tres cortes-y-empalmes diferentes (Tabla III, Fig.8).

Tabla III. Tamaño esperado de transcritos *Sxl* de acuerdo al patrón de cortes-y-empalmes.

Variante	Cortes y empalmes	Tamaño esperado (pb)	Forma esperada
<i>i1</i>	0	835	
<i>i2</i>	1	784	
<i>i3</i>	2	755	
<i>i4</i>	1-2	704	
<i>i5</i>	3	681	
<i>i6</i>	1-3	630	

i = isoforma

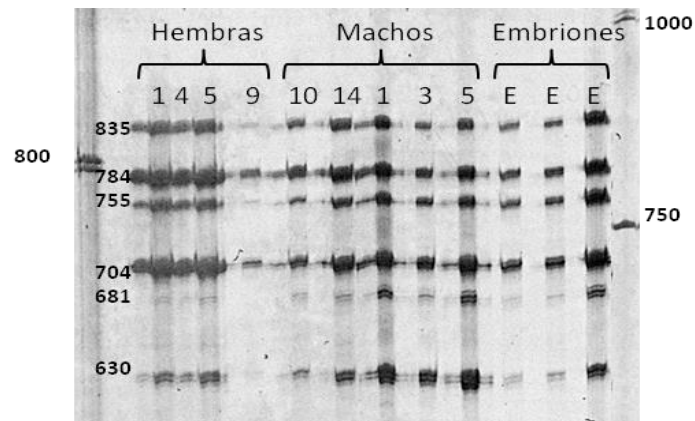


Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida de seis variantes *Sxl* de *P. vannamei* en gónadas de ambos sexos y embriones. Los fragmentos corresponden al tamaño esperado según la combinación de los diferentes sitios de corte-y-empalme. En hembras, la línea 1 = vitelogénesis secundaria, 4 = vitelogénesis primaria, 5 y 9 = Previtelogénesis. En machos, las líneas 10 y 14 = inmaduros, y 1, 3 y 5 = maduros. En embriones, tres pools del desarrollo embrionario (sin división hasta previo a la eclosión a nauplio).

Una vez observado el patrón de bandeo de los productos de PCR con los oligonucleótidos antes mencionados (Fig. 8), se llevó a cabo el alineamiento y ensamblaje de seis diferentes transcritos *Sxl*, y la traducción conceptual de cada uno de ellos (Fig.9).

1 AACGGAGCTCGCGGCCAAAAATCGAGGAGCGAATTATCTGAGAGGTTGGCACGCGTGAGTC 60
 61 AATGTTTGTGTGCCCCACGCGCGTCCACCCGGCATCGCTCTCGCCTCCAAAAGCTACATG 120
 121 TTTTGTTAATTTAGGTTAGGCTTGGGAAGAGGAAGTACACAatgagttttgagtcattct 180
 1 M S F E S S 6
 181 agcagccccagctcagcgcttcccgatggggaacggaacaaacctatcatcaactac 240
 7 S S P S S A L P D G E T R T N L I I N Y 26
 241 ctgccacagactctcaccgaccaagagttttacaagatatttgtgtgtcgggcccac 300
 27 L P Q T L T D Q E F Y K I F V V V G P I 46
 301 aaaaactgcccattatgaaggatttaagcagactggctattccttcgggttcggcttc 360
 47 K N C R I M K D L K Q T G Y S F G F G F 66
 361 gtggagtaccagaagccagaggacgctgcaaaggccatcctgcaattgaacaacctcca 420
 67 V E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P 86
 421 gtgcagcacaacgtatcaaggtctcctatgccccggccccctggtgaggacatcaaggaa 480
 87 V Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E 106

481 accaacctctacattcagaatattcccaga aaggaaacagactccaaggaacaaacctt 540
 107 T N L Y I Q N I P R K E T D S K E T N L 126
 541 tacattggaatgttccaagatcatcacattagaccagtttagaggaactgttctcttca 600
 127 Y I A N V P R S Y T L D Q L E E L F S S 146

SS1

481 accaacctctacattcagaatattcccaga----- 540
 107 T N L Y I Q N I P R 126
 541 -----tcatacacattagaccagtttagaggaactgttctcttca 600
 127 S Y T L D Q L E E L F S S 146

↑ SS1 [-51 nt
-17 aa

601 gaatttgcttattggccagattgtccagaagaaggacaaggttacaggacttccacgtggc 660
 147 Y G Q I V Q K N L L K D K V T G L P R G 166
 661 gttggatttgtgaggtttgataagaagtctcaggcagaagcggcgattgtgggcatgaat 720
 167 V G F V R F D K K S Q A E A A I V G M N 186
 721 ggcgttgttccgagggtgggactgagccccctagtggttaaggtagcggaggagcacggc 780
 187 G V V P E G G T E P L V V K V A E E H G 206
 781 aaaatgaaggctgcctactacgctggttaccatgctggcctcagcaccacgaaagtggc 840
 207 K M K A A Y Y A G Y H A G L S T T K G G 226

841 ggcgggtgctg gtogagggcgtgtaactacaacaccgagggggaggtggtggtgctac 900 SS3
 227 G G V G R G R G N Y N N R G G G G G G Y 246 +
 901 caggaacgaggaactacaataatgtatcatcacaggtggtactaaGCCGAGGAGTGG 960 SS2
 246 Q G R G N Y N N M Y H H R W Y *

Proteinas codificadas: SxlPvan-1 retiene SS1+SS2+SS3:261 aa. SxlPvan-2 ↑SS1 retiene SS2+SS3:244aa

961 AAGGTGATGCCAGCGCCACCCGCCCAACCTCCTCGCAAGCAGGGGTGGTAAGATAGCCC 1020
 1021 CGGACCGAACCGCCAACCCGCTACAACCCGATCGGCAGCGCGCGGCTATGGCGGTGGGT 1080
 1081 ACGGAGGTGGGTATGGCAGTGGCGGGAGTTCCTTGGGCTACTCCAATGATGCGGCTGGCC 1140
 1141 AATCCTCGTTCTACAGCTTCTCCACGCCTTCTTCAGTGGGGGAAATTACACATCGTTCT 1200
 1201 CCGGCATGAGTAATACTCTGGTGGCGGGCTATAGTAGTACTGACGCCAGCCCGCT 1260
 1261 GTTAAACAACAGCAACAACAACAAAACGTGTTCTATGAGTGACAAGGAAAAAAGAATGG 1320
 1321 CTTTACGCGGGGAGCTCTTTCAATGAATAACAAAAA

mRNAs: SxlPvan-1 retiene SS1+SS2+SS3:1352nt. SxlPvan-2 ↑SS1 retiene SS2+SS3:1301 nt.

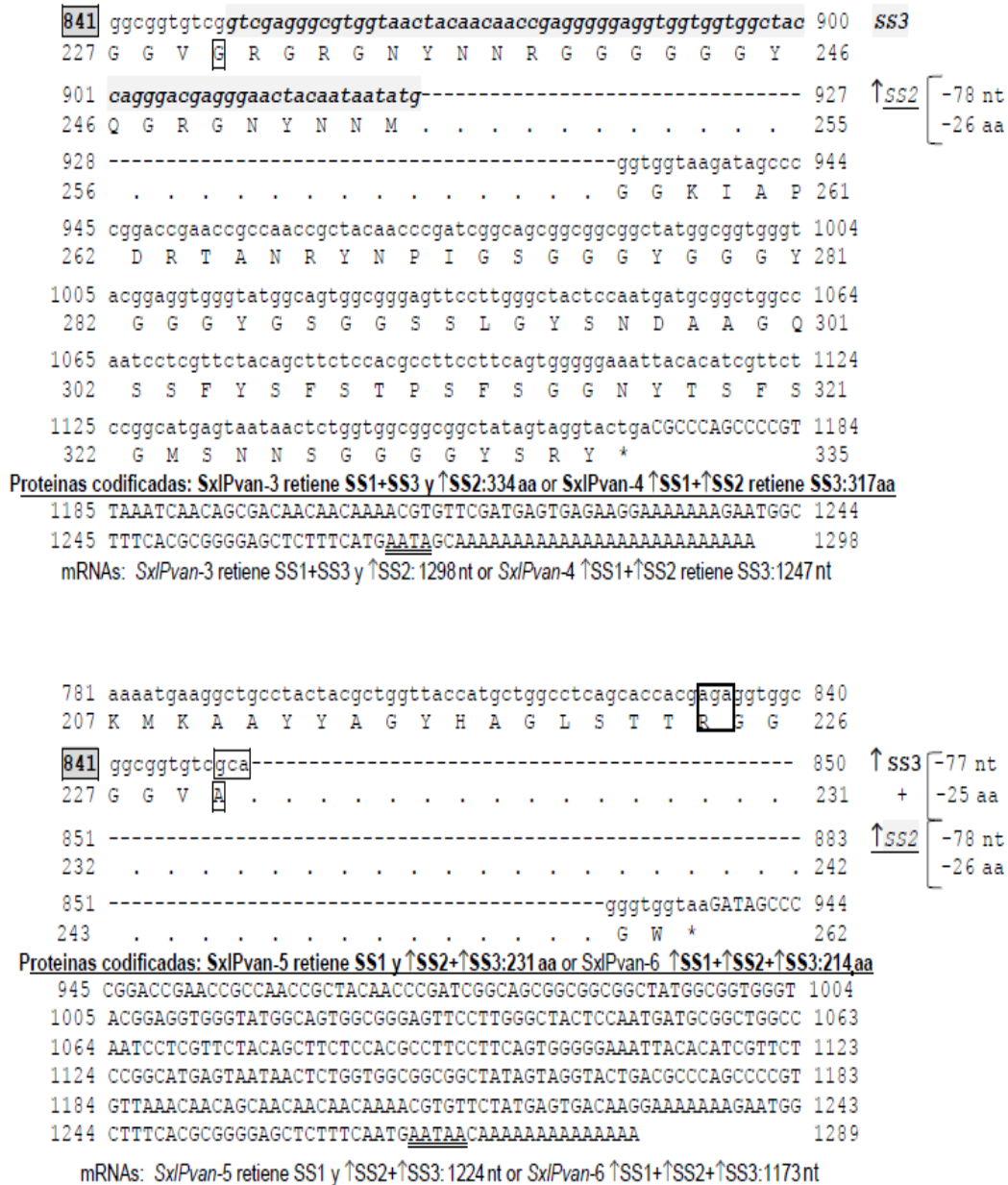


Figura 9. Secuencias nucleotídicas y de aminoácidos para los diferentes transcritos del gen *Sex-lethal* de *P. vannamei* (*PvanSxl*). UTRs 5' y 3' se muestran en mayúsculas y el ORF se muestra en minúsculas. El codón de inicio de transcripción (atg) está subrayado, los codones de paro están marcados con (*) debajo de la secuencia, y las señales de poliadenilación subrayados con doble línea. Sitios de corte y empalme 1, 2 y 3, se indican SS1 en azul, SS2 subrayado en verde y SS3 en morado. Sitios de reconocimiento del ARN (RRM) sombreados en gris oscuro; los dos diferentes puntos de inicio (10 aa) existentes en la segunda RRM están sombreados en gris claro.

Las seis isoformas son resultado de la combinación de sitios de corte y empalme alternativo en las regiones previamente descritas, y todas tienen la misma región UTR 5' de 162 pb, presentado el codón de inicio de la transcripción (ORF) en la posición nucleotídica 163, pero diferentes tamaños de UTR 3' resultantes de dos diferentes sitios de señal de poliadenilación (poli-A) (Fig.10).

Los sitios de corte y empalme (SS) se describen en el orden en el cual fueron descubiertos. El primer sitio (SS1) inicia en la posición nucleotídica 510 con una longitud de 51 nt, el segundo sitio SS2 está localizado en la posición 927 y consiste de 78 nt, y el tercer sitio SS3, el cual inicia cascada arriba del sitio SS2 en la posición 850 consiste de 151 nt ya que incluye 73 nt además de los 78 nt correspondientes al SS2. La variante de cDNA *PvanSxl-1* tiene un tamaño de 1352 pb sin sitios de corte-y-empalme, incluyendo una región 3'UTR de 404 pb, y un ORF de 786 pb que codifica una proteína deducida de 261 aminoácidos (aa). La variante *PvanSxl-2* tiene una longitud de 1324 pb que incluye una 3'UTR de 430 pb, extrae el primer sitio de corte-y-empalme (SS1), y su ORF es de 732 pb, que codifica una proteína de 243 aa. La variante *PvanSxl-3* es de longitud 1298 pb con una región 3'UTR de 131 pb, extrae un sitio de corte-y-empalme que corresponde al fragmento SS2, y su ORF es de 1005 pb que codifica una proteína deducida de 334 aa debido a que al remover la región SS2 se elimina el codón de paro que conduce a proteínas de menor tamaño como en las variantes *PvanSxl-1* y *PvanSxl-2*. La variante *PvanSxl-4* tiene una longitud de 1247 pb incluyendo 131 pb del 3'UTR, elimina dos sitios de corte-y-empalme, SS1 y SS2, y tiene un ORF de 954 pb que codifica a una proteína deducida de 317 aa; al igual que la variante *PvanSxl-3* la extracción de SS2 elimina el codón de paro de la transcripción, resultando en una proteína de mayor tamaño. Estas dos variantes, *PvanSxl-3* y *PvanSxl-4*, presentan una región adicional rica en glicina en la región carboxilo terminal de las respectivas proteínas codificadas (Fig. 10). Las últimas dos variantes, *PvanSxl-5* y *PvanSxl-6*, eliminan el tercer sitio de corte-y-empalme SS3 (que incluye SS2) que modifica el ORF, dando lugar a un codón de paro prematuro. *PvanSxl-5* tiene longitud de 1224 pb incluyendo una 3'UTR de 231 pb

y un ORF de 696 pb que al traducirse conducirán a una proteína de 231 aa. Finalmente, la variante *PvanSxl-6* tiene longitud de tan solo 1173 pb incluyendo una 3'UTR de 366 pb ya que elimina los tres sitios de corte-y-empalme SS1 y SS3 (que incluye SS2), y tiene un ORF de 645 pb que al traducirse conduce a una proteína de 214 aa (Tabla IV; Figs. 9 y 10).

La información descrita se encuentra resumida en la Tabla IV, y las secuencias depositadas en la base de datos GenBank del NCBI con su respectivo número de acceso se muestran en el ANEXO A.

Tabla IV. Características de transcritos *PvanSxl* con la respectiva proteína conceptual.

Isoforma	GenBank No. Acc.	Tamaño (nt)	Sitios de splice	Tamaño ORF (nt)	3'UTR (nt)	TEP (aa)	PME (kDa)
<i>PvanSxl-1</i>	KY498656	1352	None	786	404	261	28.92
<i>PvanSxl-2</i>	KY498657	1324	SS1	732	430	243	26.84
<i>PvanSxl-3</i>	KY498658	1298	SS2	1005	131	334	35.71
<i>PvanSxl-4</i>	KY498659	1247	SS1 & SS2	954	131	317	33.74
<i>PvanSxl-5</i>	KY498660	1224	SS3	696	366	231	25.50
<i>PvanSxl-6</i>	KY498661	1173	SS1 & SS3	645	366	214	23.57

TEP=tamaño esperado de proteína, PME=peso molecular esperado, pl=punto Isoeléctrico.

En las secuencias de proteínas traducidas, se observaron dos regiones de reconocimiento del ARN (RRM, por sus siglas en inglés), la primera es conservada en la región N-terminal y la segunda en la región central. La segunda RRM es ligeramente diferente al inicio (QNI en lugar de ANV, Fig. 10) como resultado de la extracción del SS1 (50pb) en las isoformas dos, cuatro y seis. Adicionalmente a las diferentes RRM al inicio, la extracción del SS1 también ocasiona diferente tamaño entre ambas RRM (7 aa versus 14 aa) en las isoformas uno, tres y cinco.

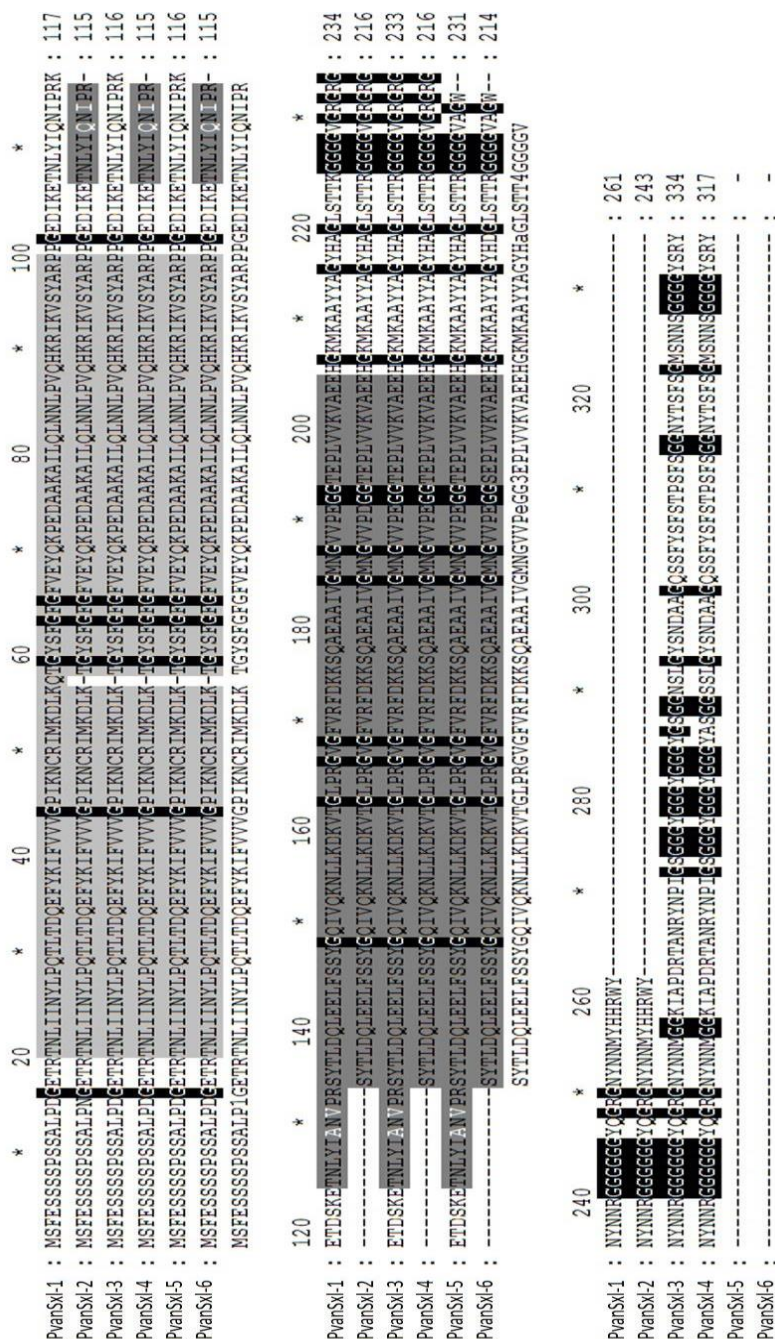


Figura 10. Traducción conceptual y alineamiento de seis diferentes variantes SXL de *P. vannamei* presentes en gónada masculina, femenina y durante el desarrollo embrionario, denotando los Motif de reconocimiento de ARN (RRM), RRM 1 en gris claro, RRM 2 y RRM 3 en gris oscuro, la diferencia entre estos dos últimos se muestra en letras color blanco. El fondo negro muestra las regiones ricas en Glicina.

7.2 Análisis filogenéticos

El análisis con BlastX de las secuencias de proteínas Sxl aisladas a partir de *P. vannamei* mostró alta similitud con secuencias Sxl de especies de crustáceos estrechamente relacionados, como *M. rosenbergii* (89 y 85%), *M. nipponense* (88 y 84%), y la pulga de agua *D. pulex* (63%), y también con insectos como *B. mori* (80%) e incluso *D. melanogaster* (62%).

Las seis isoformas *P. vannamei* presentan dos regiones de unión al ARN (RRM) que son características de proteínas Sxl. Estas regiones están conservadas en los artrópodos mientras que las secuencias fuera de la RRM no se conservan. El árbol filogenético, que incluyó las seis isoformas PvanSXL, mostró dos grupos, uno de secuencias de insectos y otro de crustáceos, y este último se dividió en dos, uno que incluye las seis PvanSxl agrupadas con las isoformas del cangrejo chino *E. sinensis*, y el segundo grupo que contiene las secuencias de las especies de langostino o camarón de agua dulce *M. nipponense* y *M. rosenbergii* (Fig.11).

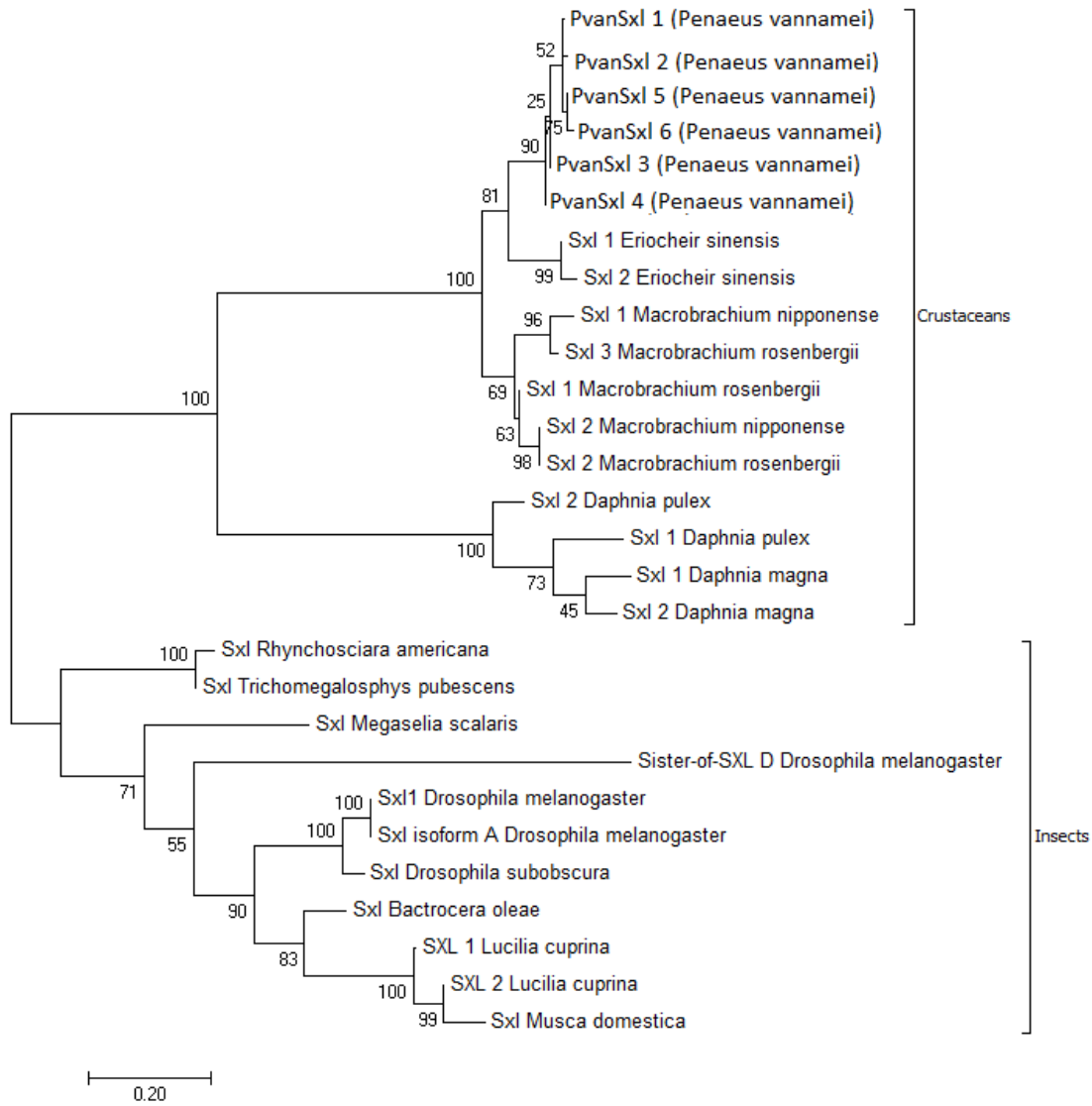


Figura 11. Árbol filogenético de secuencias proteicas de *Sex-lethal*. La historia evolutiva se infirió mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Le y Gascuel 2008. Se muestra el árbol con el mayor valor logarítmico de verosimilitud (-10,284.09). El porcentaje de árboles en los que el taxa asociado se agrupó se muestra a un lado de las ramas.

7.3 Análisis de expresión de *Sxl* entre sexos y tejidos de camarón blanco *P. vannamei*

Se realizaron reacciones de PCR de 12 μ L con oligonucleótidos para *Sxl* y *18S* por separado, empleando el cDNA sintetizado a partir de ARN de gónada (ovario y testículo), ámpula terminal y vaso deferente de macho, hepatopáncreas, pedúnculo, músculo, intestino, corazón, cerebro y branquia de cinco hembras y cinco machos adultos de 30 g de peso.

En hembras se observó que la amplificación del gen *Sxl* evaluada por PCR en punto final es mayor en pedúnculo, gónada, hepatopáncreas, e intestino, mientras que en machos la expresión entre estos mismos tejidos fue menor en hepatopáncreas. La expresión en cerebro, corazón y músculo de ambos sexos fue prácticamente imperceptible (Fig.12).

De manera opuesta a lo anterior, en branquia se observa una ligera amplificación mayor en machos que en hembras.

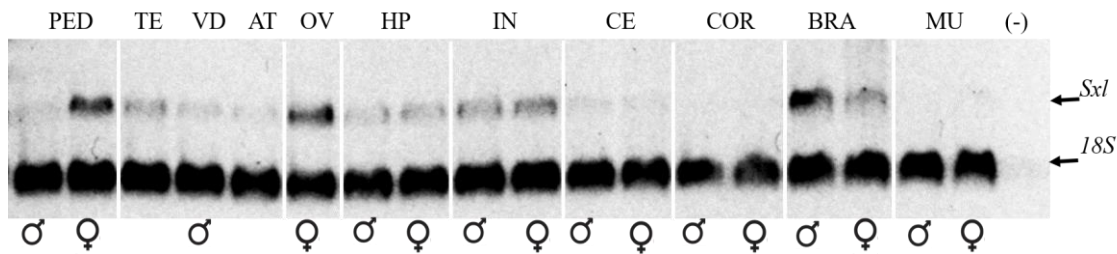


Figura 12. Electroforesis de productos obtenidos con oligonucleótidos Ubicuidad_ *Sxl* y *18S* en los diferentes tejidos de hembras y machos adultos de camarón blanco.

7.4 Análisis semicuantitativo de expresión de *Sxl* en el desarrollo ontogénico y gametogénico de hembras y machos de camarón blanco *P. vannamei*

La separación por electroforesis de los productos amplificados por PCR empleando el par de oligonucleótidos (LvanSxlB-F y Lvan7723-R) que flanquean las regiones de corte-y-empalme de las seis variantes *PvanSxl*, mostraron que

todas las variantes están presentes durante todo el desarrollo embrionario, larvario temprano (Fig.13), postlarvario (Fig. 14) y durante el desarrollo gametogénico de ambos sexos (Fig.15) de camarón blanco.

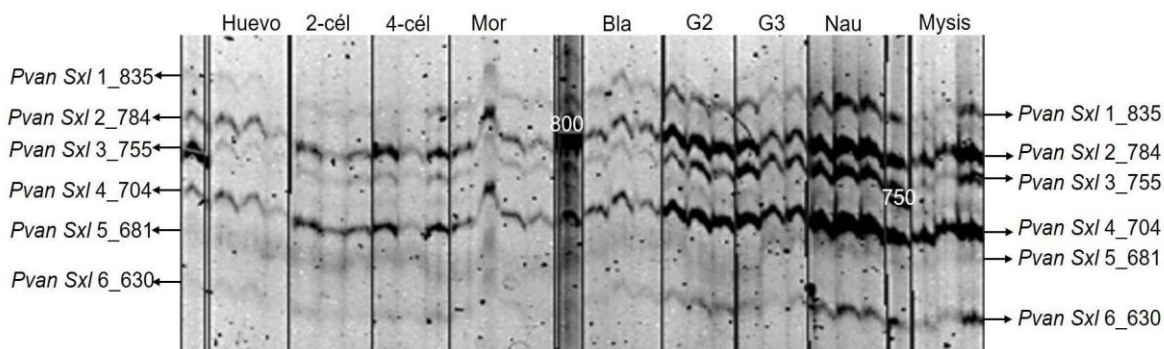


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes *Sxl* durante la ontogenia de *P. vannamei*. Huevo, 2-cél (primera división celular), 4-cél (segunda división celular), Mor (mórula), Bla (formación del blastoporo), G2 (gástrula temprana), G3 (gástrula tardía), Nau (nauplio), y Mysis. M1 y M2 son marcadores de peso molecular.

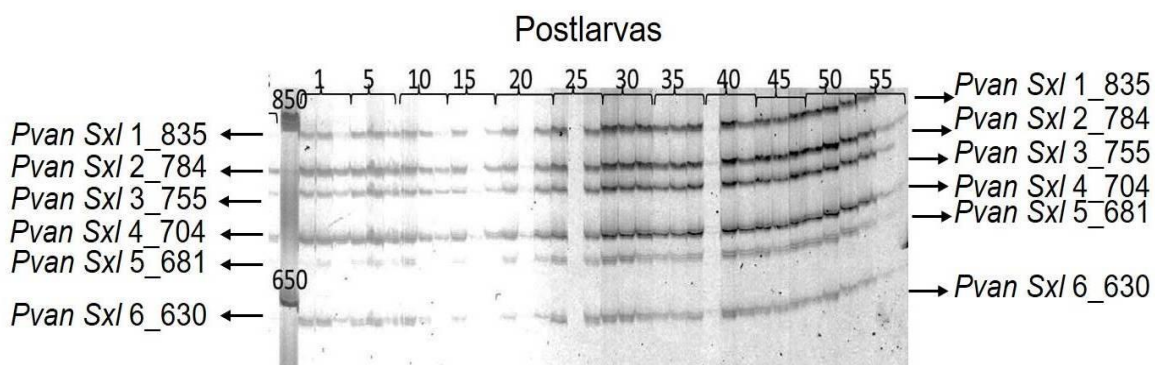


Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes *Sxl* durante el desarrollo postlarvario de *P. vannamei*. Postlarva de 1 a 55 días de desarrollo.

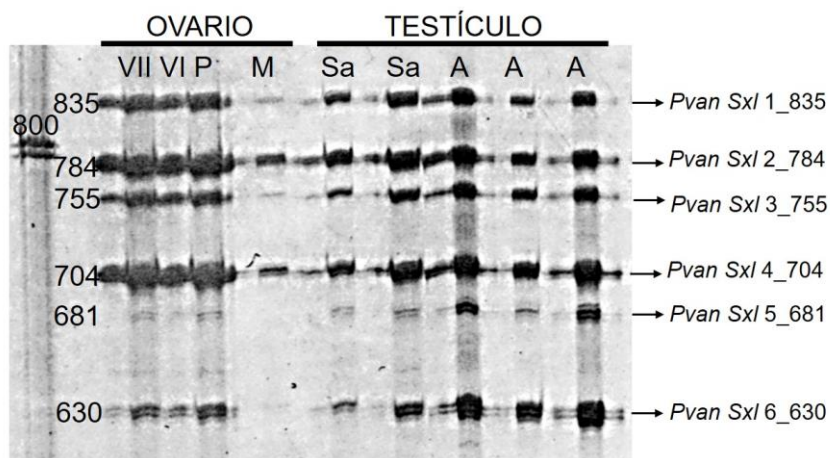


Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida de las seis variantes de *Sxl* en *P. vannamei* resultantes de tres cortes-y-empalmes diferentes en hembras y machos. En hembras: VII = vitelogénesis secundaria, VI = vitelogénesis primaria, P = Previtelogénesis. En machos: Sa = testis de subadultos inmaduros, A = testis de adultos maduros.

Las imágenes obtenidas a partir de la separación electroforética de productos de amplificación de variantes *Sxl*, fueron empleadas para analizar diferencias de expresión entre isoformas en cada estadio de desarrollo; se empleó el porcentaje de los productos de amplificación de tamaño esperado según las variantes descritas previamente (Tabla IV).

Tabla IV. Características de la proteína conceptual de los diferentes transcritos *PvanSxl*.

Isoforma	GenBank No. Acc.	Sitios de splice	Tamaño ORF (nt)	TEP (aa)	PME (kDa)
PvanSxl-1	KY498656	Ninguno	786	261	28.92
PvanSxl-2	KY498657	SS1	732	243	26.84
PvanSxl-3	KY498658	SS2	1005	334	35.71
PvanSxl-4	KY498659	SS1 & SS2	954	317	33.74
PvanSxl-5	KY498660	SS3	696	231	25.50
PvanSxl-6	KY498661	SS1 & SS3	645	214	23.57

TEP=tamaño esperado de proteína, PME=peso molecular esperado, pI=punto Isoeléctrico

Se hizo el análisis estadístico para cada etapa de desarrollo (embrionario, larvario temprano a PL1, de PL5 a PL55, gónadas de machos y hembras). Se hicieron

Análisis de varianza (ANOVA) de tipo anidado (isoformas dentro de cada estadio) con el porcentaje relativo transformado a arcoseno de la raíz cuadrada de 'p'. Las medias se analizaron con una prueba de Fisher (LSD) y un valor de significancia de $P \leq 0.05$ o de $P \leq 0.10$ en el caso de solamente observar una tendencia en el ANOVA.

Para facilidad de visualización en las gráficas se muestra el porcentaje relativo de cada isoforma por cada estadio de desarrollo (Figs. 16, 17 y 18). En el ANOVA del desarrollo embrionario únicamente se observó una tendencia ($P = 0.07$) a encontrar diferentes isoformas dentro de estadios por lo que se realizó una comparación de medias preestableciendo un valor de significancia de $P = 0.10$. En la figura 16 se observa que en cigoto (huevo fertilizado), primera división y segunda división todas las isoformas estuvieron en proporciones similares a excepción de la isoforma uno (i1, sin cortes-y-empalmes) que estuvo en menor proporción. En mórula la isoforma de mayor proporción fue la isoforma cuatro (i4, con el primer y segundo corte-empalme extruidos), aunque solo alcanzó diferencias significativas de la isoforma uno (i1, sin cortes-y-empalmes) y la seis (i6, primer y tercer sitio de corte-empalme extruidos) que fueron las menos expresadas. En blastocele y gástrula intermedia (G2) no se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de las isoformas. En gástrula avanzada (G3) la isoforma cinco (i5, tercer corte-empalme extruidos) fue la más expresada pero no difirió de las isoformas tres (i3, segundo corte-empalme extruido) y seis.

En el desarrollo larvario temprano de nauplio hasta postlarva de un día (PL1) el ANOVA indicó que existían diferencias significativas ($P = 0.00$) entre isoformas dentro de los diferentes estadios, observándose (Fig. 16) que en nauplio la isoforma más expresada fue la cuatro (i4, primer y segundo corte-empalme extruidos), la cual difirió significativamente de las otras isoformas. La misma isoforma cuatro (i4) fue la más expresada en mysis, no alcanzando diferencias significativas únicamente de la isoforma seis (i6). En PL1 la isoforma cuatro (i4) fue la más expresada, aunque en este caso no alcanzó diferencias en la abundancia de las isoformas dos (i2, primer corte y empalme extruido) y cinco (i5).

Cabe señalar que las isoformas i5 e i6 presentaron mayor proporción durante el desarrollo embrionario y larvario temprano en comparación con lo observado en postlarvario (Fig.17). Llama la atención que la traducción conceptual de estas dos isoformas da lugar a las secuencias de aminoácidos de menor tamaño, 231 y 214 aa, respectivamente, las cuales ocurren por la presencia de un codón de paro en el segundo corte-empalme cuando este es extruido

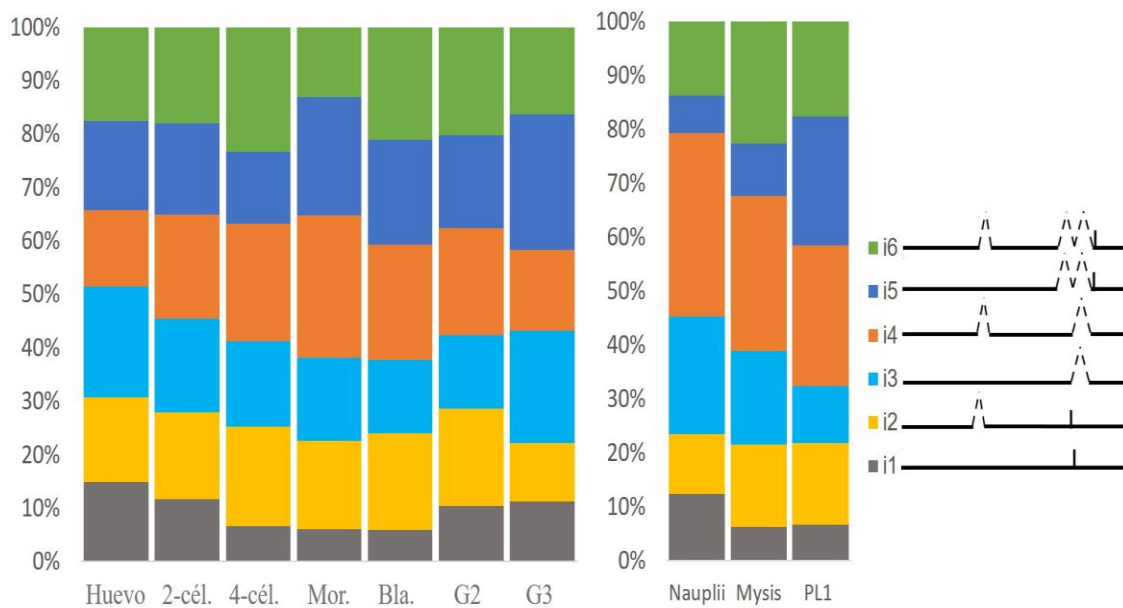


Figura 16. Medias del porcentaje relativo de expresión para cada isoforma *PvanSxl* dentro de los distintos estadios de desarrollo embrionario y larvario temprano.

En el desarrollo postlarvario se observa un patrón más claro siendo solo dos isoformas de mayor proporción, pero cada una presentándose más expresada en diferentes edades de postlarva. La primera es la isoforma i4 en PL5, 15 y 20, la cual es significativamente más expresada que las demás isoformas; esta isoforma es seguida por la i2 también con una alta expresión, pero sin diferir significativamente de la i4 en PL5. En PL10 estas dos isoformas altamente expresadas tienen una proporción similar, aunque la i2 fue significativamente más expresada que la i4. En PL15 y PL20 la i4 fue la más expresada y diferente de todas las otras. En PL25 la i4 fue más expresada que la i1, i2, e i5, pero no mostró

diferencia significativa de la i3 o i6. La segunda isoforma más expresada a lo largo del desarrollo postlarvario, la i2, presentó mayor proporción en PL30 aunque no alcanzó diferencias significativas de la i3 e i4. Este mismo patrón se observó en PL35, 40 y 55. En PL45 la abundancia de las isoformas i1, i2, i3 e i4 no difirió entre ellas, y fue significativamente mayor que las i5 e i6. De hecho, estas últimas dos isoformas que comparten el tercer sitio de corte y empalme fueron las de menor expresión durante el desarrollo postlarvario (PL15, 30, 35, 45 y 50) (Fig.17). Es interesante notar que las dos isoformas más expresadas durante el desarrollo postlarvario, la i2 e i4, comparten el primer sitio de corte y empalme.

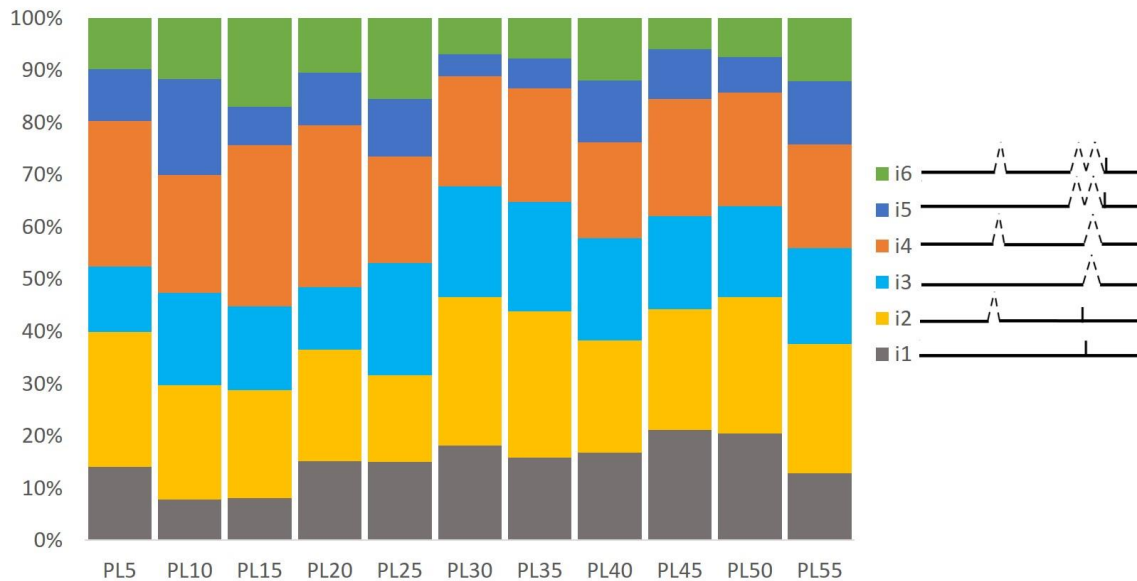


Figura 17. Medias del porcentaje relativo de expresión para cada isoforma *PvanSxl* en los distintos estadios de desarrollo postlarvario (PL) progresivo.

La proporción observada de la expresión de *PvanSxl* en gónadas de hembras y machos durante el desarrollo gametogénico mostró resultados contrastantes entre géneros (Fig. 18). Por ejemplo, en machos subadultos las isoformas i5 e i6 fueron las menos expresadas junto con la i1, y las más expresadas fueron la i2 e i4, pero en machos adultos la i5 e i6, junto con la i4, fueron las más expresadas. En hembras, la isoforma presente en mayor proporción fue la i2 en previtelogénesis

(Previt), vitelogénesis I (Vit I), y madura, aunque no difirió de la i1 e i3 en previtelogénesis, de la i3 e i4 en vitelogénesis primaria (vit I), y de la i3 en hembras maduras. A diferencia de los machos, las isoformas i5 e i6 fueron significativamente menos expresadas que las otras isoformas, aunque en vitelogénesis primaria no difirieron de la i1 y en vitelogénesis secundaria de la i4.

En el caso de machos adultos, las isoformas de mayor proporción fueron la i4 e i6, siendo estas dos significativamente diferentes de las demás isoformas (i5, i2, e i3).

Finalmente, la isoforma de menor proporción en expresión fue la i1.

De estos resultados resalta lo siguiente: que las isoformas i2 e i4 también presentaron altas proporciones como se observa en estadios postlarvarios (Fig. 14), además las isoformas cinco y seis fueron altas únicamente en macho adulto, como se observó en los estadios de desarrollo embrionario (Fig.18).

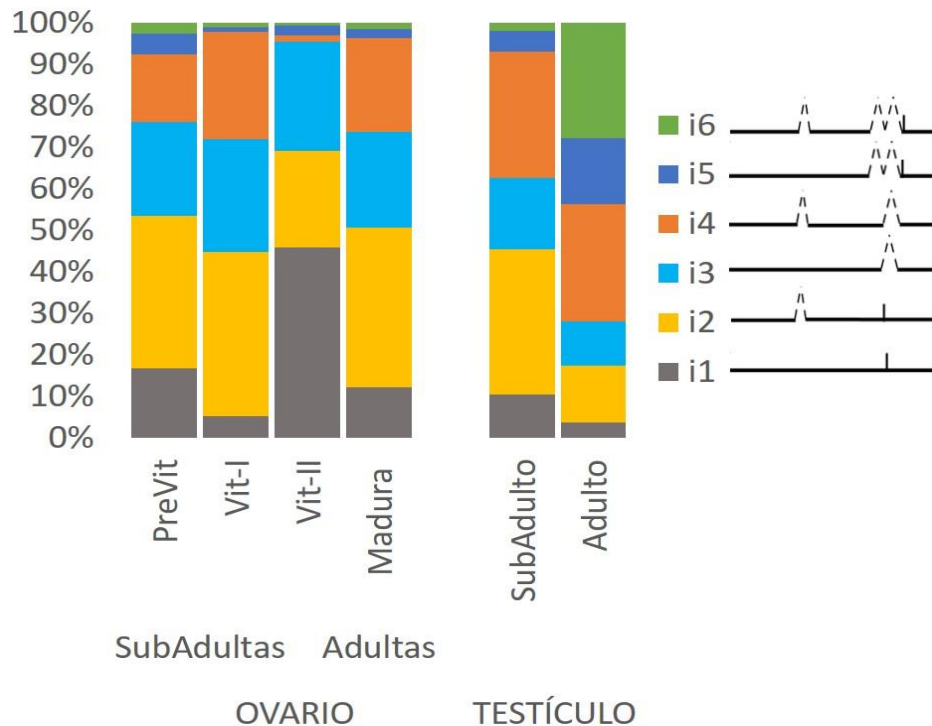


Figura 18. Medias del porcentaje relativo de cada isoforma de *PvanSxl* expresada en gónadas de hembras (Previt, Vit-I, Vit-II, Madura) y machos (Subadultos y adultos) en distintos estadios de desarrollo gametogénico o edades.

7.5 Identificar si las variantes de *PvanSxl* traducen diferentes proteínas en camarón blanco.

La detección de proteínas PvanSXL específicas durante el desarrollo de camarón blanco fue posible a través de Western blot, en donde se observaron resultados interesantes y cambios en el patrón de proteínas PvanSXL en las diferentes etapas del desarrollo.

El peso molecular esperado de las variantes PvanSXL presenta diferencias muy pequeñas entre sí, siendo PvanSxl-6 la de menor peso molecular con 23.5 kDa, resultado de los sitios de corte-y-empalme SS1 (50 pb) y SS3 (150 pb); seguida de la variante PvanSxl-5 con peso de 25.5 kDa resultado del corte-y-empalme SS3; posteriormente por la variante PvanSxl-2 con 26.8 kDa resultado del corte-y-empalme SS1; después por la variante PvanSxl-1 con 28.9 kDa que no presenta cortes-y-empalmes, seguida de las variantes PvanSxl-4 con 33.7 resultado de los cortes-y-empalmes SS1 y SS2; y finalmente la variante PvanSxl-3 de 35.7 kDa resultado del corte-y-empalme SS2 (Tabla IV).

Tabla IV. Características de la proteína conceptual de los diferentes transcritos *PvanSxl*.

Isoforma	GenBank No. Acc.	Sitios de splice	Tamaño ORF (nt)	TEP (aa)	PME (kDa)
PvanSxl-1	KY498656	Ninguno	786	261	28.92
PvanSxl-2	KY498657	SS1	732	243	26.84
PvanSxl-3	KY498658	SS2	1005	334	35.71
PvanSxl-4	KY498659	SS1 & SS2	954	317	33.74
PvanSxl-5	KY498660	SS3	696	231	25.50
PvanSxl-6	KY498661	SS1 & SS3	645	214	23.57

TEP=tamaño esperado de proteína, PME=peso molecular esperado, pl=punto Isoeléctrico

A continuación se describe el tamaño observado de las diferentes isoformas PvanSXL en la detección por Western blot durante el desarrollo embrionario (Fig. 19), larvario temprano (Fig. 20), postlarvario (Fig. 21), gónada de subadultos (Fig. 22) y adultos (Fig. 23) de ambos géneros de camarón blanco; y el tamaño

esperado según la traducción conceptual de las diferentes isoformas (transcritos) previamente aisladas y caracterizadas: proteínas de 21 kDa (23 kDa tamaño esperado) correspondiente a la isoforma PvanSXL-6; proteínas de 24 kDa (25.5 kDa tamaño esperado) correspondiente a la isoforma PvanSXL-5; proteínas de 26 kDa (26.8 kDa tamaño esperado) correspondiente a la isoforma PvanSXL-2; proteínas de 28 kDa (28.9 kDa tamaño esperado) correspondiente a la isoforma PvanSXL-1; proteínas de 30 kDa (33.7 kDa de tamaño esperado) correspondiente a isoforma PvanSXL-4; y proteínas de 31 kDa (36 kDa tamaño esperado) correspondiente isoforma PvanSXL-3.

Además, se observaron proteínas de diferente tamaño al esperado: 20 kDa a la que denominamos u1 y que se encontró presente en todos los estadios y gónadas de ambos géneros; otra de 25 kDa (u2) presente solo en desarrollo postlarvario, y finalmente una de 22 kDa (u3) presente en gónada masculina y femenina.



Figura 19. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot durante el desarrollo embrionario y larvario de *P. vannamei*. sd = huevo sin dividir, 1d = primera división celular, mor = mórula, bla = formación del blastoporo, G2 = gástrula intermedia, G3 = gástrula avanzada, Nau = nauplio, Zoe = zoea, Mys = mysis; kDa = peso molecular de proteínas en kiloDaltons.

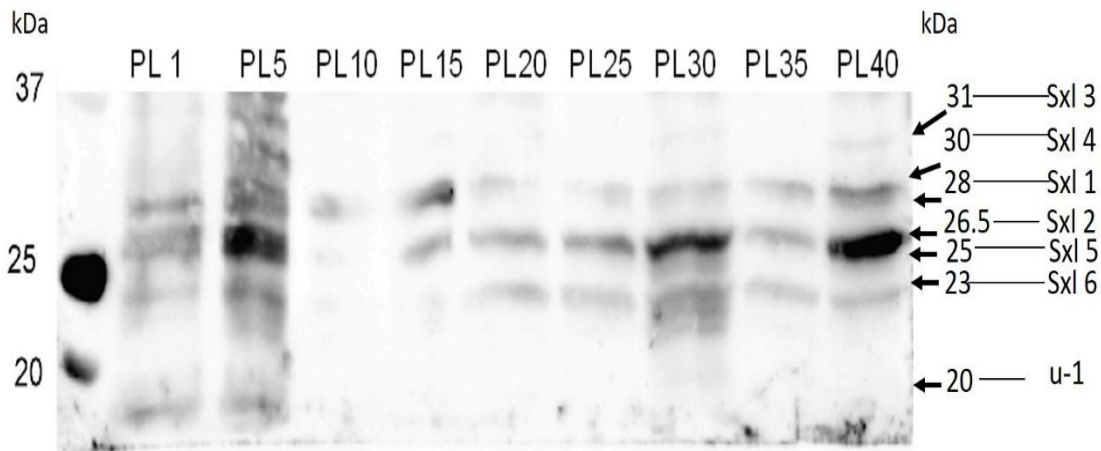


Figura 20. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot durante el desarrollo postlarvario de *P. vannamei*. PL1-PL40 = postlarvas de uno y hasta 40 días de desarrollo; kDa = peso molecular de proteínas en kiloDaltons.



Figura 21. Detección de proteínas PvanSXL por Western blot en gónada de hembra y macho subadultos de *P. vannamei*. kDa = peso molecular de proteínas en kiloDaltons.

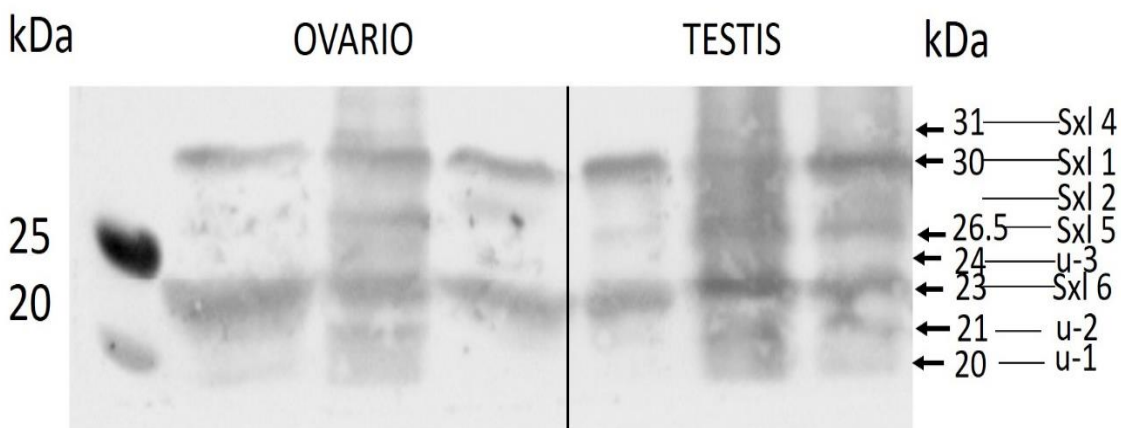


Figura 22. Detección de proteínas SXL por Western blot en gónada de hembra y macho adultos de *P. vannamei*. kDa = peso molecular de proteínas en kiloDaltons.

Durante el desarrollo embrionario se encontraron diferencias ($P < 0.05$) de abundancia entre las isoformas.

Las isoformas de mayor proporción fueron la i1 desde el huevo sin dividir, disminuyendo progresivamente hasta blastoporo, estadio en el cual la i2 e i4 fueron las más abundantes, y en los dos estadios de gástrula la isoforma más abundante fue la i5. En el desarrollo larvario temprano la i4 e i6 son las más abundantes en nauplio, mientras que en zoea la más abundante fue la i5 y en mysis la i3 e i4 están en proporción similar (Fig. 23).

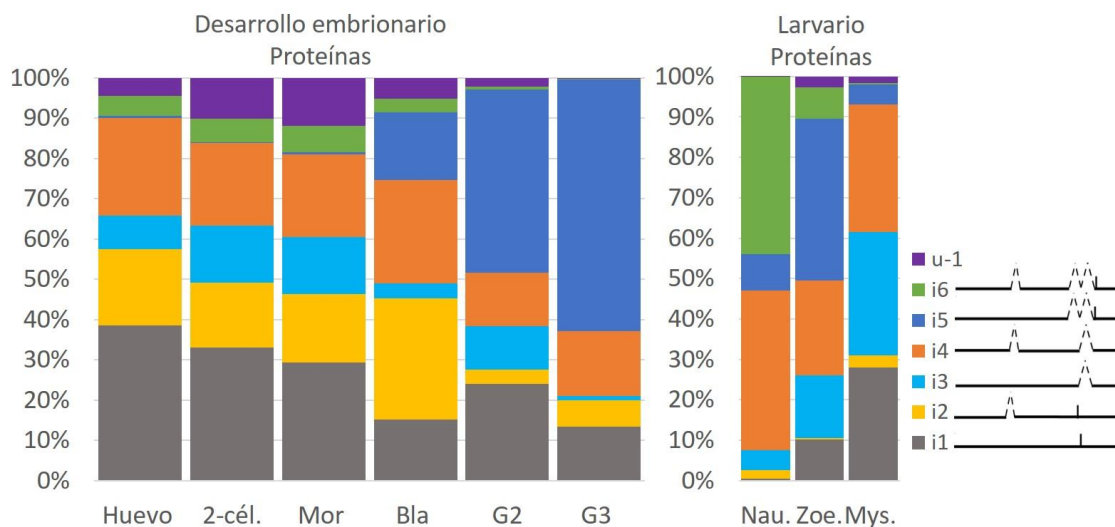


Figura 23. Porcentaje relativo de abundancia de cada proteína PvanSXL detectada por western blot en el desarrollo embrionario y larvario. Egg = huevo sin dividir, 2-cél. = 1ª división celular, Mor = mórula, Bla = blastoporo, G2 = Gástrula intermedia, G3 = Gástrula tardía.

Las isoformas más abundantes en esta etapa de desarrollo fueron: la i2 en estadios postlarvarios avanzados (de PL20 hasta PL40), mientras que la i4 fue más abundante en PL10 y PL15. En PL5 la i1 e i2 se presentan en proporción similar (Fig. 24).

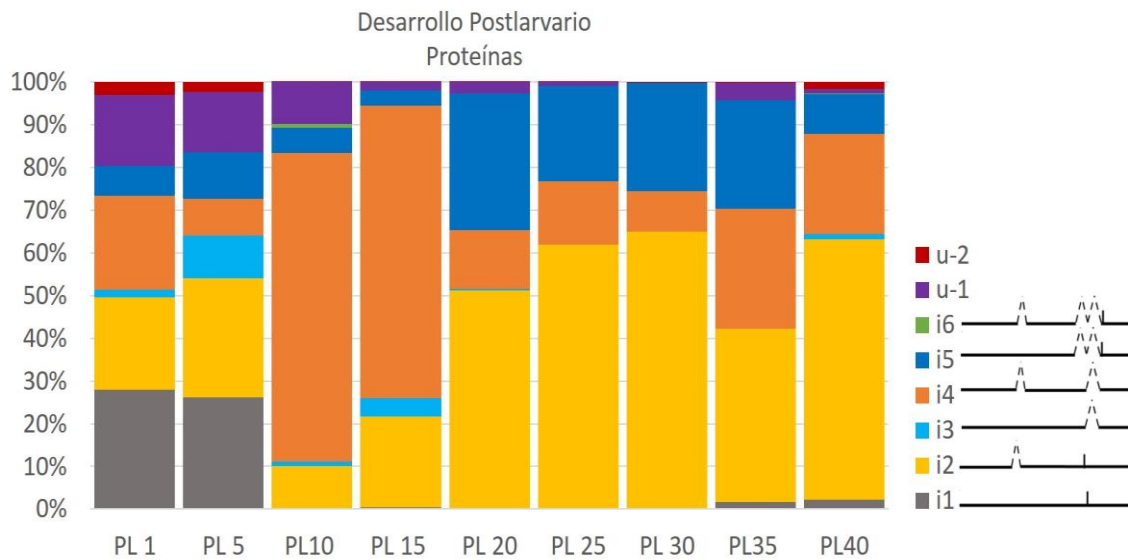


Figura 24. Porcentaje relativo de abundancia de cada proteína PvanSXL detectada por Western blot en desarrollo postlarvario. PL 1 al 40 = Postlarvas de un día a 40 días de desarrollo.

En gónada de subadultos, donde sí se contó con réplicas y se hizo un análisis de varianza factorial y de medias (LSD de Fisher) se encontraron diferencias en la abundancia de las diferentes isoformas, pero no entre hembras y machos, aunque la interacción entre género e isoforma mostró una tendencia, de forma que al analizar las medias por género e isoforma, la i4 estuvo en mayor abundancia en machos que en hembras. En hembras fueron las isoformas i2 y la i5 las de mayor abundancia, pero no se encontraron diferencias significativas entre i1, i2, i3, i4 e i5. Por otro lado, la i6 fue significativamente la menos expresada junto con la u-1 y u-3 (Fig. 25).

En el caso de gónada de machos subadultos, i4 fue significativamente mayor que las demás, no existen diferencias significativas entre la i1, i2, i5 y u-3, mientras que la i3, i6 y u-1 son significativamente menos abundantes que las demás isoformas.

En el caso de la gónada de adultos solo se encontraron diferencias entre isoformas y no hay diferencias entre géneros. La isoforma i3 fue significativamente menor que la i4 y u-3, y éstas dos fueron las más expresadas, mostrando diferencias significativas con todas las otras isoformas. No se observaron diferencias entre i1, i2, i3, i5, i6 y u-1 (Fig. 25).

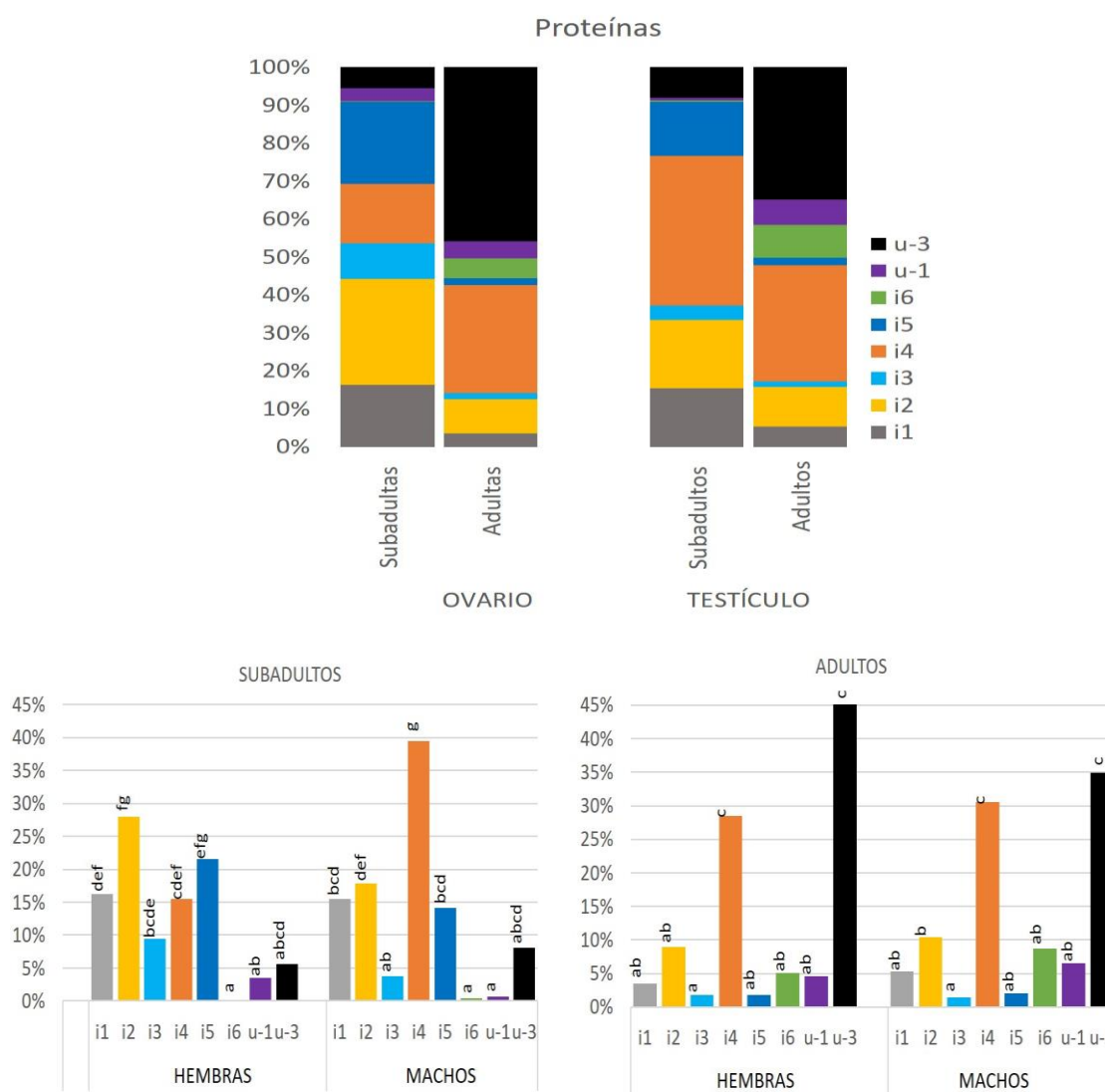


Figura 25. Comparación de medias del porcentaje relativo de cada isoforma de la proteína de PvanSXL (transformadas a arcoseno para su análisis) detectada por Western blot en gónadas de hembras y machos (subadultos y adultos).

7.6 Comparación de análisis de abundancia entre transcritos y proteínas.

Al comparar los resultados de la expresión de la transcripción y la detección de proteínas, se observó que se detectaron tres proteínas más de lo esperado y una diferencia en la abundancia entre las isoformas.

En el desarrollo embrionario, desde el cigoto hasta la mórula, no hubo diferencia entre los transcritos. Sin embargo, en proteínas, la i5 fue imperceptible de cigoto a mórula, pero es la más abundante en G2, G3 así como en zoea; mientras que la isoforma proteica i6 fue más abundante en nauplio y prácticamente no se observó en la gástrula (G2 y G3), y mysis. La i2 consistentemente se observa en muy baja abundancia durante estadios larvarios (Nauplio, Zoea y Mysis). La isoforma 3 del transcrito (*PvanSxl-3*) disminuye gradualmente al avanzar el desarrollo larvario, sin embargo, su proteína aumenta y alcanza una proporción similar a la *PvanSXL-4*, siendo estas dos las más abundantes en mysis (Fig. 26).

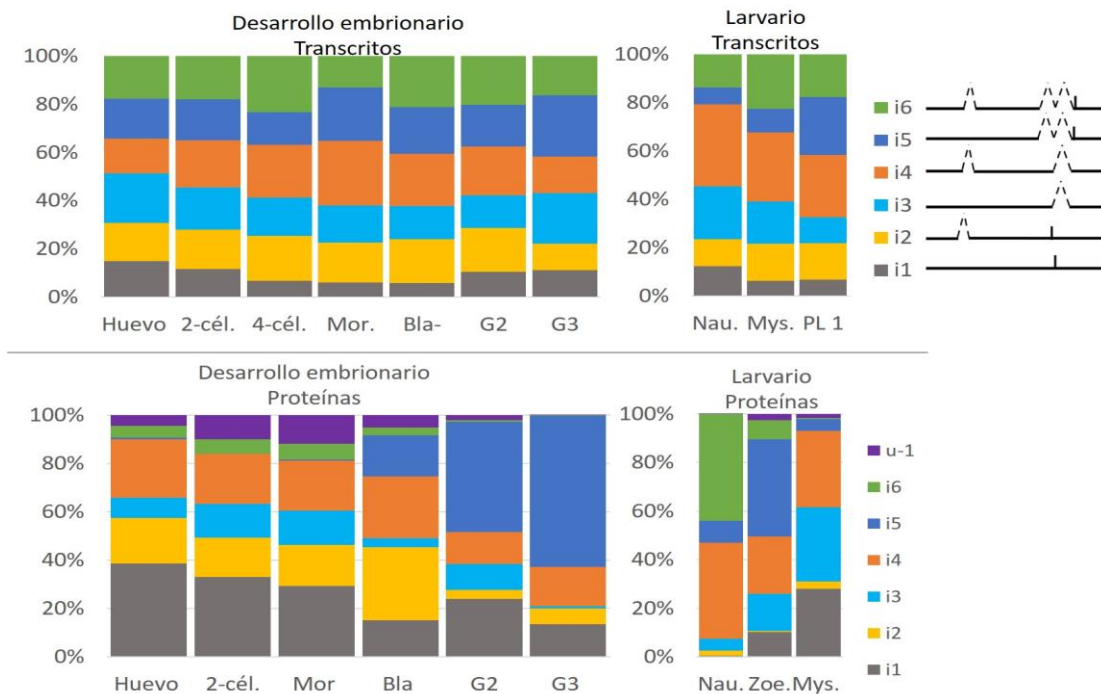


Figura 26. Comparación de abundancias de isoformas Sex-lethal de *P. vannamei* durante el desarrollo embrionario y larvario temprano. Transcritos (arriba) y proteínas (abajo).

En el desarrollo postlarvario, la proteína i3 tiene una abundancia muy baja, y no se observó la i1 desde PL 10 hasta PL 30. En el análisis de la abundancia de los transcritos, en PL15 y PL20 la i4 fue significativamente mayor, pero a partir de PL30 la abundancia de la i2 fue mayor, seguida de la i4. En cuanto a la abundancia de las proteínas, la i4 fue mayor en PL10 y PL15, y a partir de PL20 la i2 fue la mas abundante al igual que en los transcritos, sin embargo en este caso es seguida por la i5 en PL20 hasta PL30, y solo en PL35 y PL40 es seguida por la i4, pero en menor proporción al comparar con las isoformas de los transcritos (Fig. 27).

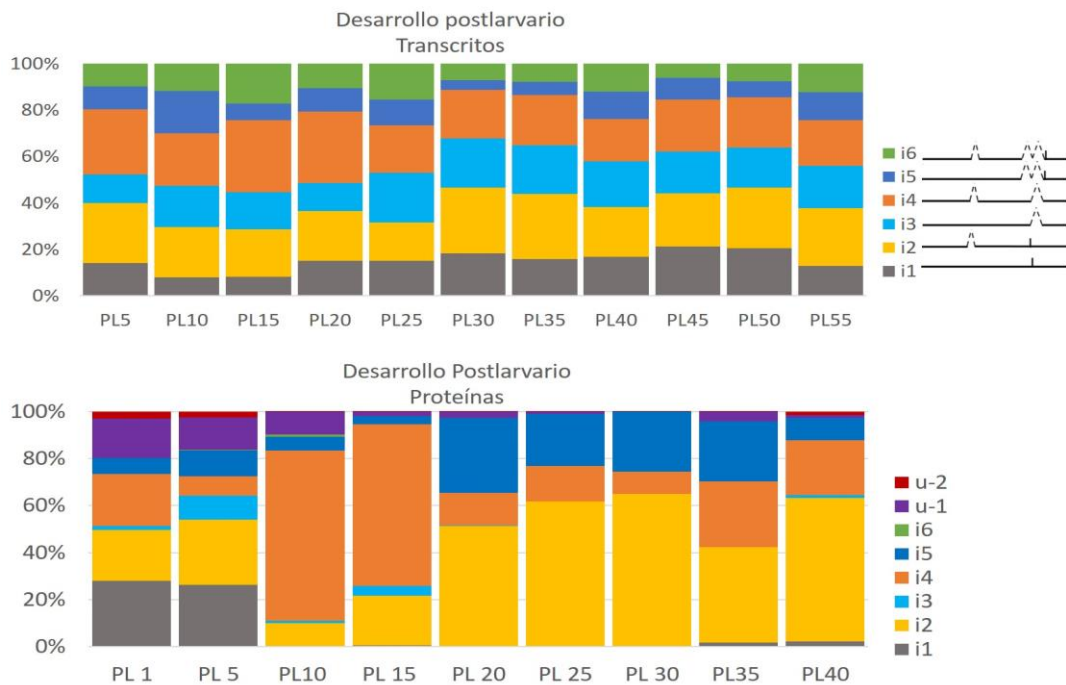


Figura 27. Comparación de abundancias de isoformas Sex-lethal en *P. vannamei* durante el desarrollo postlarvario. Transcritos (arriba) y proteínas (abajo).

En el caso de la gónada de subadultos, la abundancia de la proteína i2 fue alta en ambos sexos similar a lo observado en los transcritos, sin embargo, en hembra subadulto no fue significativamente diferente de i5, que fue la segunda más abundante. En el caso de machos subadultos la isoforma i4 del transcrito fue la segunda más abundante, pero en proteínas la i4 fue significativamente mayor a la i2.

En gónada de adultos el transcrito i4 fue más abundante en machos y en hembras fue el i2; sin embargo, en proteínas el i4 y u-3 fueron significativamente mayores en ambos sexos. Cabe resaltar que en ambos sexos la proteína u-3 fue la más expresada, aunque sin presentar diferencias significativas respecto a i4. Esta proteína presenta un tamaño no esperado de 22 kDa con base en los transcritos aislados.

Por otro lado, la i3 presentó menor abundancia en proteínas que en transcritos, mientras que la i5 fue mayor en proteínas que en transcritos, pero solamente en subadultos ya que en adultos esta es imperceptible. Finalmente, la abundancia de i1 es muy similar entre transcritos y proteínas (Fig. 28).

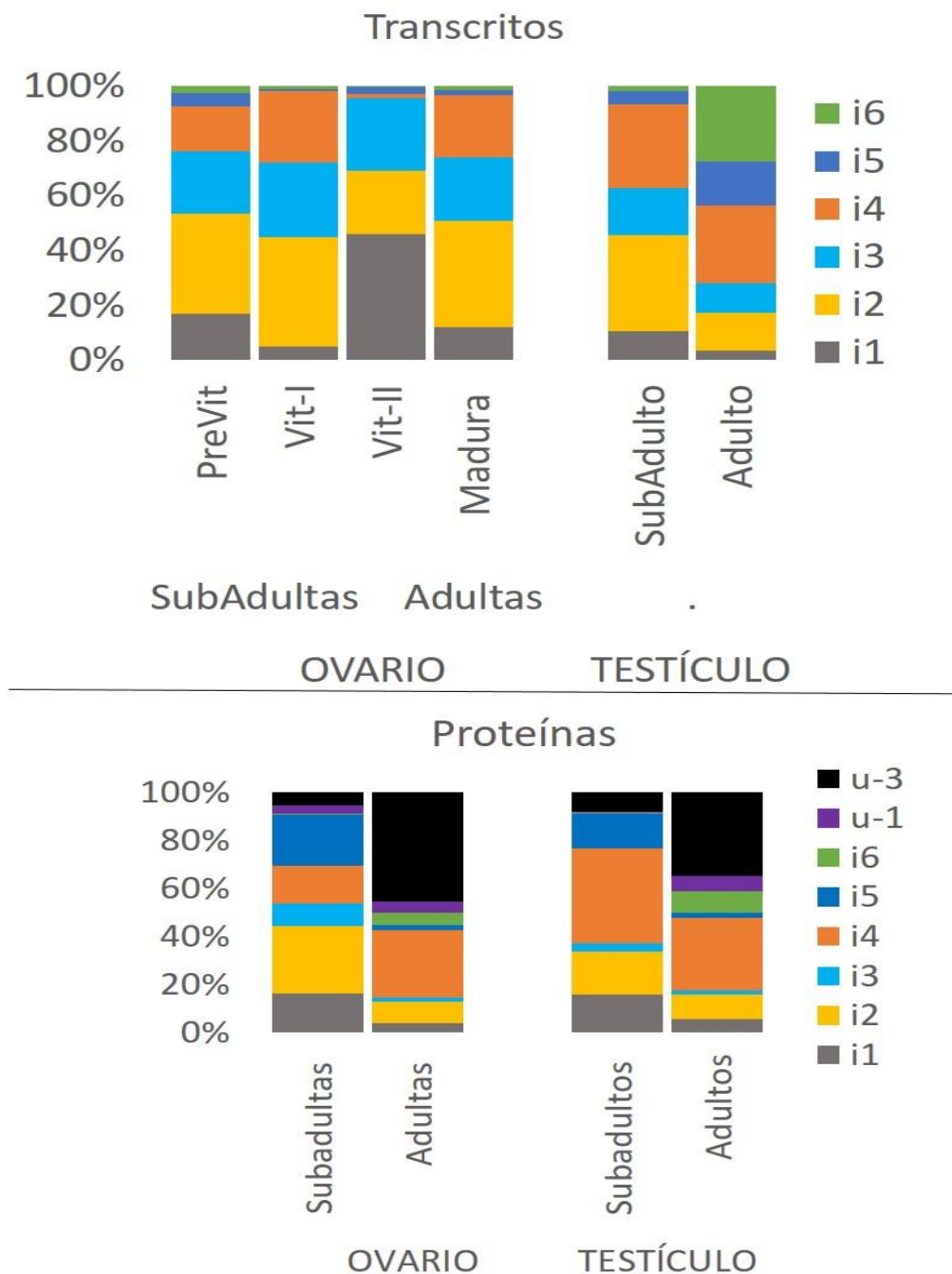


Figura 28. Comparación de abundancias de isoformas de Sex-lethal de *P. vannamei* en gónada de hembra y macho en diferentes edades (Subadulto y adulto). Transcritos (arriba) y proteínas (abajo).

8. DISCUSIÓN

Hasta el momento los estudios enfocados al aislamiento y caracterización de genes involucrados en la cascada génica de diferenciación sexual en crustáceos han sido pocos: de *Tra* (Kato *et al.*, 2010) y de *Dsx* (Kato *et al.*, 2011) en *D. magna*; dos variantes de *Sxl* en *D. pulex* (Colbourne *et al.*, 2011); *Tra-2* y secuencias parciales de *Sxl* en *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2006); secuencias parciales de *Sxl* en *M. japonicus* (Aoki, datos no publicados); tres variantes de *Tra-2* en *F. chinensis* (Li *et al.*, 2012); dos variantes *Sxl* (Zhang *et al.*, 2013a), y un transcrito de *Tra-2* (Zhang *et al.*, 2013b) en *Macrobrachium nipponense*; y finalmente el gen *Dmrt* (Zhang y Qiu, 2010) y dos variantes del gen *Sxl* (Shen *et al.*, 2014) en *E. sinensis*.

En este sentido, el presente trabajo es el primero en reportar más de dos isoformas *Sxl* en una especie de crustáceo, encontrando seis isoformas expresadas diferencialmente a nivel transcripcional y traduccional durante las diferentes etapas del desarrollo ontogénico y gametogénico.

En contraste, en otras especies de crustáceos e insectos en los que no se presentan isoformas sexo-específicas, solo dos isoformas *Sxl* han sido reportadas, corta y larga (o referidas como 1 y 2). Por otro lado, en *D. melanogaster*, *Sxl* se transcribe en ambos sexos (Bell *et al.*, 1988; Maine *et al.*, 1985; Salz *et al.*, 1989) con aproximadamente 21 transcritos que difieren entre sí en tamaño como resultado de corte-y-empalme alternativo, y sitios alternativos de poliadenilación. Los diferentes transcritos en *D. melanogaster* se clasifican en tres grupos: hembra-específico temprano, hembra-específico tardío y macho-específico tardío (Salz y Erickson, 2010; Samuels *et al.*, 1991).

En *P. vannamei* las seis isoformas *Sxl* tienen en común la región 5'-UTR, pero difieren entre sí en el tamaño del marco de lectura (ORF), principalmente debido a corte-y-empalme alternativo y por la presencia de dos sitios de poliadenilación. Debido a que previamente no se ha caracterizado el gen completo de *Sxl*, se empleó el descrito en *D. pulex* (Colbourne *et al.*, 2011) buscando entender la

estructura exón-intrón, lo que permitió localizar los límites entre exones de *PvanSxl*, identificando cinco exones presentes en ambas especies (Fig. 29).

Interesantemente, el primer sitio de corte y empalme (SS1) de 51 nt observado en las isoformas *PvanSxl*-2, -4 y -6, no corresponden a un exón en *D. pulex*, sino al intrón dos (66 nt). Respecto a lo anterior, en algunas especies de *Drosophila*, así como en *M. scalaris*, se ha reportado un exón llamado exón Z, localizado previo a la región 5' del exón tres, que en estas especies es el exón macho específico (Cline *et al.*, 2010), el cual también presenta corte-y-empalme alternativo. No se sabe si existe una función específica asociada con la retención o la extrusión del posible intrón dos, correspondiente al primer sitio de corte y empalme (SS1).

Al igual que el exón Z en *D. melanogaster*, SS1 en *P. vannamei* contiene un codón ATG que podría indicar un nuevo sitio de inicio de la transcripción para *Sxl*, pero si no se producen más modificaciones a la transcripción y se emplea el mismo marco de lectura, una vez traducida, se produciría una proteína de 7 aa (MFQDHTH) debido a la presencia de un codón de paro al inicio del exón tres.

Recientemente hemos logrado obtener el intrón dos del gen *Sxl* utilizando el genoma de *Penaeus vannamei* recién liberado. Este intrón es, a diferencia del de *Daphnia magna*, de aproximadamente 3,964 nucleótidos, y al parecer la parte retenida en las isoformas 2, 3 y 4 resulta de un corte y empalme alternativo, reteniendo una parte pequeña del intrón.

Por otro lado, el primer sitio de corte y empalme (SS1) en donde parte del intrón dos es retenido, es único de *P. vannamei*, es decir, no ha sido reportado para las otras especies de crustáceos en los que se ha aislado y caracterizado *Sxl*, no así el segundo sitio de corte y empalme (SS2) el cual se encuentra entre los exones cuatro y cinco en el alineamiento con *D. pulex* (Fig. 29) y ha sido reportado como intrón alternativo que da lugar a las dos isoformas de *Sxl* presentes en *E. sinensis*, *M. nipponense* y *Procambarus clarkii* (Shen *et al.*, 2014).

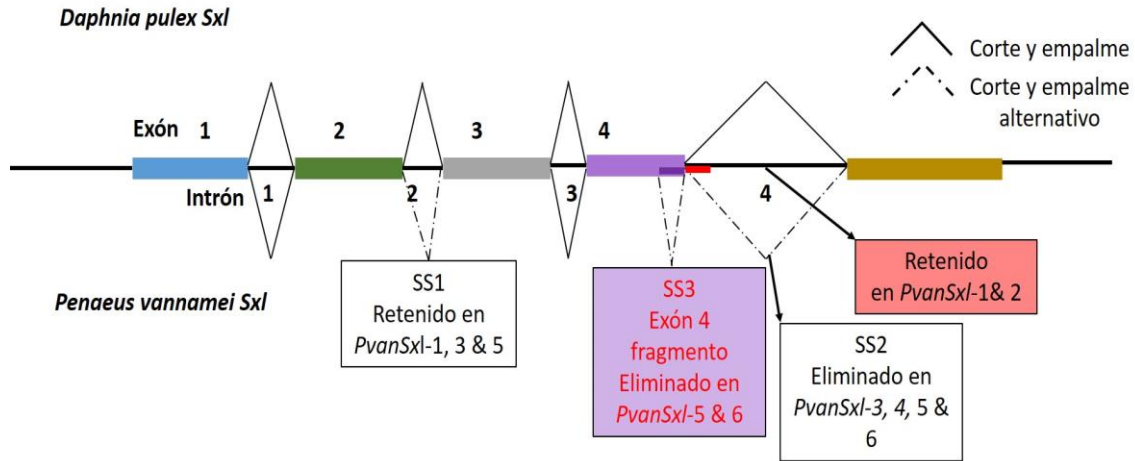


Figura 29. Comparación de estructura exón-intrón entre *Sxl* de *D. pulex* y *P. vannamei*. Patrón de corte-y-empalme de *D. pulex*, y patrón de corte-y-empalme observado en *P. vannamei*.

Al analizar el gen *Sxl* y las dos isoformas predichas a transcribir en *D. pulex*, se puede observar que esta región de 77 nt en *P. vannamei* corresponde a una parte del intrón cuatro, localizado en el extremo 5' del intrón y con un tamaño de 36 nt en *D. pulex*. En las isoformas de *Daphnia* en las que esta secuencia se escinde con el resto del intrón 4, es decir en *DpuSXL2*, conduce a una proteína deducida de mayor tamaño (297 aa). En las otras especies de crustáceos (Shen *et al.*, 2014), las isoformas que escinden esta región corresponden a las *Sxl* largas, y en *P. vannamei* a *PvanSxl-3* (334 aa) y *PvanSxl-4* (317 aa).

En el caso alternativo, cuando el fragmento de 77 nt de este intrón es retenido, un codón de paro localizado 21 nt hacia la región 3' (a partir del inicio del intrón) conduce a una proteína pequeña como se observa en la variante *Sxl* corta de otras especies de crustáceos (Shen *et al.*, 2014), proteína de 263 aa de *D. pulex*, y en *PvanSxl-1* (261 aa) y *PvanSxl-2* (243 aa) de *P. vannamei*.

Finalmente, el tercer sitio de corte y empalme (SS3) observado en *PvanSxl-5* y *PvanSxl-6*, no ha sido reportado en otra especie de crustáceo, podría ser resultado de un sitio aceptor de corte y empalme alternativo dentro del exón cuatro, un fenómeno que se conoce que se presenta en transcritos de *Sxl* de *D. melanogaster* (Bell *et al.*, 1988).

Cuando SS3 es extruido junto con SS2, el marco de lectura (ORF) cambia, escindiendo una parte significativa del exón cuatro en la terminación 3', resultando en un codón de paro prematuro, un transcrito corto y una traducción ORF corta. Las dos isoformas que extruyen SS2 y SS3 (*PvanSxl-5* y *PvanSxl-6*, 231 y 214 aa respectivamente) difieren entre sí en tamaño como resultado de la retención o no del intrón dos (SS1). Se observó que SS3 siempre es extruido junto a SS2 (intrón cuatro).

Otras diferencias en el tamaño de los transcritos de *PvanSxl* son resultado del uso de cualquiera de los dos sitios de poli-adenilación (secuencias que contienen AATAAA), similar a *Sxl* en *Drosophila* en donde se sabe que se presentan diferentes señales de poli-A (Salz y Erickson, 2010; Samuels *et al.*, 1991).

Como se ha observado en el mRNA de *Sxl* en otras especies, la traducción conceptual de isoformas *PvanSxl* resulta en proteínas deducidas de diferente tamaño, las cuales presentan en común dos regiones de reconocimiento del ARN (RRM) altamente conservadas, a excepción de los pocos aminoácidos que las separan entre sí, la conocida región enlazadora (linker región), la cual es característica de *Sxl* en *Drosophila* (revisado en Penava y Sánchez, 2003).

En *D. melanogaster*, la RRM dirige la diferenciación sexual y compensación de dosis del cromosoma X, donde la proteína SXL se une a su propio pre-ARNm y promueve el corte y empalme hembra específico del pre-ARNm de *tra* mediante la unión a la región polipirimidinica rica en uracilo en el sitio de corte y empalme 3' no sexo específico, durante la determinación sexual (Handa *et al.*, 1999).

Por otro lado, las proteínas traducidas más largas en *P. vancouverensis*, *PvanSxl-3* y *PvanSxl-4* (334 aa y 317 aa), contienen un dominio rico en glicina en la región carboxilo terminal. En *Drosophila*, SXL también contiene este dominio, sin embargo, se localiza en la región amino terminal, la cual es una característica conservada evolutivamente y se ha propuesto que este dominio es responsable de las interacciones proteína-proteína. El dominio rico en glicina es necesario para el control adecuado del corte y empalme alternativo de *Sxl* (Lallena *et al.*, 2002; Wang y Bell, 1994; Wang *et al.*, 1997) debido a que la eliminación de este dominio,

aunque no afecta la unión al ARN, interfiere con la regulación adecuada del corte y empalme (Blanchette y Chabot, 1999). Este dominio también se observa en otras proteínas que regulan corte y empalme de ARN. Tanto las RRM's como el dominio rico en glicina sugieren que las isoformas *PvanSxl-3* y *PvanSxl-4* (aunque no son sexo-específicas) tienen una función de unión al ARN y de corte y empalme del mismo.

En los análisis filogenéticos, las secuencias se agruparon claramente en grupos taxonómicos: crustáceos (orden: Decápoda y Cladópera) e insectos. En el caso de los insectos, aquellos pertenecientes al orden Nematocera se separaron del resto, y la secuencia correspondiente a Sister-of-sex-lethal (*Ssx*) mostró mayor distancia respecto a *Sxl*. En este sentido, se sabe que las isoformas *Sxl* observadas en insectos no drosofilidos muestran alta similitud con *Sxl* de drosofilidos, así como con *Ssx*, una proteína paróloga de *Sxl* presente solo en especies de *Drosophila* (Traut *et al.*, 2006), y que recientemente se ha descrito que tiene función en la represión de la traducción de *male-specific lethal-2 (msl-2)* al unirse a su región 5' (Moschall *et al.*, 2017). En crustáceos se han reportado no parálogos similares a *Ssx*, indicado que, eventos de duplicación dieron lugar a *Sxl* y *Ssx* recientemente en tiempo evolutivo.

Aunque se observó que ninguna de las isoformas es sexo-específica, la PCR de punto final en diferentes tejidos, mostró diferencias aparentes de expresión entre tejidos por sexo. La mayor expresión de *PvanSxl* se observó en pedúnculo ocular y ovario, a diferencia de lo reportado en *E. sinensis* y *M. nipponense* donde la mayor expresión es reportada en testículo-hepatopáncreas y hepatopáncreas-intestino respectivamente, mientras que el pedúnculo ocular y el ovario mostraron la expresión más baja en estas especies (Shen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013a). Sin embargo, en *E. sinensis* la expresión de *Sxl* fue dependiente del estadio de madurez posterior a la ablación del tallo ocular en ambos sexos (la cual induce maduración), la mayor expresión se observó en ovario y músculo, mientras que en testículo la expresión disminuyó (Shen *et al.*, 2014).

Todas las isoformas *PvanSxl* se observaron a lo largo del desarrollo embrionario, larvario y gametogénico, aunque con diferencias en abundancia y patrones de expresión como se muestra en la sección de resultados. Debido a que todas se expresan simultáneamente, y no hay regiones específicas o únicas entre sí que permitan la cuantificación única de cada isoforma, no fue posible estimar su abundancia relativa por qPCR y las inferencias en abundancia de las diferentes isoformas se realizaron mediante la observación y análisis de intensidad de isoformas amplificadas empleando un par de oligonucleótidos específicos.

Se observó que a nivel de ARNm, durante los estadios de embriogénesis analizados las isoformas que tienden a ser más expresados fueron *PvanSxl-2* y *PvanSxl-4*, ambos eliminan la región SS1 (intrón dos de *D.pulex* y potencialmente exón Z en *D. melanogaster*).

A nivel proteína, se observó que la más abundante con diferencia significativa desde huevo fecundado hasta mórula, fue *PvanSxl-1* correspondiente al transcrito completo (261 aa, sin región rica en Glicina), sin embargo, en la formación del blastoporo, las proteínas más abundantes son *PvanSxl-2* y *PvanSxl-4* como se observa a nivel de transcritos.

Esto es interesante debido a que todas las proteínas predichas contienen las dos regiones RRM pero solamente la isoforma *PvanSxl-4* contiene el dominio rico en glicina debido a la eliminación de la región SS2 que conduce al cambio en el marco de lectura eliminando un codón de paro presente al inicio de la región SS2, una observación muy similar a lo reportado en la isoforma hembra-específica de *Drosophila*, donde la eliminación del exón 3 conduce a la eliminación del codón de paro que conduce a la proteína trunca macho-específica. Con estos resultados no se puede afirmar si *PvanSxl-4* participa en la regulación de corte y empalme de este u otro gen, sin embargo, como se menciona previamente, la región rica en glicina se requiere para la regulación correcta del corte y empalme en *Drosophila* (Blanchette y Chabot, 1999).

Por otro lado, al final de la embriogénesis, en gástrula avanzada (G3), el transcrito con mayor abundancia significativa fue *PvanSxl-5*, este mismo también fue de

mayor abundancia a nivel proteína en ambos estadios de gástrula (G2 y G3). Esta isoforma, es resultado de la extrusión de SS2 y SS3, la traducción de esta isoforma muestra que contiene las RRM, sin embargo, debido al paro prematuro de la transcripción conducen a una proteína de 231 aa, que no incluye la región rica en Glicina.

Se sabe que es en esta etapa (gastrulación) donde se da la diferenciación de células de mesendodermo que darán lugar a la línea germinal en peneidos (Hertzler, 2005; Pawlak *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008). El análisis de proteínas SXL de *P. vannamei* se observó un cambio evidente en la distribución de isoformas en donde la PvanSxl-1 disminuye hacia mórula, en blastocele se observa una transición en donde PvanSxl-2 y PvanSxl-4 son las más abundantes y finalmente en gastrulación la PvanSxl-5 es la más abundante.

En *D. melanogaster* se ha observado que la proteína SXL funcional está presente a partir de la formación del blastocele (Bopp *et al.*, 1991), y se sabe que sucede a la par de la disminución de transcritos *Sxl* hembra-específicos (Salz *et al.*, 1989). Aun no puede ser afirmado si las proteínas PvanSxl corresponden a la función descrita en *D. melanogaster*, sin embargo, si se puede decir que existe un patrón similar.

En estadios larvarios se observó que, a nivel transcrito, *PvanSxl-4* sigue siendo la más abundante, y a nivel de proteína, aunque no hay diferencias significativas, esta tiende a ser más abundante junto con PvanSxl-6 en nauplio, PvanSxl-5 en zoea y finalmente con PvanSxl-3 y PvanSxl-1 en mysis, estas dos últimas incrementan gradualmente conforme avanza el desarrollo larvario, cabe resaltar que PvanSxl-3 es la isoforma de mayor tamaño 334 aa (debido a la escisión de SS2) y que también contiene la región rica en Glicina, necesaria para la regulación de corte y empalme en *D. melanogaster*.

Durante el desarrollo postlarvario, las diferencias entre transcritos *PvanSxl* fueron muy sutiles, sin embargo, las más abundantes fueron *PvanSxl-4* (PL1 a PL 25), *PvanSxl-2* (PL30 en adelante) y PvanSxl-2 (a partir de PL20). Interesantemente estas dos isoformas presentan un patrón que coincide con los eventos de

diferenciación sexual interna y externa de la especie durante el desarrollo postlarvario, ya que en PL 12 se observa el lóbulo lateral y conductos sexuales de ambos sexos (Garza-Torres *et al.*, 2009), momento en que la proteína PvanSxl-4 tiene la mayor abundancia (PL10 y PL15). Además, PvanSxl-2 se convierte en la proteína más abundante a partir de PL20 en adelante. Se sabe que a partir de PL32, ya se pueden observar indicios de las estructuras sexuales externas, las cuales están ya visibles entre PL40 y PL50 (Garza-Torres *et al.*, 2009). El hecho de que para estas isoformas Sxl tenga mayor abundancia durante estos eventos, puede sugerir alguna función de Sxl durante el proceso de diferenciación sexual.

Es interesante observar que al inicio del desarrollo postlarvario (PL1 y PL5) la proteína PvanSxl-1 que corresponde al transcrito completo presenta abundancia similar a PvanSxl-2. PvanSxl-1 también presentó mayor abundancia precisamente al inicio de la embriogénesis, lo que pudiera sugerir que esta isoforma está presente y tiene alguna función previa a procesos significativos en el desarrollo y/o diferenciación sexual de la especie.

Por otro lado, las observaciones de expresión de Sxl en gónada femenina desde estadio de previtelogénesis hasta madurez, concuerda con lo observado en *D. melanogaster* en donde la presencia de Sxl se requiere para el desarrollo normal de la oogénesis (Bopp *et al.*, 1993; Schüpbach, 1985), en donde se sabe que regula el inicio de la oogénesis en células germinales mediante la regulación post-transcripcional de Nanos (Chau *et al.*, 2012). PvanSxl podría funcionar de manera similar a Sxl de *D. melanogaster*.

Tanto en gónada femenina como masculina en ambas edades (subadultos y adultos) las isoformas PvanSxl-2 y PvanSxl-4 fueron las que mostraron mayor expresión como lo observado en el desarrollo embrionario, pero a diferencia de la embriogénesis PvanSxl-1 y PvanSxl-3 también se expresaron durante la vitelogénesis secundaria de los ovocitos. No se sabe si estas isoformas son transferidas a los huevos, pero el hecho de que se observe menor amplificación para estas isoformas en el ovario maduro puede ser indicativo de que solo se transfieren PvanSxl-2 y PvanSxl-4. En *D. melanogaster* los transcritos Sxl se

transfieren al huevo exclusivamente para ser editadas (corte y empalme) para producir el transcrito hembra-específico (Bopp *et al.*, 1991).

A nivel de proteínas estas dos isoformas fueron las más abundantes en subadultos, donde se observó algo interesante, PvanSxl-2 y -5 fueron más abundantes en hembras y PvanSxl-4 fue mayor en machos, aunque ambas proteínas están presentes en el sexo contrario en menor abundancia. Es interesante reclacar que la abundancia de PvanSxl-4 mostró diferencias significativas sexo-específicas en subadultos pero no en adultos, lo que sugiere alguna función diferencial en el inicio de la maduración gonádica, la cual se pierde una vez alcanzada la madurez en ambos sexos. Esta posible función es aún especulativa y se requiere de más investigación para confirmarla y en su caso esclarecerla. En adultos, no se observaron diferencias entre sexos, la más abundante en ambos casos fue PvanSxl-4 además de u-3.

Las isoformas proteicas PvanSxl-2 y PvanSxl-4 junto con PvanSxl-6 comparten con *Sxl* de *D. melanogaster* la región enlazadora (linker región) entre las dos RRM, la cual consiste de siete aminoácidos, comenzando con glicina y terminando con treonina (Zhang *et al.*, 2014). Por otro lado, PvanSxl-3 y PvanSxl-5 contienen región enlazadora de mayor tamaño entre las RRM debido a la retención de la región SS1 (o intrón 2 en *D. pulex*), que incrementa la longitud la región enlazadora a 14 aa. Además, el transcrito *PvanSxl-5* (abundante en hembra subadulta) no contiene las regiones SS2 y SS3 como resultado de un aceptor de corte y empalme alternativo. La retención de la región SS1 es característica única de *P. vannamei*, porque incluso en aquellas especies en las que *Sxl* no tiene función en la determinación sexual, existe una conservación no sólo en los RRM sino también en la región enlazadora (Penalva y Sánchez, 2003) condición que no se observa en las isoformas proteicas PvanSxl-1, PvanSxl-3 y PvanSxl-5.

Por otro lado, se observó qué, aunque todas las isoformas PvanSxl están presentes a nivel de ARNm, no fue así a nivel de proteínas en donde PvanSxl-1 no se detectó en nauplio y postlarvas PL10-30; PvanSxl-2 no se observó en desarrollo larvario; PvanSxl-3 no se observó en formación de blastoporo,

gastrulación y PL20-35; y finalmente *PvanSxl-6* no se observó en desarrollo embrionario, mysis, desarrollo postlarvario y gónada femenina. *PvanSxl-3* y *PvanSxl-5* se observaron en muy baja abundancia en gónada de ambos sexos en edad adulta.

Lo anterior puede sugerir una posible función de *PvanSxl* como ARNs largos no codificantes (lncRNAs) lo cual debe investigarse en el futuro, porque si son lncRNAs pueden realizar otras funciones como, por ejemplo, la regulación de la expresión a través de mecanismos epigenéticos, transcripcionales o postranscripcionales (Marchese *et al.*, 2017). En *Drosophila*, por ejemplo, se sabe que, aunque grandes cantidades de ARNm se transfieren al huevo no fertilizado, éstos no se traducen a la proteína Sxl (Bopp *et al.*, 1993).

Hoy se sabe que durante la embriogénesis temprana en *Drosophila*, lncRNAs influyen en el inicio de la transcripción del promotor temprano (SxlPe) (Mulvey *et al.*, 2014). Por lo que el destino de los transcritos de *PvanSxl* como reguladores del promotor Sxl debe ser investigado en *P. vannamei*.

Por otro lado, el hallazgo de que el transcrito Sxl se expresa en machos no fue sorprendente porque se sabe que en *Drosophila* están presentes pequeñas isoformas de la proteína Sxl en tejidos masculinos (Bopp *et al.*, 1991). Sin embargo, el hallazgo de que en testis de subadulto dos de las isoformas *PvanSxl-2* y *PvanSxl-4* se expresaron altamente, y en el testículo adulto *PvanSxl-6* también fue altamente expresado fue ciertamente sorprendente. Estas isoformas escinden a SS1 (intrón 2 en *D. pulex*) y, por lo tanto, tienen una región enlazadora entre los RRM con la longitud conservada de 7 aa. Esto sugiere una función de Sxl durante la espermatogénesis de *P. vannamei*, probablemente durante la recombinación.

Esto es, además de la diferenciación sexual y la ovogénesis en *D. melanogaster*, Sxl desempeña un papel durante la recombinación de cromosomas homólogos, participando en su emparejamiento y formación de quiasmas. Mientras que en *D. melanogaster* sólo ocurre la recombinación en hembras (Bopp *et al.*, 1999), en estudios recientes de mapeo genético en *P. vannamei* con múltiples marcadores de tipo SNP han encontrado que no hay diferencia en las frecuencias de

recombinación entre los grupos de ligamiento de machos y hembras (Yu *et al.*, 2015), apoyando un papel potencial de *Sxl* en la recombinación y explicando su presencia tanto en testículos como en el núcleo de ovocitos en estadios tempranos de meiosis (previtelogénicos) (López-Cuadros, 2014). Además, la expresión de *PvanSxl* también se detectó en el núcleo espermático y el citoplasma (López-Cuadros, 2014), lo que indica que además del posible papel en la recombinación, este gen puede tener una función adicional más adelante que en las etapas meióticas masculinas que deben investigarse en el futuro.

Finalmente, la detección de proteínas de diferente tamaño al esperado, u1 (20 kDa) presente en todos los estadios y gónadas de ambos géneros; u2 (25 kDa) presente en desarrollo postlarvario, y u3 (22 kDa) presente en gónada masculina y femenina; puede corresponder a transcritos diferentes no aislados anteriormente o a modificaciones post-traduccionales que le confieran peso molecular diferente al esperado; de ser el caso, dichas modificaciones post-traduccionales podrían aportar información valiosa para esclarecer la función o funciones de *Sxl* en *P. vannahmei*, por lo que el tema requiere mayor investigación.

9. CONCLUSIONES

1. En *P. vannamei*, se generan al menos seis transcritos diferentes de *PvanSxl* mediante corte y empalme alternativo, siendo este el primer reporte de más de dos isoformas *Sxl* en un crustáceo y en un no Drosofilida.

2. *Sxl* está presente en todos los tejidos/órganos de ambos sexos de camarón blanco, siendo la gónada femenina la que presentó mayor “abundancia” en contraste con la gónada masculina, seguida de pedúnculo, intestino y hepatopáncreas, mientras que en cerebro, corazón y músculo es casi imperceptible.

3. Las seis isoformas se expresan y traducen durante el desarrollo embrionario, larvario y postlarvario, así como durante la gametogénesis tanto en gónadas masculinas como femeninas; si bien su presencia no parece ser específica de sexo o de algún estadio en particular, su abundancia tanto a nivel transcrito como a nivel proteína si mostró algunos patrones específicos.

4. Las isoformas más abundantes a nivel de transcrito y proteínas fueron *PvanSxl-4* que escinde a SS1 y SS2, seguida de *PvanSxl-2* que sólo escinde a SS1.

5. No todas las isoformas fueron detectadas a nivel proteico en todos los estadios analizados. Es posible que, en estos estadios, éstas tengan una función como lncRNAs, como se reporta en *Drosophila* donde *Sxl* presenta funciones transcripcionales y post-transcripcionales.

6. Los resultados de este trabajo, junto con los resultados de expresión de *Sxl* durante el desarrollo embrionario, larvario, post-larvario, así como en diferentes tejidos de otros crustáceos (Shen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013a, 2013b), sugieren que en Peneidos, *Sxl* podría desempeñar funciones importantes en el desarrollo embrionario y la gametogénesis, incluso en la diferenciación sexual pero no en la determinación del sexo, ya que éste se define mediante mecanismos cromosómicos.

Para poder obtener respuestas sobre potenciales funciones de *Sxl* en la diferenciación y desarrollo sexual en camarones peneidos se requieren estudios adicionales.

10. LITERATURA CITADA

- Aflalo, E.D., A. Bakhrat, S. Raviv, D. Harari, A. Sagi, U. Abdu. 2007. Characterization of a *vasa-like* gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 172–177.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, D. Lipman. 1990. Basic local alignment tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baranski, M., G. Gopikrishna, N.A. Robinson, V.K. Katneni, M.S. Shekhar, J. Shanmugakarhik, S. Jothivel, C. Gopal, P. Ravichandran, M. Kent, M. Arnyasi, A. G. Ponniah. 2014. The development of a high density linkage map for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) based on cSNPs. *PLoS One*, 9(1): e85413.
- Bell, L.R., E.M. Maine, P. Schedl, T.W. Cline. 1988. *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* 55, 1037–1046.
- Bell, T.A., D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Allen Press, Kansas, USA.
- Biffis, C., F. Alwes, G. Scholtz. 2009. Cleavage and gastrulation of the dendrobranchiate shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda). *Arthropod Structure Development.* 38: 527–540.
- Blanchette, M., B. Chabot. 1999. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* 18, 1939–1952.
- Bopp, D., L.R. Bell, T.W. Cline. 1991. Developmental distribution of female-specific *Sex-lethal* proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 5, 403–415.
- Bopp, D., J.L. Horabin, R.A. Lersch, T.W. Cline, P. Schedl. 1993. Expression of the *Sex-lethal* gene is controlled at multiple levels during *Drosophila* oogenesis. *Development.* 118: 797–812.
- Bopp, D., C. Schutt, J. Puro, H. Huang, R. Nothiger. 1999. Recombination and disjunction in female germ cells of *Drosophila* depend on the germline activity of the gene *Sex-lethal*. *Development* 126, 5785–5794.
- Budd, G.E., M.J. Telford. 2009. The origin and evolution of arthropods. *Nature.* 457:812–817.
- Burghardt, G., M. Hediger, C. Siegenthaler, M. Moser, A. Dübendorfer, D. Bopp. 2005. The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev Genes Evol.* 215:165–176
- Camara, N., C. Whitworth, M. Van Doren. 2008. The creation of sexual dimorphism in the *Drosophila* soma. *Current Topics in Developmental Biology.* 83:65–107.
- Campos-Ramos, R., R. Garza-Torres, D.A. Guerrero-Tortolero, A.M. Maeda-Martínez, H. Obregón-Barboza. 2006. Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 37:1583–1593.

- Carmi, I., B. J. Meyer. 1999. The Primary Sex Determination Signal of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 152(3):999–1015.
- Chau, J., L. Shapiro Kulnane, H.K. Salz. 2012. *Sex-lethal* enables germline stem cell differentiation by down-regulating Nanos protein levels during *Drosophila* oogenesis. *PNAS* 109 (24), 9465–9470.
- Cline, T. 1984. Autoregulatory functioning of a *Drosophila* gene product that establishes and main-tains the sexually determined state. *Genetics*. 106:231–277.
- Cline, T.W., M. Dorsett, S. Sun, M.M. Harrison, J. Dines, L. Sefton, L. Megna. 2010. Evolution of the *Drosophila* feminizing switch gene *Sex-lethal*. *Genetics* 186:1321–1336.
- Colbourne J.K., M.E. Pfrender, D. Gilbert, W.K. Thomas, A. Tucker, T.H. Oakley, *et al.* 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*. 331:555–561.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nuc.Acids Res.* 16(22):10881-10890.
- Dübendorfer, A., M. Hediger. 1998. The female-determining gene *F* of the housefly *Musca domestica* acts maternally to regulate its own zygotic activity. *Genetics*. 150: 221–226.
- Dübendorfer, A., M. Hediger, G. Burghardt, D. Bopp. 2002. *Musca domestica*, a window on the evolution sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol.* 46: 75–79.
- Erickson, J.W., J.J. Quintero. 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5: e3332.
- Extavour, C.G. 2005. The fate of isolated blastomeres with respect to germ cell formation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Dev. Biol.* 277: 387–402.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Primera Edición. Roma. 274 pp.
- Feng, Z.F., Z.F. Zhang, M.Y. Shao, W. Zhu. 2011. Developmental expression pattern of the *Fc-vasa-like* gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*. 314(1–4): 202–209.
- 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. Tesis de Maestría. CIBNOR. 97 pp.
- Garza-Torres, R., R. Campos-Ramos, A.M. Maeda-Martínez. 2009. Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*. 296: 136–142.
- Gempe, T., M. Beye. 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays*. 33:52–60.

- Glenner H., P.F. Thomsen, H.B. Hebsgaard, M.V. Sorensen, E. Willerslev. 2006. Evolution. The origin of insects. *Science*. 314:1883–1884.
- Handa, N., O. Nureki, K. Kurimoto, I. Kim, H. Sakamoto, Y. Shimura, Y. Muto, S. Yokoyama. 1999. Structural basis for recognition of the *tra*-mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature*. 398(6728): 579-85.
- Hansen, D., D. Pilgrim. 1999. Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Mech Develop*. 83:3–15.
- Hashiyama, K., Y. Hyashi, S. Kobayashi. 2011. *Drosophila* *Sex lethal* Gene initiates Females Development in Germline Progenitors. *Science*. 333:885–888.
- Hertzler, P.L. 2005. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Malacostraca, Decapoda, Dendrobranchiata). *Arthropod Struct. Dev*. 34: 455–469.
- Hinson, S., R.N. Nagoshi. 2002. The involvement of ovarian tumour in the intracellular localization of Sex-lethal protein. *Insect Molecular Biology*. 11: 241–248.
- Hodgkin, J. 1986. Sex determination in the nematode *C.elegans*: analysis of *tra-3* suppressors and characterization of *fem* genes. *Genetics*. 114, 15–52.
- Hodgkin, J. 2002. Exploring the envelope: systematic alteration in the sex-determination system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 162:767–780.
- Johnson, C.L., A.M. Spence. 2011. Epigenetic licensing of germline gene expression by maternal RNA in *C. elegans*. *Science*. 333(6047):1311–1314.
- Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe, T. Iguchi. 2010. Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. *Genomics*. 95:160–165.
- Kato, Y., K. Kobayashi, H. Watanabe, T. Iguchi. 2011. Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a *Doublesex* gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genet* 7: e1001345.
- Koebernick, K., T. Pieler. 2002. Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation*. 70, 69–76.
- Korpelainen, H. 1990. Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol. Rev.* 65:147-184.
- Kraemer, C., E.R. Schmidt. 1993. The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma*. 102: 553–562.
- Kuwabara, P.E., J. Kimble. 1995. A predicted membrane protein, TRA-2a, directs hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 121: 2995–3004.
- Kumar, S., G. Stecher, K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874.
- 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: 461–473.

- Lagos, D., M.F. Ruiz, L. Sánchez, K. Komitopoulou. 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *sex-lethal* and *doublesex* genes of the *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 384: 111–121.
- Lagos, D., M. Koukidou, C. Savakis, K. Komitopoulou. 2007. The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol. Biol.* 16: 221–230.
- Lallena, M.J., K.J. Chalmers, S. Llamazares, A.I. Lamond, J. Valcárcel. 2002. Splicing regulation at the second catalytic step by *Sex-lethal* involves 3' splice site recognition by SPF45. *Cell* (3), 285–296.
- Le, S.Q., O. Gascuel. 2008. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Evol.* 25(7):1307-1320.
- Leelatanawit, R., K. Sittikankeaw, P. Yocawibun, S. Klinbunga, S. Roytrakul, T. Aoki, I. Hirono, P. Menasveta. 2009. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A* 512: 66–76.
- Legrand, J.J., E. Legrand-Hamelin, P. Juchault. 1987. Sex determination in Crustacea. *Biol. Rev.* 62: 439-479.
- Lezer, Y., E.D. Aflalo, R. Manor, O. Sharabi, K.L. Avilevich, A. Sagi. 2014. On the safety of RNAi usage in aquaculture: The case of all-male prawn stocks generated through manipulation of the insulin-like androgenic gland hormone. *Aquaculture*. 435: 157–166.
- 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.* 6:267–278
- Li, Y., K. Byrne, E. Miggiano, V. Whan, S. Moore. 2003. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture*. 219: 143–156.
- Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. 2002. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. México. España. 1084 pp.
- López-Cuadros, I. 2014. Caracterización y localización de la expresión de *Sxl* (*Sex-lethal*) en camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Maestría. CIBNOR. 87 pp.
- Maine, E.M., H.K. Salz, P. Schedl, T.W. Cline. 1985. *Sex-lethal*, a link between sex determination and sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 595–604.
- Marchese, F.P., I. Raimondi, M. Huarte. 2017. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol.* 18 (1), 206.
- Marin, I., B.S. Baker. 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science*. 281: 1990–1994
- Meise, M., D. Hilfiker-Kleiner, A. Dübendorfer, C. Brunner, R. Nöthiger, D. Bopp. 1998. *Sex-lethal* the master sex-determining gene in *Drosophila* is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*. *Development*. 125: 1487–1494.

- Moschall, R., D. Strauss, M. García-Beyaert, F. Gebauer, J. Medenbach. 2017. *Drosophila Sister-of-Sex-lethal* is a repressor of translation. *RNA* 24 (2), 149–158.
- Müller-Holtkamp, F. 1995. The *Sex-lethal* gene in *Chrysomya rufifacies* is highly conserved in sequence and exon-intron organization. *J.Mol.Evol.* 41:467–477.
- Mulvey, B.B., U. Olcese, J.R. Cabrera, J.I. Horabin. 2014. An interactive network of long non-coding RNAs facilitates the *Drosophila* sex determination decision. *Biochim.Biophys. Acta* 1839, 773–784.
- Nakkrasae, L., P. Damrongphol. 2007. A *vasa-like* gene in the giant freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol. Repro. Dev.* 74, 835–842.
- Nicolle, M., C.C. Akerib, B.J. Meyer. 1997. X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex. *Nature.* 388: 200–204.
- Niimi, T., K. Sahara, H. Oshima, Y. Yasukochi, K. Ikeo, W. Traut. 2006. Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene. *Genome.* 49:263–268.
- Okkema, P.G., J. Kimble. 1991. Molecular analysis of *tra-2*, a sex determining gene in *C. elegans*. *EMBO J.* 10: 171.176.
- Özhan-Kizil, G., J. Havemann, M. Gerberding. 2009. Germ cell in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on Vasa protein for their maintenance but not for their formation. *Dev. Biol.* 327: 230–239
- Pane, A., M. Salvemini, P.D. Bovi, C. Polito, G. Saccone. 2002. The *transformer* gene in *Ceratitidis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development.* 129: 3715–3725.
- Pawlak, J., M.J. Sellars, A. Wood, P.L. Hertzler. 2010. Cleavage and gastrulation in the Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate): A revised cell lineage and identification of a presumptive germ cell marker. *Develop. Growth Differ.* 52: 677–692.
- Penalva, L.O.F., L. Sánchez. 2003. RNA binding protein Sex-lethal (Sxl) and control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3), 343–359.
- Pomerantz, A.F., M.A. Hoy. 2014. RNAi-mediated knockdown of *transformer-2* in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* via oral delivery of double-stranded RNA. *Exp. Appl. Acarol.* DOI 10.1007/s10493-014-9852-5
- Robinson, N.A.; G. Gopikrishna, M. Baranski, V.K., Katneni. M.S. Shekhar, J. Shanmugakarthik, S. Jothivel, C. Gopal, P. Ravichandran, T. Gitterle, A.G. Ponniah. 2014. QTL for White spot syndrome virus resistance and the sex-determining locus in the Indian black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *BMC Genomics.* 15:731
- Rozen, S., H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Misener, S., S.A. Krawetz (ed.). *Methods in Molecular Biology.* Humana Press. Vol.32: Bioinformatics Methods and Protocols. USA. 365-386
- Ruiz, M.F., C. Goday, P. González, L. Sánchez. 2003. Molecular analysis and developmental expression of the *Sex-lethal* gene of *Sciara ocellarus*

- (Diptera Order, Nematocera Suborder). *Gene Expr. Patt. (Mech. Dev.)*. 3: 341–346.
- Ruiz, M.F., A. Milano, M. Salvemini, J.M. Eirín-López, A.L.P. Perondini, D. Selivon, C. Polito, G. Saccone, L. Sánchez. 2007. The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (dipteral, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE*. 2(11): e1239.doi:10.1371/journal.pone.0001239
- Saccone, G., I. Peluso, D. Artiaco, E. Giordano, D. Bopp, L. C. Polito. 1998. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development*. 125:1495-1500.
- SAGARPA. 2012. Anuario estadístico de Acuacultura y Pesca 2012 de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2012. México. 385 pp.
- Sagawa, K., H. Yamagata, Y. Shiga. 2005. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. *Gene Expr. Patterns* 5: 669–678.
- Salvemini, M., M. Robertson, B. Aronson, P. Atkinson, C. Polito, G. Saccone. 2009. *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene for female sex determination. *Int J Dev Biol*. 53:109–120.
- Salz, H. 2011. Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Current opinion in Genetics and Development*. 21:395–400.
- Salz, H.K., E.M. Maine, L.N. Keyes, M.E. Samuels, T.W. Cline, P. Schedl. 1989. The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. *Genes Dev*. 3, 708–719.
- Salz, H.K., J.W. Erickson 2010. Sex determination in *Drosophila*: the view from the top. *Fly (Austin)*. 4:60–70.
- Samuels, M.E., P. Schedl, T.W. Cline. 1991. The complex set of late transcripts from the *Drosophila* sex determination gene *Sex-lethal* encodes multiple related polypeptides. *Mol. Cell. Biol*. 11, 3584–3602.
- Sánchez, L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol*. 52: 837–856.
- Sarno, F., M.F. Ruiz, J.M. Erin-Lopez, A.L.P. Perondini, D. Selvon, L. Sánchez. 2010. The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evol Biol* 10:140. doi:10.1186/1471-2148-10-140.
- Schauer, I.E., W.B. Wood. 1990. Early *C. elegans* embryos are transcriptionally active. *Development*. 110:1303–1317.
- Sellars, M.J., R.E. Lyons, P.M. Grewe, T. Vuocolo, L. Leeton, G.J. Coman, B.M. Degan, N.P. Preston. 2007. A PL10 *vasa-like* gene in the Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, expressed during development and in adult gonad. *Mar. Biotechnol*. 9: 377–387.
- Serna, E., E. Gorab, M.F. Ruiz, C. Goday, J.M. Eirín-López, L. Sánchez. 2004. The gene *Sex-lethal* of the Sciaridae family (Order Diptera, Suborder Nematocera) and its phylogeny in dipteran insects. *Genetics*. 168: 907–921.

- Shen, H, Y. Hu, X. Zhou. 2014. *Sex-lethal* gene of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, induction by eyestalk ablation, and expression of two splice variants in males and females. *Dev Genes Evol.* DOI 10.1007/s00427-014-0467-y.
- Shukla, J.N., S.R. Palli. 2013. *Tribolium castaneum transformer-2* regulates sex-determination and development in both males and females. *Insect Biochem Mol Biol.* 43:1125–1132.
- Schüpbach, T. 1985. Normal female germ cell differentiation requires the female X chromosome to autosome ratio and expression of *Sex-lethal* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 109, 529–548.
- Sievert, V., S. Kuhn, A. Paululat, W. Traut. 2000. Sequence conservation and expression of the *Sex-lethal* homologue in the fly *Megaselia scalaris*. *Genome.* 43: 382–390.
- Staelens, J., D. Rombaut, I. Vercauteren, B. Argue, J. Benzie, M. Vuylsteke. 2008. High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics.* 179: 917-925.
- Suzuki, M.G., K. Suzuki, F. Aoki, M. Ajimura. 2012. Effects of RNAi-mediated knockdown of the *Bombyx mori transformer-2* gene on the sex-specific slicing of *Bmdsx* pre-mRNA. *Int J Dev Biol.* 56:693–699.
- Tan Fermin, J.D., R.A. Pudadera. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 77, 229–242.
- Tassanakajon, A., S. Klinbunga, N. Puanglarp, V. Rimpanichayakit, A. Udomkit, S. Jitrapakdee, K. Dangtip, A. Pongdara, S. Pongsomboon, P. Supungul, S. Tang, K. Kuphanumart, R. Pichyangkura, C. Lursinsap. 2006. *Penaeus monodon* gene discovery project: generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene.* 384: 104–112.
- Traut, W., T. Niimi, K. Ikeo, K. Sahara. 2006. Rhylogeny of the sexdetermining gene *Sex-lethal* in insects. *Genome.* 49: 254–262.
- Trend, 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: 43–56.
- Van Doren, M. 2011. Determining sexual identity. *Science.* 333:829–830.
- Ventura, T., R. Manor, E.D. Aflalo, S. Weil, S. Raviv, L. Glazer, A. Sagi. 2009. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinology.* 150(3):1278–86.
- Ventura, T., A. Sagi. 2012. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies. *Biotechnology advances.* 30: 1543–1550.
- Vied, C., J.I. Horabin. 2001. The sex determination master switch, *Sex-lethal*, responds to Hedgehog signaling in the *Drosophila* germline. *Dev.* 128, 2649-2660.
- Vied, C., N. Halachmi, A. Salzberg, J. I. Horabin. 2003. Antizyme is a target of sex-lethal in the *Drosophila* germline and appears to act downstream of

- hedgehog to regulate sex-lethal and cyclin B. *Developmental Biology*. 253(2):214-229.
- Wang, J., L.R. Bell. 1994. The Sex-lethal amino terminus mediates cooperative interactions in RNA binding and is essential for splicing regulation. *Genes Dev*. 8,2072–2085.
- Wang, J., Z. Dong, L.R. Bell. 1997. *Sex-lethal* interactions with protein and RNA. Roles of glycine-rich and RNA binding domains. *J. Biol. Chem.* 272, 22227–22235.
- Wang, S.W., P.L. Hertzler, H.C. Wallis Jr. 2008. Mesendoderm cells induce oriented cell division and invagination in the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Dev. Biol.* 320, 175–184.
- Yano, I. 1988. Oocyte development in the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 99, 549–553.
- You, E.M., K.F. Liu, S.W. Huang, M. Chen, M.L. Groumelle, S.J. Fann, H.T. Yu. 2010. Construction of integrated genetic linkage maps of the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using microsatellite and AFLP markers. *Animal Genetics*. 41: 365–376.
- Yu, Y., X. Zhang, J. Yuan, F. Li, X. Chen, Y. Zhao, L. Huang, H. Zheng, J. Xiang. 2015. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sci. Rep.* 5,15612.
- Yu, Y., X. Zhang, J. Yuan, Q. Wang, S. Li, H. Huang, F. Li, J. Xiang. 2017. Identification of sex-determining loci in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using linkage and association analysis. *Mar. Biotechnol.* 19, 277–286.
- Zhang, L., C. Yang, Y. Zhang, L. Li, X. Zhang. 2006. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetics*. 131: 37–49.
- Zhang, Y.P., H. Qiao, W.Y. Zhang, S.M. Sun, S.F. Jiang, Y.S. Gong, Y.W. Xiong, S.B. Jin, H.T. Fu. 2013a. Molecular cloning and expression analysis of two *Sex-lethal* homolog genes during development in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Genet Mol Res.* 12(4):4698–711.
- Zhang, Y.P., H.T. Fu, H. Qiao, S.B. Jin, S.F. Jiang, Y. Xiong, Y. Gong Y., X. Zhang. 2013b. Molecular cloning and expression analysis of *transformer-2* gene during development in *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Journal of the world Aquaculture Society*. 44 (3): 338–349.
- Zhang, Z., J. Klein, M. Nei. 2014. Evolution of the Sex-lethal gene in insects and origin of the sex-determination system in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 78 (1), 50–65.
- 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, 151–159.
- Zhao, G.F., G.L. Li, C.H. Zhu. 2009. Preliminary study on sex differentiation of *Litopenaeus vannamei*. *J. Guangdong Ocean Univ.* 3: 19–23.