

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Análisis del transcriptoma gonadal del abulón rojo *Haliotis
rufescens* cultivado en Baja California, México**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Edgar Alfonso López Landavery

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por
Edgar Alfonso López Landavery

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Codirector del Comité

Dra. Amelia Portillo López
Codirector del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Miembro del Comité

Dr. Cristian Jorge Gallardo Escárte
Miembro del Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Febrero, 2015

Resumen de la tesis de Edgar Alfonso López Landavery, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura.

Análisis del transcriptoma gonadal del abulón rojo *Haliotis rufescens* cultivado en Baja California, México

Resumen elaborado por:

Edgar Alfonso López Landavery

El abulón rojo *H. rufescens* (Swanson, 1822) es una especie de importancia comercial para la acuicultura en México, con niveles de producción anual alrededor de las 35 t y una gran demanda en el mercado internacional, por lo que se pretende incrementar su cultivo en la península de Baja California. El éxito en su cultivo dependerá por un lado de la crianza selectiva y por otro del conocimiento básico de la reproducción a nivel molecular. El abulón es una especie que madura antes de alcanzar la talla comercial y aunque existen las bases histológicas relacionadas con la diferenciación sexual y la maduración gonadal, poco se sabe de dichos procesos a nivel molecular. Por tanto, para conocer mejor el proceso reproductivo del abulón rojo, en el presente estudio se hace: a) un análisis del transcriptoma gonadal a través de bibliotecas de cDNA y secuenciación masiva para determinar genes sexo específicos asociados con la reproducción y b) un análisis de expresión diferencial de los genes sexo específico en diferentes tallas. El análisis de ontología (GO) de las bibliotecas de cDNA y la secuenciación 454 revelaron la presencia de genes sexo específicos asociados con la lisina del esperma (*LYS*), proteína de fertilización, receptor de lisina en la cubierta vitelina (*VERL*), entre otros. Asimismo, se encontraron genes asociados con la diferenciación de la línea germinal (*Vasa* y *Nanos*) y la determinación sexual. El análisis de asignación de sexos (usando *VERL* y *LYS*) y el análisis de los genes sexo específico mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa en cuatro intervalos de talla (5-15, 16-25, 26-35 y 36-45 mm) e individuos maduros demostró que los genes se expresaron en ambos sexos en todo el intervalo de tallas, aunque con niveles significativamente menores en el sexo al que no se les asocia tradicionalmente. Asimismo, los niveles de expresión diferencial ocurrieron en individuos con longitud de concha entre 26-35 y 36-45 mm. Además, con referencia en el GO se generó una base de datos de EST's para la elaboración de un macroarreglo de tejido gonadal de la hembra. De manera complementaria, las vías metabólicas más abundantes que se obtuvieron del GO, estuvieron asociadas con la síntesis de ácidos nucleicos y la obtención de energía reflejando el tipo de sustrato utilizado y la dinámica del metabolismo en la fase de maduración gonadal. Finalmente, se puede concluir que la expresión de genes asociados al sexo no es estrictamente sexo específica y que la diferenciación sexual en el abulón rojo ocurre entre los 16 y 25 mm de longitud de concha.

Palabras clave: **abulón, desarrollo gonadal, *Haliotis rufescens*, transcriptoma**

Abstract of the thesis presented by Edgar Alfonso Lopez Landavery as a partial requirement to obtain the Doctor in Science degree in Aquaculture.

Analysis of the gonadal transcriptome of red abalone *Haliotis rufescens* farmed in Baja California, Mexico

Abstract by:

Edgar Alfonso Lopez Landavery

The red abalone *H. rufescens* (Swanson, 1822) is an important species for commercial aquaculture in Mexico, with annual production levels around the 35 t and a high demand in the international markets, thus there are several plans in order to increase its production in Baja California. Success in its cultivation will depend on one hand from selective breeding and on the other basic knowledge of abalone reproduction at the molecular level. Abalone is a species that matures before reaching market size and although there are histological bases related to sexual differentiation and gonadal maturation, little is known about these processes at the molecular level. Therefore, in order to have a better understanding of the red abalone reproductive process, in the present study were carried out: a) an analysis of the gonadal transcriptome by cDNA libraries and massive sequencing to identify sex-specific genes associated with reproduction and b) an analysis of differential expression of the sex-specific genes related with abalone sizes. Gene Ontology (GO) analysis of the cDNA libraries and 454 sequencing revealed the presence of sex-specific genes associated with the sperm lysine (*LYS*), fertilization protein and vitelline envelopment receptor lysine (*VERL*), among others. We also found genes associated with germline differentiation (*Vasa* and *Nanos*) and sexual determination. The analysis of sex allocation (using *VERL* and *LYS*) and the analysis of sex-specific genes by reverse transcription and quantitative PCR in four intervals of size (5-15, 16-25, 26-35 and 36-45 mm) and mature individuals showed expression in both sexes, although with significantly lower levels in sex that are not traditionally associated. Also, differential expression levels occurred in individuals with shell length between 26-35 and 36-45 mm. In addition to, based on the GO analysis, it was generated an EST's database for a macroarray of female gonadal tissue. Complementarily, the most abundant metabolic pathways obtained were associated with nucleic acid synthesis and energy production reflecting the type of substrate used and the dynamics of metabolism in the stage of gonadal maturation. In conclusion, the expression of genes associated with sex is not strictly sex-specific and sexual differentiation in red abalone occurs between 16 and 25 mm of shell length.

Keywords: **abalone, gonadal development, *Haliotis rufescens*, transcriptome**

Dedicatoria

A mis padres María Nelly y Alfonso por todo su apoyo a pesar de la distancia.

A mis hermanos por todas las experiencias compartidas, risas y complicidades.

A Anaid por su tiempo y cariño.

Agradecimientos

Al CICESE por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A CONACYT por la beca otorgada para alcanzar esta meta.

A mis directores de tesis, Dr. Miguel A. del Río Portilla y Dra. Amelia Portillo López. Sin su profesionalismo, sus enseñanzas y consejos esto no habría sido posible. Fueron unos grandes maestros.

A mis sinodales, Dra. Carmen Paniagua Chávez, Dr. Cristian Gallardo Escárate y Dr. Jorge Cáceres Martínez. Gracias por sus críticas constructivas y sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la plana docente del Departamento de Acuicultura por brindarnos siempre lo mejor de su calidad humana y profesional.

A la Dra. Fabiola Lafarga por su amistad incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Rigoberto y Luis Miguel, por todas las horas compartidas no sólo de trabajo sino también de debates a nuestro estilo.

A todos los compañer@s, de las diferentes generaciones del Posgrado en Acuicultura y de otras áreas, que he conocido a lo largo de todo este tiempo y con los que he compartido muchas situaciones gratas.

A todo el personal administrativo del Departamento de Acuicultura, Servicios Escolares y Biblioteca por estar siempre dispuestos a ayudarnos.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a que esto se haga realidad.

A este país maravilloso por haberme adoptado todo este tiempo. Por su cultura, su gente y sus lugares encantadores.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiv
1. Introducción	
1.1 Generalidades del abulón.....	1
1.2 Importancia del recurso abulón en México.....	2
1.2.1 Pesquería.....	2
1.2.2 Cultivo.....	3
1.3 Biología reproductiva del abulón.....	3
1.3.1 Estrategias reproductivas en moluscos.....	3
1.3.2 Anatomía reproductiva del abulón.....	5
1.3.3 Estadios reproductivos y ciclo reproductivo gonadal.....	5
1.3.4 Factores exógenos que afectan la reproducción.....	6
1.3.5 Factores endógenos que controlan la reproducción.....	7
1.4 Determinación sexual en moluscos.....	8
1.4.1 Ambiental.....	8
1.4.2 Genética.....	9
1.4.2.1 Cromosómica.....	9
1.4.2.2 Balance de genes.....	10
1.5 Diferenciación sexual y talla de primera madurez sexual.....	11
1.5.1 Diferenciación sexual.....	11
1.5.2 Talla de primera madurez sexual.....	12
1.6 Genes relacionados con la reproducción de moluscos.....	13

Tabla de contenido (continuación)

1.7	Transcriptoma y transcriptómica.....	15
1.7.1	Teorema de la biología molecular.....	15
1.7.2	Características del RNA.....	15
1.7.3	Biología molecular del RNA.....	18
1.7.3.1	Etiquetas de secuencias expresables (EST's).....	19
1.7.3.2	Bibliotecas genómicas y de cDNA.....	19
1.7.3.3	Micro y macroarreglos.....	20
1.7.3.4	RT-qPCR.....	21
1.7.3.5	Secuenciación masiva y RNA-Seq.....	22
1.8	Ontología de genes.....	23
1.9	La reproducción y sus implicaciones en acuicultura.....	23
1.10	Hipótesis.....	25
1.11	Objetivos.....	25
1.11.1	General.....	25
1.11.2	Particulares.....	25
2.	Materiales y métodos	
2.1	Ontología de genes y elaboración de macroarreglo.....	26
2.1.1	Muestras de abulón.....	26
2.1.2	Extracción de RNA y construcción de bibliotecas.....	26
2.1.2.1	Bibliotecas de cDNA.....	26
2.1.2.2	Secuenciación 454.....	27
2.1.3	Procesamiento de datos.....	28
2.1.3.1	Limpieza de secuencias y ensamble.....	28
2.1.3.2	BLAST y análisis funcional de genes.....	28
2.1.4	Elaboración de macroarreglo con tejido gonadal de hembras de abulón.....	29
2.1.4.1	Obtención y análisis de secuencias.....	29
2.1.4.2	Obtención de insertos positivos y negativos.....	29

Tabla de contenido (continuación)

2.1.4.3 Elaboración de sonda mediante PCR.....	29
2.1.4.4 Evaluación de sonda marcada con digoxigenina.....	30
2.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón.....	31
2.2.1 Abulones y muestreo de tejidos.....	31
2.2.2 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y grupos experimentales....	31
2.2.3 Diseño de iniciadores y selección.....	32
2.2.4 RT-qPCR.....	33
2.2.5 Análisis de datos.....	34
2.2.6 Variación dentro y entre ensayos.....	34
2.3 Expresión de genes sexo específicos en abulón rojo.....	36
2.3.1 Muestras de abulón.....	36
2.3.2 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y grupos experimentales....	36
2.3.3 Selección de genes sexo específicos y diseño de iniciadores.....	36
2.3.4 Amplificación por RT-qPCR.....	37
2.3.5 Análisis de datos.....	39
2.3.5.1 Asignación de sexos.....	39
2.3.5.2 Expresión relativa y análisis estadístico.....	39
3. Resultados	
3.1 Ontología de genes y elaboración de macroarreglo.....	40
3.1.1 Secuenciación y ensamble.....	40
3.1.2 BLASTx y anotación funcional.....	41
3.1.2.1 Biblioteca de cDNA.....	41
3.1.2.2 Secuenciación 454.....	43
3.1.3 Análisis de ontología de genes.....	44
3.1.3.1 Biblioteca de cDNA.....	44
3.1.3.2 Secuenciación 454.....	45
3.1.4 Análisis KEGG.....	45
3.1.4.1 Biblioteca de cDNA.....	45

Tabla de contenido (continuación)

3.1.4.2 Secuenciación 454.....	45
3.1.5 Genes relacionados con la reproducción y sexo específicos.....	49
3.1.5.1 Biblioteca de cDNA.....	49
3.1.5.2 Secuenciación 454.....	50
3.1.6 Genes relacionados con el sistema inmune y procesos de crecimiento.....	50
3.1.7 Macroarreglo.....	55
3.1.7.1 Unigenes.....	55
3.1.7.2 Detección de insertos positivos.....	59
3.1.7.3 Evaluación de sonda con dot blot.....	59
3.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón rojo...	60
3.2.1 Cantidad y calidad del RNA total.....	60
3.2.2 Amplificación de iniciadores por RT-qPCR.....	60
3.2.3 Estabilidad de expresión de los genes de mantenimiento.....	60
3.2.3.1 geNorm.....	61
3.2.3.2 NormFinder.....	62
3.2.4 Variación dentro y entre ensayos.....	65
3.3 Expresión de genes sexo específicos en juveniles de abulón rojo..	66
3.3.1 Amplificación de iniciadores por RT-qPCR.....	66
3.3.2 Asignación de sexos.....	67
3.3.3 Expresión diferencial.....	67
3.3.3.1 Proteína de la cubierta vitelina (<i>VCP 2.2</i>).....	67
3.3.3.2 Receptor de lisina en la cubierta vitelina (<i>VERL</i>).....	70
3.3.3.3 Vitelogenina I (<i>VTG</i>).....	71
3.3.3.4 Factor de transcripción relacionado con doble sexo y mab3 (<i>DMRT1</i>).....	72
3.3.3.5 Proteína de fertilización (<i>FP</i>).....	73
3.3.3.6 Lisina del esperma (<i>LYS</i>).....	74
3.3.3.7 Proteína interactuante con receptores de andrógenos (<i>SARIP</i>)...	75
3.3.3.8 Tektina (<i>TEKT</i>).....	76

Tabla de contenido (continuación)

3.3.4. Genes sexo específicos.....	77
4. Discusión	
4.1 Ontología de genes y elaboración de macroarreglo.....	78
4.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón rojo...	83
4.3 Expresión de genes sexo específicos en juveniles de abulón rojo..	89
5. Conclusiones.....	97
6. Recomendaciones.....	98
Referencias bibliográficas.....	99
Anexos.....	124

Lista de figuras

Figura		Página
1	Producción pesquera de abulón en México durante el periodo 1990-2013. El peso vivo equivale al peso total (SAGARPA, 2012, 2013).....	2
2	Producción acuícola de abulón rojo <i>H. rufescens</i> en México durante el periodo 2000-2013 (SAGARPA, 2012, 2013).....	4
3	Distribución de estrategias reproductivas en moluscos (Collin, 2013).....	5
4	Inicio de la transcripción en eucariotas. La RNA polimerasa II requiere de un grupo de factores de transcripción. Proteína de unión a la caja TATA (TPB, por sus siglas en inglés), Factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) (Modificado de Alberts <i>et al.</i> , 2014; p. 231).....	16
5	Mecanismo general de la transcripción en eucariotas (Modificado de Alberts <i>et al.</i> , 2014; p. 238).....	17
6	Productos de PCR para nueve genes de mantenimiento en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. M: Marcador molecular (50 pb); 1: β -actina (<i>ACTB</i>), 2: β -glucuronidasa (<i>BGLU</i>), 3: Ciclofilina (<i>CY</i>), 4: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>), 5: Hipoxantina fosforiltransferasa 1 (<i>HPRT1</i>), 6: Proteína ribosomal L5 (<i>RPL5</i>), 7: Succinato deshidrogenasa (<i>SDHA</i>), 8: β -tubulina (<i>TUBB</i>) y 9: Ubiquitina (<i>UBC</i>).....	33
7	Productos de PCR para ocho genes sexo específicos en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. 1: <i>LYS</i> , 2: <i>TEKT</i> , 3: <i>VERL</i> , 4: <i>SARIP</i> , 5: <i>VTGI</i> , 6: <i>FP</i> , 7: <i>VCP 2.2</i> , 8: <i>DMRT1</i> y M: Marcador molecular (50 pb).....	37
8	Distribución de la longitud para los EST's de la biblioteca de cDNA (A. Hembra, B. Macho) y secuenciación 454 (C).....	42
9	Distribución superior de concordancia con especies obtenida con el programa Blast2GO y con base en BLASTx de la biblioteca de cDNA. A) Hembra y B) Macho.....	43

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
10	Distribución superior de concordancia con especies obtenida con el programa Blast2GO y con base en BLASTx de la secuenciación 454.....	44
11	Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los EST's obtenidos de la biblioteca de cDNA para hembras de abulón rojo.....	46
12	Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los EST's obtenidos de la biblioteca de cDNA para machos de abulón rojo.....	47
13	Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los contigs obtenidos de la secuenciación 454.....	48
14	Resultados del BLASTx para las secuencias de EST's del tejido gonadal de las hembras de abulón rojo destinadas para la elaboración del macroarreglo	55
15	Detección de insertos en DNA plasmídico para la biblioteca de cDNA de hembras de abulón rojo	59
16	Reacción final de la hibridación de la sonda marcada con digoxigenina. C+=inserto positivo de 783 pb y C-=Inserto negativo de 1 pb.....	59
17	Valores de estabilidad de genes de mantenimiento evaluados con geNorm: A) Todos los tejidos, B) Branquias, C) Cabeza y D) Gónada/glándula digestiva.....	63
18	Análisis de variación pareada ($V_{n/n+1}$) calculado por geNorm para determinar el número óptimo de genes de mantenimiento necesarios para normalización. A) Todos los tejidos, B) Branquia, C) Cabeza y D) Gónada/glándula digestiva.....	64
19	Expresión de <i>RPL5</i> en gónada/glándula digestiva de abulón rojo con diferente longitud de concha (ANOVA de una vía, $F_{(3,8)}=0.5575$, $P>0.05$). Datos mostrados como media \pm desviación estándar.....	65

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
20	Asignación de sexos en individuos indiferenciados y maduros de abulón rojo mediante el diferencial de expresión de <i>VERL</i> y <i>LYS</i>	67
21	Expresión relativa de <i>VCP 2.2</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	68
22	Expresión relativa de <i>VERL</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	70
23	Expresión relativa de <i>VTGI</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	71
24	Expresión relativa de <i>DMRT1</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	72
25	Expresión relativa de <i>FP</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	73
26	Expresión relativa de <i>LYS</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	74
27	Expresión relativa de <i>SARIP</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	75
28	Expresión relativa de <i>TEKT</i> en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.....	76
29	Valores de Cq para ocho genes sexo específicos en hembras y machos de abulón rojo utilizados como control positivo para la asignación de sexos. Valores están expresados como media \pm desviación estándar.....	77

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Empresas de cultivo de abulón en México, localización y año de inicio de operaciones (Searcy-Bernal <i>et al.</i> , 2010; CESAIBC, 2014).....	3
2 Estructuras ganglionares relacionadas con la reproducción en abulón (Hahn, 1992; p.57).....	8
3 Aplicaciones de la secuenciación de siguiente generación en acuicultura (Liu, 2011; p. 44).....	22
4 Genes de mantenimiento y secuencias de iniciadores usados en las reacciones de RT-qPCR.....	35
5 Genes sexo específicos y secuencias de iniciadores usados en las reacciones de RT-qPCR.....	38
6 Resumen estadístico de EST's de la biblioteca de cDNA y secuenciación 454.....	40
7 Vías metabólicas de alta y baja abundancia para los contigs de la secuenciación 454 anotados en la base de datos KEGG's.....	49
8 Contigs de la secuenciación 454 relacionados con la diferenciación y determinación sexual en diferentes niveles de la Ontología de Genes (GO) y categorías.....	51
9 Contigs de la secuenciación 454 asociados con procesos del sistema inmune al segundo nivel de la Ontología de Genes (GO) en el abulón rojo <i>H. rufescens</i>	52
10 Contigs de la secuenciación 454 asociados con procesos de crecimiento al segundo nivel de la Ontología de Genes (GO) en el abulón rojo <i>H. rufescens</i>	54
11 Descripción de la homología de los unigenes no redundantes de la biblioteca de cDNA para hembras de abulón rojo.....	56
12 Valores de eficiencia (E) y R ² para los iniciadores de los genes de mantenimiento usados en las reacciones de RT-qPCR.....	61

Lista de tablas (continuación)

Tabla		Página
13	Estabilidad de los genes de mantenimiento para tres tejidos de abulón rojo con diferente longitud de concha (5–45 mm) evaluada con NormFinder (1=mejor, 9=peor).....	62
14	Variación dentro de los ensayos (precisión) y entre ensayos (variabilidad) del termociclador RotorGene 6000 (Corbett Research) con <i>RPL5</i> y cDNA de la gónada/glándula digestiva en abulón rojo (DE=Desviación estándar y CV=Coeficiente de variación).....	65
15	Valores de eficiencia (E) y R^2 para los iniciadores de los genes sexo específicos usados en la reacción de RT-qPCR	66
16	Homología de los productos de PCR para los genes asociados al sexo, encontrada en el banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI)..	69
17	Relación de secuencias EST y nucleótidos depositados en el Genbank del NCBI (8 febrero de 2015), sólo se mencionan las primeras diez especies de abulón y el total de Haliotidae.....	79

1. Introducción

1.1 Generalidades del abulón

Los abulones constituyen un grupo importante de gasterópodos marinos que pertenecen a la familia Haliotidae. Existen alrededor de 56 especies (Geiger y Owen, 2012) y la mayoría son encontrados en fondos someros en regiones templadas y tropicales del mundo. Típicamente, viven sobre sustratos rocosos alimentándose de microflora bentónica cuando son juveniles y de macroalgas cuando son adultos. La mayor variedad de especies se encuentra a lo largo del Pacífico suroccidental y del Océano Índico. Menos de 20 especies en el mundo alcanzan tallas suficientemente grandes de interés para las pesquerías comerciales y la acuicultura (Leighton, 2000).

Los abulones nativos del noreste del Océano Pacífico están representados por ocho especies (Cox, 1962). Además, se reconocen subpoblaciones de *Haliotis fulgens turveri* Bartsch, 1942; *Haliotis fulgens guadalupensis* Talmadge, 1964; *Haliotis corrugata oweni* Talmadge, 1966 y *Haliotis cracherodii californiensis* Swainson, 1822 que se encuentran en la isla Guadalupe, México (Leighton, 2000). Geiger y Owen (2012) señalan que actualmente en México existen 7 especies de abulón (*H. corrugata corrugata* W. Wood, 1828; *H. cracherodii cracherodii* Leach, 1814, *H. fulgens fulgens* Philippi, 1845; *H. kamtschatkana assimilis* Dall, 1878; *H. rufescens* Swainson, 1822; *H. sorenseni* Bartsch, 1940 y *H. walallensis* Stearns, 1899).

El abulón rojo *H. rufescens* es el más grande del mundo dentro de su grupo, llegando a alcanzar a menudo longitudes mayores a 30.5 cm de longitud de concha y pesos superiores a 1.7 kg. Se distribuye desde Coos Bay en Oregon, EUA de América (EUA) hasta Bahía Tortugas en Baja California, México (Cox, 1962), se encuentra desde la zona intermareal hasta profundidades de 20 m y prefiere aguas con temperatura entre los 7 y 21°C; con un rango preferencial entre los 14 y 16°C y una tolerancia máxima de 25°C (Hahn, 1989; Leighton, 2000). Presenta una concha arqueada y convexa, siendo gruesa y dura. Su cara externa es rojiza, mientras que la interna es lisa y brillante con tonos azules, verdes y plateados. En la parte interna se puede apreciar la marca del pie que corresponde al músculo. Presenta de 3 a 4 poros respiratorios abiertos en un

arreglo ovalado. El epipodio es liso y negro (Ault, 1985). Esta especie, soportó parte de la pesquería hasta 1997 (Instituto Nacional de Pesca, 2006) y ha sido la principal, para la acuicultura en California, EUA y Baja California, México.

1.2 Importancia del recurso abulón en México

1.2.1 Pesquería

En México, la captura de abulón se realiza desde hace más de un siglo y constituye una de las actividades más importantes que se desarrollan en la costa occidental de la península de Baja California, desde la frontera con EUA hasta Isla Margarita en Baja California Sur (SAGARPA, 2006). Su valor máximo de captura se registró en 1951 con 6,000 t y aunque se han reportado hasta 7 especies, más del 99% de la pesquería actual es soportada por el abulón azul (*Haliotis fulgens*) y el abulón amarillo (*Haliotis corrugata*). En 2001 se registró uno de los valores más bajos de captura con 500 t de peso total y a partir de 2011 la pesquería ha venido decayendo por debajo de ese valor (Figura 1), posiblemente debido al efecto sinérgico entre condiciones ambientales adversas y la presencia de patógenos (Searcy-Bernal *et al.*, 2010; SAGARPA, 2012, 2013).

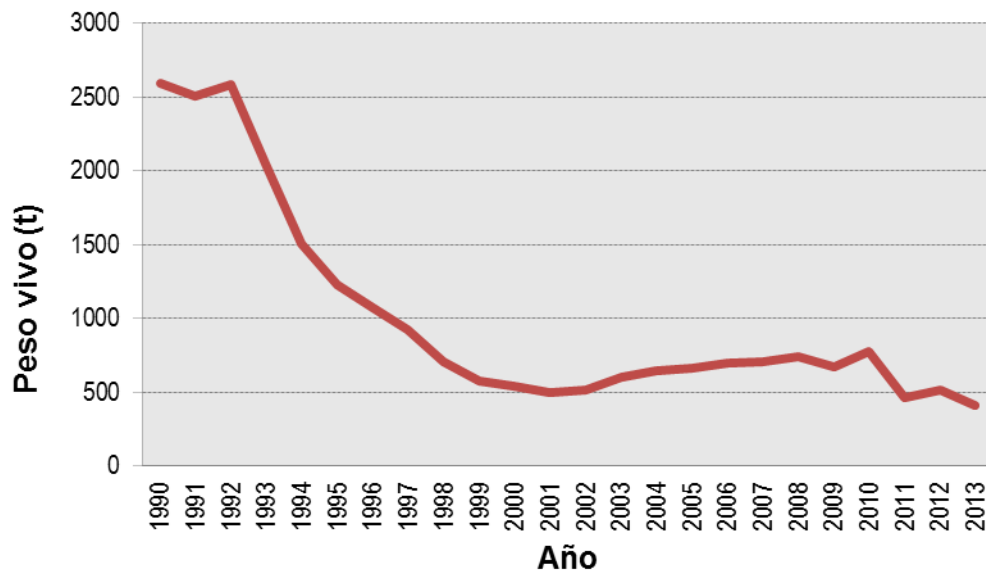


Figura 1. Producción pesquera de abulón en México durante el periodo 1990-2013. El peso vivo equivale al peso total (SAGARPA, 2012, 2013).

1.2.2 Cultivo

Las investigaciones para el desarrollo del cultivo de abulón en México empezaron en 1970 y a diferencia de lo que sucede en la pesquería del abulón, que es sostenida por *H. fulgens* y *H. corrugata*, la producción acuícola depende principalmente de *H. rufescens*. Todas las granjas comerciales tienen laboratorios de producción de semilla, la que es llevada hasta la talla comercial, utilizando *Macrocystis pyrifera* como fuente de alimento. En la engorda, la talla comercial (>7 cm de longitud de concha) se alcanza entre los 4 y 5 años (Searcy-Bernal *et al.*, 2010) y la producción se destina a la exportación en casi un 100%, siendo sus principales mercados EUA y los países asiáticos (SAGARPA, 2006). Actualmente, cuatro empresas se encuentran cultivando abulón (Tabla 1) y los niveles de producción anual fluctúan entre las 25 y 35 t. No obstante, debido a la disminución en la producción pesquera, a partir de 2010 se ha generado una mayor demanda sobre el abulón de cultivo. En el 2013, el nivel de producción fue mayor a las 60 t y se debió principalmente a la cosecha de lotes de menor tamaño para abastecer la demanda (SAGARPA, 2012, 2013) (Figura 2).

Tabla 1. Empresas de cultivo de abulón en México, localización y año de inicio de operaciones (Searcy-Bernal *et al.*, 2010; CESAIBC, 2014).

Empresa	Ubicación	Año
Abulones Cultivados	Eréndira	1992
Productores Marinos Baja	Eréndira	2003
GEMAS	Colonia Vicente Guerrero	1999
Asociación Pesquera REGASA	El Rosario	2007

1.3 Biología reproductiva del abulón

1.3.1 Estrategias reproductivas en moluscos

Los moluscos presentan una diversidad de estrategias reproductivas que se agrupan en dos categorías: gonocóricos o hermafroditas (Guo *et al.*, 1998). Las especies gonocóricas o dioicas están conformadas por individuos de sexos separados (machos y hembras), mientras que las especies hermafroditas están conformadas por individuos que funcionan como machos y como hembras en algún momento de su vida (Sternberg *et al.*, 2010; Collin, 2013).

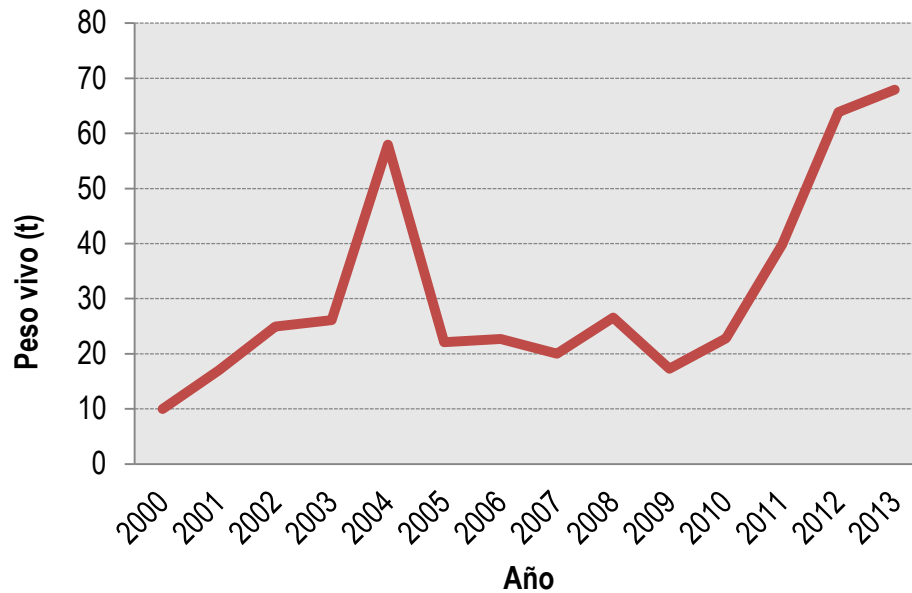


Figura 2. Producción acuícola de abulón rojo *H. rufescens* en México durante el periodo 2000-2013 (SAGARPA, 2012, 2013).

Los gasterópodos marinos, como el abulón, desovan sus gametos en el agua de mar, donde ocurre la fertilización. La fertilización o la unión de gametos, es un proceso especie específico y es un componente crítico de la reproducción sexual que da origen a una célula totipotencial denominada cigoto (Swanson y Vacquier, 2002; Evans, 2012). Además, la fertilización es dirigida por procesos químicos y moleculares que llevan a la unión del ovocito y el esperma. En el caso de desovadores libres, la unión puede darse por una sincronía en la liberación de los gametos o por la producción de quimioattractantes a partir del ovocito (Vieira y Miller, 2006). En la Figura 3 se muestran las diferentes estrategias reproductivas presentes en moluscos con base en análisis filogenéticos (Collin, 2013).

Aunque los detalles de la fertilización en gasterópodos marinos varían entre especies, ésta consiste de cinco pasos coordinados: 1) reconocimiento inicial y unión entre esperma y ovocito, 2) reacción acrosomal, 3) penetración del esperma dentro de la cubierta del ovocito, 4) unión del esperma dentro del ovocito y 5) fusión del material genético del esperma y ovocito generando la activación del metabolismo del ovocito, la mitosis y el inicio del desarrollo (Vacquier, 1998).

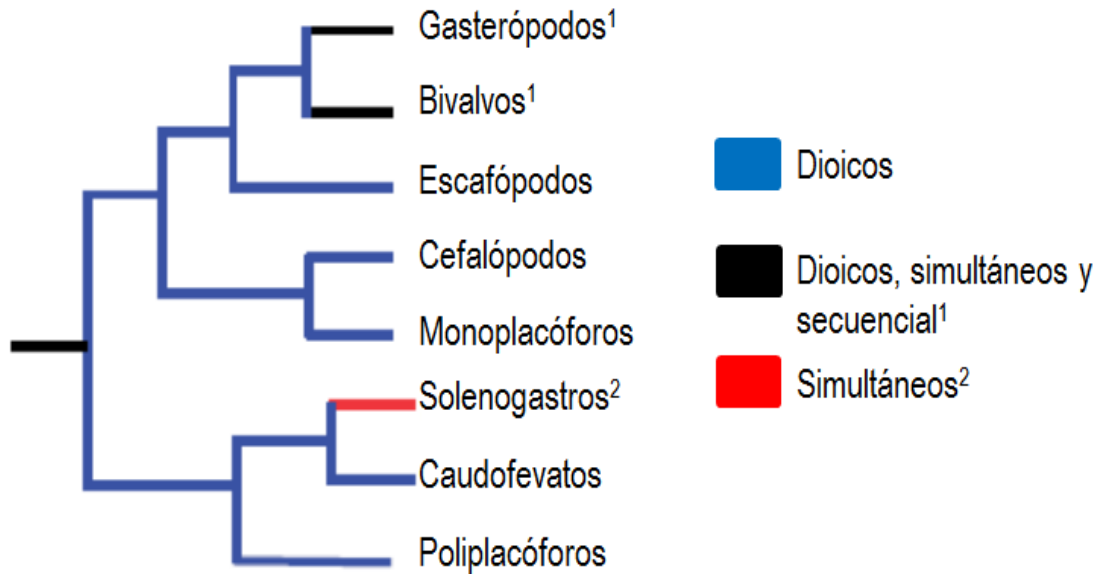


Figura 3. Distribución de estrategias reproductivas en moluscos (Collin, 2013).

1.3.2 Anatomía reproductiva del abulón

Los abulones son dioicos y su historia de vida se puede dividir en cinco etapas: embrión, larva, postlarva, juvenil y adulto. La gónada de estos gasterópodos se abre en el nefridio derecho a través del cual los gametos son descargados directamente hacia el medio externo vía el nefridioporo. La gónada forma una envoltura de tejido que rodea a la glándula digestiva y ambas forman un apéndice cónico (Hahn, 1989). Las áreas superficiales de los epitelios germinales que recubren el lumen del ovario y el testículo se incrementan en gran medida por tubos y láminas de tejido conjuntivo que se extiende entre las partes internas y externas de la gónada (Giorgi y DeMartini, 1977). Este epitelio germinal es el sitio de la gametogénesis. La glándula digestiva incrementa su tamaño justo antes o inmediatamente después del desove. Boolootian *et al.* (1962) encontraron una relación inversa entre el tamaño de la gónada y la glándula digestiva, lo que indica que el material puede ser transportado desde la glándula digestiva hacia la gónada durante el proceso de gametogénesis.

1.3.3 Estadios reproductivos y ciclo reproductivo gonadal

El ciclo reproductivo se define como el lapso entre desoves sucesivos en una población. Este lapso puede ser determinado por dos métodos: (1) analizando cambios en la histología de la gónada y (2) midiendo los cambios en los índices gonádicos. En general, el ciclo reproductivo de un organismo es caracterizado por seis fases distintas:

la activación (incitación de la gametogénesis), gametogénesis, la ampliación de la gónada como el resultado de aumento en el número o tamaño de gametos, el desove de los gametos, la reabsorción de gametos no liberados y un período de reposo (Giese, 1959; Boolootian *et al.*, 1962). Cada fase tiene una duración determinada y está controlada por factores exógenos (diferencias en el ambiente) y endógenos (fisiológicos) (Hahn, 1989).

1.3.4 Factores exógenos que afectan la reproducción

La maduración gonadal es un proceso que está dirigido por la maquinaria molecular del organismo. La acción o inhibición de los genes relacionados con el proceso de maduración gonadal depende de la interacción con su ambiente. En este sentido, los factores exógenos más comunes asociados con la maduración gonadal son la temperatura, el fotoperiodo y el alimento (Uki y Kikuchi, 1984; Gosling, 2003), mientras que en el abulón el pH también es importante (Hahn, 1989).

La temperatura es quizá uno de los principales factores que influye en la tasa de desarrollo gonadal en la mayoría de especies de abulón. No obstante, la disponibilidad de alimento parece controlar la madurez gonadal en el abulón rojo. Se ha encontrado que, periodos de rápida gametogénesis y vitelogénesis, además del tiempo preciso de desove en *H. laevigata*, *H. cyclobates* y *H. rufescens*, se correlacionan con la abundancia de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. Además, cambios en la gametogénesis se correlacionan principalmente con la cantidad de alimento en comparación con los cambios de temperatura del agua de mar por sí sola (Hahn, 1989; Sternberg *et al.*, 2010).

En condiciones de laboratorio, el abulón rojo puede ser fácilmente inducido a la maduración manteniendo la disponibilidad de alimento *ad libitum*. Esto podría explicarse por el hecho de que la producción de gametos requiere una gran cantidad de nutrientes para requerimientos metabólicos y síntesis de vitelogenina, que es la fuente nutritiva para el desarrollo larvario en especies lecitotróficas como el abulón (Moran y Manahan, 2003). Por otro lado, la restricción de la ingesta, ya sea mediante la reducción de las raciones de alimento o provisión de alimentos bajos en ácidos grasos esenciales, se

traduce en un mayor tiempo de maduración en los adultos y crecimiento subóptimo en las larvas de abulón (Uki *et al.*, 1986).

1.3.5 Factores endógenos que controlan la reproducción

La reproducción es un proceso íntimamente relacionado con el sistema nervioso y endócrino (York *et al.*, 2012). Las células neurosecretoras se encuentran en gran número y variedad en los ganglios cerebral, pleural-pedal y visceral de los moluscos y son la principal fuente de hormonas (Joosse, 1988). Las neurohormonas son los mensajeros químicos filogenéticamente más antiguos respecto a las hormonas y la comunicación intercelular (neurosecreción) en la que participan es una función principal en la actividad neuronal de los invertebrados; asociada principalmente con el crecimiento y la reproducción (Bern y Hagadorn, 1965; Scharrer, 1978; Gosling, 2003).

Diversas células neurosecretoras relacionadas con masas ganglionares en abulón (cerebral, pleural-pedal y visceral, Tabla 2) se han asociado con el control de la gametogénesis, vitelogénesis y el desove (Hahn, 1989). Hahn (1992) encontró evidencia acerca del control diferencial de estos procesos asociados con la reproducción. Por ejemplo, las células tipo 1 en el ganglio pleural-pedal y contenidas en el tejido periférico incrementaron las sustancias neurosecretoras durante el periodo de proliferación del ovocito. Asimismo, las células tipo A en el ganglio cerebral estuvieron activas durante el siguiente periodo de vitelogénesis, mientras que la gónada de la hembra ganó volumen.

Aunque no se conoce completamente la regulación endócrina de la reproducción del abulón, se sugiere que un químico del tipo prostaglandina está involucrado en la inducción al desove (Morse *et al.*, 1977). La irradiación con luz ultravioleta del agua de mar o la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para inducir el desove en los abulones producen radicales libres peroxi ($\cdot OO\cdot$) e hidroperoxi ($HOO\cdot$) que actúan como donadores de oxígeno el cual es utilizado por la enzima prostaglandina sintetasa para producir prostaglandina a partir de precursores tales como el ácido araquidónico (Morse *et al.*, 1977; Uki y Kikuchi, 1984).

Tabla 2. Estructuras ganglionares relacionadas con la reproducción en abulón (Hahn, 1992; p.57).

Estructura	Función
<i>Ganglio cerebral:</i>	
Células A	Vitelogénesis
<i>Ganglio pleural-pedal:</i>	
Células tipo 1	Gametogénesis
Células tipo 7	Inducción al desove
<i>Órgano neurohemal</i>	Inducción al desove
<i>Ganglio visceral</i>	Inducción al desove
<i>Gónada</i>	Inducción al desove

1.4 Determinación sexual en moluscos

El término sexo se refiere al fenotipo sexual y el mecanismo por el cual es establecido se denomina determinación del sexo (Pierce, 2005). La determinación del sexo es una parte integral de la reproducción y un proceso esencial para la evolución y enriquecimiento del genoma (Manolakou *et al.*, 2006). Los mecanismos de determinación del sexo en animales son diversos e incluyen a machos heterogaméticos (sistema XX/XY), hembras heterogaméticas (sistema ZW/ZZ), determinación sexual poligénica, determinación sexual ambiental, haplodiploidia, entre otros. Dentro de las categorías anteriores hay más diversidad en los mecanismos genéticos y fenotípicos de determinación del sexo (Werren y Beukeboom, 1998).

En moluscos, el sexo puede ser determinado por el ambiente o genéticamente. En la determinación genética, según el número de genes involucrados, los más comunes son del tipo cromosómica o de dos factores, oligogénica y poligénica; aunque existen otras variantes (Yusa, 2007).

1.4.1 Ambiental

Este tipo de determinación sexual resulta de la acción ambiental sobre el embrión en un estadio crucial de desarrollo. Una de las interacciones principales está asociada con alteraciones de temperatura. Dicho proceso se conoce como “determinación del sexo dependiente de la temperatura” y el estadio de desarrollo de determinación del sexo como “periodo termosensible”. Este mecanismo se ha observado principalmente en

reptiles y peces (Angelopoulou *et al.*, 2012). Otros factores ambientales asociados con este tipo de determinación sexual son la disponibilidad de alimento, fotoperiodo, la presencia de individuos adultos, entre otros (Bull, 1983). Aunque estos factores no intervienen a nivel embrionario, influyen el destino del sexo de organismos adultos. Ejemplos en moluscos corresponden a las lapas del género *Crepidula*, en donde los individuos pequeños que se fijan sobre individuos adultos maduran como machos, mientras que en estado solitario maduran como hembras. Estos machos pequeños tienen la capacidad de cambiar de sexo, pero también hay machos verdaderos que no tienen dicha capacidad (Pierce, 2005).

1.4.2 Genética

1.4.2.1 Cromosómica

La teoría de la herencia cromosómica sostiene que los genes están localizados en los cromosomas, los cuales sirven como vehículos para la segregación de genes en la meiosis. Esta teoría indica que el sexo de algunos animales es determinado por la presencia o ausencia de cromosomas sexuales (Pierce, 2005). Los dos sistemas más comunes que existen en vertebrados es el sistema XY, que produce machos heterogaméticos, y el sistema ZW, que produce hembras heterogaméticas (Bull, 1983; Yusa, 2007). La mayoría de los moluscos gasterópodos gonocóricos y algunos bivalvos presentan el sistema XY (Guo y Allen, 1997; Yusa, 2007).

El número y estructura de los cromosomas presentes en una especie es representada por un cariotipo (van der Merwe y Roodt-Wilding, 2008). En abulones de California se han realizado estudios del cariotipo e incluyen a *H. cracherodii* (Minkler, 1977), *H. fulgens* (Hernández-Ibarra *et al.*, 2004; Gallardo-Escárate *et al.*, 2005b), *H. rufescens* (Gallardo-Escárate *et al.*, 2004; Hernández-Ibarra *et al.*, 2004; Gallardo-Escárate *et al.*, 2005a; Gallardo-Escárate y Del Río-Portilla, 2007) y *H. corrugata* (Gallardo-Escárate *et al.*, 2005b; Gallardo-Escárate y Del Río-Portilla, 2007); encontrando un número cromosómico de 36 (2n) y ninguna evidencia de la existencia de cromosomas sexuales. A las mismas conclusiones han llegado los estudios realizados en *H. discus discus*, *H. madaka*, *H. gigantea* (Miyaki *et al.*, 1997) y *H. discus hannai* (Okumura *et al.*, 1999). A pesar de que hay evidencia de que no existen cromosomas sexuales en el género

Haliotis, se ha sugerido que el mecanismo de determinación del sexo en *H. discus hannai* podría ser del tipo XY (Liu *et al.*, 2006)

En vertebrados, el principal gen involucrado en este tipo de determinación sexual se denomina *SRY* (región determinante del sexo asociada al cromosoma Y), el cual se expresa en las células de Sertoli y puede actuar de manera “dosis sensible” reprimiendo factores que bloquean la diferenciación de los testículos (Koopman, 1999). *DMRT1* (Doble sex and mab-3 related transcription factor 1, por sus siglas en inglés), es otro gen de la familia *SRY* que está involucrado en la determinación del sexo en invertebrados, contiene una secuencia homóloga a la variante de corte de doble sexo (*Dsx*) en el macho de *Drosophila* y se expresa de manera específica en los testículos de varios vertebrados (Raymond *et al.*, 1998). En invertebrados marinos, varios trabajos han reportado la expresión de genes ortólogos (genes que son homólogos entre organismos y que tienen la misma función originada por descendencia, Primrose y Twyman, 2003, p. 113) para *DMRT1* (Klinbunga *et al.*, 2009; Farazmand *et al.*, 2010; Zhang y Qiu, 2010; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014). Además, un ortólogo de *SRY* diferente de *DMRT1* se ha reportado como *SOX30* (*SRY*-box 30, por sus siglas en inglés) y se expresa específicamente en la gónada de machos de la almeja Manila *Ruditapes philippinarum* (Ghiselli *et al.*, 2012).

1.4.2.2 Balance de genes

En moluscos también se han encontrado otros tipos de determinación genética que dependen de la interacción de un número pequeño de genes. En la almeja, *Mya arenaria*, se ha encontrado un mecanismo de balance cromosoma X/autosoma parecido al de *Drosophila* (Allen *et al.*, 1986), mientras que en el ostión Americano, *Crassostrea virginica*, se cree que puede haber un arreglo genético multilocus (Haley, 1977; Hedrick y Hedgecock, 2010). Asimismo, en el ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, al parecer existe un sistema que parece involucrar un alelo dominante para masculinidad y otro alelo para feminidad protándrica (Guo *et al.*, 1998), mientras que en el mejillón *Mytilus* spp. existe un sistema denominado “doble herencia uniparental” (DIU, por sus siglas en inglés) donde el genotipo nuclear materno parece influenciar el sexo (Kenchington *et al.*, 2002; Theologidis *et al.*, 2008).

1.5 Diferenciación sexual y talla de primera madurez sexual

1.5.1 Diferenciación sexual

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual la masa gonadal sexualmente indiferenciada se transforma en un ovario o testículo dando como resultado un individuo macho o hembra (Bull, 1983). Dicho proceso está controlado por una serie de mecanismos moleculares y fisiológicos que se traducen en cambios morfológicos que se pueden observar mediante histología o la expresión de algún marcador molecular asociado al sexo (Piferrer, 2009).

La diferenciación sexual se divide en dos grandes etapas: estadio pregonadal y de formación gonádica. La primera incluye eventos de aparición, migración y concentración de células germinales primordiales (PGC), mientras que en la segunda, ocurre la diferenciación propiamente dicha con cambios morfológicos a nivel histológico y celular. Con base en lo anterior, la migración temprana de las PGC indica que los eventos asociados con la gonadogénesis requiere la interacción entre diversos tipos celulares. Asimismo, el crecimiento posterior y diferenciación de la gónada involucra la comunicación con tejidos no adyacentes a través de un control endócrino que difieren tanto para el macho como para la hembra (Bieniarz y Epler, 1992; Nagahama, 1994).

El sistema endócrino se describe como un sistema que involucra varios órganos y mensajeros químicos, que actúan en cascadas y gobiernan muchas vías regulatorias relacionadas con procesos fisiológicos, permitiendo de ésta manera responder a estímulos endógenos y exógenos (LaFont, 2000). Los mensajeros químicos de naturaleza peptídica son los más comunes y actúan sobre los receptores de membrana desencadenando una cascada de eventos celulares con el consecuente incremento en la transcripción de genes (Croll y Wang, 2007). Ejemplos clásicos de esta interacción están representados por la influencia de las gonadotropinas sobre: 1) las células de Leydig y Sertoli durante la espermatogénesis y 2) las células de la teca y la granulosa durante la vitelogénesis (Zanuy *et al.*, 2009). En este sentido, el sistema nervioso central juega un rol importante en los procesos de regulación y en moluscos está organizado en ganglios “cerebrales” y un cordón nervioso ventral (Ketata *et al.*, 2008).

Estudios histológicos en *Haliotis discus hannai* han demostrado que la formación de la gónada y el proceso de diferenciación sexual podría dividirse en cuatro fases: formación de la cavidad gonadal, aparición de PGC, diferenciación de células germinales y maduración de células germinales (Awaji y Hamano, 2004). Estos mismos autores encontraron que la talla de formación de la gónada y aparición de las PGC fue mayor a los 7 mm de longitud de concha, mientras que la talla para el inicio de la diferenciación sexual fue mayor a los 21 mm de longitud de concha. En *Haliotis rufescens*, la talla donde se inicia la formación de la cavidad gonadal y aparición de las PGC fue mayor a los 10 mm de longitud de concha y la diferenciación de las células germinales ocurrió entre los 22 y 24 mm de longitud de concha (Gutiérrez, 2009).

1.5.2 Talla de primera madurez sexual

Un individuo sexualmente maduro se define como aquel que presenta espermatozoides u ovocitos primarios (Giorgi y DeMartini, 1977). Los abulones exhiben una gran variación en la talla de la primera madurez sexual (McShane y Naylor, 1995) y gran parte de esta variación puede deberse a la variabilidad inherente del ambiente. Factores como la densidad, la historia de crecimiento y la disponibilidad y calidad del alimento pueden promover grandes diferencias en alcanzar el tiempo de la primera madurez sexual (McAvaney *et al.*, 2004). Con base en la maduración de ejemplares de *H. rufescens* y *H. fulgens* en condiciones de laboratorio, la primera madurez sexual se alcanza alrededor del segundo año. Dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, esto puede involucrar individuos tan pequeños con una longitud de concha entre 30 y 50 mm (Leighton, 2000). Por otro lado, el muestreo de individuos de *H. rufescens* y *H. fulgens* del medio natural sugieren que la talla de primera madurez sexual ocurre a tallas mayores con respecto a las de cultivo (Ault, 1985). Rogers-Bennett *et al.* (2004) reportaron que individuos de *H. rufescens* del norte de California tenían gametos maduros para hembras con longitud de concha entre 105 y 130 mm y para machos entre 75 y 95 mm. Basto-Cuevas (2009) encontró que los individuos de *H. rufescens* en cultivo comercial maduran después de los 50 mm de longitud de concha, aunque encontró un bajo porcentaje de individuos diferenciados con longitud de concha menor a 30 mm. En cultivo de *H. discus hannai*, la maduración gonadal ocurrió a los 18 meses post asentamiento con longitudes de concha entre 29 y 42 mm (Awaji y Hamano, 2004).

1.6 Genes relacionados con la reproducción de moluscos

Los genes asociados con la reproducción de moluscos codifican principalmente para proteínas de reconocimiento (interacción de gametos), proteínas de fusión, componentes estructurales de los gametos y neurohormonas, interviniendo en diferentes etapas del proceso de reproducción que van desde la diferenciación de la línea germinal hasta el desove y la fertilización (Matsumoto *et al.*, 2013).

Los miembros de la familia de genes *Vasa* y *Nanos* son importantes para la especificación y desarrollo de la línea germinal (Kranz *et al.*, 2010). En moluscos, genes homólogos del tipo *Vasa* y *Nanos* se han caracterizado en *H. asinina*, *C. gigas* y *H. rufescens* (Fabioux *et al.*, 2004; Kranz *et al.*, 2010; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014). Experimentos con RNA de interferencia en adultos de *C. gigas* usando RNA de doble cadena, resultó en una subproliferación de las células germinales y en la suspensión de la meiosis a través de la gónada (Fabioux *et al.*, 2009). Esto sugiere un papel clave del gen similar a *Vasa* en el desarrollo de las células germinales de moluscos. Por otro lado, los ortólogos del gen similar a *Nanos* se han relacionado con el desarrollo temprano y más específicamente con el desarrollo de las PGCs (Aflalo *et al.*, 2007).

La vitelogenina (VTG, por sus siglas en inglés) es una lipoglucoproteína que sirve como precursor de la proteína más importante del vitelo del ovocito en la mayoría de los animales ovíparos, la vitelina. Aunque los teleósteos tienen tres formas de esta proteína, VtgAa, VtgAb y VtgC (Finn *et al.*, 2009), sólo un gen de ésta se ha identificado en *C. gigas*, *Patinopecten yessoensis*, *H. discus hannai* y *H. rufescens* (Osada *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2013; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014). En invertebrados marinos, la VTG se produce principalmente en el ovario, aunque también se ha reportado la producción extraovárica (Arcos *et al.*, 2003).

Los receptores de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) son importantes en la maduración gonadal a través de los diferentes taxones. Los ER regulan la transcripción de genes diana de los estrógenos, como las *Vtgs* en teleósteos a través de procesos bioquímicos de retroalimentación positiva y negativa (Matsumoto *et al.*, 2013). Aunque la función de los ERs en moluscos sigue sin entenderse completamente, se ha

confirmado la expresión de ERs en la gónada de ostras y el manto de mejillones (Ciocan *et al.*, 2011). En *M. edulis* se reportó que la expresión de mRNA de ERs estuvo significativamente subregulada en el testículo maduro, mientras que estuvo sobrerregulada en los mejillones expuestos a los estrógenos en la fase temprana de la gametogénesis, sugiriendo su importancia en esta etapa (Ciocan *et al.*, 2010, 2011).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) y sus receptores (GnRHR) también tienen efecto sobre el desarrollo gonadal. En los vertebrados, la maduración gonadal está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La GnRH es un neuropéptido de 10 aminoácidos sintetizada en el hipotálamo de los mamíferos y estimula la liberación de las hormonas gonadotrópicas, sirviendo así como un regulador clave de la reproducción (Kah *et al.*, 2007). En *H. asinina*, se han identificado dos tipos de GnRH, una asociada a los ganglios cerebral y pleuropedal y la otra al ovario de hembras maduras (Nurrai *et al.*, 2010a). Por otro lado, la inyección de gonadotropinas en individuos de *H. asinina* de un año de edad resultó en la aceleración del proceso de maduración, mientras que la inyección de la hormona de la puesta de huevos (ELH, por sus siglas en inglés) en juveniles de *H. asinina* con tallas entre 11.5 y 12.3 mm resultó en la diferenciación sexual temprana de los individuos con un sesgo en favor de las hembras en relación de 4 a 1 (Nurrai *et al.*, 2010b).

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) actúa a través de múltiples receptores para mediar diversas funciones en vertebrados e invertebrados. En los bivalvos, el mayor interés ha sido su función en la maduración de ovocitos. La meiosis de los ovocitos de moluscos en su mayoría se detiene en metafase I (Krantic y Rivaller, 1996). Durante la detención meiótica, los ovocitos se desarrollan; es decir, que acumulan una gran cantidad de vitelo y se convierten en totalmente competentes para ser fecundados y desarrollar posteriormente el embrión. En la temporada de desove, las hembras de los moluscos contienen muchos ovocitos completamente desarrollados detenidos en profase en la gónada. Cuando el entorno es favorable para el desove, los óvulos son liberados al ambiente en profase o continúan la meiosis hasta metafase I, seguido del desove y fecundación (Matsumoto *et al.*, 2013). En Haliótidos, se ha reportado la presencia de receptores para 5-HT en *H. asinina*, mientras que en *H. rubra* se demostró que la serotonina participa en la liberación de gametos (Panasophonkul *et al.*, 2009).

Las interacciones moleculares durante la fertilización son muy importantes. Uno de las interacciones mejor caracterizadas es la del abulón *H. rufescens*. En el abulón, las proteínas acrosomales del espermatozoide contienen lisina que se une a su receptor en la cubierta vitelina (VERL) del ovocito para disolverla de manera no enzimática (Vacquier *et al.*, 1990). VERL contiene un motivo de aproximadamente 260 aminoácidos, conocidos como el dominio ZP e incluye un grupo de por lo menos 30 proteínas (Aagaard *et al.*, 2010). Hacia el final de esta interacción la proteína de fertilización favorece la unión del contenido de ambos gametos. Por otro lado, existen proteínas estructurales componentes de los gametos tales como tektina, proteínas asociadas a pequeños andrógenos, proteínas de la cubierta vitelina, entre otras, que han sido estudiadas en diferentes tejidos de abulón a través del proceso de gametogénesis (Klinbunga *et al.*, 2009; Amparyup *et al.*, 2010; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014).

1.7 Transcriptoma y transcriptómica

1.7.1 Teorema de la biología molecular

De acuerdo al teorema central de la biología molecular, la expresión de la información hereditaria fluye desde las secuencias genómicas del ácido desoxirribonucleico (DNA), a través de un intermediario, el mRNA, hacia una última manifestación fenotípica en la forma de proteínas. Mientras que este diseño refleja lo que ocurre en células procariotas y eucariotas, algunas excepciones se han observado en la naturaleza: (1) el descubrimiento de la enzima retroviral transcriptasa inversa, por la cual el RNA puede servir como un molde para la síntesis de DNA; y (2) el descubrimiento de la edición del RNA, también conocida como una alteración de la secuencia de RNA, en la que una secuencia transcrita está sujeta a cambios (Farrell, 2010).

1.7.2 Características del RNA

La transcripción es el proceso por el cual una molécula de RNA de simple cadena es sintetizada desde un locus cromosomal específico en el núcleo o mitocondria, en uno de los primeros pasos conocidos como biogénesis del RNA. Una unidad transcripcional es una secuencia de DNA que manifiesta señales apropiadas para la iniciación y terminación de la transcripción. Este mecanismo es mediado por enzimas conocidas

como RNA polimerasas. Estas enzimas, junto con otras proteínas conocidas como factores de transcripción, reconocen secuencias altamente conservadas denominadas promotores. Los promotores consisten de varios nucleótidos reconocibles denominados secuencias consenso. En eucariotas, el promotor es conocido como la caja TATA, aunque también se han encontrado las cajas CAAT y GC. Estos elementos parecen controlar la unión inicial de la RNA polimerasa y la eficiencia del promotor (Figura 4).

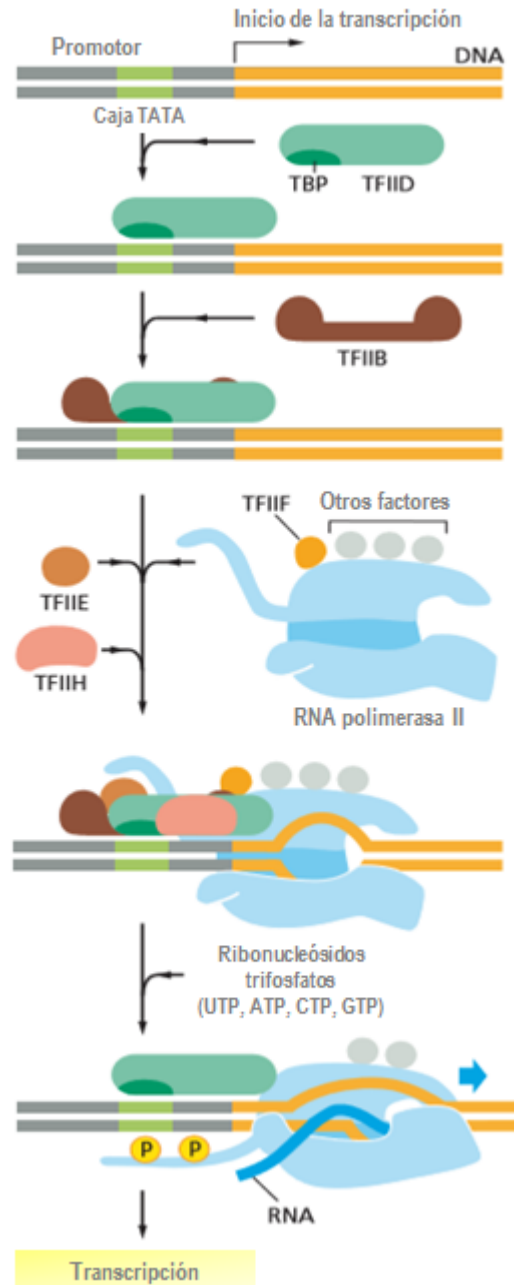


Figura 4. Inicio de la transcripción en eucariotas. La RNA polimerasa II requiere de un grupo de factores de transcripción. Proteína de unión a la caja TATA (TPB, por sus siglas en inglés), Factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) (Modificado de Alberts *et al.*, 2014; p. 231).

Los genes eucariotas han revelado que para una gran mayoría de genes hay muchos más nucleótidos en un locus particular respecto a los que son necesarios para dirigir la síntesis de un polipéptido, ello es, la secuencia de DNA y la de un aminoácido no son colineares. Este patrón también se observa a nivel del mRNA maduro en el citoplasma, que es más corto respecto a la secuencia de DNA de la cual deriva. Esto puede explicarse por la presencia de intrones, que son regiones de DNA que se transcriben pero no están representadas en el mRNA maduro. Colectivamente, los precursores de RNA en el núcleo son conocidos como RNA nuclear heterogéneo (hnRNA, por sus siglas en inglés). En células eucarióticas, los mRNAs son derivados desde hnRNA a través de una serie de reacciones de modificación, que incluye la adición de un nucleótido de guanina metilada en la posición 5', empalme de exones, procesamiento en el 3' terminal y generalmente, poliadenilación (Farrell, 2010; Figura 5).

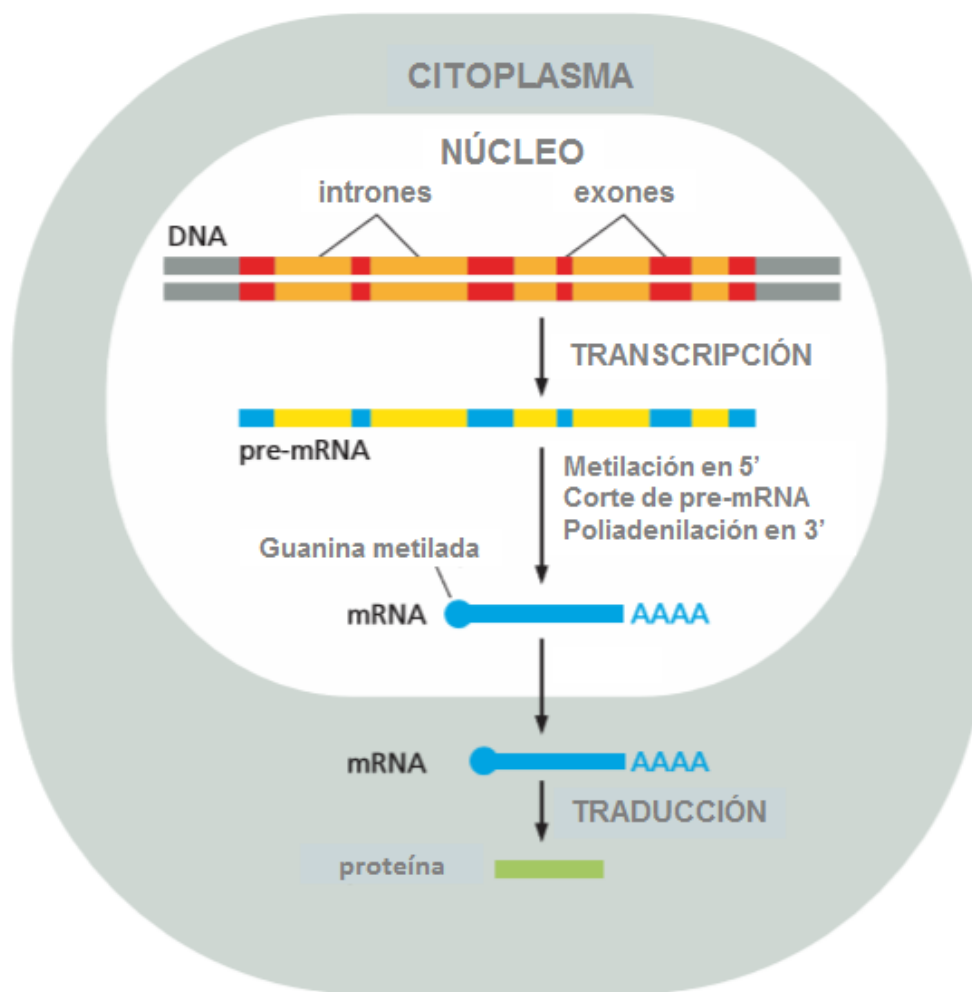


Figura 5. Mecanismo general de la transcripción en eucariotas (Modificado de Alberts *et al.*, 2014; p. 238).

1.7.3 Biología molecular del RNA

El dogma central de la biología molecular denominaba gen a una porción de DNA cuyo correspondiente mRNA codifica una proteína. De acuerdo con este punto de vista, el RNA se consideraba un puente en la transferencia de la información biológica entre el DNA y las proteínas; mientras que la identidad de cada gen expresado, y de sus niveles de transcripción, se indica comúnmente como transcriptoma. Se consideraba que este transcriptoma estaba compuesto principalmente por RNA ribosomal (rRNA, 80-90%), RNA de transferencia (tRNA, 5-15%), mRNA (2-4%) y una pequeña fracción de RNA no codificante intragénico e intergénico (ncRNA, 1%) con funciones reguladoras sin definir (Yarus, 2010). Particularmente, tanto las secuencias intragénicas e intergénicas enriquecidas en los elementos repetitivos, se han considerado genéticamente inertes, compuestas principalmente por DNA “basura”. No obstante, recientemente se ha demostrado que la cantidad de DNA no codificante (ncDNA) aumenta con la complejidad del organismo. y probablemente representan la principal fuerza motriz que origina la diversidad biológica de los organismos vivos (Costa *et al.*, 2010).

Un “transcriptoma” es la colección de ácidos ribonucleicos (RNAs) transcritos desde el genoma, mientras que la “transcriptómica” se refiere a la generación y análisis del RNA mensajero, o mRNA, de la célula. A lo largo de los años, varias técnicas se han desarrollado para identificar los tipos de mRNA que son expresadas en diferentes muestras. Estos métodos son capaces de responder algunas preguntas muy importantes o al menos sugerir ciertos mecanismos de respuesta. Por ejemplo, pueden indicar qué genes están asociados con una enfermedad degenerativa, comparando tejido enfermo contra tejido sano, o pueden indicar qué genes están involucrados en un proceso específico como el desarrollo gonadal. (Dale y Von Schantz, 2007).

Los objetivos de la transcriptómica son: clasificar todas las especies de transcriptos, incluyendo mRNA, RNA no codificantes y pequeños RNAs; determinar la estructura transcripcional de los genes, en términos de sus sitios de inicio, 5' y 3', patrones de corte y otras modificaciones post-transcripcionales; y cuantificar los cambios en los niveles de expresión de cada transcripto durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones (Liu, 2010).

En acuicultura, la utilización de los transcriptomas se ha enfocado sobre varios aspectos. Morrison *et al.* (2006) estudiaron la respuesta del salmón del Atlántico *Salmo salar*, hacia *Neoparamoeba spp.*, causante de la enfermedad de la branquia amebiana. Lang *et al.* (2009) usaron esta herramienta para probar la hipótesis de que las familias de ostra *Crassostrea gigas* que difieren en supervivencia después de un choque térmico varían también en su respuesta transcripcional al estrés. Xu *et al.* (2011) identificaron genes expresados diferencialmente entre individuos de retrocruzas avanzadas que poseían alelos para crecimiento rápido y lento en un loci de carácter cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés) en *Oncorhynchus mykiss*.

1.7.3.1 Etiquetas de secuencias expresables (EST's)

Las etiquetas de secuencias expresables (EST's, por sus siglas en inglés) son secuencias cortas de DNA complementario (cDNA) que se obtienen al extraer el RNA mensajero (mRNA), copiarlo a cDNA e introducirlo dentro de un vector de clonación para luego transformarlo dentro de una bacteria (por ejemplo, *Escherichia coli*); para secuenciarlo y almacenarlo en un banco de genes. Usando este enfoque y sus ventajas, ha sido posible realizar diversos estudios en ciencias biológicas tales como el descubrimiento de genes, el perfil de expresión o el mapeo de genes (Jiang *et al.*, 2011). En acuicultura, el uso de las bibliotecas de EST's se ha centrado sobre varios aspectos tales como patología, reproducción, nutrición, etc. Por ejemplo, se determinaron los genes que se expresan en la glándula digestiva y gónada de *Haliotis discus discus* (Munasinghe *et al.*, 2006).

1.7.3.2 Bibliotecas genómicas y de cDNA

Una biblioteca genómica es una colección de clones que representa el genoma entero de un organismo (Dale y Von Schantz, 2007) o parte de él. Los clones contienen segmentos de DNA representando la secuencia de nucleótidos de una región cromosomal. Estos son llamados segmentos de DNA genómicos y pueden contener secuencias que codifican genes encontrados en exones, secuencias no codificantes encontradas en intrones, secuencias regulatorias, entre otras. Un segundo tipo de biblioteca corresponde a la de cDNA. Esta se caracteriza porque la secuencia del gen que se utiliza para construir la biblioteca es DNA complementario o cDNA, el cual es

derivado desde la conversión de mRNA celular de simple cadena en DNA de cadena sencilla usando la enzima transcriptasa inversa. Este tipo de bibliotecas contiene transcritos de células y tejidos que son controlados espacial y temporalmente de una manera altamente regulada (Miesfeld, 1999).

Un obstáculo reconocido en el análisis de las bibliotecas de cDNA es la abundancia diferencial de varios transcritos en cualquier tipo celular (Bogdanova *et al.*, 2011). Los métodos para disminuir la prevalencia de transcritos altamente abundantes e igualar las concentraciones de mRNA en una biblioteca de cDNA son denominados “normalización de cDNA”, mientras que las bibliotecas se denominan “bibliotecas normalizadas”. La normalización hace que la frecuencia de cada uno de los transcritos en la biblioteca se encuentre en un rango estrecho y resulta en un incremento sustancial en la tasa de descubrimiento de los genes (Soares *et al.*, 1994).

Un segundo tipo de biblioteca de cDNA es la sustractiva, que puede ser genómica o de cDNA, y se caracteriza porque contiene genes y transcritos expresados diferencialmente. Se han reportado diversos métodos de sustracción de cDNA y de manera general involucran la hibridación de cDNA desde una población (téster o de prueba) con el exceso de cDNA de otra población (driver o conductora), y luego la separación de la fracción no hibridada. Actualmente, la hibridación sustractiva por supresión (SSH) es uno de los métodos más utilizados para separar cDNAs distintivos desde dos muestras (Lukyanov *et al.*, 2007).

1.7.3.3 Micro y macroarreglos

Un microarreglo también denominado arreglo y actualmente chip de genes, es un sustrato sólido a la que se han adherido un gran número (de cientos a miles) de secuencias cortas de genes individuales (Fodor *et al.*, 1993). Los microarreglos se desarrollaron originalmente para estudios de expresión de mRNA de varias fuentes biológicas con base en el principio de hibridación (Schena *et al.*, 1995) y actualmente se usan con enfoques genómicos y proteómicos (Moran *et al.*, 2004; Ule *et al.*, 2005). Aunque los microarreglos se consideran como herramientas de alto rendimiento, no son en sentido estricto cuantitativos (Farrell *et al.*, 2010).

En acuicultura y a nivel de reproducción, los microarreglos se han utilizado para identificar genes potencialmente importantes durante el desarrollo ovárico (von Schalburg *et al.*, 2005). En otros estudios, se ha reportado el modelo global de expresión génica en ovarios de trucha *O. mykiss* y *C. gigas* en estadios de vitelogénesis, postvitelogénesis y maduración (Bobe *et al.*, 2006; Dheilly *et al.*, 2011). Una práctica común con el uso de los microarreglos es determinar genes candidatos que después serán caracterizados al menos a nivel transcripcional por PCR cuantitativa o qPCR (Farrell *et al.*, 2010).

A diferencia de los microarreglos, en los macroarreglos las secuencias de cDNA se adhieren sobre una membrana de nylon. Este método es menos sofisticado y más económico respecto a los microarreglos y son útiles cuando se quiere analizar la expresión de un grupo pequeño de genes asociados por ejemplo con el cáncer, la apoptosis o la reproducción (Farrell, *et al.*, 2010).

1.7.3.4 RT-qPCR

La transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés) y la qPCR son dos herramientas poderosas utilizadas en biología molecular para cuantificar niveles de expresión de mRNA. En la transcripción inversa, el mRNA es transformado en cDNA por acción de la enzima viral transcriptasa inversa. En la qPCR, el cDNA es amplificado y detectado en cada ciclo usando colorantes como SYBR Green I o sondas marcadas con diferentes colorantes (Bustin y Nolan, 2004). En comparación con otras técnicas tales como PCR semicuantitativa, Northern Blot o microarreglos, la RT-qPCR es preferida por su alta sensibilidad, reproducibilidad y alto rango dinámico (Garson *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006). Por ejemplo, la qPCR es 100 veces más sensible que la PCR punto final y tiene un rango dinámico de no menos nueve escalas logarítmicas (Raso y Biassoni, 2014). No obstante, existen variables que podrían afectar los resultados de los niveles de expresión de mRNA. Estas variables corresponden a la cantidad de muestra inicial, diferencias cualitativas y cuantitativas del RNA, eficiencia de la transcripción inversa, entre otros. En este sentido, para controlar el ruido generado por estas variables, controles internos previamente validados son amplificados paralelamente con el gen de interés (de Kok *et al.*, 2005; Dheda *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2006).

1.7.3.5 Secuenciación masiva y RNA-Seq

El paradigma del método de secuenciación de Sanger o de primera generación fue la DNA polimerasa dependiente de la síntesis de una cadena complementaria y fue la base para el desarrollo de las tecnologías de siguiente generación (Morozova *et al.*, 2009; Hui, 2012; Liu *et al.*, 2012). Entre el 2005 y 2008, la secuenciación del DNA se llevó al siguiente nivel cuando se introdujeron los secuenciadores “454” de Roche y el “genome analyzer” de Illumina, anunciando la era de la secuenciación de siguiente generación o NGS (Next generation sequencing, por sus siglas en inglés). Este tipo de secuenciación está evolucionando a un ritmo sin precedentes, junto con el costo cada vez menor y se considera que se convertirá en una técnica de rutina (Delseny *et al.*, 2010; Hui *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Actualmente existen una serie de plataformas de secuenciación masiva que incluyen a 454 que está a punto de ser discontinuada por sus altos precios (Nature, 2013), Illumina, Solid, Ion Torrent, Helicos, PacBio RS y recientemente la secuenciación con nanoporos (Shendure y Ji, 2008; Delseny *et al.*, 2010; Hui *et al.*, 2012). Estas plataformas se han aplicado en una variedad de áreas con diferentes objetivos. En el caso de la acuicultura, se han utilizado para secuenciar genomas *de novo*, analizar el transcriptoma, analizar el patrón de metilación del DNA y construir mapas de la interacción DNA-proteína (Liu, 2011, Tabla 3).

Tabla 3. Aplicación de la secuenciación de siguiente generación en acuicultura (Liu, 2011; p. 44)

Categoría	Aplicaciones (ejemplos)
Genoma	Secuenciación <i>de novo</i> : la generación inicial de grandes genomas eucariotas. Resecuenciación del genoma completo: detección de SNPs, inserciones y deleciones, número de copias y variación estructural de genomas.
Transcriptoma	Cuantificación de expresión de genes; anotación de transcritos, descubrimiento de SNPs o mutaciones somáticas. Perfil de RNA pequeño.
Epigenómica	Factor de transcripción y sus blancos respectivos. Perfil genómico de histonas modificados.

Entender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y entender los procesos reproductivos y de desarrollo. La técnica de secuenciación del RNA o RNA-Seq permite la detección y la cuantificación de los transcritos expresados. Sus aplicaciones incluyen el descubrimiento de nuevos transcritos, el análisis de expresión diferencial, y el corte alternativo. El RNA-Seq tiene ventajas sobre el análisis de expresión de genes que se basa en microarreglos, ya que proporciona una valoración más exacta de la gama completa de los transcritos con un mayor rango dinámico (Mortazavi *et al.*, 2008; Martin y Wang, 2011; Sims *et al.*, 2014).

1.8 Ontología de genes

El proyecto de la ontología de genes (GO, por sus siglas en inglés) es una colaboración entre las bases de datos de organismos modelo para describir el producto de un gen usando un lenguaje consistente y computacional. Este vocabulario define explícitamente tres categorías principales que incluye procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares asociados a un gen, proceso que se conoce como anotación funcional o anotación genética (Ashburner *et al.*, 2000; Conesa *et al.*, 2005).

Dentro de las aplicaciones del análisis de ontología, una de las más comunes es analizar los resultados que proviene de secuenciación masiva y determinar que categorías de la ontología de genes están sub o sobre expresadas. Otras aplicaciones están asociadas con las nuevas funciones que se puedan describir para un gen con base en los datos existentes y como están distribuidos los genes a través de un juego predefinido de categorías biológicas (Rhee *et al.*, 2008).

1.9 La reproducción y sus implicaciones en acuicultura

La reproducción es una parte fundamental de la actividad acuícola debido a que mantiene una relación inversa con el crecimiento. Esto implica que el conocimiento de los mecanismos moleculares de la determinación del sexo gonadal, la diferenciación sexual, la maduración gonadal y el desarrollo de las especies en cultivo puede proporcionar una vía para maximizar la relación entre la reproducción y el crecimiento (Elliott, 2000; Arai y Okumura, 2013).

En el manejo reproductivo, varias estrategias se han desarrollado para manipular la proporción de sexos, la talla de primera madurez sexual, producir organismos triploides, ginogenéticos, revertidos sexualmente y obtener juveniles monosexo (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002). En muchas especies de organismos cultivados, las hembras muestran tasas de crecimiento mayores que los machos y alcanzan tamaños mayores. Por ejemplo, en *H. asinina* las hembras crecen 25% más que los machos, lo que las hace más deseables en términos de producción (Klinbunga *et al.*, 2009). Contrariamente, en la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*, debido a la maduración de las hembras antes de alcanzar la talla comercial, la estrategia es obtener individuos machos revertidos sexualmente mediante la adición de la hormona 17- α -metiltestosterona en el alimento de individuos indiferenciados (Bocek *et al.*, 1992). Por lo tanto, dependiendo de las características biológicas de las especies en producción existiría un gran interés por parte del sector privado a producir poblaciones monosexo (Piferrer, 2001; Callaghan *et al.*, 2010), para lo cual es necesario el conocimiento de la reproducción a nivel molecular.

El abulón rojo *H. rufescens* es una especie de importancia comercial para la acuicultura en Baja California, con niveles de producción anual alrededor de las 35 t (SAGARPA, 2012). No obstante, en el 2013, su nivel de producción superó las 60 t (SAGARPA, 2013), debido a la cosecha de lotes de menor tamaño como consecuencia de una mayor demanda, generando un valor total de 13,000,000 MXN. El éxito en el cultivo de abulón que permita responder a las demandas del mercado dependerá por un lado de la crianza selectiva y por otro del conocimiento básico de la reproducción a nivel molecular. El abulón es una especie que madura antes de alcanzar la talla comercial y aunque existen las bases histológicas relacionadas con la diferenciación sexual y la maduración gonadal (Awaji y Hamano, 2004; Basto-Cuevas, 2009) poco se sabe de dichos procesos a nivel molecular. Por tanto, para conocer mejor el proceso reproductivo del abulón rojo que permita aprovechar su potencial biológico, en el presente estudio se hace un análisis del transcriptoma gonadal a través de bibliotecas de cDNA y secuenciación masiva para determinar genes sexo específicos asociados con la reproducción y determinar las tallas en que se produce tanto su expresión diferencial así como la diferenciación sexual.

1.10 Hipótesis

- Los niveles de expresión de los genes relacionados al sexo dependen de la talla del abulón rojo *Haliotis rufescens* bajo condiciones de cultivo y serán sexo específico.
- La expresión diferencial de los genes asociados al sexo así como la diferenciación sexual ocurre por debajo de los 30 mm de longitud de concha dado que a partir de dicha talla se han encontrado abulones sexualmente maduros.

1.11 Objetivos

1.11.1 General

- Obtener y analizar el transcriptoma del tejido gonadal y evaluar los niveles de expresión de genes sexo específicos en el abulón rojo *H. rufescens*.

1.11.2 Particulares

- Efectuar el análisis de ontología de los genes del tejido gonadal obtenidos por clonación bacteriana y secuenciación masiva.
- Construir un macroarreglo de cDNA a partir del tejido ovárico de *H. rufescens*.
- Caracterizar el perfil de expresión de genes sexo-específicos a través de diferentes tallas mediante RT-qPCR.

2. Materiales y métodos

2.1 Ontología de genes y elaboración de macroarreglo

2.1.1 Muestras de abulón

Un primer grupo de abulones se obtuvo de la empresa “Abulones Cultivados S.A de C.V” ubicada en el Ejido Eréndira, Baja California, México. Los individuos se transportaron sobre un sustrato húmedo en bolsas plásticas con oxígeno y macroalga *Macrocystis pyrifera* hacia el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Tres hembras (74.4 ± 2.9 mm de longitud de concha) y dos machos (67.8 ± 1.0 mm de longitud de concha) se mantuvieron por un día en un tanque circular con agua de mar a una salinidad de 34 g L^{-1} , temperatura de 18°C y aireación constante. Al segundo día, se extrajeron muestras de tejido gonadal, se fijaron en RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) y se almacenaron a -80°C hasta la extracción y purificación de RNA. El segundo grupo de abulones (cinco hembras y cinco machos) se obtuvo de la empresa comercial “Pacífico Austral” en Corral, Valdivia, Chile y se extrajo tejido gonadal para el aislamiento de RNA.

2.1.2 Extracción de RNA y construcción de bibliotecas

2.1.2.1 Biblioteca de cDNA

El tejido gonadal del primer grupo de abulones se usó para la preparación de la biblioteca de cDNA. La extracción del RNA total y mRNA, purificación, transcripción inversa y la construcción de la biblioteca de cDNA para cada uno de los sexos fue realizada por la empresa “Rx Biosciences” (Maryland, USA). Brevemente, se removió el RNA later, se pulverizaron 500 mg de tejido en Nitrógeno líquido y se homogenizó en amortiguador de lisis. Después, el lisado se purificó a través de columnas QiaShredder (Qiagen, Valencia, CA, USA), se mezcló con un volumen igual de etanol al 70% y se pasó nuevamente a través de la columna. Las columnas se lavaron y se trataron con el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA, USA) para remover cualquier contaminación de DNA genómico. La integridad del RNA se confirmó a través de un gel desnaturante de agarosa.

El mRNA se aisló a partir del RNA total usando oligo-dT. Brevemente, el RNA total se mezcló con amortiguador de unión (10 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl) y se calentó a 70°C por 5 min. Las muestras se enfriaron inmediatamente sobre hielo por 5 min, se mezclaron con oligo-dT y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 5,000 g. El botón se lavó dos veces con amortiguador de unión y con un exceso de amortiguador de sales (10 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl). Finalmente, el mRNA se eluyó en 10 mM Tris pH 8.0 y se revisó una alícuota de la muestra sobre un gel desnaturalizante de agarosa.

Para la construcción de la biblioteca de cDNA, 1 µg de mRNA normalizado de cada una de las muestras se mezclaron con oligo-dT que tenía un sitio de restricción para la enzima *NotI* en el extremo 5' y se calentaron a 70°C por 5 min en un volumen final de 20µL. Después, en un tubo separado se preparó y precalentó a 42°C una mezcla maestra que contenía 1µL de la enzima SuperScripRT (200 U µL⁻¹, Invitrogen) en un volumen final de 30µL. Luego de calentar el mRNA e iniciadores, el tubo se transfirió a 42°C por 15 min, se agregó la mezcla maestra y se incubó a 42°C por 1 h. Después, la reacción se calentó a 90°C por 2 min para desactivar la enzima transcriptasa inversa y se usó para la síntesis de la segunda cadena. La segunda cadena se sintetizó usando el amortiguador de segunda cadena 1X, RNase H, dNTPs y DNA polimerasa de *E. coli* a 15°C por 2.5 h. Luego de la incubación, la doble cadena se limpió con la enzima polimerasa T4 y se extrajo con fenol cloroformo. La mezcla se centrifugó y de la fase acuosa se purificó nuevamente con fenol cloroformo y se precipitó con dos volúmenes de etanol. El cDNA se diluyó en 25 µL de agua, se ligó con adaptadores en los extremos 3' y 5' y se purificó en gel de agarosa al 1%. Para la ligación, el cDNA se separó en dos fracciones, pequeña y grande. Ambas fracciones se ligaron separadamente con el plásmido pcDNA3.1 digerido con *EcoRV/NotI*. Finalmente, los clones se obtuvieron separadamente y se secuenciaron con el iniciador T7.

2.1.2.2 Secuenciación 454

El tejido gonadal del segundo grupo de abulones se usó para la secuenciación 454. Brevemente, la extracción de RNA se realizó con Tri Reagent (Ambion, Austin, TX, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La producción de RNA total se midió con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific). La

integridad del RNA se valoró con un gel desnaturalizante de agarosa al 0.5% con Bromuro de Etidio en el sistema de fotodocumentación Discovery (Ultra Lum Inc.). Se prepararon dos grupos de RNA total, uno para cada sexo. La síntesis de cDNA y la secuenciación 454 fueron hechas por la empresa Macrogen en Corea del Sur en un cuarto de placa de la plataforma GS FLX.

2.1.3 Procesamiento de datos

2.1.3.1 Limpieza de secuencias y ensamble

Los datos crudos obtenidos de la biblioteca de cDNA y de la secuenciación 454 se sometieron a un proceso de remoción de adaptadores, iniciadores y secuencias de baja calidad y complejidad usando el programa CLC Main Workbench 6.0 y CLC Genomics Workbench 4.0 (www.clcbio.com). Asimismo, para evitar la contaminación de las secuencias con las del vector de clonación en la biblioteca de cDNA, las secuencias se compararon con la base de datos UniVec a través del programa CLC Main Workbench 6.0 de acuerdo a los parámetros por omisión. Las secuencias de alta calidad que resultaron de este proceso se ensamblaron para generar secuencias contiguas y únicas (contigs y singletons, por sus nombres en inglés).

2.1.3.2 BLAST y análisis funcional de genes

A fin de corroborar la cobertura de las secuencias, se corrió el algoritmo BLASTx (umbral del valor $E < 10^{-3}$ y semejanza ≥ 33 aminoácidos) contra la base de datos de proteínas no redundantes (nr). Solamente se tomaron en cuenta diez aciertos por contig, además de los singletons. El mapeo y el análisis funcional de los EST's se realizaron con un umbral del valor $E < 10^{-6}$ en el Consorcio de Ontología de Genes (Ashburner *et al.*, 2000). Se realizaron anotaciones adicionales usando las bases de datos ANNEX e INTERPROSCAN (IPS). Finalmente, se utilizó la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG's, por sus siglas en inglés) para predecir las vías metabólicas. Todos los análisis se realizaron con el programa BLAST2GO V.2.5.1 (Conesa y Götz, 2008).

2.1.4 Elaboración de macroarreglo con tejido gonadal de hembras de abulón

2.1.4.1 Obtención y análisis de secuencias

Se obtuvieron 1,086 secuencias EST's de la biblioteca de cDNA del tejido gonadal de las hembras de abulón rojo y se procesaron según la sección 2.1.3 para identificar cada una de las secuencias y determinar el número de unigenes (contigs + singletons).

2.1.4.2 Obtención de insertos positivos y negativos

Con base en las secuencias, se procedió a corroborar la presencia de insertos dentro del DNA plasmídico mediante PCR y electroforesis en agarosa. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ L y contenían 5.0 μ L de mezcla maestra Go Taq 2x (Promega, Madison, WI, USA), 0.50 μ M de cada uno de los iniciadores específicos y 1 μ L de DNA plasmídico. Los iniciadores que se usaron fueron *EcoRV* F y *NotI* R. Estos iniciadores se diseñaron con base en la secuencia del plásmido pcDNA 3.4 que se utilizó para la construcción de las bibliotecas de cDNA. La secuencia de ambos iniciadores en la dirección 5' a 3' fue: TCCAGTGTGGTGGGAATTCT (*EcoRV* F) y TAAACGGGCCCTCTAGAC (*NotI* R). Las condiciones de reacción fueron: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55 °C y 45 s a 72°C. Finalmente, se dio un paso de extensión de 10 min a 72°C y se enfriaron a 4°C por 2 min.

2.1.4.3 Elaboración de sonda mediante PCR

A partir de la detección de insertos positivos y negativos, se seleccionó un inserto de 736 pb y se marcó con digoxigenina (Digoxigenin-11-dUTP, alkali-labile, Roche, Life Science) mediante PCR. Este representó el control positivo. Para el control negativo, se marcó con digoxigenina DNA plasmídico conteniendo un inserto de 1pb. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 μ L y contenían 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP y dGTP), 0.13 mM de dTTP, 0.07 mM Dig-11-dUTP, 2 μ L de amortiguador de PCR 10X (con 15 mM de MgCl₂), 0.2 μ L de la enzima *Taq* polimerasa (5U μ L⁻¹), 0.5 μ M de los iniciadores *EcoRV* F y *NotI* R, 1 μ L de DNA plasmídico diluido 1:100 (control positivo y negativo) y agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción fueron: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 45 s a 72°C. Después, se dio un paso de extensión de 10 min a 72°C y se enfriaron a 4°C por 2 min. Finalmente, los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen).

2.1.4.4 Evaluación de sonda marcada con digoxigenina

Para evaluar la incorporación de digoxigenina en los productos de PCR, se realizó una prueba de dot blot (protocolo modificado de Castro-Lara, 2010) con los controles positivo y negativo usando una membrana de nylon (Roche, Life Science). Este proceso se realizó de la siguiente manera:

- **Prehibridación:**

Se agregó en la membrana de nylon 1 μ L de DNA plasmídico conteniendo los insertos de 736 pb y 1 pb sin digoxigenina y se dejó secar por tres h. Luego, se humedeció la membrana en solución 2x SSC (NaCl 0.75M, Citrato de Sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75mM). Para desnaturalizar la muestra, la membrana se sumergió en la solución 1 (NaCl 0.5M, NaOH 0.2N) por 5 min. Luego para neutralizar la reacción se sumergió en solución 2 (NaCl 1M, Tris-Cl 0.5M pH 8.0) por 10 min. Finalmente, la membrana se colocó dentro de una bolsa de cierre plástico (ziploc) con solución Church- Gilbert (Na_2HPO_4 0.34M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.16M, SDS 7.5%, EDTA 1mM pH 7.2) durante 30 min a 65°C.

- **Hibridación:**

Se calentó la sonda nucleica a 95°C por 3 min para desnaturalizar la doble cadena. Descartar la solución de hibridación de la bolsa ziploc y agregar inmediatamente la sonda a la membrana. Luego se agregó nueva solución de hibridación previamente calentada a 65°C y se dejó hibridar durante 2 h a 65°C.

- **Posthibridación:**

Se transfirió la membrana desde la bolsa ziploc a un recipiente y se sumergió en solución 2x SSC durante 5 min. Luego se lavó la membrana seis veces durante 5 min cada vez en solución de lavado 1 (SSC 0.2x, SDS 0.1%) a 65°C. Se repitió el paso anterior con la solución 2 (SSC 0.1x, SDS 0.1%) y finalmente, se lavó la membrana con solución 0.1x SSC durante 5 min.

- **Revelado:**

Se sumergió la membrana en el amortiguador TBS (Tris-Cl 12mM pH 7.5, KCl 0.02%, NaCl 0.8%). Luego para bloquear la membrana se sumergió en solución de leche

descremada al 5% diluida en el amortiguador TBS durante 15 min. Se enjuagó la membrana con TBS y se añadió nuevamente leche descremada al 5% incorporando el anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments $0.75 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ (Roche, Life Science) a razón de 1:15,000. Se dejó incubar por 45 min a temperatura ambiente y se lavó la membrana brevemente cinco veces con amortiguador TBS y luego dos veces con amortiguador B (Tris-Cl 50mM pH 9.0, MgCl_2 1mM, NaCl 0.1M). Se agregó la solución reveladora o sustrato hasta que se observó la reacción en el control positivo y finalmente se lavó la membrana con amortiguador B para eliminar cualquier sustrato remanente.

2.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón

2.2.1 Abulones y muestreo de tejidos

Los abulones se obtuvieron de la granja comercial “Abulones Cultivados, S.A. de C.V.” ubicada en el ejido Eréndira, Baja California, México; y se transportaron sobre un sustrato húmedo dentro de bolsas plásticas con oxígeno y macroalga *M. pyrifera* como alimento vivo hacia el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. Se mantuvieron cincuenta individuos (longitud de concha entre 5 y 45 mm) en un tanque circular con agua de mar a una salinidad de 34 g L^{-1} , temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y aireación constante durante dos días. Al segundo día, se extrajeron muestras de branquia, cabeza y gónada/glándula digestiva, se fijaron en RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) y se almacenaron a -80°C hasta la purificación del RNA.

2.2.2 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y grupos experimentales

El RNA total se extrajo con el método descrito por Matz (2002). Se disolvieron 100 mg de muestra pulverizada con Nitrógeno líquido en solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato disódico 30 mM, β -mercaptoetanol 30 mM, pH 7.0-7.5), se centrifugó a 15 000 g y se precipitó dos veces el sobrenadante a 4°C en presencia de fenol (equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0, EDTA 1 mM) y cloroformo (24:1). Posteriormente, se agregó glucógeno y etanol al 96% para precipitar el RNA. Se lavó el botón con etanol al 80% y se precipitó con LiCl 12 M a -20°C . Finalmente, se recuperó el RNA mediante centrifugación, se lavó con etanol al 80% y se diluyó en agua libre de RNasas. La

calidad y cantidad del RNA se verificó a través de la medición de la absorbancia (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA). Después de la purificación del RNA y verificación de las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, se consideraron las muestras con valores mayores a 1.8 (96 muestras en total que correspondieron a 32 muestras por tejido).

Para evitar cualquier tipo de contaminación con DNA, 20 μg de RNA de cada una de las muestras se trataron con el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se purificaron con el kit RNeasy® MinElute® CleanUp (Qiagen, Valencia, CA, USA) que asegura fragmentos de RNA mayores a 200 bases. La calidad y cantidad del RNA se verificaron nuevamente con las relaciones de absorbancia y se confirmó la integridad del RNA mediante un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído al 1.2% (Sambrook *et al*, 2001). Se diluyó el RNA a una concentración final de 200 ng μL^{-1} .

El cDNA de una cadena se sintetizó con el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 μg de RNA total se transcribió inversamente con una mezcla de oligo (dT)₂₀ 50 μM e iniciadores hexámeros aleatorios 50 μM por 10 min a 25°C, 50 min a 50°C y 5 min a 85°C en un volumen final de 20 μL . Luego, el híbrido cDNA-RNA fue tratado con 1 μL de RNasa H por 20 min a 37°C. Finalmente, el cDNA fue diluido 1:10 y almacenado a -20°C hasta su uso.

A partir del cDNA se construyeron tres grupos experimentales (branquia, cabeza y gónada/glándula digestiva). Cada uno de los grupos estuvo conformado por 32 muestras de cDNA. Luego, cada uno de los grupos se subdividió en cuatro intervalos de talla (5-15, 16-25, 26-35 y 36-45 mm de longitud de concha). Cada intervalo de talla estuvo conformado por dos grupos (cuatro muestras de cDNA por grupo) que se consideraron como réplicas biológicas. Finalmente, se evaluaron cada uno de los grupos de manera independiente como reportaron McCurley y Callard (2008).

2.2.3 Diseño de iniciadores y selección

Se seleccionaron nueve pares de iniciadores a partir de *Haliotis discus discus* (Wan *et al.*, 2011), excepto para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o *GAPDH* (Tabla 4).

Los iniciadores para *GAPDH* se diseñaron previamente con base en el trabajo de Baibai *et al.* (2010). Primero, se alinearon secuencias de *Crassostrea gigas* (Acceso N° CAD67717), *H. discus* (ABO26632) y *Homo sapiens* (P00354) con el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Después, se localizó el gen *GAPDH* y se diseñaron iniciadores específicos al compararlo con una base de datos de EST's de *H. rufescens* (Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014). Posteriormente, estos iniciadores se probaron con cDNA de la gónada/glándula digestiva del abulón rojo, mezcla maestra Go Taq 2x pc y 0.5 μ M de cada uno de los iniciadores en un volumen final de 10 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Mini Research y las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 45 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Después de confirmar la amplificación por PCR, el producto fue purificado y enviado a secuenciar (Figura 6).

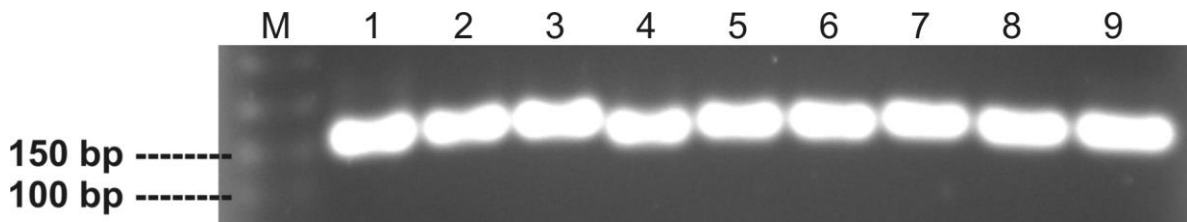


Figura 6 Productos de PCR para nueve genes de mantenimiento en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. M: Marcador molecular (50 pb); 1: β -actina (*ACTB*), 2: β -glucuronidasa (*BGLU*), 3: Ciclofilina (*CY*), 4: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), 5: Hipoxantina fosforiltransferasa 1 (*HPRT1*), 6: Proteína ribosomal L5 (*RPL5*), 7: Succinato deshidrogenasa (*SDHA*), 8: β -tubulina (*TUBB*) y 9: Ubiquitina (*UBC*).

2.2.4 RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un volumen final de 15 μ L y contenían 7.5 μ L de 2x RotorGene® SYBR®Green PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA), 0.25 μ M de cada uno de los iniciadores específicos y 12.5 ng de cDNA. Las condiciones de reacción fueron: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 60°C y 30 s a 72°C. Las reacciones se realizaron por duplicado con un control negativo sin cDNA (NTC) en un RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Para verificar la especificidad del producto, se realizó un análisis de la curva de fusión incrementando la temperatura cada 0.5°C desde 65 a 95°C. Para determinar la eficiencia (E) de cada uno de los genes de mantenimiento (HKG's, por sus siglas en inglés), se construyó una curva estándar con diluciones seriadas de 1:4 desde 25 ng μ L⁻¹ hasta 0.39 ng μ L⁻¹ de cDNA.

La concentración final de cDNA por reacción estuvo entre 1.56 y 100 ng. El valor E se calculó con la fórmula descrita por Kubista *et al.* (2006):

$$E = [10^{(-1/k)} - 1], \text{ con } k = \text{pendiente} \quad (1)$$

2.2.5 Análisis de datos

Para determinar la estabilidad de expresión de los HKG's se usaron los programas geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). Previo al ingreso de los datos, se transformaron los valores de Cq en cantidades relativas (RQ). El valor más bajo de Cq (el máximo nivel de expresión) de cada gen se usó como calibrador y se le asignó arbitrariamente un valor de 1. Después, asumiendo que la eficiencia de la PCR fue 100%, las cantidades relativas (RQ) se calcularon usando la fórmula descrita por Latham (2010):

$$RQ = 1 / (2^{(Cq, \text{muestra} - Cq, \text{calibrador})}) \quad (2)$$

2.2.6 Variación dentro y entre ensayos

Con base en el estudio de Pfaffl (2010) y en los resultados de los programas geNorm y NormFinder, se realizó un análisis de variación “dentro del ensayo” para determinar la reproducibilidad de la reacción de qPCR en el termociclador RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Asimismo, se realizó un análisis de variación “entre ensayos” en tres tiempos diferentes (dentro de las 24 h) con diferentes mezclas maestras y cDNA de la gónada/glándula digestiva de abulones individuales con las siguientes longitudes de concha: a) 5-15 mm (n=3), b) 16-25 mm (n=3), c) 26-35 mm (n=3) y d) 36-45 mm (n=3). Las reacciones por duplicado de la qPCR se realizaron con el 2x RotorGene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA) y 20 ng de cDNA. Para determinar diferencias significativas entre los promedios de los cuatro grupos experimentales se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05. Para esto, se aplicó la función $\log_2 x$ (x=valores de Cq para *RPL5*) para obtener una distribución de datos simétrica como recomendaron Hellemans y Vandesompele (2011). Previo al análisis de varianza, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas.

Tabla 4. Genes de mantenimiento y secuencias de iniciadores usados en las reacciones de RT-qPCR.

Gen ^a	Acceso GenBank	Función celular	Secuencias (5' → 3')	Tm ^b (°C)	pb
<i>ACTB</i>	KJ188152	Proteína estructural del citoesqueleto	F: GAATCTGCTGGTATCCATGAAACC R: GGGATGTGATCTCCTTCTGCAT	60	151
<i>BGLU</i>	KJ188153	Procesos metabólicos de carbohidratos	F: ATAGTCCAGGCCTTCCCTCGAAT R: CCTCTTCAGCTGGAATGGATGTGT	60	155
<i>CY</i>	KJ188154	Plegamiento de proteínas	F: GATCCAAGGTGGAGACTTCACTAAG R: AACTGGGAACCATTGGTGTTG	60	153
<i>GAPDH</i>	KJ188155	Enzima glucolítica	F: AAGGAATTCTTGGATACACAGA R: CCGTACTCATTGTCATACCAT	60	145
<i>HPRT I</i>	KJ188156	Síntesis de nucleótidos de purinas	F: ACGACATCTCAACAGGGAACATC R: GACTTGGGCTTCACTTCCTTCA	60	151
<i>RPL5</i>	KJ188157	Componente ribosomal (60S)	F: TCACCAACAAGGACATCATTTGTC R: CAGGAGGAGTCCAGTGCAGTATG	60	152
<i>SDHA</i>	KJ188158	Transporte de electrones en el CK ^c y cadena respiratoria	F: CTAGCTCTGCCTGTACATACCA R: TACCAAACACAAACCCTGTGGATA	60	151
<i>TUBB</i>	KJ188159	Proteína estructural	F: AGTTCTGGGAGGTGATTTTCAGATG R: TCCAAATCGACGAGGATAGCA	60	151
<i>UBC</i>	KJ188160	Degradación de proteínas	F: CACTGGCAAGCAACAATAATGG R: CCATTGCTGTTGATGTTTGGGA	60	152

a: Wan *et al.* (2011), excepto *GAPDH* obtenida con el presente trabajo

b: Tm, Temperatura de fusión (melting temperatura, por sus siglas en inglés)

c: Ciclo de Krebs

2.3 Expresión de genes sexo específicos en abulón rojo

2.3.1 Muestras de abulón

Los abulones se obtuvieron y manejaron como se describe en la sección 2.2.1. Posteriormente, se extrajeron muestras de gónada/glándula digestiva, se fijaron en RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) y se almacenaron a -80 °C hasta la purificación del RNA.

2.3.2 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y grupos experimentales

Para la extracción de RNA y síntesis de cDNA ver la sección 2.2.2. A partir del cDNA se construyeron cuatro grupos experimentales en función de la longitud de concha (5-15 mm, 16-25 mm, 26-35 mm y 36-45 mm). Cada grupo estuvo conformado por el siguiente número de réplicas biológicas que se evaluaron independientemente: 1) n=7 (5-15 mm), 2) n=8 (16-25 mm), 3) n=7 (26-35 mm) y 4) n=5 (36-45 mm). Además, se incluyeron machos y hembras maduros (n=2) como controles positivos.

2.3.3 Selección de genes sexo específicos y diseño de iniciadores

Se seleccionaron ocho genes sexo específicos a partir de una base de datos de EST's (ver sección 2.1.2.1) y otra de pirosecuenciación de abulón rojo (Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014). Los iniciadores (Tabla 5) se diseñaron con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000) y los genes correspondieron para el grupo de las hembras a vitelogenina (*VTG 1*), receptor de lisina en la cubierta vitelina (*VERL*) y proteína de la cubierta vitelina (*VCP 2.2*); mientras que para los machos correspondieron a la proteína de fertilización (*FP*), lisina del esperma (*LYS*), tektina (*TEKT*), proteína interactuante relacionada con pequeños andrógenos (*SARIP*) y factor de transcripción relacionado con doble sexo y mab-3 (*DMRT1*). Posteriormente, los iniciadores se evaluaron con una mezcla de cDNA proveniente de los 4 grupos experimentales, mezcla maestra Go Taq 2x (Promega, Madison, WI, USA) y 0.5 µM de cada uno de los iniciadores en un volumen final de 10 µL. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Mini Research y las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a T_m, 45 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. La T_m

varió entre los 57 y 62°C. Después de confirmar la amplificación por PCR, el producto fue purificado y secuenciado (Figura 7).

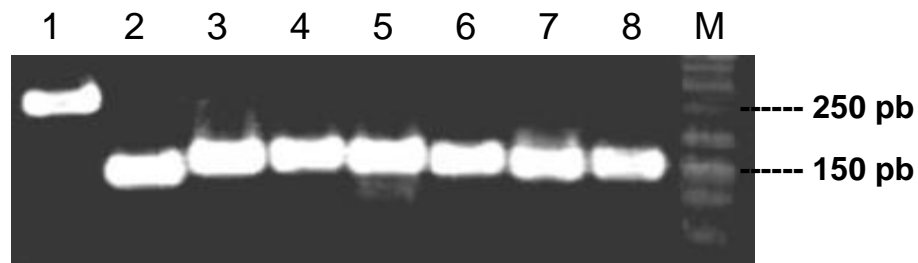


Figura 7. Productos de PCR para ocho genes sexo específicos en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. 1: *LYS*, 2: *TEKT*, 3: *VERL*, 4: *SARIP*, 5: *VTGI*, 6: *FP*, 7: *VCP 2.2*, 8: *DMRT1* y M: Marcador molecular (50 pb).

2.3.4 Amplificación por RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un volumen final de 15 μL y contenían 7.5 μL de 2x RotorGene® SYBR®Green PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA), 0.25 μM de cada uno de los iniciadores específicos y 15 ng de cDNA. Las condiciones de reacción fueron: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a T_m (Tabla 5) y 30 s a 72°C. Las reacciones se realizaron por duplicado con un control negativo sin cDNA (NTC, por sus siglas en inglés) en un RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Para verificar la especificidad del producto, se realizó un análisis de la curva de fusión incrementando la temperatura cada 0.5°C desde 65 a 95°C. Posteriormente, se dejó enfriar por 30 s a 40°C. Para determinar la eficiencia (E) de cada uno de los HKG's, se construyó una curva estándar con diluciones seriadas de 1:4 desde 25 ng μL^{-1} hasta 0.39 ng μL^{-1} de cDNA. La concentración final de cDNA por reacción estuvo entre 1.56 y 100 ng. El valor E se calculó con la fórmula (1).

Tabla 5. Genes sexo específicos y secuencias de iniciadores usados en las reacciones de RT-qPCR.

Gen	Función celular	Secuencias (5' → 3')	T _m (°C)	Amplicon (pb)
<u>Hembra</u>				
<i>VCP 2.2</i>	Componente estructural del ovocito	F: CCCAGGCTACTGTACCTCCA R: AAAGCTCACTGCCTTGTTGC	58	146
<i>VERL</i>	Fusión especie específica espermatozoide ovocito	F: ACTCCCAGTGTATGTGCGTTC R: ACCCCTGTGGCTTTTATGTG	58	153
<i>VTGI</i>	Precursor de vitelina	F: GGTCCGCTACACTCTGAAGG R: GCCTCGGTCAAATACATGGT	60	144
<u>Macho</u>				
<i>DMRT1</i>	Determinación y diferenciación sexual	F: AACCATGCCGTCATCAGC R: CTCCTCATCCTGCACCTGAC	60	150
<i>FP</i>	Fusión espermatozoide ovocito	F: GGCACATGGTCAGAGTGATG R: CGGTGTAATGGCGAAACTG	59	150
<i>LYS</i>	Fusión especie específica espermatozoide ovocito	F: ATGCACTGGGCAGAACTCCAG R: TGGTGT CATAGCTCCCCGTGT	60	266
<i>SARIP</i>	Receptor de andrógenos	F: CGCGTTGTTGAGGCTGAT R: ACCGAAAAACGGGTCGTC	58	160
<i>TEKT</i>	Componente estructural del citoesqueleto	F: CAAAACACAGTCCGAGGTGAC R: TTCTCCAGCCGCTTTTTTC	58	141

2.3.5 Análisis de datos

2.3.5.1 Asignación de sexos

Dada la condición indiferenciada de la gónada de los individuos, el sexo para cada uno de ellos se asignó calculando el valor de ΔCq (*VERL* – *LYS*), que se modificó de Sedik *et al.* (2010). Valores negativos indican hembras, mientras que valores positivos indican machos. Asimismo, para evitar cualquier tipo de sesgo en la asignación de sexos, se incluyeron valores de *Cq* obtenidos a partir de hembras y machos maduros (n=2, para cada uno de los sexos).

2.3.5.2 Expresión relativa y análisis estadístico

Los niveles de expresión relativa entre cada uno de los genes sexo específico y *RPL5* (Proteína ribosomal L5) a través de los cuatro grupos experimentales se determinaron con la fórmula propuesta por Pfaffl (2001):

$$\text{razón de cambio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cq_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cq_{\text{ref}}(\text{control-sample})}} \quad (3)$$

Donde:

E = Eficiencia de los genes

Target = Gen sexo específico

Ref. = Gen de mantenimiento (*RPL5*)

ΔCq = Diferencial de valores de *Cq*

Control = Grupo experimental con longitud de concha menor (5-15 mm)

Sample = Grupos experimentales restantes, machos o hembras maduros

El gen de mantenimiento (*RPL5*) fue uno de los más estables en diferentes tejidos de abulón rojo cuando se analizaron con geNorm y NormFinder en un estudio producto de esta investigación (Sección 2.2, anexo 6). Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05. Cuando existieron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey para determinar los grupos con mayores niveles de expresión. Los análisis se realizaron con el programa Statistica 7.0 (StatSoft, OK, USA).

3. Resultados

3.1 Ontología de genes y elaboración de macroarreglo

3.1.1 Secuenciación y ensamble

Los datos de la biblioteca de cDNA y la secuenciación 454 se secuenciaron solamente en una dirección. Para la biblioteca de cDNA, se obtuvo un total de 702 y 757 lecturas para hembras y machos, respectivamente (Tabla 6). Las lecturas para las hembras tuvieron una longitud promedio de 470 pb, mientras que para los machos la longitud promedio fue de 388 pb. Las lecturas más largas tuvieron una longitud de 1,093 y 819 pb para la hembra y el macho respectivamente. De la misma manera, se obtuvieron un total de 231,967 lecturas provenientes de la secuenciación 454 con una longitud promedio de 384 pb. La longitud más larga fue de 730 pb y la suma total de nucleótidos fue de 82.22 Mb.

Tabla 6. Resumen estadístico de EST's de la biblioteca de cDNA y secuenciación 454.

Categoría	Biblioteca de cDNA		Secuenciación
	Hembra	Macho	454
<i>Lecturas:</i>			
Total	702	757	213,967
Nucleótidos totales	330,224	293,653	82 225,551
Longitud promedio (pb)	470	388	384
Longitud máxima (pb)	1,093	819	730
Número de lecturas removidas	147	289	240
Número de lecturas para ensamble	555	468	213,727
<i>Ensamble:</i>			
Número de contigs	39	43	12,682
Número de singletons	406	293	28,460
Longitud promedio de contigs (pb)	437	423	634
Lecturas promedio por contig	4	4	15
N50	509	456	513

El tratamiento previo de los datos consistió en eliminar las lecturas de baja calidad (sin sentido, <100 pb para la biblioteca de cDNA, <200 pb para la secuenciación 454 y lecturas correspondientes al plásmido pcDNA3.4). De la biblioteca de cDNA, se eliminaron 147 lecturas para las hembras y 289 para los machos. El número total de secuencias ensambladas para las hembras fue de 555, generando 39 contigs y 406 singletons con una longitud promedio de los contigs de 437 pb. Para los machos, se ensamblaron 468 lecturas que generaron 43 contigs con una longitud promedio de 421 pb y 293 singletons. En el caso de la secuenciación 454, se eliminaron 240 lecturas y se ensamblaron 213,727. El ensamble generó 12,682 contigs con una longitud promedio de 634 pb y 28,460 singletons (Tabla 6, Figura 8).

3.1.2 BLASTx y anotación funcional

3.1.2.1 Biblioteca de cDNA

Un total de 27 y 18 contigs, correspondientes al 69.23% y 41.86% de los EST's de hembras y machos respectivamente, mostraron homología con la base de datos de proteínas no redundantes en el NCBI. Los valores E para las secuencias homólogas varió entre 10^{-5} y 10^{-181} . La distribución de especies mostró que 55.65% y 10.11% de las concordancias del BLAST estuvieron asociadas con el género *Haliotis* en las secuencias de las hembras y los machos, respectivamente. Las principales especies en la distribución de las diez especies más importantes fueron *Haliotis rufescens* (59.25%), *Haliotis discus* (11.11%) y *H. diversicolor* (3.7%) para las hembras, mientras que *Crassostrea gigas* (33.33%), *H. rufescens* (16.67%) y *Branchiostoma floridae* (11.11%) lo fueron para los machos. El nivel de anotación en la base de datos de la Ontología de Genes fue similar para las hembras y los machos con 35.89% y 37.20%, respectivamente. Asimismo, la anotación adicional en la base de datos ANNEX no mejoró significativamente, pero contra la base de datos IPS el nivel de anotación fue mayor en las hembras (61.54%) respecto a los machos (46.51%) (Figura 9A y 9B).

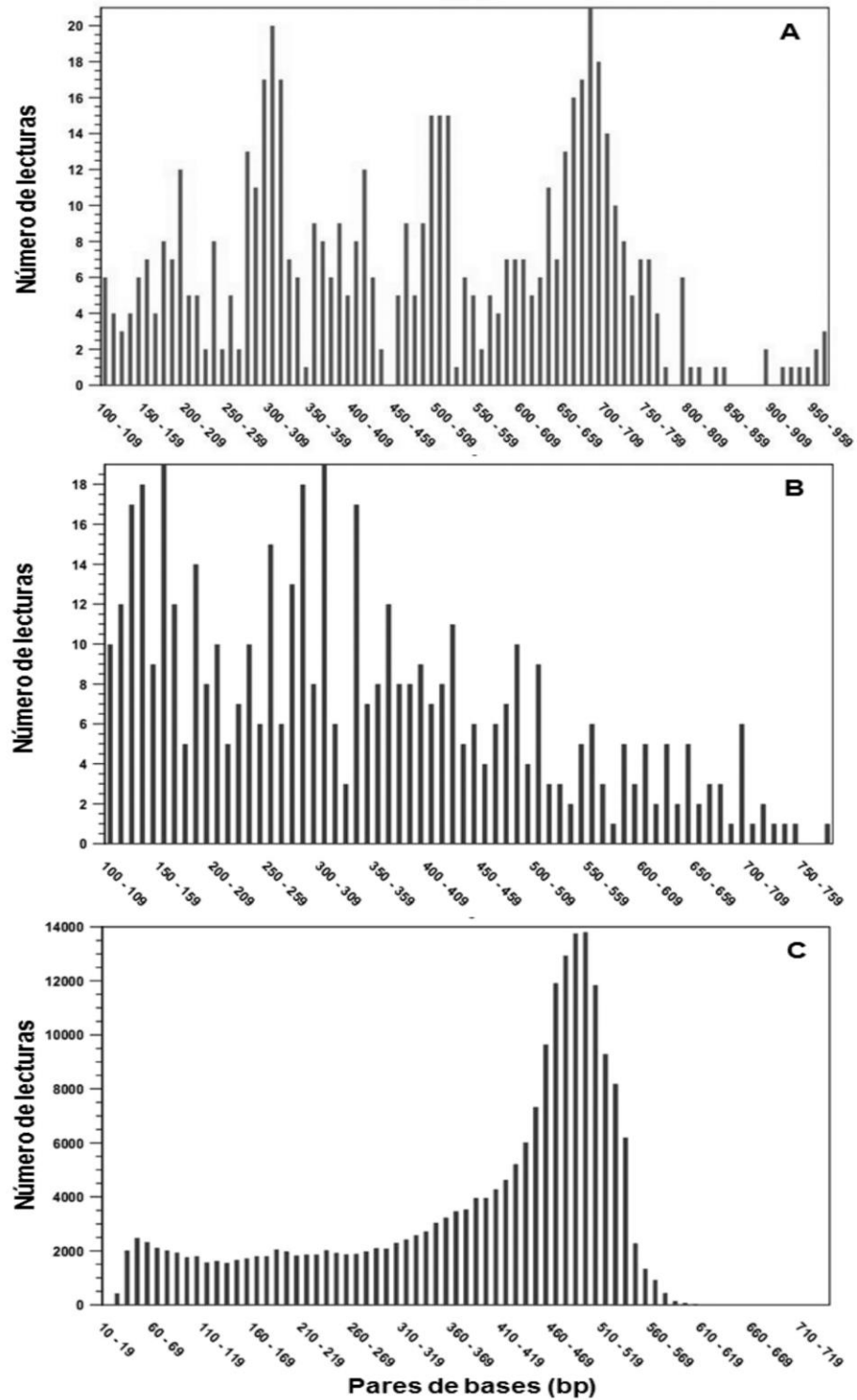


Figura 8. Distribución de la longitud para los EST's de la biblioteca de cDNA (A. Hembra, B. Macho) y secuenciación 454 (C).

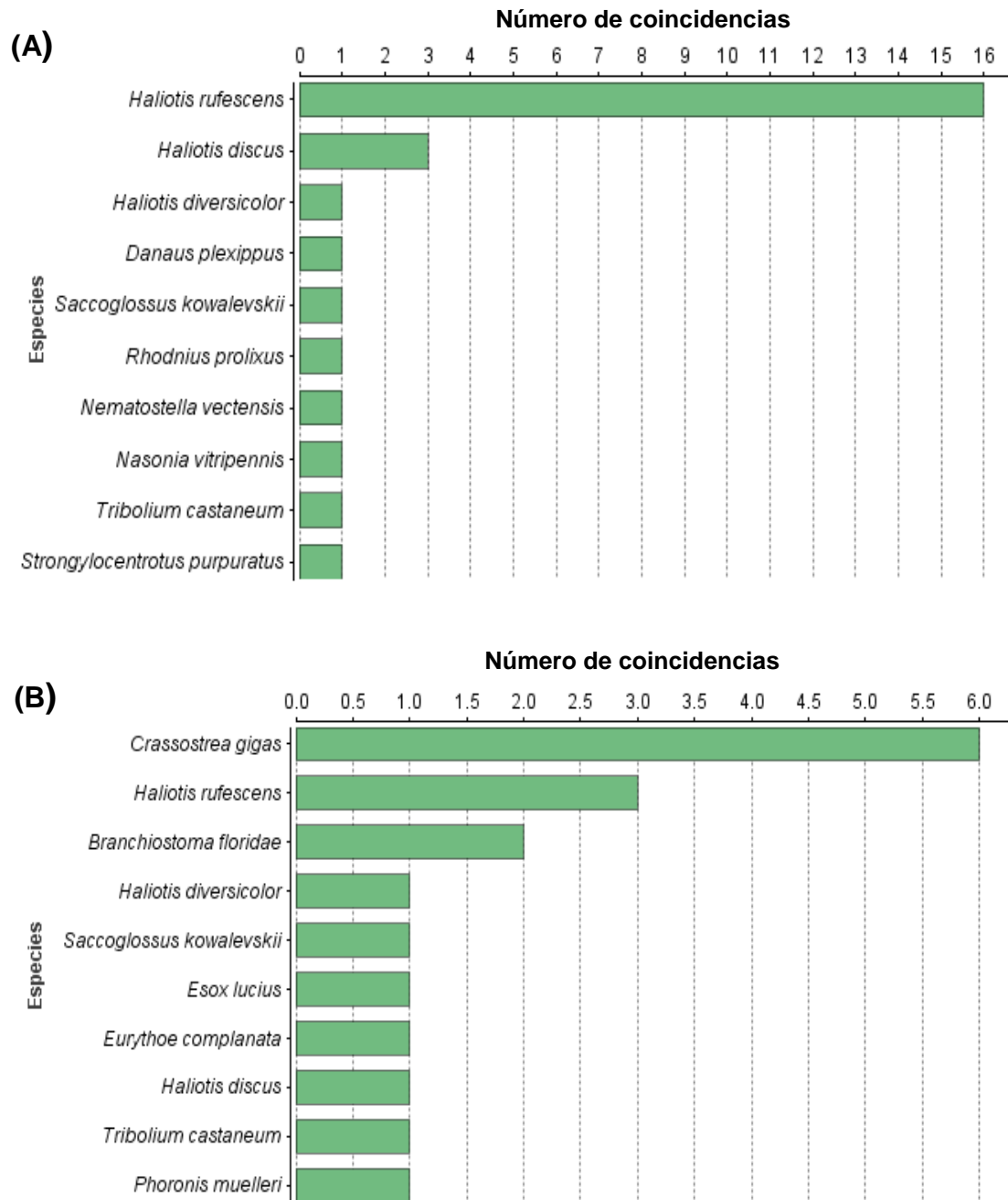


Figura 9. Distribución superior de concordancia con especies obtenida con el programa Blast2GO y con base en BLASTx de la biblioteca de cDNA. A) Hembra y B) Macho.

3.1.2.2 Secuenciación 454

Un total de 5,595 contigs (44.12%) tuvo homología en la base de datos de proteínas no redundantes (nr) del NCBI (valores $E < 10^{-3}$ y similitudes de aminoácidos entre 33 y 100). Las especies más representadas en los resultados del BLAST incluyeron *Branchiostoma floridae* (5.60%), *Saccoglossus kowaleski* (3.83%), *Homo sapiens* (3.54%), *Mus musculus* (3.28%), *Strongylocentrotus purpuratus* (3.24%), *Danio rerio*

(3.01), *Xenopus* (Silurana, 2.42%), *Nematostella vectensis* (2.38%), *Oreochromis niloticus* (1.91%), y *Xenopus laevis* (1.61%), entre otros. En esta categoría, el único miembro de los gasterópodos fue *Haliotis discus* (1.18%). Las 15 especies más importantes del BLAST incluyeron *Haliotis discus* (4.08%), *Haliotis rufescens* (2.01%) y *Haliotis diversicolor* (1.38%). El nivel de anotación de los contigs en la base de datos de la Ontología de Genes fue de 54.33%. El nivel de anotación contra la base de datos IPS incremento en 7.64% (Figura 10).

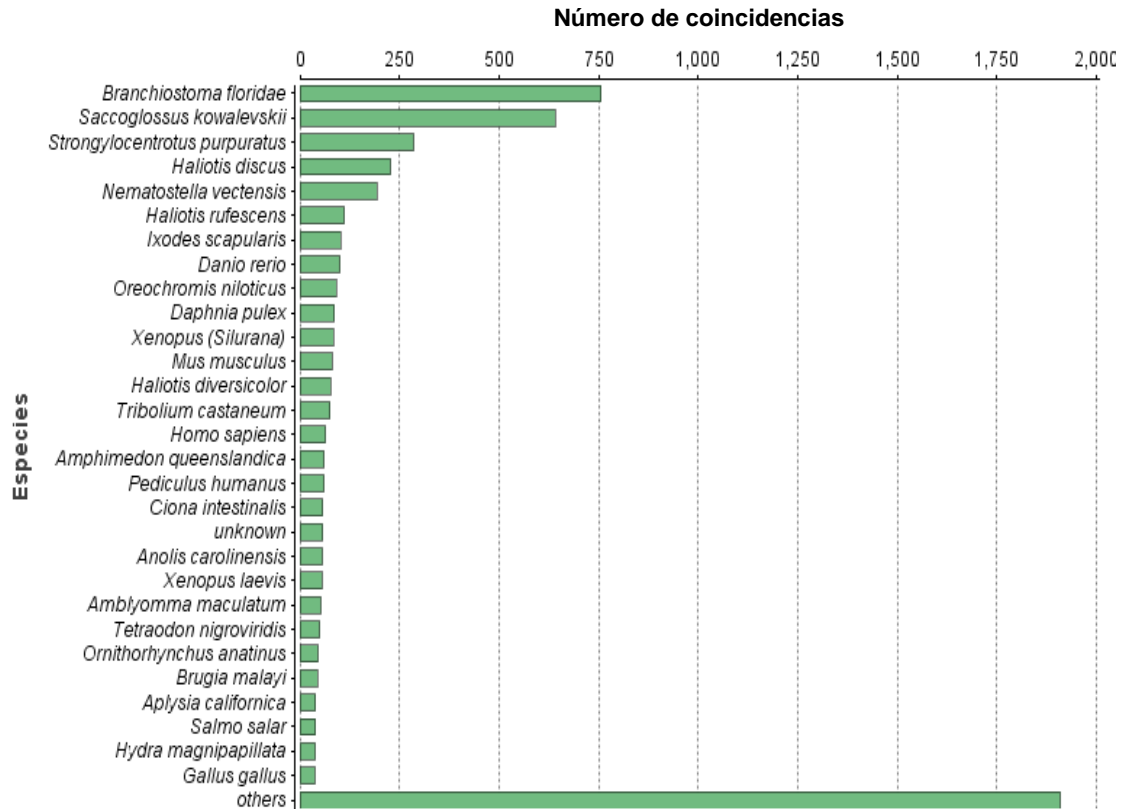


Figura 10. Distribución superior de concordancia con especies obtenida con el programa Blast2GO y con base en BLASTx de la secuenciación 454.

3.1.3 Análisis de ontología de genes

3.1.3.1. Biblioteca de cDNA

Los términos de la ontología de genes se asignaron exitosamente a proceso biológico, función molecular y componente celular, con base en los resultados del BLASTx (Figura 9 y 10). Los principales términos en la categoría de procesos biológicos al segundo nivel fueron procesos celulares y procesos metabólicos, representando el 60.71% en las hembras y 63.64% en los machos. En la categoría función molecular, los términos

más abundantes estuvieron relacionados con la unión y la actividad de moléculas estructurales con 69.23% en hembras y 66.67% en machos. Del mismo modo, la célula y organelos fueron los términos más abundantes asociados con la categoría componente celular (Figura 11 y 12). En la categoría de proceso biológico, el término reproducción representó el 4.55% en los machos.

3.1.3.2. Secuenciación 454

El número de contigs asignados a las diferentes categorías de la ontología de genes fue la siguiente: proceso biológico (8,269), función molecular (3,931) y componente celular (4,934). Los principales términos asociados con proceso biológico fueron los procesos celulares (23.58%), procesos metabólicos (21.28%), regulación biológica (9.83%), respuesta a estímulos (6.81%), y regulación de componentes celulares (6.37%), entre otros. En esta categoría, el porcentaje de contigs relacionados con la reproducción fue 1.84. La mayoría de contigs en la categoría de función molecular estuvieron asociados con la unión (47.75%) y la actividad catalítica (39.05%). Entre los términos más abundantes de la categoría componente celular, los componentes celulares y organelos representaron el 39.46% y 30.02% (Figura 13), respectivamente.

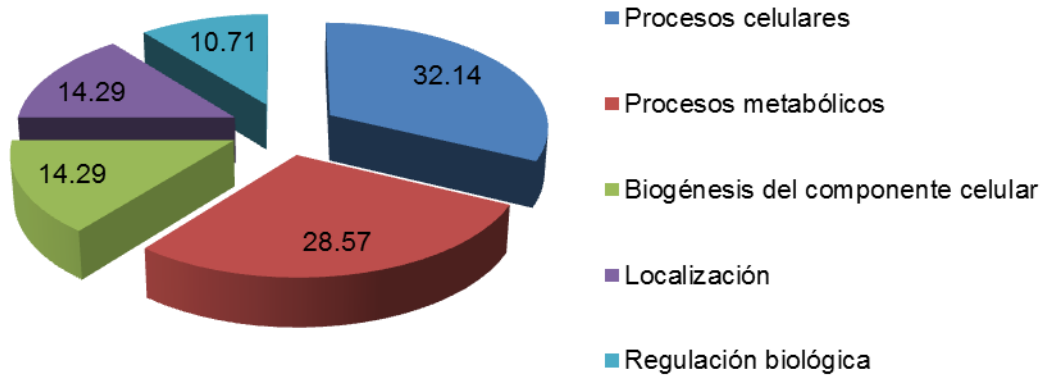
3.1.4 Análisis KEGG

3.1.4.1. Biblioteca de cDNA

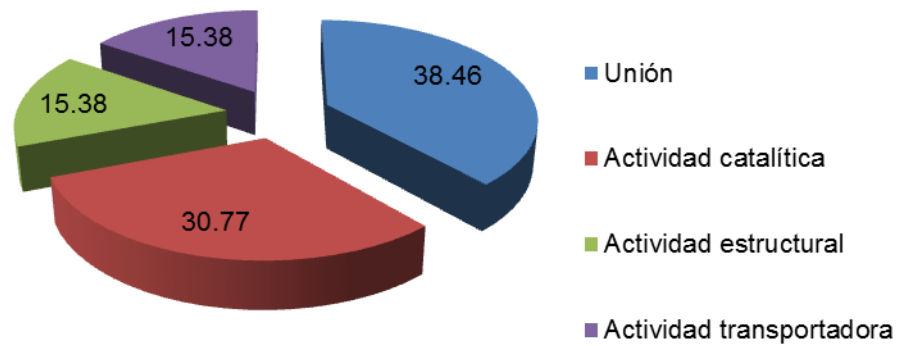
La identificación de las vías metabólicas se basó en el mapeo de los códigos de las enzimas y la base de datos KEGG's. Un contig del tejido gonadal del macho estuvo asociado con el metabolismo de las purinas y pirimidinas, correspondiente a la enzima nucleósido difosfato cinasa

3.1.4.2. Secuenciación 454

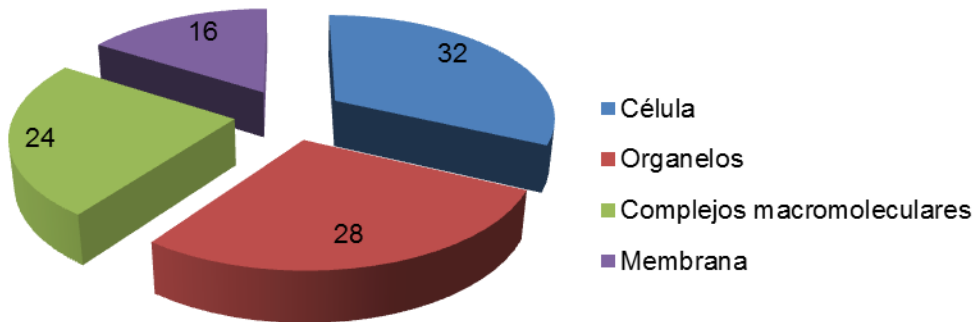
Un total de 1,217 contigs fueron identificados en la base de datos KEGG. Las vías metabólicas más abundantes estuvieron relacionadas con el metabolismo de las purinas (12.16%), metabolismo del nitrógeno (4.03%), fosforilación oxidativa (3.53%), metabolismo de tiamina (2.55%), ciclo del citrato (2.30%), metabolismo del metano (2.22%), degradación de valina-leucina-isoleucina (1.97%), metabolismo de ácidos grasos (1.97%), entre otros (Tabla 7).



A) Proceso biológico

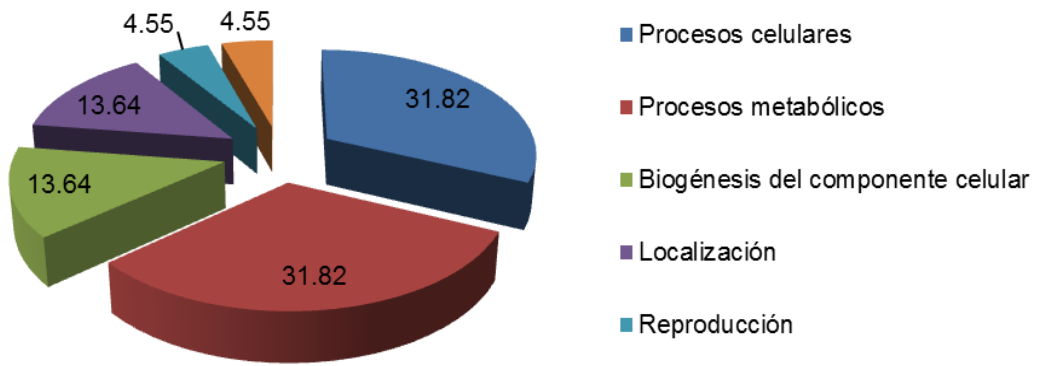


B) Función molecular

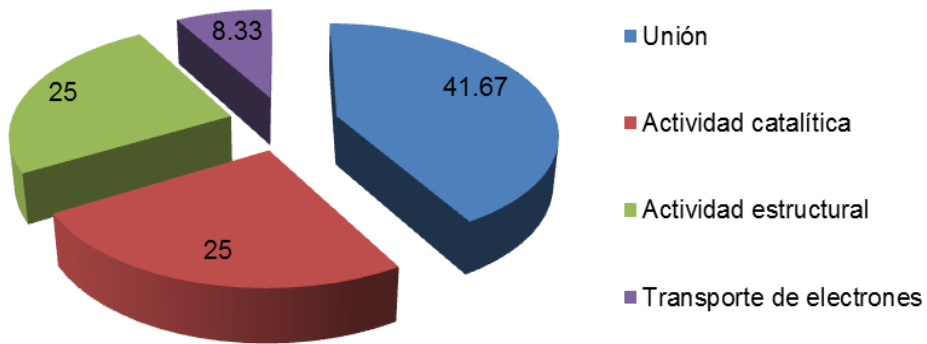


C) Componente celular

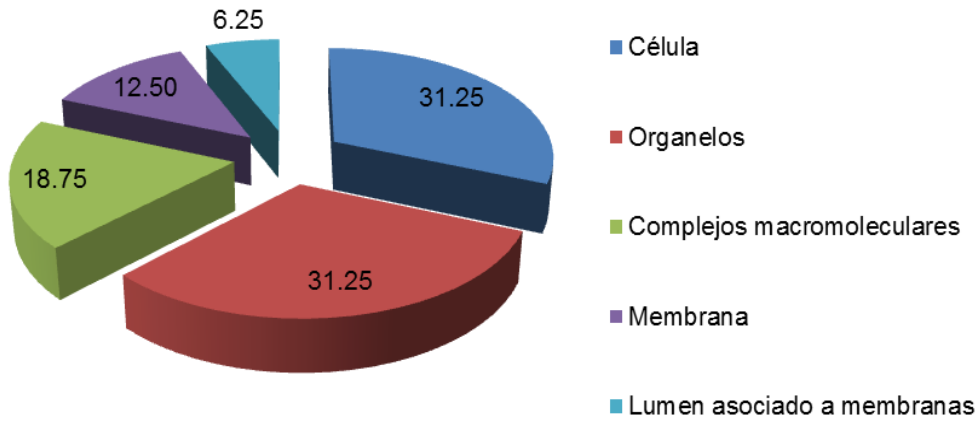
Figura 11. Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los EST's obtenidos de la biblioteca de cDNA para hembras de abulón rojo.



A) Proceso biológico

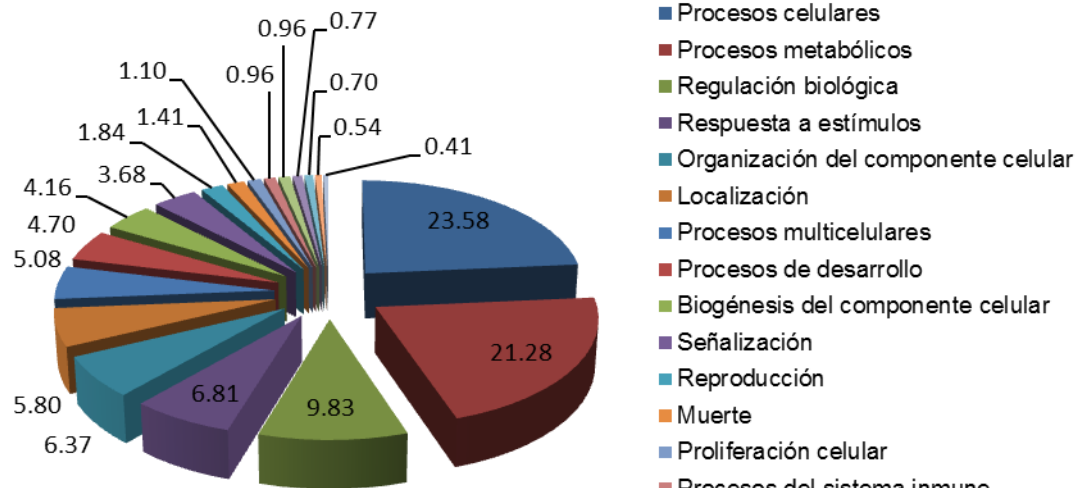


B) Función molecular

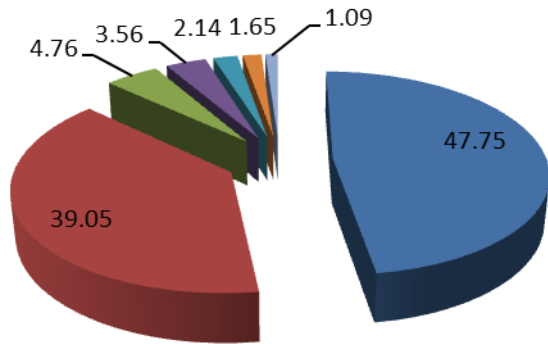


C) Componente celular

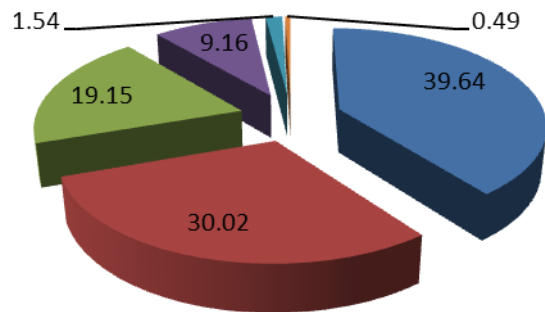
Figura 12. Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los EST's obtenidos de la biblioteca de cDNA para machos de abulón rojo.



A) Proceso biológico



B) Función molecular



C) Componente celular

- Procesos celulares
- Procesos metabólicos
- Regulación biológica
- Respuesta a estímulos
- Organización del componente celular
- Localización
- Procesos multicelulares
- Procesos de desarrollo
- Biogénesis del componente celular
- Señalización
- Reproducción
- Muerte
- Proliferación celular
- Procesos del sistema inmune
- Locomoción
- Reproducción viral
- Procesos de multiorganismos
- Crecimiento
- Adhesión biológica
- Unión
- Actividad catalítica
- Actividad estructural
- Actividad transportadora
- Regulación enzimática
- Actividad transductora
- Transporte de electrones
- Célula
- Organelos
- Complejos macromoleculares
- Lumen asociado a membranas
- Región extracelular
- Sinapsis

Figura 13. Distribución (%) del segundo nivel de Ontología Genética (GO) para las diferentes categorías de los contigs obtenidos de la secuenciación 454.

Tabla 7. Vías metabólicas de alta y baja abundancia para los contigs de la secuenciación 454 anotados en la base de datos KEGG's.

Vías metabólicas	Número de contigs
<i>Alta abundancia:</i>	
Metabolismo de las purinas	148
Metabolismo del Nitrógeno	49
Fosforilación oxidativa	43
Metabolismo de las pirimidinas	43
Metabolismo de la tiamina	31
Ciclo del citrato	28
Metabolismo del metano	27
Metabolismo de ácidos grasos	24
Degradación de valina, leucina e isoleucina	24
Fijación de Carbono en procariotas	22
Biosíntesis de aminoacil tRNA	21
Metabolismo de arginina y lisina	21
Metabolismo de glioxilato	21
Glucólisis/gluconeogénesis	20
<i>Baja abundancia:</i>	
Metabolismo de éster lipídicos	1
Biosíntesis de glucosilfosfatidil inositol	1
Biosíntesis de lisina	1
Degradación de estirenos	1
Biosíntesis de hormonas esteroides	1
Biosíntesis de folatos	1
Degradación de esteroides	1
Metabolismo de ácido lipoico	1
Biosíntesis de butirosina y neomicina	1
Biosíntesis de estreptomina	1
Resistencia de β -lactámicos	1
Biosíntesis de glucano tipo mucina	1
Biosíntesis de otros glucanos	1
Biosíntesis de penicilina y cefalosporina	1

3.1.5 Genes relacionados con la reproducción y sexo específicos

3.1.5.1. Biblioteca de cDNA

Para los machos, un contig estuvo relacionado con el proceso de reproducción en el segundo nivel de ontología (GO:0000003). Otros términos asociados con esta secuencia en otros niveles de ontología fueron proceso reproductivo (GO:0022414),

reproducción sexual (GO:0019953) y fertilización (GO:0009566). En el caso de las hembras, se identificó un contig homólogo a la proteína nucleolar 60b (Nop60B) relacionado con el proceso de reproducción. Otros procesos biológicos relacionados fueron la síntesis de pseudouridinas (GO: 0001522) y el procesamiento de RNA (GO: 0006396). Contigs sexo específicos correspondieron a vitelogenina y el precursor de lisina del esperma. La vitelogenina estuvo relacionada con el transporte de lípidos (GO: 0005319, GO: 6869) y el precursor de la lisina del esperma con la fertilización (GO: 0007338).

3.1.5.2. Secuenciación 454

Un total de 152 contigs estuvieron relacionados con la reproducción al segundo nivel de ontología. Los contigs con mayor número de identidades de ontología genética (GO ID) se describieron como factor inhibitorio de la migración de macrófagos (41 GO ID's), superóxido dismutasa Cu/Zn (38 GO ID's), proteínas asociadas con la sinapsis (27 GO ID's) y proteína similar al picotazo b (nipped-b-like protein, 26 GO ID's). Por otro lado, los contigs con los números más bajos de GO ID correspondieron a lisina (GO:0007338, fertilización), proteína 44 del tipo RING-finger (GO:0008584, desarrollo de la gónada del macho), proteína cre-zft-16 (GO:008406: desarrollo gonadal) y la proteína 10 del gen específica de los testículos (GO:0007283, espermatogénesis). En la Tabla 8 se muestran los contigs relacionados con la determinación y diferenciación sexual en tres diferentes niveles de la ontología de genes y sus categorías (proceso biológico, función molecular y componente celular).

3.1.6 Genes relacionados con el sistema inmune y procesos de crecimiento

Un total de 78 y 44 contigs de la secuenciación 454 estuvieron asociados con procesos de crecimiento y el sistema inmune al segundo nivel de la Ontología de Genes (Tablas 9 y 10). Las descripciones más conocidas para el sistema inmune fueron presenilina 1, superóxido dismutasa Cu/Zn, piruvato cinasa, retinoide X- β , piruvato deshidrogenasa, tropomiosina 4, actina 2, hsp70 y NADH deshidrogenasa, entre otros. Asimismo, para el crecimiento, las mejores descripciones fueron: presenilina 1, factor inhibitorio de la migración de macrófagos, superóxido dismutasa Cu/Zn, caspasa, hsp90, factor 2 de unión a interleucinas, precursor de panteteinasa y la subunidad h2 del complejo de la condensina, entre otros.

Tabla 8. Contigs de la secuenciación 454 relacionados con la diferenciación y determinación sexual en diferentes niveles de la Ontología de Genes (G0) y categorías.

Descripción	Número de contigs	Categorías de GO
Diferenciación sexual:		
<i>Macho</i>		
Proteína de fertilización	24	PB, FM
Precursor de la lisina del esperma	14	PB, FM
Tektina A1, 1 y 2	4	PB, FM, CC
Proteína cinasa específica de los testículos	4	FM
Proteína axonemal	3	PB, FM, CC
Proteína del flagelo del esperma 1 y 2	2	PB, FM, CC
Proteína sp18 asociada a la espermatogénesis	2	PB, FM
ATPasa transportadora de calcio	1	PB, FM, CC
Bomba de protones de sodio específico del esperma	1	PB
Espermidina sintasa	1	PB, FM
Lisina del esperma	1	PB
Proteína 10 específica de testículos	1	PB, CC
Proteína 11 expresada en testículos	1	FM
<i>Hembra</i>		
Catepsina b, d y l	8	PB, FM, CC
Antígenos 6, 7, 16 y 17 asociados con el esperma	5	PB, FM, CC
Precursor de catepsina z	3	PB, FM, CC
Genes estructurales de la vitelogenina	2	PB, FM
Receptor de lisina en la cubierta vitelina	2	PB, FM
VEZPD4	1	FM
VEZPD10	1	PB, FM, CC
Vitelogenina 1	1	PB, FM
Vitelogenina 3	1	PB, FM
Vitelogenina [<i>Haliotis discus hannai</i>]	1	PB, FM
Determinación sexual:		
Proteína de tipo vasa	2	FM
Proteína de tipo nanos	1	FM
DMRT1 específico de testículos	1	PB, FM, CC

PB: Proceso biológico; FM: Función molecular; CC: Componente celular

Tabla 9. Contigs de la secuenciación 454 asociados con procesos del sistema inmune al segundo nivel de la Ontología de Genes (GO) en el abulón rojo *H. rufescens*.

Contig ID	Descripción del hit	Número de ID's de GO
Hr_contig_8118	Presenilina 1	56
Hr_contig_1281	División del ciclo celular g1 a s y g2 a m	45
Hr_contig_2939	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos	41
Hr_contig_5568	Superóxido dismutasa Cu-Zn	38
Hr_contig_6135	Smarca4	29
Hr_contig_6993	Ubiquitina c variante 4	29
Hr_contig_1760	Map quinasa erk	27
Hr_contig_2302	Proteína asociada a la sinapsis	27
Hr_contig_5091	Argininasuccinato sintetasa 1	27
Hr_contig_10825	Proteína msh2 para reparación del DNA	25
Hr_contig_2167	Muts homólogo 2	25
Hr_contig_8220	Tirosina quinasa del bazo	24
Hr_contig_3283	Asociado a cáncer de mama	22
Hr_contig_8466	Proteína Myh9	22
Hr_contig_3278	Retinoblastoma 1	21
Hr_contig_11667	Enzima de conjugación con la ubiquitina e2n	19
Hr_contig_11859	Proteína b2 de alta movilidad	19
Hr_contig_2872	Fosfatasa subunidad alfa	18
Hr_contig_542	Enzima transformadora de angiotensina	16
Hr_contig_8913	Enzima transformadora de angiotensina isoforma 2	16
Hr_contig_1603	Proteína quinasa srpk2	14
Hr_contig_7936	Proteína 42 para el control de la división celular	14
Hr_contig_1606	Proteína 1 interactuante con aminoacil tRNAs	13
Hr_contig_3562	Proteína ribosomal s19	12
Hr_contig_3847	Proteína quinasa proto oncogen C-mer	12
Hr_contig_9653	Proteína Wwp1	12
Hr_contig_12066	Proteína msh6 para reparación del DNA	11
Hr_contig_4932	Proteína sbds para maduración del ribosoma	11
Hr_contig_4941	Aduccina del sistema nervioso	11
Hr_contig_11409	Secuencia genómica de <i>Pinus taeda</i> locus 2_4109_02	10
Hr_contig_2815	Caja 2 del grupo de alta movilidad	10
Hr_contig_3211	Proteína Mll5	10
Hr_contig_6128	Inhibidor del factor nuclear kappa- β quinasa	10
Hr_contig_6215	Proteína msh2 para reparación del DNA	10
Hr_contig_6224	Proteína quinasa activada por mitógeno	10
Hr_contig_920	Moesina radixina Ezrin	10
Hr_contig_2174	Complejo Ap2 subunidad σ	9
Hr_contig_11877	β 2c	8

Tabla 9. (continuación).

Contig ID	Descripción del hit	Número de ID's de GO
Hr_contig_2282	Complejo Ap2 subunidad β	8
Hr_contig_4387	N-acetilglucosaminil transferasa	8
Hr_contig_5664	Caspasa	8
Hr_contig_10613	RNA polimerasa III dependiente de DNA subunidad rpc1	7
Hr_contig_2555	Proteína gamma de unión al potenciador CCAAT	7
Hr_contig_3413	Precursor de panteteinasa	7
Hr_contig_3727	Proteína Hells	7
Hr_contig_6450	Proteína msh3 para reparación del DNA	7
Hr_contig_9118	Componente del exosoma 9	7
Hr_contig_12250	Proteína Dusp7	6
Hr_contig_3458	Histona acetiltransferasa myst1	6
Hr_contig_3684	Proteína ribosomal I11	6
Hr_contig_3890	Proteína Ga19045	6
Hr_contig_11335	Proteína Mgc83221	5
Hr_contig_11580	Glucosidasa 2 subunit beta	5
Hr_contig_12102	RNA polimerasa III dependiente de DNA subunidad rpc8	5
Hr_contig_1295	Subunidad del complejo de vesículas	5
Hr_contig_3231	Zinc finger Protein c3h tipo 1 del grupo Zinc finger	5
Hr_contig_8567	Proteína de choque térmico 90 (hsp90)	5
Hr_contig_9938	Precursor de la subunidad 48 kDa de glucosil transferasa	5
Hr_contig_11774	Subunidad alfa del proteosoma de tipo 1	5
Hr_contig_65	Antígeno reconocido por las células T del carcinoma	4
Hr_contig_9022	Moesina	4
Hr_contig_1639	Transportadora de solutos de la familia 25	4
Hr_contig_2785	Polipéptido de activación de la tirosina 3-monooxigenasa	3
Hr_contig_288	Complemento del factor D	3
Hr_contig_3174	Factor de unión 2 para el potenciador de interleucinas	3
Hr_contig_3434	RNA polimerasa III dependiente de DNA subunidad rpc4	3
Hr_contig_9809	Homólogo de la subunidad 5 del complejo Tho	3
Hr_contig_10248	Proteína 1 de tipo β	3
Hr_contig_3102	Proteína ubiquitin ligasa E3	2
Hr_contig_4781	Proteína transmembranal 181	2
Hr_contig_7526	Proteína Zing finger adyacente al Bromodominio	2
Hr_contig_8169	Dipeptidil peptidasa 1	2
Hr_contig_9398	Citoquina Ik	2
Hr_contig_10454	Receptor fc para inmunoglobulina de baja afinidad	2
Hr_contig_1267	Subunit h2 del complejo condensina 2	1
Hr_contig_2863	Factor de corte 3a	1
Hr_contig_5070	Señalización de tipo Toll	1

Tabla 10. Contigs de la secuenciación 454 asociados con procesos de crecimiento al segundo nivel de la Ontología de Genes (GO) en el abulón rojo *H. rufescens*.

Contig ID	Descripción del hit	Número de ID's de GO
Hr_contig_8118	Presenilina 1	56
Hr_contig_1281	División del ciclo celular g1 a s y g2 a m	45
Hr_contig_1038	Proteína C de tipo Ras	40
Hr_contig_5568	Superóxido dismutasa Cu-Zn	38
Hr_contig_6135	Smarca4	29
Hr_contig_2302	Proteína asociada a la sinapsis	27
Hr_contig_11434	Proteína de tipo Nipped	26
Hr_contig_286	Guanilato asociado a membrana	25
Hr_contig_4554	Factor transcripcional	23
Hr_contig_3283	Asociado a cáncer de mama	22
Hr_contig_1524	Proteína Loc734002	19
Hr_contig_2872	Fosfatasa subunidad alfa	18
Hr_contig_3169	Reticulon 4	18
Hr_contig_6526	Oxidasa dual 2	16
Hr_contig_3241	Piruvato cinasa	15
Hr_contig_4259	Npr2 parcial	15
Hr_contig_8882	Proteína G	15
Hr_contig_260	Retinoide X-β	14
Hr_contig_6611	Piruvato deshidrogenasa isoforma b	13
Hr_contig_11773	Proteína del retículo endoplasmático asociada con el estrés	12
Hr_contig_3815	Proteína relacionada con receptores de lípidos de baja densidad	12
Hr_contig_5016	Proteína Cre-unc-52	12
Hr_contig_9811	Tropomiosina 4	12
Hr_contig_4932	Proteína sbds de maduración de los ribosomas	11
Hr_contig_4941	Aduccina del sistema nervioso	11
Hr_contig_11715	Sintenina 1 (isoforma 5)	10
Hr_contig_11747	Proteína cinasa Ttk	9
Hr_contig_3108	Actina 2	9
Hr_contig_1046	Factor 19 procesador de pre mRNA	8
Hr_contig_1363	Proteína de choque térmico (hsp70)	8
Hr_contig_7898	Polimerasa 1 Poli-(adp-ribosa)	8
Hr_contig_7999	Proteína Epc1	8
Hr_contig_3042	Proteína 14-3-3	7
Hr_contig_4431	Proteína del grupo Zinc finger	7
Hr_contig_9118	Componente del exosoma 9	7
Hr_contig_3658	Isocitrato deshidrogenasa	5
Hr_contig_1646	Subunidad 1 del complejo integrador	4
Hr_contig_4242	Homólogo de la proteína st7	3

Tabla 10. (continuación)

Contig ID	Descripción del hit	Número de ID's de GO
Hr_contig_7100	NADH deshidrogenasa	3
Hr_contig_8718	Bmp2 4	3
Hr_contig_6196	Adenosina cinasa	2
Hr_contig_7970	Proteína 1 interactuante con la neurona motora de la supervivencia	2
Hr_contig_11039	Proteína 706 del grupo Zinc finger	1
Hr_contig_3423	Proteína con dominio inhibidor de la serina proteasa de tipo Kazal	1

3.1.7 Macroarreglo

3.1.7.1 Unigenes

El análisis de BLASTx reveló la presencia de 377 unigenes en la biblioteca de cDNA de tejido gonadal en las hembras de abulón rojo, los cuales se dividieron en 65 contigs y 312 singletons. Del total de unigenes, 269 tuvieron homología en el GenBank, mientras que 108 no presentaron ningún término asociado. Asimismo, del grupo de secuencias con homología el 30% fue anotado en la base de la ontología de genes (Figura 14). En la Tabla 11 se presenta la descripción de la homología de los unigenes.

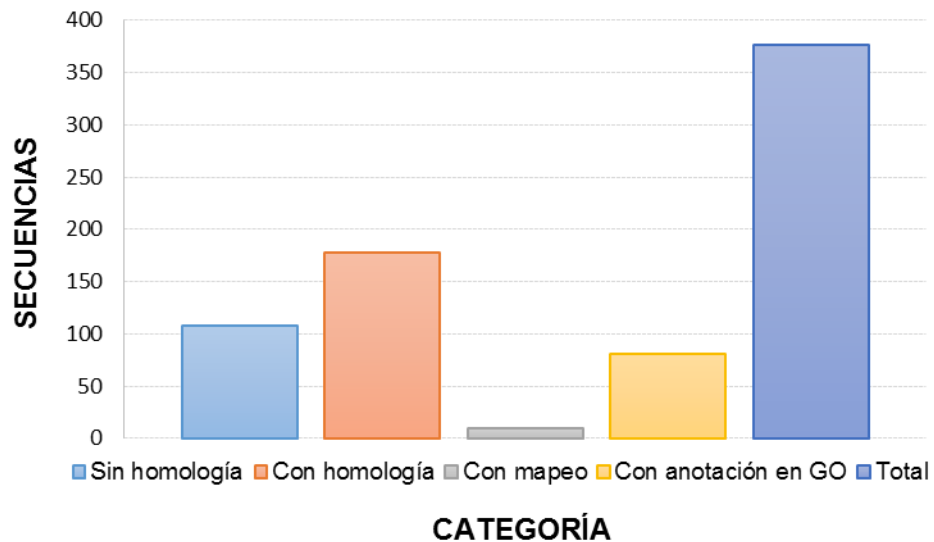


Figura 14. Resultados del BLASTx para las secuencias de EST's del tejido gonadal de las hembras de abulón rojo destinadas para la elaboración del macroarreglo.

Tabla 11. Descripción de la homología de los unigenes no redundantes de la biblioteca de cDNA para hembras de abulón rojo.

Descripción de la secuencia	pb	Acceso	Valor E	Similitud (%)
Acetil citosólico	649	XP_009048899	3.80E-78	94
Aldosa 1 epimerasa	414	EKC23657	9.88E-27	74
Antígeno nuclear de células proliferantes	942	XP_005092985	6.56E-135	91
Apolipoprotein d	687	XP_002740546	4.87E-26	62
ATP sintasa de tipo mitocondrial isoforma x2	606	ABY87376	1.90E-33	97
ATP sintasa subunidad 6	749	ACB73225	1.73E-106	96
ATPasa de tipo mitocondrial	665	XP_009066104	5.15E-15	82
Cafeoil- o-metiltransferasa	599	WP_007311102	1.74E-49	63
Calreticulín	292	EKC27799	3.79E-37	88
Celulasa	426	BAC67187	2.35E-76	94
Celulasa multifuncional	312	ACC86116	1.52E-13	73
Ciclina específica mitótica g2 parcial	885	EKC19463	4.85E-10	68
Citocromo b	806	ACB73229	1.44E-142	97
Citocromo c	629	Q6QLW4	6.63E-60	90
Citocromo parcial	197	AAB81267	2.89E-21	88
Desintegrina a y metaloproteínasa	1084	XP_009046161	3.09E-26	51
Diaminobutirato 4 aminotransferasa	353	EGZ20736	1.43E-07	46
Ectoina hidroxilasa	648	XP_005108978	2.10E-33	72
Elastasa	790	WP_021140089	4.96E-47	62
Eosinofil peroxidase	537	AAA16244	1.80E-44	62
Factor 40 de procesamiento de pre-mRNA	649	EKC27272	3.02E-84	89
Factor asociado a pcna	981	XP_005314444	1.68E-12	67
Factor de corte 2 rico en serina arginina	541	EKC32256	4.41E-24	96
Factor de elongación 1 gamma	680	XP_009009109	1.49E-72	81
Factor de elongación 1 parcial	279	XP_003925668	9.80E-27	82
Ferritina	706	ADK60915	1.52E-47	94
Fosfoglicerato deshidrogenasa d3	209	XP_005090703	5.81E-30	88
Glucosidasa alfa neutral isoforma x3	1106	EKC40929	1.02E-49	75
Glutathione s transferasa	679	ABO26603	5.75E-27	76
Homólogo de la proteína 6 del locus surfeit	913	XP_009053294	5.61E-13	78
Inhibidor 1 de la telomerasa interactuante con pin2	235	XP_008494390	2.76E-05	65
NADH deshidrogenasa subunidad 5	816	ACB73226	2.07E-140	93
Peptidil tRNA hidrolasa mitocondrial isoforma x1	564	XP_005101298	9.84E-25	76
Precursor de serina proteasa de tipo quimi tripsina	584	P35003	2.56E-14	56
Profilina	559	ABY87349	7.11E-27	79
Proteína 1 interactuante con estriatina	639	ELU17163	2.29E-06	88
Proteína del factor 2 de unión a post-gpi	622	EKC17467	1.48E-40	70
Proteína predicha	153	CCD58973	6.78E-12	88

Tabla 11. (continuación).

Descripción de la secuencia	pb	Acceso	Valor E	Similitud (%)
Proteína 2 de la matriz repetitiva serina arginina	753	EKC18006	6.54E-78	90
Proteína 1 con el dominio de la nucleasa estafilococal	892	EKC40848	7.21E-23	84
Proteína 1 con el dominio ribosomal I1	1205	XP_005092473	3.17E-82	71
Proteína 1 tipo quinona oxidoreductasa isoforma x2	733	XP_009060271	1.97E-50	78
Proteína 1 de unión a poliadenilatos	1251	AEW42987	3.91E-141	97
Proteína 20 homóloga del ciclo de división celular	1053	XP_003707890	2.75E-23	62
Proteína 4 con el dominio thap isoforma x2	762	XP_005241630	1.37E-55	69
Proteína 5 conteniendo el dominio mynd y set	734	XP_009052485	1.91E-106	79
Proteína asociada a senescencia	468	ACZ34291	3.91E-17	82
Proteína con dominio de la fasciclina	688	XP_009048290	3.06E-17	68
Proteína con la repetición wd de la caja f	671	XP_009048884	4.24E-119	96
Proteína de choque térmico hsp90	1091	ACX94847	0	98
Proteína de repetición de la triple hélice del colágeno	661	ETT43693	8.94E-13	65
Proteína del esperma autoantigenica	311	XP_007550861	5.71E-11	73
Proteína hipotética CGI_10019718	586	EKC30826	1.28E-08	53
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_162340	400	XP_009056548	4.17E-09	57
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_166149	567	XP_009061452	6.83E-14	58
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_238761	331	XP_009049647	3.72E-12	68
Proteína inhibidora del crecimiento	701	EKC37103	1.36E-56	76
Proteína no caracterizada LOC101855522	701	XP_005107638	5.51E-07	84
Proteína no caracterizada LOC101863969	406	XP_005094409	3.17E-13	64
Proteína parcial	430	ACX37426	5.55E-80	99
Proteína predicha	377	XP_001631524	4.01E-05	47
Proteína psf1 del complejo de replicación del DNA	492	EKC37719	2.11E-74	95
Proteína ribosomal 60S I12	198	XP_009057640	6.90E-13	87
Proteína ribosomal 60S I18a	308	ACD65169	5.76E-28	88
Proteína ribosomal 60S I21	232	AFV81459	2.59E-15	74
Proteína ribosomal 60S I27	495	ABZ04238	1.62E-74	94
Proteína ribosomal 60S I27a	294	XP_009022948	1.07E-43	92
Proteína ribosomal 60S I6	281	AIE16173	1.61E-23	87
Proteína ribosomal 60S parcial	718	XP_005105827	1.86E-96	90
Proteína ribosomal I3	490	AEW42982	2.40E-90	99
Proteína ribosomal I5	794	ABO26701	9.14E-116	98
Proteína ribosomal s2 isoforma 3	803	XP_005108650	8.77E-149	92
Proteína ribosomal s4	714	ABO26688	1.54E-137	100
Proteína ribosomal sa 40S	647	ABO26619	4.10E-135	99
Protocaderina grasa 2	689	EKC21435	2.77E-12	48
Receptor ϵ de inmunoglobulinas de baja afinidad	920	XP_009053982	6.32E-34	46
Regulador transcripcional atrx	386	EKC43176	3.57E-21	78
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea I	742	XP_009065822	3.40E-27	76
Serina carboxipeptidasa inducible del retinoide	969	XP_009062081	5.45E-65	73

Tabla 11. (continuación).

Descripción de la secuencia	pb	Acceso	Valor E	Similitud (%)
Sialofosfodentina	944	ELU10681	3.47E-24	76
Subunidad 4 del complejo haus augmina isoforma x1	991	XP_009050923	2.08E-114	76
Subunidad alfa del proteasoma tipo 2	685	XP_009043856	3.82E-80	89
Subunidad alfa del proteasoma tipo 6	793	EKC30164	1.64E-61	90
Subunidad del complejo citocromo b-c1	405	XP_005092343	1.46E-12	73
Subunidad del factor de corte u2af 35 kDa isoforma x2	660	EKC34075	3.22E-114	86
Subunidad I del citocromo c oxidasa	1284	ACL99801	0	97
Subunidad III del citocromo c oxidasa	840	YP_026066	5.43E-139	93
Subunidad parcial del complejo señalísoma cop9	667	EKC38149	3.14E-22	92
Subunidad regulatoria de la ATPasa	795	EKC39252	5.53E-82	83
Subunidad sap30l complejo deacetilasa de histonas	393	EKC40291	3.57E-59	92
Subunidad teta de la proteína 1 del complejo t	670	ABO26620	6.16E-62	98
Timidilato sintasa	695	XP_009062346	5.22E-94	88
Timosina β -12	485	AEW42985	7.57E-16	93
VEZPD 2	809	ACX37440	3.11E-27	100
VEZPD 3	961	ABE72921	1.55E-81	99
VEZPD 4	740	ABE72925	2.71E-123	99
VEZPD 5	653	ABE72929	1.77E-150	99
VEZPD 6	933	ACX37422	0	99
VEZPD 7	463	ACX37436	1.12E-104	100
VEZPD 8	1038	ABE72945	6.91E-152	92
VEZPD 9	501	ABE72949	4.15E-94	99
VEZPD 10	1081	ACX37441	2.20E-142	96
VEZPD 12	173	ACX37422	4.35E-26	96
VEZPD 14	1092	ACX37423	2.24E-138	94
VEZPD 19	253	ACX37429	2.84E-28	98
VEZPD 21	347	ACX37431	3.81E-47	100
VEZPD 23	268	ACX37433	4.89E-15	95
VEZPD 26	611	ACX37436	3.99E-13	97
VEZPD 27	274	ACX37437	6.62E-20	97
VEZPD 29	254	ACX37439	6.43E-36	100
VEZPD parcial	729	ACX37425	6.33E-64	71
Vitelogenina	670	BAF98238	1.16E-19	97
Zinc finger de unión al RNA	927	XP_009051823	4.23E-84	66
Zona pelucida dominio a	890	ABE72933	0	98
α -tubulina	853	BAJ14323	1.53E-25	79
α -tubulina parcial	533	XP_002589328	1.39E-76	100

3.1.7.2 Detección de insertos positivo.

De la muestra de DNA plasmídico seleccionado aleatoriamente para confirmar la presencia de insertos positivos, el 96% tuvo una longitud entre 150 y 1,000 pb, generando amplicones con tamaños aproximados entre 200 pb y mayores a 1,000 pb debido a que los iniciadores *EcoRV* y *NotI* generan un fragmento de 53 pb (Figura 15).

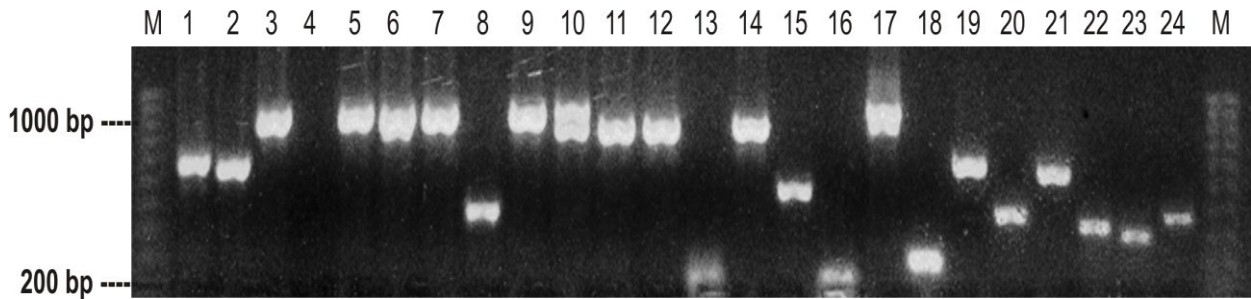


Figura 15. Detección de insertos en DNA plasmídico para la biblioteca de cDNA de hembras de abulón rojo.

3.1.7.3 Evaluación de sonda con dot blot

La evaluación de la sonda marcada con digoxigenina mediante dot blot resultó ser exitosa como se muestra en el control positivo (Figura 16). Asimismo, la ausencia de coloración en el control negativo indica que la selección de los iniciadores fue adecuada a pesar de que generan un fragmento de 53 pb. Por otro lado, dada la intensidad de la coloración en la reacción del control positivo, es posible efectuar la hibridación de la muestra con la sonda diluida en el orden de 10^{-1} y 10^{-2} .

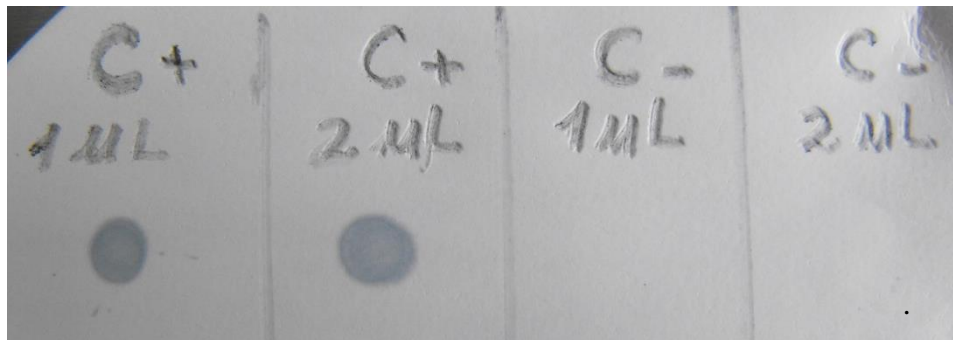


Figura 16. Reacción final de la hibridación de la sonda marcada con digoxigenina. C+=inserto positivo de 783 pb y C-=Inserto negativo de 1 pb.

3.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón rojo

3.2.1 Cantidad y calidad del RNA total

El RNA se purificó a partir de branquias, cabeza y gónada/glándula digestiva. La concentración de RNA total fue $1,235.66 \pm 489.58 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los promedios totales para las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ fueron 2.08 ± 0.07 y 2.14 ± 0.20 , respectivamente. Estos valores indicaron una alta pureza del RNA y libre de compuestos tales como proteínas, residuos fenólicos y tiocianato de guanidina. Además, la electroforesis en gel de agarosa formaldehído desnaturalizante confirmó la integridad del RNA total.

3.2.2 Amplificación de iniciadores por RT-qPCR

Se evaluaron por RT-qPCR nueve genes con diferentes funciones celulares (*ACTB*, *BGLU*, *CY*, *GAPDH*, *HPRTI*, *RPL5*, *SDHA*, *TUBB* and *UBC*) en tres tejidos de abulón rojo. Los valores de Cq variaron entre 15.63 ± 0.60 (*RPL5*) y 22.882 ± 1.26 (*BGLU*). Generalmente, el control negativo (NTC) no amplificó. No obstante, cuando hubo amplificación, éste mostró dos características: a) $Cq \geq 35$ y b) $Cq, \text{ NTC} - Cq \text{ máx.}, \text{ muestra} > 10$; e indicó la correcta amplificación entre las muestras y el control. Los valores para el coeficiente de determinación (R^2) de las curvas estándar variaron entre 0.993 y 0.999. Además, las eficiencias de la PCR estuvieron entre 0.95 y 0.99 (Tabla 12). Estos resultados demuestran una alta reproducibilidad y especificidad de los iniciadores, lo cual se confirmó con el análisis de la curva estándar que mostró un solo pico.

3.2.3 Estabilidad de expresión de los genes de mantenimiento

Se usaron los programas geNorm y NormFinder para analizar la estabilidad de la expresión de nueve genes. Estos resultados se dividieron en todos los tejidos, branquia, cabeza y gónada/glándula digestiva.

Tabla 12. Valores de eficiencia (E) y R² para los iniciadores de los genes de mantenimiento usados en las reacciones de RT-qPCR.

Gen	Acceso GenBank	Función celular	E ^a	R ²
<i>ACTB</i>	KJ188152	Proteína estructural del citoesqueleto	0.98	0.993
<i>BGLU</i>	KJ188153	Procesos metabólicos de carbohidratos	0.99	0.997
<i>CY</i>	KJ188154	Plegamiento de proteínas	0.95	0.998
<i>GAPDH</i>	KJ188155	Enzima glucolítica	0.97	0.999
<i>HPRT I</i>	KJ188156	Síntesis de nucleótidos de purinas	0.99	0.999
<i>RPL5</i>	KJ188157	Componente ribosomal (60S)	0.99	0.996
<i>SDHA</i>	KJ188158	Transporte de electrones en el ciclo de Krebs y cadena respiratoria	0.95	0.999
<i>TUBB</i>	KJ188159	Proteína estructural	0.98	0.999
<i>UBC</i>	KJ188160	Degradación de proteínas	0.99	0.996

a: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})-1}$

3.2.3.1. geNorm

Para obtener los mejores genes, geNorm recomienda un valor de estabilidad promedio (M) ≤ 1.5 . El orden de los genes candidatos para *H. rufescens* respecto al valor M fue: *RPL5 + CY > GAPDH > SDHA > HPRTI > TUBB > UBC > ACTB > BGLU* (Figura 17A). Asimismo, cuando se analizó la estabilidad de los genes en branquias, el orden fue: *HPRTI + BGLU > RPL5 > UBC > ACTB > TUBB > CY > GAPDH > SDHA* (Figura 17B). En cabeza, siguiendo el mismo patrón de los valores de M , el orden fue: *RPL5 + UBC > ACTB > CY > GAPDH > SDHA > HPRTI > BGLU > TUBB* (Figura 17C). Por otro lado, la gónada/glándula digestiva presentó los siguientes valores de M : *RPL5 + TUBB > UBC > GAPDH > HPRTI > SDHA > BGLU > CY > ACTB* (Figura 17D). Aquí, bajos valores de M representan una mayor estabilidad del gen. Además, en todos los casos, *RPL5* apareció como uno de los genes más estables.

Con base en el análisis de variación pareada ($V_{n/n+1}$), geNorm puede calcular el número de genes candidatos necesarios que se requieren para normalizar un experimento. El

valor de corte fue de 0.15, bajo el cual, no se requiere la adición de un nuevo gen candidato. Considerando todos los tejidos, los valores de $V_{n/n+1}$ fluctuaron entre 0.075 ($V_{2/3}$) y 0.21 ($V_{7/8}$). Para branquias, cabeza y gónada/glándula digestiva los valores $V_{n/n+1}$ fueron menores de 0.15. Estos resultados sugieren que el factor de estandarización debería incluir dos genes (Figura 18).

3.2.3.2. NormFinder

A diferencia de geNorm, NormFinder calcula el valor de estabilidad de cada uno de los genes candidatos con base en su varianza mínima combinada dentro de los grupos y entre los grupos. Al respecto, los genes que se expresaron de manera más estable presentaron valores bajos de estabilidad de expresión promedio. Los resultados de este estudio (Tabla 13) indican que cuando se consideraron todos los tejidos, los genes más estables fueron *RPL5* (0.172) y *CY* (0.213), mientras que en branquias los genes más estables fueron *HPRT1* (0.020) y *BGLU* (0.020). En el caso de cabeza, los genes más estables fueron *GAPDH* (0.070) y *CY* (0.70); a la vez que *SDHA* (0.070) y *HPRT1* (0.070) lo fueron para gónada/glándula digestiva.

Tabla 13. Estabilidad de los genes de mantenimiento para tres tejidos de abulón rojo con diferente longitud de concha (5–45 mm) evaluada con NormFinder (1=mejor, 9=peor).

Orden	Branquia	Cabeza	Gónada/glándula digestiva	Todos los tejidos
1	<i>HPRT I</i>	<i>GAPDH</i>	<i>SDHA</i>	<i>RPL5</i>
2	<i>BGLU</i>	<i>CY</i>	<i>HPRT I</i>	<i>CY</i>
3	<i>RPL5</i>	<i>SDHA</i>	<i>BGLU</i>	<i>HPRT I</i>
4	<i>UBC</i>	<i>ACTB</i>	<i>RPL5</i>	<i>GAPDH</i>
5	<i>ACTB</i>	<i>RPL5</i>	<i>TUBB</i>	<i>TUBB</i>
6	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT I</i>	<i>CY</i>	<i>SDHA</i>
7	<i>TUBB</i>	<i>UBC</i>	<i>UBC</i>	<i>UBC</i>
8	<i>CY</i>	<i>BGLU</i>	<i>GAPDH</i>	<i>ACTB</i>
9	<i>SDHA</i>	<i>TUBB</i>	<i>ACTB</i>	<i>BGLU</i>

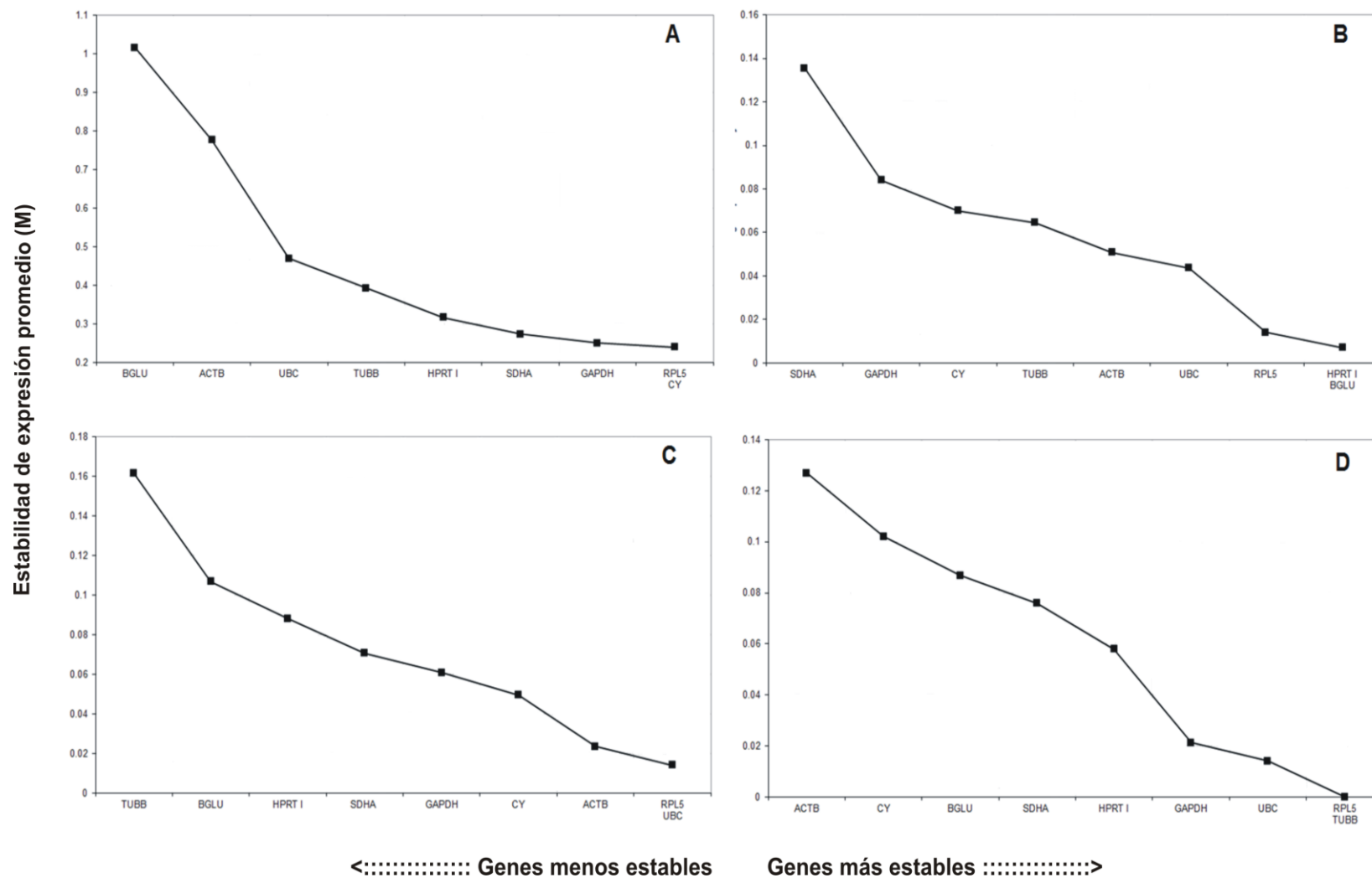


Figura 17. Valores de estabilidad de genes de mantenimiento evaluados con geNorm: A) Todos los tejidos, B) Branquias, C) Cabeza y D) Gónada/glándula digestiva.

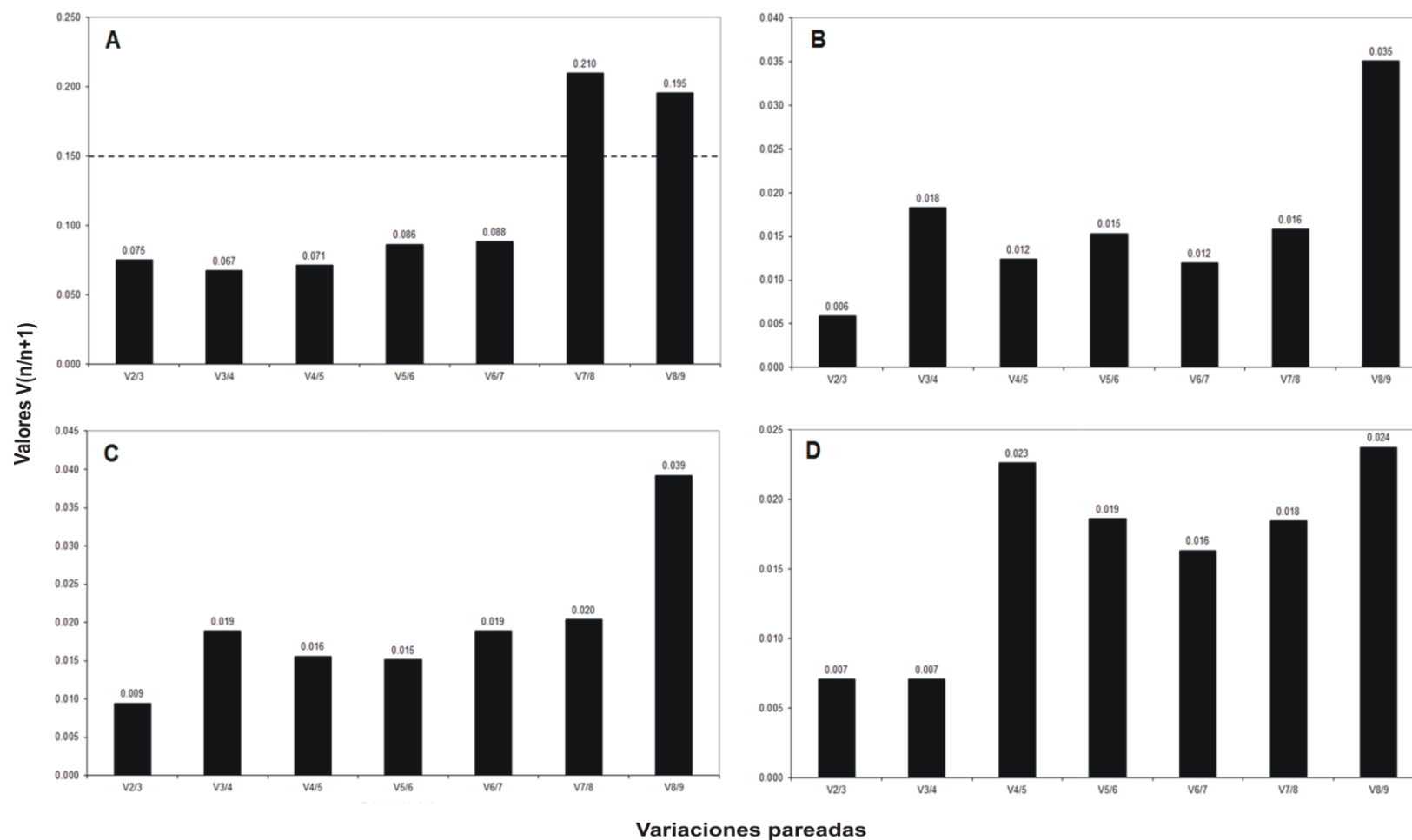


Figura 18. Análisis de variación pareada ($V_{n/n+1}$) calculado por geNorm para determinar el número óptimo de genes de mantenimiento necesarios para normalización. A) Todos los tejidos, B) Branquia, C) Cabeza y D) Gónada/glándula digestiva

3.2.4 Variación dentro y entre ensayos

El ensayo de reproducibilidad para los transcritos que se evaluaron con *RPL5* se basó en el promedio y la variación de los valores de Cq. En este estudio, los resultados fueron: a) ≤ 1.89 para el ensayo entre grupos y b) ≤ 0.56 para el ensayo dentro de los grupos. Estos valores son bajos y demuestran una alta reproducibilidad y precisión del ensayo (Tabla 14). Por otro lado, el nivel de expresión promedio del gen *RPL5* en la gónada/glándula digestiva no mostró diferencias significativas a través de los cuatro intervalos de longitud de concha que se evaluaron ($P > 0.05$, Figura 19). Por lo anterior, se utilizó este gen como referencia para los siguientes análisis (Sección 3.3)

Tabla 14. Variación dentro de los ensayos (precisión) y entre ensayos (variabilidad) del termociclador RotorGene 6000 (Corbett Research) con *RPL5* y cDNA de la gónada/glándula digestiva en abulón rojo (DE=Desviación estándar y CV=Coefficiente de variación).

Longitud de concha (mm)	Dentro de los ensayos			Entre los ensayos		
	Media de Cq	DE	CV (%)	Media de Cq	DE	CV (%)
5 - 15 (n=3)	14.11	0.08	0.56	14.70	0.23	1.58
16 - 25 (n=3)	13.37	0.06	0.45	13.55	0.22	1.62
26 - 35 (n=3)	14.51	0.05	0.34	14.56	0.26	1.79
36 - 45 (n=3)	14.07	0.07	0.50	14.32	0.27	1.89

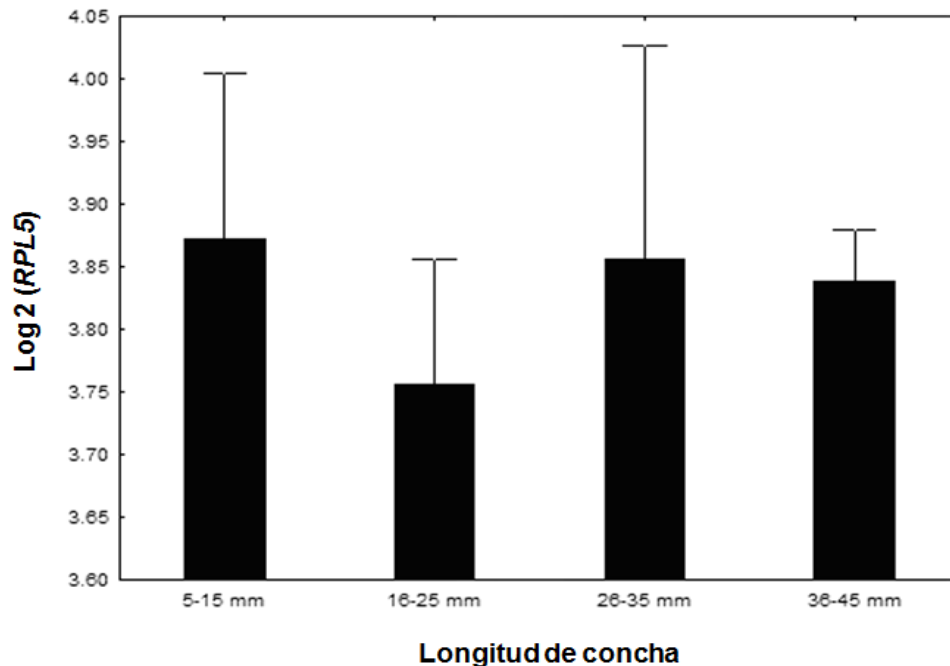


Figura 19. Expresión de *RPL5* en gónada/glándula digestiva de abulón rojo con diferente longitud de concha (ANOVA de una vía, $F_{(3,8)}=0.5575$, $P > 0.05$). Datos mostrados como media \pm desviación estándar.

3.3 Expresión de genes sexo específicos en juveniles de abulón rojo

3.3.1 Amplificación de iniciadores por RT-qPCR

De los ocho pares de iniciadores que se evaluaron para los genes sexo-específico, *SARIP* presentó mayor nivel de expresión con valores de Cq fluctuando entre 3.11 y 5.02. Asimismo, los niveles más bajos de expresión fueron para *DMRT1* con fluctuaciones de Cq entre 28 y 36.49 y para *VTGI* con valores entre 28 y 35.5. Por otro lado, los valores para el coeficiente de determinación (R^2) de las curvas estándar variaron entre 0.983 y 0.999. Además, las eficiencias de la PCR estuvieron entre 0.95 y 1.02 (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de eficiencia (E) y R^2 para los iniciadores de los genes sexo específicos usados en la reacción de RT-qPCR.

Gen	Función celular	Cq (Mín – Máx.)	E	R^2
<u>Hembra</u>				
<i>VCP 2.2</i>	Componente estructural del ovocito	24-31	0.97	0.996
<i>VERL</i>	Fusión especie específica espermatozoide ovocito	28-34	0.95	0.997
<i>VTGI</i>	Precursor de vitelina	28-35.5	1.02	0.999
<u>Macho</u>				
<i>DMRT1</i>	Determinación y diferenciación sexual	29-35.5	0.98	0.995
<i>FP</i>	Fusión espermatozoide ovocito	24-29.5	0.96	0.983
<i>LYS</i>	Fusión especie específica espermatozoide ovocito	25-30	0.97	0.983
<i>SARIP</i>	Receptor de andrógenos	3-5	0.98	0.993
<i>TEKT</i>	Componente estructural del citoesqueleto	20-24	0.97	0.976

3.3.2 Asignación de sexos

Los resultados de la asignación de sexos indicaron que los individuos en el intervalo de longitud de concha 5-15 mm fueron clasificados como hembras. Esto podría representar dos escenarios: a) Que el proceso de maduración gonadal aún no está activo en su totalidad o, b) Que el proceso de maduración es activo y existe realmente una mayor expresión del gen *VERL* respecto al gen *LYS*. Para el resto de intervalos, el porcentaje de hembras y machos respectivamente fue: a) 29% y 71% (16-25 mm), b) 50% y 50% (26-35 mm) y c) 40% y 60% (36-45 mm). En el caso de los machos y hembras maduros, el sexo fue confirmado (Figura 20).

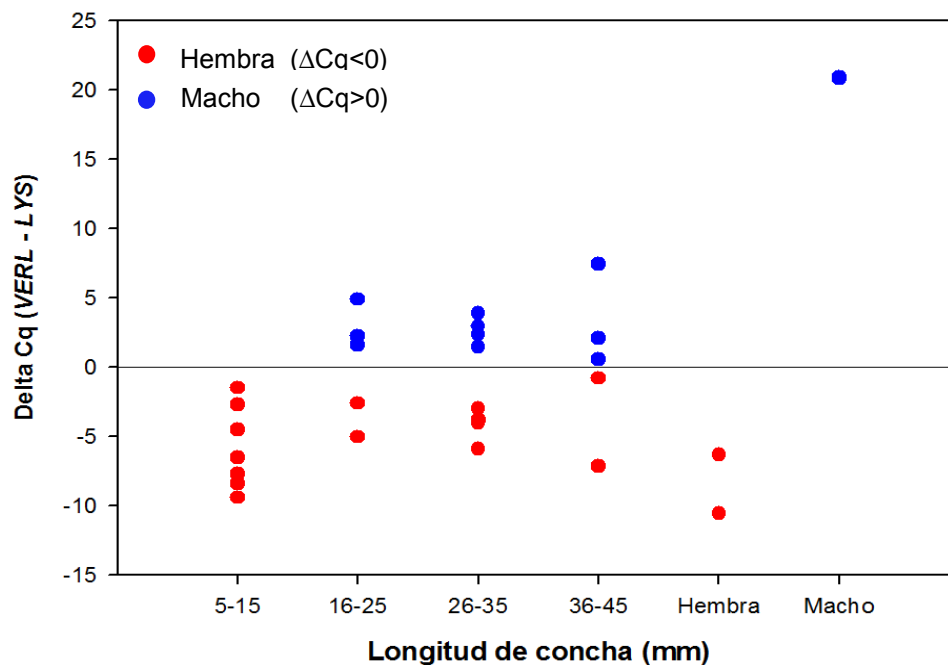


Figura 20. Asignación de sexos en individuos indiferenciados y maduros de abulón rojo mediante el diferencial de expresión de *VERL* y *LYS*.

3.3.3 Expresión diferencial

3.3.3.1. Proteína de la cubierta vitelina (*VCP 2.2*)

En el grupo clasificado como hembras, los niveles de expresión de *VCP 2.2* resultaron ser significativamente diferentes a través de los diferentes grupos experimentales ($P < 0.0001$). Los niveles de expresión se mantuvieron bajos y estadísticamente iguales entre los intervalos de longitud de concha 5-15 mm, 16-25 mm y 26-35 mm. No obstante, a partir del intervalo 36-45 mm, la expresión de este gen fue diferencial con

valores mayores a 200 con respecto al intervalo inicial. Asimismo, los niveles de expresión de *VCP 2.2* en las hembras maduras fueron muy altos en comparación a los cuatro intervalos de talla que se evaluaron (Figura 21A). Para el caso de los machos, se observó la misma tendencia que en las hembras. Hubieron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0.0001$), la expresión diferencial ocurrió en el intervalo 36-45 mm y los niveles de expresión en los machos maduros fue mayor respecto a todos los intervalos (Figura 21B). Una característica importante a destacar es que aunque se presentó el mismo patrón que en las hembras los niveles de expresión fueron más bajos.

El análisis de homología del fragmento secuenciado que se realizó en el banco de genes del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), demostró que está relacionado con el mRNA correspondiente al dominio 2 de la zona pelúcida en la cubierta vitelina (VEZP2, por sus siglas en inglés) de las especies *H. fulgens* y *H. discus hannai* (Tabla 16).

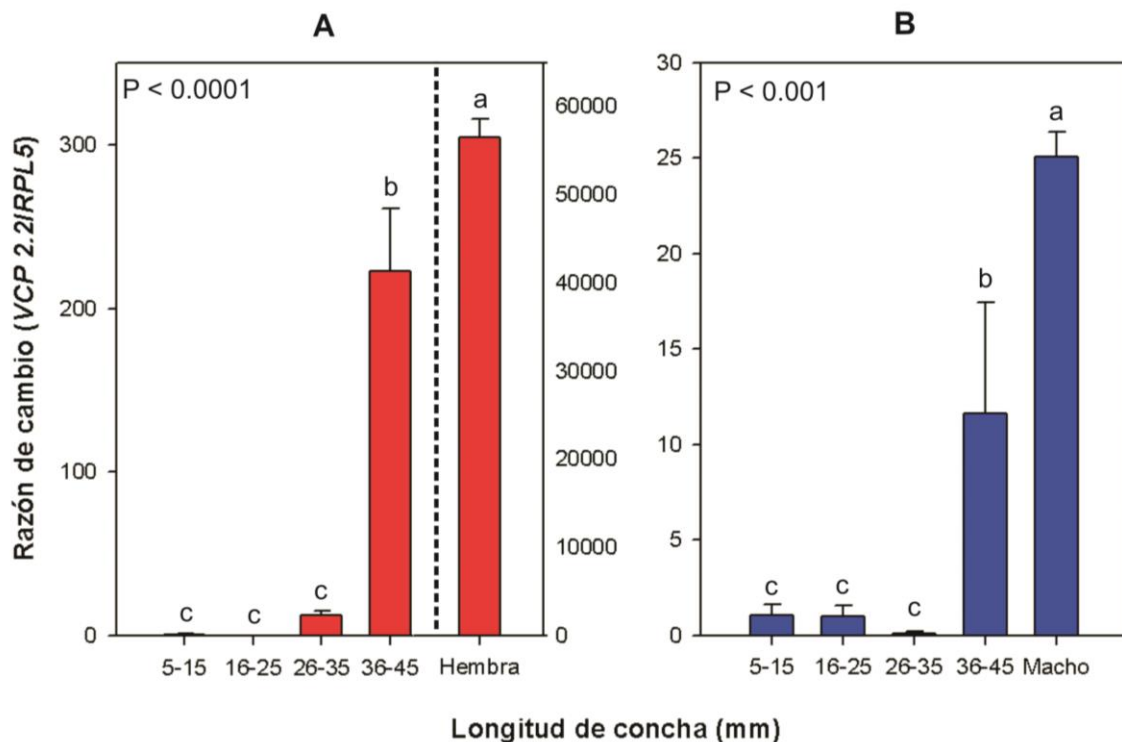


Figura 21. Expresión relativa de *VCP 2.2* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

Tabla 16. Homología de los productos de PCR para los genes asociados al sexo, encontrada en el banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Gen	Descripción	Valor E	ID (%)	Acceso
VCP2.2	mRNA del dominio 2 de la zona pelúcida en la cubierta vitelina, <i>H. rufescens</i> , complete cds	3E-10	100	DQ453712.1
	mRNA del dominio 2 de la zona pelúcida en la cubierta vitelina, <i>H. fulgens</i> , complete cds	0.000004	100	DQ453713.1
	mRNA del dominio 2 de la zona pelúcida en la cubierta vitelina, <i>H. discus hannai</i>	0.000004	100	DQ453711.1
VERL	Aislado p003 para el receptor de lisina en la cubierta vitelina, <i>H. corrugata</i> , exon, cds parcial	4E-12	98	FJ940539.1
	mRNA del receptor de lisina en la cubierta vitelina, <i>H. fulgens</i> , cds parcial	4E-12	98	DQ453752.1
	mRNA del receptor de lisina en la cubierta vitelina, <i>H. discus hannai</i> , cds parcial	4E-12	98	DQ453751.1
	mRNA del receptor de lisina en la cubierta vitelina, <i>H. corrugata</i> , cds parcial	4E-12	98	DQ453750.1
	mRNA del receptor de lisina en la cubierta vitelina, <i>H. rufescens</i> , cds parcial	4E-12	98	AF453553.1
VTGI	mRNA de vitelogenina, <i>H. rufescens</i> , cds parcial	3E-30	100	GU122162.1
	Vg mRNA de vitelogenina, <i>H. discus hannai</i> , cds completa	6E-27	95	AB360714.1
DMRT1	mRNA de DMRT1 específico de testículos, <i>Haliotis rufescens</i> , cds parcial	9E-30	100	GU122160.1
FP	mRNA de proteína de fertilización, <i>H. rufescens</i> , cds parcial	9E-41	98	JX826454.1
	mRNA de proteína de fertilización, <i>H. rufescens</i> , cds completa	6E-38	96	L36552.1
	mRNA de proteína de fertilización, <i>H. sorenseni</i> , cds completa	1E-24	89	L36553.1
	mRNA de proteína de fertilización, <i>H. assimilis</i> , cds completa	1.00E-15	93	L36554.1
LYS	mRNA de lisina del esperma, <i>H. rufescens</i> , cds completa	4.00E-92	100	M34388.1
	mRNA de lisina, <i>H. sorenseni</i> Bartsch, cds completa	9E-79	96	M59968.1
	mRNA de lisina, <i>H. kamtschatkana kamtschatkana</i> , cds completa	2E-65	91	M59970.1
	mRNA de lisina, <i>H. wallalensis Stearns</i> , cds completa	2E-65	91	M59969.1
SARIP	mRNA de la proteína interactuante de pequeños andrógenos, <i>H. rufescens</i> , cds parcial	3E-34	100	GU122163.1
TEKT	mRNA de tektina A1, <i>H. rufescens</i> , cds parcial	6E-25	100	GU122161.1
	mRNA de tektina A1, <i>H. asinina</i> , cds completa	6E-20	95	EU827257.1

Cds: Secuencia de DNA codificante (Coding DNA Sequence, por sus siglas en inglés)

3.3.3.2. Receptor de lisina en la cubierta vitelina (*VERL*)

Los niveles de expresión de *VERL* en el grupo de las hembras fueron significativamente diferentes entre los intervalos de talla y los individuos maduros ($P < 0.0001$). Los niveles de expresión se mantuvieron iguales durante los tres primeros intervalos de talla e incrementó a partir del intervalo 36-45 mm. Asimismo, al igual que con *VCP 2.2*, los individuos maduros presentaron el nivel de expresión más alto con valores mayores a 100 (Figura 22A).

Aunque este gen se ha relacionado principalmente con tejido ovárico, se detectó expresión tanto en los individuos indiferenciados como maduros pero sin existir diferencias significativas ($P > 0.05$, Figura 22B).

El análisis de homología del fragmento secuenciado reveló su relación con otra secuencia reportada para *H. rufescens* y con secuencias parciales de *VERL* de las especies *H. fulgens* y *H. discus hannai* (Tabla 16).

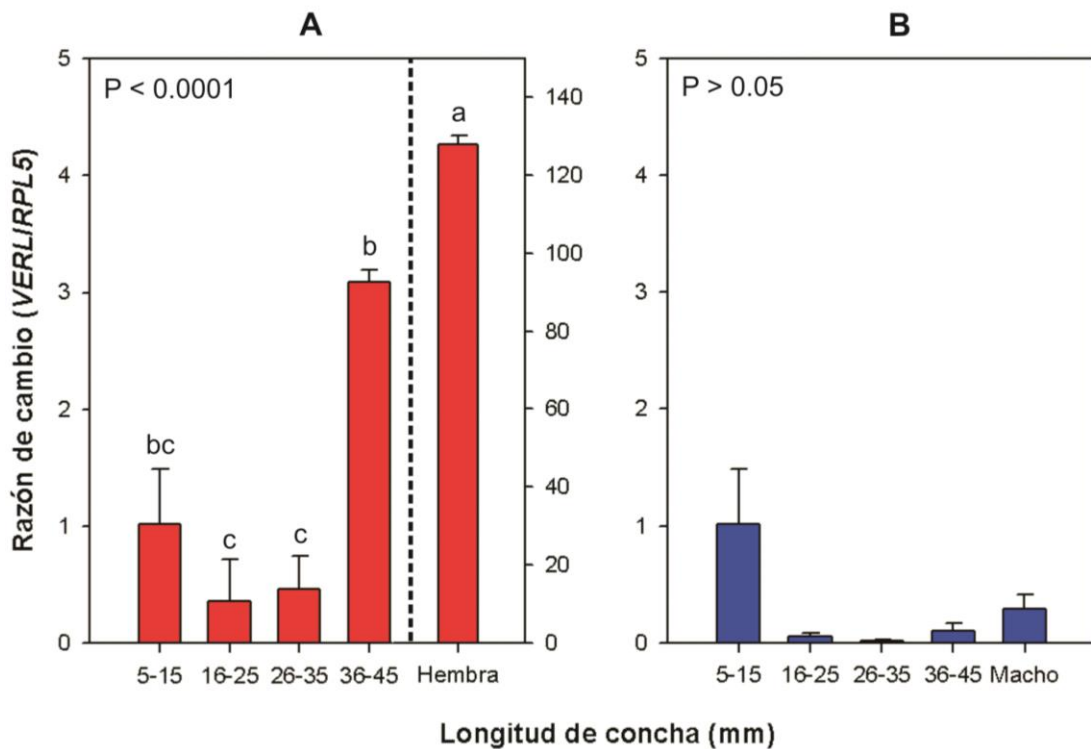


Figura 22. Expresión relativa de *VERL* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.3. Vitelogenina I (VTGI)

Los niveles de expresión de *VTGI* en las hembras fueron significativamente diferentes entre los grupos estudiados ($P < 0.0001$). No obstante, entre los cuatro intervalos de longitud de concha no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Aquí es importante señalar que aunque los niveles de expresión se mantienen bajos hasta el cuarto intervalo de talla, los niveles que presentaron las hembras maduras fueron muy altos (> 6000 veces). Esto podría indicar que la expresión diferencial de *VTGI* en esta especie ocurre después de los 45 mm de longitud de concha (Figura 23A).

Para el caso de los machos se presentó el mismo patrón que con las hembras. No obstante, y a diferencia de los genes que se analizaron anteriormente, los cuatro intervalos de talla mostraron niveles de expresión similares a los de las hembras (< 1 , Figura 23B).

El análisis molecular del fragmento secuenciado mostró similitudes con un mensajero de *VTGI* reportado previamente para *H. rufescens* y otro de *H. discus hannai* (Tabla 16).

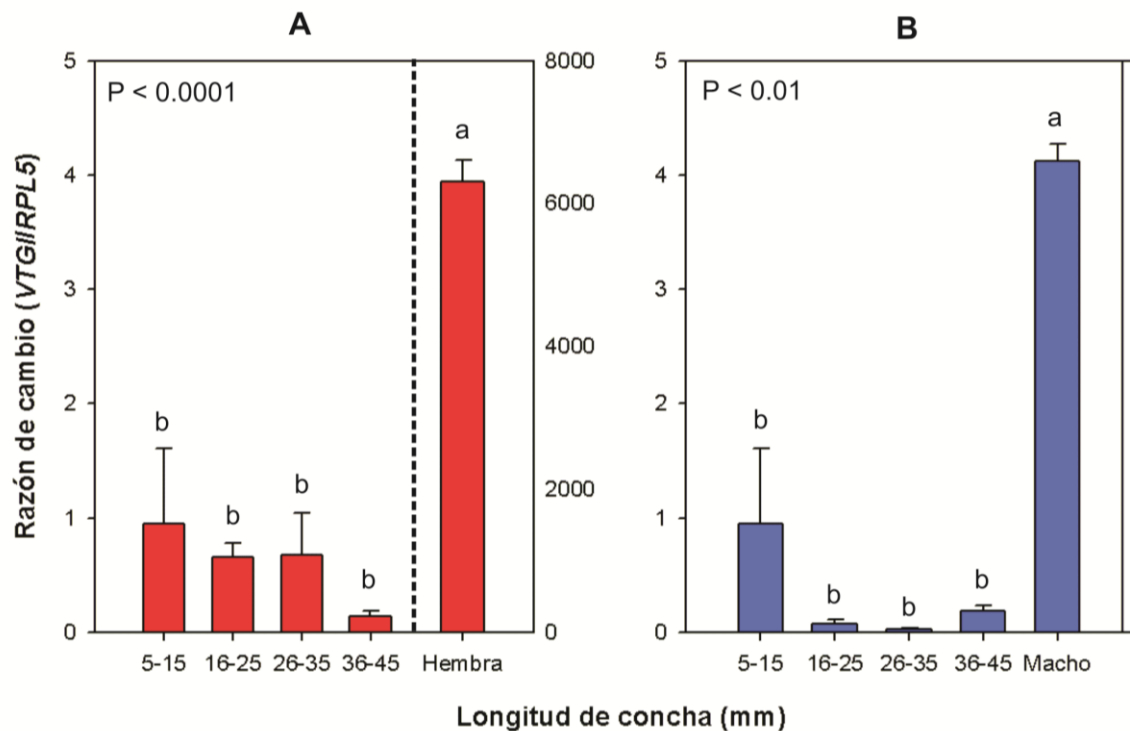


Figura 23. Expresión relativa de *VTGI* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.4. Factor de transcripción relacionado con doble sexo y mab-3 (*DMRT1*)

Para el caso de las hembras, los niveles de expresión de *DMRT1* no fueron significativos ($P > 0.05$). No obstante, a partir del intervalo 16-25 mm se observó una tendencia a la baja a medida que los individuos alcanzan un mayor tamaño, incluso cuando estos están maduros sexualmente (Figura 24A).

En el caso de los machos, los niveles de expresión fueron significativamente diferentes ($P < 0.001$), con un mayor nivel de expresión en los individuos maduros. Asimismo, los valores de expresión para los cuatro intervalos de talla indicarían que la expresión diferencial para *DMRT1* ocurre en tallas mayores a 45 mm (Figura 24B).

El análisis de homología del fragmento amplificado mostró similitud con un mensajero de *DMRT1* reportado previamente para *H. rufescens* (Tabla 16).

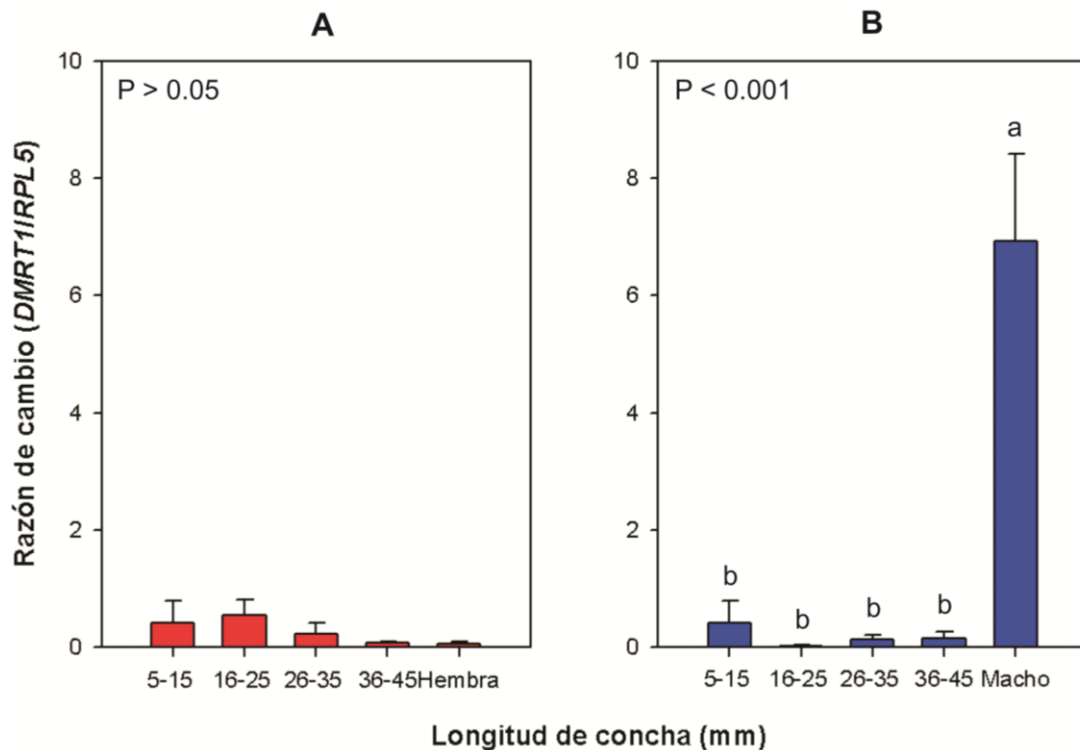


Figura 24. Expresión relativa de *DMRT1* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.5. Proteína de fertilización (FP)

Los niveles de expresión de *FP* para el grupo de las hembras mostraron diferencias significativas entre los cuatro intervalos de talla e individuos maduros ($P < 0.001$). No obstante, aunque no se detectaron diferencias entre los intervalos estudiados, los niveles de expresión de las hembras maduras fueron relativamente altos (aprox. 40) para un gen que normalmente se asocia con machos (Figura 25A).

Para el grupo de los machos, hubieron diferencias significativas entre los intervalos de talla y los individuos maduros ($P < 0.0001$). Asimismo, se observó una tendencia a incrementar los niveles de expresión a mayor longitud de concha, excepto para el intervalo 36-45 mm. Por otro lado, la expresión diferencial ocurrió a partir del tercer intervalo de longitud de concha (26-35 mm, Figura 25B).

El análisis de similitud del fragmento secuenciado mostró relación con dos mensajeros de *FP* reportados previamente para *H. rufescens* y otro de *H. sorenseni* (Tabla 16).

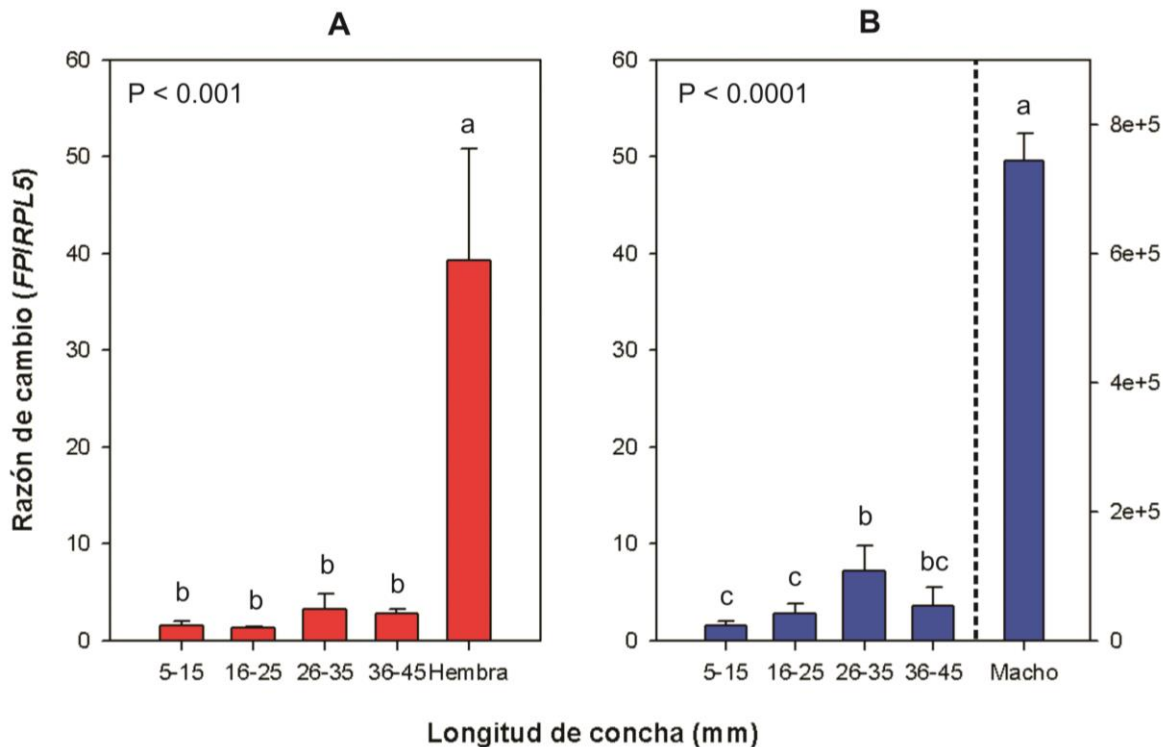


Figura 25. Expresión relativa de *FP* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.6. Lisina del esperma (*LYS*)

Aunque *LYS* se ha asociado tradicionalmente con los machos, hubo expresión de este gen en las hembras. No obstante, no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) y los niveles de expresión se mantuvieron bajos a través de todos los intervalos de longitud de concha y en los individuos maduros (Figura 26A).

Los niveles de expresión de *LYS* en el grupo de los machos fueron significativamente diferentes entre los intervalos de talla y los individuos maduros ($P < 0.0001$). Asimismo, se observó una tendencia ascendente a mayor longitud de concha, mientras que la expresión diferencial ocurrió en el intervalo de 26-35 mm (Figura 26B).

El análisis molecular del fragmento secuenciado indicó que presenta similitud con mensajeros de *LYS* reportados para *H. rufescens*, *H. sorenseni* y *H. kamtschatkana kamtschatkana* (Tabla 16).

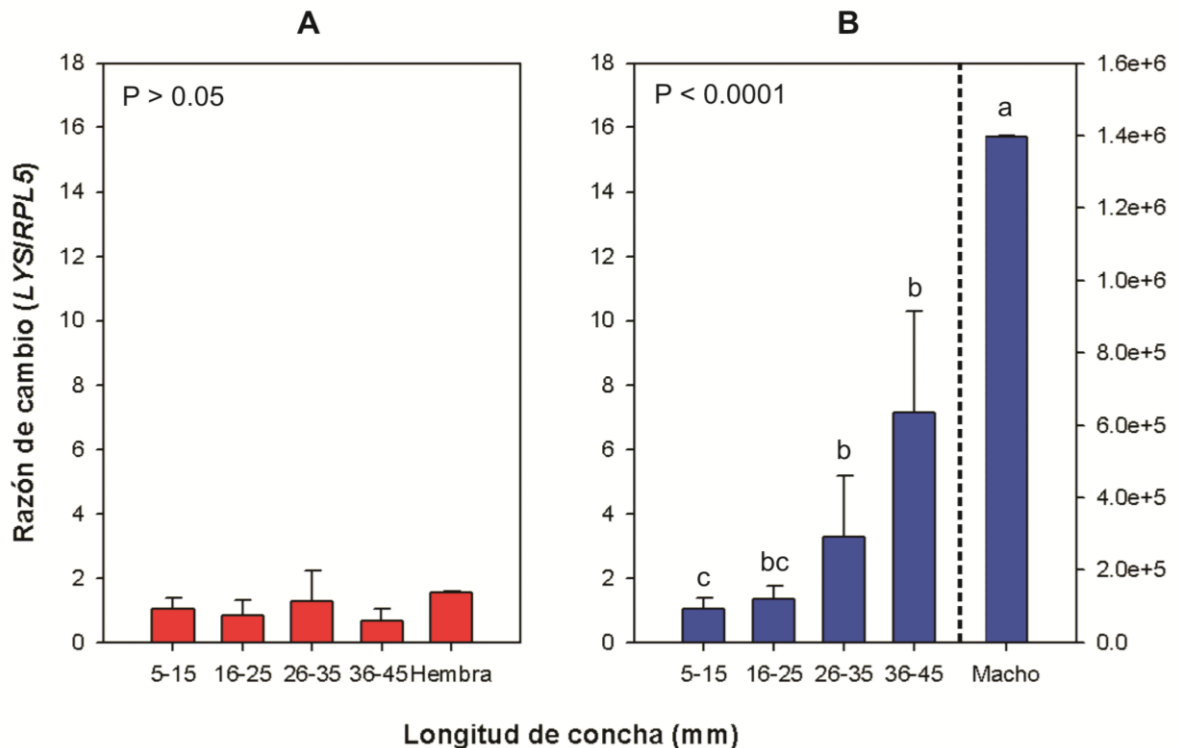


Figura 26. Expresión relativa de *LYS* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.7. Proteína interactuante con receptores de andrógenos (*SARIP*)

SARIP ha sido relacionado principalmente con andrógenos. Sin embargo, se observó la expresión de este gen en el grupo de las hembras, aunque en niveles bajos y sin diferencias significativas ($P > 0.05$, Figura 27A).

En el grupo de los machos, los niveles de expresión fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$). No obstante, se observó que no hubo diferencia entre los niveles de expresión entre los cuatro intervalos de talla. Esto, al igual que los valores obtenidos para *DMRT1* indicaría que la expresión diferencial ocurre a tallas mayores de 45 mm de longitud de concha (Figura 27B).

El análisis de homología del fragmento secuenciado tuvo similitud con un mensajero de *SARIP* reportado previamente para *H. rufescens* (Tabla 16).

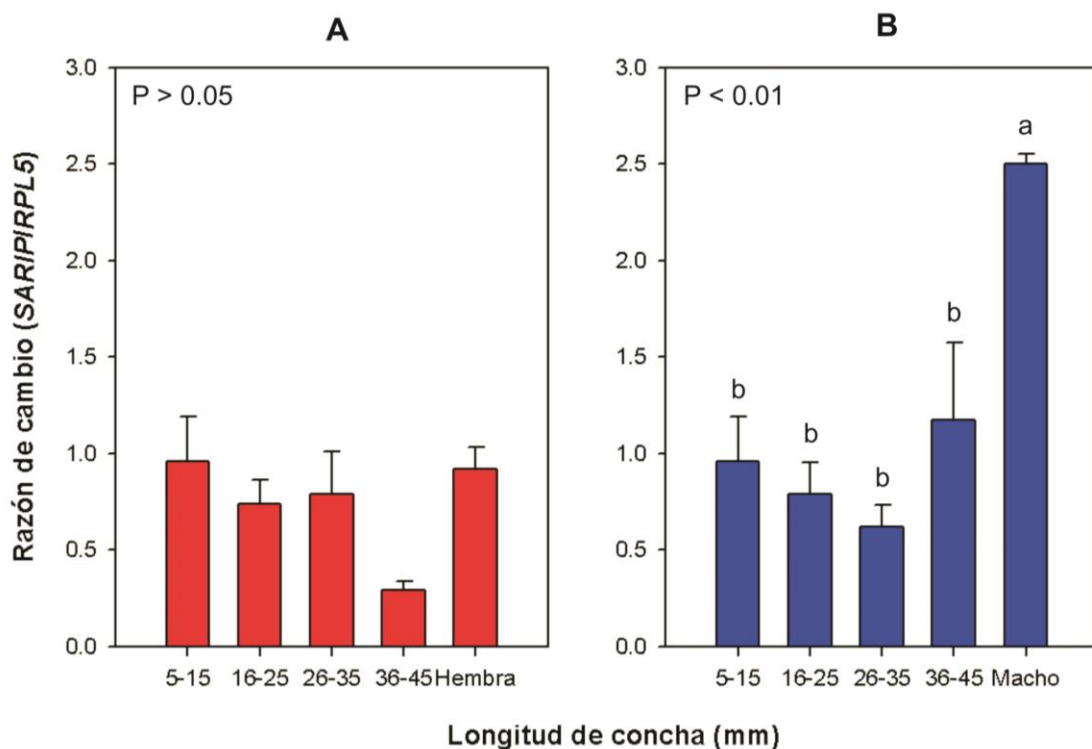


Figura 27. Expresión relativa de *SARIP* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.3.8. Tektina (*TEKT*)

TEKT es otro gen al que se le asocia con individuos machos. Sin embargo, en el grupo de las hembras se observó la expresión de este gen y hubieron diferencias significativas entre los intervalos de talla y las hembras maduras ($P < 0.05$). Asimismo, se observó una tendencia descendente a partir del intervalo de 16-25 mm de longitud de concha alcanzando su nivel más bajo en los individuos maduros (Figura 28A).

Los niveles de expresión de *SARIP* en el grupo de los machos presentó diferencias significativas entre los intervalos de talla y los individuos maduros ($P < 0.0001$). Asimismo, aunque presentó el mismo patrón respecto al grupo de las hembras, alcanzando la expresión diferencial en el intervalo de 16-25 mm, la diferencia radica en que para los individuos maduros los niveles de expresión fueron mayores (>100 veces) respecto al intervalo más pequeño (5-15 mm, Figura 28B).

El análisis de homología reveló que la secuencia tuvo similitud con mensajeros de *TEKT* de *H. rufescens* y *H. asinina* (Tabla 16).

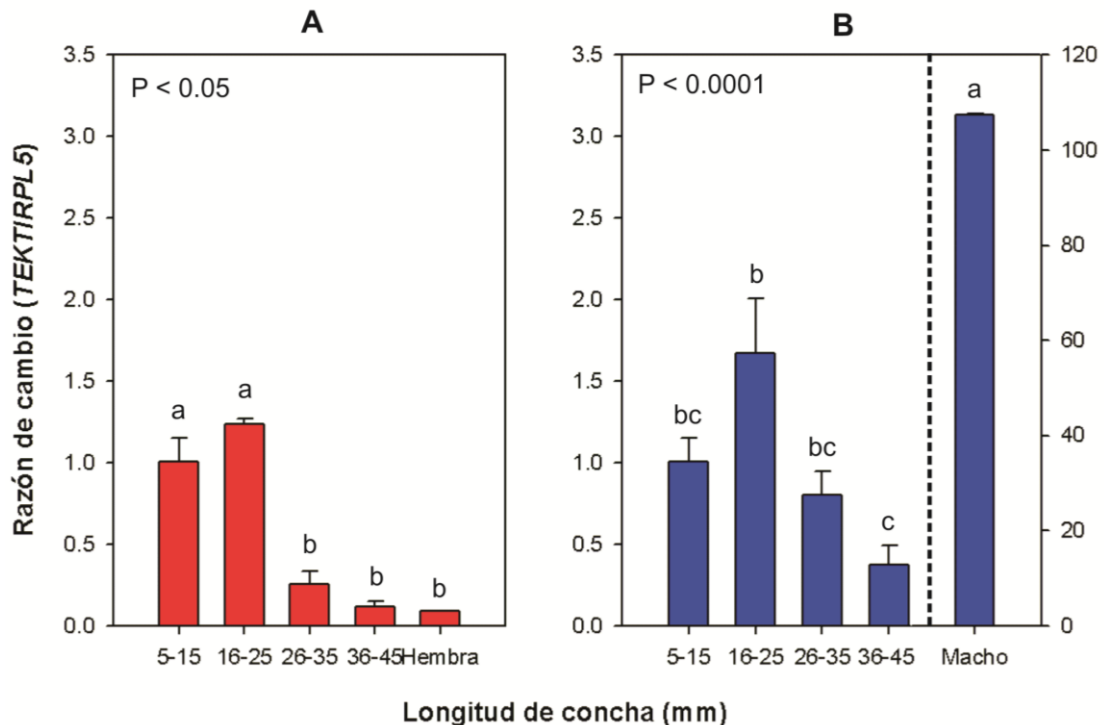


Figura 28. Expresión relativa de *TEKT* en individuos de abulón rojo con diferente longitud de concha. A) Hembras, B) Machos. Valores expresados como media \pm error estándar.

3.3.4 Genes sexo específicos

El análisis de los genes sexo específico, se realizó solamente sobre los individuos (machos y hembras) sexualmente maduros. Los resultados de expresión mostraron las siguientes características: 1) Todos los genes se expresaron en ambos sexos, 2) Los niveles de expresión de los genes relacionados tradicionalmente a un sexo fueron mayores en dicho sexo y menores en el sexo opuesto y 3) A excepción de *SARIP*, todos los genes tuvieron un $\Delta Cq > 3$ entre ambos sexos (Figura 29).

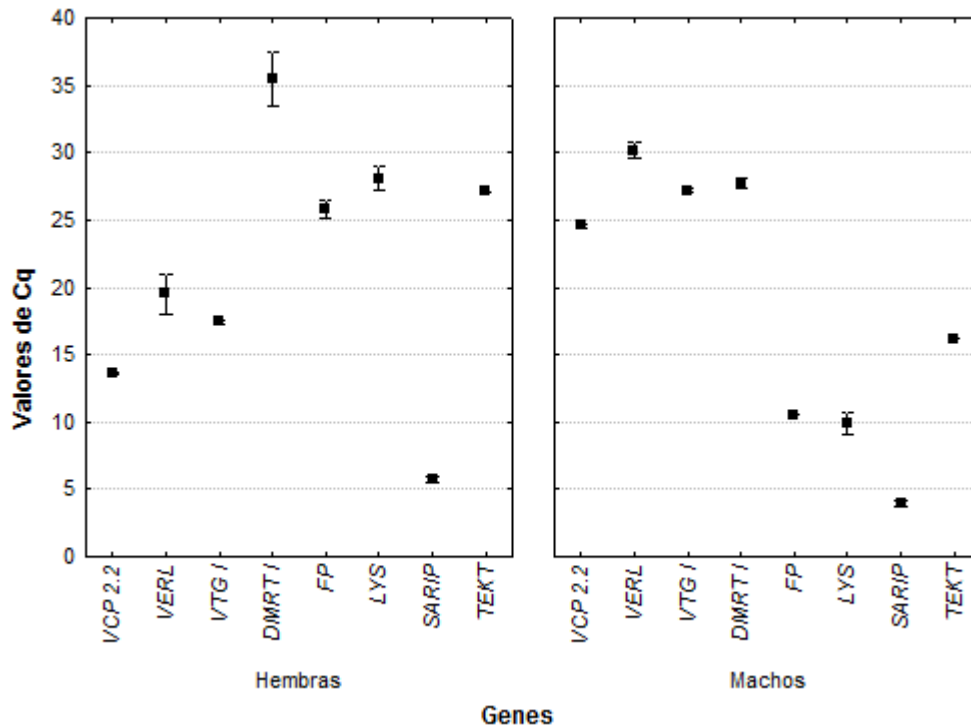


Figura 29. Valores de Cq para ocho genes sexo específicos en hembras y machos de abulón rojo utilizados como control positivo para la asignación de sexos. Valores están expresados como media \pm desviación estándar.

4. Discusión

4.1 Ontología de genes y elaboración de macroarreglo

El análisis de EST's es una manera de entender la expresión de genes en diferentes campos de las ciencias biológicas. En acuicultura por ejemplo, el conocimiento de la reproducción a nivel molecular es importante para optimizar el manejo de reproductores y la producción larval. En este sentido, se obtuvieron EST's de una biblioteca de cDNA y por secuenciación 454 para la búsqueda de datos acerca de genes relacionados al sexo en el abulón rojo. En la biblioteca de cDNA, se obtuvieron 39 contigs y 406 singletons para el caso de las hembras, y 43 contigs y 293 singletons para los machos. El número de lecturas en este trabajo fue mayor que las 200 obtenidas por Amparyup *et al.* (2004) en una biblioteca normalizada de cDNA que se obtuvo a partir de tejido gonadal de hembras de *Haliotis asinina*. En otros estudios con invertebrados marinos, se obtuvieron 400 secuencias únicas de tejido gonadal de individuos adultos de *Argopecten purpuratus* (Boutet *et al.*, 2008) y 296 transcritos (38 contigs y 67 singletons) de tejido gonadal de hembras juveniles de *Marsupenaeus japonicus* usando una biblioteca sustractiva de cDNA (Callaghan *et al.*, 2010). Estas similitudes entre los niveles de recuperación de EST's de las bibliotecas de cDNA considerando el mismo tejido de interés y diferentes especies reflejan la eficiencia específica de este enfoque, independientemente del protocolo que se emplee, especie o tejido.

A febrero de 2015 (Tabla 17), el tamaño de la base de datos de los EST's en el NCBI para el género *Haliotis* fue de 24,936 con *H. rufescens* representando solamente 1.42%. Para la secuenciación 454, se obtuvieron 213,746 lecturas con una longitud promedio de 293 pb, las cuales fueron ensambladas en 12,682 contigs y 28,460 singletons, con una longitud promedio de 634 pb por contig. La longitud promedio por lectura está dentro del intervalo de tamaño reportado para las tecnologías NGS (Droege y Hill, 2008). Otros estudios en invertebrados reportan el uso de plataformas NGS tales como 454 GSF-LX en *Macrobrachium rosenbergii* (Jung *et al.*, 2011), *Ruditapes philippinarum* (Milan *et al.*, 2011), *Meretrix meretrix* (Huan *et al.*, 2012); e Illumina en *Haliotis midae* (Francini *et al.*, 2011), *R. philippinarum* (Ghiselli *et al.*, 2012) y *Octopus vulgaris* (Zhang *et al.*, 2012), entre otros. En este sentido, todos los estudios, incluyendo

éste, presentaron dos características: a) Alto nivel de recuperación de EST's (entre 200,000 y 8'500,000) y b) Longitud promedio de contigs >260 pb. Estas características, considerando además el bajo costo por lectura, permitirán mejorar el tamaño de las bases de datos de los EST's y la anotación funcional en especies no modelo tales como el abulón rojo *H. rufescens*.

Tabla 17. Relación de secuencias EST y nucleótidos depositados en el Genbank del NCBI (8 febrero de 2015), sólo se mencionan las primeras diez especies de abulón y el total de Haliotidae.

Especie	EST en el Genbank	Nucleótidos
<i>Haliotis asinina</i>	8,666	830
<i>Haliotis discus</i>	8,019	2,134
<i>Haliotis diversicolor</i>	7,394	28,749
<i>Haliotis rufescens</i>	354	280
<i>Haliotis tuberculata</i>	222	699
<i>Haliotis midae</i>	91	363
<i>Haliotis corrugata</i>		469
<i>Haliotis rubra</i>		202
<i>Haliotis iris</i>		178
<i>Haliotis fulgens</i>		154
Total	24,746	34,627

La anotación funcional se realizó con BLASTx en el NCBI. En la biblioteca de cDNA, el 69.23% y 41.86% de los contigs de hembras y machos, respectivamente, presentaron homología. Para las hembras, más del 50% en la distribución de especies se relacionó con el género *Haliotis* y las especies más importantes fueron *H. rufescens*, *H. discus*, y *Nematostatella vectensis*. De la misma manera, las especies más abundantes para los machos fueron *Crassostrea gigas*, *H. rufescens* y *Branchiostoma floridae*. En este sentido, *H. discus* pertenece a los abulones del Pacífico y está relacionado filogenéticamente con *H. rufescens* (Lee y Vacquier, 1995). También, el ostión del Pacífico *C. gigas* es un miembro del Filo Mollusca y se ha relacionado con *H. discus* cuando se compararon secuencias de *GAPDH* para determinar distancias evolutivas (Baibai et al., 2010). Interesantemente, la anémona de mar *N. vectensis* y el anfioxo *B.*

floridae son especies modelo que han sido anotadas en porcentajes similares en otros estudios de abulón (Franchini *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011), pero en menor grado que en vertebrados (Salem *et al.*, 2010; Micallef *et al.*, 2012; Yúfera *et al.*, 2012), lo que refleja una relación más cercana con organismos más antiguos en términos evolutivos. Para la secuenciación 454, el porcentaje de anotación fue de 44.12% y la distribución de especies mostró a las especies modelo *B. floridae*, *Saccoglossus kowaleski*, *Strongylocentrotus purpuratus* y *N. vectensis* como las más abundantes. Esto es razonable considerando el gran tamaño de las bases de datos de secuenciación en estas especies y es una característica en la anotación de los estudios transcriptómicos en diferentes especies no modelo de varios grupos (Goetz y MacKenzie, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Pazos-Navarro *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011).

El análisis de la ontología de genes al segundo nivel mostró resultados similares para los EST's de la biblioteca de cDNA y la secuenciación 454. Las categorías más abundantes de la ontología de genes fue la siguiente: proceso biológico > componente celular > función molecular. Además, los principales términos para proceso biológico estuvieron asociados con procesos celulares y metabólicos, mientras que el término unión lo fue para la función molecular. Este patrón se ha reportado para moluscos, crustáceos, peces y otros grupos (Amparyup *et al.*, 2004; Wynne *et al.*, 2008; Callaghan *et al.*, 2010; Parchman *et al.*, 2010; Salem *et al.*, 2010; Cárdenas *et al.*, 2011; Heras *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011; Ghiselli *et al.*, 2012; Franchini *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2012; Sarropoulou *et al.*, 2012). Considerando que estos estudios incluyeron diferentes especies, estadios de vida, tejidos, sexo y condiciones experimentales; los resultados reflejan el diseño universal y funcionalidad conservada de la maquinaria celular; más allá de la importancia de la genómica funcional en mejorar nuestro entendimiento acerca de la naturaleza y función de los genes en especies relacionadas con la acuicultura.

La función de los genes en los sistemas biológicos, al nivel celular o sistémico, puede ser entendido con la base de datos KEGG (Kanehisa *et al.*, 2006). El metabolismo del Nitrógeno, de las bases nitrogenadas y la fosforilación oxidativa fueron las vías metabólicas más abundantes asociadas con el tejido gonadal tanto en la biblioteca de cDNA y la secuenciación 454. En *Argopecten irradians concentricus*, cuando la gónada

está madura, el metabolismo depende principalmente del sustrato proteico (Barber y Blake, 1985). Asimismo, en el músculo de *M. rosenbergii*, la fosforilación oxidativa fue una de las vías metabólicas más abundantes (Jung *et al.*, 2011). En el presente trabajo, el tejido gonadal de los individuos de *H. rufescens* estuvo maduro y los resultados obtenidos con la base de datos KEGG concuerdan con Barber y Blake (1985). Otra vía metabólica abundante fue el ciclo del ácido cítrico. En esta vía metabólica, las células obtienen energía removiendo el hidrógeno y los electrones a través de la fosforilación oxidativa (Hammen, 1969). Por lo tanto, en términos de gasto energético el catabolismo de las proteínas es mayor que el de lípidos o carbohidratos y esto explicaría el orden que se obtuvo de las vías metabólicas con la base de datos KEGG. Algunas vías metabólicas de baja abundancia estuvieron asociadas con bacterias u otros microorganismos. Entre éstas, se tuvo la biosíntesis de neomicina y butirosina, la biosíntesis de estreptomina, biosíntesis de cefalosporina y penicilina, y resistencia a β -lactámicos, entre otros. Esto estaría relacionado con los microorganismos que viven sobre el abulón o en su ambiente (Huang *et al.*, 2012).

En la biblioteca de cDNA se encontraron genes que codifican para la vitelogenina y el precursor de la lisina del esperma, mientras que un mayor número de genes relacionados al sexo fue encontrado con la secuenciación 454 (Ver Tabla 9). La vitelogenina es sintetizada en las células del folículo ovárico en *H. discus hannai* (Matsumoto *et al.*, 2008) y comúnmente es usada en acuicultura de invertebrados como un indicador de la maduración (Arcos *et al.*, 2011; Awaji *et al.*, 2011). En el abulón rojo, se han encontrado cDNAs para vitelogenina principalmente en ovocitos en proceso de maduración y completamente maduros (Gutiérrez, 2009) y los resultados del presente trabajo concuerdan con aquellos al encontrar EST's asociados con la vitelogenina. Por otro lado, el precursor de la lisina del esperma es una proteína que crea un orificio en la cubierta vitelina del ovocito que permite la entrada del espermatozoide (Vacquier *et al.*, 1990). La edad de los abulones que se usaron en este trabajo fue mayor a los dos años y esto significa que estuvieron maduros. En *H. asinina*, el precursor de la lisina del esperma se ha detectado a partir de los cinco meses de edad y cabe mencionar que esta especie madura a los siete meses de edad en el caso de los machos y a los once en las hembras (Sobhon *et al.*, 1999). En ambos casos, esto podría sugerir que el precursor de la lisina del esperma en abulón está asociado con la espermatogénesis.

Para la secuenciación 454, las secuencias relacionadas con el sexo en hembras estuvieron asociadas con el receptor de la lisina del esperma en la cubierta vitelina (*VERL*), proteínas de la cubierta vitelina (*VCP*) y vitelogenina, mientras que en los machos estuvieron asociadas con la proteína de fertilización, proteína de la lisina del esperma, tektina y proteína axonemal, entre otros. Estos genes se han reportado en *H. asinina* (Amparyup *et al.*, 2004, 2010) y están relacionados con la diferenciación sexual.

Las secuencias relacionadas con la determinación sexual fueron las proteínas de tipo Vasa y Nanos, y *DMRT1* específico de los testículos. Las proteínas de tipo Vasa y Nanos están involucradas en la especificación y desarrollo de la línea germinal y se han reportado en *H. asinina*, *L. vannamei* y otras especies (Aflalo *et al.*, 2007; Gustafson y Wessel, 2010; Kranz *et al.*, 2010). *DMRT1* está involucrado en la determinación sexual del macho y se ha reportado en varias especies de invertebrados (Klinbunga *et al.*, 2009; Farazmand *et al.*, 2010; Zhang y Qiu, 2010). Se considera que estos genes podrían usarse como marcadores genéticos en la acuicultura del abulón, pero se requieren más estudios para determinar el patrón de expresión durante el desarrollo gonadal.

Los macroarreglos son ampliamente usados para comparar el análisis de expresión de genes en un organismo o una muestra (Cox, 2001). Las sondas que se usan para la hibridación son marcadas comúnmente con Fósforo-32 (P^{32}) o digoxigenina. En el caso de digoxigenina, la detección se hace por colorimetría usando fosfatasa alcalina (Farrell, 2010). En este estudio, se evaluó la detección de EST's de tejido gonadal de hembras de abulón rojo mediante la técnica de dot blot usando digoxigenina. El nivel de detección fue aceptable al obtener una coloración intensa de la reacción de hibridación entre el DNA impregnado en la membrana y la sonda que se utilizó. Los niveles de coloración que se obtuvieron aquí son comparables a aquellos obtenidos en estudios de detección de la mancha blanca en camarones (Nadala y Loh, 2000), de *Paramoeba pemaquidensis* en Salmón del Atlántico (Douglas-Helders *et al.*, 2001), de nodavirus en *M. rosenbergii* (Sri Widada *et al.*, 2003), en la identificación de genes específicos del ovario en el camarón *Eriocheir japonica sinensis* (Ma *et al.*, 2010) y en los testículos de la trucha arcoíris *O. mikyss* (Mazurais *et al.*, 2005). Otro aspecto importante en el desarrollo de los macroarreglos lo constituye el nivel de detección. En este estudio, se

cargó en la membrana entre 1 y 2 μL de la reacción de PCR de la muestra a hibridar con la sonda. En términos prácticos, se han reportado niveles de detección positivos impregnando en la membrana entre 0.5 y 2 μL de la reacción de PCR diluida en el orden de hasta 10^{-3} – 10^{-4} (Nadala y Loh, 2000; Shekhar *et al.*, 2006). También, los niveles de sensibilidad y especificidad son altos en la elaboración de macroarreglos usando digoxigenina. En este trabajo, los controles positivos y negativos reaccionaron correctamente. El nivel de sensibilidad y especificidad en la detección de *P. pemaquiensis* reportado por Douglas-Helders *et al.* (2001) fue de 97% y 91%, respectivamente. Con base en lo anterior y en el hecho de que un macroarreglo puede contener hasta 50,000 transcritos (Boonefaes *et al.*, 2011), sugieren que los macroarreglos de membrana de nylon o nitrocelulosa son herramientas adecuadas para el análisis de expresión de genes.

Finalmente, el análisis funcional de los EST's de la biblioteca de cDNA y la secuenciación 454 permitió identificar genes relacionados con el sexo involucrados en la determinación y diferenciación sexual en *H. rufescens*. Esto representa una base para incrementar nuestro conocimiento acerca de la biología de la reproducción a nivel molecular en esta especie. Otro aspecto interesante, fue la presencia de secuencias relacionadas con procesos de crecimiento y el sistema inmune del abulón rojo.

4.2 Selección de genes de referencia para RT-qPCR en abulón rojo

La validación de los genes de mantenimiento para los estudios de expresión génica usando RT-qPCR es importante para la adecuada interpretación biológica y sus implicaciones en la función celular o a nivel de tejido. En este sentido, dado que el abulón rojo es una especie económicamente importante para la acuicultura, hay un interés creciente en estudiar aspectos tales como la reproducción, termorregulación y endocrinología. Actualmente, hay un aparente sesgo en la proporción de sexos, donde los machos están cambiando a hembras y ello afecta la disponibilidad de reproductores a escala comercial. Además, hay un interés en mejorar la tasa de crecimiento a través de la caracterización de neuropéptidos. Para soportar estos intereses, este trabajo representa uno de los principales esfuerzos que se realizan para validar genes de

mantenimiento asociados con tejidos blanco implicados en los aspectos básicos de la biología del abulón rojo.

Los genes de mantenimiento reducen la variabilidad que se puede generar por el tamaño de muestra, cantidad y calidad del RNA, la eficiencia en la síntesis de cDNA o la presencia de algunos inhibidores de la PCR (Bustin y Nolan, 2004; Dheda *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2006). El protocolo descrito por Matz (2002) nos permitió obtener suficiente RNA total para realizar los procedimientos posteriores como la síntesis de cDNA y RT-qPCR. Además, las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ fueron >2 , se valoró la integridad del RNA y se usó la misma cantidad de RNA (1 μ g) para la síntesis de cDNA. Estas consideraciones son importantes no sólo cuando se validan los genes de mantenimiento, sino también cuando se realiza el ensayo de expresión con los genes de interés *per se* (Bustin *et al.*, 2009). En este sentido, se ha demostrado que las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230} >1.8$ son consideradas como indicadores de buena calidad, pero no necesariamente asegura una buena integridad del RNA (Taylor *et al.*, 2010). Además, se han encontrado correlaciones entre la relación de $A_{260/230}$ y las eficiencias de PCR. Bajas relaciones usualmente resultan en eficiencias inadecuadas de PCR y la manera de solucionar este problema es diluir la muestra o usar columnas para limpiar el RNA después de la digestión con DNasa (Olsvik *et al.*, 2005) tal como se hizo en este estudio, por lo que se considera que se obtuvo el RNA con la calidad y cantidad suficientes para los análisis aquí presentados.

Los parámetros utilizados para definir la calidad de la amplificación en la PCR tiempo real son la eficiencia, el coeficiente de determinación (R^2) y la presencia de un solo pico en la curva de fusión del ácido nucleico. Los valores recomendados para la eficiencia de la PCR varían entre 0.9 y 1.1 (Doak y Zair, 2012; Schmittgen y Livak, 2008), mientras que los valores de R^2 deben ser ≥ 0.985 (Kavanagh *et al.*, 2011). En este caso, los valores de eficiencia y R^2 (0.98 y 0.997, respectivamente, Tabla 13) cumplen con estas recomendaciones. Los valores de eficiencia reflejan la especificidad de los iniciadores y también están relacionados con el tamaño del fragmento. El tamaño del fragmento que se recomienda para PCR tiempo real varía de 60 a 150 pb (Czechowski *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2006; Udvardi *et al.*, 2008), con un máximo de 300 pb (Dussault y Pouliot, 2006). En este estudio, el tamaño del fragmento para los genes de

mantenimiento varió entre 145 y 153 pb, y probablemente contribuyó a los valores de eficiencia que se obtuvieron.

En el presente trabajo se estudió la expresión de nueve genes de mantenimiento que se han usado en diferentes taxones. Su estabilidad se evaluó en diferentes tejidos de abulón rojo (branquia, cabeza, gónada/glándula digestiva y considerando los tres tejidos) con geNorm y NormFinder. Los genes seleccionados tuvieron diferentes funciones (ver Tabla 4) para evitar la coregulación entre sí (Vandesompele *et al.*, 2002). Los análisis de estabilidad con geNorm y NormFinder indicaron que los genes más estables considerando todos los tejidos y branquias fueron *RPL5-CY* y *HPRTI-BGLU*, respectivamente. *CY* y otras proteínas ribosomales, similares a *RPL5*, se han reportado como los genes más estables en estudios de expresión de células epiteliales respiratorias entre pacientes asmáticos y saludables (He *et al.*, 2008); y también en infecciones fúngicas de trigo (Long *et al.*, 2011). Asimismo, se ha reportado a *RPL5* como el gen más estable en reproductores de *H. discus discus* expuestos a xenobióticos (Wan *et al.*, 2011). Además, otras proteínas ribosomales del mismo grupo fueron clasificadas entre los genes más estables en estudios de expresión con hemocitos tetraploides y normales de *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2008), diferentes estadios de desarrollo de *C. gigas* (Dheilly *et al.*, 2011), y durante la infección viral de *Nicotiana benthamiana* (Liu *et al.*, 2012). Por otro lado, *HPRTI* fue uno de los genes más estables en estudios con ratones donde se indujo la hepatitis con concanavalin A (Shi *et al.*, 2010) y en tejido adiposo visceral humano de diferentes condiciones mórbidas (Mehta *et al.*, 2010).

El análisis con geNorm mostró a *RPL5* y *UBC* como los genes más estables en cabeza, mientras que NormFinder seleccionó a *GAPDH* y *CY*. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el tipo de tejido utilizado, los pseudogenes asociados con *GAPDH* y al procedimiento matemático de cada programa para determinar la estabilidad de cada uno de los genes. En especies acuícolas, se ha reportado a *UBC* como uno de los genes más estables en tejidos de *Paralichthys olivaceus* previo a la infección con *Edwardsiella tarda* (Zheng y Sun, 2011), durante el desarrollo larvario de *Solea senegalensis* (Infante *et al.*, 2008) y en la embriogénesis de *P. olivaceus* (Zhong *et al.*, 2008). Por otro lado, *GAPDH*, *ACTB* y 18S *rRNA* son genes controversiales dado los

diferentes resultados que se han publicado en la literatura científica. Por ejemplo, se ha reportado a *GAPDH* como un gen estable en estudios de expresión con diferentes mezclas de tejido en *C. gigas* (Dheilly *et al.*, 2011), en la interacción entre el parásito *Bonamia ostreae* y *Ostrea edulis* (Morga *et al.*, 2010) y durante el choque térmico de la diatomea marina *Ditylum brightwellii* (Guo *et al.*, 2012). En contraste, también se ha descrito a *GAPDH* como el gen menos estable en estudios de infección del salmón con el virus de la anemia infecciosa (Jorgensen *et al.*, 2006) y en estudios de nutrigenómica en *Lates calcarifer* (De Santis *et al.*, 2011). Estas diferencias pueden estar asociadas con el hecho de que generalmente se ha relacionado esta enzima con la glucólisis, sin embargo, está involucrada en múltiples funciones tales como la replicación del DNA, exportación del RNA nuclear, regulación de la traducción y actividad fosfotransferasa, entre otros (Sirover, 1999). A su vez, Yin *et al.* (2013) demostraron que *G6PDH* y *GAPDH* fueron los genes con mayor y menor estabilidad en múltiples cepas del hongo patógeno *Valsa mali* var. *mali* a través de diferentes condiciones abióticas.

En este estudio, *RPL5* y *TUBB* también como *SDHA* y *HPRTI* fueron los genes más estables en gónada/glándula digestiva reportados por geNorm y NormFinder, respectivamente. Los miembros más comunes de la familia de las tubulinas son α -tubulina (*TUBA*) y β -tubulina (*TUBB*), los cuales se usan en estudios de expresión. *TUBB* fue el gen más estable durante el desarrollo de *Hippoglossus hippoglossus* (Fernandes *et al.*, 2008). Además, dos isoformas de *TUBB* (*TUB1* y *TUB5*) se han sugerido como controles internos en el desarrollo de *Striga hermonthica* (Fernández-Aparicio *et al.*, 2013). Por otro lado, *SDHA* que está involucrado en el metabolismo de la energía celular ha mostrado una estabilidad variable a través de diferentes taxones. Este gen fue incluido en el factor de normalización de fibroblastos cultivados expuestos a xenobióticos en *Stenella coeruleoalba* (Spinsanti *et al.*, 2008). Contrariamente, *SDHA* fue el gen con mayor variabilidad en diferentes estadios de desarrollo de *Panonychus citri* (Niu *et al.*, 2012).

En este trabajo, con la excepción del análisis que incluye todos los tejidos y branquias, geNorm y NormFinder reportaron diferentes genes como los más estables para cabeza y gónada/glándula digestiva. Esta diferencia en la valoración de los genes más estables se debe principalmente a los algoritmos utilizados por cada programa y esta situación

se ha encontrado en diferentes estudios sobre peces, plantas y otros grupos (Demidenko *et al.*, 2011; Olsvik *et al.*, 2008; Urbatzka *et al.*, 2013). geNorm basa su estimado en la comparación pareada de la similitud de todos los genes de referencia, para obtener un estimado confiable requiere de al menos siete genes y tiene el potencial de detectar genes corregulados (Vandesompele *et al.*, 2002). Por otro lado, NormFinder basa su modelo en el cálculo de las variaciones dentro y entre los grupos, siendo menos probable que detecte genes corregulados. Por ejemplo, Kortner *et al.* (2011) trabajando en el salmón del Atlántico con enteropatía reportaron diferentes valoraciones para *ACTB*, desde el gen más estable hasta el cuarto más estable usando geNorm, NormFinder y BestKeeper. Aunque actualmente no hay consenso sobre cuál es el mejor método para seleccionar los genes de referencia más estables, la tendencia es usar dos o más programas como una guía. Además, para fortalecer la selección de los genes más estables, Dhar *et al.* (2009) sugirieron que en vez de usar un simple ranking de genes de referencia, debería utilizarse una lista de los genes más estables por tratamiento o condición.

β -actina es uno de los genes más comunes que se utiliza en los estudios de expresión (Huggett *et al.*, 2005). Varios análisis estadísticos confirmaron que más del 30% de los artículos sobre expresión con PCR tiempo real publicados entre Julio y Diciembre del 2007 en las revistas *The Plant Cell*, *Plant Physiology* y *The Plant Journal* usaron β -actina como control interno (Guénin *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que genes tales como β -actina y *GAPDH* pueden variar su expresión dependiendo de las condiciones patológicas, experimentales y tejido específicas a las que están sujetas, afectando los niveles de expresión (Li y Shen, 2013). Los resultados del presente trabajo mostraron que β -actina fue uno de los genes menos estables en todos los tejidos de *H. rufescens* con diferente longitud de concha. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en glándula digestiva, músculo del pie, branquias, hemocitos y manto de *H. discus discus* previo a la infección con *Vibrio anguillarum* (Qiu *et al.*, 2013) y en diferentes tejidos de juveniles y adultos de *Cyprinus carpio* var. jian (Tang *et al.*, 2012). Aunque existen estudios en especies de importancia acuícola donde usan β -actina como control interno (Huang *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2013), este gen no se recomienda para estudios de expresión (Filby y Tyler, 2007; Tricarico *et al.*, 2002). Esta recomendación podría darse por dos razones: a) La diversidad de funciones y procesos

en la que está involucrado tales como el reacomodo del citoesqueleto, citocinesis, fagocitosis, encapsulación, entre otros (Takai *et al.*, 2001) y b) Por duplicación como pseudogen que puede abarcar hasta 73% de su longitud (Ghani *et al.*, 2013).

En este estudio, el análisis de variación pareada con geNorm confirmó que se requieren dos genes ($V_{2/3}$) para normalizar los estudios de expresión en tejidos de abulón rojo con diferente longitud de concha. Actualmente, el número óptimo de genes para estandarización es controversial debido a las implicaciones prácticas, económicas y sobre todo biológicas que ello representa. Por ejemplo, se recomienda usar la media geométrica de múltiples genes de referencia como factor de normalización (Vandesompele *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que este enfoque no siempre produce los resultados biológicos más relevantes (De Santis *et al.*, 2011).

Considerando los resultados de estabilidad que se obtuvieron con geNorm que ubican principalmente a *RPL5* dentro de los genes más estables y manteniendo en mente su posible aplicación en estudios de expresión sexo específicos, evaluamos un ensayo de variación con tejido de la gónada/glándula digestiva. Los valores que se reportan para los ensayos de variabilidad dentro y entre grupos reflejaron un máximo de 2.16% y 3.96% (Pfaffl, 2001). Asimismo, se reportan intervalos desde 0.22% a 0.55% (dentro de grupos) y desde 1.16% a 2.18% (entre grupos, Doak y Zair, 2012). La variabilidad que se obtuvo en este estudio, $\leq 0.56\%$ y $\leq 1.89\%$, está dentro de los valores reportados y demuestran la precisión y reproducibilidad del ensayo. Sin embargo, desde que este tipo de variabilidad sólo mide la variabilidad técnica, realizamos un ANOVA de una vía para determinar la variabilidad biológica. Los resultados del ANOVA no mostraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *RPL5* en la gónada/glándula digestiva para cuatro intervalos de longitud de concha ($P > 0.05$). Esto confirma los resultados de geNorm, pero no los de NormFinder. Además, la máxima diferencia que se obtuvo para los valores promedio de *RPL5* fue 1.15 ($Cq_{RPL5_{5-15\text{ mm}}} - Cq_{RPL5_{16-25\text{ mm}}}$) y equivale a una magnitud de cambio de 2.2 ($2^{1.15}$) entre ambos promedios. En otros estudios, Willems *et al.* (2008) no encontraron diferencias significativas para valores de magnitud de cambio de 2.6 en la expresión del gen *braquiura* en los cuerpos embrioides de ratón inducida por la presencia de Activina A.

En conclusión, se seleccionaron nueve genes de referencia con diferentes funciones y se validaron por primera vez en diferentes tejidos de abulón rojo, usando geNorm y NormFinder. En branquias, *HPRT1* y *BGLU* fueron los genes más estables y pueden ser usados para normalizar datos en estudios de RT-qPCR. Para cabeza, los genes más estables fueron *RPL5*, *UBC*, *GAPDH* y *CY*; mientras que *RPL5*, *TUBB*, *SDHA* y *HPRT1* lo fueron para gónada/glándula digestiva. Los resultados de cabeza y gónada/glándula digestiva muestran claramente la importancia de seleccionar y validar genes de referencia con más de un enfoque para evitar sesgos en la selección de aquellos genes que son realmente estables. Este trabajo también sugiere que los genes utilizados comúnmente como genes de referencia, tales como *ACTB* y *BGLU*, fueron los menos estables y no se recomienda usarlos en abulón rojo. Finalmente, aunque es necesaria más investigación, los resultados de este estudio representan una guía para estudios futuros de RT-qPCR relacionados con los aspectos biológicos de importancia comercial en esta especie.

4.3 Expresión de genes sexo específicos en juveniles de abulón rojo

El conocimiento de los mecanismos moleculares de la determinación del sexo, la diferenciación y el desarrollo gonadal han sido por mucho tiempo de interés para la acuicultura de los invertebrados marinos. Este interés se centra en las estrategias que se pueden aplicar a partir del manejo molecular de la reproducción e incluyen la producción de cultivos monosexo, modificación de la talla de primera madurez sexual y manipulación de proporciones sexuales (Elliot, 2000; Klinbunga *et al.*, 2009; Callaghan *et al.*, 2010). Tradicionalmente, la búsqueda de genes relacionados con los procesos reproductivos ha estado asociada con la generación de bibliotecas de EST's, normalizadas o sustractivas y actualmente se basa en la obtención de transcriptomas gonadales. En este estudio, se reportan los niveles de expresión de ocho genes relacionados con el desarrollo gonadal y la maduración en individuos indiferenciados y sexualmente maduros de abulón rojo *H. rufescens*.

El análisis de asignación de sexos usando la ecuación descrita por Sedik *et al.*, 2010, permitió asignar el sexo en todos los individuos indiferenciados de abulón rojo y confirmó el sexo en los individuos sexualmente maduros. Asimismo, mediante este

análisis, se identificaron machos a partir del intervalo de longitud de concha 16-25 mm. Esto podría explicarse por el desarrollo ontogénico de la gónada que involucra las siguientes fases: formación de la cavidad gonadal, aparición de las PGC, diferenciación de células germinales y maduración de las células germinales (Awaji y Hamano, 2004). En *H. asinina* se ha encontrado que la talla de formación de la gónada y aparición de las PGC ocurre después de los 7 mm de longitud de concha, mientras que la diferenciación sexual se produjo después de los 21 mm de longitud de concha (Awaji y Hamano, 2004). En *Haliotis rufescens*, datos del desarrollo ontogénico de la gónada fue reportado por (Gutiérrez, 2009). Este autor reporta que la formación de la cavidad gonadal y la aparición de las PGC ocurren después de los 10 mm de longitud de concha en individuos provenientes de cultivo, mientras que la diferenciación de las células germinales ocurrió entre los 22 y 24 mm de longitud de concha (Gutiérrez, 2009). Adicionalmente, Basto-Cuevas (2009) en un estudio sobre identificación del sexo usando los métodos visual, histológico y bioquímico, encontró que la maduración en el abulón rojo ocurre después de los 50 mm de longitud de concha y además reportó individuos diferenciados sexualmente por debajo de los 30 mm de longitud de concha (26.9 mm). Los resultados a nivel histológico reportados por Gutiérrez (2009) y Basto-Cuevas (2009) concuerdan con el patrón de expresión a nivel molecular encontrado mediante el análisis de asignación de sexo en este estudio y en conjunto no sólo confirmarían la relación entre el nivel de transcripción de genes relacionados con el sexo y el desarrollo ontogénico de la gónada, sino que además muestran evidencia para sugerir que la diferenciación sexual en el abulón rojo ocurre entre los 16 y 25 mm de longitud de concha.

La proteína de la cubierta vitelina (VCP 2.2) es un componente del ovocito y específicamente forma parte de la cubierta vitelina (Amparyup *et al.*, 2004; Aagaard *et al.*, 2006). Además, VCP 2.2 pertenece a un grupo de 30 proteínas que comparten una característica estructural denominada el dominio de la zona pelúcida, que existe tanto en invertebrados como vertebrados (Aagaard *et al.*, 2010). En el presente estudio, se observó una relación directa entre los niveles de expresión de VCP 2.2 y la longitud de concha, incluyendo las hembras maduras. Esta tendencia estaría relacionada con un incremento en el desarrollo ovárico de las hembras de abulón. Estos datos, concuerdan con los resultados obtenidos por Amparyup *et al.* (2010) en *H. asinina*, donde se obtuvo

mayores niveles de expresión de *VCP 2.2* en estadios tardíos de la ovogénesis. Por otro lado, aunque las proteínas de la cubierta vitelina se relacionan con el ovocito, en este trabajo se observó la expresión de *VCP 2.2* en tejido testicular, con la misma tendencia que en tejido ovárico, pero con niveles más bajos. Este patrón también se encontró en el abulón tropical (Amparyup *et al.*, 2004).

El receptor de lisina en la cubierta vitelina (*VERL*) es una glucoproteína fibrosa con un peso molecular de aproximadamente 1000 kDa, está compuesta de al menos 25 repeticiones en serie de 150 aminoácidos e interviene en la fusión espermato-ovocito de manera específica (Evans, 2000; Swanson *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2003). Los niveles de expresión de *VERL* que se encontraron en este estudio sugieren un patrón similar a *VCP 2.2*, es decir, que se expresó desde el intervalo más pequeño y presentó la misma tendencia en función de los intervalos de longitud de concha, pero con niveles más bajos. Por otro lado, aunque se detectó la expresión de este gen en tejido testicular, los niveles de expresión se mantuvieron iguales a lo largo de la etapa de crecimiento y maduración. En el mejillón *M. edulis*, se ha encontrado que los máximos niveles de expresión de *VERL* en el manto ocurren durante los meses de maduración gonadal, mientras que los mínimos se presentan en la etapa de reabsorción gonádica (Sedik *et al.*, 2010; Anantharaman y Craft, 2012). Asimismo, los resultados contrastantes publicados acerca de la expresión de este gen en machos de invertebrados marinos (Ciocan *et al.*, 2010; Craft *et al.*, 2010; Sedik *et al.*, 2010; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2014), indicarían que se necesitan más estudios para determinar si realmente se expresa sólo en testículos, que probablemente se exprese en otros tejidos o que podría tratarse de la expresión de algún equivalente parálogo.

La vitelogenina es el precursor de una de las principales proteínas del vitelo, la vitelina, en los ovocitos de vertebrados e invertebrados y es por tanto crítica durante la maduración ovárica (Matsumoto *et al.*, 2003; Boutet *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2010). En este estudio, los niveles de expresión de vitelogenina fueron significativamente diferentes sólo en hembras maduras y no para individuos menores a los 45 mm de longitud de concha. Basto-Cuevas (2009), con base en observaciones histológicas, indicó que, individuos de *H. rufescens* con una longitud de concha de 47 mm, presentaban el estado proliferativo de maduración ovárica. Asimismo, en peces

teleósteos se ha demostrado que los niveles de producción de vitelogenina durante la fase previtelogénica son muy bajos o inexistentes, mientras que en el inicio de la vitelogénesis la producción de los componentes del vitelo empiezan a ser considerables (Le Menn *et al.*, 2007). Esto podría indicar que durante la etapa previa a la vitelogénesis e inicio de ésta, las tasas de transcripción para el gen de la vitelogenina son bajas. Lo anterior explicaría los resultados que se obtuvieron en este estudio para los niveles de expresión de vitelogenina. Por otro lado, la expresión de este gen en machos con el mismo patrón que hembras, pero con niveles de expresión más bajos indicaría la expresión de vitelogenina en tejido testicular. Los resultados de este estudio respecto a la expresión en ambos sexos y a sus niveles de expresión concuerdan con aquellos obtenidos en la ostra *Saccostrea glomerata* (Anderson *et al.*, 2010) y en los pectínidos *Argopecten purpuratus* (Boutet *et al.*, 2008), *Chlamis farreri* (Qin *et al.*, 2012) y *Chlamis nobilis* (Zheng *et al.*, 2012).

DMRT1 es un gen involucrado en la determinación del sexo y se considera como el primer gen conservado en cascadas de diferenciación sexual a través de diferentes grupos de organismos (Raymond *et al.*, 1998; Marchand *et al.*, 2000). Además, *DMRT1* pertenece a una familia de genes que codifican proteínas que contienen un dominio DM con características de unión al DNA (Raymond *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). En este estudio, los niveles de expresión de *DMRT1* en *H. rufescens* indicaron que la amplificación no fue sexo específica y que en el caso de los machos, la expresión diferencial ocurrió en individuos maduros respecto a individuos indiferenciados. Los resultados respecto a un mayor nivel de expresión en gónadas de machos maduros concuerdan con aquellos obtenidos en diferentes etapas de desarrollo testicular en *H. asinina* (Klinbunga *et al.*, 2009; Amparyup *et al.*, 2010), *P. martensii* (Yu *et al.*, 2011) y *C. gigas* (Naimi *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que en *H. rufescens*, *DMRT1* juega un papel importante en el desarrollo testicular y la diferenciación sexual. Por otro lado, aunque se asocia a *DMRT1* con el desarrollo de la gónada del macho, hay evidencias de que este gen y otras isoformas se expresan en ovarios y otros tejidos (Raymond *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 2004), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para la expresión en el grupo de las hembras, que presentó niveles más bajos respecto a los machos y una relación inversa con la longitud de concha. En *C. gigas* se reportan tres genes con el dominio DM. Uno de ellos, denominado *CgDsx*, se expresó

solamente en gónada y su nivel de expresión en testículos fue 5.3 veces mayor al observado en los ovarios (Zhang *et al.*, 2014) Asimismo, en la ostra perlera *P. martensii*, un hermafrodita protándrico, los niveles de *DMRT2* fueron mayores en machos y subsecuentemente fueron disminuyendo durante la transición hacia el sexo opuesto (Yu *et al.*, 2011). En el caso de vertebrados, por ejemplo *O. mykiss*, se reportan niveles de expresión de *DMRT1* superiores en testículos respecto a los ovarios con diferenciales de expresión mayor a 10 veces (Marchand *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, se podría sugerir que en *H. rufescens* *DMRT1* estaría implicado en el desarrollo sexual del macho en una manera dosis dependiente.

En este estudio, la expresión diferencial de *LYS* ocurrió en el intervalo de longitud de concha 26-35 mm e incrementó en los machos maduros, mientras que en las hembras aunque se detectó la expresión de este gen, los niveles fueron bajos en todos los intervalos de talla e individuos adultos. La lisina es una proteína acrosomal que se ha estudiado en varias especies de abulón y erizos de mar, principalmente con fines filogenéticos (Kresge *et al.*, 2001; Pujolar y Pogson, 2011; Swanson *et al.*, 2011). Su importancia como proteína reproductiva se basa en el hecho de que participa en la fusión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito a través del receptor de lisina presente en la cubierta vitelina (Lee *et al.*, 1995; Metz *et al.*, 1998; Vacquier y Swanson, 2011). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Gutiérrez (2009), quien por medio de RT-PCR detectó la expresión de *LYS* a partir de los 37 mm de longitud de concha en individuos de *H. rufescens*. Otras especies de moluscos donde se reporta la expresión ascendente de *LYS* en función del grado de madurez gonadal incluye a *M. edulis* (Ciocan *et al.*, 2010) y *Mytilus galloprovincialis* (Banni *et al.*, 2011). Los resultados encontrados en este estudio sugieren que la lisina está funcionalmente involucrada en estadios tempranos de la espermatogénesis de *H. rufescens*. Por otro lado, la expresión de *LYS* en hembras podría estar asociada a remanentes de glándula digestiva durante la disección del tejido dada la ubicación de la gónada en los abulones.

La proteína de fertilización o sp18 es una proteína de mayor peso molecular (18KDa) que la lisina (16 KDa) y ambas constituyen las proteínas acrosomales más estudiadas en el espermatozoide de abulones y otros invertebrados marinos (Lewis *et al.*, 1982; Swanson

y Vacquier, 2002). La proteína de fertilización actúa hacia el final de la fertilización, después de la reacción acrosomal, permitiendo la fusión del espermatozoide con la membrana interna del ovocito (Metz *et al.*, 1998). En este estudio, la expresión diferencial para este gen ocurrió en el intervalo de longitud de concha 26-35 mm y fue mayor en los individuos maduros. Estos resultados coinciden con los reportados por Amparyup *et al.* (2010) en *H. asinina*, que con RT-PCR detectaron la expresión de este gen en individuos con cinco meses de edad e individuos adultos. El patrón de expresión que se encontró en este estudio sugiere que, al igual que la lisina, sp18 está involucrada en el desarrollo temprano de la espermatogénesis. Por otro lado, la expresión de sp18 en el grupo de las hembras concuerda con la expresión observada en hembras de *H. asinina* (Amparyup *et al.*, 2004). Finalmente, la expresión de sp18 que se observó en las hembras de abulón rojo en el presente estudio y la reportada en *H. asinina*, demuestran que es una proteína expresada en ambos sexos, que al igual que otros genes relacionados con el sexo necesitan ser estudiados para determinar su función.

Los andrógenos transforman el cuerpo de los machos de diferentes maneras, por ejemplo, el desarrollo de órganos sexuales, la producción de espermatozoides, el desarrollo de la próstata, el comportamiento, entre otros. Asimismo, los receptores de andrógeno regulan estos eventos de manera específica activando o reprimiendo genes definidos o vías regulatorias (Jänne *et al.*, 2000). En este estudio, la expresión significativa de *SARIP* ocurrió en machos maduros, pero no en organismos con tallas inferiores a 45 mm de longitud de concha. Aunque no hubo diferencias significativas en el grupo de las hembras, los niveles de expresión fueron cercanos a los reportados por los machos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por RT-PCR en testículos y ovarios de *H. asinina* (Amparyup *et al.*, 2004). De lo anterior, los resultados de expresión de *SARIP* en este estudio sugieren que la expresión de este gen primero no es sexo-específica y después que está involucrado en procesos de retroalimentación negativa en estadios tempranos de gametogénesis y retroalimentación positiva en estadios posteriores de la espermatogénesis. Otro aspecto importante en la expresión de *SARIP* en ambos sexos se basa en el hecho de que las diferencias en las características sexuales entre machos y hembras en vertebrados están dadas por la expresión diferencial de esteroides sexuales (Köhler *et al.*, 2007). En el caso de invertebrados acuáticos, por ejemplo *Branchiostoma belcheri*, se detectó

experimentalmente la presencia de receptores de andrógenos tanto en ovogonias y en diferentes estadios de madurez ovárica así como en espermatogonias, espermatocitos y espermatidas (Yong-Qian *et al.*, 2001). Por tanto, en el abulón rojo la expresión de este gen en ambos sexos y más aún la expresión diferencial en machos maduros podría sugerir su participación en el balance andrógeno-estrógeno y que hacia el final del proceso de maduración es uno de los componentes necesarios para lograr la producción de espermatozoides.

Las tektinas (A, B y C) son proteínas del citoesqueleto asociadas a microtúbulos, esenciales para formar sitios de unión complejos para componentes axonemales tales como nexinas y brazos de dineinas (Norrander *et al.*, 1998). Estas proteínas se han caracterizado a partir de equinodermos y cilios de moluscos (Linck y Stephens, 1987; Pirner y Linck, 1994), se expresan principalmente en la línea germinal del macho y son importantes para la estructural axonemal y estabilidad del flagelo del espermatozoide, además de otras estructuras ciliares y flagelares (Roy *et al.*, 2004). En este estudio, los niveles de expresión de *Tektin A1* fueron altos en los intervalos de talla 5-15 y 16-25 mm, para luego disminuir en individuos con mayor talla, excepto en los machos maduros. Estos resultados contrastan con los obtenidos en diferentes estadios de maduración testicular en *H. asinina* donde los mayores niveles de expresión se obtuvieron en los estadios II, III y IV de madurez (Amparyup *et al.*, 2010). Estas diferencias podrían estar asociadas al hecho de que en dicho estudio se usó PCR semicuantitativa y en este estudio la cuantificación de la expresión génica se hizo con RT-qPCR. Por otro lado, aunque se ha reportado la expresión de *Tektin A1* en branquia, glándula digestiva y cámara hipobranquial en hembras (Klinbunga *et al.*, 2009), no se ha encontrado en ovarios. La expresión de *Tektin A1* en ovario de hembras maduras en este estudio, podría asociarse con el hecho de que el citoesqueleto axonemal, relacionado con las tektinas, participa en el transporte de proteínas (Linck *et al.*, 2014).

El dimorfismo sexual se refiere a las diferencias en apariencia y conducta que existen entre machos y hembras. Sin embargo, a pesar de las grandes diferencias fenotípicas entre los sexos, los machos y hembras son genéticamente casi idénticos. Lo anterior implica que los rasgos dimórficos resultan de la expresión diferencial de genes

presentes en ambos sexos (Ellegren y Parsch, 2007). Tradicionalmente, tanto en invertebrados como vertebrados, se ha sugerido la presencia de genes sexo específicos que incluyen *VTGI*, *VERL*, *LYS*, *DMRT1*, entre otros (Swanson y Vacquier, 2002; Arcos *et al.*, 2005; Klinbunga *et al.*, 2009). No obstante, en este trabajo los resultados de expresión de genes asociados a hembras y machos en individuos maduros de abulón rojo demuestran que la expresión no fue sexo específica, pero si significativamente mayor en uno u otro sexo. Esta situación podría implicar que los genes evaluados en este estudio existen en ambos sexos y que la técnica de RT-qPCR es más sensible comparada con PCR punto final o PCR semicuantitativa, lo que permite detectar niveles muy bajos de expresión que anteriormente no podían detectarse. Por ejemplo, se ha establecido que los individuos machos de cualquier especie deberían tener niveles mínimos de vitelogenina bajo condiciones normales, debido a los niveles insuficientes de desencadenantes endógenos para una vitelogénesis significativa (Matozzo *et al.*, 2008). Por otro lado, una de las principales limitantes de los estudios transcriptómicos es que no permite conocer las modificaciones postranscripcionales ni postraduccionales. Con base en lo anterior, puede darse el escenario de que a nivel transcriptómico los genes no son sexo específico, pero si se podría hablar de proteínas específicas del sexo. Recientemente, en *H. laevigata* usando herramientas proteómicas se encontraron proteínas sexo específicas para individuos adultos (Mendoza-Porras *et al.*, 2014). En este sentido, las herramientas proteómicas ayudan a complementar los enfoques transcriptómicos ya que permiten cubrir sus limitantes relacionadas principalmente con las modificaciones postranscripcionales y el proceso mismo de la traducción.

5. Conclusiones

- De los 12,764 contigs obtenidos se pudo anotar 3,491 (27.35%), los cuales incrementan el conocimiento del transcriptoma gonadal del abulón rojo.
- A partir de las bibliotecas de cDNA y de la secuenciación masiva se identificaron genes sexo específicos asociados con la diferenciación sexual, con la diferenciación de células germinales (*Vasa* y *Nanos*) y la determinación sexual de machos (*DMRT1*).
- La expresión diferencial de los genes sexo específicos ocurrió entre los 26-35 y 36-45 mm de longitud de concha.
- Los genes asociados específicamente a un sexo se expresaron en el sexo al que no se les asocia tradicionalmente, pero con niveles significativamente menores.
- La expresión de los genes *SARIP*, *LYS* y *DMRT1* no fue significativamente diferente a través de los cuatro intervalos de talla en el grupo de las hembras.
- El análisis de asignación de sexos mostró que el proceso de diferenciación sexual en el abulón rojo ocurre entre los 16 y 25 mm de longitud de concha.
- Las vías metabólicas en el tejido gonadal estuvieron asociadas con la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de energía, reflejando la utilización del sustrato metabólico (proteína) en función del grado de madurez sexual.

6. Recomendaciones

- Integrar estudios de proteómica para complementar los resultados transcriptómicos en el sentido de determinar si se mantienen los niveles diferenciales de los genes a nivel de proteínas y determinar si genes sexo específicos llegan a traducirse en el sexo opuesto.
- Con el fin de identificar regiones cromosomales sexo específicas se recomienda utilizar enfoques de hibridación tales como FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) con los genes aquí utilizados.
- Realizar un análisis de expresión de genes que codifican para las gonadotropinas y sus receptores, que permita correlacionarlo con la expresión de los genes sexo específicos.
- En estudios futuros de RT-qPCR relacionados con la expresión de genes en tejido gonadal del abulón rojo, utilizar como genes de referencia la proteína ribosomal L5 o β -tubulina, descartando β -actina ya que fue el gen de mantenimiento menos estable.

7. Referencias bibliográficas

- Aagaard, J.E., Yi, X., MacCoss, M.J. y Swanson, W.J. (2006). Rapidly evolving zona pellucida domain proteins are a major component of the vitelline envelope of abalone eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17302–17307. doi:10.1073/pnas.0603125103
- Aagaard, J.E., Vacquier, V.D., MacCoss, M.J. y Swanson, W.J. (2010). ZP domain proteins in the abalone egg coat include a paralog of VERL under positive selection that binds lysin and 18-kDa sperm proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 27,(1), 193–203. doi:10.1093/molbev/msp221
- Aflalo, E.D., Bakhrat, A., Raviv, S., Harari, D., Sagi, A. y Abdu, U. (2007). Characterization of a vasa-like gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 74(2), 172–177. doi:10.1002/mrd.20622
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2014). *Essential cell biology, 4th edition*. Garland Science. 726 pp
- Allen, J.S.K., Hidu, H. y Stanley, J. G. (1986). Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 170(2), 198–210. doi:10.2307/1541803
- Amparyup, P., Klinbunga, S., Preechaphol, R., Tassanakajon, A., Hirono, I., Aoki, T. y Jarayabhand, P. (2004). Expressed Sequence Tag Analysis of Ovaries and Testes from Tropical Abalone (*Haliotis asinina*). *Mar. Biotechnol.* 6, S1–S6. doi: 10.1007/s10126-004-8361-4
- Amparyup, P., Klinbunga, S. y Jarayabhand, P. (2010). Identification and Expression Analysis of Sex-Specific Expression Markers of Thai Abalone *Haliotis asinina*, Linnaeus, 1758. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 765–773. doi:10.2983/035.029.0331
- Anantharaman, S. y Craft, J.A. (2012). Annual Variation in the Levels of Transcripts of Sex-Specific Genes in the Mantle of the Common Mussel, *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 7(11), e50861. doi:10.1371/journal.pone.0050861
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. y Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Anderson, K., Burnell, F., Roiko, A., Andrew, M., O'Connor, W. y Elizur, A. (2010). Notes y summaries. *Ecological Management and Restoration*, 11(2), 143–146.

- Angelopoulou, R., Lavranos, G. y Manolakou, P. (2012). Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 13. doi:10.1186/1477-7827-10-13
- Arai, K. y Okumura, S.I. (2013). Aquaculture-oriented genetic researches in abalone: current status and future perspective. *African Journal of Biotechnology*, 12(26), 4044–4052. doi:10.5897/AJB12.2178
- Arcos, F.G., Ibarra, A.M. y Racotta, L. S. (2011). Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture*, 316(1), 93–98. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.045
- Arcos, F.G., Racotta, I.S., Palacios, E. y Ibarra, A.M. (2005). Ovary development at the onset of gametogenesis is genetically determined and correlated with reproductive traits at maturity in shrimp *Litopenaeus (Penaeus) vannamei*. *Marine Biology*, 148(2), 339–346. doi:10.1007/s00227-005-0087-1
- Arcos, G.F., Ibarra, A.M., Vazquez-Boucard, C., Palacios, E. y Racotta, I.S. (2003). Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 34(9), 749–755. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00878.x
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Traver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. y Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. doi:10.1038/75556
- Ault, J.S. (1985). Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1-4), 398–425.
- Awaji, M. y Hamano, K. (2004). Gonad formation, sex differentiation and gonad maturation processes in artificially produced juveniles of the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture*, 239(1), 397-411.
- Awaji, M., Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M. y Hara, A. (2011). Immunohistochemical observations of vitellin synthesis and accumulation processes in ovary of Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Science*, 77(2), 191–197.
- Baibai, T., Oukhattar, L., Mountassif, D., Assobhei, O., Serrano, A. y Soukri, A. (2010). Comparative molecular analysis of evolutionarily distant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Sardina pilchardus* and *Octopus vulgaris*, 42(12), 863–872. doi:10.1093/abbs/gmq103.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A. y Dondero, F. (2011). Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS ONE*, 6(5), e18904. doi:10.1371/journal.pone.0018904

- Barber, B.J. y Blake, N.J. (1985). Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in *A. irradians concentricus*, as indicated by ¹⁴C incorporation. *Biol. Bull.*, 168(1), 39–49.
- Basto-Cuevas, A.M. (2009). Identificación del sexo y del desarrollo gonadal en abulón rojo *Haliotis rufescens*, en cautiverio. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 56 p.
- Bern, H. A. y Hagadorn, I. R. (1965). Structure and function in the nervous system of invertebrates. *Neurosecretion*, 1: 353-429
- Bieniarz, K. y Epler, P. (1992). Advances in reproductive endocrinology of fish. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 43(4 Suppl 1), 215–222.
- Bobe, J., Montfort, J., Nguyen, T. y Fostier, A. (2006). Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(39), i0006-3363. doi:10.1186/1477-7827-4-39
- Bocek, A., Phelps, R. P. y Popma, T. J. (1992). Effect of Feeding Frequency on Sex-Reversal and on Growth on Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 1(3), 97-103.
- Bogdanova, E.A., Barsova, E.V., Shagina, I.A., Scheglov A., Anisimova V., Vagner L.L., Lukyanov S.A y Shagin D.A. (2011). Normalization of full-length enriched cDNA. En: C. Lu, J. Browse y J.G Wallis. cDNA libraries: Methods and applications. Humana press. 275 pp.
- Booolootian, R. A., Farmanfarmaian, A. y Giese, A. C. (1962). On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *The Biological Bulletin*, 122(2), 183-193.
- Boonefaes, T., Houthuys, E., Van den Bergh, R., Vander Beken, S., Raes, G., Brouckaert, P., De Baetselier, P. y Grooten, J. (2011). Do-it-yourself: construction of a custom cDNA macroarray platform with high sensitivity and linear range. *BMC Biotechnology*, 11(1):97.
- Boutet, I., Moraga, D., Marinovic, L., Obreque, J. y Chavez-Crooker, P. (2008). Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: Influence of maturation stage and sex on mRNA expression. *Gene*, 407, 130–138. doi:10.1016/j.gene.2007.10.005
- Bull, J.J. (1983). Evolution of sex determining mechanisms. *Benjamin Cummings, Menlo Park, CA*. 316 pp

- Bustin, S.A, Benes, V., Garson, J.A, Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. y Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Bustin, S.A. y Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 15(3), 155–166.
- Callaghan, T.R., Degnan, B.M. y Sellars, M.J. (2010). Expression of sex and reproduction-related genes in *Marsupenaeus japonicus*. *Marine Biotechnology*, 12(6), 664–677. doi:10.1007/s10126-009-9254-6
- Cárdenas, L., Sánchez, R., Gomez, D., Fuenzalida, G., Gallardo-Escárate, C. y Tanguy, A. (2011). Transcriptome analysis in *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae): Mining and characterization of new genomic and molecular markers. *Marine Genomics*, 4(3), 197–205. doi:10.1016/j.margen.2011.05.002
- Castro-Lara, J.L. (2009). Desarrollo y análisis del conjunto PCR/DotBlot para la detección del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 130 p.
- CESAIBC, (2014). Directorio de productores acuícolas de moluscos. Comité estatal de sanidad acuícola e inocuidad de Baja California. Recuperado de: http://www.cesaibc.org/sitio/archivos/DIRECTORIO%20PRODUCTORES%20MOLUSCOS%202014_280214154756.pdf
- Charlesworth, B. y Dempsey, N.D. (2001). A model of the evolution of the unusual sex chromosome system of *Microtus oregoni*. *Heredity*, 86(4), 387–394. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00803.x
- Scharrer, B. (1978). Pertidergic neurons: facts and trends. *Gen Comp Endocrinol* 34: 50-62.
- Ciocan, C.M., Cubero-Leon, E., Puinean, A.M., Hill, E.M., Minier, C., Osada, M., Fenlon, K. y Rotchell, J. M. (2010). Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution*, 158, 2977–2984. doi:10.1016/j.envpol.2010.05.025
- Ciocan, C.M., Cubero-Leon, E., Minier, C. y Rotchell, J.M. (2011). Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PloS One*, 6(7), e22326. doi:10.1371/journal.pone.0022326
- Collin, R. (2013). Phylogenetic patterns and phenotypic plasticity of molluscan sexual systems. *Integrative and Comparative Biology*, 53, 723–735. doi:10.1093/icb/ict076

- Conesa, A. y Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 619832. doi:10.1155/2008/619832
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M. y Robles, M. (2005). Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(8), 3674–3676. doi:10.1093/bioinformatics/bti610
- Costa, V., Angelini, C., De Feis, I. y Ciccodicola, A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 853916. doi:10.1155/2010/853916
- Cox, K. W. (1962). California abalones, family Haliotidae (No. 114-123). resources agency of California, Department of fish and game.
- Cox, J. M. (2001). Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. *Journal of immunological methods*, 250(1), 3-13.
- Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchison, T.H. y Chipman, J.K. (2010). Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE*, 5(1), e8875. doi:10.1371/journal.pone.0008875
- Croll, R.P. y Wang, C. (2007). Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture*, 272(1-4), 76–86. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.06.031
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R. y Udvardi, M.K. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 38(2), 366–79. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02051.x
- Dale, J.W y von Schantz, M. (2007). From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology. John Wiley and Sons. (2a. ed.). 384 pp.
- De Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A, Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W. y Span, P.N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(1), 154–9. doi:10.1038/labinvest.3700208
- De Santis, C., Smith-Keune, C. y Jerry, D.R. (2011). Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*. *Marine Biotechnology*, 13(2), 170–80. doi:10.1007/s10126-010-9277-z

- Delseny, M., Han, B. y Hsing, Y.I. (2010). High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science*, 179(5), 407-422. doi:10.1016/j.plantsci.2010.07.019
- Demidenko, N.V, Logacheva, M.D. y Penin, A.A. (2011). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) based on transcriptome sequence data. *PLoS One*, 6(5), e19434. doi:10.1371/journal.pone.0019434
- Devlin, R.H. y Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191-364. doi:10.1016/S0044-8486(02)00057-1
- Dhar, A.K., Bowers, R.M., Licon, K.S., Veazey, G. y Read, B. (2009). Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. *Molecular Immunology*, 46(8-9), 1688-95. doi:10.1016/j.molimm.2009.02.020
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A, Johnson, M.A, Rook, G. y Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37(1), 112-4, 116, 118-9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283208>
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A. y Favrel, P. (2011). Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics*, 12(1), 468. doi:10.1186/1471-2164-12-468
- Doak, S.H. y Zair, Z. (2012). Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction: Technical Considerations for Gene Expression Analysis. En: J. M. Parry y E. M. Parry (Eds.), *Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology*, vol. 817 (Vol. 817, pp. 251-270). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-61779-421-6
- Douglas-Helders, M., Carson, J., Howard, T. y Nowak, B. (2001). Development and validation of a new dot blot test for the detection of *Paramoeba pemaquidensis* (Page) in fish. *Journal of Fish Diseases*, 24, 273-280. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00295.x
- Droege, M. y Hill, B. (2008). The Genome Sequencer FLX™ System-Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology*, 136(1-2), 3-10. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.03.021
- Duncan, N.J., Sonesson, A.K. y Chavanne, H. (2013). Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. En: G. Allan y G. Burnell (Eds.). *Advances in hatchery aquaculture technology*. pp. 23-66. Woodhead Publishing Limited.

- Dussault, A.A. y Pouliot, M. (2006). Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8(1), 1–10. doi:10.1251/pbo114
- Ellegren, H. y Parsch, J. (2007). The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nature Reviews. Genetics*, 8(9), 689–698. doi:10.1038/nrg2167
- Elliott, N.G. (2000). Genetic improvement programmes in abalone: what is the future?. *Aquaculture Research*, 31(1), 51–59.
- Evans, J.P. (2000). Getting sperm and egg together: things conserved and things diverged. *Biology of Reproduction*, 63(2), 355–360.
- Evans, J.P. (2012). Sperm-Egg Interaction. *Annual Review of Physiology*, 74, 477-502. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153339
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P. y Huvet, A. (2009). In vivo RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 276(9), 2566–2573. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F. y Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4), 897–904. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.145
- Farazmand, A., Inanloo, K. y Agh, N. (2010). Expression of Dmrt family genes during gonadal differentiation in two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Urmia Lake (Iran). *Crustaceana*, 83(10), 1153-1165.
- Farrell, R.E. (2010). RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Elsevier, USA. (4a. ed.) 717 pp. doi:10.1016/B978-0-12-374727-3.00023-1
- Fernandes, J.M.O., Mommens, M., Hagen, O., Babiak, I. y Solberg, C. (2008). Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 23–32. doi:10.1016/j.cbpb.2008.01.003
- Fernández-Aparicio, M., Huang, K., Wafula, E.K., Honaas, L.A, Wickett, N.J., Timko, M. P., Depamphilis, C.W., Yoder, J.I y Westwood, J. H. (2013). Application of qRT-PCR and RNA-Seq analysis for the identification of housekeeping genes useful for normalization of gene expression values during *Striga hermonthica* development. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 3395–407. doi:10.1007/s11033-012-2417-y
- Filby, A.L. y Tyler, C.R. (2007). Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 10. doi:10.1186/1471-2199-8-10

- Finn, R.N., Kolarevic, J., Kongshaug, H. y Nilsen, F. (2009). Evolution and differential expression of a vertebrate vitellogenin gene cluster. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 2. doi:10.1186/1471-2148-9-2
- Fodor, S.P., Rava, R.P., Huang, X.C., Pease, A.C., Holmes, C.P. y Adams, C.L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 364, 555–556. doi:10.1038/364555a0
- Franchini, P., Van der Merwe, M. y Roodt-Wilding, R. (2011). Transcriptome characterization of the South African abalone *Haliotis midae* using sequencing-by-synthesis. *BMC research notes*, 4(1), 59.
- Gallardo-Escárate, C., Alvarez-Borrego, J., Del Río-Portilla, M. A. y Kober, V. (2004). Karyotype of pacific red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae) using image analysis. *Journal of shellfish research*, 23(1), 205-210.
- Gallardo-Escárate, C., Álvarez-Borrego, J., Del Río-Portilla, M.Á., Cross, I., Merlo, A. y Rebordinos, L. (2005a). Fluorescence *in situ* hybridization of rDNA, telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n repeats in the red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae). *Hereditas*, 142(2005), 73–79. doi:10.1111/j.1601-5223.2005.01909.x
- Gallardo-Escarate, C., Alvarez-Borrego, J., Rio-Portilla, M.A., Von Brand-Skopnik, E. y Bueno, M.A. (2005b). Analysis of chromosomal DNA content in Pacific red abalone *Haliotis rufescens* by fluorescence image analysis. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1161–1168. Recuperado de: [http://www.bioone.org/doi/abs/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1161:AOCDCl\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.2983/0730-8000(2005)24[1161:AOCDCl]2.0.CO;2)
- Gallardo-Escárate, C. y Del Río-Portilla, M.Á. (2007). Karyotype composition in three California abalones and their relationship with genome size. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 825-832. doi:10.2983/0730-8000(2007)26[825:KCITCA]2.0.CO;2
- Garson, J. A., Grant, P. R., Ayliffe, U., Ferns, R. B. y Tedder, R. S. (2005). Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *Journal of virological methods*, 126(1), 207-213.
- Geiger, D.L. y Owen, B. (2012). Abalone: world-wide Haliotidae. ConchBooks. 361 pp.
- GenBank. (2015). National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Haliotis>. Recuperado el 8 de febrero de 2015
- Ghani, M., Sato, C., y Rogaeva, E. (2013). Segmental duplications in genome-wide significant loci and housekeeping genes; warning for GAPDH and ACTB. *Neurobiology of Aging*, 34(6), 1710.e1–4. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.006

- Ghiselli, F., Milani, L., Chang, P.L., Hedgecock, D., Davis, J.P., Nuzhdin, S.V. y Passamonti, M. (2012). De novo assembly of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination. *Molecular Biology and Evolution*, 29(2), 771–786. doi:10.1093/molbev/msr248
- Giese, A.C. (1959). Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual review of physiology*, 21(1), 547-576.
- Giorgi, A. E. y DeMartini, J. D. (1977). A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. *Calif. Fish Game*, 63(2), 80-94.
- Goetz, F.W. y MacKenzie, S. (2008). Functional genomics with microarrays in fish biology and fisheries. *Fish and Fisheries*, 9(4), 378-395. doi:10.1111/j.1467-2979.2008.00301.x
- Gosling, E. (2003). Bivalve Culture. In *Bivalve molluscs: Biology, Ecology and Culture* (pp. 284–332). doi:10.1002/9780470995532.
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., y Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 487–93. doi:10.1093/jxb/ern305
- Guo, X. y Allen, S.K. (1997). Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome*, 40(3), 397-405.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., y Allen, S. K. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution*, 52, 394–402. doi:10.2307/2411076
- Guo, R., Lee, M.A. y Ki, J.S. (2012). Normalization genes for mRNA expression in the marine diatom *Ditylum brightwellii* following exposure to thermal and toxic chemical stresses. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 1101–1109. doi:10.1007/s10811-012-9908-z
- Gustafson, E.A. y Wessel, G.M. (2010). Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays*, 32(7), 626-637. doi:10.1002/bies.201000001
- Gutiérrez, A.P. (2009). Análisis de los patrones de expresión de genes relacionados a la maduración sexual en abalón rojo (*Haliotis rufescens*). Tesis Universidad de Concepción, Chile. 77 p.
- Hahn, K.O. (1989). Handbook of culture of the abalone and other marine gastropods. CRC Press. 348 pp.

- Hahn, K.O. (1992). Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis spp.* En: S.A. Sheperd, M.J. Tegner y S.A. Guzman del Proo (Eds.). *Abalone of the world: biology, fisheries and culture: proceedings of the 1st international symposium on abalone.* Fishing News Books. 608 pp.
- Haley, L. E. (1977). Sex Determination in the American Oyster. *Journal of Heredity*, *68*, 114–116.
- Hammen, C. S. (1969). Metabolism of the oyster, *Crassostrea virginica*. *American Zoologist*, *9*(2), 309-318.
- He, J.Q., Sandford, A.J., Wang, I.M., Stepaniants, S., Knight, D.A, Kicic, A, Stick, S.M. y Paré, P. D. (2008). Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *The European Respiratory Journal*, *32*(3), 755–62. doi:10.1183/09031936.00129107
- Hedrick, P. W. y Hedgecock, D. (2010). Sex determination: Genetic models for oysters. *Journal of Heredity*, *101*, 602–611. doi:10.1093/jhered/esq065
- Hellemans, J. y Vandesompele, J. (2011). qPCR data analysis—unlocking the secret to successful results. En: S. Kennedy y N. Oswald (Eds). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide* (p. 139). Horizon Scientific Press.
- Heras, J., Koop, B.F. y Aguilar, A. (2011). A transcriptomic scan for positively selected genes in two closely related marine fishes: *Sebastes caurinus* and *S. rastrelliger*. *Marine Genomics*, *4*(2), 93–98. doi:10.1016/j.margen.2011.02.001
- Hernández-Ibarra, N.K., Márquez, C., Ramírez, J.L. y Ibarra, A.M. (2004). Comparative karyotypes of two northeastern Pacific abalone species (*Haliotis fulgens* Philippi and *Haliotis rufescens* Swainson). *Journal of Shellfish Research*, *23*(3), 861-865.
- Huan, P., Wang, H. y Liu, B. (2012). Transcriptomic analysis of the clam *Meretrix meretrix* on different larval stages. *Marine Biotechnology*, *14*(1), 69-78.
- Huang, R., Gao, L.Y., Wang, Y.P., Hu, W. y Guo, Q.L. (2009). Structure, organization and expression of common carp (*Cyprinus carpio* L.) NKEF-B gene. *Fish and Shellfish Immunology*, *26*(2), 220–9. doi:10.1016/j.fsi.2008.10.013
- Huang, Z. X., Chen, Z. S., Ke, C. H., Zhao, J., You, W. W., Zhang, J., Dong, W. T. y Chen, J. (2012). Pyrosequencing of *Haliotis diversicolor* transcriptomes: insights into early developmental molluscan gene expression. *PloS one*, *7*(12), e51279.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., y Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–84. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Hui, P. (2012). Next generation sequencing: chemistry, technology and applications. *Topics in Current Chemistry*, *336*, 1–18. doi:10.1007/128

- Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Cañavate, J.P., Reith, M. y Manchado, M. (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 28. doi:10.1186/1471-2199-9-28
- Instituto Nacional de Pesca. (2006). Sustentabilidad y pesca responsable en México. 543 pp.
- Jänne, O.A., Moilanen, A.M., Poukka, H., Rouleau, N., Karvonen, U., Kotaja, N., Häkli, M. y Palvimo, J.J. (2000). Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 401–405. doi:10.1042/0300-5127:0280401
- Jiang, J.Z., Zhang, W., Guo, Z.X., Cai, C.C., Su, Y.L., Wang, R.X. y Wang, J.Y. (2011). Functional annotation of an expressed sequence tag library from *Haliotis diversicolor* and analysis of its plant-like sequences. *Marine Genomics*, 4(3), 189–196. doi:10.1016/j.margen.2011.05.001
- Josse, J. (1988). The hormones of molluscs. In: Laufer, H. and Downer, R.D.H. 26 (eds.) *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan Liss, New York.
- Jorgensen, S.M., Kleveland, E.J., Grimholt, U. y Gjoen, T. (2006). Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Marine Biotechnology*, 8(4), 398–408. doi:10.1007/s10126-005-5164-4
- Jung, H., Lyons, R.E., Dinh, H., Hurwood, D.A., McWilliam, S. y Mather, P.B. (2011). Transcriptomics of a giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): De Novo assembly, annotation and marker discovery. *PLoS ONE*, 6(12), e27938.
- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C. y Lareyre, J. J. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and comparative endocrinology*, 153(1), 346-364.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M. y Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl 1), D354-D357. doi:10.1093/nar/gkj102
- Kenchington, E., MacDonald, B., Cao, L., Tsagkarakis, D. y Zouros, E. (2002). Genetics of mother-dependent sex ratio in blue mussels (*Mytilus spp.*) and Implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics*, 161(4), 1579–1588.
- Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A. y Minier, C. (2008). Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 147(3), 261-270. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.007
- Klinbunga, S., Amparyup, P., Khamnamtong, B., Hirono, I., Aoki, T. y Jarayabhand, P. (2009). Isolation and characterization of testis-specific DMRT1 in the tropical abalone (*Haliotis asinina*). *Biochemical Genetics*, 47(1-2), 66–79.

- Köhler, H.R., Kloas, W., Schirling, M., Lutz, I., Reye, A.L., Langen, J.S., Triebkorn, R., Nagel, R. y Schönfelder, G. (2007). Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, 16, 131–43. doi:10.1007/s10646-006-0111-3
- Koopman, P., 1999. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55(6-7), 839–856.
- Kortner, T.M., Valen, E.C., Kortner, H., Marjara, I.S., Krogdahl, Å. y Bakke, A.M. (2011). Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture*, 318(3-4), 355–363. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.05.038
- Kavanagh, I., Jones, G. y Nayab, S.N. (2011). Significance of controls and standard curves in PCR. En: Kennedy, S. y Oswald, N. (Eds.), *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 67–78.
- Krantic, S. y Rivailler, P. (1996). Meiosis reinitiation in molluscan oocytes: a model to study the transduction of extracellular signals. *Invertebrate Reproduction and Development*, 30(1-3). doi:10.1080/07924259.1996.9672532
- Kranz, A. M., Tollenaere, A., Norris, B. J., Degnan, B. M., y Degnan, S. M. (2010). Identifying the germline in an equally cleaving mollusc: Vasa and Nanos expression during embryonic and larval development of the vetigastropod *Haliotis asinina*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(4), 267–279. doi:10.1002/jez.b.21336
- Kresge, N., Vacquier, V.D. y Stout, C.D. (2001). The crystal structure of a fusagenic sperm protein reveals extreme surface properties. *Biochemistry*, 40(18), 5407–5413. doi:10.1021/bi002779v
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömblom, L., Ståhlberg, A. y Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- LaFont, R. (2000). The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology*, 9(1-2), 41–57. doi:10.1023/A:1008912127592
- Lang, R.P., Bayne, C.J., Camara, M.D., Cunningham, C., Jenny, M.J. y Langdon, C.J. (2009). Transcriptome profiling of selectively bred pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Marine Biotechnology*, 11(5), 650–668. doi:10.1007/s10126-009-9181-6
- Latham, G. J. (2010). Normalization of MicroRNA Quantitative RT-PCR Data in Reduced Scale Experimental Designs. En: S. Monticelli (Ed.). *MicroRNAs and the Immune System: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 667, pp. 19–31). Totowa, NJ: Humana Press Inc. doi:10.1007/978-1-60761-811-9

- Lee, Y.H., Ota, T. y Vacquier, V.D. (1995). Positive selection is a general phenomenon in the evolution of abalone sperm lysin. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2), 231–238.
- Lee, Y.H. y Vacquier, V.D. (1995). Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Marine Biology*, 124(2), 267–278. doi:10.1007/BF00347131
- Leighton, D.L. (2000). The biology and culture of the California abalones. Dorrance Publishing. 216 pp.
- Le Menn, F., Cerdà, J. y Babin, P. J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In *The Fish Oocyte* (pp. 1-37). Springer Netherlands.
- Lewis, C.A., Talbot, C.F. y Vacquier, V.D. (1982). A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. *Developmental Biology*, 92(1), 227–239. doi:10.1016/0012-1606(82)90167-1
- Li, R. y Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sciences*, 92(13), 747–51. doi:10.1016/j.lfs.2013.02.014
- Linck, R., Fu, X., Lin, J., Ouch, C., Schefter, A., Steffen, W., Warren, P. y Nicastro, D. (2014). Insights into the structure and function of ciliary and flagellar doublet microtubules: Tektins, Ca²⁺-binding proteins, and stable protofilaments. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17427–17444. doi:10.1074/jbc.M114.568949
- Linck, R.W. y Stephens, R.E. (1987). Biochemical characterization of tektins from sperm flagellar doublet microtubules. *Journal of Cell Biology*, 104(4), 1069–1075. doi:10.1083/jcb.104.4.1069
- Liu, X., Liu, X., Guo, X., Gao, Q., Zhao, H. y Zhang, G. (2006). A preliminary genetic linkage map of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Marine Biotechnology*, 8(4), 386-397.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D. y Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PloS One*, 7(9), e46451.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. y Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 251364 doi:10.1155/2012/251364
- Liu, Z.J. (2010). *Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture*. (pp. 123-132). Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9780470958964

- Long, X.Y., Liu, Y.X., Rocheleau, H., Ouellet, T. y Chen, G.Y. (2011). Identification and Validation of Internal Control Genes for Gene Expression in Wheat Leaves Infected by Strip Rust. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 5(3): 255-267.
- López-Landavery, E.A., Portillo-López, A., Gallardo-Escárate, C., y Del Río-Portilla, M. A. (2014). Selection of reference genes as internal controls for gene expression in tissues of red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca, Vetigastropoda; Swainson, 1822). *Gene*, 549(2), 258–265. doi:10.1016/j.gene.2014.08.002
- Lukyanov, S.A, Lukianov, K.A, Gurskaya, N.G., Bogdanova, E.A. y Buzdin, A.A. (2007). Selective suppression of polymerase chain reaction and its most popular applications. En: A. Buzdin y S. Lukyanov (Eds.). *Nucleic Acids Hybridization Modern Applications* (pp. 29-51). Springer Netherlands.
- Ma, C.Y., Guo, Y.J. y Zhou, K.Y. (2010). Identification and characteristics of a novel gene, EJO1, in the Chinese mitten crab (*Eriocheir japonica sinensis*) ovary. *Mol Biol Rep* 37(6), 2587–2592. doi: 10.1007/s11033-009-9778-x
- Manolakou, P., Lavranos, G. y Angelopoulou, R. (2006). Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 59. doi:10.1186/1477-7827-4-59
- Mañanós, E., Duncan, N. y Mylonas, C. (2009). Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. En: E. Cabrita, V. Robles y P. Harraez, (Eds.). *Methods in Reproductive Aquaculture*. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 3–80.
- Marchand, O., Govoroun, M., D’Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J.J., Bernot, A., Laudet, V. y Guiguen, Y. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1493(1), 180–187. doi:10.1016/S0167-4781(00)00186-X
- Martin, J.A. y Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews. Genetics*, 12(10), 671–682. doi:10.1038/nrg3068
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F. y Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 34(4), 531-545. doi:10.1016/j.envint.2007.09.008
- Matsumoto, T., Masaoka, T., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Satoh, N. y Awaji, M. (2013). Reproduction-related genes in the pearl oyster genome. *Zoological Science*, 30(10), 826–50. doi:10.2108/zsj.30.826
- Matsumoto, T., Nakamura, A. M., Mori, K. y Kayano, T. (2003). Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological Science*, 20(1), 37–42. doi:10.2108/zsj.20.37

- Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M. y Hara, A. (2008). Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 149(3), 293–298. doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.003
- Matz, M.V. (2002). Amplification of Representative cDNA Samples from Microscopic Amounts of Invertebrate Tissue to Search for New Genes. En: B.W. Hicks (Ed.). *Green Fluorescent Protein: Applications and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 183 (Vol. 183, pp. 3–18). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C. y Gac, F. L. (2005). Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1), 143-154.
- McAvaney, L.A., Day, R.W., Dixon, C.D. y Huchette, S.M. (2004). Gonad development in seeded *Haliotis laevigata*: Growth environment determines initial reproductive investment. *Journal of Shellfish Research*, 23(4), 1213-1218.
- McCurley, A.T. y Callard, G.V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 102. doi:10.1186/1471-2199-9-102
- McShane, P.E. y Naylor, J.R. (1995). Small-scale spatial variation in growth, size at maturity, and yield- and egg-per-recruit relations in the New Zealand abalone *Haliotis iris*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29(4), 603–612. Recuperado de <Go to ISI>://WOS:A1995TQ82200014
- Mehta, R., Bireddinc, A., Hossain, N., Afendy, A., Chandhoke, V., Younossi, Z. y Baranova, A. (2010). Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 39. doi:10.1186/1471-2199-11-39
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N.A., McWilliam, S.M., Cook, M.T., Harris, J.O., Wijffels, G. y Colgrave, M.L. (2014). Exploiting genomic data to identify proteins involved in abalone reproduction. *Journal of Proteomics*, 108, 337–353. doi:10.1016/j.jprot.2014.06.001
- Metz, E.C., Robles-Sikisaka, R. y Vacquier, V.D. (1998). Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10676–10681. doi:10.1073/pnas.95.18.10676
- Meyer, E., Aglyamova, G. V, Wang, S., Buchanan-Carter, J., Abrego, D., Colbourne, J. K., Willis, B.L. y Matz, M.V. (2009). Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFlx. *BMC Genomics*, 10(1), 219. doi:10.1186/1471-2164-10-219

- Micallef, G., Bickerdike, R., Reiff, C., Fernandes, J.M.O., Bowman, A.S. y Martin, S.A.M. (2012). Exploring the transcriptome of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) skin, a major defense organ. *Marine Biotechnology*, 14(5), 559–569. doi:10.1007/s10126-012-9447-2
- Miesfeld, R.L. (1999). Applied molecular genetics. Wiley-Liss. 293 pp.
- Milan, M., Coppe, A., Reinhardt, R., Cancela, L.M., Leite, R.B., Saavedra, C., Ciofi, C., Chelazzi, G., Patarnello, T., Bortoluzzi, S. y Bargelloni, L. (2011). Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics*, 12(1), 234. doi:10.1186/1471-2164-12-234
- Minkler, J. (1977). Chromosomes of the black abalone (*Haliotis cracherodii*). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(9), 1143-1143.
- Miyaki, K., Tabeta, O. y Kayano, H. (1997). Karyotypes of two species of abalones *Nordotis discus* and *N. gigantea*. *Fisheries Science*, 63(2), 179–180.
- Moran, A.L. y Manahan, D.T. (2003). Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. *Biological Bulletin*, 204(3), 270–277.
- Moran, G., Stokes, C., Thewes, S., Hube, B., Coleman, D.C. y Sullivan, D. (2004). Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology*, 150(10), 3363–3382. doi:10.1099/mic.0.27221-0
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J.V., Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B. y Figueras, A. (2012). Transcriptomics of in Vitro immune-stimulated hemocytes from the manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035009
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N. y Renault, T. (2010). Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(6), 937–45. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.028
- Morozova, O., Hirst, M. y Marra, M.A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 135–151. doi:10.1146/annurev-genom-082908-145957
- Morrison, R.N., Cooper, G.A., Koop, B.F., Rise, M.L., Bridle, A.R., Adams, M.B. y Nowak, B.F. (2006). Transcriptome profiling the gills of amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a role for tumor suppressor p53 in AGD pathogenesis? *Physiological Genomics*, 26(1), 15–34. doi:10.1152/physiolgenomics.00320.2005

- Morse, D. E., Duncan, H., Hooker, N. y Morse, A. (1977). Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, 196(4287), 298-300.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. y Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621–628. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516045>
- Munasinghe, H., Kang, H. S. y Lee, J. (2006). Analysis of digestive gland expressed sequence tag library from the disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(1), 96–106. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00012.x
- Nadala Jr, E. C. B. y Loh, P. C. (2000). Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods*, 84(2), 175-179.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38, 217-217.
- Naimi, A., Martinez, A.S., Specq, M.L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., y Sourdain, P. (2009). Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 152(2), 189–196. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.019
- Nature, (2013). Seven days. The news in brief. *Nature* 502, 414-415.
- Niu, J.Z., Dou, W., Ding, T.B., Yang, L.H., Shen, G.M. y Wang, J.J. (2012). Evaluation of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during development and abiotic stress in *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Molecular Biology Reports*, 39(5), 5841–9. doi:10.1007/s11033-011-1394-x
- Nolan, T., Hands, R.E. y Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–82. doi:10.1038/nprot.2006.236
- Norrander, J., Larsson, M., Ståhl, S., Höög, C. y Linck, R. (1998). Expression of ciliary tektins in brain and sensory development. *The Journal of neuroscience*, 18(21), 8912-8918. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 8912-8918.
- Nurrai, P., Poljaroen, J., Tinikul, Y., Cummins, S., Sretarugsa, P., Hanna, P., Wanichanon, C. y Sobhon, P. (2010a). The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta histochemica*, 112(6), 557-566.
- Nurrai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., y Wanichanon, C. (2010b). Stimulatory effects of egg-laying hormone and gonadotropin-releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 627-635.

- Okumura, S. I., Kinugawa, S., Fujimaki, A., Kawai, W., Maehata, H., Yoshioka, K., Yoneda, R. y Yamamori, K. (1999). Analysis of karyotype, chromosome banding, and nucleolus organizer region of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* (Archaeogastropoda: Haliotidae). *Journal of Shellfish Research*, 18, 605–609.
- Olsvik, P.A, Lie, K.K., Jordal, A.E.O., Nilsen, T.O. y Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6(1), 21. doi:10.1186/1471-2199-6-21
- Olsvik, P.A, Søfteland, L. y Lie, K.K. (2008). Selection of reference genes for qRT-PCR examination of wild populations of Atlantic cod *Gadus morhua*. *BMC Research Notes*, 1(1), 47. doi:10.1186/1756-0500-1-47
- Osada, M., Harata, M., Kishida, M. y Kijima, A. (2004). Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, *Patinopecten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca). *Molecular Reproduction and Development*, 67(3), 273–281. doi:10.1002/mrd.20020
- Panasophonkul, S., Apisawetakan, S., Cummins, S.F., York, P.S., Degnan, B.M., Hanna, P.J., Saitongdee, P., Sobhon, P. y Sretarugsa, P. (2009). Molecular characterization and analysis of a truncated serotonin receptor gene expressed in neural and reproductive tissues of abalone. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(5), 629–642. doi:10.1007/s00418-009-0555-7
- Pang, S.J., Zhang, Z.H., Bao, Y. y Gao, S.Q. (2006). Settling abalone veliger larvae in a free-swimming microalgal culture. *Aquaculture*, 258(1), 327–336. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.03.028
- Parchman, T.L., Geist, K.S., Grahnen, J.A., Benkman, C.W. y Buerkle, C.A. (2010). Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. *BMC Genomics*, 11(1), 180. doi:10.1186/1471-2164-11-180
- Pazos-Navarro, M., Dabauza, M., Correal, E., Hanson, K., Teakle, N., Real, D. y Nelson, M.N. (2011). Next generation DNA sequencing technology delivers valuable genetic markers for the genomic orphan legume species, *Bituminaria bituminosa*. *BMC Genetics*, 12(1), 104. doi:10.1186/1471-2156-12-104
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pierce, B.A. (2005). Genetics: A conceptual approach. Freeman and Company. Second edition. New York, USA. 720 pp.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197(1), 229-281. doi:10.1016/S0044-8486(01)00589-0
- Piferrer, F. (2009). Determinación y diferenciación sexual en los peces. En: M. Carrillo (Ed.). La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. 719 pp.

- Pirner, M.A. y Linck, R.W. (1994). Tektins are heterodimeric polymers in flagellar microtubules with axial periodicities matching the tubulin lattice. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31800–31806.
- Primrose, S. B. y Twyman, R. (2003). Principles of genome analysis and genomics. Wiley Publishing. Maiden, MA, USA. 263 pp.
- Pujolar, J.M. y Pogson, G.H. (2011). Positive Darwinian selection in gamete recognition proteins of *Strongylocentrotus* sea urchins. *Molecular Ecology*, 20(23), 4968–4982. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05336.x
- Qin, Z., Li, Y., Sun, D., Shao, M. y Zhang, Z. (2012). Cloning and expression analysis of the vitellogenin gene in the scallop *Chlamys farreri* and the effects of estradiol-17 β on its synthesis. *Invertebrate Biology*, 131(4), 312–321. doi:10.1111/ivb.12006
- Qiu, R., Sun, B., Fang, S., Sun, L. y Liu, X. (2013). Identification of normalization factors for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(2), 421-430.
- Raso, A. y Biassoni, R. (2014). Twenty Years of qPCR: A Mature Technology? *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1160, 1–3. doi:10.1007/978-1-4939-0733-5_1
- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J. y Zarkower, D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391(6668), 691–695. doi:10.1038/35618
- Rhee, S.Y., Wood, V., Dolinski, K. y Draghici, S. (2008). Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), 509–515. doi:10.1038/nrg2363
- Roberts, R.D., Revsbech, N.P. y Damgaard, L.R. (2007). Effect of water velocity and benthic diatom morphology on the water chemistry experienced by postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 745-750.
- Rogers-Bennett, L., Dondanville, R.F. y Kashiwada, J. (2004). Size specific fecundity of red abalone (*Haliotis rufescens*): Evidence for reproductive senescence? *Journal Of Shellfish Research*, 23, 553–560.
- Roy, A., Yan, W., Burns, K.H. y Matzuk, M.M. (2004). Tektin3 Encodes an evolutionarily conserved putative testicular microtubules-related protein expressed preferentially in male germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 67(3), 295–302. doi:10.1002/mrd.20025
- SAGARPA. (2006). Sustentabilidad y pesca responsable en México. 544 pp.
- SAGARPA. (2012). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. 385 pp.

- SAGARPA. (2013). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Recuperado en julio del 2014 de: http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/anuario_2013.
- Salem, M., Rexroad, C.E., Wang, J., Thorgaard, G.H. y Yao, J. (2010). Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC Genomics*, 11(1), 564. doi:10.1186/1471-2164-11-564
- Sarropoulou, E., Galindo-Villegas, J., García-Alcázar, A., Kasapidis, P. y Mulero, V. (2012). Characterization of European sea bass transcripts by RNA-Seq after oral vaccine against *V. anguillarum*. *Marine Biotechnology*, 14(5), 634–642. doi:10.1007/s10126-012-9466-z
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. y Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470. doi:10.1126/science.270.5235.467
- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M.R. y Altamira, B. (2010). Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573-576. doi:10.2983/035.029.0304
- Sedik, W. F., Dempsey, K. E., Meng, X. y Craft, J. A. (2010). Temporal expression of sex-specific genes in the mantle of the common mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Biology*, 157(3), 639–646. doi:10.1007/s00227-009-1349-0
- Shekhar, M. S., Azad, I. S. y Ravichandran, P. (2006). Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 261(4), 1122-1127.
- Shendure, J. y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. Recuperado de:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087>
- Shi, G., Zhang, Z., Feng, D., Xu, Y., Lu, Y., Wang, J., Jiang, J., Zhang, Z., Li, X. y Ning, G. (2010). Selection of reference genes for quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in concanavalin A-induced hepatitis model. *Analytical Biochemistry*, 401(1), 81–90. doi:10.1016/j.ab.2010.02.007
- Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M. y Berthe, F.C.J. (2008). Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(3), 202–7. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.006
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N.E., Heger, A. y Ponting, C.P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121–32. doi:10.1038/nrg3642

- Sirover, M.A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432(2), 159–84.
- Smith, C. A., McClive, P.J., Western, P.S., Reed, K.J. y Sinclair, A.H. (1999). Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402, 601–602. doi:10.1038/45127
- Soares, M. B., Bonaldo, M.F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L. y Efstratiadis, A. (1994). Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), 9228–9232.
- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, S.E. y Poomthong, T. (1999). Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia*, 25, 3–21.
- Spinsanti, G., Panti, C., Bucalossi, D., Marsili, L., Casini, S., Frati, F. y Fossi, M.C. (2008). Selection of reliable reference genes for qRT-PCR studies on cetacean fibroblast cultures exposed to OCs, PBDEs, and 17beta-estradiol. *Aquatic Toxicology*, 87(3), 178–86. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.018
- Sri Widada, J., Durand, S., Cambournac, I., Qian, D., Shi, Z., Dejonghe, E., Richard, E. y Bonami, J. R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 26(10), 583-590.
- Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K. y LeBlanc, G.A. (2010). Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, 19(1), 4-23. doi:10.1007/s10646-009-0397-z
- Suphamungmee, W., Weerachathanukul, W., Poomtong, T., Hanna, P. y Sobhon, P. (2008). Morphological and biochemical alterations of abalone testicular germ cells and spawned sperm and their fertilizing ability. *Marine Biotechnology*, 10(5), 593–601. doi:10.1007/s10126-008-9097-6
- Swanson, W.J., Aagaard, J.E., Vacquier, V.D., Monné, M., Sadat Al Hosseini, H. y Jovine, L. (2011). The molecular basis of sex: linking yeast to human. *Molecular Biology and Evolution*, 28(7), 1963–6. doi:10.1093/molbev/msr026
- Swanson, W.J., Clark, A.G., Waldrip-Dail, H.M., Wolfner, M.F. y Aquadro, C.F. (2001). Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7375–7379. doi:10.1073/pnas.131568198
- Swanson, W.J. y Vacquier, V.D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 137–144. doi:10.1038/nrg733

- Swanson, W.J., Nielsen, R. y Yang, Q. (2003). Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1), 18–20.
- Takai, Y., Sasaki, T. y Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 81(1), 153–208.
- Tang, Y., Yu, J., Xu, P., Li, J., Li, H. y Ren, H. (2012). Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 775–9. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.027
- Tave, D. (1999). Inbreeding and brood stock management. Fisheries Technical Paper. Roma, FAO. 122 pp.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. y Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1–5. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005
- Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M.B. y Zouros, E. (2008). Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution*, 62(4), 959–970. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00329.x
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A y Orlando, C. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 309(2), 293–300. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413463>
- Udvardi, M. K., Czechowski, T. y Scheible, W.R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7), 1736–7. doi:10.1105/tpc.108.061143
- Uki, N. y Kikuchi, S. (1984). Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*, 39(1), 247–261. doi:10.1016/0044-8486(84)90270-9
- Uki, N., Sugiura, M. y Watanabe, T. (1986). Dietary value of seaweeds occurring on the Pacific coast of Tohoku for growth of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52(2), 257–266. doi:10.2331/suisan.52.257
- Ule, J., Ule, A., Spencer, J., Williams, A., Hu, J.S., Cline, M., Wang, H., Clarck, T., Fraser, C., Ruggiu, M., Zeeberg, B.R., Kane, D., Weinstein, J.N., Blume, J. y Darnell, R.B. (2005). Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nature Genetics*, 37(8), 844–852. doi:10.1038/ng1610

- Urbatzka, R., Galante-Oliveira, S., Rocha, E., Castro, L.F.C. y Cunha, I. (2013). Normalization strategies for gene expression studies by real-time PCR in a marine fish species, *Scophthalmus maximus*. *Marine Genomics*, 10, 17–25. doi:10.1016/j.margen.2013.02.001
- Vacquier, V.D. (1998). Evolution of gamete recognition proteins. *Science*, 281(5385), 1995–1998. doi:10.1126/science.281.5385.1995
- Vacquier, V.D., Carner, K.R. y Stout, C.D. (1990). Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5792–5796. doi:10.1073/pnas.87.15.5792
- Vacquier, V.D. y Swanson, W.J. (2011). Selection in the rapid evolution of gamete recognition proteins in marine invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a002931. doi:10.1101/cshperspect.a002931
- Valenzuela-Muñoz, V., Bueno-Ibarra, M.A. y Gallardo-Escárate, C. (2014). Characterization of the transcriptomes of *Haliotis rufescens* reproductive tissues. *Aquaculture Research*, 45(6), 1026–1040. doi:10.1111/are.12044
- Van der Merwe, M. y Roodt-Wilding, R. (2008). Chromosome number of the south African abalone *Haliotis midae*. *African Journal of Marine Science*, 30(1), 195–198. doi:10.2989/ajms.2008.30.1.21.471
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034.
- Vieira, A. y Miller, D.J. (2006). Gamete interaction: Is it species-specific? *Molecular Reproduction and Development*, 73(11), 1422–1429. doi:10.1002/mrd.20542
- Von Schalburg, K.R., Rise, M.L., Cooper, G.A., Brown, G.D., Gibbs, A.R., Nelson, C.C., Davidson, W.S. y Koop, B.F. (2005). Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics*, 6(1), 126. doi:10.1186/1471-2164-6-126
- Wan, Q., Whang, I., Choi, C.Y., Lee, J.S. y Lee, J. (2011). Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 153(3), 259–68. doi:10.1016/j.cbpc.2010.11.009
- Werren, J. H. y Beukeboom, L.W. (1998). Sex determination, sex ratios and genetic conflict. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 233–61. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.233

- Willems, E., Leyns, L. y Vandesompele, J. (2008). Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical biochemistry*, 379(1), 127-129.
- Winkler, C., Hornung, U., Kondo, M., Neuner, C., Duschl, J., Shima, A. y Scharl, M. (2004). Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal dmrt genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mechanisms of Development*, 121(7), 997–1005. doi:10.1016/j.mod.2004.03.018
- Wynne, J. W., O'Sullivan, M.G., Cook, M.T., Stone, G., Nowak, B.F., Lovell, D.R. y Elliott, N.G. (2008). Transcriptome analyses of amoebic gill disease-affected atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues reveal localized host gene suppression. *Marine Biotechnology*, 10(4), 388–403. doi:10.1007/s10126-007-9075-4
- Xu, P., McIntyre, L.M., Scardina, J., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H. y Nichols, K.M. (2011). Transcriptome profiling of embryonic development rate in rainbow trout advanced backcross introgression lines. *Marine Biotechnology*, 13(2), 215–231. doi:10.1007/s10126-010-9283-1
- Yarus, M. (2011). Life from an RNA world, the ancestor within. Harvard University Press, 208 pp.
- Yin, Z., Ke, X., Huang, D., Gao, X., Voegelé, R.T., Kang, Z. y Huang, L. (2013). Validation of reference genes for gene expression analysis in *Valsa mali* var. mali using real-time quantitative PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1563–71. doi:10.1007/s11274-013-1320-6
- Yong-Kian, F., You-Zhu, W y Xiao-Xia, H. (2001). Distribution of sex steroid hormones and their receptors in the gonads and nervous system of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*). *Acta Zoologica Sinica*, 4, 008.
- York, P. S., Cummins, S. F., Degnan, S. M., Woodcroft, B. J. y Degnan, B. M. (2012). Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*. *Frontiers in zoology*, 9(1), 9.
- Yu, F.F., Wang, M.F., Zhou, L., Gui, J.F. y Yu, X.Y. (2011). Molecular Cloning and Expression Characterization of Dmrt2 in Akoya Pearl Oysters, *Pinctada martensii*. *Journal of Shellfish Research*, 30(2), 247–254. doi:10.2983/035.030.0208
- Yúfera, M., Halm, S., Beltran, S., Fusté, B., Planas, J.V. y Martínez-Rodríguez, G. (2012). Transcriptomic Characterization of the Larval Stage in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) by 454 Pyrosequencing. *Marine Biotechnology*, 14(4), 423–435.
- Yusa, Y. (2004). Brood sex ratio in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda : Ampullariidae) is determined genetically and not by environmental factors. *Journal of Molluscan Studies*, 70(3), 269–275. doi:10.1093/mollus/70.3.269
- Yusa, Y. (2007). Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca: an overview. *American Malacological Bulletin*, 23(1), 89–98.

- Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A. y Molés, G. (2009). Regulación y control hormonal del proceso reproductor de teleósteos. En: M. Carrillo (Ed.). La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. 719 pp.
- Zeng, V., Villanueva, K.E., Ewen-Campen, B.S., Alwes, F., Browne, W.E. y Extavour, C.G. (2011). De novo assembly and characterization of a maternal and developmental transcriptome for the emerging model crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *BMC Genomics*, 12(1), 581. doi:10.1186/1471-2164-12-581
- Zhang, E.F. y Qiu, G.F. (2010). A novel Dmrt gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Development Genes and Evolution*, 220(5-6), 151–159. doi:10.1007/s00427-010-0336-2
- Zhang, X., Mao, Y., Huang, Z., Qu, M., Chen, J., Ding, S., Hong, J y Sun, T. (2012). Transcriptome analysis of the *Octopus vulgaris* central nervous system. *PloS one*, 7(6), e40320.
- Zhang, N., Xu, F. y Guo, X. (2014). Genomic analysis of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc. *Genes, Genomes and Genetics*, 1–36. doi:10.1534/g3.114.013904
- Zheng, W.J. y Sun, L. (2011). Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 30(2), 638–45.
- Zheng, H., Zhang, Q., Liu, H., Liu, W., Sun, Z., Li, S. y Zhang, T. (2012). Cloning and expression of vitellogenin (Vg) gene and its correlations with total carotenoids content and total antioxidant capacity in noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae). *Aquaculture*, 366, 46–53. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.08.031
- Zhong, Q., Zhang, Q., Wang, Z., Qi, J., Chen, Y., Li, S., Sun, Y., Li, C. y Lan, X. (2008). Expression profiling and validation of potential reference genes during *Paralichthys olivaceus* embryogenesis. *Marine Biotechnology*, 10(3), 310–8.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. y Tandler, A. (1995). Gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). En: N.R. Bromage y R.J. Roberts (Eds.). Broodstock management and egg and larval quality. Oxford: Blackwell Science, pp. 94–117.

8. Anexos

Anexo 1. Extracción de RNA total (Matz, 2002) y visualización en gel desnaturalizante (Sambrook *et al.*, 2001).

1. Disolver el tejido en solución D. La máxima cantidad de tejido a usar debe ser equivalente al 20% del volumen de la solución D. Usar nitrógeno líquido o un tip de pipeta con la punta cortada haciendo movimientos hacia arriba y abajo. 2-3 min.
2. Centrifugar a máxima velocidad por 5 min a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a dos tubos nuevos en partes iguales.
3. Colocar el tubo en hielo y agregar un volumen equivalente de fenol saturado y mezcle. Adicione 20% del volumen total de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y dar vortex. Se formarán dos fases. Dar vortex de 3 a 4 veces más con intervalos de 1 minuto entre cada paso y ubicando el tubo en hielo. Centrifugar a máxima velocidad por 30 min a 4°C. Recupere la fase acuosa superficial.
4. Repetir el paso 3.
5. Adicione 1 μL de coprecipitante (glucógeno), luego adicione un volumen igual de etanol al 96% y mezclar. Centrifugar inmediatamente a máxima velocidad a temperatura ambiente por 10 min. Lavar el precipitado con 0.5 mL de etanol al 80%. Secar el precipitado brevemente (hasta que no se vea líquido).
6. Disolver el precipitado en 100 μL de agua miliQ. Si el precipitado no puede ser disuelto completamente, remover los residuos centrifugando la muestra a máxima velocidad por 3 min a temperatura ambiente. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo, adicione un volumen equivalente de LiCl 12 M y enfríe la solución a -20°C por 30 min. Centrifugar a máxima velocidad por 15 min a temperatura ambiente. Lavar el pellet con 0.5 mL de etanol al 80%, y secar como se hizo previamente.

7. Disolver el precipitado en 40 μ L de agua miliQ.
8. Incubar el RNA de 5 a 10 min a 60°C para asegurar la completa solubilización y proceda inmediatamente a efectuar las lecturas en espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Razones 260/280 deben estar entre 1.8 y 2.0.
9. Estimar la calidad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa/formaldehído desnaturalizante (Sambrook *et al.*, 2001).
10. Para almacenar el RNA aislado, Agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol al 96%. Mezclar fuertemente. La muestra puede ser almacenada por años a -20°C.
11. Para recuperar el RNA total almacenado seguir los siguientes pasos:
 - Agregar un volumen de etanol frío al 96-100%. Mezclar
 - Centrifugar a máxima velocidad por 30 min a 4°C
 - Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 80%
 - Centrifugar entre 4,500 y 5,900 *g* (7,000 y 8,000 rpm) por 8 min a 4°C
 - Descartar cuidadosamente el sobrenadante
 - Resuspender el precipitado en agua libre de RNasas

Reactivos:

Generales:

- ✓ Fenol saturado con 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA (Sigma Cat. N° P4557)*
- ✓ Cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) (Sigma Cat. N° CO549)
- ✓ Glucógeno (Sigma Cat. N° G1767)
- ✓ Etanol al 96%
- ✓ Etanol al 80%.
- ✓ Agua miliQ (agua libre de RNasas y DNasas)
- ✓ LiCl 12 M (Sigma Cat. N° L4408, P.M=42.39 g mol⁻¹)

- ✓ Acetato de sodio 3M (Sigma Cat. N° S2889, P.M=82.03 g mol⁻¹)
- ✓ Hielo

* En caso de no contar con fenol saturado, usar fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (Sigma Cat. N° 77617).

Solución D:

- ✓ Solución de Tiocianato de guanidina 6M (Sigma Cat. N° 509083)
- ✓ Citrato disódico o citrato trisódico (Sigma Cat. N° S1804, P.M=294.10 g mol⁻¹)
- ✓ B-mercaptoetanol (Sigma Cat. N° M7522, P.M=78.13 g/mol, $\gamma = 1.115 \text{ g mL}^{-1}$)

Solución D: Tiocianato de guanidina 4M, citrato disódico 30 mM, β -mercaptoetanol 30 mM, pH 7.0-7.5.

Por ejemplo, para preparar 50 mL de solución D tenemos:

$$\text{Tiocianato de guanidina: } V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} = \frac{4M \times 50mL}{6M} = 33.33mL$$

$$\text{Citrato trisódico: } 50mL \times \frac{30mmoles}{1000mL} \times \frac{294.10mg}{1mmol} \times \frac{1g}{1000mg} = 0.44g$$

$$\text{B-mercaptoetanol: } 50mL \times \frac{30mmoles}{1000mL} \times \frac{78.13mg}{1mmol} \times \frac{1g}{1000mg} \times \frac{1.115mL}{1g} = 0.13mL$$

Mezclar los reactivos y aforar a 50 mL con agua libre de RNasas.

Normalmente, la solución final queda al pH indicado (7.0-7.5). Cuando suceda lo contrario, asegúrese que el pHmetro haya sido calibrado o que los reactivos utilizados no hayan caducado.

Gel de agarosa/formaldehído desnaturalizante:

a. Composición de amortiguadores :

Para el gel de agarosa formaldehído 10X:

- ✓ 200 mM de ácido 3-N-morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma Cat. N° M1254, P.M=209.26 g mol⁻¹)
 - ✓ 50 mM de acetato de sodio
 - ✓ 10 mM EDTA (Sigma Cat. N° E9884, P.M=292.94 g mol⁻¹)
- Ajustar el pH a 7.0 con NaOH

Para correr el gel de agarosa formaldehído 1X:

- ✓ 100 mL del amortiguador para el gel de agarosa formaldehído 10X
- ✓ 20 mL de formol/formaldehído 37%
- ✓ 880 mL de agua libre de RNasas

De carga (5X) para el RNA:

- ✓ 16 µL de solución de azul de bromofenol acuoso saturado
- ✓ 80 µL de EDTA 500 mM, pH 8.0
- ✓ 720 µL de formol/formaldehído 37%
- ✓ 2 mL de glicerol 100% (Sigma Cat. N° G5516)
- ✓ 3048 µL de formamida (Sigma Cat. N° 221198)
- ✓ 4 mL del buffer para el gel de agarosa formaldehído 10X
- ✓ Agua libre de RNasas hasta completar 10 mL

Este amortiguador es estable por aproximadamente 3 meses a 4°C

b. Preparaciones:

Gel de agarosa formaldehído 1.2% (Para un volumen de 100 mL):

- ✓ 1.2 g de agarosa
- ✓ 10 mL del amortiguador del gel de agarosa formaldehído 10X
- ✓ Agregar agua libre de RNasas hasta completar 100 mL
- ✓ Calentar la mezcla en horno microondas para derretir la agarosa. Dejar enfriar a 65°C, agregar 1.8 mL de formol/formaldehído 37% y 1 µL de la solución stock de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹). Mezclar fuertemente y cargar en el soporte del gel. Antes de correr el gel, equilibrar en el amortiguador para el corrido del gel de agarosa formaldehído 1X al menos por 30 min.

Preparación de muestra de RNA:

- ✓ Agregar 1 volumen del amortiguador de carga 5X por 4 volúmenes de la muestra de RNA (por ejemplo, 1 µL de buffer de carga y 4 µL de RNA) y mezclar.
- ✓ Incubar por 3 a 5 min a 65°C, enfriar en hielo, y cargar en el gel de agarosa formaldehído equilibrado.

Anexo 2. Digestión de DNA contaminante con RNase-Free DNase Set (Cat. N° 79254, Qiagen).

1. Disolver la DNasa I liofilizada (1,500 unidades Kunitz) en 550 μ L de agua libre de RNasas que viene con el kit. Para evitar la pérdida de DNasa I, no abra el vial. Inyectar agua libre de RNasas en el vial utilizando una aguja y una jeringa. Mezclar suavemente invirtiendo el vial. **No agitar con vórtex.**

2. Para el almacenamiento a largo plazo de la DNasa I reconstituida, dividir el stock en alícuotas de un solo uso y almacenar a -20°C durante un máximo de 9 meses. Alícuotas descongeladas se pueden almacenar a $2-8^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 6 semanas. **No vuelva a congelar las alícuotas después de la descongelación.**

3. Mezclar en un tubo de microcentrífuga lo siguiente:
 - ≤ 87.5 μ L de solución de RNA (contaminada con DNA)
 - 10 μ L de amortiguador RDD
 - 2.50 μ L de DNasa I

Llevar el volumen a 100 μ L con agua libre de RNasas

4. Incubar por 10 min a $20-25^{\circ}\text{C}$

5. Limpiar con el kit Rneasy Min Elute CleanUp

Anexo 3. Limpieza de RNA total con el kit RNeasy Min Elute CleanUp (Cat. N° 74204, Qiagen).

1. Ajustar el volumen de la muestra a 100 μ L con agua libre de RNasa. Adicionar 350 μ L de buffer RLT, y mezclar bien.

Opcional: Adicionar β -mercaptoetanol (o DTT) a buffer RLT antes de usar. Si agrega β -mercaptoetanol se recomienda preparar sólo la cantidad que se requiere en el momento debido a que en estas condiciones la solución dura un mes.

2. Agregar 250 μ L de etanol 96-100% al RNA diluido y mezclar bien por pipeteo. **NO CENTRIFUGAR**. Proceder inmediatamente al paso 3.
3. Transferir la muestra (700 μ L) a una columna RNeasy MinElute ubicada en un tubo de colección de 2 mL. Cerrar suavemente, y centrifugar por 15 segundos a ≥ 8000 g ($\geq 10\,000$ rpm). Descargar el sobrenadante.

Para muestras >700 μ L, transferir la muestra restante (hasta 700 μ L) y repetir la centrifugación. Descargar el sobrenadante.

4. Ubicar la columna de RNeasy MinElute en un nuevo tubo de colección. Adicionar 500 μ L de buffer RPE a la columna. Cerrar suavemente, y centrifugar por 15 segundos a ≥ 8000 g ($\geq 10\,000$ rpm) para lavar la membrana de la columna. Descargar el sobrenadante. Reusar el tubo de colección en el siguiente paso.

El buffer RPE es suministrado en forma concentrada. Asegúrese que se le agregó etanol al 96-100% antes de usar.

5. Agregar 500 μ L de etanol 80% a columna RNeasy MinElute. Cerrar suavemente, y centrifugar 2 min a ≥ 8000 g ($\geq 10\,000$ rpm) para lavar la membrana de la columna. Descargar el sobrenadante y el tubo de colección.

Después de la centrifugación, remover cuidadosamente la columna RNeasy del tubo de colección de modo que la columna no contacte el sobrenadante.

6. Ubicar la columna RNeasy en un nuevo tubo de colección. Abrir la tapa de la columna, y centrifugar a máxima velocidad por 5 min. Descargar el sobrenadante y el tubo de colección.

Es importante secar la membrana de la columna desde que el etanol residual puede interferir con reacciones posteriores. Centrifugar con las tapas abiertas asegura que ningún residuo de etanol este presente durante la elución de RNA.

7. Ubicar la columna RNeasy MinElute en un nuevo tubo de colección de 1.5 mL. Agregar 14 μ L de agua libre de RNasas directamente al centro de la membrana de la columna. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar por 1 min a máxima velocidad para eluir el RNA.

La cantidad mínima de agua libre de RNasas a agregar es de 10 μ L, no usar menos porque la membrana no se hidratará suficientemente y se reducirá la producción de RNA.

Anexo 4. Síntesis de cDNA con el kit Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Cat. N° 11904-018, Invitrogen).

El siguiente procedimiento está diseñado para convertir desde 1 pg hasta 5 µg de RNA total o desde 1 pg hasta 500 ng de poly(A)⁺ RNA en cDNA de primera cadena.

1. Mezclar y centrifugar brevemente cada uno de los componentes antes de usar.
2. Combine lo siguiente en un tubo de 0.2 o 0.5 mL:

Componente	Cantidad
RNA total (hasta 5 µg)	n µL
Oligo-dT ₂₀ 50 µM	1 µL
Hexámeros aleatorios 50 ng µL ⁻¹ *	2 µL
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µL
Agua tratada con DEPC	Para completar 10 µL

* En este caso estamos usando una concentración equimolar respecto a los oligo-dT₂₀. Como se hará una reacción final de 20 µL, la concentración final de los oligo-dT₂₀ será de 2.5 µM (50 µM x 1 µL 20 µL⁻¹). Los hexámeros tienen una concentración de 50 ng µL⁻¹ que equivale aproximadamente a 25 µM.

3. Incubar a 65°C por 5 min, luego ubicar en hielo por al menos 1min.
4. Preparar la siguiente mezcla de síntesis de cDNA, **AGREGANDO CADA UNO DE LOS COMPONENTES EN EL ORDEN INDICADO:**

Componente	1 Rxn	10 Rxn
RT buffer 10X	2 µL	20 µL
MgCl ₂ 25 mM	4 µL	40 µL
DTT 0.1 M	2 µL	20 µL
RNaseOut (40 U µL ⁻¹)	1 µL	10 µL
Superscript III RT (200 U µL ⁻¹)	1µL	10 µL

5. Agregar 10 μL de la mezcla de síntesis de cDNA a cada tubo de la mezcla RNA/iniciadores, mezclar suavemente, y colectar por breve centrifugación. Incubar como sigue en un termociclador:
 - 10 min a 25°C, 50 min a 50°C, 5 min a 85°C y 2 min a 4°C
6. Colectar las reacciones por breve centrifugación. Agregar 1 μL de RNasa H a cada tubo e incubar por 20 min a 37°C.
7. La reacción de síntesis de cDNA puede almacenarse a -20°C o usarse inmediatamente para PCR.

Control (+) y (-):

1. Diluir el RNA HeLa hasta 100 pg μL^{-1} con agua tratada con DEPC.
2. Preparar la mezcla de RNA/iniciadores en un tubo de 0.2 o 0.5 mL como sigue:

Componente	Control RT (+)	Control RT (-)
RNA Total HeLa diluido (100 pg μL^{-1})	1 μL	1 μL
Oligo_dT ₂₀	1 μL	1 μL
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 μL	1 μL
Agua tratad con DEPC	7 μL	7 μL

3. Incubar las muestras a 65°C por 5 min, luego ubicar en hielo por al menos 1 min. Colectar por breve centrifugación y agregar lo siguiente:

Componente	Control RT (+)	Control RT (-)
Buffer RT 10X	2 μL	2 μL
MgCl ₂ 25 mM	4 μL	4 μL
DTT 0.1 M	2 μL	2 μL
RNasaOUT	1 μL	1 μL
Superscript III RT (200 U μL^{-1})	1 μL	-
Agua tratada con DEPC	-	1 μL

4. Mezclar suavemente y colectar las reacciones por breve centrifugación.

5. Incubar a 50°C por 50 min.
6. Terminar las reacciones a 85°C por 5 min y enfriar a 4°C por 2 min.
7. Colectar las reacciones por breve centrifugación. Agregar 1 µL de RNasa H a cada tubo e incubar por 20 min a 37°C.
8. Preparar una mezcla de PCR para cada uno de los controles de la misma forma que se hizo para las muestras objetivo del estudio, excepto que use los iniciadores control sense primer 10 µM y control antisense primer 10 µM que vienen con el kit.
9. Mezclar los contenidos del tubo. Centrifugar brevemente para colectar los componentes de la reacción.
10. Efectúe la PCR teniendo en cuenta que la temperatura de alineamiento para los iniciadores sense y antisense es de 55°C.
11. Analizar entre 3 y 5µL de cada una de las muestras, usando electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Una banda de 353 pb debería ser visible para el control RT(+). Ninguna banda debe ser visible para el control RT(-).

Anexo 5. qPCR con el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Cat. N° 204072, Qiagen).

1. Descongelar la mezcla maestra 2x Rotor Gene SYBR Green PCR, el DNA molde o cDNA, iniciadores y agua libre de RNasas. Mezclar las soluciones individualmente.
2. Para un volumen de reacción de 25 μL preparar la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Volumen/reacción	[Final]
Mezcla 2x Rotor Gene SYBR Green PCR	12.5 μL	1x
Iniciador F (10 μM)	1-2 μL	0.25-0.50 μM
Iniciador R (10 μM)	1-2 μL	0.25-0.50 μM
DNA molde o cDNA (agregar en paso 4)	2 – 4 μL	≤ 100 ng reacción ⁻¹
Agua libre de RNasa	Variable	
Volumen total de reacción	25 μL	

3. Mezclar con pipeta, centrifugar brevemente y dispense en tubos de PCR.
4. Agregar el DNA molde o cDNA (≤ 100 ng reacción⁻¹) en los tubos individuales de PCR conteniendo la mezcla de reacción. En este estudio, para volúmenes de reacción entre 15 y 25 μL se trabajó con cantidades de cDNA entre 10 y 20 ng reacción⁻¹.
5. Programar el termociclador como se indica a continuación y en las figuras A1 y A2:

Paso	Tiempo	T(°C)	Comentarios
Activación	5 min	95	Hot Star es activada en este paso, por lo que es indispensable mantener la temperatura
Ciclado de 2 pasos			
Desnaturalización	5 s	95	
Alineamiento/extensión	10 s	60*	Colección de datos de fluorescencia
N° de ciclos	35-40		N° ciclos depende de cantidad de DNA

* Esta temperatura también se debe usar para juegos de iniciadores con una T_m inferior a 60°C, pero se recomienda optimizar.

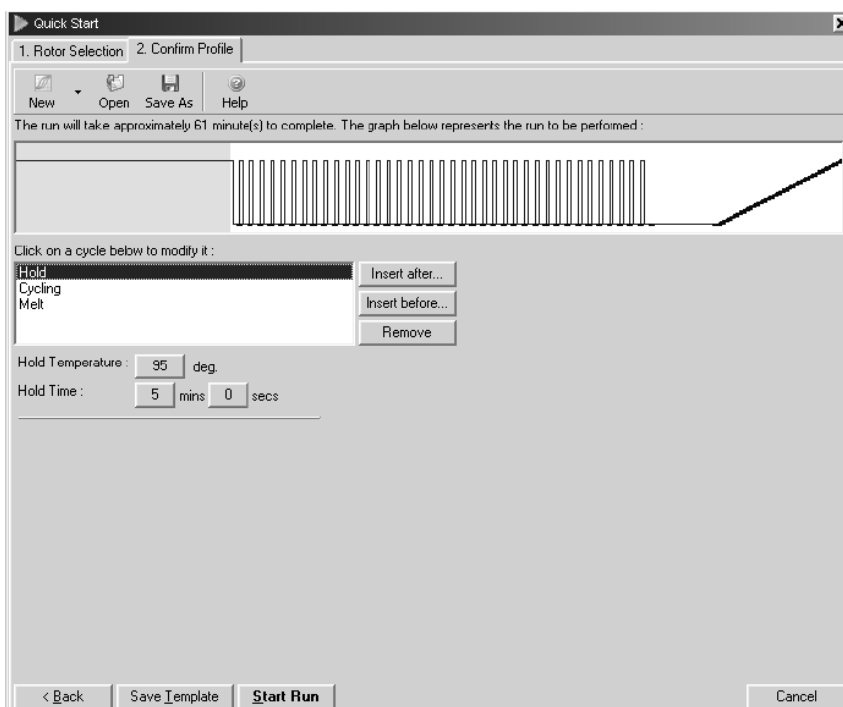


Figura A1. Paso de activación inicial de la PCR. La PCR requiere una activación inicial de 95°C para activar la DNA polimerasa HotStar Taq Plus.

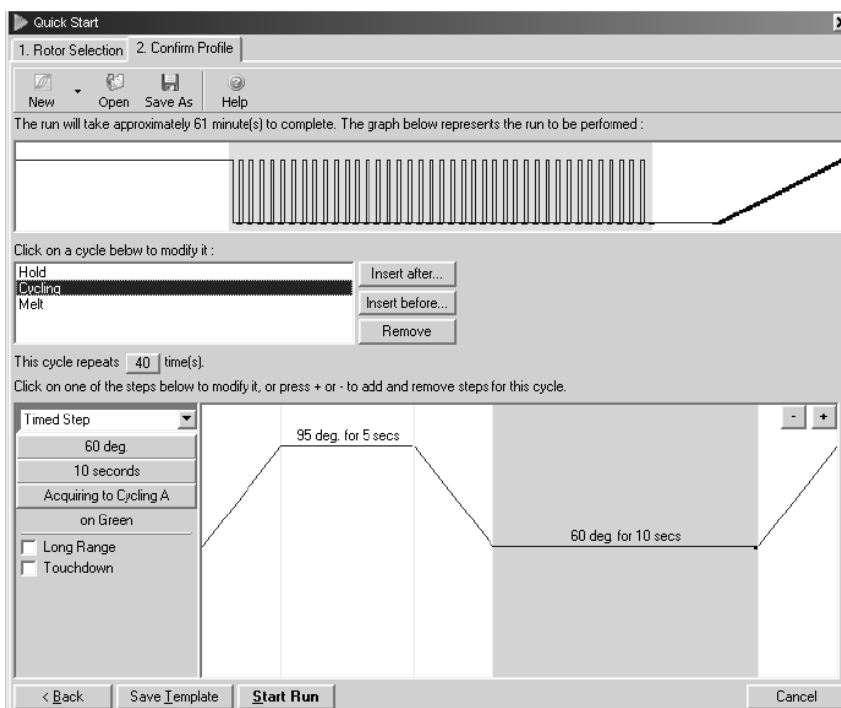


Figura A2. Ciclo de dos pasos. La PCR requiere de 35-40 ciclos. Cada ciclo está compuesto de dos pasos: 95°C por 5 segundos (desnaturalización) y 60°C por 10 segundos (alineamiento/extensión)

- Realizar el análisis de la curva de fusión del producto de PCR para verificar su especificidad e identidad (Figura A3).

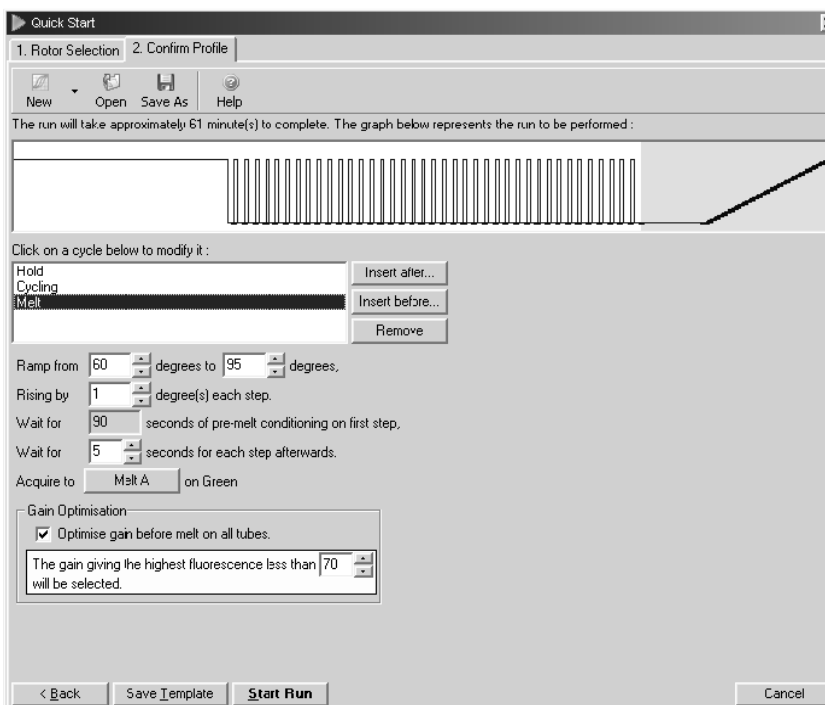


Figura A3. Análisis de la curva de fusión. Después de que la PCR ha finalizado, un análisis de la curva de fusión debe realizarse para verificar la especificidad de la reacción.

- Después de programar el paso fusión (melting), insertar un segundo hold a 40°C por 30 segundos. Esto se hace para enfriar el equipo antes de abrirlo para retirar las muestras al finalizar la corrida.
- Después de definir las condiciones de amplificación y los canales a utilizar, regresar a la ventana donde aparecen las opciones “edit profile” y “gain optimization” (Figura A4):

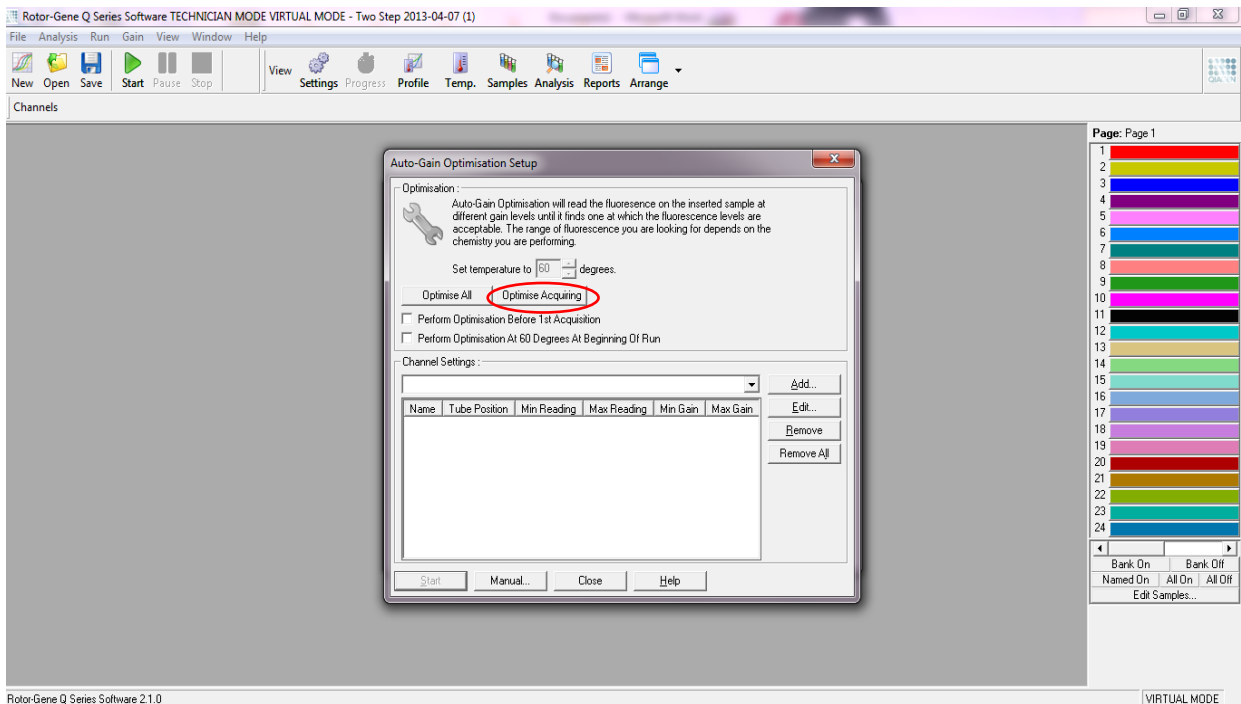
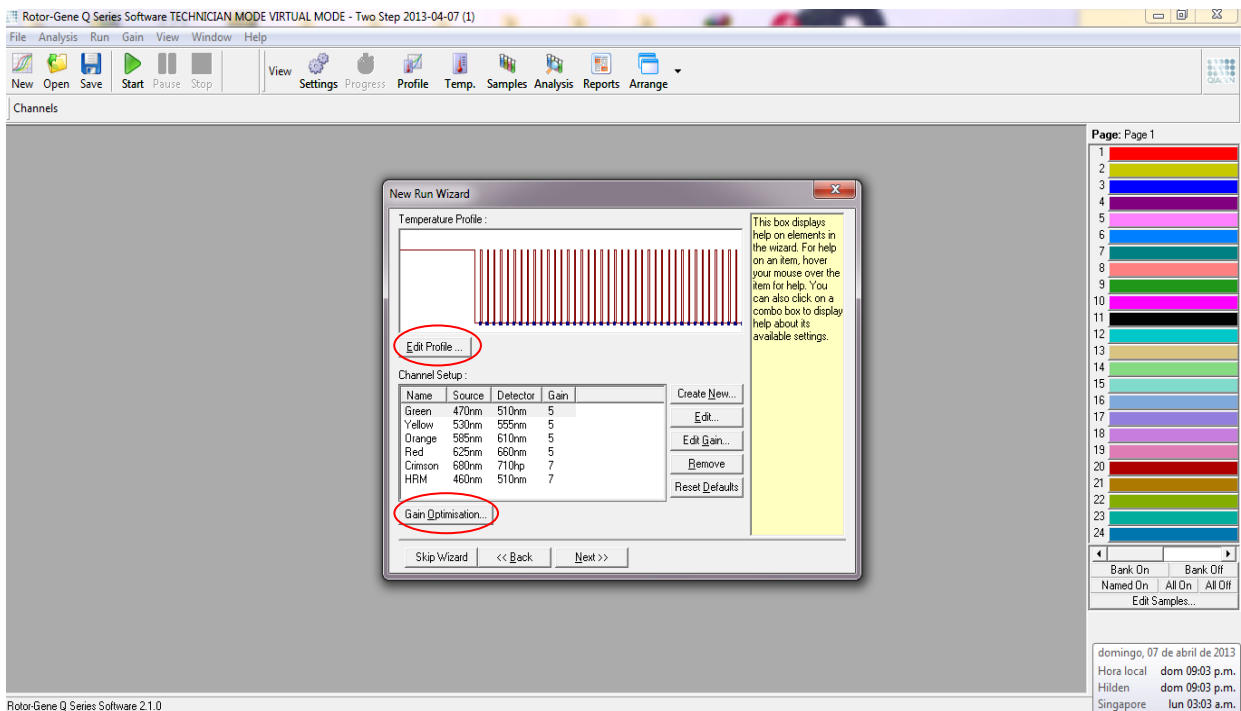


Figura A4 y A5. Opciones edit profile y gain optimization. Aquí se necesita seleccionar el canal en el que trabaja el SYBR Green I que es el verde (Green)

9. Después de seleccionar gain optimization, seleccionar los parámetros en el orden indicado (círculo rojo, Figura A5 y A6):

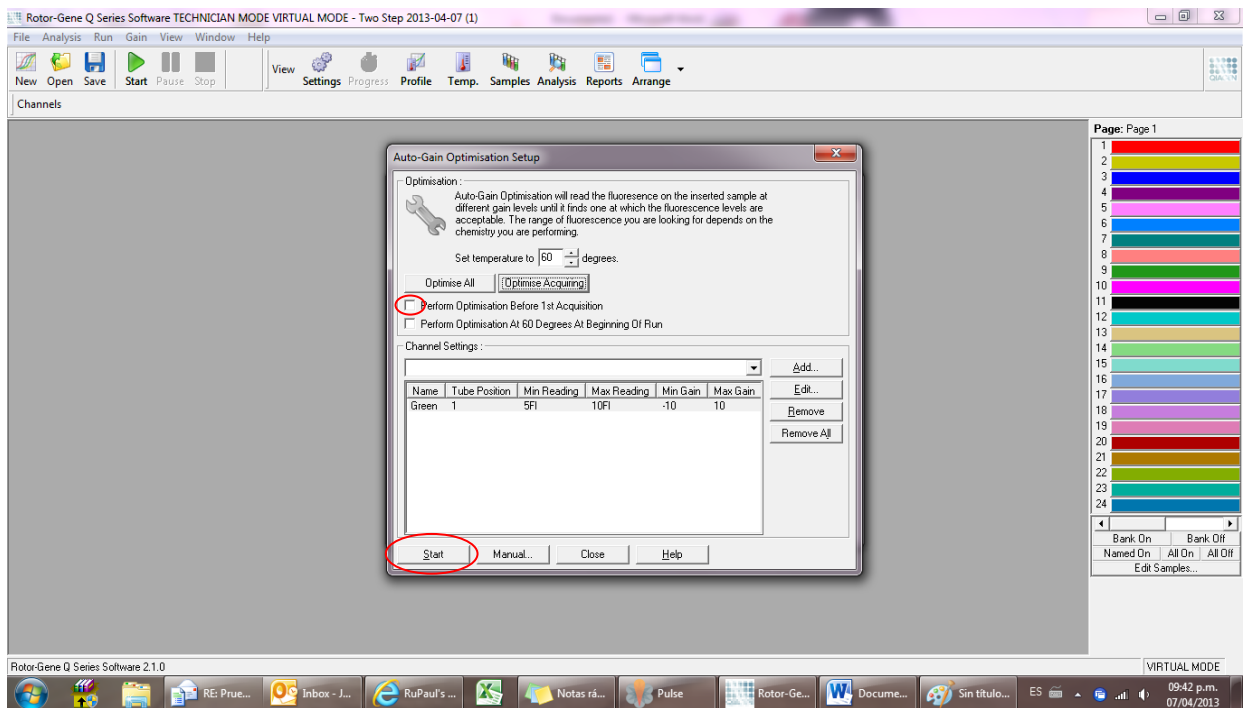
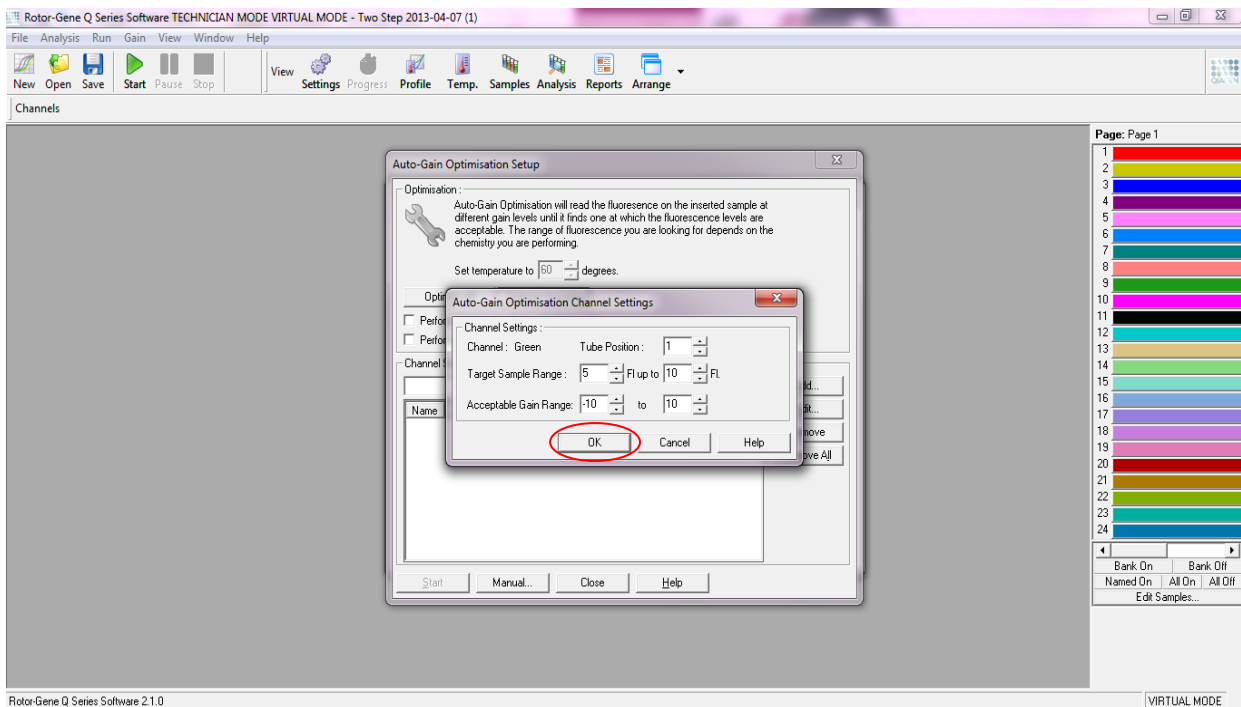


Figura A5 y A6. Opciones edit profile y gain optimization. Aquí se necesita seleccionar el canal en el que trabaja el SYBR Green I que es el verde (Green)

10. Dar clic en start para iniciar corrida.