



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

**BIOLOGIAKO GRADUA
GRADO EN BIOLOGIA
DEGREE IN BIOLOGY**

**GRADU AMAIERAKO LANA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
BACHELOR'S THESIS**

**DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE
EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL
TRANSCRIPTOMA MITOCONDRIAL EN LA
ALMEJA JAPONESA *RUDITAPES
PHILIPPINARUM***

MARÍA CALLEJA FELIPE

Leioa, 2013ko uztaila/ Julio 2013/July 2013

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Resumen

Muchos bivalvos tienen un sistema de herencia mitocondrial que exceptúa la norma general de herencia maternal (SMI). En la almeja *Ruditapes philippinarum*, entre otras, se da la herencia uniparental doble (DUI) de manera que coexisten dos linajes de ADN mitocondrial: el linaje paternal (M) que se transmite de padres a hijos a través del espermatozoide, y el linaje maternal (F) que se transmite de madres a toda la descendencia a través de los óvulos. De esta manera, las hembras serán homoplásmicas para el genoma F y los machos heteroplásmicos, mostrando principalmente genoma M en tejidos somáticos, y genoma F solo en tejidos somáticos en menor medida. Se ha propuesto que el sistema DUI evolucionó del SMI, y que está regulado por factores genéticos nucleares codificados por la hembra. En el contexto de un estudio sobre las características de este sistema en *R. philippinarum* se ha secuenciado el transcriptoma en muestras de varios tejidos de individuos adultos y las secuencias obtenidas se han alineado a genomas mitocondriales de referencia M y F. Sobre la base de estos resultados se han calculado ratios que reflejan la expresión de ambos genomas en los diferentes tejidos de los adultos, diferenciando entre machos y hembras. Dichos ratios han sido ponderados con las proporciones corporales de 10 individuos adultos que fueron diseccionados con esa finalidad. Se confirman los patrones de distribución de ambos genomas, aunque las hembras han resultado ser heteroplásmicas con existencia de genoma M en sus tejidos somáticos y los machos heteroplásmicos en todos sus tejidos incluyendo la gónada. Dado que el sexo de *R. philippinarum* solo se puede determinar mediante métodos estándares cuando los individuos presentan gónadas, una aplicación de estos resultados ha sido la puesta a punto de un sistema de determinación del sexo en individuos sexualmente inmaduros, diferenciando entre individuos de crecimiento bajo (S) y alto (F). El método diseñado para determinar el sexo de los individuos juveniles ha resultado exitoso y en consecuencia se ha podido calcular la ratio sexual de los individuos S con un resultado de 0,39.

Abstract

Many bivalves species have a mitochondrial inheritance system which excludes the general norm of maternal inheritance (SMI). In the *Ruditapes philippinarum* clam's case, among others, the double uniparental inheritance takes place (DUI), so that two lineages of mitochondrial DNA coexist: the paternal lineage (M), which is transmitted from father to son through the sperm, and the maternal lineage (F) which is transmitted from mother to the whole offspring through the eggs. In this way, females will be homoplasmic for the F genome, while males will be heteroplasmic, showing the M genome in somatic tissues mainly, while they show the F genome only in somatic tissues, but to a lesser extent. It has been hypothesized that the DUI system evolved from the SMI, and that it is regulated by nuclear genetic factors encoded by the female. In the context of a study on characteristics of this system in *R. philippinarum*, transcriptome was sequenced in samples of various tissues of adult individuals and the sequences obtained were mapped with the reference mitochondrial genomes M and F. On the basis of these results, ratios comparing the expression of both genomes in different adult tissues have been calculated, differentiating between males and females. These ratios were then standardized using the body proportions of 10 individuals dissected for this purpose. Here we assume the distribution patterns of both genomes, even if the females turned out to be heteroplasmic with the presence of both genomes in their tissues, and males, though heteroplasmic, have shown traces of F genome in their gonads. Since the sex of *R. philippinarum* can only be determined by standar methods when individual show gonads, an aplication of these results have been the development of a sex-determination system in immature specimens, differentiating between slow grower (S) and fast grower individuals (F). The designed method to establish the juvenil's sex have turned to be successful and consequently it was possible to calculate the sex ratio of the S individual, with a score of 0,39.

Introducción

El ADN mitocondrial es el único genoma extranuclear en el citoplasma de los animales. La mayoría de los genomas mitocondriales de los metazoos son moléculas circulares de aproximadamente unos 14-42kb (Yuan *et al.*, 2012). El genoma mitocondrial típico contiene los mismos 37 genes: 13 genes para subunidades proteicas de encimas de oxidación fosforilativa (atp6, atp8, cox1-3, cob, nad1-6 y nad4l), dos para RNA ribosómico (subunidades grande y pequeña), y 22 para RNA de transferencia, los cuales son necesarios para la transcripción de los 13 genes mencionados (Yuan *et al.*, 2012).

En general hay pocas secuencias intergénicas, exceptuando la región no codificante que parece ser que contiene elementos que controlan el inicio de replicación y transcripción (Yuan *et al.*, 2012). El hecho de que una célula contenga un elevado número de mitocondrias y sean homoplásmicas (Breton *et al.*, 2011), que éstas no sufran recombinación, la ausencia de intrones, además de un ratio evolutivo alto y el hecho de que su herencia sea maternal hacen del ADN mitocondrial una herramienta perfecta para estudios comparativos y evolutivos, tanto en identificación de especies, como en genética de poblaciones o relaciones filogenéticas (Breton *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012).

La disposición de los genes del ADN mitocondrial no ha sufrido muchos cambios. Sin embargo, los moluscos, y especialmente los bivalvos, muestra una gran variación en la disposición de los genes. La subclase Heterodonta ha resultado ser hasta ahora el grupo mas diverso entre los bivalvos. A su vez, este grupo incluye algunos de los grupos de mayor importancia económica (almejas, berberechos y navajas) y los que mayor importancia ecológica muestran en la comunidad trófica infaunal (Yuan *et al.*, 2012). El orden Veneroida es uno de esos grupos e incluye a la especie *Venerupis philippinarum* (A. Adams y Reeve, 1850) (también *Ruditapes philippinarum*).

Ruditapes philippinarum habita en latitudes bajas, de subtropicales a boreales. Hoy en día es una especie de gran importancia económica debido a su masiva producción en diferentes países donde se ha introducido y establecido de forma permanente. Los principales países productores son los Estados Unidos de América, Corea, China, Taiwan, y diferentes regiones europeas (Goulletquer, P., 2005). Fue introducida en las costas del Pacífico de Norte América en la década de 1930, junto con la semilla del ostión japonés. Desde entonces la distribución de la almeja japonesa ha aumentado considerablemente. Esta especie fue introducida en Europa en 1972. Debido a la sobrepesca y los rendimientos irregulares de almejas europeas como *Ruditapes decussatus*, se fomentó la introducción de *R. philippinarum* a las costas europeas. Reino Unido, Portugal, Irlanda, España e Italia son hoy en día los principales países Europeos productores de esta almeja (Goulletquer, P., 2005).

La reproducción natural de *R. philippinarum* aumentó y en consecuencia la expansión geográfica de las poblaciones naturales incrementó. La almeja japonesa resultó ser más resistente y de crecimiento más rápido que la especie nativa *R. decussatus* (Goulletquer, P., 2005). Es por ello que hoy en día son las poblaciones de *R. philippinarum* las mayores

responsables de la producción acuícola de Europa. La producción mundial ha aumentado de manera increíble en los últimos años. Según estadísticas de la FAO- Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Services, la producción global del año 2000 fue de aproximadamente 1,5 millones de toneladas. Diez años después, en 2010, la producción incrementó hasta el punto de llegar a 3,6 millones de toneladas.

Sistema DUI

De forma general, el genoma mitocondrial se hereda a través de un solo parental. Aunque se conocen especies que rompen esta norma, la mayoría de ellas son especies en las que predomina la reproducción asexual (Theologidis *et al.*, 2007). En la mayoría de los metazoos la herencia de las mitocondrias se da estrictamente de forma maternal (SMI, Strict Maternal Inheritance), siendo las mitocondrias del esperma, excluidas o degradadas (en mamíferos, las mitocondrias masculinas son degradadas por medio de ubiquitinización (Ghiselli *et al.*, 2012)). Sin embargo, se ha visto que en algunos bivalvos la transmisión puede ser tanto maternal como paternal, de manera que existen dos linajes: el linaje transmitido a través de los óvulos (tipo F) y el que se transmite a través del esperma (tipo M). En estas especies la transmisión del ADN mitocondrial es biparental y los dos genomas han llegado a mostrar hasta un 52% de divergencia (Milani *et al.*, 2011). Sin embargo, el genoma mitocondrial femenino se transmite a través de la línea femenina (maternalmente) y el genoma masculino a través de la línea masculina (paternalmente), por lo que la regla general de uniparentalidad no cambia. Es por esto que este sistema se conoce como herencia uniparental doble (DUI, Doubly Uniparental Inheritance) (Breton *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2010; Breton *et al.*, 2011). El sistema DUI ocurre, entre otros, en los mejillones marinos (orden Mytiloidea), mejillones de agua dulce (superfamilia Unionoidea) y almejas marinas (orden Veneroidea). En las especies de las familias Donacidae (Theologidis *et al.*, 2007), Hyriidae, Mytilidae, Solenidae, Unionidae, Veneridae y Margaritiferidae (Ghiselli *et al.*, 2011) el ADN mitocondrial se hereda de forma biparental (Obata *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2010). Hoy en día se conocen alrededor de 40 especies de bivalvos con el sistema DUI (Zouros, 2013).

Las características de la transmisión hereditaria de ambos genomas F y M en organismos con sistema DUI son las siguientes: los óvulos contienen genoma mitocondrial del tipo F, y el esperma, genoma del tipo M (Zouros, 2013), pero la madre transmitirá su genoma F a toda la descendencia (machos y hembras) y el padre solo transmitirá su genoma M a los hijos

(Passamonti y Scali, 2001; Zouros, 2013). Es por ello que, tras la fertilización y durante el desarrollo, las hembras serán homoplásmicas para el genoma F, y en cambio, los machos, serán mosaicos del ADN mitocondrial (heteroplásmicos) (Batista *et al.*, 2010; Zouros, 2013).

El fenómeno DUI ha sido principalmente estudiado en especies del género *Mytilus* (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*) y en la especie *R. philippinarum*. Tanto almejas como mejillones de agua salada comparten unos mismos rasgos de este tipo de herencia mitocondrial, pero existen ciertas diferencias. Tal y como se ha observado en el género *Mytilus*, los machos maduros contienen ratios de los genomas F y M que varían, en todos los tejidos: M predomina en las gónadas y F en el tejido somático (Breton *et al.*, 2007). Sin embargo, en *R. philippinarum* se han observado diferencias en cuanto a la distribución de los genomas por lo que se deduce que el mecanismo que secuestra el genoma M en las gónadas masculinas no es perfecto o que el genoma M cumple diferentes funciones en las especies de *Mytilus* y *Ruditapes* (Breton *et al.*, 2007).

Los genomas mitocondriales del tipo F y M muestran la siguiente distribución tisular en ambos sexos de la especie *R. philippinarum*. En cuanto a los machos, el tejido somático de los mismos contiene mayormente genoma del tipo M (Ghiselli *et al.*, 2011). Las gónadas en principio solo contienen genoma de tipo M, aunque en ocasiones se ha identificado una pequeña cantidad de genoma F (Ghiselli *et al.*, 2011; Breton *et al.*, 2007; Passamonti y Scali, 2001). En cuanto a los gametos, solo el genoma mitocondrial M pasa al espermatozoide, por lo que no se ha detectado mtDNA F en estos (Ghiselli *et al.*, 2011). Las hembras de *R. philippinarum* en general contienen genoma de tipo F, tanto en las gónadas como en el tejido somático (Zouros, 2013). Sin embargo, se han encontrado pequeñas cantidades del genoma M en el tejido somático y en gónadas femeninas (Zouros, 2013). Aun cuando esto ocurre, los gametos femeninos solo contienen genoma F (Milani *et al.*, 2012). Por lo tanto, aunque las gónadas de machos y hembras puedan mostrar mtADN de ambos tipos, los gametos siempre serán homoplásmicos para genoma M y F, respectivamente.

Partiendo de un sistema DUI y dadas las características de distribución tisular de ambos genomas descritas anteriormente, se infiere que durante el desarrollo y maduración gonadal actuarán diferentes mecanismos de replicación o degradación de las mitocondrias para obtener óvulos homoplásmicos para el tipo F, y del mismo modo, para obtener espermatozoides homoplásmicos del tipo M (Milani *et al.*, 2012; Ghiselli *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, se

ha propuesto un mecanismo de control de tres puntos para la segregación de mitocondrias en ese proceso:

El primer punto de control consistiría en la segregación activa de las mitocondrias M a las células germinales macho durante el desarrollo temprano del embrión, seguramente mediante un mecanismo de transporte auxiliado por microtúbulos (Ghiselli *et al.*, 2011). Las mitocondrias del tipo M tienen que invadir la línea germinal de los embriones machos durante el desarrollo, ya que si esto no ocurriera, el esperma transmitiría mtDNA de tipo F y no se realizaría el sistema DUI. El segundo punto de control tiene lugar en las hembras, donde ocurre la degradación activa de las mitocondrias M (Ghiselli *et al.*, 2011) (o la inhibición de la replicación del mtDNA M (Milani *et al.*, 2012)). Es probable que el genoma M porte una especie de etiqueta molecular similar a la ubiquitina (Ghiselli *et al.*, 2011). Se ha observado que los primeros dos puntos de control no son perfectos en *R. philippinarum* (Ghiselli *et al.*, 2011), por lo que se requeriría un tercer punto de control para asegurar la homoplasmia de los gametos en esta especie.

Patrones de distribución de las mitocondrias del esperma

Se ha observado que la distribución de las mitocondrias del esperma sigue dos patrones dependiendo de cual será el sexo del embrión: el “patrón agregado” y el “patrón disperso” (Milani *et al.*, 2011). En embriones macho, las mitocondrias forman un patrón agregado, y en cambio, en embriones hembra, forman un patrón disperso. Estos patrones de distribución dependen de la acción de los microtúbulos (Breton *et al.*, 2007). En el patrón agregado las mitocondrias del esperma permanecen próximas unas a otras en el óvulo fertilizado y más adelante en el desarrollo, aparecen localizadas en una célula: la célula D, que de acuerdo con la nomenclatura de Conklin (1897) es la célula de la que se originan las células germinales (Zouros, 2013). En cuanto al patrón disperso, como el propio nombre indica, las mitocondrias no siguen ninguna distribución concreta durante la división celular en el desarrollo encontrándose distribuidas uniformemente (Zouros, 2013). Este mismo fenómeno de la distribución de las mitocondrias del esperma se ha observado en la especie *R. philippinarum* (Milani *et al.*, 2011).

Regulación genética del sistema DUI

Dada la abrumadora presencia del sistema SMI en animales, parece lógico pensar el DUI evolucionó del SMI. En el sistema SMI, el ADN mitocondrial del esperma es excluido del pool de ADN mitocondrial del cigoto. Esto se consigue tanto previniendo su entrada como eliminándolo una vez haya entrado. En los mamíferos este proceso se lleva a cabo mediante la ubiquitinización de las membranas mitocondriales del esperma (Batista et al., 2010; Zouros, 2013). El proceso parece estar regulado por dos factores genéticos codificados en el genoma nuclear de las hembras: W y X, que se asume estén presentes también en las especies con DUI. La diferencia entre SMI y DUI sería que este último requiere un elemento nuclear más: el locus Z (Zouros, 2013).

En resumen, tres factores genéticos (W, Z y X) son necesarios para el desarrollo del sistema DUI, 1) asegurando presencia del genoma M de manera exclusiva en el esperma y 2) previniendo la presencia del genoma M en los óvulos y por lo tanto en la línea de transmisión maternal (Batista et al., 2010). El factor W se encuentra en la membrana exterior de la mitocondria del esperma. El factor X (codificado por genes nucleares del óvulo) reconoce el factor W. Estos dos factores son parte del “sistema de eliminación de las mitocondrias del esperma” que lleva a la herencia SIM del mtDNA, un mecanismo comparable al sistema de ubiquitinización de los mamíferos. El tercer factor, Z, está presente en el citoplasma del óvulo y tiene dos alelos: el alelo activo Z, y el inactivo z. El modelo propuesto es que el factor Z suprime el factor X, previniendo así, la eliminación (o dispersión) de las mitocondrias del esperma en los óvulos fertilizados (Breton et. al., 2007; Zouros, 2013). De esta manera, teniendo en cuenta que la hembra puede ser ZZ, Zz o zz: si el óvulo suministra el factor Z, al ser fertilizado éste suprimirá el factor X y como consecuencia, no se eliminará (o dispersará) el mtDNA del tipo M (mitocondrias M), dando lugar a un cigoto que se desarrolla como macho (patrón agregado del genoma M). Por el contrario, si el óvulo suministra el alelo z, no se suprimirá el factor X, y por lo tanto, el mtDNA M se dispersará o se eliminará, dando lugar a un individuo hembra (patrón disperso del genoma M) (Breton et al., 2007).

La especie *R. philippinarum* es estrictamente gonocórica y sus gónadas se forman cada año al comienzo de la estación de apareamiento (a partir de las células germinales), después de la cual, se degradan (Milani et al., 2011). Ocurre lo mismo en la mayoría de las especies de bivalvos: son gonocóricas estables de manera que una vez que se establece el sexo del individuo, estos permanecen con el mismo sexo de forma estable durante el resto de su vida.

Muchas en cambio, muestran un hermafroditismo simultáneo, de manera que producen gametos femeninos y masculinos en sus gónadas; o hermafroditismo secuencial, cambiando el sexo al tiempo que envejecen (Breton et al., 2007).

En cualquier caso, en todas las especies de bivalvos, el sexo (o el tipo de gametos producidos) no está determinado hasta que las líneas germinales estén diferenciadas. El mecanismo de la “sexualización” de las gónadas es aún desconocido (Milani et al., 2011). Por el momento solo se conoce con certeza que en los bivalvos el sexo no está determinado por cromosomas sexuales heteromórficos (Breton et al., 2007), por lo tanto, solo se podrá conocer su sexo detectando oocitos o esperma bajo un microscopio cuando la almeja está en la estación reproductiva (Ghiselli et al., 2012).

Esta situación justifica el interés de crear un método para determinar el sexo de los individuos juveniles. La distribución de los genomas mitocondriales en los tejidos de ambos sexos de *R. philippinarum* es diferente, pero se desconoce la expresión de los mismos. Por tanto, cuantificando ambos linajes de genoma mitocondrial en cada tejido, podría establecerse un criterio para diferenciar el sexo de los individuos. Para ello, es necesaria la cuantificación de los tejidos, de modo, partiendo de la secuenciación del transcriptoma en diferentes muestras de tejidos (tecnología Illumina HiSeq 2000) realizada en el contexto de un proyecto de carácter más amplio se procedió a alinear las secuencias obtenidas a los genomas M y F de referencia pudiendo de este modo obtener las ratios que permiten identificar el sexo de juveniles diferenciados según su tasa de crecimiento: individuos de crecimiento bajo (“slow growers” o S) y alto (“fast growers” o F).

La gran ventaja de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS – New Generation Sequencing) como Illumina HiSeq 2000 es que permiten analizar una gran cantidad de información de manera económica en comparación con el método alternativo Sanger (Metzker, M.L, 2010), aunque tiene un menor nivel de precisión. En concreto, la tecnología Illumina HiSeq 2000 puede generar más de 600 Gb cada vez que secuenciamos, lo cual nos permite una gran capacidad de lectura. Además, no es necesario conocer el genoma del organismo que queremos analizar, por lo que es una gran ventaja a la hora de secuenciar organismos no modelo como *R. philippinarum*. Como contrapartida, las secuencias que genera la tecnología Illumina HiSeq 2000 son de 100 pb (Metzker, M.L, 2010) frente a las 500-800 bp que genera la secuenciación Sanger. Sin embargo, la tecnología PairedEnd (PE) permite

secuenciar los dos extremos de cada secuencia, ampliando así el número de pares de bases conocido.

El objetivo específico de este trabajo ha sido el diseño de un sistema de este tipo, para establecer y comparar la ratio sexual en dos grupos de juveniles de la primera generación (F1) resultante de la fertilización con gametos procedentes de 200 individuos reproductores. Dado que ambos grupos de juveniles F y S se segregaban en función de su tasa de crecimiento, la determinación de posibles diferencias en la ratio sexual permitiría asociar al sexo un componente de las diferencias interindividuales de tasa de crecimiento, precisamente en la etapa previa a la maduración reproductiva que es cuando estas diferencias se manifiestan con más intensidad. Este conocimiento podría contribuir a una más eficiente gestión de la producción de larvas y semillas en los sistemas acuícolas de cultivo de esta especie.

2. Material y métodos

El material analizado en este trabajo se obtuvo a partir de muestras obtenidas en el contexto de un proyecto más amplio destinado a establecer a) el transcriptoma de referencia en una especie no modelo de amplio uso en acuicultura, *Ruditapes philippinarum* y b) la expresión génica diferencial en dos grupos de juveniles de esta especie seleccionados por presentar tasas de crecimiento diferenciadas. Dentro del programa de muestreo, y en lo que se refiere a los datos tratados en este trabajo, se obtuvieron 1) Adultos reproductores. 2) Muestras individuales de juveniles de tasa de crecimiento alta (fast growers o F) y baja (slow growers o S).

Las muestras fueron proporcionadas por la empresa Tinamenor S.A. (Planta de Cultivo de Pesués). Una vez realizada la fertilización con gametos procedentes de unos 200 parentales y tras el cultivo larvario en la hatchery de la empresa, se obtuvo una generación de juveniles a partir de la cual se seleccionaron dos grupos constituidos por las “cabezas y “colas” de la distribución de tallas. Estos grupos se tomaban como de alto crecimiento (F, por “fast grower”) y de bajo crecimiento (S por “slow grower”), respectivamente. Para los análisis subsiguientes se utilizaron 17 individuos F y 19 individuos S. 200 parentales fueron sexados y se seleccionaron 10 machos y 10 hembras de máxima maduración que posteriormente, fueron diseccionados, para obtener los siguientes tejidos: glándula digestiva (DG), branquias (GL), manto (MN) y gónadas (GN).

Al tratarse de un análisis del transcriptoma como primera etapa del proceso se procedió a la extracción de RNA total a partir de las muestras. En los individuos adultos, cada muestra se obtuvo agrupando, en un pool para cada sexo, el RNA extraído de cada tejido. En cuanto a los juveniles, se obtuvo una muestra de cada individuo en su totalidad, sin distinguir entre tejidos.

Como etapas previas a la secuenciación, la muestra de RNA total que se extrajo de los tejidos se trató con DNAsas para eliminar el DNA contaminante que pudiera haber. La muestra resultante, se trató de manera que solo se conservó el mRNA, descartando los demás tipos de RNA. Posteriormente, el mRNA resultante se utilizó en la creación de una librería de cDNA utilizando retrotranscriptasa. Las muestras se secuenciaron mediante la tecnología Illumina Hiseq 2000 tras la cual se obtuvieron secuencias crudas (raw reads). Posteriormente se procedió a evaluar la calidad de las mismas con el programa Fastaq, un programa para visualizar la calidad de los *reads*. Se utilizó el programa Trimmomatic (0.20v) para eliminar las secuencias o fragmentos de éstas que no cumplieran los parámetros de calidad deseados. De acuerdo con esos parámetros, se eliminaron los 15 primeros nucleótidos de cada secuencia, ya que la calidad de dichos nucleótidos era escasa. Además, se eliminaron también los adaptadores y/o secuencias específicas de Illumina como el index, añadidas previamente. Del mismo modo que con el método Sanger la calidad del principio y final de las secuencias es menor, ocurre lo mismo con las NGS. Además, se evalúa la calidad del principio y fin de la secuencia base a base, para que no sea menor de 10. El programa evalúa la calidad de la siguiente forma: calcula la calidad cada cuatro pares de bases, de manera que si la calidad media de esos fragmentos de 4bp es inferior a 20, el programa corta la secuencia en esos puntos. Solo se mantuvieron las secuencias que no tuviesen un tamaño menor que 50 pb (min50). Se volvió a evaluar la calidad de las secuencias obtenidas (trimmed reads) con Fastaq, para comprobar que la calidad había mejorado tras el trimming.

La existencia de secuencias completas del genoma mitocondrial masculino y femenino de *R. philippinarum* en bases públicas (GenBank accession numbers AB065374 y AB065375) permite alinear con esas referencias las secuencias obtenidas (trimmed reads). El alineamiento se llevó a cabo mediante el programa Bowtie2 (2.1.0v), estableciendo ciertos parámetros conservadores, de manera que nuestros reads se alinearan con las secuencias de referencia lo más fielmente posible. Establecimos, entre otros, el criterio de que no hubiera errores de emparejamiento (0 mismatch) y que se alinearan los pairs con ambos reads (en lugar de

alinearse pairs con un solo reads). El alineamiento fue global, es decir, los reads se alinearon completamente a los genomas de referencia.

Concluido el alineamiento, para conocer el número de reads que se alinearon al genoma M y al genoma F, se utilizó el programa Tablet (1.12.02.06v). Este programa requiere del formato bam, por lo que se utilizó el programa Samtools (0.1.18v) para pasar los resultados del alineamiento al formato bam. Al obtener como resultado un número concreto de lecturas alineados al genoma M y otro al genoma F, lo que conseguimos es cuantificar la expresión de dichas lecturas, y por lo tanto, la expresión de cada genoma mitocondrial.

Como se indica en la sección anterior, uno de los objetivos de este trabajo consistía en utilizar los valores de alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de los tejidos adultos de machos y hembras a los genomas mitocondriales masculino y femenino para construir índices (ratios) que permitan identificar el sexo de los juveniles. Para una mayor precisión del método, las ratios correspondientes a los distintos tejidos deben ser ponderadas en función de la contribución relativa de cada tipo de tejido al peso total. Con este fin se diseccionaron 10 individuos de *R. philippinarum*. Se extrajeron los tejidos (glándula digestiva, manto, branquias, pie, gónadas y musculo abductor) y se pesaron tras 24 horas en estufa a 95°C-100°C de manera que se obtuvo el peso seco de cada tejido. Posteriormente, se procedió a calcular el índice corporal de cada tejido (peso seco tejidos/peso seco total), con el que se ponderaban las ratios de alineamiento obtenidas.

3. Resultados

3.1. Lecturas brutas y depuradas

Las lecturas brutas (raw reads) obtenidas en la secuenciación de los tejidos de los adultos se sometieron a un depurado (trimming), para conseguir las secuencias denominadas lecturas depuradas (trimmed reads). En las Tabla 1 y 2, se presentan los valores en números de reads obtenidos en la secuenciación y tras el trimming en individuos adultos y en juveniles, respectivamente. En el caso de los adultos se observó un descenso en el número de información del 25% aproximadamente, tras realizar el trimming, ya que se eliminaron los unpairs y los pairs que no cumplieron los parámetros de calidad establecidos. Más exactamente, en el caso de los machos se conservó el 77,51% de los pairs (de buena calidad); 76,06% en el caso de las hembras. En cuanto a los individuos juveniles se puede apreciar que

la cantidad de información ha disminuido de forma similar, tanto en individuos S como F, de manera que se conservó el 77,43% y 73,71% de pairs, respectivamente.

Tabla 1: Valores medios del número de reads (raw y trimmed) en adultos machos y hembras (M = millones de reads)

Sexo	Raw reads	Trimmed reads
Macho	54,41M ± 10,91	42,18M ± 8,8
Hembra	56,36M ± 7,9	42,87M ± 7,1
Total	55,39M ± 8,8	42,53M ± 7,4

Tabla 2: Valores medios del número de reads (raw y trimmed) en individuos S y F (M = millones de reads)

Individuos	Raw reads	Trimmed reads
S	58,10 ± 19,34	44,98 ± 16,22
F	63,90 ± 34,32	47,10 ± 23,60
Total	60,84 ± 27,19	45,98 ± 19,78

3.2. Alineamiento de secuencias en individuos adultos

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos tras realizar el alineamiento (mapping) con las secuencias depuradas (trimmed reads) frente a los genomas M y F de referencia. Se puede apreciar el número de lecturas (reads) alineadas al genoma masculino (M) y al femenino (F) en los diferentes tejidos analizados, además de los porcentajes de las ratios para cada tejido de los dos sexos, calculado como porcentaje de secuencias alineadas al genoma M con respecto al total. Los valores muestran una aportación mínima del genoma M. Sin embargo, en función del sexo, los resultados muestran una variación importante como se puede apreciar en la Tabla 3. En los machos, la glándula digestiva (M-DG) y la gónada (M-GN) presentan una ratio muy elevada con respecto a los demás tejidos (y a las hembras). De ese modo, la glándula digestiva muestra una ratio de 9,626% y la gónada un valor de 71,149%. Con respecto a este último tejido, la ratio en la gónada femenina es de 0,061%; es decir, una diferencia muy elevada entre sexos. En el resto de los tejidos se observa el mismo fenómeno, aunque las diferencias no son tan marcadas. Estas comparaciones indican que los machos presentan de forma general más genoma mitocondrial de tipo paternal que las hembras.

Tabla 3: Número de lecturas (reads) alineadas al genoma masculino (M) y al femenino (F) y porcentajes de las ratios (M/(M+F)) de la glándula digestiva (DG), branquia (GL), manto (MN) y gónada (GN) de machos (M) y hembras (F).

Tejidos	Reads M	Reads F	Total reads	Ratio (%)
M-DG	302882	2843638	3146520	9,626
M-GL	1892	3160834	3179766	0,595
M-MN	25453	5807569	5833022	0,436
M-GN	8936768	3623893	12560661	71,149
F-DG	620	2474968	2475588	0,025
F-GL	2056	4087647	4089706	0,050
F-MN	408	3836682	3837090	0,011
F-GN	2380	3904020	3906400	0,061

3.3. Ponderación de las ratios en función de las proporciones corporales de los distintos tejidos

La Tabla 4 muestra los valores medios (\pm SD) y el rango de las proporciones corporales de los diferentes tejidos obtenidos por disección de una muestra de 10 almejas adultas. Con respecto a su utilización en la ponderación de las ratios de alineamiento obtenidas para esos tejidos. Los resultados son orientativos ya que no se trata de los mismos individuos que se utilizaron en la secuenciación. No obstante, puede observarse que la mayoría de los tejidos somáticos (pie, manto, músculo aductor y branquias) presentan escasa variación, excepto la glándula digestiva cuya variación puede estar motivada por diferencias en el estado nutricional de los distintos individuos. Cuestión aparte es la gónada que muestra diferencias notorias entre los individuos (rango: 3,6 a 8% del peso corporal). Este órgano varía además estacionalmente en función del ciclo reproductor del animal, por lo que no podemos asumir una correspondencia entre el estado de desarrollo gonadal de los adultos secuenciados y los utilizados en estas disecciones. En consecuencia, en la ponderación se han considerado dos escenarios: Escenario 1: El estado presente de los individuos diseccionados, donde la gónada representa un valor medio del 5,8% del peso corporal; Escenario 2: Un estado de ausencia de gónada que correspondería al periodo de reposo sexual. Los resultados de la ponderación de acuerdo con este segundo escenario serían aplicables a la evaluación de las ratios obtenidas para el conjunto de los tejidos en individuos juveniles, ya que se asume que son sexualmente inmaduros y no presentan gónadas.

Tabla 4: Valores medios (\pm SE) de las proporciones corporales de cada tejido (glándula digestiva (DG), branquia (GL), manto (MN), gónada (GN), pie (FO) y músculo abductor (AB)) y del peso total de los tejidos en los 10 individuos diseccionados.

Individuos	Peso total tejidos (g)	DG	GL	MN	FO	AB	GN
Media	7,4621 \pm 0,9324	0,107 \pm 0,007	0,199 \pm 0,008	0,169 \pm 0,006	0,218 \pm 0,011	0,249 \pm 0,009	0,058 \pm 0,017
Rango (min - max)	5,9820 – 8,07	0,07 – 0,119	0,189 – 0,211	0,158 – 0,175	0,204 – 0,234	0,237 – 0,262	0,036 – 0,080

Con las proporciones corporales calculadas de cada tejido, se ponderaron las ratios de los individuos adultos, manteniendo los dos escenarios propuestos. A los componentes corporales que no fueron secuenciados (músculo aductor y pie) se les atribuyó como ratio el valor medio obtenido para los tejidos somáticos secuenciados (glándula digestiva, branquia y manto); es decir, un valor del 3,5525% en el caso de los machos y 0,0286% en el caso de las hembras.

1. Escenario: la gónada del animal representa el 5,8% del peso corporal

La Tabla 5 compara las ratios originales estimadas con los resultados de la ponderación. Las ratios globales para el conjunto de los tejidos se han obtenido : a) como valor promedio de las ratios originales y b) como suma de los valores ponderados para reconstituir una ratio de conjunto que tome en cuenta la abundancia relativa de cada tejido.

Tabla 5: Ratios originales y ratios ponderadas a partir de las proporciones corporales de los distintos tejidos, en la glándula digestiva (DG), branquia (GL), manto (MN), gónada (GN), pie (FO) y músculo abductor (AB) de machos (M) y hembras (F). (Ratio=M/(M+F)) (*) Valor medio de la ratio del resto de los tejidos somáticos (glándula digestiva, branquias y manto).

Tejidos	Ratio (%)	Ratio ponderada (%)
M-DG	9,626	1,032
M-GL	0,595	0,118
M-MN	0,436	0,074
M-GN	71,149	4,112
M-FO	3,552*	0,775
M-AB	3,552*	0,883
M- Global	X = 14,818	6,985
F-DG	0,025	0,004
F-GL	0,050	0,010
F-MN	0,011	0,002
F-GN	0,061	0,003
F-FO	0,029*	0,006
F-AB	0,029*	0,007
F-Global	X = 0,024	0,032

2. Escenario: el animal no presenta gónadas

La Tabla 6 muestra las ratios ponderadas de cada tejido asumiendo la ausencia de gónada. Debido al elevado valor de la ratio en gónada masculina, su supresión produce el efecto de una acusada reducción en los valores globales para machos. Por otra parte, la diferencia entre cifras ponderadas y no ponderadas resulta menor en este caso debido a la baja contribución de la gónada al peso total. Las diferencias entre los dos escenarios son mínimas para las hembras.

Tabla 6: Valores medios (\pm SE) de las proporciones corporales de los tejidos (glándula digestiva (DG), branquia (GL), manto (MN), pie (FO) y músculo abductor (AB)) y peso total de los tejidos en los 10 individuos diseccionados.

Tejidos	Ratio (%)	Ratio ponderada (%)
M-DG	9,6259	1,063
M-GL	0,5953	0,122
M-MN	0,4363	0,076
M-FO	3,5525*	0,799
M-AB	3,5525*	0,910
M- Global	X = 3,552	2,970
F-DG	0,0250	0,003
F-GL	0,0503	0,010
F-MN	0,0106	0,002
F-FO	0,0286*	0,006
F-AB	0,0286*	0,007
F-Global	X = 0,028	0,055

En la Tabla 7 se muestran los valores de las ratios ponderadas en machos y hembras, que representan las ratios teóricas de individuos completos. Los machos muestran una ratio de 6,985% y las hembras un valor de 0,032%. Excluyendo el tejido gonadal, en los machos se aprecia una ratio de 2,970% y en las hembras, 0,055%. Se puede observar por lo tanto, que existe una diferencia clara entre los sexos, tanto en el caso de los individuos con gónadas como si ellas.

Tabla 7: Ratios ponderadas (%) en machos y hembras teniendo en cuenta las gónadas y excluyéndolas.

Muestra	Ratio ponderada %
Machos	6,985
Hembras	0,032
Machos (sin gónadas)	2,970
Hembras (sin gónadas)	0,055

3.4. Individuos juveniles

Una vez establecidos los ratios de los adultos para los dos escenarios propuestos, se procedió a trabajar con los datos de los juveniles. Los resultados del alineamiento (mapping) obtenidos se muestran en la Tablas 8 (individuos S) y 9 (individuos F). Como hemos asumido que los juveniles carecen de gónadas, se aplicaron los ratios del segundo escenario para determinar el sexo de estos supuestos individuos inmaduros. La distribución de valores de la ratio conforma dos grupos perfectamente claros por referencia a los dos valores característicos de machos (2,97%) y hembras (0,028%). En el caso de los individuos juveniles de crecimiento bajo (S), Tabla 8, sobre una muestra de 19 individuos, se identificaron 7 machos (SA1, SB2, SF2, SA3, SE4, SE5 y SF5) y 11 hembras (SE1, SF1, SA2, SE2, SB3, SE3, SF3, SA4, SB4, SF4 y SA5). Para los machos se calculo una ratio medio de 21,705% (\pm SE %14,07), con un valor máximo de 39,86% (SE4) y un valor mínimo de 2,5% (SF2). Para las hembras, se obtuvo una ratio medio de 0,012% (\pm SE %0,008), con un valor máximo de 0,03% para el individuo SA2, prácticamente coincidente con el valor característico de los adultos (0,028%). El individuo SB5 quedó sin caracterizar por el anormalmente bajo número de lecturas alineadas al genoma F.

En el caso de los individuos de crecimiento rápido (F), (Tabla 9), solo se pudo trabajar con cuatro individuos de los 17 secuenciados desde un principio. Los 13 individuos restantes mostraron un alineamiento muy bajo con la referencia para la especie, por lo que fueron descartados para este estudio. En este caso se identificaron tres individuos macho (FA2, FF2 y FA6) y una sola hembra (FB2). En el caso de la ratio de los machos se estableció un valor medio de 42,255% (\pm SE %27,061), muy superior al valor medio obtenido para los adultos macho sin gónadas (2,97%), lo cual no deja dudas en cuanto al sexo de los mismo. La hembra FB2 mostró una ratio de 0,0089%, inferior al valor medio de las hembras adultas sin gónadas (0,028%).

Con los resultados de identificación del sexo en juveniles se calculó la ratio sexual de 0,39 (n = 18) en el grupo S. Al disponer de tan solo 4 muestras de individuos F no parece pertinente el cálculo de la ratio sexual en ese grupo. El valor de esa ratio, tomando en cuenta todos los individuos identificados, es de 0,47 (n = 22).

Tabla 8: Resultado del alineamiento, porcentaje de las ratios y sexo de cada individuo de crecimiento bajo (S).

Individuos	Reads M	Reads F	Ratio (%)	Sexo
SA1	300422	2075002	12,65	Macho
SE1	86	2722484	0,00	Hembra
SF1	1338	11502492	0,01	Hembra
SA2	946	3085460	0,03	Hembra
SB2	649600	2500370	20,62	Macho
SE2	832	4154988	0,02	Hembra
SF2	98870	3501152	2,50	Macho
SA3	1820982	2831106	39,14	Macho
SB3	330	2741824	00,01	Hembra
SE3	836	5641174	0,01	Hembra
SF3	246	3258982	0,01	Hembra
SA4	542	3637956	0,01	Hembra
SB4	376	5576376	0,01	Hembra
SE4	1314850	1984156	39,86	Macho
SF4	76	2456426	0,00	Hembra
SA5	198	2123414	0,01	Hembra
SB5*	652	19550	3,23	–
SE5	1405764	10176436	12,14	Macho
SF5	608986	1823920	25,03	Macho

Tabla 9: Resultado del alineamiento, porcentaje de las ratios y sexo de cada individuo de crecimiento alto (F).

Individuos	Reads M	Reads F	Ratio (%)	Sexo
FA2	2028202	1098004	64,88	Macho
FB2	172	1912282	0,01	Hembra
FF2	4104086	4167754	49,62	Macho
FA6	178950	1279016	12,27	Macho

4. Discusión

Individuos adultos

Como se ha podido observar en este trabajo, la distribución de los dos genomas presentes en la especie *Ruditapes philippinarum*, una almeja que presenta el sistema de herencia mitocondrial DUI, varía con respecto al sexo y también respecto al tejido. Nuestros resultados confirman que los machos resultan ser heteroplásmicos, de manera que muestran los dos linajes del genoma mitocondrial. Los resultados del alineamiento con los genomas de referencia M y F (GenBank accession numbers AB065374 y AB065375) muestran diferencias respecto al patrón de distribución establecido en estudios previos. Así, los tejidos somáticos como la glándula digestiva, las branquias y el manto muestran ambos expresión de genomas M y F, con una predominancia del genoma materno mientras que, diversos estudios han demostrado en machos una mayor abundancia de genoma mitocondrial M en los tejidos somáticos (Ghiselli *et al.*, 2011; Passamonti y Scali, 2001), aunque también se aprecie genoma de tipo F (Ghiselli *et al.*, 2011). En el caso del tejido gonadal de los machos, nuestros resultados muestran una ratio elevada de genoma M (71,149%), indicando una expresión elevada del genoma paternal. Este dato se ve respaldado por diversos trabajos, donde se ha observado que el genoma M predomina fuertemente en este tejido (Ghiselli *et al.*, 2011). Sin embargo, también hemos podido comprobar la presencia de genoma F, lo cual podría explicarse, ya que estudios en el mitílido *M. galloprovincialis* han concluido que el genoma F que aparece en la gónada podría pertenecer al tejido conjuntivo de la misma (Obata *et al.*, 2011).

En lo que a las hembras se refiere, nuestros resultados indican que, al contrario de lo que se ha concluido en otros estudios, éstas también resultan ser heteroplásmicas. Es cierto que las ratios son mucho menores que en los machos, lo cual indica una menor expresión del genoma M. El hecho de que se hayan encontrado pequeñas cantidades del genoma M en el tejido somático y en gónadas femeninas (Zouros, 2013) respaldaría nuestros resultados aunque estudios minuciosos como el de Ghiselli *et al.*, 2011 donde se siguieron estrictos protocolos para evitar posibles contaminaciones entre muestras, han concluido que las hembras son homoplásmicas para el genoma F, de manera que no muestran indicios de genoma paternal. Por lo tanto, no es descartable que nuestros resultados puedan reflejar una contaminación entre tejidos en la etapa de disección previa a la secuenciación.

Conviene indicar que los resultados de este trabajo, al estar basados en mRNA, consisten en la cuantificación de la expresión de los genomas mitocondriales M y F, pero no son indicativos de la

cantidad de dichos genomas. Es posible que un mayor número de lecturas alineadas a un genoma concreto indique mayor expresión y no por ello mayor cantidad de genoma; o incluso, puede que con una mayor cantidad, la expresión sea menor. Se ha podido comprobar que existe expresión diferencial de los genomas M y F en diferentes tejidos en *Mytilus galloprovincialis* (Obata *et al.*, 2011). En estos mitílidos se ha estudiado la relación entre la expresión y la cantidad de ambos genomas, concluyendo que la cantidad de genoma y la expresión del mismo están nivelados. En el caso de *R. philippinarum*, los machos muestran tanto genoma M como F en sus tejidos, pero hasta el momento no se han realizado estudios que demuestren la existencia de expresión diferencial de los genomas en esta especie. En consecuencia, y por falta de información, al haber cuantificado la expresión, no podemos afirmar que haya mayor o menor cantidad de genoma. Si asumimos que existe una linealidad entre la expresión y la cantidad de genoma en nuestra especie, nuestros resultados muestran una menor cantidad de genoma M en los tejidos somáticos del macho, con respecto a los resultados observados en el trabajo de Ghiselli *et al.*, 2011. No obstante, en el caso de que no se diera esa linealidad y los resultados de dicho trabajo fueran correctos, nuestras ratios indicarían una menor expresión del genoma M, y por lo tanto, diferencias en cuanto a las funciones que cumplen ambos genomas. De todas formas, aunque todas estas asunciones sean de carácter hipotético y no exista esa linealidad entre expresión y cantidad, las ratios obtenidas para la totalidad del macho y de la hembra no pierden su valor, ya que la diferencia entre ambos es muy grande (unas 100 veces mayor en el caso de los machos).

Uso de las proporciones corporales de los distintos tejidos en la ponderación de las ratios de genoma M

El desconocimiento de los estados nutricional y reproductor de los adultos utilizados en la secuenciación impone algunas reservas en relación con la utilización de las proporciones corporales obtenidas a partir de una muestra diferente de adultos. La glándula digestiva y la gónada, son órganos cuyo peso varía bastante a lo largo del año, ya sea por la cantidad de alimento disponible, en el caso de la glándula digestiva, como por el hecho de que la reproducción de las almejas sea estacional, en el caso de la gónada (Milani *et al.*, 2011). Al haber secuenciado individuos acondicionados como reproductores, mantenidos en condiciones óptimas de alimentación, el tamaño de su glándula digestiva se espera que sea elevado. En los individuos diseccionados para obtener las proporciones corporales, la glándula digestiva representa, como media, el 10,72% del peso corporal, semejante a los valores máximos estacionales (10,11%; Alvarez-Jorna, 1995); por lo tanto, las cifras obtenidas para este órgano pueden considerarse aplicables al grupo de adultos secuenciados. En cuanto a las gónadas, la presencia de éstas está condicionada por el ciclo reproductor, y como no conocemos las condiciones y el estado

exacto de desarrollo gonadal del grupo de parentales que se secuenciaron, se decidió proponer dos escenarios: 1) individuos que presentaran gónadas y 2) individuos que no las presentan. El hecho de distinguir estos dos escenarios no afecta a nuestro objetivo en cuanto a establecer la ratio de los machos y hembras en los adultos, para luego poder determinar el sexo en los juveniles, ya que asumimos que los juveniles son sexualmente inmaduros. Sin embargo, ambas aproximaciones ayudaron a entender mejor la distribución de los genomas en los diferentes tejidos.

En cuanto a los dos escenarios propuestos, los resultados prácticamente no varían. Respecto al primer escenario propuesto, en términos de ratios globales, la reducción operada en el caso de los machos como consecuencia de la ponderación se explica esencialmente por el pequeño tamaño de la gónada, que es el tejido que presenta la ratio más elevada. En el caso de las hembras, el incremento producido puede atribuirse al tamaño relativamente elevado del tejido branquial, que presenta una ratio comparativamente elevada. En el caso del segundo escenario, debido a que la aportación de la gónada aparece ponderada por un escaso 6%, las diferencias en las hembras son aun menos relevantes que en los machos.

Individuos juveniles

Basándonos en las ratios establecidas en los individuos maduros sin gónadas, hemos podido determinar el sexo de cada individuo juvenil. En la Figura 1 se muestra la distribución de los individuos S en base a los ratios de los adultos: 2,971% en el caso de los machos y 0,028% en el caso de las hembras. Podemos concluir con certeza la fiabilidad de este método, ya que con la excepción ya comentada del individuo SB5 (indicado en gris), no se ha planteado ninguna duda a la hora de la determinación del sexo del resto de individuos. En cuanto a este individuo, la ratio obtenida (3,227%) sugiere que se trataría de un macho tal y como se puede apreciar en la figura B. No obstante, los resultados del alineamiento (652 lecturas alineadas al genoma M y 19550 al genoma F) son escasas en número con respecto al resto de muestras, y el hecho de mostrar un número de lecturas M tan reducido nos hace pensar en la posibilidad de que en realidad, fuera hembra.

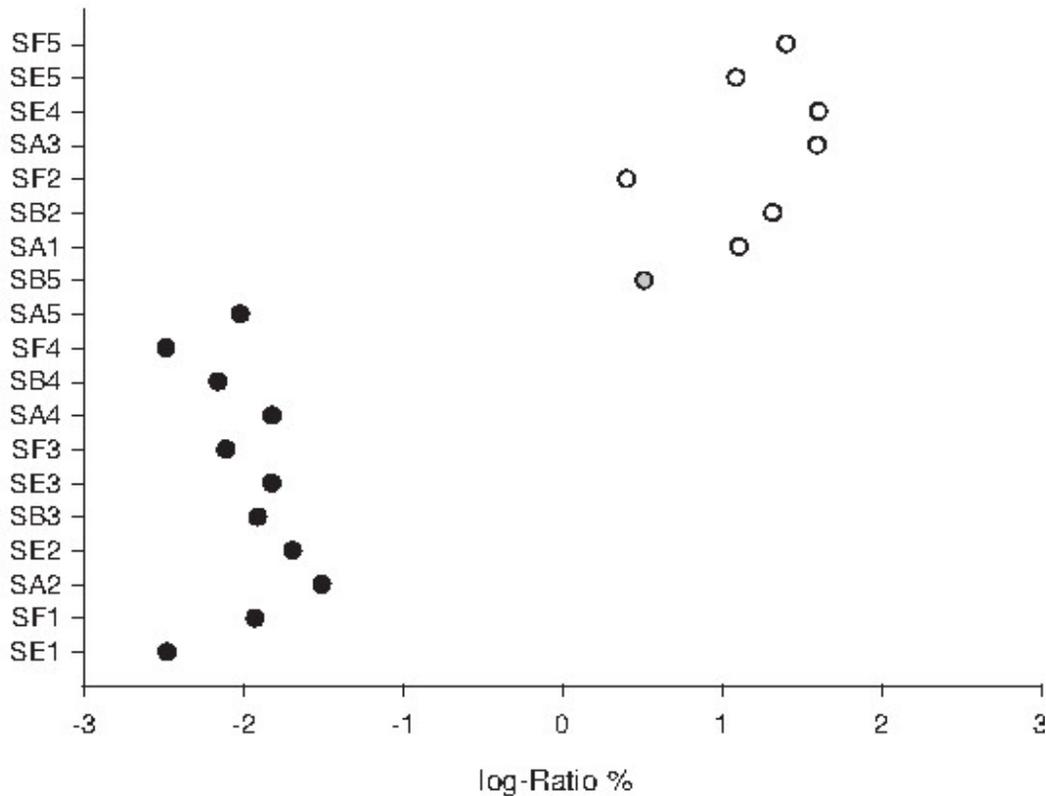


Figura 1: Distribución de los individuos juveniles de crecimiento lento (S) con respecto a la ratio (%) establecido en los individuos adultos. Hembras en negro, machos en blanco y el individuo SB5 en gris.

A pesar de comenzar este trabajo con muestras de 19 y 17 individuos juveniles de crecimiento bajo (S) y alto (F), respectivamente, el número de individuos F utilizables se redujo a 4; el resto fueron descartados por presentar, como se ha indicado anteriormente, un bajo índice de coincidencia con la referencia de la especie. Hay una evidencia fuerte de que un porcentaje muy elevado de individuos juveniles F sean posibles híbridos entre la especie introducida, *R. philippinarum* y la especie local, *R. decussatus*, como se ha podido observar en otros estudios (Hurtado et al., 2011). Se espera que próximos estudios aclaren con mayor precisión esta incertidumbre, pero, debido a esto, solo se pudo determinar el sexo de 4 individuos de tasa elevada de crecimiento identificando tres machos y una sola hembra (0,01%). En el caso de los juveniles de crecimiento bajo (S), la muestra inicial de 19 individuos se vio reducida a 18. El juvenil SB5 mostró unos resultados anómalos: por lo que se optó por prescindir de esta muestra. De entre los 18 individuos restantes, se pudieron identificar 7 machos y 11 hembras.

Visto que el valor de la ratio que muestra la mayoría de los juveniles identificados como machos es muy elevado, superior a la ratio establecida para machos con gónadas (6,995%) nuestra propuesta es

que esos juveniles no son sexualmente inmaduros, sino que presentan gónadas. En el caso de las hembras, no podemos saber con seguridad si éstas presentan gónadas o no, ya que los dos valores de las ratios (para hembras con gónadas y sin ellas), son muy semejantes (0,0314% y 0,028%, respectivamente).

Cuando se calcula la ratio sexual (machos/total) para el único grupo de crecimiento, el S, con tamaño de muestra representativo (18 individuos) el valor obtenido es de 0,39 o 1:1,57 lo que indicaría una clara desviación de la ratio hacia las hembras. Este resultado es plenamente coincidente con el valor publicado para la ratio sexual de esta especie por Drummond et al., 2006, que es de 1:1,53. Cuando se calcula para el total de juveniles sexados en este trabajo, la ratio calculada es 1:1,2, más próxima de la ratio 1:1 que se considera normal en poblaciones de bivalvos.

Desde que el sistema DUI se descubriera en la década de 1990, se ha progresado de una manera extraordinaria en el estudio y caracterización de este fenómeno. El presente trabajo sobre el sistema DUI en la almeja *R. philippinarum* no termina aquí. Se ha avanzado en la construcción de los genomas mitocondriales de referencia del macho y de la hembra de *R. philippinarum* a partir de la caracterización de los genes secuenciados en los individuos adultos. Además, puesto que es posible que varios de los individuos F resulten ser híbridos de *R. philippinarum* y *R. decussatus*, otro reto será la identificación de dichos individuos, y el estudio del sistema de herencia mitocondrial, ya que muy pocos estudios han sido realizados en la especie nativa.

Bibliografía

- Alvarez-Jorna, P. 1995. Crecimiento, reproducción y energética fisiológica de la almeja *Tapes philippinarum*. Memoria de tesis doctoral. Universidad del País Vasco – Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa.
- Batista, F.M., Lallias, D., Taris, N., Guedes-Pinto, H. y Beaumont, A.R. 2010. Relative quantification of the M and F mitochondrial DNA types in the blue mussel *Mytilus edulis* by real-time PCR. *Journal of Molluscan Studies* 77: 24-29
- Breton, S., Beaupré, H.D., Stewart, D.T., Hoeh, W.R. y Blier, P.U. 2007. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *TRENDS in Genetics* 23: 465-474

Breton, S., Beaupré, H.D., Stewart, D.T., Piontkivska, H., Karmakar, M., Bogan, A.E., Blier, P.U. y Hoeh, W.R. 2009. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* 183: 1575-1589

Breton, S., Stewart, D.T., Shepardson, S., Trdan, R.J., Bogan, A.E., Chapman, E.G., Ruminas, A. J., Piontkivska, H. y Hoeh, W.R. 2011. Novel protein genes in animal mtDNA: a new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Mol. Biol. Evol.* 28: 1645-1659

Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D.T. y Hoeh, W.R. 2011. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae). *PLoS ONE* 6: e19365. doi:10.1371/journal.pone.0019365

Cao, L., Kenchington, E.L. y Zouros, E. 2004. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics Society of America* 166: 883-894

Dalziel, A.C. y Stewart, D.T. 2002. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Genome* 45: 348-355

Drummond, L., Mulcahy, M. y Culloti, S. 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture* 254: 326-340

Ghiselli, F., Milani, L. y Passamonti, M. 2011. Strict sex-specific mtDNA segregation in the germ line of the DUI species *Venerupis philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mol. Biol. Evol.* 28: 949-961

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. *Mol. Biol. Evol.* 29: 771-786

Goulletquer, P. 2005. *Ruditapes philippinarum*. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Departamento de Pesca y Acuicultura.

- Hurtado, N.S., Pérez-García, C., Morán, P. y Pasantes, J.J. 2011. Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain. *Acuaquulture* 311: 123-128
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies – The next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31-46
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M.G. y Passamonti, M. 2011. Doubly uniparental inheritance of mitochondrial as a model system for studying germ line formation. *PloS ONE* 6: e28194. doi:10.1371/journal.pone.0028194
- Milani, L., Ghiselli, F. y Passamonti, M. 2012. Sex-linked mitochondrial behaviour during early embryo development in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia Veneridae) a species with the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondria. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 318:182-189
- Obata, M., Sano, N. y Komaru, A. 2011. Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Develop.Growth Differ.* 53: 878-886
- Quesada, H., Warren, M. y Skibinski, D.O.F. 1998. Nonneutral evolution and differential mutation rate of gender-associated mitochondrial DNA lineages in the marine mussel *Mytilus*. *Genetics* 149: 1511-1526
- Stewart, D.T., Breton, S., Blier, P.U. & Hoeh, W.R. 2009. Masculinization events and doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA: A model for understanding the evolutionary dynamics of gender-associated mtDNA in mussels. *Evolutionary Biology*. Part 1:163-173
- Passamonti, M. y Scali, V. 2001. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Current Genetics* 39: 117-124.
- Passamonti, M., Boore, J.L. y Scali, V. 2003. Molecular evolution and recombination in gender-associated mitochondrial DNAs of the manila clam *Tapes philippinarum*. *Genetics* 164: 603-611
- Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M.B. y Zouros, E. 2007. Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* 62: 959-970

Yuan, Y., Li, Q., Yu, H. y Kong, L. 2012. The complete mitochondrial genome of six Heterodont bivalves (Tellinoidea and Solenoidea): Variable gene arrangements and phylogenetic implications. PLoS ONE 7: e32353. doi: 10.1371/journal.pone.0032353

Zouros, E. 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evol. Bio.* 40: 1-31