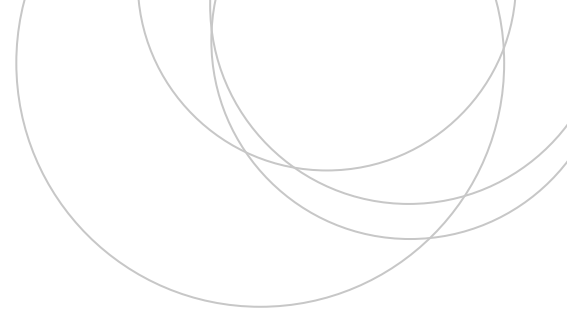




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología

DetECCIÓN DEL SEXO DE MITÍLIDOS POR MÉTODOS DE PCR CUANTITATIVA

Autor:

Peio Pascual Hernando

Director:

Enrique Navarro Adorno

© 2017, Peio Pascual Hernando todos los derechos
reservados.

Leioa, 27 de Julio de 2017

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	2
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1.1 Herencia mitocondrial en el reino animal: Un solo genoma.	
1.2 Herencia doble uniparental. Funcionamiento.	
1.3 Dificultades del sexado de bivalvos y soluciones diagnósticas basadas en DUI	
1.4 Objetivos del trabajo	
2. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	6
2.1 Recolección y manipulación de los especímenes.	
2.2 Métodos histológicos.	
2.3. Métodos de análisis genético.	
3. <u>RESULTADOS</u>	11
3.1 Análisis histológico y genético del tejido gonadal.	
3.2 Asignación del sexo basada en las ratios del tejido hemolinfático y su verificación mediante frotis del manto.	
4. <u>DISCUSIÓN</u>	16
4.1 Ratios F/M en gónada.	
4.2 Precisión de la técnica en tejido gonadal.	
4.3 Ratios F/M en hemolinfa.	
5. <u>CONCLUSIONES</u>	19
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	20
7. <u>ANEXO I</u>	23
8. <u>ANEXO II</u>	24

RESUMEN

La herencia doble uniparental (DUI) es una forma de herencia del genoma mitocondrial presente en ciertas familias de bivalvos, en virtud de la cual los individuos poseen dos tipos de DNA mitocondrial: uno heredado por línea paterna (M mtDNA) y otro por línea materna (F mtDNA). En este trabajo se explora la posibilidad de desarrollar un método molecular de sexado basado en este fenómeno, proponiéndose como objetivo cuantificar ambos tipos de mtDNA y utilizar sus proporciones relativas (F/M) para establecer el sexo de mejillones (*Mytilus galloprovincialis*). Para ello, mediante primers específicos se amplificó por qPCR un fragmento de la secuencia del citocromo b de ambos mtDNA en 30 muestras de tejido gonadal y 9 de hemolinfa, para posteriormente comparar los resultados del sexado por observación microscópica de la gónada con la determinación del sexo basada en las proporciones F/M en esos tejidos.

Los resultados de este experimento permiten concluir que la identificación del sexo por qPCR presenta un éxito del 83% y del 100%, en tejido gonadal y hemolinfa, respectivamente. De esta forma, la validez de este método queda demostrada, así como su aplicabilidad asociada a técnicas no letales de obtención de muestras, como es la extracción de hemolinfa.

ABSTRACT

In some bivalvian families, individuals inherit two types of mtDNA, one from their paternal ancestry and one from their maternal ancestry, following a model called Double Uniparental Inheritance (DUI). In this work, this phenomenon is explored, with the aim of quantifying these two types of mtDNA and measuring their relative proportions in order to determine sex in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). To this end, a fragment of the cytochrome b sequence was amplified using specific primers for each of the mtDNA types in 30 gonad samples and 9 hemolymph samples. Later, an histological examination was performed in order to ascertain the sex of each individual, in order to compare its results to the F/M ratio obtained via qPCR amplification.

The results of this experiment show that this technique correctly identifies the sex of the individuals in 83% and 100% of the cases, for gonad tissue and hemolymph respectively. Thus, the validity of this method is proven, as well as its applicability in conjunction with non-lethal tissue sampling techniques, like the extraction of hemolymph.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Herencia mitocondrial en el reino animal: Un solo genoma.

Una característica de las células eucariotas es el hecho de que la información genética que contienen se encuentra repartida entre el núcleo celular y varios orgánulos citoplasmáticos, principalmente las mitocondrias. Existe además una diferencia fundamental en la forma en que núcleo y orgánulos transmiten su información genética entre organismos eucariotas. En el caso del núcleo, la “célula hija” cuenta con material genético de ambos progenitores, mientras que los orgánulos celulares solo se transmiten por vía materna, puesto que aunque los gametos masculinos tengan mitocondrias, estas tienden a ser excluidas durante la fertilización o incluso degradadas en el cigoto. El hecho de que las mitocondrias se hereden exclusivamente por línea materna recibe el nombre de herencia materna estricta o SMI y tiene como consecuencia la aparición de un único tipo de genoma mitocondrial (Xu, 2005).

1.2 Herencia doble uniparental. Funcionamiento.

En los últimos 20 años, se han aportado evidencias de un modelo de herencia mitocondrial distinto en algunas especies de moluscos, en concreto en las familias *Donacidae*, *Hyriidae*, *Margaritiferae*, *Mytilidae*, *Solenidae*, *Unionidae* y *Veneridae* (Zouros et al., 1994a; Zouros, 2000; Breton et al., 2007; Theologidis et al., 2008). Cabe indicar que la mayor parte de la investigación en este campo se ha llevado a cabo en miembros del complejo *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*) (Mizi et al. 2005) y en *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum* (Ghiselli et al. 2011; Milani et al. 2011).

Según este modelo, llamado herencia doble uniparental (DUI), podemos encontrar dos tipos de genomas mitocondriales, identificables a partir de diferencias en algunos sitios clave de la secuencia nucleotídica (Mizi et al. 2005). Por un lado, el que llamaremos M mtDNA, únicamente existente en la línea germinal de los machos y, por otro, el DNA mitocondrial presente en la línea germinal de hembras, que recibe el nombre de F mtDNA. De entrada, es fundamental indicar que, en los tejidos somáticos tanto de machos como de hembras, predomina el F mtDNA, si bien en tejidos somáticos de machos también existe una cantidad detectable de M mtDNA. Ambos genomas son muy similares en cuanto a la estructura general que presentan y el orden de sus genes, pero difieren en un área concreta, denominada VR1 o primera región variable. La VR1 es un área que engloba el gen de la apoenzima citocromo b (*cob*) y la región de control del mtDNA del mejillón (Figura 1). En las especies del complejo *Mytilus*, el grado de divergencia de ambos genomas en la región VR1 es del 50% (frente al 20% en el caso de la molécula completa). Además, el M mtDNA posee una VR1 150 pares de bases más corta que el F mtDNA (Cao et al. 2004).

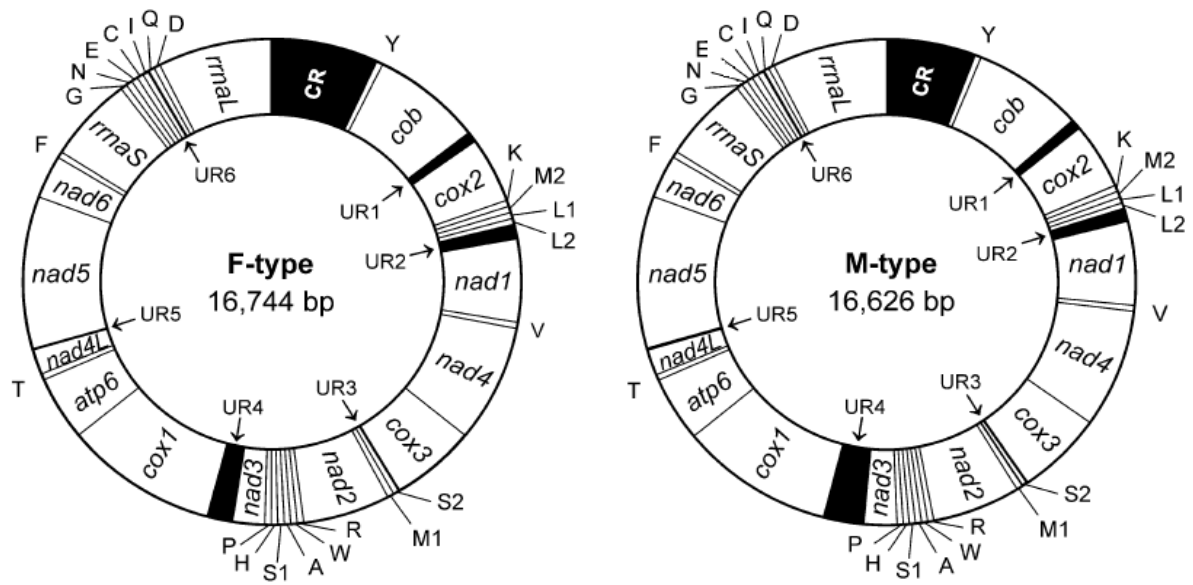


Figura 1. La estructura de los genomas mitocondriales es muy similar para ambos tipos, F y M. Las diferencias principales se encuentran en la secuencia de nucleótidos de zonas como la región de control (CR) o el citocromo b. Tomado de Mizi et al. 2005.

A fin de detallar más el modelo DUI de herencia mitocondrial se expondrán a continuación una serie de principios o reglas que sigue la transmisión de ambos genomas mitocondriales: Por un lado, el M mtDNA se transmite exclusivamente por los espermatozoides, encontrándose mayoritariamente en la gónada de machos. Por su parte, el F mtDNA se transmite exclusivamente por los óvulos, y se encuentra en la gónada de hembras, así como en los tejidos somáticos de machos y hembras.

Una vez que ocurre la fecundación, se ha observado que la distribución de mitocondrias provenientes de espermatozoides sigue dos patrones distintos en función del sexo del mejillón. Si el animal es macho, las mitocondrias siguen un “patrón agregado” según el cual se agrupan en un único blastómero, el que posteriormente dará lugar a la línea germinal. En el caso de las hembras, las mitocondrias se dispersan en el embrión, de forma que adoptan un “patrón disperso” y su distribución es aleatoria (Cao et al. 2004). Aun no se conocen en profundidad los mecanismos de esta distribución dependiente del sexo, pero se ha postulado que puede deberse a un factor específico que solo se expresaría en hembras (factor Z) durante la ovogénesis (Saavedra et al. 1997; Kenchington et al. 2002).

En conclusión, se ha observado que los machos transmiten su M mtDNA únicamente a los machos, y lo hacen por línea germinal, y que las hembras transmiten su F mtDNA tanto a las hembras como a los machos, de forma que acaba predominando en sus tejidos somáticos (Zouros, 2013).

1.3 Dificultades del sexado de bivalvos y soluciones diagnósticas basadas en DUI

La distinción entre sexos es del mayor interés en diversos ámbitos de estudio en bivalvos, puesto que machos y hembras pueden presentar profundas diferencias en el crecimiento, la fisiología e incluso en la pauta de acumulación de contaminantes (Sokolowski et al., 2004). Sin embargo, salvo en estudios del ciclo reproductor basados en la histología de la gónada, la identificación del sexo se omite con regularidad, incluso en investigaciones de carácter genético. La explicación radica en que la mayor parte de métodos de sexado están basados en la identificación microscópica de los gametos en la gónada, lo que solamente es posible durante ciertas épocas del año y en individuos que han alcanzado la madurez sexual. En consecuencia, se han realizado varios intentos de ofrecer métodos alternativos para esta identificación, con resultados diversos (Hines et al., 2007; Craft et al., 2010; Fraser et al., 2016).

El hecho de que, durante la segmentación, el M mtDNA se concentre en el blastómero que origina la línea germinal conlleva su presencia mayoritaria en el tejido gonadal de los machos, (aunque también se encuentra en proporciones considerables en el músculo abductor, ya que éste órgano, del mismo modo que la gónada, proviene del mesodermo). En ocasiones, se ha podido detectar la presencia de M mtDNA en tejidos de machos distintos de los mencionados, e incluso en hembras, mediante el uso de técnicas de gran precisión como la qPCR o la amplificación por PCR con tinción DIG (Garrido-Ramos et al., 1998; Dalziel et al., 2002). Dos hipótesis alternativas han sido elaboradas para explicar la creciente complejidad encontrada en el patrón de distribución del M mtDNA:

- "Sperm mtDNA leakage". Parte de la base de que la eliminación o la reclusión del M mtDNA en un solo blastómero no ocurre en el 100% de los casos, de forma que alguna mitocondria escapa ocasionalmente durante el proceso de embriogénesis y alcanza una presencia detectable en tejidos somáticos (Kyriakou et al., 2010).
- "Egg heteroplasmy". Generalmente, el óvulo sólo contiene F mtDNA. Esta hipótesis sostiene que en ocasiones puede contener también M mtDNA de forma residual, debido a que este M mtDNA materno se comporta como F mtDNA, por lo que se dispersa por el cuerpo del animal (Cao et al. 2004; Obata et al. 2006).

1.4 Objetivos del trabajo

Ya hemos visto que existe una diferencia en el comportamiento de los distintos mtDNA dependiendo del sexo de algunos moluscos bivalvos, que en la práctica se traducen en una diferencia en las cantidades relativas de uno y otro tipo. Existe bibliografía que repasa esta cuestión, pero está orientada en su mayoría a describir el fenómeno DUI, de modo que no se realiza suficiente énfasis en las posibles aplicaciones a la hora de establecer el sexo del animal (Garrido-Ramos et al. 1998; Dalziel & Stewart 2002; Batista et al. 2011; Obata et al. 2011).

El objetivo general de este trabajo es utilizar las proporciones relativas de M mtDNA y F mtDNA como marcador molecular del sexo en mejillones *Mytilus galloprovincialis*, a cuyo efecto se desarrolló una técnica de PCR cuantitativa para amplificar la región que, según la información bibliográfica disponible, permite diferenciar ambos tipos de mtDNA. Esta técnica se aplicó en los siguientes casos: a) Muestras del tejido del manto (lugar donde se desarrolla la gónada) en individuos supuestamente maduros y cuyo sexo era seguidamente identificado mediante observación histológica de la gónada. b) Muestras de hemolinfa extraídas de individuos supuestamente inmaduros, que sobrevivían a esta operación y alcanzaban la madurez sexual en el laboratorio, y cuyo sexo se establecía posteriormente mediante observación microscópica en frotis del tejido del manto.

En cuanto a los objetivos específicos, con el primer experimento se busca una validación del método molecular propuesto de sexado de los mejillones, tomando como referencia el método tradicional de observación histológica de la gónada; mientras que mediante el segundo experimento se evalúa en forma de prueba piloto la posibilidad de disponer de una técnica de sexado de individuos viables mediante un marcador molecular del sexo. El interés práctico de este segundo objetivo es que dicho método permitiría la segregación por sexos de los animales experimentales en estudios de diversa índole.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Recolección y manipulación de los especímenes.

Los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) destinados al análisis de muestras del manto se recogieron en el puerto de Plencia (N 43°25'17"; W 2°56'51") durante el mes de Septiembre de 2016, y fueron diseccionados el mismo día de su recolección. En el curso de la disección, se realizaron frotis del manto para intentar seleccionar individuos (de 6 cm de longitud aproximadamente) sexualmente maduros y aproximar una proporción 1:1 entre sexos. Además del tejido gonadal, objeto de este estudio, durante la disección se separaron otros tejidos (branquia, músculo abductor y glándula digestiva) que se congelaban y almacenaban para subsiguientes análisis.

En un muestreo anterior e independiente, realizado entre el 3 y el 4 de Septiembre de 2016, se recogieron en Getxo 9 mejillones sexualmente inmaduros de entre 5 y 5,5 cm de longitud para la extracción de hemolinfa. La extracción se realizó mediante una jeringuilla hipodérmica insertada en el seno hemolinfático a través del músculo abductor. Dado que la hemolinfa es un tejido pobre en células, se introdujeron en la jeringuilla 0,5 ml de anticoagulante Alsever's Solution (Sigma-Aldrich), para prevenir la pérdida de hemocitos por adherencia a las paredes del cilindro. El volumen de hemolinfa extraída varió entre 250 y 500 μ l.

Tras la extracción fueron mantenidos a 17°C y alimentados con una mezcla de dos algas, *Isochrysis galbana* y *Rhodomonas lens*, a una concentración de partículas equivalente a 2,5mm³/L de volumen empaquetado, ración adecuada para maximizar el crecimiento y la producción gonadal. Los mejillones permanecieron mes y medio en estas condiciones, hasta que se asumió que habían alcanzado la madurez sexual, momento en el cual se diseccionaron para realizar preparaciones de frotis a partir del manto.

2.2 Métodos histológicos

Tras la disección, las piezas de tejido gonadal, dispuestas individualmente en *cassettes* se fijaban durante 24 horas en líquido fijador (formaldehído 4%) y se deshidrataban en una serie de alcoholes de concentración creciente hasta su inclusión en parafina. Estas operaciones se realizaban de forma automática mediante un procesador de tejidos Leica ASP 300.

Se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de grosor usando un microtomo Leica RM2125 RTS, realizándose una selección de los mejores cortes de cada individuo antes de proceder a la tinción, con el objetivo de que la examinación al microscopio fuese lo más informativa posible, puesto que durante la disección se había advertido que las gónadas de algunos mejillones no mostraban gran presencia de gametos. La tinción de los cortes se realizó con un robot Leica Autostainer XL, desparafinando en xileno e hidratando mediante una serie de inmersiones en etanol de concentración decreciente, para luego aplicar hematoxilina y eosina. El protocolo y la configuración de los aparatos utilizados para la fase de tratamiento de muestras se adjuntan en el Anexo I (Tabla A1).

Para limitar en lo posible la subjetividad, la identificación del sexo en las secciones histológicas se realizó por duplicado (dos observadores), de forma que sólo se seleccionaron para la siguiente fase aquellos individuos en los que ambas identificaciones eran coincidentes.

2.3. Métodos de análisis genético

2.3.1. Extracción del DNA y cuantificación

Tras la determinación del sexo mediante histología se seleccionaron muestras del manto de 15 machos y 15 hembras para la extracción y cuantificación de su DNA, escogiendo aquellos cuya identificación resultó más evidente. Las extracciones se llevaron a cabo en el servicio SGIker de la UPV. La extracción se efectuó mediante un kit de NucleoSpin (Macherey-Nagel), realizándose a continuación una cuantificación de DNA de doble hebra (dsDNA) mediante fluorimetría, además de la cuantificación estándar de DNA total, realizada por espectrofotometría. La determinación del dsDNA, que es el que se amplifica en la qPCR, es necesaria para conocer la cantidad disponible y evaluar la necesidad de posteriores diluciones.

2.3.2. Análisis qPCR

a) Primers y optimización

Los primers utilizados para la amplificación por qPCR se presentan en la Tabla 1, y fueron tomados de Obata et al. 2011. Están basados en la secuencia del gen del Citocromo b que, como hemos visto en la introducción, difiere entre el mtDNA de tipo M y el de tipo F.

Tabla 1. Primers para la detección de M y F mtDNA, basado en Obata et al. 2011.

Genes mitocondriales		Secuencia
Citocromo b, tipo F	Forward	5' TTAATTCCTACGCTTCATACAGGTAAGTAC 3'
	Reverse	5' TTCATGTTAGGCTAATAAACCTTCCA 3'
Citocromo b, tipo M	Forward	5' AGGTTTGGGTCTATACTAGGTTTAAGGT 3'
	Reverse	5' TCGTGGGCAGTATAGTGAATTGAC 3'

El agente fluorescente utilizado para la cuantificación de los productos de la reacción fue SYBR Green, debido a que no requiere el uso de sondas, resultando el más adecuado para genomas con alta diversidad de nucleótidos como es el caso de *M. galloprovincialis* (Wares, J.P. & Cunningham, C.W. 2001).

Una correcta reacción de qPCR requiere condiciones que aseguren máxima eficiencia (100%) de amplificación, por una parte, y ausencia total de dímeros de primers y/o de amplificaciones inespecíficas por otra. Una eficiencia del 100% significa que, en cada ciclo de replicación, el DNA diana se duplica una vez, para lo cual es necesario que la cantidad de primers sea suficiente para la concentración de DNA de la muestra. Sin embargo, un exceso de primers promovería uniones entre sí en lugar de a su secuencia complementaria, formando lo que se conoce como dímeros de primers. A través de un procedimiento de optimización, se determinaron las proporciones óptimas de primers y DNA antes de comenzar con las reacciones de qPCR propiamente dichas.

b) Condiciones de la reacción

Cada pocillo de reacción poseía 20 µl totales, de los cuales 18 µl provenían de la mezcla de reacción (la solución acuosa que contiene el SYBR Green, los primers, y la DNA polimerasa) mientras que los 2 restantes correspondían a la muestra. Tras la optimización de la técnica para DNA extraído de gónadas, se determinó que la cantidad de muestra ideal era de 5ng/µl con una concentración de primers de 5pMol. En el caso del DNA extraído de hemolinfa, la cantidad de muestra ideal también se situó en 5ng/µl (salvo en un par de casos en los que la cantidad extraída era menor y no permitía alcanzar este valor), pero en este caso la concentración de primers fue de 4pMol.

Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) configurado como se especifica en la tabla A2 del anexo I, previo centrifugado de las placas a 4°C durante 5 minutos y a 1500x g, para eliminar posibles burbujas de aire que hubiesen podido formarse con el uso de las pipetas.

c) Curvas de reacción

El parámetro de referencia para medir el progreso de una reacción de qPCR es el valor Ct (Figura 2). Se trata de un valor absoluto que se define como el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia emitida alcance un valor umbral, que depende de la cantidad de fluorescencia “de fondo” (background fluorescence) y se configura de forma automática. En cuanto la curva de amplificación corta con este valor umbral, se considera que la emisión de fluorescencia es significativamente diferente a la fluorescencia de fondo, y por tanto, la señal obtenida es *real*. Dado que estos valores dependen de la cantidad de DNA diana inicial (a mayor cantidad de DNA de partida, mayor fluorescencia se emitirá en los primeros ciclos de replicación y menos ciclos tardará en sobrepasar esa fluorescencia de fondo, y por tanto menor valor Ct), es de suma importancia que si una muestra se va a analizar tres veces, como es este caso, cada una de esas tres réplicas posea un valor Ct lo más próximo entre sí (idealmente incluso idénticos). A fin de garantizar esto, se establece el criterio de que la desviación estándar de las tres réplicas no debe superar el valor de $\pm 0,3$.

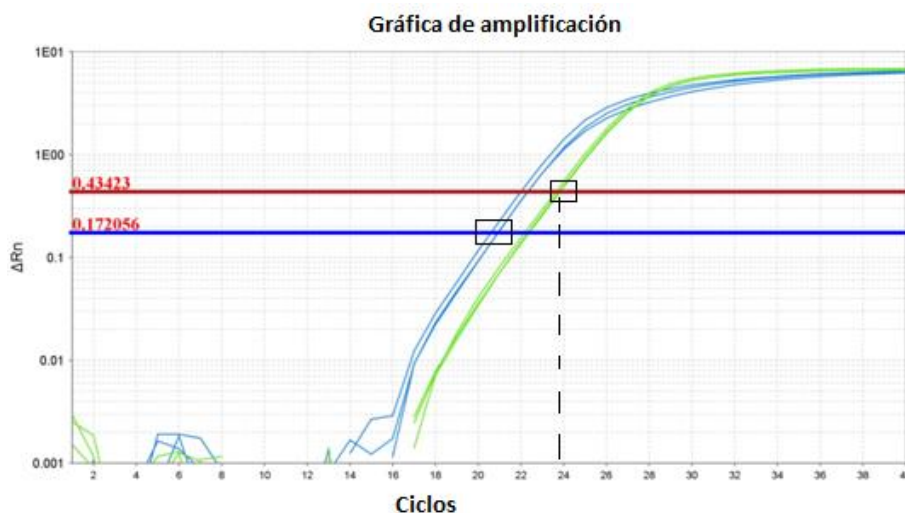


Figura 2. Gráfica de amplificación para una muestra de gónada elegida al azar. La curva de color azul corresponde a la amplificación de F mtDNA y la verde a la de M mtDNA. Los rectángulos pequeños negros señalan los puntos de corte con las líneas umbral para cada curva, y la línea discontinua señala dónde se situaría el valor Ct en esa curva. El rectángulo rojo amplio muestra una pequeña señal típica de dímeros de primers. Las curvas corresponden a un individuo macho (PLAU 16 39 MN).

En el ejemplo de la muestra PLAU 16 39 MN (Figura 2), las tres M_{Ct} son: 23,78, 23,83 y 23,643, lo cual genera una media de 23,754 y una DE de $\pm 0,099$, que cumple correctamente con

este criterio; lo mismo ocurre con las tres réplicas de F_{Ct} ($\mu=20,826$ $DE= \pm 0,167$). Realizar las reacciones de qPCR para cada conjunto de primers por triplicado permitía retener dos de los valores cuando el tercero era discrepante, a fin de que no se superase ese límite de desviación.

Las rectas patrón de qPCR se confeccionaron a partir de los valores de Ct determinados para sucesivas diluciones de un *pool* de DNA (Tabla 2). Para obtener una cantidad de *pool* final adecuada, se tomaron 5 μ l de cada muestra, (ya que al ser 30 muestras en total, el volumen final hubiese sido de 30 μ l en caso de solo haber tomado 1 μ l). Sin embargo, la concentración de este *pool* estaba en unidades de ng/5 μ l (por haber tomado 5 de cada muestra), por lo que después fue necesario diluirlo 5 veces. De esta forma se obtuvo el valor de 764,7 ng/ μ l, que se consideró una muestra representativa de la cantidad media de DNA del conjunto de muestras.

Tabla 2. Diluciones crecientes del pool original de DNA, y valores de Ct que corresponden a cada dilución. El valor numérico al lado de la p indica el factor de dilución: e.g., p10 es el pool original diluído 10 veces, así sucesivamente.

	p	p10	p20	p50	p100	p200
[DNA] (ng/ μ l)	764,7	76,47	38,235	15,294	7,647	3,8235
LOG10[DNA]	2,88349109	1,88349109	1,582461095	1,184521	0,883491	0,582461
Ct M mtDNA	16,267	18,675	19,684	20,786	22,019	23,011
Ct F mtDNA	11,309	13,954	14,757	15,713	17,160	18,451

Las rectas patrón se utilizan principalmente para estimar la eficiencia de la reacción, pero también permiten estimar el contenido en ng/ μ l de una muestra concreta, siempre y cuando el rango de diluciones sea lo suficientemente amplio. La Figura 3 muestra las rectas patrón obtenidas para la amplificación del FmtDNA y MmtDNA de las sucesivas diluciones de *pool* mediante ajuste semilogarítmico.

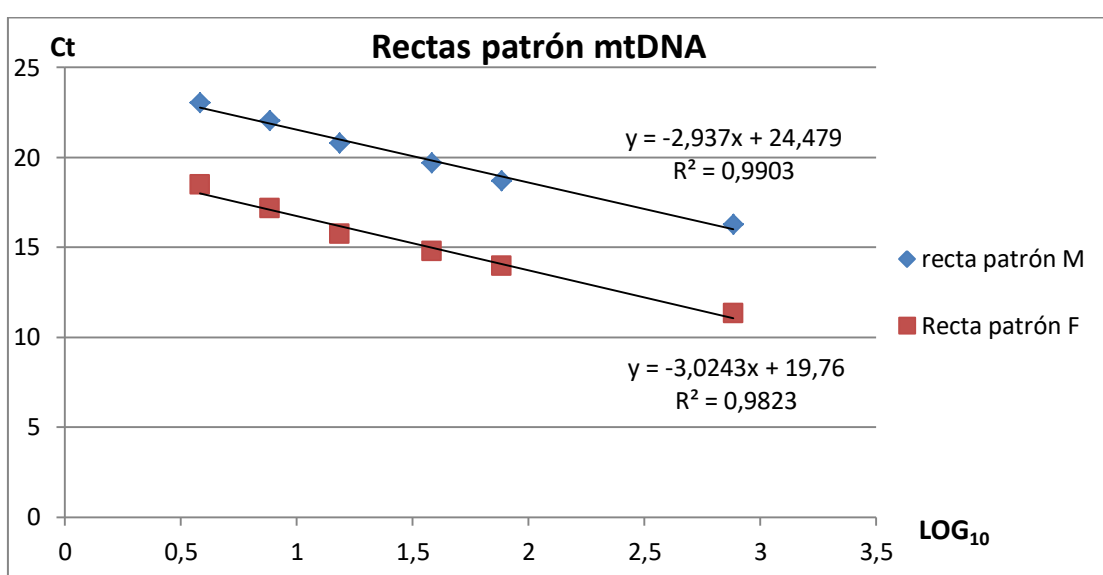


Figura 3. Representación gráfica de los valores Ct frente a los logaritmos decimales de las concentraciones obtenidas por dilución del pool inicial de DNA. El coeficiente de determinación (R^2) indica la bondad del ajuste. La pendiente de la ecuación sirve para el cómputo de la eficiencia.

El cálculo de la eficiencia de reacción se realiza de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$(1) \quad E(\%) = \left(10^{(1/-m)} - 1\right) \times 100$$

Donde m es la pendiente de la recta (Figura 3).

En este caso, las eficiencias obtenidas para ambas reacciones están en torno al 120%, lo que en la práctica significa que se ha alcanzado la eficiencia máxima (100%)

2.3.3 Obtención de la ratio F/M

Las proporciones relativas de F mtDNA y M mtDNA o ratio F/M se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$(2) \quad F/M \text{ de cada individuo} = \frac{\frac{1}{(1+E)^{(F_{Ct})}}}{\frac{1}{(1+E)^{(M_{Ct})}}}$$

Donde los valores F_{Ct} y M_{Ct} representan la media de los valores de Ct para las tres réplicas realizadas por individuo y tipo de mtDNA diana y E la eficiencia de la reacción. En este modelo se interpreta que, con una eficiencia de 1 (100%), obtendríamos para los denominadores de ambas fracciones la expresión 2^{Ct} , la cual representa el número de duplicaciones necesarias para alcanzar el umbral de fluorescencia predefinido (estandarizado por el aparato termociclador). Por lo tanto, su valor inverso representa la abundancia de mtDNA de tipo F o M en la muestra original, puesto que cuanto mayor sea esa abundancia menos duplicaciones resultan necesarias para alcanzar el umbral (es decir, será menor el valor Ct). En resumen, esta expresión se utilizó para obtener un estimado de la relación entre la cantidad de mtDNA de tipo F frente al de tipo M, asumiendo que en todos los pocillos de reacción se había añadido el mismo contenido en ng/ μ l. Al tratarse de una ratio entre dos medidas de la misma muestra, el método no requiere cuantificar exactamente la cantidad de DNA añadido en cada pocillo, lo que hubiese encarecido el procedimiento sin aportar más información.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis histológico y genético del tejido gonadal

Los resultados del análisis histológico de las muestras de gónada se adjuntan en la tabla 3.

Tabla 3. Asignación de sexo y grado de certeza de las muestras codificadas como PLAU 16, (Plentzia-Autumn 2016) seguido del número asignado durante la disección del manto(MN).

Muestras hembra	Certeza	Muestras macho	Certeza
PLAU 16 2 MN	3	PLAU 16 3 MN	1
PLAU 16 4 MN	2	PLAU 16 5 MN	1
PLAU 16 7 MN	1	PLAU 16 6 MN	1
PLAU 16 8 MN	1	PLAU 16 10 MN	1
PLAU 16 9 MN	1	PLAU 16 11 MN	1
PLAU 16 13 MN	1	PLAU 16 12 MN	1
PLAU 16 14 MN	2	PLAU 16 17 MN	1
PLAU 16 22 MN	1	PLAU 16 19 MN	1
PLAU 16 24 MN	1	PLAU 16 20 MN	1
PLAU 16 25 MN	1	PLAU 16 23 MN	1
PLAU 16 26 MN	2	PLAU 16 30 MN	1
PLAU 16 27 MN	1	PLAU 16 35 MN	1
PLAU 16 33 MN	1	PLAU 16 37 MN	1
PLAU 16 34 MN	2	PLAU 16 36 MN	1
PLAU 16 38 MN	3	PLAU 16 39 MN	1

El grado de certeza al que se hace referencia fue determinado en base a las asignaciones por frotis y al doble examen “ciego” de los cortes histológicos. La asignación de certeza de grado 1 corresponde a las muestras en las que el doble examen arrojó resultados idénticos; coincidentes además con los resultados de la prueba de frotis. El grado 2, en cambio, se le asignó a aquellas muestras en las que la identificación del sexo no era totalmente obvia, aunque los resultados del doble examen fuesen coincidentes. En el caso de las muestras con certeza de grado 3, el sexado fue especialmente problemático ya que el doble examen arrojó resultados ambiguos al no poder identificarse estructuras que apuntasen a un sexo o a otro de forma inequívoca. Aunque se evitó, en la medida de lo posible, incluir muestras de grado 3 de certeza en el examen histológico, debido al limitado grado de madurez sexual en la época de muestreo, no se logró el número deseado de 15 hembras identificadas con absoluta certeza. Estas muestras fueron revisadas posteriormente en una tercera examinación aún más minuciosa, tras realizar el análisis genético, puesto que se encontró una discrepancia entre la asignación histológica y genética en una de ellas.

En la figura 4 se representan, por separado, las curvas de amplificación de M mtDNA y F mtDNA de las 30 muestras de gónada (15 hembras y 15 machos), en forma de curvas Ct. Examinadas en detalle, estas líneas ilustran acerca de la calidad de las curvas en sí mismas y de la bondad de las réplicas.

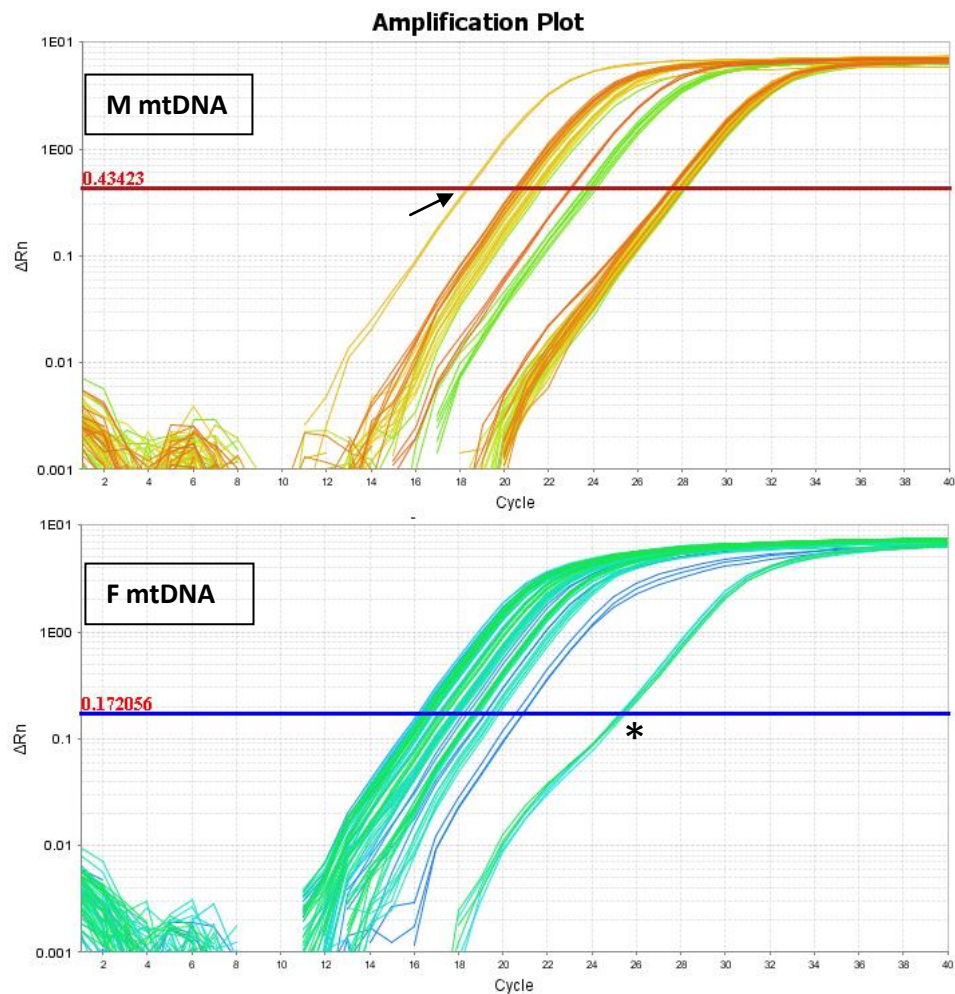


Figura 4. Curvas de amplificación de M mtDNA (gráfica superior) y F mtDNA (gráfica inferior). La flecha negra (gráfica superior) señala los valores C_t coincidentes de dos réplicas de la misma muestra, para la que la tercera réplica era claramente discrepante, por lo que fue omitida y no se muestra. El asterisco (gráfica inferior) señala un grupo de 6 curvas (2 muestras) cuyos valores C_t aparecen notablemente desplazados del grupo principal.

Como se ha indicado en la sección anterior, el objetivo fue obtener, al menos, 2 réplicas viables de cada amplificación, M_{C_t} y F_{C_t} , lo cual se consiguió en 29 muestras de un total de 30. Además, en 14 de estas 29 muestras, todas las réplicas fueron viables (en la figura se recogen sólo las réplicas que cumplieron este requisito de calidad). La muestra restante, codificada como PLAU 16 3 MN, fue descartada, en principio, por diferir significativamente las tres réplicas de M_{C_t} entre sí. Sin embargo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de información posible sobre cada muestra, se trató de obtener un valor F/M con cada una de esas tres réplicas por separado (además de con la media de las 3) y en todos los casos se obtuvieron resultados acordes con lo esperado.

Tabla 4. Clasificación de las muestras del manto en orden creciente de valores de la ratio F/M. Salvo excepciones que se comentarán en la sección siguiente, el tejido gonadal de los machos (muestras en color azul) presentan ratios F/M notablemente inferiores quea las del tejido gonadal de las hembras, que se sitúan por encima de 1000.

Muestras	F/M	Identificación
PLAU 16 11 MN	1,48	Correcta
PLAU 16 20 MN	2,09	Correcta
PLAU 16 6 MN	3,50	Correcta
PLAU 16 19 MN	3,91	Correcta
PLAU 16 5 MN	4,08	Correcta
PLAU 16 7 MN	4,31	Subsanado
PLAU 16 13 MN	4,38	Errónea
PLAU 16 23 MN	6,02	Correcta
PLAU 16 35 MN	7,03	Correcta
PLAU 16 39 MN	7,61	Correcta
PLAU 16 12 MN	9,83	Correcta
PLAU 16 30 MN	10,22	Correcta
PLAU 16 36 MN	23,32	Correcta
PLAU 16 2 MN	84,83	Subsanado
PLAU 16 3 MN	88,02	Correcta
PLAU 16 37 MN	206,59	Correcta
PLAU 16 17 MN	581,99	Correcta
PLAU 16 25 MN	1095,04	Correcta
PLAU 16 24 MN	1126,65	Correcta
PLAU 16 9 MN	1550,30	Correcta
PLAU 16 4 MN	1814,87	Correcta
PLAU 16 27 MN	1908,25	Correcta
PLAU 16 10 MN	2041,72	Errónea
PLAU 16 8 MN	2098,72	Correcta
PLAU 16 26 MN	2303,40	Correcta
PLAU 16 14 MN	2383,56	Correcta
PLAU 16 33 MN	2680,48	Correcta
PLAU 16 22 MN	2859,46	Correcta
PLAU 16 38 MN	3205,25	Correcta
PLAU 16 34 MN	3608,13	Correcta

El último paso en el análisis de las muestras de gónada fue utilizar las medias muestrales de Ct para F mtDNA y M mtDNA (F_{Ct} y M_{Ct}) en el calculo de una proporción F/M, de acuerdo con la fórmula (2) (Ver Anexo II para el desglose de estos cálculos). Los valores resultantes se muestran en la Tabla 4, en en orden creciente de esa ratio asociados al individuo del que procedía la muestra y cuyo sexo fue asignado, con mayor o menor certeza, por observación histológica.

Los resultados muestran una tendencia clara del tejido gonadal macho a mostrar ratios F/M bajos, por debajo de 600, mientras que las hembras tienden a presentar ratios F/M muy altos, entre 1000 y 4000. Las excepciones a esta regla, como es el caso de las muestras números 2, 7, 10 y 13, serán objeto de discusión en la próxima sección, así como el caso de la muestra número

3, donde resultó imposible determinar con precisión un valor medio de Ct por elevada discrepancia entre réplicas, pero cuyas ratios F/M encajan en el rango de valores característico de machos. En resumen, de entrada y a reserva de un examen más detallado de los datos anómalos, esta técnica permite una clara separación entre mejillones macho y hembra en 25 muestras de 30; es decir, identifica el sexo con un 83% de éxito.

3.2 Asignación del sexo basada en las ratios F/M del tejido hemolinfático y su verificación mediante frotis del manto.

Tabla 5. Las muestras de hemolinfa se han codificado como #HMS, S por Survival, puesto que, como se pretendía, sobrevivieron a la extracción de hemolinfa y llegaron a madurar sexualmente. Se observan ratios F/M muy elevados debidos a la baja presencia de M mtDNA en este tejido.

Asignación del sexo (frotis)	FCt	MCt	Muestra	Ratio F/M	Identificación
Macho	18,34	34,31	1HMS	$6,4 \times 10^4$	Correcto
Macho	17,87	34,45	2HMS	$9,7 \times 10^4$	Correcto
Macho	18,34	34,65	3HMS	$8,1 \times 10^4$	Correcto
Macho	18,41	24,08	4HMS	50,9	Correcto
Macho	18,92	34,83	5HMS	$6,1 \times 10^4$	Correcto
Macho	19,34	35,58	6HMS	$7,7 \times 10^4$	Correcto
Macho	18,13	36,11	7HMS	$2,5 \times 10^5$	Subsanado
hembra	17,71	35,97	8HMS	$3,1 \times 10^5$	Correcto
hembra	17,94	36,79	9HMS	$4,7 \times 10^5$	Correcto

En la tabla 5 se presentan los valores medios de Ct de ambos mtDNA y las ratios F/M calculadas a partir de esos valores, junto con los resultados de asignación del sexo basada en la observación microscópica de frotis del manto. En concordancia con la condición somática del tejido hemolinfático, las ratios F/M obtenidos son en general muy altos, lo que implica que la presencia de M mtDNA es muy baja (incluso en los machos) en comparación con el F mtDNA. Aún así, también en este caso se aprecia un patrón claro de diferenciación entre sexos, según el cual los mejillones identificados como macho poseen ratios F/M un orden de magnitud inferiores a los identificados como hembras, con la excepción del individuo 7HMS cuya condición se discute en la sección siguiente.

4. DISCUSIÓN

4.1 Ratios F/M en gónada

Según se evidencia en la Figura 4, las curvas Ct presentan una distribución netamente diferenciada para cada tipo de mtDNA, con valores medios (\pm DE) de 25,26 (\pm 3,2) para M_{Ct} y 18,36 (\pm 2,3) para F_{Ct} que son significativamente diferentes. En función de las desviaciones calculadas, se concluye que el conjunto de las F_{Ct} estaban significativamente más próximas entre sí que el conjunto de las M_{Ct} (2,3 vs 3,2). Es importante señalar que esta mayor homogeneidad de la serie F_{Ct} se incrementa notablemente si se excluyen las dos muestras señaladas con * en la Figura 4, en cuyo caso la desviación estandar se reduce a \pm 1,2. Por consiguiente, los resultados de comparar las curvas de amplificación de ambos mtDNA en tejido gonadal indican, en primer lugar, que hay bastante más F mtDNA que M mtDNA para la misma cantidad de DNA extraído (recordemos que, en la práctica, mayores contenidos de DNA iniciales se reflejan en valores menores de Ct) y, en segundo lugar, revelan que la distribución de M mtDNA en los tejidos gonadales es notablemente más heterogénea que la de F mtDNA.

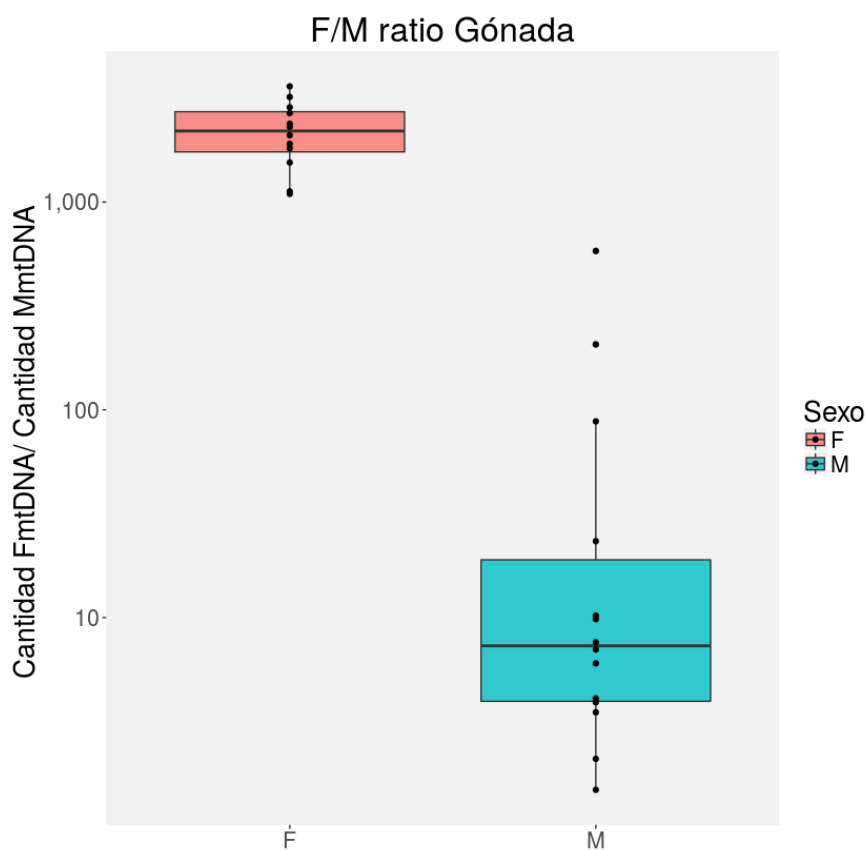


Figura 5. Valores de la ratio F/M en escala logarítmica. Las cajas representan el área donde se agrupan el 75% de las muestras, mientras que la barra horizontal señala la mediana. Para confeccionar este gráfico se han eliminado las 5 muestras problemáticas para acentuar la diferencia entre los rangos de valores F/M entre machos (M) y hembras (F) y mostrar así una situación de precisión del 100% (Markaide et al. 2017).

Siendo la identificación del sexo por medio de la ratio F/M un procedimiento esencialmente empírico, es importante señalar que la escasez de datos disponibles no permite determinar con precisión los rangos de valores F/M característicos de cada sexo. Es decir, aunque se ha establecido la tendencia a generar dos rangos sensiblemente diferentes, el valor de demarcación entre dichos rangos aún no ha sido determinado. De acuerdo con nuestros datos (Figura 5) ese valor podría situarse en torno a 1000 para el tejido gonadal de *Mytilus galloprovincialis*, lo que permitiría asignar el sexo masculino a cualquier individuo con una ratio F/M inferior a 1000, y el femenino a los individuos cuya ratio F/M supere ese valor.

4.2 Precisión de la técnica en tejido gonadal

La eficacia de la ratio F/M en tejido gonadal para la identificación del sexo se estimó en un 83% sobre la base de que se producía coincidencia con la asignación histológica en 25 de 30 casos. Sin embargo, una consideración más detallada de los 5 casos inciertos o discrepantes sugiere que la precisión del método puede superar ese porcentaje de éxito. En primer lugar, la muestra nº 3 generó réplicas de las curvas M_{Ct} muy diferenciadas, incompatibles con la estimación precisa de un valor medio. Sin embargo, las réplicas extremas dieron valores de F/M entre 8 para la curva $Ct=20$, y 750 para $Ct=27$ (valor medio de $F/M=88$ con una M_{Ct} media de 23,9), valores todos ellos incluidos en el rango característico de machos, y compatibles por tanto con la identificación histológica de este individuo como macho. En este sentido y a pesar de las limitaciones técnicas que presenta esta muestra, la asignación basada en sus estimaciones de la ratio F/M puede considerarse correcta.

En segundo lugar, existen 4 muestras a las que la qPCR discrepa del método histológico en la asignación del sexo. Dos de ellas (nº 10 y nº 13) se tuvieron que dar definitivamente por erróneas al no poder encontrar otra explicación que un sexado erróneo, pero las 2 restantes permitían un análisis más detallado utilizando los metadatos generados durante el estudio. La muestra nº 2 fue asignada histológicamente como hembra con baja certeza, pero la qPCR la asignó como macho. En vista de esta discrepancia se revisaron minuciosamente los cortes histológicos, que mostraban folículos vacíos correspondientes a una gónada post-freza (*spent*). En el curso de esta inspección pudieron encontrarse algunos espermatozoides residuales, por lo que se decidió dar por correcto el criterio del valor de F/M.

Por último, la muestra nº 7 presenta una ratio F/M típica de machos, pero fue asignada como hembra con un grado de certeza elevado. Por suerte, durante el proceso de optimización de las reacciones de qPCR se había realizado una prueba con 8 individuos entre los cuales estaba PLAU 16 7 MN (datos no mostrados). En esta prueba, que se puede dar por satisfactoria en

términos de calidad de reacción, los 8 individuos estudiados fueron correctamente identificados, teniendo esta muestra en concreto una ratio F/M de 6297 (frente al valor 4,31 de la segunda amplificación). Por ello, se asume que el resultado erróneo de la muestra 7 se debe a un error humano, ocurrido probablemente durante el pipeteo de la muestra en la placa de qPCR.

Como se ha visto, una examinación más precisa de los resultados ha logrado detectar y solucionar errores en el proceso de sexado. Si bien no pudo ser “corregida” la totalidad de las muestras, el porcentaje de éxito de este método se puede estimar en un 93%.

Recientemente se ha considerado la identificación del sexo por expresión y presencia de proteínas específicas de gametos, como VERL y VCL (Hines et al. 2007; Sedik et al. 2009; Craft et al. 2010), como un “*Gold standard*” (Fraser et al. 2016) entre las técnicas no histológicas, habiéndose propuesto como referencia con la que comparar otros métodos. La técnica descrita en este trabajo y ampliada en Markaide et al. 2017 (ver apartado 4.3) tiene posibilidades de convertirse en un nuevo estándar, sobre todo una vez validada su aplicación en muestras en estado de reposo sexual.

4.3 Ratios F/M en hemolinfa

Como ya se ha mencionado, se planteó la qPCR en hemolinfa como una prueba de carácter piloto, orientada a valorar la posibilidad de cuantificar mtDNA (del tipo que fuera), siendo el más esperable el de tipo F. Por ello, es destacable el hecho de haber detectado cantidades de M mtDNA en todas las muestras (si bien muy bajos en general), distintas además entre machos y hembras, lo que a su vez ha permitido identificar el sexo de estos animales. Este es un resultado muy prometedor como base de una técnica de sexado de mejillones sin sacrificarlos.

Para valorar adecuadamente la eficacia del método en tejido hemolinfático, queda pendiente precisar una cuestión con respecto al individuo 7HMS, cuya ratio F/M es característica de hembra pero que fue asignado como macho durante el frotis bajo la anotación de «asignado macho por hallarse presencia de espermatozoides, algunos móviles, pero también se detecta un óvulo». Según los protocolos estándar de frotis (Gagné et al. 2001; Fraser et al 2016), el sexo se determina en función de los gametos encontrados, de forma que si predominan los espermatozoides, el sexo asignado es masculino.

En retrospectiva, es muy probable que ocurriese algún tipo de contaminación con los gametos de otro individuo, de forma que, dado que eran los espermatozoides los que predominaban, el resultado del frotis identificaba a un macho, a pesar de que el óvulo (gameto con menor movilidad y menos sospechoso de ser contaminante) era el verdadero indicador del sexo.

La técnica de frotis para estas muestras se escogió por su sencillez y conveniencia para una prueba piloto de estas características, pero tiene limitaciones de precisión importantes por lo que es razonable asumir, en este caso, la identificación basada en la ratio F/M.

Tras el éxito de esta prueba se decidió ampliar este enfoque, incorporándose ya la hemolinfa y la glándula digestiva al grupo de tejidos analizados (Markaide et al. 2017). En este nuevo estudio se lograron sexar con éxito 29 de 30 individuos usando los ratios F/M en tejido hemolinfático, mientras que la tasa de acierto en gónada y glandula digestiva fue del 100% (sin contar muestras que causaron problemas por bajas concentraciones de DNA).

5. CONCLUSIONES

1. Tras un examen minucioso de los datos, se concluye que la precisión de la técnica de qPCR en la asignación del sexo de los mejillones fue de un 93,3% (28 sobre 30) para las muestras de gónada, y de un 100% (9 sobre 9) para las muestras de hemolinfa, con la reserva, en el caso del tejido hemolinfático, propia del pequeño tamaño de muestra.
2. Por tanto, los resultados aportados en este trabajo indican que las proporciones relativas de F mtDNA y M mtDNA (en definitiva, ratios F/M) existentes en tejido gonadal y hemolinfático son una técnica válida para asignar el sexo de un animal con una precisión notablemente similar a la de los métodos histológicos estándar. Además, la comparación de este método con otros moleculares también resulta favorable.
3. La aplicabilidad de esta técnica en tejido hemolinfático posibilita un método de identificación del sexo en mejillones viables, puesto que tras una extracción cuidadosa y bajo estricto control alimenticio se obtuvo una supervivencia del 100%.
4. Si bien esta técnica ha resultado ser extremadamente prometedora, es necesario ampliar la investigación en este ámbito para validarla con otro tipo de muestras, como las almacenadas en biobancos, o tomadas a partir de mejillones clasificados como intersexo, recolectados en distintos estadios de desarrollo gonadal o en otras especies de bivalvos dotados de un sistema de herencia doble uniparental.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer especialmente a Pablo Markaide su inestimable formación y apoyo moral y técnico, tanto dentro como fuera del laboratorio.

La ayuda prestada por Eider Bilbao y Nerea Duroudier del laboratorio de Citología (Departamento de Zoología y Biología Celular) ha sido imprescindible para el aprendizaje, desarrollo y correcta valoración de la técnica aquí expuesta. Además, el autor agradece el apoyo técnico y humano de los SGIker (UPV/EHU).

BIBLIOGRAFÍA

1. Batista, F. M., Lallias, D., Taris, N., Guedes-Pinto, H., & 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(1), 24-29.
2. Breton, S., Beaupre, H. D., Stewart, D. T., Hoeh, W. R., & Blier, P. U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. *Trends in Genetics*, 23(9), 465-474.
3. Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., & Rodakis, G. C. (2004). Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics*, 167(2), 835-850.
4. Cao, L., Kenchington, E., & Zouros, E. (2004). Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics*, 166(2), 883-894.
5. Craft, J. A., Gilbert, J. A., Temperton, B., Dempsey, K. E., Ashelford, K., Tiwari, B., ... & Chipman, J. K. (2010). Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns. *PLoS one*, 5(1), e8875.
6. Dalziel, A. C., & 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(2), 348-355.
7. Fraser, M., Fortier, M., Roumier, P. H., Parent, L., Brousseau, P., Fournier, M., ... & Vaillancourt, C. (2016). Sex determination in blue mussels: Which method to choose?. *Marine Environmental Research*, 120, 78-85.
8. Gagné, F., Marcogliese, D. J., Blaise, C., & Gendron, A. D. (2001). Occurrence of compounds estrogenic to freshwater mussels in surface waters in an urban area. *Environmental toxicology*, 16(3), 260-268.
9. Garrido-Ramos, M. A., Stewart, D. T., Sutherland, B. W., & Zouros, E. (1998). The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome*, 41(6), 818-824.
10. Ghiselli, F., Milani, L., & Passamonti, M. (2010). Strict sex-specific mtDNA segregation in the germ line of the DUI species *Venerupis philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Molecular Biology and Evolution*, 28(2), 949-961.
11. Hines, A., Yeung, W. H., Craft, J., Brown, M., Kennedy, J., Bignell, J., ... & Viant, M. R. (2007). Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. *Analytical Biochemistry*, 369(2), 175-186.

12. Kenchington, E., MacDonald, B., Cao, L., Tsagkarakis, D., & 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.
13. Kyriakou, E., Zouros, E., & Rodakis, G. C. (2010). The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species *Mytilus galloprovincialis*. *BMC research notes*, *3*(1), 222.
14. Markaide, P., Duroudier, N., Pascual P., Navarro, E., & Bilbao E. A promising gender determination method based on a single qPCR for mussels *Mytilus galloprovincialis*. Paper presented at: 19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 19); 2017 June 30-July 3; Matsuyama, Japan.
15. Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., & Rodakis, G. C. (2005). The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(4), 952-967.
16. Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M. G., & Passamonti, M. (2011). Doubly uniparental inheritance of mitochondria as a model system for studying germ line formation. *PLoS One*, *6*(11), e28194.
17. Obata, M., Kamiya, C., Kawamura, K., & Komaru, A. (2006). Sperm mitochondrial DNA transmission to both male and female offspring in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Development, growth & differentiation*, *48*(4), 253-261.
18. Obata, M., Sano, N., & Komaru, A. (2011). Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Development, growth & differentiation*, *53*(7), 878-886.
19. Sokołowski, A., Wołowicz, M., Hummel, H., Smolarz-Górska, K., Fichet, D., Radenac, G., ... & Namieśnik, J. (2004). Abnormal features of *Macoma balthica* (Bivalvia) in the Baltic Sea: alerting symptoms of environmental adversity?. *Marine Pollution Bulletin*, *49*(1), 17-22.
20. Saavedra, C., Reyero, M. I., & Zouros, E. (1997). Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, *145*(4), 1073-1082.
21. Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M. B., & 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.
22. Wares, J. P., & Cunningham, C. W. (2001). Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, *55*(12), 2455-2469.
23. Xu, J. (2005). The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome*, *48*(6), 951-958.
24. Zouros, E. (2000). The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes & genetic systems*, *75*(6), 313-318.
25. Zouros, E. (2013). Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, *40*(1), 1-31.

ANEXO I

Tabla A1. Protocolo de tratamiento de muestras para las máquinas utilizadas. Las dos columnas de la izquierda corresponden a la inclusión de las muestras en parafina, mientras que las dos de la derecha corresponden a la tinción de los cortes histológicos.

Protocolo Leica ASP300		Protocolo Leica Autostainer XL	
Reactivo	Condiciones	Reactivo	Condiciones
70° etanol	60 min a 40°C	Xileno	10 min x 2 veces
96° etanol	120 min a 40°C	Etanol 100° (puro)	2 min x 2 veces
100° etanol	120 min a 40°C	Etanol 96°	2 min
50° etanol:xileno (1:1)	60 min a 40°C	Etanol 70°	2 min
Xileno	120 min at 40°C	H ₂ O pura	5 min
96° etanol	60 min at 40°C	Hematoxilina de Harris	4 min
100° etanol	60 min at 40°C	Agua	4 min
Parafina	6 horas a 60°C	Etanol ácido	10 seg
		Agua	5 min
		Carbonato de Litio	10 seg
		Agua	1 min
		Eosina Y	1 min 30s
		Agua	1 min 30s
		Etanol 70°	5 seg
		Etanol 96°	10 seg
		Etanol 100° (puro)	35 seg
		Xileno	1 min x 2 veces

Tabla A2. Protocolo de configuración para el termociclador Viiia7.

Fase	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	50°C	2 min.
	95°C	10 min.
<i>Annealing</i> y extensión (40 ciclos)	95°C	15 seg.
	59°C	1 min.
	95°C	15 seg.
	59°C	1 min.
	95°C	15 seg.
	60°C	15 seg.

ANEXO II

Tabla A3. Valores de concentración de mtDNA junto con las medias Ct a partir de las cuales fueron calculados, asociados con el número de muestra y el ratio F/M que produjeron. Los datos se muestran ordenados por número de muestra y no por ratio F/M por facilidad de presentación.

Sample ID	FCt	[F mtDNA]	MCt	[M mtDNA]	F/M
PLAU 16 2 MN	16,626	9,89E-06	23,033	1,17E-07	84,83
PLAU 16 3 MN	17,453	5,57E-06	23,913	6,33E-08	88,02
PLAU 16 4 MN	16,735	9,17E-06	27,561	5,05E-09	1.814,87
PLAU 16 5 MN	18,738	2,29E-06	20,768	5,60E-07	4,08
PLAU 16 6 MN	18,736	2,29E-06	20,544	6,54E-07	3,5
PLAU 16 7 MN	25,457	2,17E-08	27,564	5,04E-09	4,31
PLAU 16 8 MN	16,583	1,02E-05	27,618	4,85E-09	2.098,72
PLAU 16 9 MN	17,374	5,89E-06	27,972	3,80E-09	1.550,30
PLAU 16 10 MN	16,536	1,05E-05	27,532	5,15E-09	2.041,72
PLAU 16 11 MN	17,826	4,30E-06	18,394	2,90E-06	1,48
PLAU 16 12 MN	18,063	3,65E-06	21,360	3,71E-07	9,83
PLAU 16 13 MN	18,836	2,14E-06	20,967	4,88E-07	4,38
PLAU 16 14 MN	16,755	9,04E-06	27,973	3,79E-09	2.383,56
PLAU 16 17 MN	18,788	2,21E-06	27,973	3,80E-09	582,06
PLAU 16 19 MN	19,537	1,31E-06	21,505	3,36E-07	3,91
PLAU 16 20 MN	19,771	1,12E-06	20,834	5,35E-07	2,09
PLAU 16 22 MN	16,403	1,15E-05	27,884	4,04E-09	2.859,46
PLAU 16 23 MN	25,446	2,19E-08	28,037	3,63E-09	6,02
PLAU 16 24 MN	17,777	4,45E-06	27,915	3,95E-09	1.126,65
PLAU 16 25 MN	17,908	4,07E-06	28,005	3,71E-09	1.095,04
PLAU 16 26 MN	16,875	8,32E-06	28,044	3,61E-09	2.303,40
PLAU 16 27 MN	17,205	6,62E-06	28,103	3,47E-09	1.908,25
PLAU 16 30 MN	17,889	4,12E-06	21,242	4,03E-07	10,22
PLAU 16 33 MN	16,640	9,79E-06	28,028	3,65E-09	2.680,48
PLAU 16 34 MN	16,306	1,23E-05	28,123	3,42E-09	3.608,13
PLAU 16 35 MN	18,404	2,88E-06	21,217	4,10E-07	7,03
PLAU 16 36 MN	19,263	1,59E-06	23,807	6,81E-08	23,32
PLAU 16 37 MN	16,403	1,15E-05	24,094	5,59E-08	206,59
PLAU 16 38 MN	16,514	1,07E-05	28,160	3,33E-09	3.205,25
PLAU 16 39 MN	20,826	5,38E-07	23,754	7,07E-08	7,61