



PCR en tiempo real para el sexaje y análisis citológico de la sinapsis del bivalente más pequeño en espermatoцитos en paquitenio de *Oreochromis niloticus*

Real-time PCR for sexing and cytological analysis of the synapsis of the smallest bivalent in pachytene spermatocytes of *Oreochromis niloticus*

Zulita Prieto*; Monica Arqueros; Linda Sánchez-Tuesta; David Salirrosas

Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Peru.

Received April 12, 2017. Accepted October 07, 2017.

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue dar a conocer nuevos marcadores moleculares para la PCR en tiempo real asociados a los cromosomas sexuales y el análisis de la sinapsis del bivalente más pequeño en espermatoцитos en paquitenio de *Oreochromis niloticus*. Se diseñaron cuatro pares de cebadores y se pusieron a prueba por PCR punto final y por PCR en tiempo real utilizando el fluorescente SYBR® Green en muestras de ADN de hembras XX, machos XY y supermachos YY. Los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR punto final fueron concordantes a los valores esperados y por PCR en tiempo real se demostró igual especificidad pero con ventaja en rapidez en la detección de amplificación de marcadores asociados a los cromosoma X y Y, de acuerdo con las condiciones de la PCR establecidas. Las diferencias genéticas entre las regiones de los cromosomas X y Y demostradas con los marcadores específicos no fueron perceptibles citológicamente en los espermatoцитos en paquitenio de *O. niloticus* XY. En base a las diferencias y homologías de las secuencias de ADN entre las accesiones KC710223 y KC710224 de los cromosomas X y Y se propone un modelo de sinapsis del bivalente XY.

Palabras clave: *Oreochromis niloticus*; tilapia; PCR en tiempo real; determinación del sexo; paquitenio.

Abstract

The aim of the present study was to report new molecular markers for real-time PCR associated with X and Y sex chromosomes, and perform analysis of the synapsis of the smallest bivalent in pachytene spermatocytes of XY male *Oreochromis niloticus*. Four pairs of primers were designed and were tested by endpoint PCR and real-time PCR using SYBR Green detection system in DNA samples from XX females, XY males and YY supermales. In order to assess the smallest bivalent synapsis, testicular samples from XY males were used to make chromosomal spreads in pachytene. Size range of fragments amplified by endpoint PCR was concordant with the expected values. Real-time PCR assay showed equal specificity but speed advantage in amplification detection of markers associated with X and Y chromosomes according to the established PCR conditions. Genetic differences between regions of the X and Y chromosomes (smallest bivalent) proven with specific markers were not cytological perceptible in pachytene spermatocytes from XY *O. niloticus*. A model of XY bivalent synapse was suggested based on the DNA sequences homologies and differences between KC710223 and KC710224 accessions from X and Y chromosomes.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; tilapia; real-time PCR; sex determination; pachytene.

1. Introducción

Oreochromis niloticus presenta el número diploide $2n=44$ de cromosomas (Supiwong *et al.*, 2013) al igual que otras especies del género *Oreochromis* (Feldberg *et al.*,

2003) y los cromosomas sexuales no presentan dimorfismo cromosómico (Oliveira y Wright 1998). Sin embargo, el sexo fenotípico diferenciado de los adultos y las proporciones de machos y hembras

* Corresponding author

E-mail: zapl99@yahoo.com (Z. Prieto).

© 2017 All rights reserved.

DOI: 10.17268/sci.agropecu.2017.04.05

en las progenies de los cruzamientos intraespecíficos constituyen evidencias de las diferencias genéticas entre ambos sexos. Para *O. niloticus* se reporta el digametismo masculino, sistema XY (Jalabert *et al.*, 1971; Lee *et al.*, 2003), contrariamente, para *O. aureus* el sistema propuesto es el digametismo femenino, sistema WZ (Avtalion y Don 1990; Cnaani 2013). El sistema de determinación del sexo en el género *Oreochromis* no está totalmente esclarecido.

Mair *et al.* (1991) propusieron el sistema monofactorial como mecanismo de determinación sexual en *O. niloticus*, sustentado en los estudios de distribución de frecuencias del ratio del sexo masculino y femenino evaluado en progenies de cruzamientos de machos YY, XY con hembras XX, progenies ginogénicas y manipulación de genomas por *shock* térmico. Por otra parte, Ser *et al.* (2009) sostienen el sistema multifactorial, con un conjunto de loci determinantes del sexo fenotípico para los cíclidos en general.

Los genes determinantes del sexo genético en *O. niloticus* tendrían su ubicación en los cromosomas sexuales y en un conjunto de genes autosómicos encargados de la morfogénesis gonadal, fisiológica y de comportamiento relacionados con el sexo masculino o femenino. A esto se sumaría el cambio de expresión de los genes determinantes del sexo en la primera etapa de diferenciación gonadal por efectos físicos o químicos, lo que da lugar a neohembras (ΔXY) o neomachos (ΔXX), cambios conocidos como reversión sexual (Abucay *et al.*, 1999).

Lee *et al.* (2003) evaluaron tres microsátelites, GM201, UNH995 y UNH104, que segregaron con los cromosomas sexuales y que estarían localizados próximos a los determinantes del sexo, en la región de ligamiento 1 (LG1). Mediante investigaciones de secuenciamiento y pruebas de hibridación in situ demostraron la existencia de un grupo de ligamiento identificado como LG1 en el par cromosómico más pequeño implicado en la determinación del sexo XY en *O. niloticus* y de un grupo de ligamiento

LG3 localizado en el par cromosómico de mayor tamaño, región donde se localizarían los genes del sistema WZ en *O. aureus* (Cnaani *et al.*, 2008). Palaiokostas *et al.*, 2013 reportaron dos marcadores, *Oni28137* y *Oni23063*, fuertemente asociados con el sexo fenotípico y establecieron que la región determinante del sexo abarca una distancia de 2 cM, que equivale aproximadamente a 1,2 Mb del LG1 en *O. niloticus*.

Recientemente, Sun *et al.* (2014) propusieron los marcadores SCARX y SCARY asociados a los cromosomas sexuales X y Y, respectivamente, y mediante pruebas de hibridación in situ localizaron a los marcadores SCAR en el grupo de ligamiento LG23, ubicado en el par cromosómico de menor tamaño del complemento cromosómico, concordante con lo reportado por Eshel *et al.* (2011, 2012). Habría dos grupos de ligamiento asociados a la determinación del sexo genético, el LG1 y el LG23 en *O. niloticus*.

Los estudios sobre la homología en los bivalentes en paquiteno de espermatocitos de *O. niloticus* XY refieren la asinapsis en la región terminal del bivalente 1 de mayor tamaño, con una frecuencia de 25,7% y sugieren que los cromosomas sexuales serían el par cromosómico 1 (Carrasco *et al.*, 1999). Ocalewicz *et al.* (2009) observaron inconsistencia en la región no apareada en el bivalente, es decir, reportaron al bivalente 1 totalmente apareado y en otros meiocitos al bivalente 1 con una región no apareada, y el mapa físico con los marcadores *OniY227* y *dmrt4*, no corresponden a las distancias de LG3 reportadas por Lee *et al.* (2005). Según Cnaani *et al.* (2008) y Lee *et al.* (2004), el mapa GL3 en la determinación del sexo está asociado a *O. aureus* y no a *O. niloticus*. Lee *et al.* (2011) trazaron mapas genéticos sobre la base de hibridación in situ (FISH) con sondas derivadas de clones con nuevos marcadores y encontraron que los cromosomas determinantes del sexo son los cromosomas más pequeños.

La búsqueda de marcadores moleculares con gran estabilidad asociados a la diferen-

ciación del sexo es necesaria para lograr el control reproductivo.

En este sentido, el objetivo de la presente investigación es proponer nuevos marcadores moleculares para PCR en tiempo real con SYBR Green asociados a los determinantes sexuales de los cromosomas X y Y de *O. niloticus* para diferenciar supermachos YY de los machos XY, así como en hembras XX y YY. Otro objetivo es mostrar la sinapsis de los bivalentes en espermatocitos en paquiteno de machos YY y de los híbridos XY del cruce de machos YY roja con hembras gris XX de *O. niloticus*.

2. Materiales y métodos

Material biológico. Se estudiaron individuos supermachos YY, machos XY y hembras XX de *Oreochromis niloticus* del Centro Experimental de Genética de la Universidad Nacional de Trujillo. Los peces fueron mantenidos de 24 a 26 °C, en condiciones de fotoperiodo natural. Fueron alimentados tres veces al día con alimento extrusado comercial (puritilapia) con 32% de proteína y se hicieron recambios diarios del agua.

Extracción de ADN. Se obtuvieron muestras de la aleta caudal de *O. niloticus*, de 10 individuos hembra XX, de 10 individuos machos XY y de 10 individuos machos YY, según el procedimiento de Cawthorn *et al.* (2011). La concentración de ADN genómico se determinó por espectrofotometría con una absorbancia de 260 nm y la pureza de la muestra se determinó con la relación 260/280 nm. El espectrofotómetro utilizado fue modelo Genesys 10Bio UV-Visible Thermo Fisher Scientific.

Amplificación por la PCR punto final. Se usaron los cebadores para los SCAR 5X y SCAR 5Y propuestos por Sun *et al.* (2014). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, SCAR-5F/5R-Y a 53 °C por 1 min, SCAR-5F-X/5R a 63 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y

extensión final a 72 °C por 7 min. Termociclador Veriti 96 marca Applied Biosystems. Los cebadores qPCR-X y qPCR-Y fueron amplificados de acuerdo con las condiciones citadas anteriormente, pero se varió la fase de hibridación, con una T_m de 60 °C para qPCR-X, T_m 60 °C para qPCR-Y, T_m 60 °C para qPCR-I y T_m 57 °C para el control interno *β actina*. Los productos amplificados fueron evidenciados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con SYBR Safe DNA. La lectura de los geles fue realizada con el equipo documentador de geles ChemiDoc XRS marca Bio-Rad. Los productos amplificados de los marcadores SCAR-5X y SCAR-5Y de muestras de *O. niloticus* del Centro Experimental de Genética, de la Universidad Nacional de Trujillo, fueron secuenciados y homologados con la base de datos del GenBank (Sun *et al.*, 2014), accesiones KC710223 y KC719224.

Diseño de cebadores para qPCR con SYBR Green. Los cebadores fueron diseñados con el software Primer 3 (software libre) teniendo en cuenta las secuencias de las accesiones antes mencionadas en las versiones KC710223.1 y KC719224.1 y los cebadores del control interno, tomando como base la secuencia del promotor accesión EF026001.1 del GenBank. Los cebadores y amplicones fueron verificados *in silico* con IDT (*Integrated Device Technology*) *OligoAnalyzer*.

Amplificación por la PCR en tiempo real (qPCR). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en cada muestra por triplicado en placas de 96 pocillos y termociclador 7500 de *Applied Biosystems*. Cada par de cebadores fue verificado sin plantilla de ADN para la comprobación de dímeros de cebadores en condiciones experimentales. También se comprobó la determinación de los valores Ct para cada par de cebadores y se analizaron las curvas de disociación de los amplicones generados. La reacción de amplificación fue de 20 µl, constituido por ADN molde 2 µl, 1 µl de cebadores en el master mix de *SYBR GreenER qPCR Super Mix Univesal*. Las temperaturas y ciclos de amplificación

fueron 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s; hubo variación solo en la fase de hibridación, como las indicadas anteriormente en la PCR punto final para cada par de cebadores.

Análisis de datos. Se demostró la eficiencia de la amplificación usando diluciones en serie de muestras de ADN con cada uno de los cebadores y la determinación del ciclo umbral (Ct) en función de la concentración de la muestra. La amplificación del control interno, gen autosómico, fue importante como control de la amplificación por qPCR en todos los individuos supermachos YY, machos XY y hembras XX.

Obtención de cromosomas en metafase. Se inyectó colchicina 0,05% por vía intramuscular la cantidad de 0,2 ml a cada individuo de peso promedio 120 g. Luego de 2 h de tratamiento los peces fueron sacrificados por punción cerebral, se extrajeron los riñones anteriores y se obtuvo una suspensión celular que se dejó en reposo por 25 min a temperatura de 37 °C. Posterior a este tiempo se centrifugó a 1000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se agregó fijador (alcohol absoluto: ácido acético en proporción de 3:1, respectivamente), luego de 10 min a temperatura de 4 °C se realizó la suspensión celular y fue centrifugado a 1000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó nuevo fijador y se dejó caer una o dos gotas sobre una lámina limpia y seca. Posteriormente fue coloreada con Giemsa al 2% en buffer fosfato pH 6,8 para su revisión al microscopio óptico OLYMPUS BX53, ocular 10X y objetivo 100X (Rivlin *et al.*, 1985).

Obtención de espermatozoides en paquitos. Se obtuvieron muestras de testículos de los individuos machos XY *O. niloticus* del cruce de machos YY con hembras genéticas XX. Los individuos en edad adulta fueron sacrificados por punción cerebral y las gónadas masculinas extraídas fueron colocadas en una solución de 0,075M de cloruro de potasio contenida en una luna de reloj. Inmediatamente, se procedió a seccionar transversalmente las

gónadas y la suspensión celular obtenida se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad y fue centrifugada a 800 rpm por 1 min. El sobrenadante de la muestra centrifugada fue vertido en otro tubo de la misma capacidad y se mantuvo en reposo por 27 min a 37 °C. Luego, se centrifugó a 800 rpm por 5 min y el precipitado fue resuspendido en una solución de Carnoy (alcohol absoluto y ácido acético en una proporción v/v de 3:1). Se dejó en reposo por 10 min y luego de realizar la resuspensión celular se volvió a centrifugar a 1000 rpm por 6 min; se eliminó el sobrenadante, se repitió este último procedimiento tres veces y se dejó caer una gota sobre cada lámina limpia y seca. Posteriormente, los extendidos cromosómicos fueron coloreados con Giemsa al 2% en buffer fosfato con un pH de 6,8.

Las observaciones se realizaron en microscopio óptico a magnificación de 1000X, se tomaron fotografías de las mejores vistas, enfocadas en el par cromosómico más pequeño del complemento diploide. Se revisaron 5 fotografías de cada individuo para estimar el número de espermatozoides con y sin sinapsis parcial o total. Se consideró 5 fotografías como representativo en cada individuo debido a que no hubo variaciones dentro y entre individuos.

3. Resultados y discusión

Se evaluaron 4 pares de nuevos cebadores por PCR en tiempo real con SYBR Green, un par asociados al cromosoma sexual X, un par asociados al cromosoma sexual Y, un par asociados a ambos cromosomas X y Y, y un par que corresponde a la secuencia promotora del gen β -actina. En la Tabla 1 se muestran los tamaños de fragmentos esperados y observados en el gel de agarosa 1,5%. Los productos amplificados por PCR punto final con los marcadores SCAR-5X y SCAR-Y fueron concordantes a los resultados de Sun *et al.* (2014). Sin embargo, con el marcador SCAR-5Y en algunos individuos machos mostró inconsistencia, probablemente por las diferencias en el Tm entre el cebador F con respecto al reverse.

Tabla 1

Secuencia de los cebadores de los marcadores qPCR asociados a los cromosomas X y Y y los tamaños de los fragmentos PCR esperados y observados en *Oreochromis niloticus*

Nombre	Secuencia de cebadores	Valor esperado* bp	Valor observado bp
qPCR-X (F/R)	5'ACATTCAGCCCACTTTGGTC 3' 5'TGAGACGTAGAGTTGAGGTTGC3'	124	~125
qPCR-Y (F/R)	5'GTAGAATAAAAAGAGATGATAGTGGA 5'CAGAAATGTAGACGCCCAAGG3'	123	~126
qPCR-I (F/R)	5'ACTAAAGCGGATTGGAAGTGTG3' 5'GCTTTGTGGAAAAGAACTGTTTCG3'	60	~ 60
β -actina (F/R)	5' TTAGTGCTGCTGCGATTAC3' 5' TGACAAACACCGGCTTTAGC3'	98	~103

*Base de datos del GenBank.

Los productos PCR secuenciados en los individuos utilizados en la presente investigación con los marcadores SCAR-X y SCAR-Y mostraron homología con las secuencias registradas en la base de datos del GenBank con las accesiones KC710223 y KC710224 para *O. niloticus*. Teniendo en cuenta la homología presentada entre las muestras secuenciadas con las accesiones KC710223 y KC710224 de *O. niloticus*, se diseñaron cebadores para PCR en tiempo real: cebadores para qPCR-X ubicadas en la región interna del SCAR 5FX-5R, que no tiene homología con la secuencia de la accesión KC10224 del cromosoma Y; los cebadores para qPCR-Y ubicadas en la secuencia interna de la accesión KC710224 del cromosoma Y, en

este caso, uno de los cebadores fue diseñado en la interrupción de la homología del Y con el X. Los cebadores del marcador qPCR-I se ubican en las secuencias homólogas del cromosoma X y el cromosoma Y (Figura 1).

En la Figura 2 se observan las bandas de los productos amplificadas por la PCR punto final en muestras de ADN de hembras XX, machos XY y machos YY. Con el marcador qPCR-X se registraron fragmentos PCR de tamaño ~125bp en las hembras XX y en los machos XY, banda que fue ausente en los machos YY (Figura 3.A) y con los cebadores del marcador qPCR-Y amplificaron solo en los machos YY y XY a Tm 60 °C, tamaño de fragmentos PCR en ~126 (Figura 2.B).

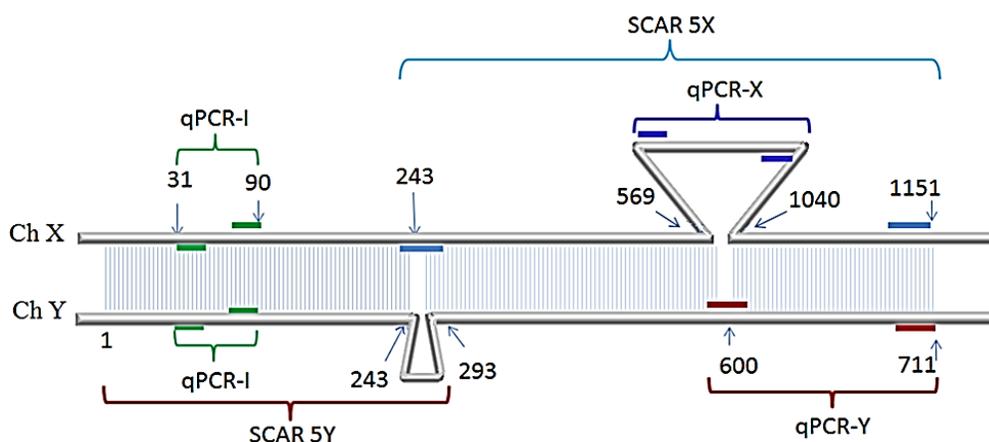


Figura 1. ■■ Secuencias homólogas entre el locus KC710223 específico para el cromosoma X y el locus KC710224 específico al cromosoma Y de *Oreochromis niloticus*. Marcador qPCR-X dentro de la secuencia del marcador SCAR5X, que no tiene secuencia alineada con la secuencia del cromosoma Y, Marcador qPCR-Y en el cromosoma Y, indicado por los cebadores (líneas de color rojo). El marcador qPCR-I indicado por los cebadores (líneas de color verde) en ambos cromosomas dentro del SCAR 5Y.

Con los cebadores qPCR-I se obtuvieron productos PCR de ~60bp en todos los individuos XX, XY y YY confirmando lo esperado (Figura 2.C); y, en la Figura 3.F se observan las bandas del control interno β -actina tanto en hembras como en machos (~103).

Como se demuestra en los resultados, los marcadores denominados qPCR-X, qPCR-Y, qPCR-I y qPCR- β actina existe correspondencia con los tamaños de fragmentos amplificadas esperados. Luego de la estandarización de los marcadores qPCR-X, qPCR-Y, qPCR-I y qPCR de β -actina con diferentes concentraciones de ADN por la PCR en tiempo real (Termociclador 7500, Applied Biosystems), se obtuvieron resultados concordantes a los productos obtenidos por PCR punto final. El marcador qPCR-X amplificó en las hembras XX y en los machos XY y la amplificación fue negativa en las muestras de los individuos YY (Figura 3. A y B); el marcador qPCR-Y amplificó solo en los machos XY y YY (Figura 3. C y D).

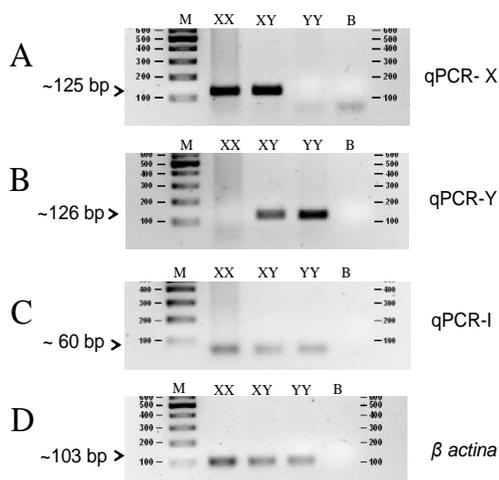


Figura 2. Amplicones de la PCR asociados a cromosomas sexuales Y y X en hembras XX, machos XY y machos YY de *Oreochromis niloticus*. A: Marcador qPCR-X. B: Marcador qPCR-Y. C: Marcador qPCR-I. D: Marcador β -actina. M: Marcador molecular 100 bp. B: Blanco.

Cabe resaltar que la temperatura de hibridación (T_m) debe ser 60 °C ya que a

menor T_m es posible la amplificación de la secuencia del cromosoma X por la posibilidad de mantener la hibridación parcial en el extremo 3' de uno de los cebadores.

En la Figura 3. E y F, se muestran los productos PCR tanto en las hembras XX como en los machos YY y de manera similar, la amplificación fue positiva en hembras y machos con los cebadores del control interno β -actina (C_t de $20,43 \pm 0,10$).

Los protocolos realizados con la PCR en tiempo real - SYBR Green demuestran especificidad, rapidez y sensibilidad asociados a los cromosomas sexuales X y Y, y por ser secuencias internas de las accesiones KC710223y KC710224, los loci de los marcadores propuestos estarían localizados en el par cromosómico más pequeño, como lo fue propuesto por Sun *et al.* (2014) en base a los estudios de segregación de marcadores SCAR con el sexo fenotípico y pruebas de hibridación in situ por fluorescencia (FISH). Propuesta de la ubicación de los loci determinantes del sexo dentro de LG23 en los cromosomas de menor tamaño fue anteriormente reportado por Lee *et al.* (2003), Ezaz *et al.* (2004), Cnaani *et al.* (2008).

En este sentido, se enfocó el estudio citológico de la determinación de apareamiento total de los cromosomas en el bivalente más pequeño y en todos los espermatoцитos XY evaluados se observó el mismo resultado. En la Figura 4.A, se muestran los 44 cromosomas en metafase de muestras de tejido renal de un individuo macho XY y en la Figura 4.B, se observa un espermatoцитo en paquiteno de un macho XY *O. niloticus*, en la que se señala el bivalente más pequeño en completa sinapsis.

En todos los espermatoцитos analizados se observó sinapsis total del bivalente más pequeño en los individuos machos XY y supermachos YY (Tabla 2). Aun cuando la resolución con la coloración Giemsa es gruesa, se puede asumir que no se presentaron diferencias en la sinapsis del bivalente más pequeño con el resto de bivalentes.

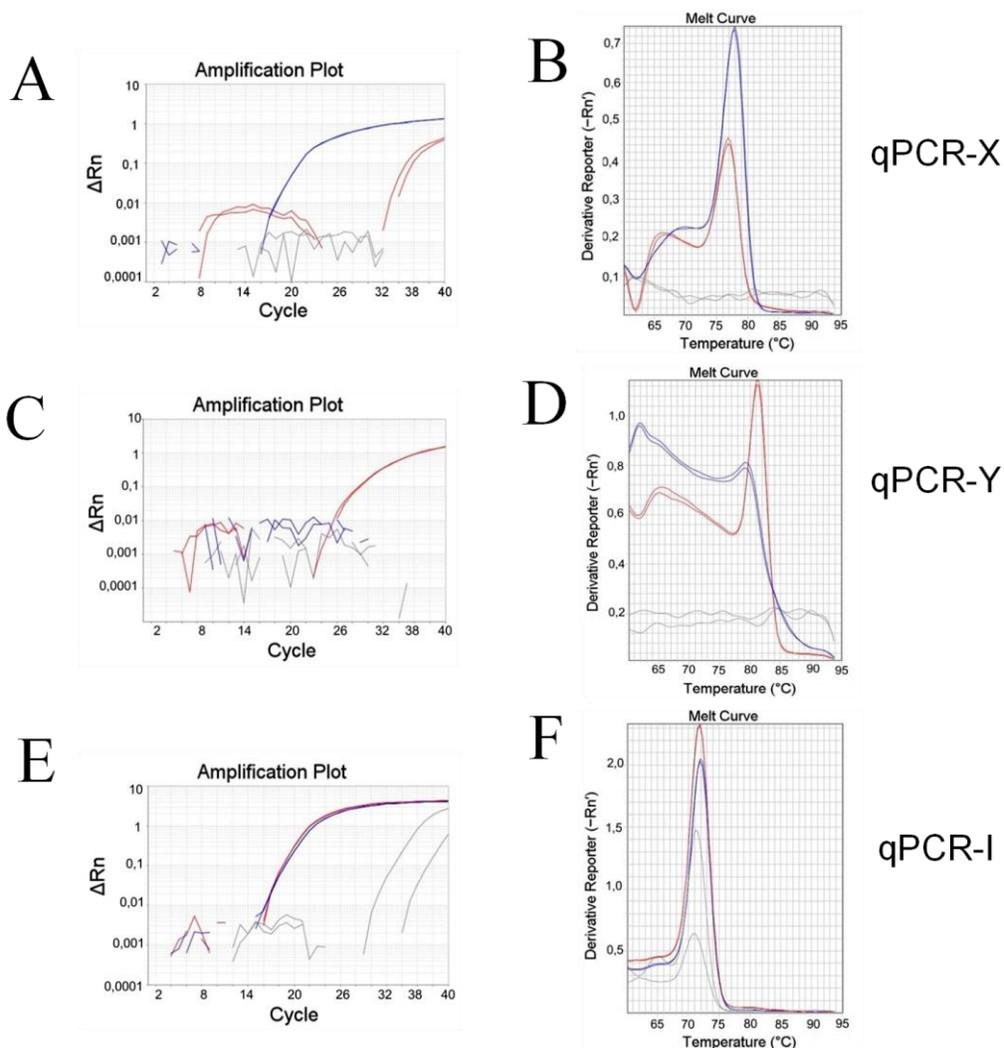


Figura 3. Curvas de amplificación y disociación de marcadores de la PCR en tiempo real en *Oreochromis niloticus*, hembras XX (curvas en azul) y machos YY (curvas en rojo). A y B: qPCR-X (Ct = 28,4 ± 0,80). C y D: qPCR-Y (Ct = 25,31 ± 0,74). E y F: qPCR-I (Ct = 26,50 ± 0,87).

Tabla 2

Porcentaje de espermatoцитos en paquiteno con sinapsis total del bivalente 22 en muestras coloreadas con Giemsa de machos XY y YY de *Oreochromis niloticus*

Individuos	Sexo fenotípico	qPCR-X	qPCR-Y	Bivalente 22 con sinapsis total		Bivalente 22 con asinapsis	
				N.º	%	N.º	%
Individuos XY	Masculino	+	+	25	100	0	0
Individuos YY	Masculino	-	+	25	100	0	0

n=5, 5 células en paquiteno por individuo.

Al revisar las figuras reportadas por Foresti y Oliveira (1993), de extendidos celulares de espermatoцитos de machos XY *O. niloticus* en la fase de paquiteno en alta resolución (microscopio electrónico) en la

que muestran el complejo sinaptonémico de los bivalentes se observa sinapsis total en el bivalente más pequeño y asinapsis parcial del bivalente de mayor tamaño (par 1).

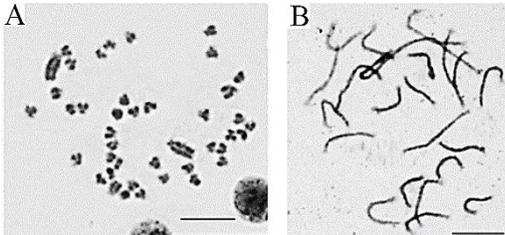


Figura 4. Cromosomas del híbrido F1 del cruce de *Oreochromis niloticus* macho YY con hembras XX *Oreochromis niloticus*. A: Metafase, 2n=44. B: Espermatocito en paquiteno, 22 bivalentes. Barra 10 µm.

Carrasco *et al.* (1999) reportaron la asinapsis de una región cromosómica del primer par de bivalentes de mayor tamaño en un porcentaje de 25,7% y bivalentes con apareamiento total en 74,3% y propusieron que los cromosomas sexuales serían los cromosomas de mayor tamaño. Ocalewicz *et al.* (2009) realizaron tinciones de bivalentes con DAPI y sondas de hibridación del gen *dmrt4* (FISH) y reportaron la señal en el bivalente 1 en *O. niloticus* y apoyaron la propuesta de Carrasco *et al.* (1999). Sin embargo, los estudios sobre la asinapsis parcial en paquitenos de espermatocitos de individuos XY no son del todo concluyentes, por el alto porcentaje de espermatocitos con sinapsis total en el bivalente de mayor tamaño. Por un lado, los cariotipos de cromosomas metafásicos en muestras de hembras y machos, tanto por coloración simple como con tinciones de bandeado de secuencias

repetidas por hibridación, no ponen de manifiesto diferencias citológicas distinguibles entre sí (Supiwong *et al.*, 2013) y en espermatocitos en paquiteno no se detectan diferencias citológicas en el bivalente más pequeño entre machos XY y machos YY. Por otro lado, se ha demostrado que existen diferencias en las secuencias de ADN en las regiones asociadas a los cromosomas sexuales X y Y a través de los marcadores utilizados en la presente investigación y la secuenciación realizada con los productos PCR obtenidos con los marcadores SCAR-5X y SCAR-5Y propuestos por Sun *et al.* (2014).

En este sentido, se propone un modelo de configuración de la sinapsis de los cromosomas sexuales en paquiteno en los individuos XY, utilizando para ello, las secuencias de los loci KC710223 y KC710224 en los cromosomas X y Y, respectivamente (Figura 5). Se muestran regiones apareadas entre los loci y las secuencias no homólogas formarían lazos de reducido tamaño que no son detectables citológicamente por coloraciones convencionales. Por la alta similitud de secuencias entre los cromosomas sexuales X y Y, y las reducidas secuencias de alelos específicos que los diferencian en las regiones determinantes del sexo es probable que ocurra similar configuración durante las fases de cigoteno y paquiteno de espermatocitos XY de *O. niloticus*.

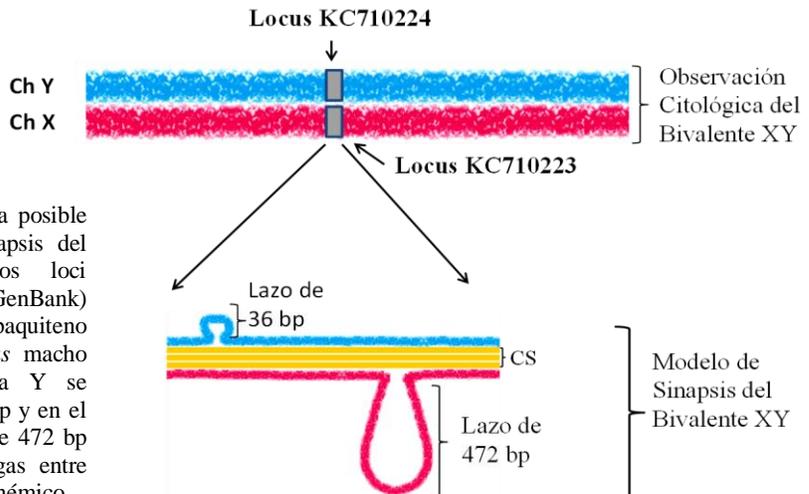


Figura 5. Esquema de la posible configuración de la sinapsis del bivalente XY de los loci KC710223/KC719224 (GenBank) en un espermatocito en paquiteno de *Oreochromis niloticus* macho XY. En el cromosoma Y se formaría un lazo de 36 bp y en el cromosoma X, un lazo de 472 bp (secuencias no homólogas entre sí). CS: complejo sinaptonémico.

La determinación del sexo fenotípico se daría por la expresión de genes existentes en el par cromosómico de menor tamaño y probablemente en los cromosomas de mayor tamaño. Sin embargo, habría solo un par de cromosomas que tendría el locus o loci que da la primera señal para la determinación del sexo. Por los antecedentes y los estudios realizados en machos YY y XY y hembras XX, se propone que tales genes estarían en el par más pequeño. Entre los genes candidatos en la determinación del sexo se reportó al gen *amh* (Eshel *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014), que fue anteriormente ubicado en el LG23 (Eshel *et al.*, 2011; Eshel *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares asociados a los cromosomas X y Y, constituyen herramientas para la identificación del sexo genético de reproductores para obtener las progenies deseadas de acuerdo con el tipo de cruces que se programe y de mayor importancia en los peces, por la frecuencia de casos de reversión sexual natural o inducida que se producen. En tilapia, se han registrado hembras XX y neohembras ΔXY y ΔYY fenotípicamente indistinguibles y funcionalmente fértiles; de manera similar, no es posible diferenciar a simple vista los machos XY, YY y neomachos ΔXX . Entre los factores físicos que afecta a los individuos, particularmente a las hembras, durante el período crítico de diferenciación gonadal, es la temperatura. Baroiller *et al.* (1995) reportaron la reversión de hembras XX a machos fértiles al ser expuestas a temperaturas de 36 °C y registraron una proporción de 81% de machos superior a la esperada (50%).

Investigaciones sobre los efectos de la temperatura en hembras XX han contribuido a identificar algunos genes que por la magnitud de su expresión consolidarían ya sea el sexo masculino o femenino. Poonlaphdecha *et al.* (2013) reportaron la expresión de los genes *foxl2* y *cyp19a1a* implicados en el desarrollo ovárico, y los genes *dmrt1* y *amh* asociados al desarrollo testicular y observaron un incremento significativo de los genes *dmrt1* y *amh* y represión del gen *foxl2* en las

hembras XX después de 17-19 días luego de la fecundación. De manera similar, la masculinización de hembras XX por efecto hormonal fue evidente y se reportó la activación de los genes *dmrt1* y *sox9a* (Kobayashi *et al.*, 2008).

Otros factores de regulación involucrados en la determinación sexual serían la presencia de microRNA (miRNA), pequeños ARN no codificantes que se expresan de manera diferencial entre sexos (Eshel *et al.*, 2014) o los procesos epigenéticos, como los procesos de metilación de promotores, que podrían activar o reprimir la expresión de los genes mayores determinantes de la masculinidad o femineidad. Sun *et al.* (2016) demostraron el incremento de niveles de metilación en varios cromosomas de ambos sexos de *O. niloticus* después de haber estado expuestos a altas temperaturas.

Las investigaciones sobre la reversión sexual de hembras XX a neomachos ΔXX , o de machos XY o YY a neohembras por factores ambientales o efectos epigenéticos y la alta homología entre los loci determinantes del sexo genético explicarían que las diferencias genéticas entre hembras y machos estarían reguladas por mecanismos de expresión diferencial más que por diferencias grandes entre los loci determinantes del sexo y en consecuencia la ausencia de dimorfismo citológico entre los cromosomas X y Y.

4. Conclusiones

La investigación aporta 4 pares nuevos de cebadores para PCR en tiempo real con SYBR Green; qPCR-X, que discrimina la presencia o ausencia del cromosoma X; qPCR-Y, que distingue la presencia o ausencia del cromosoma Y; cebadores qPCR-I y qPCR- β *actina* que amplifican en ambos sexos hembras XX y machos XY y YY utilizadas como control interno de amplificación. Los marcadores qPCR tienen mayor ventaja en sensibilidad, con posibilidades de cuantificación que los marcadores PCR punto final. Por la mayor magnitud de la homología que las dife-

rencias entre las secuencias de los cromosomas X y Y, la asinapsis en el bivalente más pequeño no fue detectada por la coloración Giemsa en los espermatozoides en paquiteno de los machos XY. Con técnicas más resolutivas, en futuras investigaciones, se podrían detectar las secuencias de ADN no homólogas a nivel citológico entre los loci determinantes del sexo genético en espermatozoides en paquiteno de machos XY *O. niloticus*.

Agradecimientos

Agradecemos al PhD Julio León por su asesoría en los diseños de cebadores y pruebas moleculares. Así también se agradece a los directivos de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) por las facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación. Proyecto financiado con recursos de CANON minero de la UNT Proyecto Mejoramiento genético de tilapia.

Referencias bibliográficas

- Avtalion, R.R.; Don, J. 1990. Sex-determining genes in tilapia: a model of genetic recombination emerging from sex ratio results of three generations of diploid gynogenetic *Oreochromis aureus*. *Journal of Fish Biology* 37: 167-173.
- Abucay, J.S.; Mair, G.C.; Skibinski, D.O.F.; Beardmore, J.A. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 173(1-4): 219-234.
- Baroiller, J.F.; Chourrout, D.; Fostier, A.; Jalabert, B. 1995. Temperature and Sex Chromosomes Govern Sex Ratios of the Mouthbrooding Cichlid Fish *Oreochromis niloticus*. *The Journal of Experimental Zoology* 273: 216-223.
- Carrasco, L.A.P.; Penman, D.J.; Bromage, N. 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture* 173: 207–218.
- Cnaani, A.; Lee, B.Y.; Zilberman, N.; Ozouf-Costaz, C.; Hulata, G.; Ron, M.; D'Hont, A.; Baroiller, J.F.; D'Cotta, H.; Penman, D.J.; Tomasino, E.; Coutanceau, J.P.; Pepey, E.; Shirak, A.; Kocher, T.D. 2008. Genetics of Sex Determination in Tilapiine Species. *Sex Dev* 2: 43–54.
- Cnaani, A. 2013. The Tilapias Chromosomes Influencing Sex Determination. *Cytogenetic and Genome Research* 141: 195-205.
- Cawthorn, D.M.; Steinman, H.A.; Witthuhn, R.C. 2011. Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa. *Food Control* 22(2): 231-244.
- Eshel, O.; Shirak, A.; Dor, L.; Band, M.; Zak, T.; Markovich-Gordon, M.; Chalifa-Caspi, V.; Feldmesser, E.; Weller, J.I.; Seroussi, E.; Hulata, G.; Ron, M. 2014. Identification of male specific *amh* duplication, sexually differentially expressed genes and microRNAs at early embryonic development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics* 15: 774.
- Eshel, O.; Shirak, A.; Weller, J.I.; Hulata, G.; Ron, M. 2012. Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *G3 (Bethesda)* 2(1): 35-42.
- Eshel, O.; Shirak, A.; Weller, J.I.; Slossman, T.; Hulata, G.; Cnaani, A.; Ron, M. 2011. Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Genet* 42(2): 222-4.
- Ezaz, M.T.; Harvey, S.C.; Boonphakdee, C.; Teale, A.J.; McAndrew, B.J.; Penman, D.J. 2004. Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Mar Biotechnol (NY)* 6(5): 435-445.
- Feldberg, E.; Porto J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 2003. Chromosomal change and adaptation of cichlid during evolution. In: A.L. Val and B.G. Kapoor (eds.). *Fish Adaptation*. Science Publishers, Inc., Enfield – NH, USA. pp 285-308.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Galetti, P.M.; De Almeida-Toledo, L.F. 1999. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome* 36: 1124-1128.
- Jalabert, B.; Kammacher, P.; Lessent, P. 1971. Déterminisme du sexe chez les hybrides entre tilapia macrochir et tilapia nilotica. Étude de la sex-ratio dans les croisements des hybrides de première génération par les espèces parentes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys* 11(1): 155-165.
- Kobayashi, T.; Kajiuura-Kobayashi, H.; Guan, G.; Nagahama, Y. 2008. Sexual Dimorphic Expression of DMRT1 and Sox9a during Gonadal Differentiation and Hormone-Induced Sex Reversal in the Teleost Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics* 237: 297-306.
- Lee, B.Y.; Penman, D.J.; Kocher, T.D. 2003. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim Genet* 34(5): 379-383.
- Lee, B.Y.; Coutanceau, J.P.; Ozouf-Costaz, C.; D'Cotta, H.; Baroiller, J.F.; Kocher, T.D. 2011. Genetic and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar Biotechnol* 13(3): 557-562.
- Lee, B.Y.; Hulata, G.; Kocher, T.D. 2004. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity* 92: 543-549.
- Lee, B.Y.; Lee, W.-J.; Streebman, J.T.; Carleton, K.L.; Howe, A.E.; Hulata, G.; Slettan, A.; Stern J.E.; Terai, Y.; Kocher T.D. 2005. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 170(1): 237-244.
- Li, C.G.; Wang, H.; Chen, H.J.; Zhao, Y.; Fu, P.S.; Ji, X.S. 2014. Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 177-178: 36-45.
- Mair, G.C.; Scott, A.G.; Penman, D.J.; Beardmore, J.A.; Skibinski, D.O. 1991. Sex determination in the genus *Oreochromis* 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). *Theoretical and Applied Genetics* 82: 144-152.
- Ocalewicz, K.; Mota-Velasco, J.C.; Campos-Ramos, R.; Penman, D.J. 2009. FISH and DAPI staining of the

- synaptonemal complex of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) allow orientation of the unpaired region of bivalent 1 observed during early pachytene. *Chromosome Research* 17(6): 773–782.
- Oliveira, C.; Wright, J.M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research* 6: 205-211.
- Palaiokostas, C.; Bekaert, M.; Khan, M.G.Q.; Taggart, J.B.; Gharbi, K.; McAndrew, B.J.; Penman, D.J. 2013. Mapping and Validation of the Major Sex-Determining Region in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD Sequencing. *PLOS One* 8(7): 1-9.
- Poonlaphdecha, S.; Pepey, E.; Canonne, M.; de Verdal, H.; Baroiller, J.F.; D’Cotta, H. 2013. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and Comparative Endocrinology* 193: 234-242.
- Rivlin, K.; Rachlin, J.W.; Dale, G. 1985. A simple method for the preparation of fish chromosomes Applicable to field work, teaching and banding. *J. Fish Biol.* 26: 267-272.
- Ser, J.R.; Roberts, R.B.; Kocher, T.D. 2009. Multiple interacting loci control sex determination in lake Malawi cichlid fish. *Evolution* 64(2): 295-602.
- Sun, L.X.; Wang, Y.Y.; Zhao, Y.; Wang, H.; Li, N.; Ji, X.S. 2016. Global DNA methylation changes in Nile Tilapia gonads during high temperature induced masculinization. *Plos One* 11(8): e0158483.
- Sun, Y.L.; Jiang, D.N.; Zeng, S.; Hu, C.J.; Ye, K.; Chao Yang, C.; Yang, S.J.; Li, M.H.; Wang, D.S. 2014. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 433: 19-27.
- Supiwong, W.; Tanomtong, A.; Supanuam, P.; Seetapan, K.; Khakhong, S.; Sanoamuang, L.O. 2013. Chromosomal Characteristic of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Mitotic and Meiotic Cell Division by T-Lymphocyte Cell Culture. *Cytology* 78(1): 9-14.