



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

“EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
DETERMINACIÓN SEXUAL DEL PEZ BLANCO DE
PÁTZCUARO *Chirostoma estor* (JORDAN, 1880)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. GUILLERMO ARMANDO CORONA HERRERA

ASESOR:

Dr. en C. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

COASESOR:

DR. CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO DEL 2013



Índice General		Página
I.	Abstract.	1
II.	Resumen.	2
III.	Agradecimientos.	3
1	Introducción.	5
1.1.	Mecanismos de determinación sexual en vertebrados.	6
1.1.1.	Determinación sexual genotípica (DSG) en vertebrados.	6
1.1.2.	Determinación sexual por temperatura (DST) en peces teleósteos.	8
1.2.	Mecanismos de diferenciación sexual de peces teleósteos.	10
1.3.	Importancia del modelo de estudio: El pez blanco de Pátzcuaro <i>Chirostoma estor</i> .	12
2	Objetivos.	15
2.1.	Objetivo general.	15
2.2.	Objetivos específicos.	15
3	Materiales y métodos.	16
3.1.	Sistema experimental.	16
3.2.	Metodología experimental.	17
3.3.	Análisis estadísticos.	20
4	Resultados.	21
4.1.	Calidad de agua.	21
4.2.	Tasa de eclosión, supervivencia y peso final promedio de las progenies.	21
4.3.	Descripción histológica de gónadas en el inicio de la diferenciación sexual.	22
4.4.	Descripción histológica de gónadas sexualmente diferenciadas.	23
4.5.	Proporción sexual fenotípica y respuesta térmica entre progenies.	24
5	Discusiones y conclusiones.	27
6	Bibliografía.	30
7	Anexo 1. Temperature-dependent sex determination in <i>Chirostoma estor</i> , a freshwater atherinopsid.	37

Índice de figuras

Figura 1.	Patrones de la determinación sexual por temperatura (DST) en peces.	9
Figura 2.	Producción de 17 β -estradiol por acción de la enzima aromatasa.	11
Figura 3.	Incubadora cilíndrica de PVC con capacidad de 6.3 litros para incubación de huevos y mantenimiento de larvas de <i>C. estor</i> .	16
Figura 4.	Procedimiento de obtención de huevos fertilizados de <i>C. estor</i> .	17
Figura 5.	Procedimiento experimental para evaluar el efecto de 14, 21 y 29° C en la proporción sexual fenotípica de <i>C. estor</i> .	18
Figura 6.	Procedimiento histológico para la determinación de la proporción sexual fenotípica en larvas de <i>C. estor</i> .	19
Figura 7.	Desarrollo temprano de la gónada en larvas de <i>C. estor</i> a 21°C.	23
Figura 8.	Aspecto histológico de testículos y ovarios en larvas de <i>C. estor</i> , expuestos a 14°C y 29°C .	24
Figura 9.	Respuesta térmica entre progenies de larvas de <i>C. estor</i> . cultivados experimentalmente a 14,21 y 29°C durante 30 dpe, y mantenidos hasta los 90 dpe en 21°C.	26

Índice de tablas

Tabla 1.	Datos de campo y laboratorio para la evaluación de DST en Atherinopsidos gonocoristas.	9
Tabla 2.	Calidad de agua en el sistema experimental para larvas de <i>C. estor</i> .	21
Tabla 3.	Tasa de eclosión, Tasa de supervivencia y Peso final promedio de las progenies de <i>C. estor</i> .	22
Tabla 4.	Proporción sexual fenotípica de las progenies de <i>C. estor</i> .	25



I. ABSTRACT

Chirostoma estor is an endangered freshwater atherinopsid endemic to central Mexico. In this work we investigated the presence of temperature-dependent sex determination (TSD) mechanisms that could be applied as a biotechnological tool for sex control in the culture of this species. This information could be useful also as a bioindicator of anthropogenic or climate change effects on its reproduction.

For this work gametes from three single pair broods were manually fertilized, immediately divided in three groups, and incubated at 14, 21, and 29°C. These thermal treatments were continued through hatching until 30 days after hatching (dah). All groups were then transferred to 21°C. About 40-60 fish per treatment were sampled at 90 dah and processed histologically to determine phenotypic sex ratios. Also to determine the onset of sexual histological differentiation at 21°C we sampled 20 larvae each week from hatching to 30 dah.

The proportions of males for the first brood were 67, 65 and 90% ($p \leq 0.01$), to second brood, 57, 55 and 64 % ($p \geq 0.05$), and to the third brood 48, 75 and 92% ($p \leq 0.01$); at 14, 21, and 29°C respectively. Thermal treatments applied from fertilization show a clear effect in biased phenotypic sex ratios in brood 1 and 3, which translates to substantial differences in the response of each brood to temperature. The histological differentiation onset was determined at 30 dah showing presumptive testis and ovaries with presence of somatic and primordial germ cells and the opening of the primordial ovarian cavity.

These results suggest that incubation at high temperatures during embryonic development can lead to male-biased sex ratios in this species. The effects of lower and medium temperatures were not so clear, suggesting a mixture of genotypic and TSD mechanisms in *C. estor* as in other atherinopsids. Moreover, the histological differentiation onset was observed around 30 dah and suggests that molecular differentiation occurs early in the first larvae stages, however more studies are required to clarify the gonadal development in this important species.



II. RESUMEN

El pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* es una especie endémica en peligro de extinción con un alto valor social, económico, ambiental y cultural del altiplano Mexicano. El presente trabajo fue realizado con el fin de obtener información científica sobre la determinación sexual por temperatura (DST) en esta especie, este conocimiento puede aplicarse como una herramienta biotecnológica para el control de la proporción sexual fenotípica en un cultivo comercial, así como para evaluar los efectos del cambio climático y la influencia antropogénica sobre la reproducción del pez blanco en el medio natural.

A partir de 3 parejas de reproductores se obtuvieron gametos sexuales que fueron manualmente fecundados, inmediatamente después se dividieron en tres grupos y se incubaron a 14, 21 y 29°C. Estos tratamientos térmicos se continuaron hasta 30 días post eclosión (dpe), posteriormente todos los grupos fueron trasladados a 21°C hasta los 90 dpe. Al finalizar el experimento 40-60 peces por tratamiento fueron muestreados y procesados histológicamente para evaluar la proporción sexual fenotípica. Para determinar el inicio de la diferenciación sexual histológica a los 21°C se muestrearon semanalmente 20 larvas desde la eclosión hasta 30 dpe.

La proporción de machos para la primera progenie fueron 67, 65 y 90% ($p \leq 0.01$) para la segunda progenie, 57, 55 y 64% ($p \geq 0.05$) y la tercera progenie 48, 75 y 92% ($p \leq 0.01$) en 14, 21 y 29°C respectivamente. Los tratamientos térmicos aplicados desde la fertilización demuestran una influencia clara sobre la proporción sexual fenotípica para las parejas 1 y 3, por lo que la respuesta de cada progenie a la temperatura es significativamente diferente. El inicio de la diferenciación histológica fue determinado en el día 30 post eclosión con la presencia de testículos y ovarios en fase inicial de desarrollo, con la presencia de células germinales primordiales, somáticas y la apertura de la cavidad ovárica primordial.

Estos resultados sugieren que la incubación a altas temperaturas durante el desarrollo embrionario puede influir en la proporción sexual fenotípica en esta especie. Sin embargo los efectos de las temperaturas bajas y medias no fueron claros, lo que sugiere una mezcla de mecanismos de determinación sexual genotípica y por temperatura en *C. estor*, como ha sido descrito en otros Atherinopsidos. El inicio de la diferenciación histológica se produce alrededor de los 30 dpe, estos resultados sugieren que la diferenciación molecular ocurre en las primeras etapas de vida de las larvas, sin embargo se requieren de más estudios para aclarar el desarrollo gonadal en esta importante especie.



III. AGRADECIMIENTOS.

Mi hija Tsanda es una de las personitas que sin duda más me ha motivado con su amor y alegría incondicional todos los días, este trabajo se lo dedico a ella que a cada instante me impulsa para seguir adelante, ser un mejor papá y una mejor persona. También agradecerle a Alejandra por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis, sobre todo cuando estuve fuera de casa y ella tuvo que cuidar de nuestra hijita preciosa durante algunos meses. Ha pesar de la distancia que nos separa mi mamá Florina, mi papá Armando y mi hermana Flor siempre me han brindado su apoyo incondicional por lo que les agradezco los infinitos momentos que hemos compartido en esta vida llena de sorpresas inesperadas.

Por otro lado agradezco infinitamente la confianza que me han brindado mis tutores principales el Dr. Carlos A. Martínez Palacios y el Dr. C. Cristian Martínez Chávez los cuales me han apoyado siempre en mi formación personal y científica, así como para el desarrollo de los diferentes proyectos en los cuales hemos trabajado juntos. También quiero decir gracias a los investigadores del IIAF, los Dres. Ma. Gisela Ríos, E. Mayra Toledo, y Jorge Fonseca que constantemente han sabido orientarme cuando las dudas surgen en los trabajos de investigación. Especialmente quiero agradecer al Dr. Antonio Campos Mendoza el cuál a través del PIFI-UMSNH me apoyo para realizar las estancias de investigación en Uruguay, Japón y Argentina, que sin duda fueron imprescindibles para obtener algunos de los resultados esperados en el presente trabajo de tesis.

Deseo agradecer a los técnicos del laboratorio de pez blanco M.C. Jesús López y M.C. Antonio Tello, los cuales siempre me brindaron todo el apoyo necesario para realizar las series experimentales y la orientación sobre el manejo de los peces en sus primeras etapas de vida. De igual manera agradezco a la M.C. Sibila Santos que me ha apoyado un sin fin de ocasiones en todo lo referente a la adquisición de materiales y consumibles del laboratorio analítico.

Además de manera muy especial pretendo agradecer a mis tutores externos de la Tokyo University of Marine Science and Technology los Doctores Carlos Augusto Strüssmann y Ricardo Shohei Hattori, ya que durante mi estancia en su laboratorio fueron amistosos y me brindaron toda la ayuda necesaria para realizar los análisis histológicos y moleculares relacionados con mi tema de tesis, además de los paseos por los alrededores de la ciudad. Por otro lado quiero decir gracias a Yoji Yamamoto el cual me brindo su amistad sincera y su visión técnica-científica para el manejo de muestras histológicas. También quiero decir que me dio mucho gusto haber conocido al Dr. Mustafiz Rahman y su familia que me brindaron su amistad durante toda mi estadía en Japón.



De igual manera a Sarida Munti le agradezco que fue una persona que me asistió en todo lo referente al trabajo de biología molecular y sobre todo me brindo su compañía y amistad sincera. También quiero agradecer a mi amigo Meng Lingjie y a las chicas del laboratorio Wang Yan Ping, Zhang Yan, Cheng Jiao, Ai Sakabe, Haruka y Eri ya que compartimos muchos momentos de diversión juntos en el laboratorio y en los alrededores de la ciudad.

Otro de mis tutores que me brindo su amistad y al cual agradezco sinceramente es sin duda el Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas de la FES-Iztacala de la UNAM, el cual siempre estuvo atento y me apoyo en todo lo que se requirió para mi trabajo en su laboratorio, junto con la M.C. Mónica Chávez Maldonado y la M.C. Beatriz Macedo Garzón las cuales ahora son entrañables compañeras y amigas.

También agradezco profundamente a la Dra. María Cristina Chávez Sánchez y a la M. C. Selene María Abad Rosales del laboratorio de histopatología del CIAD unidad Mazatlán, las cuales me recibieron cordialmente en su laboratorio y me enseñaron a realizar los cortes histológicos necesarios para la primera etapa de este trabajo de tesis.

A la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, la Dra. Alma Lilia Fuentes Farías y el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina del laboratorio de Ecofisiología Animal de la UMSNH deseo darles las gracias ya que siempre me han ofrecido su amistad, una visión crítica y su laboratorio para el desarrollo de este y otros trabajos científicos.

Agradecer al Dr. Gustavo Somoza del Instituto Tecnológico de Chascomús, Argentina, a la Dra. Denisse Vizziano de la Universidad de la Republica de Uruguay, al Dr. Christophe Klopp, al Dr. Jean Jacques Lareyre y al Dr. Yann Guiguen del Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia por todo el apoyo recibido para comprender los procesos de la diferenciación y determinación sexual que ocurren en los peces, así como su punto de vista para el diseño de la serie experimental desarrollada en el presente trabajo. De igual manera agradezco a la Dra. Silvia Arranz, la Dra. Nora Calcaterra, al M.C. Ignacio Simo, a todos sus colegas y estudiantes del Instituto de Biología Molecular y Celular del Rosario, Argentina por su amistad y todo el apoyo recibido para comprender mejor algunos los mecanismos moleculares y celulares que ocurren en el desarrollo y crecimiento de los peces.

Por último pero no menos trascendente debo reconocer la labor tan importante que realiza el programa de becarios de posgrado del CONACYT ya que sin ellos esta tesis de maestría no se hubiera podido realizar, realmente son parte importante en el apoyo económico y moral para el trabajo científico diario así como en el apoyo en la realización de las estancias en el extranjero específicamente en los laboratorios de biología molecular y celular de Japón y Argentina.



1.INTRODUCCIÓN.

Debido a que los organismos acuáticos representan el 70% del total de las especies animales del planeta, el hombre ha aprovechado este recurso a lo largo de miles de años realizando, en general, actividades extractivas. Para satisfacer la creciente demanda de alimento, el hombre ha desarrollado actividades como la acuicultura. El cultivo de organismos acuáticos a gran escala es un suceso relativamente reciente aunque, a pequeña escala, esta actividad ha existido desde tiempos antiguos, pues los romanos y los chinos ya la practicaban.

Como consecuencia del incremento de la población, en las últimas tres décadas la demanda mundial de productos pesqueros se ha duplicado, y según la FAO (http://www.fao.org/index_es.htm) se ha alcanzado el techo de aprovechamiento de la pesca extractiva. Debido a ello, los incrementos en la producción de productos pesqueros solo podrán provenir de la acuicultura. Por otra parte, una determinada especie sometida a grandes presiones de pesca puede encaminarse a estar en peligro de extinción. Por ende puede ser también un medio para evitar sobreexplotación pesquera.

Según un estudio realizado por un consorcio internacional de investigadores reveló que la acuicultura marina resultará fundamental para alimentar a los 9.200 millones de habitantes que se espera que haya en el planeta sobre el año 2050. Por lo que la acuicultura marina podría crecer de 34 millones de toneladas actuales hasta 600 millones de toneladas para mediados de siglo, y suplir así las carencias de la agricultura y la ganadería, dadas las limitaciones en la disponibilidad de agua y terreno fértil. La acuicultura también es el sector de producción de alimento que crece más rápido, con un aumento del 7,4% anual, y que más se diversifica en número de especies, con un 3% anual de nuevas especies domesticadas. "Sin duda la expansión de la acuicultura podría constituir la siguiente revolución en la alimentación humana" (Duarte et al., 2009). Existen cientos de diferentes especies acuáticas con potencial para ser cultivadas, sin embargo, para lograr establecer sus cultivos se requiere un profundo conocimiento acerca de aspectos que van desde su fisiología, formas de crecimiento y reproducción, hasta su comportamiento y particularidades del desarrollo. La falta de esta información limita el desarrollo de tecnologías para el cultivo, por consiguiente es muy importante el desarrollo de ciencia y tecnología en especies con potencial acuícola para suministrar la proteína necesaria a las generaciones presentes y futuras.

En acuicultura, para determinadas especies de peces, son preferidos los animales de un determinado sexo, pues poseen mejores características productivas, estas características pueden ser un crecimiento más acelerado o una maduración sexual tardía, un crecimiento acelerado permite obtener peces de mayor peso en un menor tiempo, con las ventajas económicas que conlleva



una puesta en el mercado más rápida y menos costosa. En cuanto a los tiempos de maduración sexual, los machos de muchas especies maduran en promedio un año antes que las hembras, los cambios secundarios causados por la maduración reducen el valor de mercado y obligan al productor a cosechar el producto antes de que haya logrado su crecimiento potencial completo. (Piferrer, 2001). Por tanto, el control de la proporción de sexos puede ser importantes para aumentar la rentabilidad en los cultivos de acuicultura (Hulata, 2001).

1.1. Mecanismos de determinación sexual en vertebrados.

Los mecanismos que controlan los eventos del dimorfismo sexual presentan una gran diversidad y plasticidad en vertebrados, los cuales reflejan esas diferencias en los mecanismos que desencadenan la determinación sexual a nivel transcripcional y post transcripcional en las rutas moleculares reguladoras del sexo (Bratus y Slota, 2006).

La determinación sexual es el proceso genético, ambiental o una mezcla de ambos mediante el cual se establece el sexo del cigoto tras la fertilización, y este proceso en peces puede ser básicamente de dos tipos; Determinación Sexual Genotípica (DSG) y Determinación Sexual Ambiental (DSA), esto quiere decir que las señales primarias de la determinación sexual pueden ser genéticas o ambientales (Devlin y Nagahama, 2002; Penman y Piferrer, 2008).

La DSG en los vertebrados incluyen dos tipos básicos heterogaméticos, el sistema XX / XY y el sistema ZZ / ZW, mientras que la DSA se debe a factores como temperatura, salinidad, fotoperiodo, calidad del agua, pH, nutrición e interacción social (Zarkower, 2001; Yoshimoto e Ito 2011).

1.1.1. Determinación sexual genotípica (DSG) en vertebrados.

Los componentes genéticos de cromosomas sexuales específicamente el sistema XY en mamíferos heterogaméticos y en algunos peces con el mismo sistema de determinación sexual han sido previamente establecidos. Sin embargo, dichos factores genéticos son aún desconocidos para la mayoría de los vertebrados donde existe el sistema ZW de hembras heterogaméticas como sucede en algunos anfibios (Zarkower, 2001).

A pesar de esta diversidad todos los sistemas de determinación sexual controlan la gónada bipotencial, la cual se convertirá en ovario o testículo (Bratus y Slota, 2006).



En DSG existen tres sistemas básicos descritos, a) Sistema monofactorial, cuando se presenta un solo sexo heterogamético con cromosomas sexuales heteromórficos u homomórficos, b) Sistema multifactorial, cuando se presentan ambos sexos heterogaméticos con cromosomas sexuales y c) Sistema polifactorial, cuando no existen cromosomas sexuales y los factores de determinación están distribuidos en todo el genoma (Vizziano, 2011).

En los mamíferos existen genes reguladores del sexo en cromosomas sexuales. En efecto, el gen primario de la determinación sexual en la mayoría de los placentarios y no placentarios es conocido como SRY/Sry, el cual se encuentra en la región determinante del sexo dentro del cromosoma Y, el cual es el responsable de la formación de testículo en gónadas XY indiferenciadas (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991 Foster, *et al.*, 1992). Esto significa que cuando están presentes los cromosomas XY, SRY induce una cascada de desarrollo sexual que conducen a la formación de un macho. De acuerdo con esto, SRY se expresa en las células pre- Sertoli (Albrecht y Eicher, 2001; Bullejos y Koopman, 2001) y es la primera evidencia de la expresión de genes de la diferenciación sexual en la gónada de mamíferos.

Aunque el gen SRY/Sry que determina el sexo ha sido identificado en mamíferos, no se habían encontrado genes similares en otros animales vertebrados. Matsuda *et al.*, (2002), describe en el pez Medaka (*Oryzias latipes*) el primer gen determinante del sexo en animales no mamíferos, este gen fue llamado DMY (Y-specific DM-domain gene) y es un homólogo de DMRT1(Doublesex and mab 3 related transcription factor 1), un gen conservado de la cascada de determinación sexual en vertebrados. Aunque en los vertebrados se presentan diferentes rutas (macho heterogamético, hembra heterogamética, determinación sexual ambiental) este gen parece jugar un rol central en el proceso de determinación sexual (Marshall Graves y Shetty, 2001). Un árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos incluyendo el dominio-DM, muestra que DMY se deriva de DMRT1 inmediatamente antes de la especiación entre *O. latipes* y *O. curvinotus* (Matsuda *et al.*, 2003).

Durante el desarrollo normal de medaka DMY es expresado sólo en las células somáticas de gónadas XY. Estos hallazgos sugieren fuertemente que DMY es un gen sexo específico necesario para el desarrollo testicular. Matsuda *et al.*, (2003) menciona que DMY es un gen dominio-DM específico en el cromosoma Y, necesario para el desarrollo de machos. También menciona que *O. curvinotus* presenta el gen DMY en el cromosoma Y, que es homólogo al cromosoma Y de medaka y que DMY se expresa en los embriones XY. Sin embargo en la mayoría de los peces no se ha registrado aún un gen maestro determinante del sexo, por lo que se desconocen los mecanismos moleculares precisos para la mayoría de las especies.



En la rana africana *Xenopus laevis*, se ha descrito un gen ligado a la determinación sexual genética conocido como DM-W (W-specific DM-domain gene) aislado de un parálogo de DMRT1, esta especie presenta una hembra heterogamética ZZ / ZW, este descubrimiento introduce un nuevo modelo de ZZ / ZW provocado por DM-W y DMRT1 en *X. laevis* (Yoshimoto & Ito, 2011).

En el Pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) la hormona antimulleriana-y (AMHy) se ha propuesto como un mecanismo alternativo hormonal para el control transcripcional de determinación del sexo en vertebrados, lo que sugiere la presencia de otros sistemas de determinación sexual aún no descritos (Hattori *et al.*, 2012)

Por último en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) el gen sdY (dimórfico sexual asociado a cromosoma Y) que es relacionado con el sistema inmune fue descrito como gen maestro en la determinación del sexo ligado exclusivamente al cromosoma Y (Yano *et al.*, 2012).

1.1.2. Determinación sexual por temperatura (DST) en peces teleósteos.

La determinación sexual por temperatura sin duda es la forma mas estudiada en peces, se han identificado rutas bioquímicas y moleculares involucradas en la diferenciación sexual, sin embargo algunos resultados sugieren la presencia de otros moduladores endógenos en los procesos de diferenciación, los cuales todavía permanecen desconocidos. (Devlin y Nagahama, 2002; Baroiller *et al.*, 2009; Strüssmann y Nakamura, 2002; Lance, 2008; Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008; Shoemaker, 2009). Aunque los genes determinantes del sexo comienzan sus procesos en el cerebro, la temperatura puede influir en la estructura-función de las proteínas y enzimas que participaran en la producción de esteroides sexuales y así sesgar la proporción sexual (Devlin y Nagahama 2002).

En especies gonocoristas la DST se puede manifestar de las siguientes formas: a) Bajas temperaturas producen hembras y a altas temperaturas se producen machos (en algunos casos la respuesta puede ser parcial a bajas temperaturas); b) Bajas temperaturas producen machos y a altas temperaturas se producen hembras; c) A altas y bajas temperaturas se producen machos, mientras que en temperaturas intermedias se producen tasas sexuales balanceadas (Figura 1).

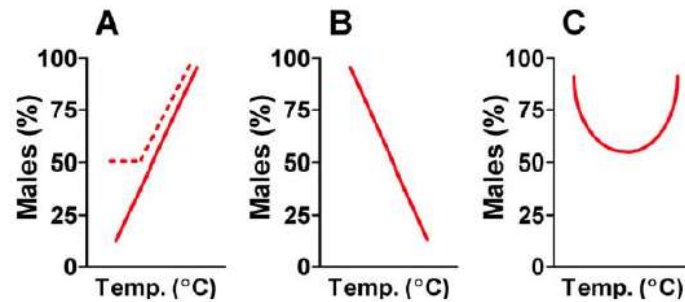


Figura 1. Patrones de la determinación sexual por temperatura (DST) en peces. A) Incremento del porcentaje de machos en altas temperaturas (en algunos casos puede haber respuestas parciales o nulas en bajas temperaturas); B) Incremento del porcentaje de hembras en altas temperaturas; C) Incremento del porcentaje de machos en bajas y altas temperaturas (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008).

En la Tabla 1 Ospina-Álvarez y Piferrer (2008) muestran los datos que sugieren que existe determinación sexual por temperatura (DST) en algunos *Atherinopsidos* como *Menidia menidia*, *M. peninsulae*, *Odontesthes bonariensis*, *O. argentinensis* y *O. hatcheri*.

Tabla 1. Datos de campo y laboratorio para la evaluación de DST en *Atherinopsidos* gonocoristas.

Orden.	Datos de Campo.				
<i>Atheriniformes</i>					
Familia.	Hábitat	Intervalo natural de T°	T° letal	Intervalo de T° durante el desarrollo	Referencias
<i>Atherinopsidae</i>					
Especies.					
<i>Menidia menidia</i>	Marino	11-33*	30 -34	16-32	1*, Fay <i>et al.</i> , (1983)
<i>Menidia peninsulae</i>	Marino/ Estuarino	10-31	-	16-31	1*, Middaugh y Hemmer (1987)
<i>Odontesthes argentinensis</i>	Marino/ Estuarino	8-30	-	8-30	1*, Reartes JL (1995)
<i>Odontesthes bonariensis</i>	Agua dulce/ Estuarino	13-29	35-39	13-29	1*, Reartes JL (1995), Cussac <i>et al.</i> , (2008)
<i>Odontesthes hatcheri</i>	Agua dulce	11-24	-	16-17	1*, Strüssmann <i>et al.</i> , (1996a)

Especies.	Datos de Laboratorio.						Referencias
	T° Baja	% ♂	T° Intermedia	% ♂	T° Alta	% ♂	
<i>Menidia menidia</i>	15	50	19	77	28	94	Conover y Heins (1987)
<i>Menidia peninsulae</i>	10-25	15	20-30	43	-	-	Middaugh y Hemmer (1987)
	17	24	25	60-70	32	74	Yamahira y Conover (2003)
<i>Odontesthes argentinensis</i>	18	10	21	19	25	45	Strüssmann <i>et al.</i> , (1996a)
<i>Odontesthes bonariensis</i>	19	0	25	71	29	100	Strüssmann <i>et al.</i> , (1997) †
<i>Odontesthes hatcheri</i>	13	11	17-23	50	25	69	Strüssmann <i>et al.</i> , (1997) †

1* Froese y Pauly (2008). †Indica que existe más de una temperatura intermedia. T° = Temperaturas en grados Celsius.



1.2. Mecanismos de diferenciación sexual de peces teleósteos.

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual un conjunto de mecanismos moleculares, genéticos, embriológicos, fisiológicos y morfológicos producen un macho o una hembra a partir de un cigoto originado por unos padres concretos y de un genotipo específico en un ambiente dado (Bull, 1983).

Las gónadas contienen células germinales y secretan hormonas esteroideas que dirigen al organismo en la diferenciación sexual. Este proceso en los peces es dependiente de los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos), donde los andrógenos masculinizan y los estrógenos feminizan cuando actúan sobre una gónada sexualmente indiferenciada (Piferrer, 2001). A nivel molecular se requieren de una gran cantidad de genes para el desarrollo de la gónada este proceso puede dividirse en tres partes: a) Formación inicial de la gónada indiferenciada, b) Periodo crítico de la determinación sexual, c) Diferenciación gonádica (Bratus y Slota, 2006).

Para conocer los procesos de diferenciación gonadal en peces y del papel de las hormonas esteroideas en este proceso, se han aplicado numerosas técnicas como la histología clásica, inmuno-histoquímica, análisis de la expresión de genes e inducciones de inversión sexual (Nakamura et al., 1998; Guiguen, 2000; Devlin y Nagahama, 2002; Vizziano et al., 2007).

El gen *cyp19a1a* codifica la enzima citocromo P450 aromatasa, la cual convierte la testosterona en 17 β -estradiol (Figura 2), esta enzima es responsable de inducir el desarrollo y la diferenciación ovárica en los peces (Baroiller y D'Cotta, 2001; Devlin y Nagahama, 2002; González, 2003).

En peces la diferenciación sexual molecular temprana ha sido poco investigada y solo se tienen reportes bien documentados en el pez Medaka *Oryzias latipes*, con la expresión del DMY en el testículo temprano (Kobayashi et al., 2004). En *Oncorhynchus mykiss* y *Oreochromis niloticus*, la diferenciación morfológica del ovario, es precedida potencialmente por la síntesis de estrógeno, en este proceso se involucra directamente el gen *cyp19a1a*. (Guiguen, 2000; Nakamura et al., 2003).

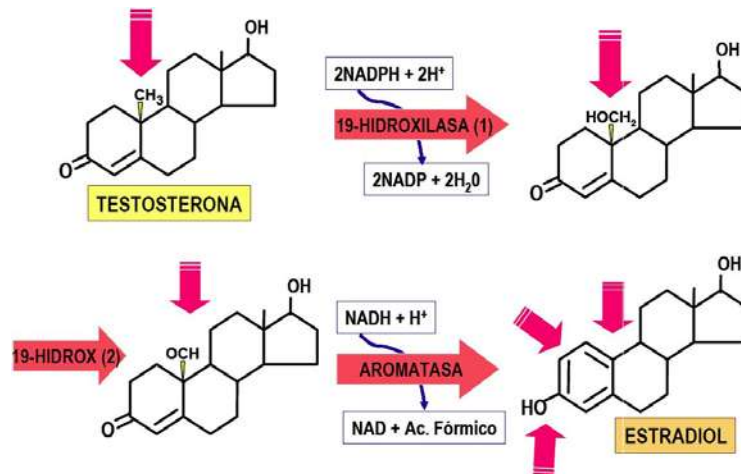


Figura 2. Producción de 17 β -estradiol por acción de la enzima aromatasa.

Por otro lado, el papel de andrógenos durante la diferenciación testicular en peces sigue siendo un tema de debate, a pesar de que los tratamientos androgénicos puedan inducir funcionalmente una completa masculinización fenotípica en hembras genéticas (Liu et al., 2000; Devlin y Nagahama, 2002), el potencial para la síntesis de andrógenos no siempre puede ser detectado antes de diferenciación testicular en peces teleósteos (Nakamura et al., 2003). En *Oreochromis niloticus* se ha sugerido que la síntesis de andrógenos está ausente durante este proceso (Nakamura et al., 1998; Nakamura et al., 2003) sin embargo en *Oncorhynchus mykiss*, algunos estudios apoyan la idea de que los andrógenos endógenos pueden conducir a la diferenciación testicular (Liu et al., 2000; Govoroun et al., 2001; Vizziano et al., 2007). Un gen que participa en el proceso de diferenciación testicular en tetrápodos (Lu et al., 2007), es el DMRT1/*Dmrt1* (Doublesex y mab 3 related transcription factor 1) y aunque en peces esta presente, su papel en la diferenciación gonadal tampoco es comprendida ampliamente (Fernandino et al., 2008a).

La expresión de *Dmrt1* de vertebrados también ha sido bien documentada en los peces teleósteos, como la Tilapia *Oreochromis niloticus* (Guan et al., 2000), trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Marchand et al., 2000), el pez cebra *Danio rerio* (Guo et al., 2005), el pejerrey *Odontesthes Bonariensis*, (Fernandino et al., 2008^a, Hattori et al., 2009), el pejerrey *O. Hatcheri* (Hattori et al., 2008) y el pez blanco *Chirostoma estor* (Rodríguez y Martínez-Chávez, 2011).



1.3. Importancia del modelo de estudio: El pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*.

El pez blanco del lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor* desde tiempos prehispánicos ha sido fuente importante de proteínas para los pobladores de la región, además de tener gran importancia económica, ecológica y social para las comunidades P'urhépechas de la zona lacustre (Arredondo, 1998). Después de la conquista española se introdujeron nuevas tecnologías agrícolas y ganaderas, además comenzó un crecimiento y urbanización que propició la deforestación de grandes áreas de bosque, por lo que actualmente existen problemas de erosión, azolve, reducción de flora, fauna y contaminación del lago (Martínez-Palacios y Ross, 2005).

Chirostoma estor pertenece a la familia *Atherinopsidae*, la cual ésta representada en su mayoría por peces de origen marino, las especies del genero *Menidia* ahora renombradas *Chirostoma* al parecer quedaron aisladas recientemente debido a la perdida del mar interior que alguna vez conectó a los océanos Pacífico y Atlántico. Lo anterior debido a los movimientos tectónicos que formaron el altiplano mexicano. Estos lagos salados a finales del Terciario cambiaron a dulceacuícolas (Uribe-Alcocer y Díaz-Jaimes, 2003; Ross y Martínez-Palacios, 2004^{bi}; Martínez-Palacios y Ross, 2005) debido a que los procesos volcánicos produjeron un compartimiento del drenaje, al ser captada la antigua cuenca del río Lerma por el sistema Grande-Santiago y originar a los lagos michoacanos y al de Chapala (Demant y Robin, 1975).

Dichas especies dulceacuícolas del genero *Chirostoma* que son ahora endémicos de los lagos del altiplano mexicano, tienen similitudes con otros *Atherinopsidos* marinos debido a que comparten ancestros comunes. Estos peces producen huevos muy pequeños con poco vitelo, presentan gotas de aceite y baja supervivencia en los primeros estadios de desarrollo, también poseen características eurihalinas pues toleran salinidades de hasta 15 g L⁻¹ (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^c y 2004). Los peces dulceacuícolas que son miembros del género *Chirostoma* incluyen 18 especies y 6 subespecies, divididos en dos grupos, el grupo Jordani y el grupo Arge. Al grupo Jordani pertenecen los llamados peces blancos con tallas grandes y al grupo Arge, pertenecen peces pequeños llamados comúnmente charales.

La población de *Chirostoma estor* actualmente está en peligro de extinción y su tamaño ha decrecido de manera alarmante en los últimos años debido principalmente a contaminación, la sobrepesca y la falta de programas serios para su conservación, otras especies similares en el altiplano mexicano se encuentran en las mismas condiciones (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^a). Las comunidades P'urhépechas ribereñas han sustentado su economía en la pesca de esta y otras especies nativas del lago y su extinción potencial implica un impacto directo en los ingresos económicos locales. Los gobiernos



federales y estatales no han planteado mecanismos prácticos para la recuperación y aprovechamiento integral de la cuenca del lago de Pátzcuaro. Debido a lo anterior se han propuesto algunas soluciones al problema: 1) Translocación de las especies a lugares mejor conservados 2) Desarrollo de un programa de acuicultura que genere una nueva industria que permita una reducción en la pesca del lago y contribuya a la protección de la economía local (Ross y Martínez-Palacios, 2004^a; Ross *et al.*, 2006).

Desde el año 1999 se han realizado algunos estudios en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH para el desarrollo de la biotecnología del pez blanco *Chirostoma estor*, planteándose como la única posibilidad viable para garantizar la supervivencia de la especie *in vivo*. Los estudios se han desarrollado en temas como la evaluación de las estructuras bucales y faríngeas de larvas y juveniles, estructuras en el huevo y las primeras larvas, primera alimentación y tracto digestivo, destete, nutrición, estudios sobre temperatura y salinidad en el crecimiento de larvas, y el desarrollo del ciclo biológico cerrado en cautiverio (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^c; Martínez-Palacios *et al.*, 2006).

Los Atherinopsidos en general son un modelo de estudio para entender los procesos de la determinación sexual. En *Odontesthes bonariensis* (especie con DST) se observó las primeras señales de la diferenciación sexual gonadal a la séptima semana post-eclosión (spe) en una temperatura 100% feminizante (TF) de 17°C, y a la sexta (spe) en una temperatura 100% masculinizante (TM) de 29°C, con respecto a la diferenciación molecular se observó el incremento en la expresión de *dmrt1* durante la cuarta (spe) en la (TM), los valores de expresión de este gen siempre se mantuvieron bajos en la (TF). Para el gen *cyp19a1a* se incrementó en la sexta (spe) en la (TF), presentándose bajos en la (TM), cabe mencionar que las diferencias moleculares fueron observadas antes de la diferenciación histológica de las gónadas (Fernandino *et al.*, 2008^a).

La apoptosis gonadal está asociada con la masculinización de *Odontesthes bonariensis* y por lo tanto, está ausente en las gónadas en las hembras, lo que sugiere que en el pejerrey este es el sexo original embrionario (Hattori *et al.*, 2009 y Strüssmann *et al.*, 2008). Además han identificado algunos genes específicos para macho entre ellos *dmrt1*, *amh*, *sox9*, *nr5a1*, *cyp11a1* y *cyp11b* (Fernandino *et al.*, 2008^a; Blasco *et al.*, 2010), mientras que *cyp19a1a*, solo muestra expresión específica en hembras (Karube *et al.*, 2007; Fernandino *et al.*, 2008^a).

En *Odontesthes hatcheri* (especie con DSG) se presentan tres isoformas de *dmrt1* y su expresión molecular dimórfica no ocurre durante la gonadogénesis a 21°C, solo se observa expresión en el testículo y el ovario de peces adultos, sin embargo su expresión molecular es mayor en el testículo que en el ovario. Para el gen *cyp19a1a* se observó un aumento en la expresión de hembras



durante la cuarta semana post eclosión justo antes de la diferenciación ovárica. (Hattori *et al.*, 2008).

En el caso de los estudios relacionados con los mecanismos de diferenciación sexual en *Chirostoma estor* se ha reportado la presencia de *cyp19a1a* solo en ovario de peces adultos (Rodríguez y Martínez-Chávez, 2011). En estudios de la determinación sexual por temperatura Tello-Ballinas *et al.*, (2010), realizó el primer acercamiento para conocer si en este *Atherinopsido* existe DST o DSG. Reporta un experimento iniciado con larvas recién eclosionadas y cultivadas hasta los 90 días post eclosión, utilizó intervalos de 19, 21, 23, 25 y 27°C con fotoperiodo de 12L:12D y concluye que la mejor temperatura en términos de crecimiento y supervivencia fue de 25°C, mientras que la proporción sexual fue de 1:1 (hembra: macho) para todos los casos sin diferencias significativas entre los tratamientos, estos resultados sugieren que: a) No existe DST en esta especie, b) Que el periodo termolábil de esta especie ocurre en la embriogénesis como lo reportado por Baroiller *et al.*, 1995; Strüssmann *et al.*, 1996, 1997; Blazquez *et al.*, 1998; Redding y Patiño, 2000.

Como conclusión de este trabajo se reporta que el sexo en *C. estor* se encuentra determinado a los 30 días post-eclosión (dpe) y que el periodo termolábil puede ocurrir durante la embriogénesis por lo que sugiere realizar un nuevo experimento con tratamientos térmicos extremos (17°C y 29°C) desde la etapa de huevo fertilizado hasta 30 dpe, para comprobar si existe un efecto por temperatura sobre la determinación sexual en *Chirostoma estor* (Tello-Ballinas *et al.*, 2010)

Actualmente debido a que la producción acuícola de *Chirostoma estor* es un cultivo de ciclo cerrado, se requiere mantener el control de la determinación sexual en la población de organismos, este factor es importante para la reproducción, el crecimiento y la engorda. Por lo tanto en este estudio pretendemos determinar la presencia de DST en la especie utilizando diferentes tratamientos térmicos a partir de la fertilización. La presente investigación contribuirá con el conocimiento del efecto de la temperatura sobre la determinación sexual, así como la descripción histológica de este proceso, estas bases servirán para desarrollar el paquete biotecnológico completo de esta especie de alto valor social, económico y ambiental.



2.-OBJETIVOS.

2.1.-Objetivo General.

Evaluar el efecto de la temperatura en la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*.

2.2.-Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto de tres temperaturas 14, 21 y 29°C en la proporción sexual fenotípica de *Chirostoma estor*, a través de estudios histológicos.
2. Describir el periodo de inicio de la diferenciación sexual histológica a 21°C en *Chirostoma estor*.



3.-MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.Sistema experimental.

El sistema experimental se colocó dentro de las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF-UMSNH) en Morelia, Michoacán. El sistema fue de recirculación cerrada con capacidad de 672 litros para las tres temperaturas (14, 21 y 29°C ± 0.5), con una salinidad constante de 5 g·L⁻¹ (Martínez-Palacios *et al.*, 2004), y un fotoperiodo de 12 L / 12 O, con una fuente de abastecimiento de agua de pozo profundo que cuenta con un sistema de bombeo (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Los componentes del sistema experimental fueron: A) Nueve tinas de cultivo de 56 litros, B) Nueve incubadoras cilíndricas de 6.3 litros, C) Sistema de bombeo, D) Sistema de filtración mecánica, biológica y lumínica (U.V.), E) Sistema de tuberías de alimentación y desagüe, F) Sistema de aireación, G) Sistema de iluminación fluorescente blanca (750 lm, 6500°K) y H) Sistema automático de control de temperatura (CW0500, Resun, China). En este sistema se distribuyeron las tres temperaturas (14°C, 21°C y 29°C), los parámetros fisicoquímicos fueron controlados en el sistema durante todo el experimento, la salinidad fue monitoreada con un refractómetro ATAGO, Mod. S/Mill-E 0-100 g L⁻¹, la temperatura mediante un termómetro de mercurio (-20 a 110°C), el amonio, pH y nitritos con un kit de medición colorimétrica HACH (modelo FF-3) y el oxígeno disuelto con un oxímetro modelo YSI 51B.

El flujo de las tinas de cultivo fue de 174 L·H⁻¹, en las incubadoras el flujo fue de 19.2 L·H⁻¹. Las incubadoras se colocaron en el interior de la tina de cultivo (Figura 3), como se sugiere para *Chirostoma estor* en el trabajo de Tello-Ballinas *et al.*, (2010).



Figura 3. Incubadora cilíndrica de PVC con capacidad de 6.3 litros para incubación de huevos y mantenimiento de larvas de *C. estor*.

3.2. Metodología experimental.

En el experimento se utilizaron 2500 huevos fertilizados de tres parejas de reproductores (3♀ y 3♂) de la planta de producción de pez blanco *Chirostoma estor* (IIAF-UMSNH), los organismos fueron sedados con una solución alcohólica de benzocaína de $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sánchez-Blanco, 2006). Con el fin de mantener un control sobre la carga genética de los padres, se obtuvieron los productos sexuales de cada pareja por separado con presión abdominal manual, después se realizó el proceso de fertilización *in situ* a una temperatura de 23°C (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^b), una vez finalizado este proceso los reproductores se regresaron a la planta de producción (Figura 4).

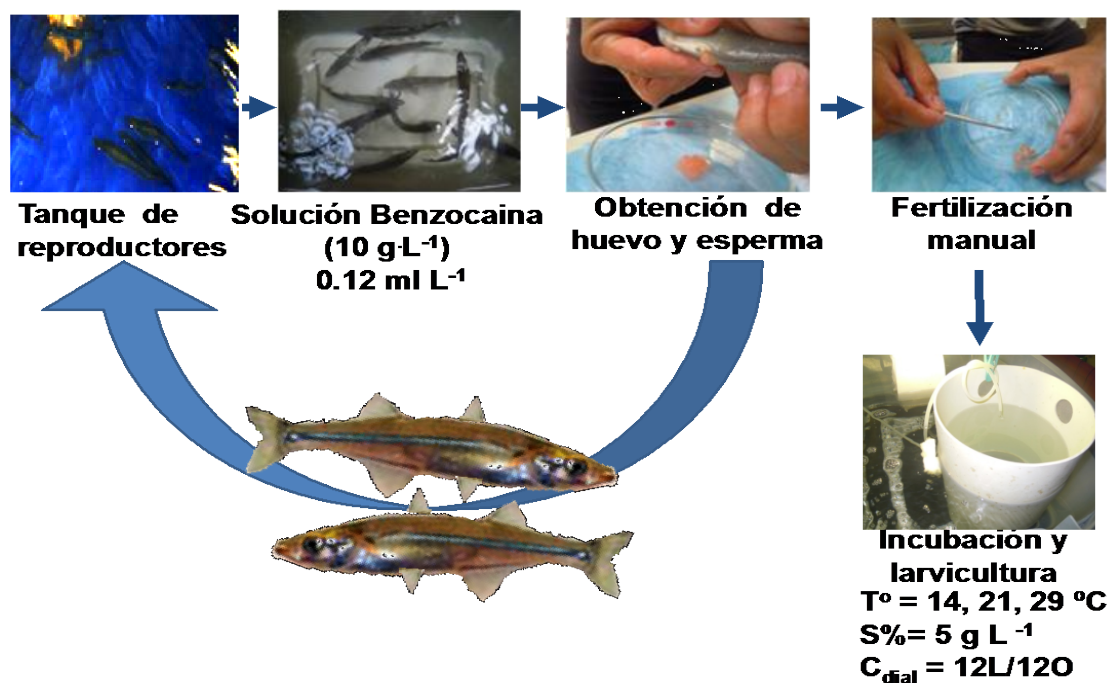


Figura 4. Procedimiento de obtención de huevos fertilizados de *C. estor*.

Posteriormente los huevos fertilizados de cada pareja (1♀ y 1♂) se distribuyeron en las tres temperaturas experimentales hasta finalizar el tratamiento térmico, cabe mencionar que el proceso de aclimatación a cada temperatura se realizó con el aumento o disminución de $1^\circ\text{C}\cdot\text{H}^{-1}$, los tratamientos térmicos ($n=3$) finalizaron a los 30 días después de la eclosión. Una vez concluido el tratamiento térmico los organismos fueron aclimatados a la temperatura control (21°C) y se mantuvieron por 60 días más, con el objetivo de obtener organismos de mayor tamaño para realizar los estudios histológicos, y poder determinar la tasa de proporción sexual ($\% \text{♀}$ y $\% \text{♂}$) en 14 , 21 y 29°C (Figura 5).

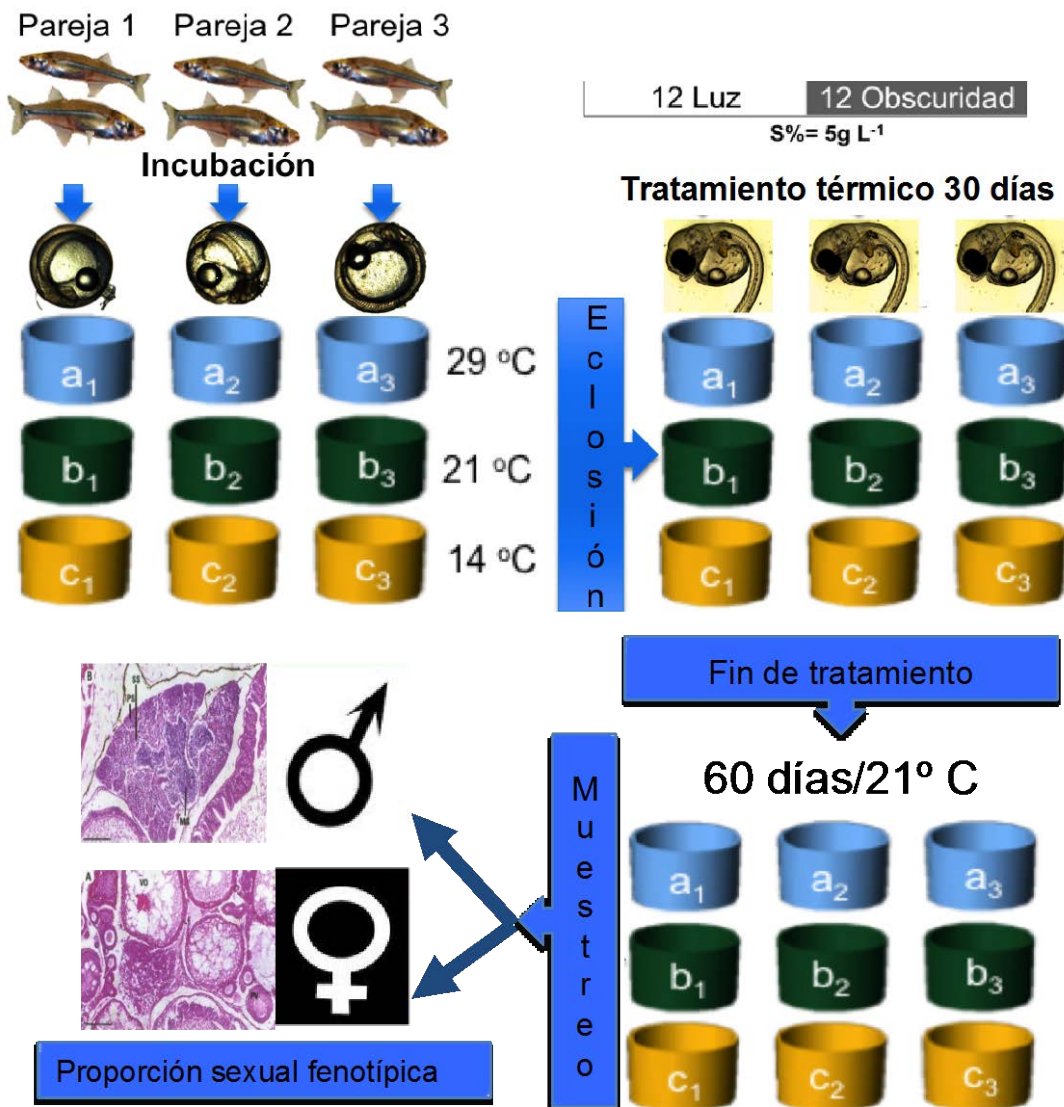


Figura 5. Procedimiento experimental para evaluar el efecto de 14, 21 y 29° C en la proporción sexual fenotípica de *C. estor*.

La alimentación fue a base de alimento vivo *ad libitum*, durante los primeros 15 días se proporciono Rotífero (*Brachionus plicatilis*) en densidades de 20 rotíferos/mililitro. Una vez finalizada esta fase se proporciono nauplios recién eclosionados de *Artemia sp.* hasta los 90 días post eclosión para finalizar la fase experimental (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^c). Al final del experimento se obtuvieron al azar 40-60 organismos de cada temperatura experimental (14, 21 y 29°C), que fueron sedados y sacrificados con un choque térmico de agua helada según criterios utilizados por (Hattori *et al.*, 2009). Posteriormente se determinó el peso final promedio con una balanza analítica Denver Instrument modelo APX-200, la tasa de eclosión y la tasa de supervivencia. Las muestras biológicas individuales fueron diseccionadas para obtener el tronco, cabeza y

cola por separado, el tronco fue utilizado para determinar la proporción sexual fenotípica y la respuesta térmica entre la progenie de las diferentes parejas. Para determinar a 21°C el periodo de inicio de la diferenciación sexual histológica se obtuvieron 20 larvas cada semana desde 1 a 30 días post-eclosión.

Para obtener los datos histológicos, los tejidos se fijaron en una solución Bouin (HT10132 Sigma-Aldrich) durante 24 horas y fueron almacenados en etanol al 70%, posteriormente se realizaron series ascendentes de etanol hasta el 100% (Uria *et al.*, 1998), para ser incluidos en parafina altamente pura enriquecida con polímeros (K93091409 Merck-Histosec), se efectuaron cortes transversales de 6 μm con un micrótopo (Leica Jung-Histocut 820), los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio y fueron teñidos con hematoxilina-eosina (Hattori *et al.*, 2009). Las preparaciones se observaron con un microscopio óptico y se determinó la proporción sexual fenotípica (Figura 6), según los criterios utilizados por Strüssmann *et al.*, 1996^b; Strüssmann *et al.*, 1997.

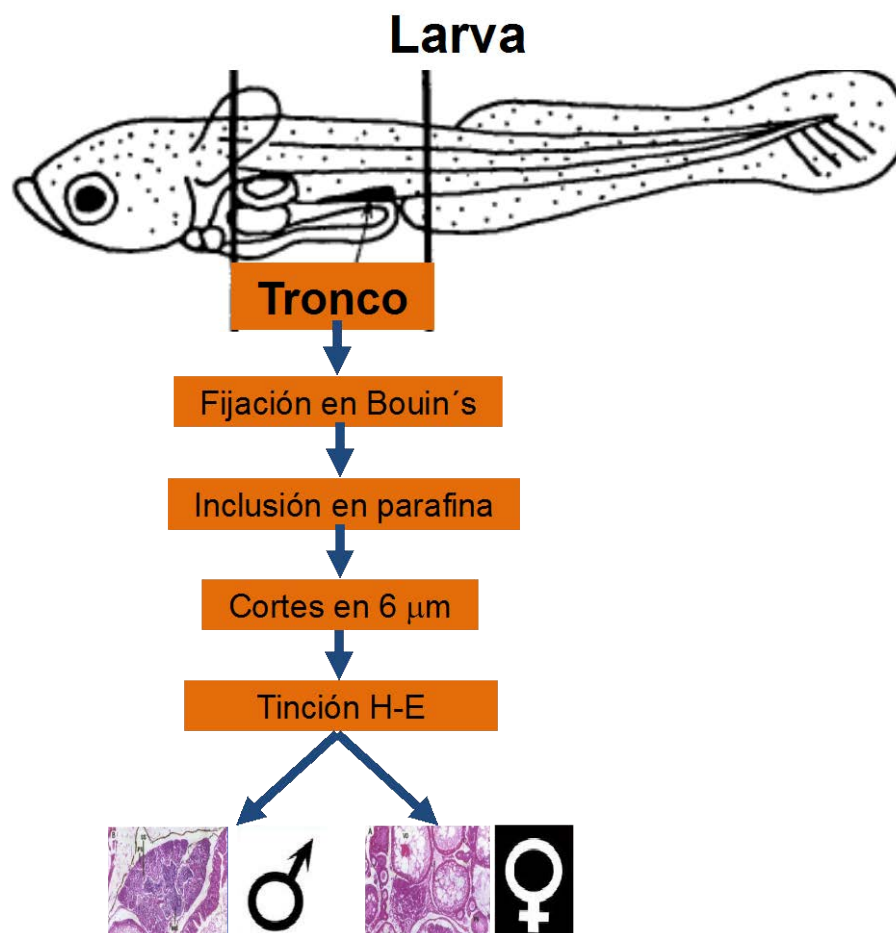


Figura 6. Procedimiento histológico para la determinación de la proporción sexual fenotípica en larvas de *C. estor*.



3.3. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Sigma Plot (v.11.00, Systat Software Inc.). La significancia de la tasa de eclosión y supervivencia, la proporción sexual fenotípica y la respuesta térmica entre la progenie de las diferentes parejas se determinó por una prueba de X^2 con un valor de significancia de $p \leq 0.01$. (Cuadras, 1991), Los datos morfométricos de peso final promedio se analizaron con la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov's y la prueba de Bartlett para conocer la varianza entre los grupos. Los conjuntos de datos que se distribuyeron normalmente se analizaron con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey de comparaciones múltiples. Los datos que se distribuyeron de forma no paramétrica se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba Dunn's para establecer la significancia entre los tratamientos. El valor de significancia para estas pruebas fue de $p \leq 0.05$.



4.- RESULTADOS.

4.1. Calidad de Agua.

Durante toda la fase experimental la calidad de agua se encontró dentro de niveles seguros sin presencia detectable de amonio total, los promedios en los resultados de las mediciones de la variables se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Calidad de agua en el sistema experimental para larvas de *C. estor* durante el experimento en 14,21 y 29°C.

Calidad de Agua					
T°	Salinidad	OD	pH	NH ₃ -NH ₄	NO ₂
± 0.5°C	5 g·L ⁻¹	6 g·L ⁻¹	8	No detectable	0.20 g·L ⁻¹

4.2. Tasa de eclosión, supervivencia y peso final promedio de las progenies.

Las tres parejas de reproductores utilizadas proporcionaron un total de 2500 huevos, de los cuales 1000 huevos se distribuyeron en 29°C, 1000 huevos en 14°C y 500 huevos en 21°C. Las tasas de eclosión para la progenie de la primera pareja fueron de 30.4, 52.4 y 60.8%; en la segunda pareja fueron 16.0 y 40.0 13.0% y para la tercera pareja, 42.0, 69.0, 41.0%, en 14, 21 y 29°C respectivamente, se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos para todas las parejas (ver Tabla 3).

La supervivencia al finalizar el experimento fue de 7.8, 91.6 y 37.1% en la progenie de la pareja 1; 14.5, 83.3 y 38.4% en la pareja 2; y 25.0, 81.1 46.3% en la pareja 3, a 14, 21 y 29°C respectivamente, con diferencias significativas entre todos los tratamientos para todas las parejas como se muestra en Tabla 3. El peso final promedio para la progenie de la primera pareja fueron de 216.67±57.7, 555.0±82.5 y 680.0±226.1 mg, para la segunda pareja fueron 257.14±78.6, 640.0±131.3 y 750.0±191.1 mg, finalmente para la pareja 3 fueron de 252.38±51.1, 545.0±139.4 y 723.0±133.5 mg, en 14, 21 y 29°C respectivamente, para las parejas 1 y 2 no existen diferencias significativas entre los tratamientos de 21 y 29°C, sin embargo existen diferencias significativas entre estos tratamientos y 14°C, únicamente en la pareja 3 existen diferencias significativas entre los tres tratamientos (Tabla 3).



Tabla 3. Tasa de eclosión, Tasa de supervivencia y Peso final promedio de las progenies de *C. estor* cultivados experimentalmente a 14,21 y 29°C durante 30 dpe, y mantenidos hasta los 90 dpe en 21°C. Superíndices indican para cada variable, diferencias significativas entre todos los tratamientos para cada pareja.

Progenie	Temperatura (°C)	Tasa de Eclosión (%)	Tasa de supervivencia (%)	Peso final promedio (mg)
1	14	30.4 ^a	7.8 ^a	216.67±57.7 ^a
	21	52.4 ^b	91.6 ^b	555.0±82.5 ^b
	29	60.8 ^c	37.1 ^c	680.0±226.1 ^b
2	14	16.0 ^a	14.5 ^a	257.14±78.6 ^a
	21	40.0 ^b	83.3 ^b	640.0±131.3 ^b
	29	13.0 ^c	38.4 ^c	750.0±191.1 ^b
3	14	42.0 ^a	25.0 ^a	252.38±51.1 ^a
	21	69.0 ^b	81.1 ^b	545.0±139.4 ^b
	29	41.0 ^c	46.3 ^c	723.0±133.5 ^c

4.3. Descripción histológica de gónadas en el inicio de la diferenciación sexual.

En el día 1 post eclosión (dpe) las gónadas se encuentran en fase temprana indiferenciadas con forma redondeada (Fig. 7-A), existe presencia de células somáticas y germinales primordiales; a los 30 dpe se pueden observar presuntos testículos en fase temprana (Fig. 7-B) en los que también se observan células germinales primordiales y células somáticas; en esta misma edad también se observan presuntos ovarios (Fig.7-C) en el inicio de la apertura de la cavidad ovárica, con la presencia de células germinales primordiales y células somáticas. Cabe mencionar que en los diferentes cortes histológicos analizados en hembras y machos se distingue un patrón de desarrollo gonádico de izquierda a derecha y de la zona cefálica a la caudal de los organismos.

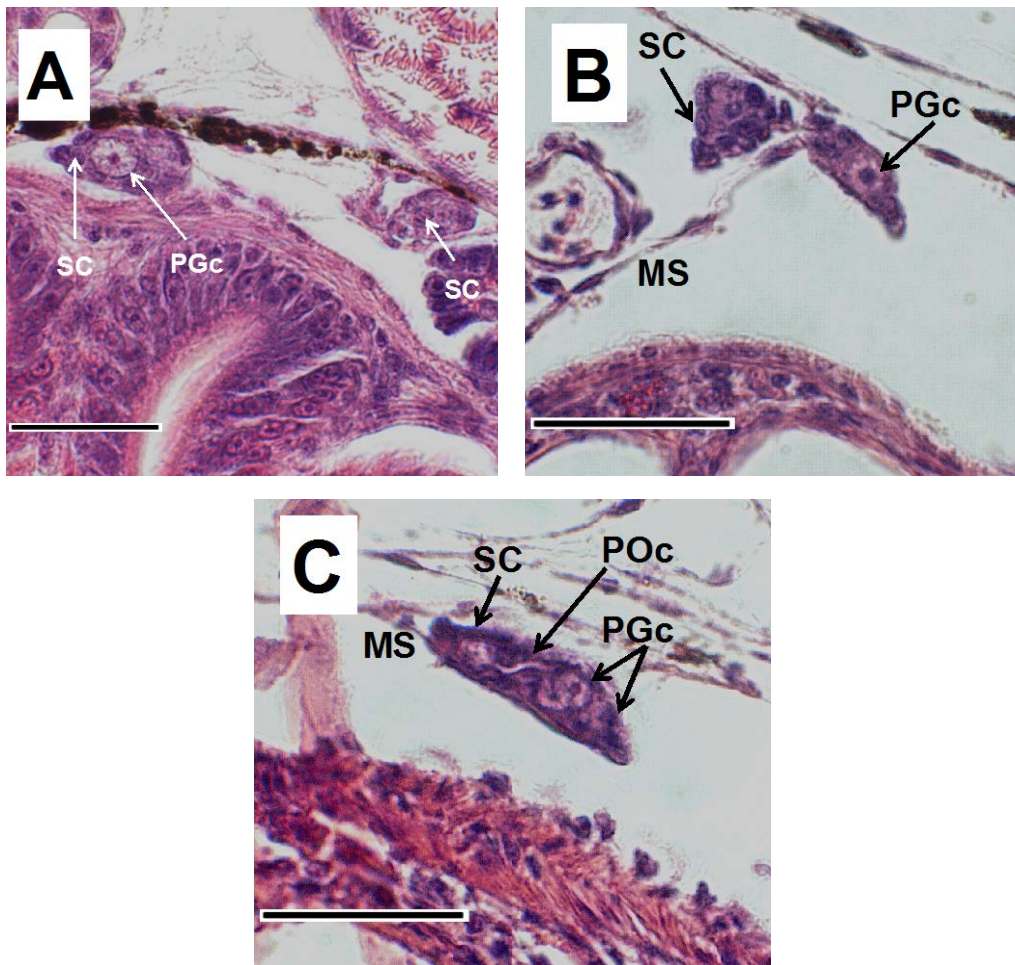


Figura 7. Desarrollo temprano de la gónada en larvas de *C. estor* a 21°C. (A) Gónada no diferenciada en 1 dpe. (B) Presunto testículo en 30 dpe. (C) Presunto ovario en 30 dpe. MS, Mesorquio; PGc, Célula Germinal Primordial; SC, Células somáticas; POc, Presunta cavidad ovárica; Barra de escala = 20 micras.

4.4. Descripción histológica de gónadas sexualmente diferenciadas.

Con el análisis de histología gonádica, se observó que los organismos de 21 y 29°C presentaron patrones de desarrollo similar, sin embargo para el caso de 14°C existe un desarrollo gonádico menor en ambos sexos. En la Figura 8-A se observa el testículo de un organismo a 14°C con lóbulos testiculares poco desarrollados, en la Figura 8-C se observan testículos de organismos de 29°C con lóbulos testiculares bien desarrollados, para todos los casos se cuenta con presencia de ducto espermático, espermatogonias, espermatoцитos de primer orden, células de Sertoli, Leydig y somáticas. Con respecto a las hembras en 14°C (Figura 8-B) se observaron ovarios en fase I, que se caracteriza por presentar ovogonias, ovocitos en paquiteno y diploteno, algunos ovarios se encontraron en fase II (cavidad ovárica, ovogonias, ovocitos en paquiteno, diploteno y perinucleolares). En las temperatura de 29°C (Figura 8-D) todos los ovarios se encontraron en fase II, para todas las temperaturas se observó los cuerpos de Balbiani y las células somáticas.

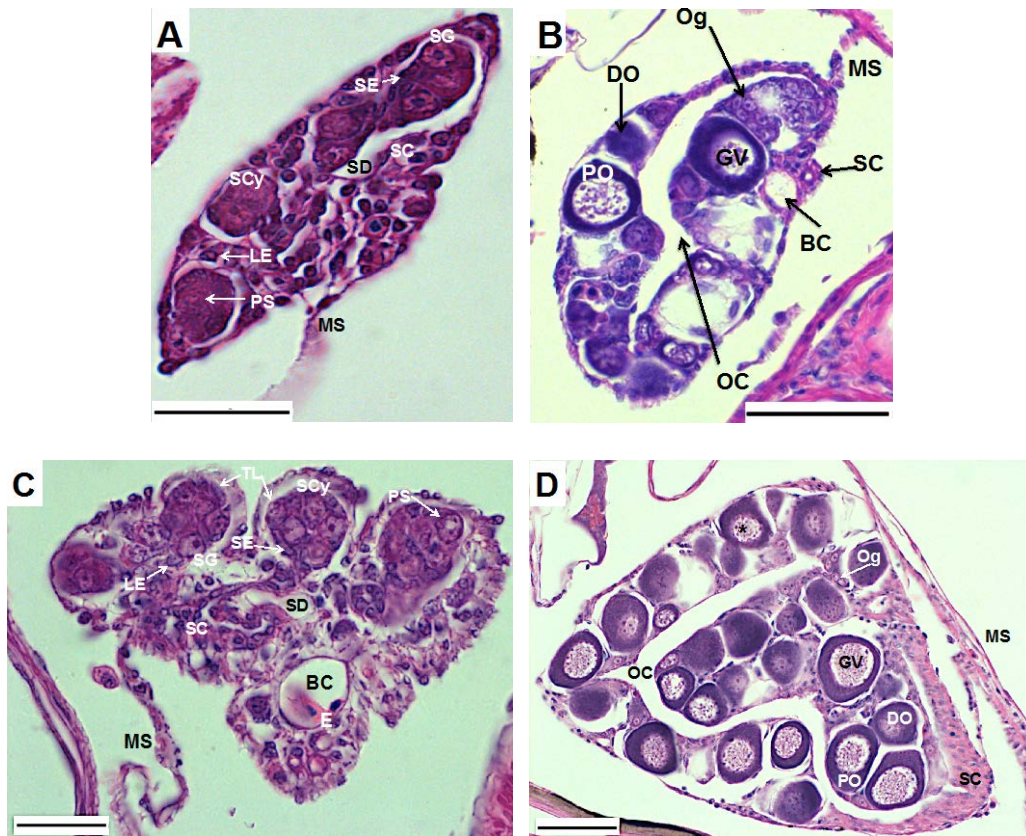


Figura 8. Aspecto histológico de testículos (A, C) y ovarios (B, D) en larvas de 90 días de edad expuestas a 14°C (A, B) y 29°C (C, D). El tamaño de los peces (longitud estándar) es el siguiente: A) 29,29 mm, B) 33,71 mm, mm C) 40,21 y D) 40,33 mm). Estructura testicular (A, C). MS, mesorquio; SG, Espermatogónias; SCy, Espermatocisto; TL, Lóbulo testicular; PS, Espermatocitos primarios; SD, Conducto espermático; SE, Células de Sertoli; LE, Células de Leydig; SC, Células somáticas; BC, Vaso capilar; E, Eritrocito; Barra de escala = 20 micras. Estructura ovárica (B, D). MS, Mesorquio; OC, Cavidad ovárica; Og, Ovogónias; DO, Ovocitos primarios en diploteno; PO, Ovocitos primarios perinucleolares; GV, Vesícula germinal; SC, Células somáticas; Asterisco, Cuerpo de Balbiani; Barra de escala = 50 micras.

4.5. Proporción sexual fenotípica y respuesta térmica entre progenies.

Debido a que los productos sexuales de cada pareja se mantuvieron por separado en los diferentes tratamientos la proporción sexual fenotípica y la respuesta térmica entre progenies pudo analizarse de manera independiente para cada pareja.

Para la progenie de la primera pareja se obtuvo un 67, 65 y 90% de machos a 14, 21 y 29°C respectivamente con diferencias significativas entre 29°C y los demás tratamientos. En la segunda pareja se presentaron 57, 55 y 64% de larvas fenotípicamente machos, sin diferencias significativas entre todos los tratamientos y finalmente en la tercera pareja se obtuvo un 48, 75 y 92% de machos en 14, 21 y 29°C respectivamente, con diferencias significativas entre todos los tratamientos (Ver Tabla 4).



Tabla 4. Proporción sexual fenotípica de las progenies de *C. estor* cultivados experimentalmente a 14, 21 y 29°C durante 30 dpe, y mantenidos hasta los 90 dpe en 21°C. n= Número de organismos experimentales por temperatura en cada pareja. Superíndices indican para cada variable, diferencias significativas entre todos los tratamientos para cada pareja.

Progenie	Temperatura (°C)	Proporción sexual fenotípica	
		(%) Machos	(n)
1	14	67 ^a	12
	21	65 ^a	20
	29	90 ^b	20
2	14	57 ^a	7
	21	55 ^a	20
	29	64 ^a	14
3	14	48 ^a	21
	21	75 ^b	20
	29	92 ^c	26

En la Figura 9 podemos observar claramente de manera gráfica la respuesta térmica entre las progenies, en la pareja 1 no se advierte un efecto de la temperatura a 14 y 21°C, sin embargo a 29°C se observa una clara influencia de masculinización con un 90% de machos. En el caso de la segunda pareja no se distingue una consecuencia significativa de ningún tratamiento térmico, en la pareja 3 las diferentes temperaturas experimentales afectan directamente la proporción de machos en la progenie ya que a 14°C se observa un 48% y conforme aumenta la temperatura encontramos un mayor porcentaje de organismos masculinizados hasta llegar a un 92 % en 29°C.

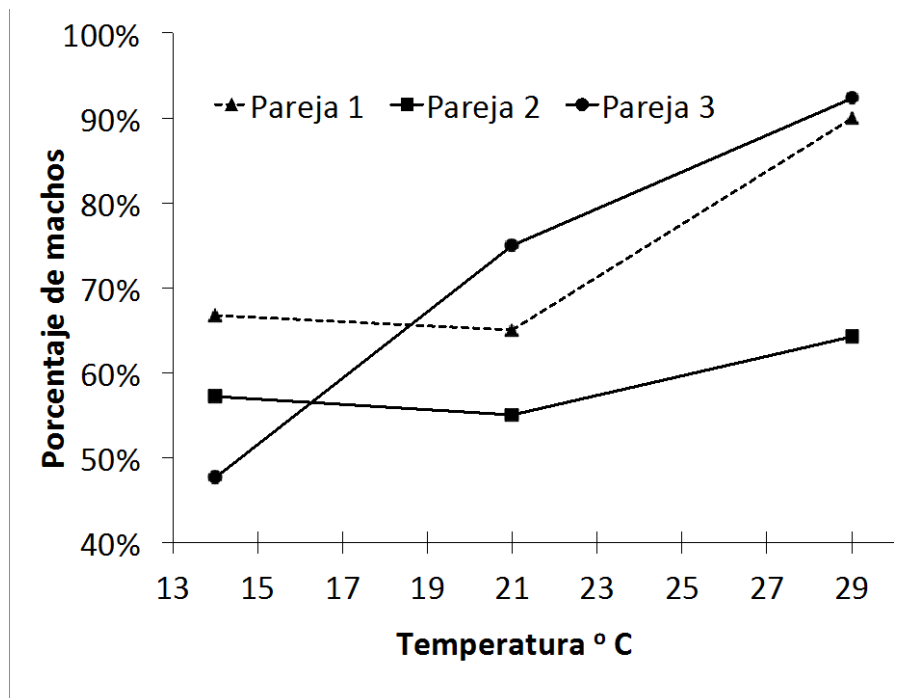


Figura 9. Respuesta térmica entre progenies de larvas de *C. estor* cultivados experimentalmente a 14,21 y 29°C durante 30 dpe, y mantenidos hasta los 90 dpe en 21°C.

Cuando comparamos los resultados entre las progenies a una misma temperatura encontramos que a 14°C no existen diferencias significativas entre las 3 parejas, en la temperatura de 21°C no existen diferencias entre la pareja 1 y 2, sin embargo entre estas progenies y la pareja 3 si existen diferencias significativas, finalmente en la temperatura de 29°C existen diferencias significativas entre las tres progenies.

Por último si utilizamos los promedios generales de las tres progenies por cada temperatura, la proporción sexual fenotípica resultante en este experimento es de 85% de machos a 29°C, 65% a 21°C y 55% a 14°C, con diferencias significativas entre todos los tratamientos.



5.- DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.

Actualmente los peces de la familia *Atherinopsidae* se han convertido en modelos interesantes para comprender algunos mecanismos de determinación sexual por temperatura en vertebrados. En este trabajo se analizó la presencia de DST y se describió el inicio de la diferenciación sexual histológica en *Chirostoma estor*.

Las diferencias significativas en la tasa de eclosión así como en la tasa de supervivencia entre los diferentes tratamientos (Tabla 3), mostraron que existe una influencia clara cuando se exponen a los peces a temperaturas extremas, en este experimento era importante que se llegara a estos extremos térmicos que la especie soporta, ya que el DST se manifiesta de manera puntual bajo estas condiciones. Estas diferencias significativas también nos indican que la temperatura control de 21°C está de acuerdo con las temperaturas óptimas de crecimiento y supervivencia (22 y 25°C) reportado previamente para esta especie (Martínez-Palacios *et al.*, 2002^a). Según estos resultados se observa que en cultivo esta especie, tolera mejor temperaturas altas que temperaturas bajas, además se sugiere que la temperatura tiene efectos *a posteriori*, ya que el tratamiento térmico únicamente se proporcionó en los primeros 30 dpe y después todos los organismos se mantuvieron durante 60 días a 21°C. Sin embargo es importante llevar a cabo experimentos a largo plazo para evaluar el efecto de la temperatura en la incubación, el crecimiento y la supervivencia de esta especie que ayuden a determinar el umbral térmico de un cultivo a nivel comercial.

En el trabajo realizado por Tello-Ballinas *et al.*, (2010), se reporta que no existen diferencias significativas en la proporción sexual fenotípica entre los tratamientos térmicos, cuando se exponen a las larvas recién eclosionadas. Sin embargo como se comprobó en el presente trabajo, cuando se exponen a los organismos a temperaturas extremas altas durante la etapa de embriogénesis existe un efecto masculinizante puntual manifestado en las progenies de la primera y tercera pareja a 29°C con una proporción de 90% y 92% de machos, respectivamente.

Estos resultados son similares a los reportados para otras especies de Atherinopsidos como *M. peninsulae* (Yamahira y Conover, 2003), *O. argentinensis* (Strüssmann *et al.*, 1996^a), *O. hatcheri* (Strüssmann *et al.*, 1997) y *Menidia menidia* (Conover y Heins, 1987), donde se observa una combinación de DST/DSG (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008). Este trabajo también demuestra que a una temperatura baja de 14°C no existe un efecto significativo en el proceso de feminización como se observa en *O. bonariensis*, *O. hatcheri* y *M. peninsulae* en los cuales se reportó un 100%, 89% y el 90% de hembras respectivamente (Strüssmann *et al.*, 1997; Strüssmann *et al.*, 1996^a; Yamahira y Conover, 2003). En este sentido, *C. estor* es similar a *M.*



menidia donde se reporta alrededor de un 50% de hembras obtenidas en las bajas temperaturas probadas (Conover y Heins, 1987).

Parece necesario suponer que los diferentes modelos de los efectos de DST en peces propuesto por Ospina-Álvarez y Piferrer (2008), se basan en diversos mecanismos y niveles de acción, permitiendo la plasticidad y variedad de los mismos para el control del sexo. Por otro lado, el grado de implicación de estos mecanismos dentro de cada modelo parece ser más especie-específicas y variables entre individuos. En este estudio, estas diferencias fueron evidentes cuando se analizaron las progenies de las diferentes parejas (Tabla 4). La diferencia de la proporción de sexos entre crías en este estudio podría deberse a las respuestas genéticas independientes de cada pareja de reproductores (Figura 9). Sin embargo, se necesitan estudios más detallados para aclarar y precisar los mecanismos implicados en dicha variación y si están involucrados componentes genéticos o epigenéticos.

La presencia de hembras en altas temperaturas de *Chirostoma estor* podría sugerir que esta especie presenta ciertos mecanismos genéticos que controlan en algún nivel bioquímico o molecular la influencia de la temperatura y que permiten la expresión de *cyp19a1a* y la consecuente producción de estrógenos. Con el fin de aclarar si en esta especie es posible sesgar la población en un 100% hacia el sexo masculino como sucede en *O. bonariensis* (Strüssmann *et al.*, 1997) se recomienda realizar un experimento donde se utilice un glucocorticoide como el cortisol o la dexametasona en dosis de 0.4 a 0.8 mg/g (Hattori *et al.*, 2009), agonista de receptores que inducen la apoptosis.

De la misma manera se pueden plantear experimentos que expongan a los organismos a temperaturas aun más extremas (31°C) pero únicamente durante el periodo de embriogénesis así podrá comprobarse si con la temperatura se puede sesgar la proporción sexual fenotípica a un 100% machos, evitando de esta manera altas mortalidades por la exposición prolongada a tratamientos térmicos después de la eclosión.

Estos resultados sugieren claramente que existe una mezcla de mecanismos DST/DSG en *Chirostoma estor*, debido a que los efectos se observan de manera variable entre las diferentes progenies además de que el efecto únicamente es claro cuando se aplican los tratamientos térmicos durante la embriogénesis. En conjunto estos resultados con los que reporta Tello-Ballinas *et al.*, (2010), sugieren que la presunta ventana termolábil en esta especie se encuentra en algún momento entre la fertilización y la eclosión como ha sido reportado en *O. hatcheri* (Strüssmann *et al.*, 1996^a).

Un informe reciente sobre el papel potencial del gen AMHy como control maestro del sexo en *O. hatcheri* durante el período termolábil (Hattori *et al.*, 2012) y el sdY en *O. mykiss* (Yano *et al.*, 2012); sugieren que varios mecanismos genéticos podrían influir en la determinación sexual de los peces. Por lo que se recomienda realizar estudios en *Chirostoma estor* para describir



la batería de genes que están involucrados en la determinación sexual de esta especie durante el periodo de embriogénesis.

La descripción histológica de las gónadas primordiales entre el día 1 y 30 post-eclosión indican que el inicio de la diferenciación histológica de la gónada es alrededor de los 30 dpe (Fig. 7) y presentan un patrón antero-posterior y de izquierda a derecha similar a lo descrito para *O. bonariensis* (Strüssmann y Ito, 2005). Estos resultados sugieren que la diferenciación molecular de las larvas ocurre en etapas muy tempranas de desarrollo, sin embargo, se requieren de varios estudios a profundidad para la descripción del proceso de la diferenciación histológica, bioquímica y molecular en las gónadas de *C. estor* para clarificar el desarrollo gonadal en esta especie.

Al final del experimento (90 dpe) las gónadas muestran claramente identificables testículos y ovarios (Figura 8) independientemente de las variaciones en el peso final promedio (Tabla 3), que pudo deberse a los cambios en el metabolismo debido a la exposición de las diferentes temperaturas experimentales.

Sin duda los mecanismos de determinación sexual por temperatura son muy variables y en general todavía no se entienden en su totalidad. Los actuales resultados sugieren que debido a que la ventana termolábil se produce antes de la eclosión y *C. estor* en el medio natural habita en zonas poco profundas, es una especie más propensa a la influencia de temperaturas altas en el medio ambiente, por lo que la dinámica natural de la población de esta especie podría ser sensible al cambio climático, ya que un incremento en la temperatura de los lagos naturales provocarían un incremento de la proporción fenotípica de machos en las poblaciones silvestres con la consecuente tendencia de la especie hacia la extinción, aunado todo esto a los problemas por contaminación, sobrepesca y la falta de programas serios para su conservación. La información producida por este trabajo también puede ser aplicada para controlar la proporción sexual en la acuicultura comercial de esta importante especie.



6.-BIBLIOGRAFÍA.

- Albrecht K.H., Eicher E.M. (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240:92–107.
- Arredondo Figueroa J.L. (1998) Sistemática molecular y poblacional de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae) Informe final 1996 -1998 proyecto H017 UAM-CONABIO
- Balza M (2004) Crecimiento somático y relación ARN/ADN en larvas y juveniles de la sardina *Sardinella aurita* Valenciennes, 1847 (Pisces: Clupeidae) del oriente venezolano. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Balza, M., Lemus M., Marin, B.(2007) Tasa de crecimiento en larvas de *Sardinella aurita* Valenciennes, 1847 (Pisces: Clupeidae) del Morro de Puerto Santo, Venezuela. *INCI*, mayo, vol.32, no.5, p.333-338. ISSN 0378-1844.
- Bardakci, F. y Skibinski D.O.F. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73:117-123.
- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273: 216-233.
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol Life Sci* 55: 910–931.
- Baroiller J.F. y D'Cotta H. (2001) Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Bio. Phy. Part C: Toxic and Pharma.* 130: 399–409.
- Baroiller, J. F., H. D'Cotta, and E. Saillant. (2009) Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev.* 3:118–135.
- Blancas Arroyo G.A., Barriga Sosa I.A., Morato Cartagena I., Romero Ramírez C.M., Arredondo Figueroa J.L. (2008) Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de 17β -estradiol y 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera maduración de pez blanco, *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae) *Vet. Méx* v.39 n.1 México jan./mar
- Blancas Arroyo G. A., Figueroa Lucero G., Arredondo Figueroa J.L., Barriga Sosa M. A. (2004) Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1835) bajo condiciones controladas, Planta Experimental de Producción Acuícola, UAM Iztapalapa, México.
- Blasco M, Fernandino JI, Guilgur LG, Strüssmann CA, Somoza GM, Vizziano-Cantonnet D. (2010) Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156: 110–118
- Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. (1998) Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *J. Exp. Zool.* 281: 207-216.
- Bratus A., Słota E. 2006. *DMRT1/Dmrt1*, the sex determining or sex differentiating gene in Vertebrata. *Folia biol. (Kraków)* 54: 81-86.
- Brunner B., Hornung U., Shan Z., Nanda I., Kondo M., Zend-Ajusich E., Haaf T., Ropers H-H., Shima A., Schmid M., Kalscheuer V. M., Schartl M. (2001) Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*. *Genomics* 77: 8-17.
- Bull J.J. (1983) *Evolution of Sex Determining Mechanisms*, Benjamin Cummings, Menlo Park, CA.
- Bull JJ (2008) Sex determination: are two mechanisms better than one? *J Biosci* 32: 5–8.
- Bullejos M, Koopman P. (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 221:201– 205 .
- Burtis K. C., Baker B. S. (1989) *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56: 997-1010.
- Campos, A., (2000) Comparación del crecimiento de tres especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae), en cultivo experimental dentro de sistemas parciales de recirculación de agua. Tesis de Maestría. U.M.S.N.H. Morelia, Michoacán.
- Capel B, Raspberry C, Dyson J, Bishop CE, Simpson E. (1993) Deletion of Y chromosome sequences located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal. *Nature Genet* 5:301–307.



- Chen J. K., Heckert L. L. (2001) Dmrt1 expression is regulated by follicle-stimulating hormone and phorbol esters in postnatal Sertoli cells. *Endocrinology* 142: 1167-1178.
- Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell- Badge R.(1993).The human SRY transcript. *Hum molec Genet* 2:2007–2012
- Conover DO, Kynard BE (1981) Environmental sex determination – Interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213: 577–579.
- Conover DO, Heins SW (1987) The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces, Atherinidae). *Copeia* 1987: 732-743.
- Cuadras C.M. (1991) Métodos de Análisis Multivariante. 2ª edición. Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona.
- Cussac VE, Fernández DA, Gómez SE, López HL (2008) Fishes of southern South America: a story driven by temperature. *Environ Biol Fish*. DOI 10.1007/s 10695-008-9217-2.
- Danielson P. (2002). «The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans». *Curr Drug Metab* 3 (6): pp. 561-97.
- D’Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature- induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59:265–276
- De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes E.M. (2002).A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 22:9005–9014
- Demant A. y C. Robin (1975) Las fases del volcanismo en México una sistesis en relación con la evolución geodinámica desde el cretácico. *Rev. Inst. Geología UNAM* 75:(I) 70-83
- Devlin R, Nagahama Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
- Duarte,C.M, Holmer M., Olsen Y., Soto D., Marbà N., Guiu J., Black K., Karakassis I. (2009) Will the Oceans Help Feed Humanity? *BioScience* 59: 967–976. ISSN 0006-3568, electronic ISSN 1525-3244.
- Erdman S. E., Burtis K. C. (1993) The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J*. 12:527-535.
- Fay CW, Neves RJ, Pardue GB (1983) Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (mid-Atlantic): Atlantic silverside. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service Biological Services Program. FWS/OBS 82 (11.10). 15 p.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*
- Fernandino.J.I,Hattori R.S., Strobl-Mazzulla P.,Strüssmann C.A., Somoza G.M. (2008a) Expression of *dmrt1* and ovarian aromatase during the sex differentiation period in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* *Cybiurn* 32(2) suppl.
- Fernandino JI, Hattori RS, Kimura H, Strüssmann CA, Somoza GM.(2008b) Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH), Chascomús, Argentina.*
- Fernandino J.I., Popesku J.T., Paul-Prasanth B., Xiong H., Hattori R.S., Oura M., Strüssmann C.A., Somoza G.M., Matsuda M., Nagahama Y., Trudeau V.L. (2011) Analysis of Sexually Dimorphic Expression of Genes at Early Gonadogenesis of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Using a Heterologous Microarray Sex Dev DOI: 10.1159/000324423
- Foster, J.W. et al. (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRYrelated sequences in marsupials. *Nature* 359, 531–533
- Froese R, Pauly D (2008) FishBase. Available at: <http://www.fishbase.org>
- Guan G., Kobayashi T., Nagahama Y. (2000) Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/ Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 662-666.
- Guerrero-Estevez Sandra, Moreno-Mendoza Norma (2010) Sexual determination and differentiation in teleost fish *Rev Fish Biol Fisheries*
- Guiguen Y. (2000) Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Curr Top Steroid Res* 3:127–143.



- Guo Y., Cheng H., Huang X., Gao S., Yu H., Zhou R. (2005) Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 950-957.
- Gutiérrez M (2000) Efecto de la Temperatura en el Desarrollo embrionario de la sardina, *Sardinella aurita* Valenciennes, 1847. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- González, C. A. (2003) Actividad citocromo P450 aromatasa en la lubina *Dicentrarchus labrax* Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España. Pgs. 226.
- Gohin M, Bodinier P, Fostier A, Chesnel F, Bobe J. (2011) Aromatase is expressed and active in the rainbow trout oocyte during final oocyte maturation. *Mol Reprod Dev.* 2011 Jul;78(7):510-8.
- Govoroun M, McMeel OM, D'Cotta H, Ricordel MJ, Smith T, Fostier A, Guiguen Y. (2001) Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Zool* 290:558–566.
- Gupta S, Kalbach BG. (2011) The relationship between 11-ketotestosterone, cortisol, and testosterone and condition index for *Poecilia reticulata* California Polytechnic State University, San Luis Obispo
- Hattori R.S., Fernandino J.I., Strüssmann C.A., Somoza G.M., Yokota M., Watanabe S. (2008) Characterization and expression profiles of DMRT1, AMH, SF1 and P450aro genes during gonadal sex differentiation in Patagonian pejerrey *Odontesthes hatcheri*. *Cybiurn* 2008, 32(2) suppl.: 95-96.
- Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, et al. (2009) Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, a Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *PLoS ONE* 4(8): e6548. doi:10.1371/journal.pone.0006548
- Hattori R.S., Murai Y., Oura M., Masuda S., Majhi S.K., Sakamoto T., Fernandino J.I., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A., (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination *PNAS* Vol. 109 No. 8 2955-2959
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603–1614.
- Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T. (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91:403–407.
- Harry JL, Koopman P, Brennan FE, Graves JA, Renfree M.B. (1995) Widespread expression of the testis-determining gene SRY in a marsupial. *Nature Genet* 11:347–349.
- Hulata, G. (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111:155-173.
- Janzen FJ (1994) Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *PNAS* 91: 7487–7490.
- Karube M, Fernandino JI, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA, Yoshizaki G, et al. (2007) Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome p-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during the thermolabile sex determination period in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 307: 625–636.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450–452.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badger. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- Korpelainen H. (1990) Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 147–184.
- Lance V.A. (2008) Is regulation of aromatase expression in reptiles key to understanding temperature-dependent sex determination? *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 309 .
- Lee GL. (1974) Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York; McGraw-Hill Book Co.
- Liu SJ, Govoroun M, D'Cotta H, Ricordel MJ, Lareyre JJ, McMeel OM, Smith T, Nagahama Y, Guiguen Y. (2000) Expression of cytochrome P450 (11beta-hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:291–298.



El efecto de la temperatura en la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan 1880).

- López-García J., Martínez-Palacios C.A., Ríos-Durán G. (2010) Effect of dietary protein and lipid levels on growth, survival and feed utilization of Mexican silverside (*Menidia estor*) juveniles. XIV International symposium on fish nutrition and feeding, Qingdao China., P-269, 119pp.
- Lösel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann H-C, Rossol-Haserot K and Wehling M.,(2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83: 965–1016.
- Lu H., Huan X., Zhan G L., Guo Y., Chen G H & R. Zhou (2007) Multiple alternative splicing of mouse *dmrt1* during gonadal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352:630-634.
- Lutfalla G., Roest C.H., Brunet F.G., Laudet V., Robinson-Rechavi M. (2003) Inventing a Sex-Specific Gene: A Conserved Role of DMRT1 in Teleost Fishes Plus a Recent Duplication in the Medaka *Oryzias latipes* Resulted in DMY *J Mol Evol* 57:S148–S153
- Marchand O., Govoroun M., D’cotta H., Mcmeel O., Lareyre J-J., Bernot A., Laudet V., Guiguen Y. (2000) DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 180-187.
- Marshall Graves J.A., Shetty S. (2001) Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* 290:449–462
- Martínez-Palacios, C.A., Barriga-Tovar, E., Taylor, J.F., Ríos-Durán, M.G., Ross, L.G. (2002)^a Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209, 369-377.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Aguilar-Valdez, M.C., Ross, L.G. (2002)^b Progresos en el cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Ciencia nicolaita* 32, 73-90.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. (2002)^c Avances en el cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor estor*. Invited paper. *Memorias del VI symposium sobre Avances en Nutrición Acuícola VI*. Cancún, México.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Aguilar-Valdez, M.C., Ross, L.G. (2003). Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. *Historia y avances del cultivo de pescado blanco*, 169-190.
- Martínez-Palacios, C.A., Comas-Morte, J., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. (2004) The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238, 509-522.
- Martínez-Palacios, C.A., Ross, L.G. (2005) Rescate del pescado blanco *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *Ciencia y Desarrollo Ene/Febr*, 24-29.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N et al. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.
- Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2003) *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zool J Linn Soc*. Feb;20(2):159-61.
- Mayer A, Mosler G, Just W, Pilgrim C, Reisert I. (2000) Developmental profile of Sry transcripts in mouse brain. *Neurogenetics* 3:25–30.
- Middaugh DP, Hemmer MJ (1987) Influence of environmental temperature on sex ratios in the tidewater silverside, *Menidia peninsulae* (Pisces: Atherinidae). *Copeia* 1987: 958-964.
- Murdock C., Wibbels T. (2003) Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 302-308.
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, Shibata N. (2006) Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 344:353.
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang XT, Nagahama Y. (1998) Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Zool* 281: 362–372.
- Nakamura M., Bhandari R.K., Higa M. (2003) The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiol Biochem* 28:113–117.



- Nam, Y.K., Park J.E., Kim K.K. y Kim D.S. (2003) A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research* 12:523-525.
- Nanda I, et al. (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11778–11783.
- NCBI Taxonomy *Menidia estor*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=587617&lvl=0>
- Neuheimer A.B. y Taggart C.T.(2007) The growing degree day and fish size at age the overlooked metric. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*64:375-385.
- Ospina-Álvarez N, Piferrer F (2008) Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE* 3(7): e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837
- Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., & Miura, T. (2006) Roles of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Fish Spermatogenesis. *Endocrinology*, 147: 5139- 5146
- Payen E, Pailhoux E, Abou Merhi R, Gianquinto L, Kirszenbaum M. (1996) Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int J Dev Biol* 40:567–575.
- Parma P, Pailhoux E, Cotinot C.(1999) Reverse transcriptionpolymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol Reprod* 61:741–748 .
- Penman, D.J., and Piferrer, F. (2008) Fish gonadogenesis. Part1: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev. Fish Sci.* 16(S1): 16-34.
- Piferrer F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 227-281.
- Raymond C. S., Shamu C. E., Shen M. M., Seifert K. J., Hirsch B., Hodgkin J., Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.
- Raymond C. S., Kettlewell J. R., Hirsch B., Bardwell V. J., Zarkower D. (1999) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215: 208-220.
- Reartes JL (1995) El Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): Métodos de cría y cultivo masivo. Roma: COPESCAL, Documento Ocasional. No. 9.
- Redding, J. M y Patiño, R. (2000) Reproductive systems. In: The handbook of experimental animal. The laboratory fish. Academic press (Eds.). pp 261- 267.
- Rodríguez Jiménez M.G., Martínez-Chávez C.C.(2011) Tesis Secuenciación de genes asociados a la diferenciación sexual en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) Facultad de Biología UMSNH.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A. (2004)a Working with the natives: Development of aquaculture technology for the Mexican silverside or Pez Blanco, *Chirostoma estor estor* Jordan. *Fish Farmer* May/June, 34-36.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A. (2004)b Towards a culture technology for pescado blanco, *Chirostoma estor estor*. *Aquaculture news* 31, 2-3.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A., Rodríguez de Sousa, M.L., Campos-Mendoza, A. (2006) The Darwin Initiative and the whitefish *Chirostoma estor estor*: A link between aquaculture, biodiversity and rural livelihoods. *Biocell* 30 (1), 119-120.
- Sánchez-Blanco, J. (2006) El uso de benzocaína e hipotermia como sedantes para el transporte de juveniles de pez blanco, *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879. MSc tesis, Instituto de investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Shan Z., Nanda I., Wang Y., Schmid M., Vortkamp A., Haaf T. (2000) Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, *DMRT1*, in birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 89: 252-257.
- Shen M.M., Hodgkin J. (1988) *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54: 1019-1031.
- Shibata K., Takase M., Nakamura M. (2002) The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen.Comp. Endocrinol.* 127: 232-241.
- Shoemaker C, Crews D. (2009) Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Sem. Cell Dev. Biol.* 20, 292–303.



El efecto de la temperatura en la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan 1880).

- Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Foster J. W., Frischau A-M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Smith C. A., Mcclive P. J., Western P. S., Reed K. J., Sinclair A. H. (1999) Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402: 601-602.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH (2009). "The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken". *Nature* 461 (7261): 267–71.
- Sreenivasulu K., Ganesh S., Raman R. (2002) Evolutionarily conserved, DMRT1, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor*. *Gene Express. Patterns* 2: 51-60.
- Strüssmann CA, Calsina-Cota JC, Phonlor G, Higuchi H, Takashima F (1996^a) Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ Biol Fish* 47: 143-154.
- Strüssmann CA, Moriyama S, Hanke EF, Calsina-Cota JC, Takashima F (1996^b) Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *J Fish Biol* 48: 643–651.
- Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F (1997) Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J Exp Zool* 278: 167-177.
- Strüssmann CA, Patiño R. (1999) Sex Determination, Environmental. In: Knobil E, Neil JD, eds. *Encyclopedia of Reproduction*. New York: Academic Press. pp 402–409.
- Strüssmann CA, Nakamura M. (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem* 26: 13–29. 7.
- Strüssmann CA, Satoru Ito L1,2 (2005) Where Does Gonadal Sex Differentiation Begin? Gradient of Histological Sex Differentiation in the Gonads of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) *Journal of Morphology* 265:190–196
- Strüssmann CA, Kitahara A, Yamashita M (2008) Role of apoptosis in temperature-dependent sex determination of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Cybius* 32: 77–79 (2008).
- Tello-Ballinas, J. A., Toledo-Cuevas, M., Martínez-Palacios, C. A., (2001) Efecto de la salinidad en la supervivencia de huevos y larvas de pez blanco *Chirostoma estor estor* (Pisces: Atherinidae). *Memorias del XVI Congreso Nacional de Ictiología*, 28 oct.-1 nov., 2001, México.
- Tello-Ballinas J.A., Martínez-Palacios C.A., Martínez-Chávez C.C. (2010) Efecto del fotoperiodo y la temperatura en el crecimiento y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Mendia estor*. Tesis Profesional, Maestría Institucional en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Torres-Maldonado L. C., Landa-Piedra A., Moreno-Mendoza, Marmolejo-Valencia A., Meza-Martines A., Merchant-Larios H. (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 20-26.
- Uria GE, Moncayo LME, Garibay GR. (1998) Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, Estado de México. *Hidrobiológica* 8(Supl 1):9–18.
- Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. (2003) Análisis cariotípico de un pescado blanco y de dos charales del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae): evolución cariotípica en el orden Atheriniformes. *Historia y avances del cultivo de pescado blanco*, 79-105.
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161: 676–683.
- Vizziano C.D., Randuineau G., Baron D., Cauty C, Guiguen Y (2007) Characterization of Early Molecular Sex Differentiation in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* *Developmental Dynamics Patterns & Phenotypes* 236:2198–2206.
- Vizziano C.D. (2011) Determinación del sexo. Laboratorio de la fisiología de la reproducción y ecología de peces. Facultad de ciencias, Universidad de la Republica del Uruguay.
- Wasko, A.P., Martins C., Oliveira C. y Foresti F. (2003) Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138:161-165.



El efecto de la temperatura en la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan 1880).

- Waters PD, Wallis MC, Marshall Graves J.A. (2007) Mammalian sex Origin and evolution of the Y chromosome and SRY; *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Jun;18(3):389-400. Epub Feb 24.
- Yamahira K, Conover DO (2003) Interpopulation variability in temperature-dependent sex determination of the tidewater silverside *Menidia peninsulae* (Pisces: Atherinidae). *Copeia* 2003: 155-159.
- Yano *et al.*, (2012) An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Current Biology* doi:10.1016/j.cub.2012.05.045
- Yi W., Zarkower D. (1999) Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggest conservation of sex determining mechanisms. *Development* 126: 873-881.
- Yi W., Ross J. M., Zarkower D. (2000) mab-3 is a direct tra-1 target gene regulating diverse aspects of *C. Elegans* male sexual development and behaviour. *Development* 127: 4469-4480.
- Yoshimoto S & Ito M (2011) A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS J* 278, 1020–1026.
- Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T & Ito M (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2469–2474.
- Zarkower D. 2001. Establishing sexual dimorphism: conservation admit diversity, *Nat. Rev. Genet.* 2: 175-185.



ANEXO 1.



TEMPERATURE-DEPENDENT SEX DETERMINATION IN *Chirostoma estor*, A FRESHWATER ATHERINOPSID

Corona-Herrera Guillermo Armando¹, Tello-Ballinas Juan Antonio¹, Hattori Ricardo Shohei², Martínez-Palacios Carlos Antonio¹, Strüssmann Carlos Augusto², Cárdenas Reygadas Rodolfo³, Martínez-Chavez Carlos Cristian^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México; ²Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan; ³Unidad de Morfología y Función, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

*Corresponding author: cristian.martinez.chavez@gmail.com

Abstract

Chirostoma estor is an endangered freshwater atherinopsid endemic to central Mexico. In this work we investigated the presence of temperature-dependent sex determination (TSD) mechanisms that could be applied as a biotechnological tool for sex control in the culture of this species. This information could be useful also as a bioindicator of anthropogenic or climate change effects on its reproduction.

For this work gametes from three single pair broods were manually fertilized, immediately divided in three groups, and incubated at 14, 21, and 29°C. These thermal treatments were continued through hatching until 30 days after hatching (dah). All groups were then transferred to 21°C. About 40-60 fish per treatment were sampled at 90 dah and processed histologically to determine phenotypic sex ratios. Also to determine the onset of sexual histological differentiation at 21°C we sampled 20 larvae each week from hatching to 30 dah.

The proportions of males for the first brood were 67, 65 and 90% ($p \leq 0.01$), to second brood, 57, 55 and 64 % ($p \geq 0.05$), and to the third brood 48, 75 and 92% ($p \leq 0.01$); at 14, 21, and 29°C respectively. Thermal treatments applied from fertilization show a clear effect in biased phenotypic sex ratios in brood 1 and 3, which translates to substantial differences in the response of each brood to temperature. The histological differentiation onset was determined at 30 dah showing presumptive testis and ovaries with presence of somatic and primordial germ cells and the opening of the primordial ovarian cavity.

These results suggest that incubation at high temperatures during embryonic development can lead to male-biased sex ratios in this species. The effects of lower and medium temperatures were not so clear, suggesting a mixture of genotypic and TSD mechanisms in *C. estor* as in other atherinopsids. Moreover, the histological differentiation onset was observed around 30 dah and suggests that molecular differentiation occurs early in the first larvae stages, however more studies are required to clarify the gonadal development in this important species.



Introduction

The sex determination process in most vertebrates including fish is driven by genetic or environmental or both factors during early stages of development (Korpelainen, 1990; Strüssmann and Patiño, 1999; Bull, 2008). Thus, sex-determining mechanisms can broadly be classified as genotypic (GSD) or environmental (ESD) of which, temperature-dependent sex determination (TSD) is the most understood (Bull, 1983; Valenzuela *et al.*, 2003) and reported in over 13 families of fish (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008).

As in other complex processes sex determination is bound to be controlled by actions of numerous molecular and biochemical pathways (e.g. transcription factors, steroidogenic enzymes, receptors and second messenger systems, etc.) Leading to synthesis of specific proteins (Devlin and Nagahama, 2002). Such proteins themselves can be influenced by temperature, changing their structure and function, affecting phenotypic sex and population dynamics in the wild (Devlin and Nagahama, 2002; Strüssmann and Nakamura, 2002; Lance, 2008; Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008; Baroiller *et al.*, 2009; Shoemaker, 2009).

At the molecular level, a number of master sex genes have already been identified such as *SRY* in eutherian and metatherian mammals (Sinclair, *et al.*, 1990; Foster, *et al.*, 1992), *DMY/dmrt1bY* in *Oryzias latipes* (Matsuda, *et al.*, 2002; Nanda, *et al.*, 2002), *DM-W* in *Xenopus laevis* (Yoshimoto, *et al.*, 2008) and *DMRT1* in chicken (Smith, *et al.*, 2009), all these being transcriptional factors crucial for gonadal sex determination. Additionally two non-transcriptional genes are described as control in sex determination, in Patagonian Pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) the Anti-müllerian Hormone- γ (*AMHy*) has been proposed as a hormone-related alternative mechanism for the transcriptional control of sex determination in vertebrates (Hattori *et al.*, 2012). Also in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) an immune-related gene was described as master sex-determining gene, called (sdY) sexually dimorphic on the Y chromosome (Yano *et al.*, 2012).

The resulting effects of temperature on phenotypic sex ratios in gonochoric fish have been reported to occur in accordance to the following models: a) Low temperatures produce female-biased sex ratios and high temperatures produce male-biased sex ratios, (In some cases, the response may be partial) b) Low temperatures produce male-biased sex ratios and high temperatures produce female-biased sex ratios, c) Male-biased sex ratios are produced at low and high temperatures, while balanced sex ratios are produced at intermediate temperatures (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008).



However, despite the previously stated and the fact that the resulting consequences of temperature on sex determination are well known, the precise molecular interplay and metabolic pathways leading to them remain unclear in fish and other non-mammalian species (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008; Guerrero-Estevez and Moreno Mendoza, 2010; Hattori *et al.*, 2012).

Atherinopsid fish have recently become interesting models of study as they present several types of TSD mechanisms. For example, masculinization is observed at high temperatures for *Menidia menidia* (94% males at 28°C) and *M. peninsulae* (74% at 32°C) (Conover and Kynard, 1981; Conover and Heins, 1987; Yamahira and Conover, 2003). Also, in other three Atherinopsid species of the genre *Odonthesthes*, partial and complete masculinization TSD mechanisms have been reported were *O. argentinensis* presented up to 45% males at 25°C, *O. hatcheri* 69% at 25°C and *O. bonariensis* 100% males at 29°C (Strüssmann *et al.*, 1996^a; Strüssmann *et al.*, 1997).

Species with TSD have been proposed to be reliable indicators of the biological impact of global warming, since temperature-induced sex ratio shifts constitute a direct fitness response to thermal fluctuation and hence population dynamics (Janzen, 1994).

The endemic Mexican freshwater silverside *Chirostoma estor* is an endangered atherinopsid species with critically low wild populations mainly due to pollution, overfishing and lack of conservation programs (Martinez-Palacios *et al.*, 2002^b). Since 1999 studies have been conducted to develop the culture biotechnology of this species, as means to ensure their survival. In this work we set out to determine the presence of TSD mechanisms by histological gonadal sex differentiation and to describe gonadal structure in this species. The information produced in this work broadens the knowledge on TSD mechanisms and is vital to understand, monitor and foresee population dynamics under global warming conditions in this landlocked species. Additionally, it could prove useful as a biotechnological tool for monosex culture of this social, economic and environmentally important species.

Materials and Methods

Experimental system

All experiments were held at the aquaculture laboratory (IIAF-UMSNH) facilities in Morelia, Mexico. The experimental system consisted of nine 60-litre aquarium tanks (3 per replicate) each one containing 6.3 litres cylindrical hatching pipes attached to mechanical, biological and UV filtration with water flow of 174 L H⁻¹. Automatic temperature control was provided by a heater-chiller (CW0500, Resun, China) used throughout the system.



The complete closed water recirculation system was constantly monitored for temperature, salinity (5 g L^{-1}) (Martinez-Palacios *et al.*, 2004) and a photoperiod of 12 light-12 dark periods with fluorescent commercial bulbs (750 lm, 6500K). In all cases water quality was monitored in the system throughout the experiments, salinity was monitored with a refractometer (S/Mill-E 0-100 g L^{-1} , Atago, Japan) temperature with a mercury thermometer (-20 to 110°C), ammonia, pH and nitrite with a colorimetric test kit (FF-3, HACH, USA) and dissolved oxygen with an oximeter (51B, YSI, USA).

Methods

In order to determine the presence of TSD and the thermolabile window in *C. estor*, two independent experiments were carried out:

Experiment 1. Post hatching effects of temperature on sex ratio of *C. estor*

For this experiment, approximately 5000 eggs pooled from ten different broodstock couples were manually stripped, fertilized and incubated at 23°C . Once hatched, fish were divided in three thermal treatments, 19, 23 and 27°C with their respective replicates ($n=3$). After 30 days of thermal exposure, fish from treatments at 19°C and 27°C were gradually acclimated (1°C H^{-1}) to the control temperature (23°C) and maintained for further grow out up to 90 (dah). This was done to ensure survival of enough fish at the end of the trial in both treatments. Fish density at the start of the trial was 3 larvae ltr^{-1} and were fed *ad libitum* *Brachionus plicatilis* and artemia nauplii the first 30 dah while on the last 60 dah they were offered a commercial micro diet (Otohime S-1) at a daily rate of 3% biomass weight.

Experiment 2. Post fertilization effects of temperature on sex ratio of *C. estor*

In this experiment, 2500 eggs from three different broodstock couples were manually stripped and fertilized at 23°C and intentionally kept separate in order to assess parental differences on offspring sex fate. Fertilized eggs of each couple were distributed in such a way that eggs of each couple were subjected to all three thermic treatments ($n=3$), 14, 21 and 29°C . Thermic treatments ended at day 30 after hatching (dah) and all treatments were then acclimated at 21°C (control temperature) and maintained for 60 days longer for on growing as in exp 1. Feeding consisted of live *B. plicatilis* and artemia nauplii offered *ad libitum* during 90 days, based on (Martinez-Palacios *et al.*, 2002^b). Fish density and acclimatization process was performed as previously described in experiment 1.

Monitoring and sampling

At the end of both experiments, 40-60 larvae were randomly obtained from each treatment/couple and were sedated with ice water and culled as previously mentioned for other Atherinopsid species (Hattori *et al.*, 2009).



Hatching, survival rate and mean final weight, was recorded. Individual larvae were dissected at the trunk for gonadal histology description purposes, in order to determine phenotypic sex ratio and thermal sex ratio response between broods in the case of Exp. 2. Also at 21°C were obtained 20 larvae every week from 1 dah to 30 dah in order to determine when the histological differentiation process begins.

Tissues were fixed in Bouin's solution (HT10132, Sigma-Aldrich, USA) for 24 hours and were stored in 70% ethanol, then were performed ascending ethanol series (Uria *et al.*, 1998), for inclusion in paraffin enriched with highly pure polymers (K93091409-Histosec, Merck, Germany) cross sections were made of 6 microns with a microtome (Jung-Histocut 820, Leica, Germany), sections were mounted on glass slides and were stained with hematoxylin-eosin-phloxine (Hattori *et al.*, 2009). Preparations were observed with a light microscope and the phenotypic sex was determined according to criteria used for Atherinopsids by Strüssmann *et al.*, (1996^b and 1997).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Sigma Plot software (v.11.00, Systat Software Inc.). The significance on hatching rate, survival, phenotypic sex ratio and thermal sex ratio response between broods was determined by X^2 test. The mean final weight data sets were tested for normality (Kolmogorov- Smirnov's test) and equal variance among groups (Bartlett's test). Data sets that were normally distributed were analyzed with one-way ANOVA with post hoc Tukey's test for multiple comparisons. Non-parametric data sets were analysed with Kruskal-Wallis test followed by post hoc Dunn's test to establish significance between treatment groups. Significance was set at $p \leq 0.05$ for all analysis except for X^2 that was set at $p \leq 0.01$.

Results

Water quality

At all times, water quality was within safe levels with no trace of ammonia. Ambient conditions (S‰, OD, pH, NH₃, NH₄, NO₂) and especially temperature were constantly monitored and maintained around $\pm 0.5^\circ\text{C}$ close to experimental temperatures at all times.

Gonadal description

In experiment 2 at 1 dah, early undifferentiated gonads shows a rounded like shape, with presence of somatic and primordial germ cells (PGC's) as see in Fig. 1-A, at 30 dah were observed presumptive testes (Fig. 1-B) showing PGC's and somatic cells (SC), also were observed presumptive ovaries (Fig. 1-C) in the onset of ovarian cavity opening, with the presence of PGC's and somatic cells.



Fig.1. Early gonad development of *C. estor* larvae at 21°C. (A) Undifferentiated gonad at 1 dah. (B) Presumptive Testis at 30 dah. (C) Presumptive Ovary at 30 dah. MS, mesorchium; PGc, Primordial Germ Cell; SC, somatic cells; POc, Presumptive Ovarian Cavity; scale bar = 20 microns.

In exp. 1, presence of testicular lobes in development with spermatogonia, spermatocysts, first order spermatocytes, spermatic duct, Sertoli, Leydig and somatic cells were observed in fish raised under 19, 23 and 27°C (Fig. 2-A). Similarly, male gonads raised at 14°C in exp. 2 had testicular lobes in development; fish testes at 21 and 29°C had testicular lobes well developed as show in figure 2-C. In females of both trials ovaries were observed in phase I; characterized by oogonia, pachytene and diplotene oocytes and phase II with oogonia, pachytene, diplotene and perinucleolares oocytes, (Fig. 2-B and 2-D).

The hatching rate from the fertilized pool of eggs in exp. 1 (brood 1) was 78.5% at 23°C and survival rate at 90 dah were 29.3%, 47.2% and 48.1% at 19, 23 and 27°C respectively with significant differences between 27-23°. The mean final weight were 218.43 ± 10.3 , 266.02 ± 12.2 and 275.96 ± 13.1 mg at 19, 23 and 27°C respectively. No significant differences were found between 27 and 23°C, however significant differences between these treatments and 19°C were found (Table 1).

In experiment 2 the hatching rates at 14, 21 and 29°C were to second brood, 30.4, 52.4 and 60.8%; to third brood were 16.0, 40.0 and 13.0 % and to brood fourth were, 42.0, 69.0, 41.0% with significant differences in all treatments by each brood (Table 1). Survival at 90 dah were 7.8, 91.6 and 37.1% in brood 2; 14.5, 83.3 and 38.4 % in brood 3; 25.0, 81.1 46.3 % in brood 4, at 14, 21 and 29°C separately, with significant differences in all treatments as show in table 1 by each brood.

The mean final weight were for second brood, 216.67 ± 57.7 , 555.0 ± 82.5 and 680.0 ± 226.1 mg, for third brood were 257.14 ± 78.6 , 640.0 ± 131.3 and 750.0 ± 191.1 mg, finally to fourth brood were 252.38 ± 51.1 , 545.0 ± 139.4 and 723.0 ± 133.5 mg, at 14, 21 and 29°C correspondingly, with no significant differences between 21 and 29°C, nevertheless significant differences was observed among these treatment and 14°C for brood 2 and 3, but significant differences was observed in brood 4 for all treatments (see Table 1).

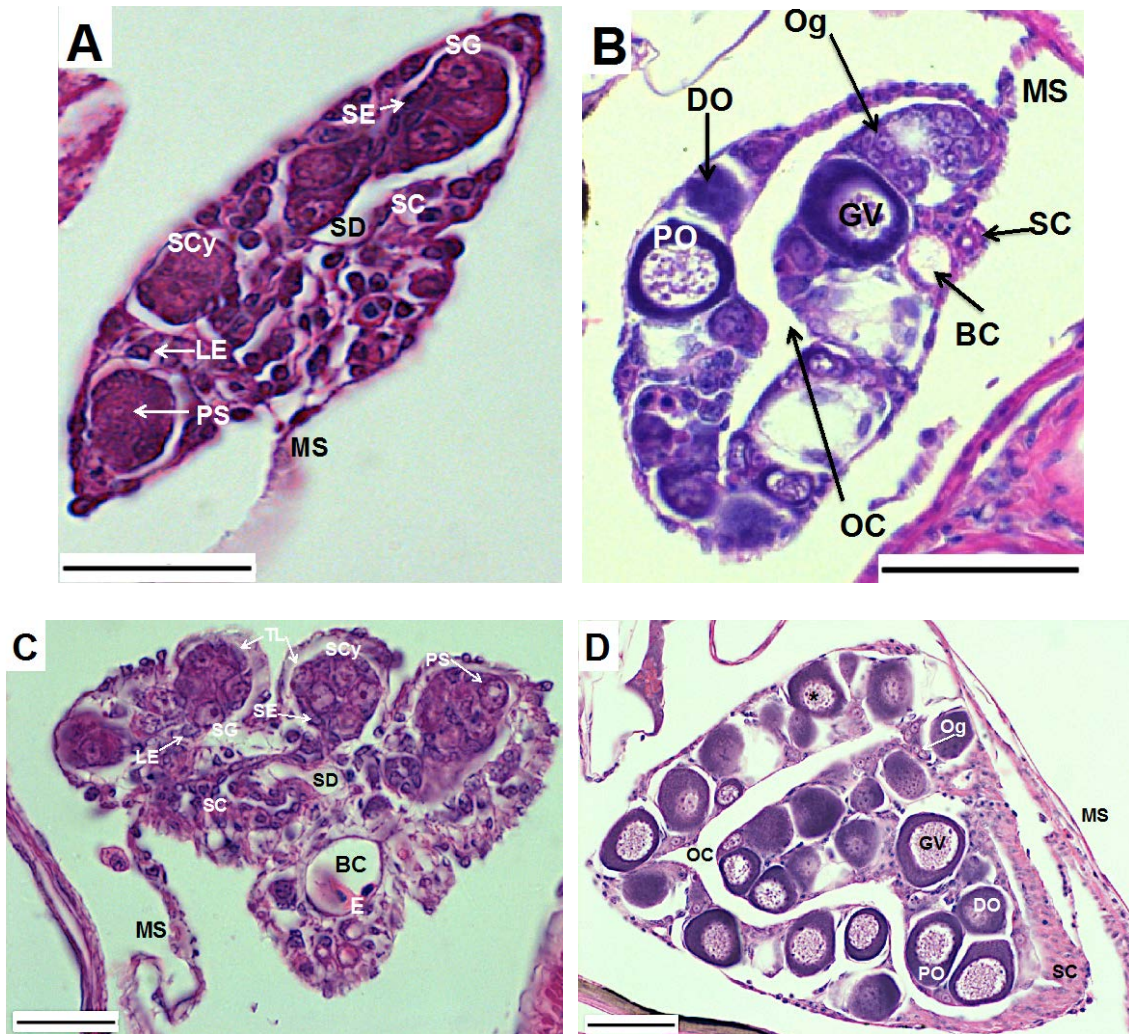


Fig. 2. Histological appearance of testes (A, C) and ovaries (B, D) in 90 day old juveniles reared at 27°C (experiment 1; A, B) and 29°C (experiment 2; C, D). Fish size (body standart length) is as follows: A) 29.29 mm, B) 33.71 mm, C) 40.21 mm, and D) 40.33 mm). Testicular structure (A,C). MS, mesorchium; SG, spermatogonia; SCy, spermatocyst; TL, testicular lobe; PS, primary spermatocytes; SD, spermatic duct; SE, Sertoli cells; LE, Leydig cells; SC, somatic cells; BC, blood capillary; E, erythrocyte; scale bar = 20 microns. Ovarian structure (B,D). MS, mesorchium; OC, ovarian cavity; Og, oogonia; DO primary oocyte in diplotene; PO, primary oocyte perinucleolar stage; GV, germinal vesicle; SC, somatic cells; Asterisk, Balbiani body; BC, blood capillary; scale bar = 50 microns.

Sex ratio

In exp. 1, the male proportions of fish out of the pooled eggs, raised after hatch at 19, 23 and 27°C was found to be 40% (n= 40), 52% (n= 60), and 50% (n= 60) respectively with no significant differences between them.

However, in exp. 2 fish raised under different thermal treatments were kept separated by broodstock origin, sex fate could also be analysed per broodstock couple that originated them. As such, 67, 65 and 90% of fish resulted male from the first brood with significant differences between 29 vs. 21 and 29 vs. 14°C. In the second brood 57, 55 and 64 % of the fish resulted phenotypic males with no



significant differences between them and finally in the third brood 48, 75 and 92% of the fish were phenotypic males at 14, 21, and 29°C respectively, with significant differences between all of them (Table 1).

Table 1. Hatching rates, survival, growth, and sex ratios of *C. estor* incubated and reared at different temperatures from after (experiment 1) or before (experiment 2) hatching to 90 days after hatching. (a,b,c) indicate significant differences between each treatment and each brood.

Experiment	Brood	Temperature (°C)	Hatching rate (%)	Survival rate (%)	Mean final weight (mg)	Sex ratio	
						(%)	(n)
1	1	19		29.3 ^a	218.43±10.3 ^a	40 ^a	40
	1	23	78.5	47.2 ^b	266.02±12.2 ^b	52 ^a	60
	1	27		48.1 ^b	275.96±13.1 ^b	50 ^a	60
2	2	14	30.4 ^a	7.8 ^a	216.67±57.7 ^a	67 ^a	12
	2	21	52.4 ^b	91.6 ^b	555.0±82.5 ^b	65 ^a	20
	2	29	60.8 ^c	37.1 ^c	680.0±226.1 ^b	90 ^b	20
	3	14	16.0 ^a	14.5 ^a	257.14±78.6 ^a	57 ^a	7
	3	21	40.0 ^b	83.3 ^b	640.0±131.3 ^b	55 ^a	20
	3	29	13.0 ^c	38.4 ^c	750.0±191.1 ^b	64 ^a	14
	4	14	42.0 ^a	25.0 ^a	252.38±51.1 ^a	48 ^a	21
	4	21	69.0 ^b	81.1 ^b	545.0±139.4 ^b	75 ^b	20
	4	29	41.0 ^c	46.3 ^c	723.0±133.5 ^c	92 ^c	26

Discussion

Atherinopsid fish have become interesting models for understanding temperature sex determination mechanism in vertebrates. In this work we analyzed the presence of TSD in *C. estor* and the presumptive thermolabile window in this Atherinopsid species. For this, we exposed fish to several thermal treatments after (Exp.1) and previous to hatching (Exp. 2).

Experiment 2 showed hatching rate in the high (29 °C) and low temperature (14°C) is significantly inferior in all broods. In exp. 1 Survival rates are differently between the lowest temperature (19°C) and the other ones (23 and 27 °C). In experiment 2 survival rates for all treatments and broods are significantly different, these results indicate that high and low temperatures were in the extreme range of what is supported by *C. estor* and control temperature for both experiments (21 and 23°C) is in agreement with the optimal growth and survival temperatures (22 and 25°C) reported previously for this species (Martinez-Palacios *et al.* 2002^a).



Indeed in our experience, this species tolerates better high temperatures than low temperatures in captivity. However, it is important to carry out long-term experiments to evaluate the effect of temperature on incubation, growth and survival of this species and determinate the thermic threshold for commercial culture.

In exp. 1 we show that sex ratio of newly hatched *C. estor* larvae is not affected, when exposed to different thermal treatments (19, 23 and 27 °C) for 30 dah (Table 1). On the other hand, when fish were exposed to similar thermal treatments (14, 21 and 29 °C) during early development (fertilization up to hatch) a typical TSD masculinizing effect was observed in high temperatures. In such trial, the phenotypic male proportion obtained in brood 2 and 4 (90% and 92%) at 29°C were significantly different, and is similar to that reported for other Atherinopsid species such as *M. peninsulae* (Yamahira and Conover, 2003), *O. argentinensis* (Strüssmann *et al.*, 1996a), *O. hatcheri* (Strüssmann *et al.*, 1997) and *Menidia menidia* (Conover and Heins, 1987), where a combination of TSD/GSD is observed (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008). Importantly however, low temperatures tested in this study (14 °C; Exp. 2) do not seem to have a clear feminizing effect as observed in *O. bonariensis*, *O. hatcheri* and *M. peninsulae* were 100%, 89% and 90% females were reported respectively (Strüssmann *et al.* 1997; Strüssmann *et al.*, 1996^a; Yamahira and Conover, 2003). In this regard, *C. estor* is similar to *M. menidia* were no more than 50% females were obtained at the low temperatures tested (Conover and Heins, 1987).

It seems necessary to suppose that the different models of TSD effects in fish proposed by Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008. rely in different mechanisms and levels of action, thus allowing the plasticity and variety of sex control mechanisms. On the other hand, the degree of involvement of GSD/TSD mechanisms within each model seems to be more species specific and variable between individuals. In this study, such differences were evident when larvae from different couples were analyzed (Table 1). The sex ratio difference found between broods in this study could be due to the genetic responses lead independently by each broodstock couple. However, more detailed studies are needed to clarify and pinpoint the mechanisms involved in such variation and whether genetic components or epigenetic mechanism's are involved. The present results clearly suggest that a mixture of GSD/TSD mechanisms are at work in this species and because such effects can only be observed when thermal treatments are applied during early development, we propose that the thermolabile window occurs somewhere between fertilization and hatching as has been reported in *O. hatcheri* (Strüssmann *et al.*, 1996^a).

A recent report on the potential role of AMHy as master sex regulator in *O. hatcheri* during the termolabile period (Hattori *et al.*, 2012), and sdY in *O. mykiss* (Yano *et al.*, 2012); suggests that several genetic mechanisms could be at work in fish. With that in mind further work is currently being developed to



describe sex candidate gene profiles during the thermolabile period found in the current work.

The histological description of primordial gonads at 1 and 30 dah indicates that histological gonadic differentiation onset occurs around 30 dah (Fig. 1), and presents an anterior-posterior pattern from left to right and is similar to that described for *O. bonariensis* (Strüssmann and Ito, 2005). However further studies are required in order to have an in depth description of the histological, biochemical and molecular differentiation of the gonad of *C. estor* in order to clarify the gonadal development in this species.

At the end of both experiments (90dah) the gonads show clearly identifiable testes and ovaries (see Fig.2) independently of the variances in mean final weight (Table 1). These differences between experiments are most likely due to the different feeding types and fish handling variability inherent to different experiments. However such differences did not affect gonadal differentiation between experiments (Fig.2).

Temperature sex determination mechanisms are highly variable and in general are not fully understood. In this study we observed a mixture of genotypic and temperature-dependent sex determination mechanisms in *Chirostoma estor* as in other atherinopsids.

The present findings suggest that because the thermolabile window occurs before hatching and *C. estor* spawns in shallow areas more prone to high temps in the wild, natural population dynamics in this species could be sensitive to climate change. This information could also be applied to control desired sex ratios in aquaculture in this social, economic and environmentally important species.

Acknowledgments

We would like to thank CONACYT, CIC-UMSNH and PIFI-UMSNH for grant-in-aid to G.C.H. and CIAD- Mazatlan, AEL-UMSNH, LPB-TUMSAT, for histology and photo processes.

References

1. Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273: 216-233.
2. Baroiller, J. F., H. D'Cotta, and E. Saillant. (2009) Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev.* 3:118–135.
3. Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. (1998) Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *J. Exp. Zool.* 281: 207-216.
4. Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. Menlo Park: Benjamin/ Cummings. 316p.
5. Bull JJ (2008) Sex determination: are two mechanisms better than one? *J Biosci* 32: 5–8.
6. Conover DO, Kynard BE (1981) Environmental sex determination – Interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213: 577–579.



7. Conover DO, Heins SW (1987) The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces, Atherinidae). *Copeia* 1987: 732-743.
8. Devlin R, Nagahama Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
9. Foster, J.W. et al. (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 359, 531–533
10. Guerrero-Estevez Sandra, Moreno-Mendoza Norma (2010) Sexual determination and differentiation in teleost fish *Rev Fish Biol Fisheries*
11. Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, et al. (2009) Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, a Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *PLoS ONE* 4(8): e6548. doi:10.1371/journal.pone.0006548
12. Hattori R.S., Murai Y., Oura M., Masuda S., Majhi S.K., Sakamoto T., Fernandino J.I., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A., (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination *PNAS* Vol. 109 No. 8 2955-2959
13. Janzen FJ (1994) Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *PNAS* 91: 7487–7490.
14. Korpelainen H. (1990) Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 147–184.
15. Lance V.A. (2008) Is regulation of aromatase expression in reptiles key to understanding temperature-dependent sex determination? *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 309 .
16. Martínez-Palacios, C.A., Barriga-Tovar, E., Taylor, J.F., Ríos-Durán, M.G., Ross, L.G. (2002^a) Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209, 369-377.
17. Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Aguilar-Valdez, M.C., Ross, L.G. (2002^b) Progresos en el cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Ciencia nicolaita* 32, 73-90.
18. Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Aguilar-Valdez, M.C., Ross, L.G. (2003). Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. *Historia y avances del cultivo de pescado blanco, SAGARPA* 169-190.
19. Martínez-Palacios, C.A., Comas-Morte, J., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. (2004) The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238, 509-522.
20. Matsuda M, et al. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563.
21. Nam, Y.K., Park J.E., Kim K.K. y Kim D.S. (2003) A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research* 12:523-525
22. Nanda I, et al. (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11778–11783.
23. Ospina-Álvarez N, Piferrer F (2008) Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE* 3(7): e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837
24. Redding, J. M y Patiño, R. (2000) Reproductive systems. In: *The handbook of experimental animal. The laboratory fish*. Academic press (Eds.). pp 261- 267.
25. Shoemaker C, Crews D. (2009) Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Sem. Cell Dev. Biol.* 20, 292–303.
26. Sinclair AH, et al. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
27. Smith CA, et al. (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461:267–271.
28. Strüssmann CA, Calsina-Cota JC, Phonlor G, Higuchi H, Takashima F (1996^a) Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ Biol Fish* 47: 143-154.
29. Strüssmann CA, Moriyama S, Hanke EF, Calsina-Cota JC, Takashima F (1996^b) Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *J Fish Biol* 48: 643–651.
30. Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F (1997) Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J Exp Zool* 278: 167-177.
31. Strüssmann CA, Patiño R. (1999) Sex Determination, Environmental. In: Knobil E, Neil JD, eds. *Encyclopedia of Reproduction*. New York: Academic Press. pp 402–409.



32. Strüssmann CA, Nakamura M. (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem* 26: 13–29. 7.
33. Strüssmann CA, Satoru Ito L1,2 (2005) Where Does Gonadal Sex Differentiation Begin? Gradient of Histological Sex Differentiation in the Gonads of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) *Journal of Morphology* 265:190–196.
34. Strüssmann CA, Kitahara A, Yamashita M (2008) Role of apoptosis in temperature-dependent sex determination of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Cybiurn* 32: 77–79
35. Tello-Ballinas J.A., Martínez-Palacios C.A., Martínez-Chávez C.C.(2010) Efecto del fotoperiodo y la temperatura en el crecimiento y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Mendia estor*. Tesis Profesional, Maestría Institucional en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
36. Uria GE, Moncayo LME, Garibay GR. (1998) Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, Estado de México. *Hidrobiológica* 8(Supl 1):9–18.
37. Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161: 676–683.
38. Wasko, A.P., Martins C., Oliveira C. y Foresti F. (2003) Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138:161-165.
39. Yamahira K, Conover DO (2003) Interpopulation variability in temperature-dependent sex determination of the tidewater silverside *Menidia peninsulae* (Pisces: Atherinidae). *Copeia* 2003: 155-159.
40. Yano *et al.*, (2012) An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Current Biology* doi:10.1016/j.cub.2012.05.045
41. Yoshimoto S, et al. (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2469–2474.