

A. LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN RODABALLO Y SU APLICACIÓN INDUSTRIAL

RESUMEN (300 PALABRAS)

Pocas especies de peces han demostrado heteromorfismos cromosómicos asociados a cromosomas mitóticos o meióticos. Esta observación es congruente con la rápida evolución de los mecanismos genéticos de determinación sexual en los peces. De esta forma, en la mayoría de especies los cromosomas sexuales se encuentran en una etapa inicial de la diferenciación. El rodaballo es un pez plano de gran valor comercial, siendo una de las especies marinas más prometedoras de la acuicultura europea. Varios programas de mejoramiento genético se están llevando a cabo por varias empresas de rodaballo, siendo uno de sus principales objetivos el control de la ratio sexual. Las hembras de esta especie alcanzan la talla comercial 4-6 meses antes que los machos, de ahí el interés de la industria en la obtención de las poblaciones todo-hembras. En este estudio se utilizó el mapa genético del rodaballo para identificar QTLs asociados al sexo en rodaballo. La identificación de un QTL mayor, que explica la mayor parte de la varianza del carácter, nos ha conducido a la localización del gen mayor determinante del sexo en rodaballo (SmaSD). Ligado a este gen se ha detectado la presencia de un marcador microsatélite (M-SmaSD) del mapa genético de referencia. El análisis familiar del marcador M-SmaSD permite el sexado molecular de los rodaballos desde su eclosión con una fiabilidad del 99% en las familias testadas. Además, los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que el mecanismo de determinación cromosómica en rodaballo es ZZ/ZW. La identificación precoz del sexo en las especies de este género supone una valiosa herramienta para los programas de selección, ya que permite seleccionar a los individuos de mayor interés productivo, y avanzar más rápidamente en la consecución de poblaciones todo-hembras.

Palabras clave: rodaballo, región determinante del sexo, QTL

INTRODUCCIÓN

El cultivo de rodaballo

La demanda mundial de productos pesqueros se ha multiplicado por ocho en los últimos 50 años, debido al incremento de la población y el mayor consumo por persona. Los océanos se están explotando cerca de su producción máxima, por lo que los futuros incrementos en la disponibilidad de productos pesqueros sólo podrán provenir de la acuicultura, como ha venido sucediendo en los últimos quince años.

Al contrario que en la dorada y la lubina, en el caso del rodaballo sigue existiendo una parte importante del aprovisionamiento de esta especie que procede de la pesca extractiva a nivel mundial, representando el rodaballo de crianza el 60,7% del total comercializado en 2008 (Figura 1).

España se sitúa entre los principales productores acuícolas mundiales de rodaballo y como primer productor europeo. En Galicia destaca la producción de rodaballo entre la piscicultura, siendo el primer productor nacional y con expectativas de seguir aumentando la producción en los próximos años (Figura 2).

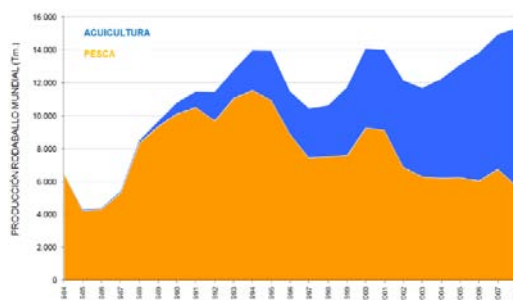


Figura 1. Evolución de las fuentes de obtención de rodaballo en Europa para el periodo 1984-2008 (APROMAR 2010).

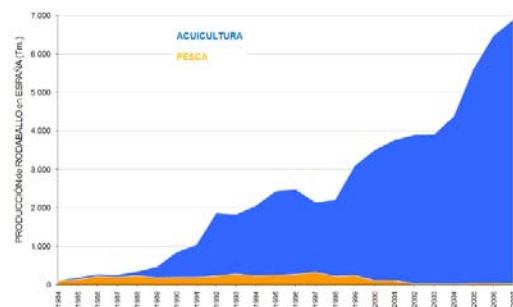


Figura 2. Evolución de las fuentes de obtención de rodaballo en España para el periodo 1980-2008 (APROMAR 2010).

Para que estas previsiones favorables sean posibles es necesario mejorar las condiciones actuales de cultivo en todas sus vertientes, tanto a nivel industrial como sanitario, para lo cual será muy importante el papel de los programas de I+D+i (Investigación-Desarrollo e innovación). La inversión en investigación también es la forma de poder seguir siendo competitivos en el futuro en un mercado globalizado.

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es un pez teleósteo perteneciente a la familia Scophthalmidae del orden Pleuronectiformes.

En Galicia el cultivo de esta especie se realiza mayoritariamente de modo intensivo en tanques en tierra durante todo el proceso productivo (Figura 3). Aunque se ha avanzado mucho en la mejora de las condiciones de producción aún hay una serie de problemas que impiden obtener el máximo rendimiento potencial de las piscifactorías.



Figura 3. Cultivo de rodaballo en tanques en tierra.

Entre los problemas del cultivo de rodaballo son destacables el control de la reproducción, marcada por la necesidad de la freza forzada; la aparición de peces con anomalías morfológicas o de pigmentación, que impiden su comercialización; la baja viabilidad larvaria, que ha ido mejorando pero que en un principio era sólo de un 5%; el largo período hasta alcanzar la talla comercial; y las patologías.

Como en otras muchas especies de peces teleósteos, **en el rodaballo, el crecimiento de las hembras es mayor que el de los machos**, llegando a alcanzar el **tamaño comercial entre 4 y 6 meses antes**. Este dimorfismo sexual para crecimiento determina una importante dispersión de tallas con el consiguiente coste en el manejo de los ejemplares en las granjas de cultivo. Además, mientras los machos maduran sexualmente entre los 15-18 meses,

las hembras no lo hacen hasta después de haber cumplido 24 meses de edad. La maduración sexual está relacionada con una pérdida de calidad de la carne, una mayor susceptibilidad a enfermedades y, especialmente, una ralentización del crecimiento. Por todo ello, **en el cultivo intensivo de esta especie es muy interesante incrementar la proporción de hembras, ya que de esta manera se incrementaría la producción de carne, y además se podrían comercializar individuos de mayor tamaño, de valor económico superior.**

Determinación sexual en peces

Los mecanismos de reproducción en peces son muy diversos. Asimismo, la determinación del sexo fenotípico en este grupo de vertebrados es muy versátil y se debe a un mecanismo dual que controla la expresión de los genes relacionados con el desarrollo gonadal: i) la determinación sexual que define el sexo genético; y ii) la diferenciación gonadal que define el sexo fisiológico. El sexo genético se fija en el momento de la fertilización y es el resultado de la combinación del material genético del óvulo y del espermatozoides de los progenitores. El gen o genes responsables de que la gónada se acabe convirtiendo en ovario o testículo puede/n estar localizado/s en un par cromosómico concreto, el par sexual, o distribuidos en distintos lugares de genoma. El sexo fisiológico se desarrolla después del sexo genético, durante la ontogénesis, a través de procesos bioquímicos bajo control genético, pero puede estar influenciado por factores ambientales. Factores como la temperatura, hormonas o comportamientos sociales pueden modificar la ruta de desarrollo gonadal (Baroiller & D'Cotta, 2001; Piferrer & Guiguen, 2008).

La identificación del sexo en rodaballo no se puede realizar con fiabilidad hasta la maduración sexual. Esto imposibilita la identificación precoz de machos y hembras necesaria en los planes de selección y producción de las empresas.

El análisis cariotípico no ha revelado la existencia de heteromorfismos cromosómicos asociados al sexo, tal como se ha observado en la mayoría de los peces (Bouza et al., 1994; Cuñado et al., 2001). Sin embargo, a partir del análisis de progenies de individuos manipulados cromosómicamente (triploides y ginogénéticos) y en las progenies de neomachos se ha podido demostrar la existencia de factores genéticos implicados en la determinación sexual (Piferrer

Un pequeño trozo de la aleta caudal de cada individuo se cortó y almacenó en etanol absoluto 4°C para la extracción de ADN.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Chelex-100 (Walsh et al., 1991), procedimiento rápido, barato, y que suministra la cantidad y calidad de ADN apropiada para el análisis. El protocolo se detalla a continuación:

1. Precalentar a 60 °C la solución Chelex al 10%.
2. Cortar un pequeño trozo de tejido muestral conservado en etanol absoluto a 4 °C.
3. Disponer el fragmento muestral (aleta) en un tubo estéril de 2 mL (con tapa enroscada) y añadir 500 µL de Chelex al 10%.
4. Agitar utilizando un vórtex.
5. Añadir 15 µL de Proteínasa K (20 mg/mL).
6. Incubación a 56 °C durante 1 hora en el horno de hibridación con frecuentes agitaciones, cada 10 minutos.
7. Incubar 15 minutos a 100 °C.
8. Conservar a 4 °C.
9. Antes de cada uso:
 - i) Agitar con vortex durante 10 segundos.
 - ii) Centrifugar 10 minutos a 10.000 r.p.m.
 - iii) Cargar 1 µL para cada reacción de PCR.

Análisis molecular de los marcadores

Se analizaron un total de 98 marcadores microsatélite distribuidos homogéneamente en el mapa de rodaballo (Bouza et al., 2007, 2008) para la detección de QTLs (Figura 4). Después del análisis de QTLs, 2 marcadores adicionales próximos al QTL detectado fueron analizados para tener mayor soporte estadístico y para la búsqueda de asociación entre el fenotipo y algún alelo de los marcadores. La amplificación por PCR de los marcadores se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: "Polymerase Chain Reaction"; Mullis, 1983) a partir del ADN extraído. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 15µl incluyendo:

- 30ng de ADN
- 1 μ M de cada cebadores (el directo marcado)
- 0.1 mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- 1.5X PCR Gold Buffer
- 1.5 mM MgCl₂
- 0.5 unidades de AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (MJ Research) como sigue: desnaturalización inicial de 10 min a 95° C seguida de 35 ciclos a 94°C de desnaturalización durante 45 s, 50 s a la temperatura específica de anillamiento de los cebadores y 50 s a 72°C para la elongación, finalmente un paso de extensión a 72°C durante 10 min.

Los fragmentos de la reacción de amplificación se analizaron en un secuenciador automático. Este análisis permite identificar las variantes alélicas del marcador en función de su tamaño en pares de bases. El fluorocromo añadido en el paso anterior a uno de los cebadores empleados en la reacción de PCR, permite la detección de los fragmentos con el láser del secuenciador y la visualización en el software de imagen. El genotipado se realizó en un secuenciador automático ABI 3730 y se analizó mediante el paquete GENEMAPPER versión 3.7 (Applied Biosystems).

Rastreo de QTLs

La metodología empleada consiste en utilizar como criterio de selección una variable genética, en este caso marcadores moleculares, asociados a la característica de interés, en este caso el sexo. Se trata de identificar, en el genoma, marcadores próximos a las regiones cromosómicas implicadas en la manifestación de caracteres de interés dentro de las familias. Estas regiones se llaman "QTL" o *Quantitative Trait Loci* (QTLs), es decir región del ADN cuya información genética es capaz de influir significativamente en la expresión de un carácter, en el individuo o en su descendencia. Como ejemplo, si un marcador está asociado con un QTL determinante del sexo, las diferentes formas del marcador (conocidas como alelos) se utilizan para establecer qué alelo está asociado al fenotipo correspondiente con el sexo femenino, y cual al sexo masculino. Para asociar un fenotipo a un alelo concreto del marcador asociado a la región determinante del carácter estudiado, se hace un análisis

del marcador dentro de las familias, de los descendientes y/o ascendientes, de manera que dicho marcador puede ser usado en los planes de selección.

El análisis de QTLs se realizó mediante el paquete GridQTL 1.3.2 (Seaton et al., 2006). El número de iteraciones fue de 1000. La búsqueda de asociación genotípica y alélica entre marcadores microsatélite específicos y el sexo, tanto en las familias como en los reproductores, se realizó mediante el test χ^2 de Pearson. La corrección de Bonferroni fue considerada para tests múltiples.

Genómica comparada

Se realizaron búsquedas contra bases de datos públicas BLAST/Autofact para la anotación de genes asociados a los marcadores próximos al QTL de sexo. Además, las secuencias de los clones genómicos de rodaballo que contenían los loci microsatélite próximos al QTL asociado con el sexo fueron comparadas mediante NCBI-BLAST con los genomas de los peces modelo descargados de <ftp://ftp.ensembl.org>: *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, y *Gasterosteus aculeatus*. Se consideraron significativos hits con un punto de corte de $E < 10^{-5}$ (Stemshorn et al., 2005).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos evidenciaron la existencia de un factor genético mayor (Figura 5; SmaSD: “*Scophthalmus maximus* sex determinant”) principal responsable de la determinación del sexo en esta especie en el grupo de ligamiento 5 (GL5) del mapa genético de referencia (Bouza et al., 2007, 2008; Martínez et al., 2008). Ligado al SmaSD se detectó la presencia del marcador microsatélite M-SmaSD= SmaUSC-E30. El refinamiento del mapa en esta región sugiere que este marcador estaría a una distancia entre 2.6-1.4 Mb del gen mayor determinante del sexo.

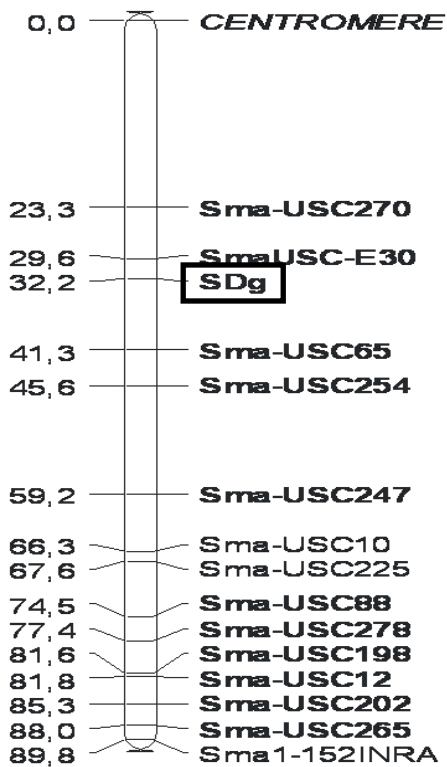


Figura 5. Localización del gen determinante del sexo (SDg) en el grupo de ligamiento 5 (GL5)

Además, la secuencia microsatélite detectada se amplificó en otras especies del género *Scophthalmus*, al hibridar en regiones altamente conservadas. Esto posibilita que dicha secuencia pueda servir para la identificación precoz del sexo en otras especies del género *Scophthalmus*.

El método descrito permite analizar el marcador M-SmaSD, a partir de cualquier región de tejido epitelial que no afecte a la viabilidad del pez. La muestra una vez tomada es pretratada para poder llevar a cabo la PCR correspondiente para amplificar el marcador y posteriormente se realiza un análisis de los fragmentos obtenidos mediante el genotipado de los mismos (Figura 6). Para identificar el sexo de los individuos a partir del genotipado del marcador, se aplican los principios de la selección asistida por marcadores, aplicados usualmente en los planes de selección genética.

Cuando este marcador es informativo, los machos y las hembras presentan un genotipo distinto para el mismo, lo que permite la discriminación molecular del sexo. Sin embargo, este genotipo no es discriminante a nivel de especie, por lo que es necesario conocer el genotipo de los padres y de los

descendientes (o ascendientes) que se pretende sexar mediante el análisis del marcador M-SmaSD.

El análisis familiar del marcador M-SmaSD, fuertemente ligado al factor determinante del sexo SmaSD, permite el sexado molecular de los rodaballos desde su eclosión con una fiabilidad del 99% en las familias testadas.

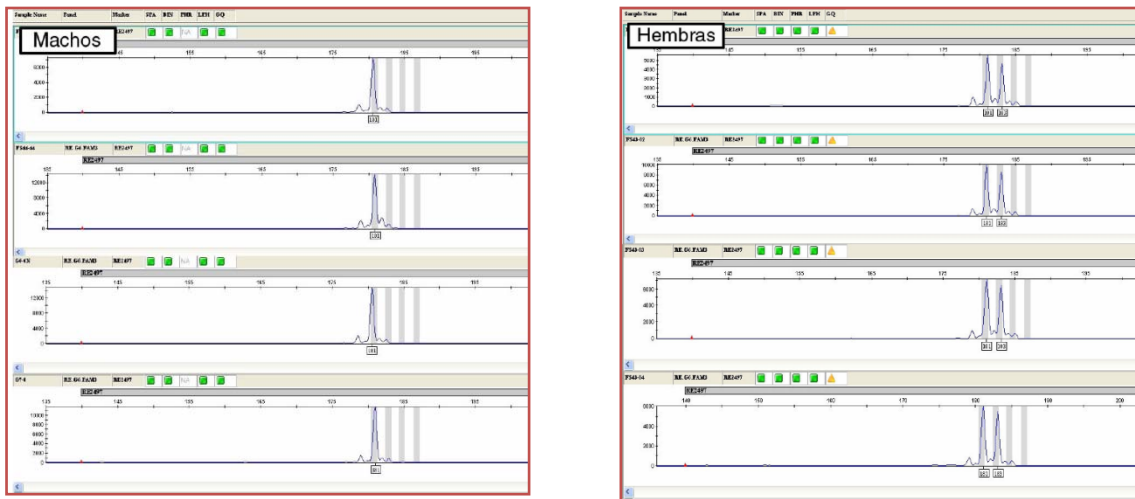


Figura 6. Análisis de fragmentos del locus microsatélite M-SmaSD en 4 hembras y 4 machos de la especie *Scopthalmus maximus*. Los individuos hembras son heterocigóticos (dos picos) muestran dos alelos, mientras que los individuos machos son homocigóticos, presentan un único tipo alélico (un sólo pico).

Los resultados obtenidos han permitido evidenciar además, que la determinación del sexo de las progenies depende únicamente de la madre, de manera que dependiendo de qué alelo materno porten los descendientes podrán ser identificados como machos o hembras, es decir, el mecanismo de determinación cromosómica en rodaballo es de tipo ZZ/ZW.

Una pequeña proporción de familias no se ajusta a la perfección a este modelo, lo que sugiere que otros factores genéticos o ambientales menores pudieran estar implicados en la determinación del sexo en esta especie.

El estudio de sintenias entre especies representa un puente para complementar los estudios de QTLs con aproximaciones de genes candidatos de localizaciones cromosómicas homólogas en organismos modelo relacionados (Erickson et al., 2004). De acuerdo con esta aproximación, hemos

realizado el mapeo comparativo de las 13 secuencias, mayoritariamente anónimas, del grupo de ligamiento 5 (GL5) con los genomas de las 5 especies modelo de peces: *Tetraodon nigroviridis* (Tni), *Takifugu rubripes* (Tru), *Gasterosteus aculeatus* (Gac), *Ordizia latipes* (Ola) y *Danio rerio* (Ostariophysis; Miya et al., 2003; Li et al., 2008) (Tabla 1). La mayor homología se observó con *G. aculeatus*, incluyendo el M-SmaSD, el marcador más cercano al SDg. Se detectaron sintenias amplias y significativas con el GL1 de *T. nigroviridis*, el GL4 de *O. latipes* y el GL8 de *G. aculeatus*.

La ausencia de homología con los cromosomas sexuales de *O. latipes* (GL1; Matsuda et al., 2002), *G. aculeatus* (GL19; Peichel et al., 2004), o *T. rubripes* (scaffolds anclados al GL19; Kikuchi et al. 2007) sugieren que el gen determinante del sexo en rodaballo es distinto al de estas especies.

Tabla 1. Análisis comparativo de los marcadores del GL5 de rodaballo frente a los genomas de peces modelo.

	Tru	Dre	Tni	Ola	Gac
SmaUSC-270	-	-	-	-	-
M-SmaSD	-	-	-	-	GL VIII
SmaUSC-65	-	-	-	-	-
SmaUSC-254	-	-	-	-	-
SmaUSC-247	-	-	-	-	-
SmaUSC-10	-	-	-	-	-
SmaUSC-225	SC-332	-	UN	-	GL VIII
SmaUSC-88	SC-25	-	GL1	-	GL VIII
SmaUSC-278	-	-	(GL1)	-	-
SmaUSC-198	-	-	-	-	-
SmaUSC-12	SC-250	GL8	GL1	GL4	GL VIII
SmaUSC-201	-	-	(GL1)	-	GLVIII

Por otro lado, los marcadores del GL5 pudieron relacionarse de manera indirecta con el GL23 de *Oreochromis* spp., donde fue detectado un QTL de

sexo (Shirak et al., 2006), ya que los GL5 de rodaballo y el GL23 de *Oreochromis* spp. son homólogos del GL8 de *G. aculeatus* (Sarropoulou et al., 2008). Genes como el *Amh* y *Dmrta2* implicados en la ruta de diferenciación gonadal mapean en las proximidades de ese QTL. Estos dos genes comapean en el GL8 de espinoso y están localizados físicamente a 10-13 Mb de la secuencia homóloga al M-SmaSD de espinoso, sugiriendo un posible papel de los mismos en la determinación del sexo en rodaballo, recomendando su mapeo.

CONCLUSIONES

Los análisis realizados han permitido la localización de un QTL mayor asociado al sexo en rodaballo situado en el extremo proximal del GL5 del mapa genético de rodaballo. El marcador microsatélite más cercano a este QTL es el M-SmaSD. El genotipado de este marcador permite el sexado molecular de los rodaballos desde su eclosión con una fiabilidad del 99%. Asimismo, los resultados obtenidos han permitido evidenciar que el mecanismo de determinación cromosómica en rodaballo es del tipo ZZ/ZW.

INTERÉS PARA EL SECTOR Y VIABILIDAD DE SU APLICACIÓN EN EMPRESAS

La identificación precoz del sexo en esta especie supone una valiosa herramienta para los programas de selección y producción de poblaciones en cultivo. Permite identificar de manera precoz (antes de que se produzca la maduración sexual) el sexo del rodaballo, lo que posibilita la selección de los individuos más interesantes desde el punto de vista productivo, las hembras, para su cultivo.

Actualmente, esta herramienta está siendo aplicada en planes de selección genética con empresas del sector. Aunque el coste de la técnica es bajo (en torno a 1€), no es posible su utilización directa para seleccionar solo hembras para el cultivo, porque sería necesario además el marcaje individual de todos los peces (entre 2-3€ cada uno) hasta que se estableciera su genotipo. Esto comportaría un coste añadido que no compensaría la ganancia por el

crecimiento superior de las hembras. Su aplicación, por tanto, tiene interés en primer lugar como soporte en planes de selección genética para conseguir proporciones sexuales equilibradas en las familias seleccionadas utilizando el marcador Sma-USC30. Pero la aplicación de mayor interés está en la obtención de poblaciones todo-hembras (Figura 7), combinando técnicas de reversión sexual con la información molecular del marcador. Esta técnica implica conseguir neomachos ZW utilizando metiltestosterona durante la etapa de desarrollo en que la gónada está aún indiferenciada. La utilización del marcador M-SmaSD permite identificar los neomachos y superhembras con una confianza elevada realizando únicamente una PCR. Esto supone ganar más de dos años en tiempo y a un coste mínimo por individuo al no tener que realizar los dos test de progenie individual para diferenciar los neomachos ZW de sus hermanos ZZ del primer cruzamiento y las superhembras WW de sus hermanas ZW en el siguiente cruzamiento.

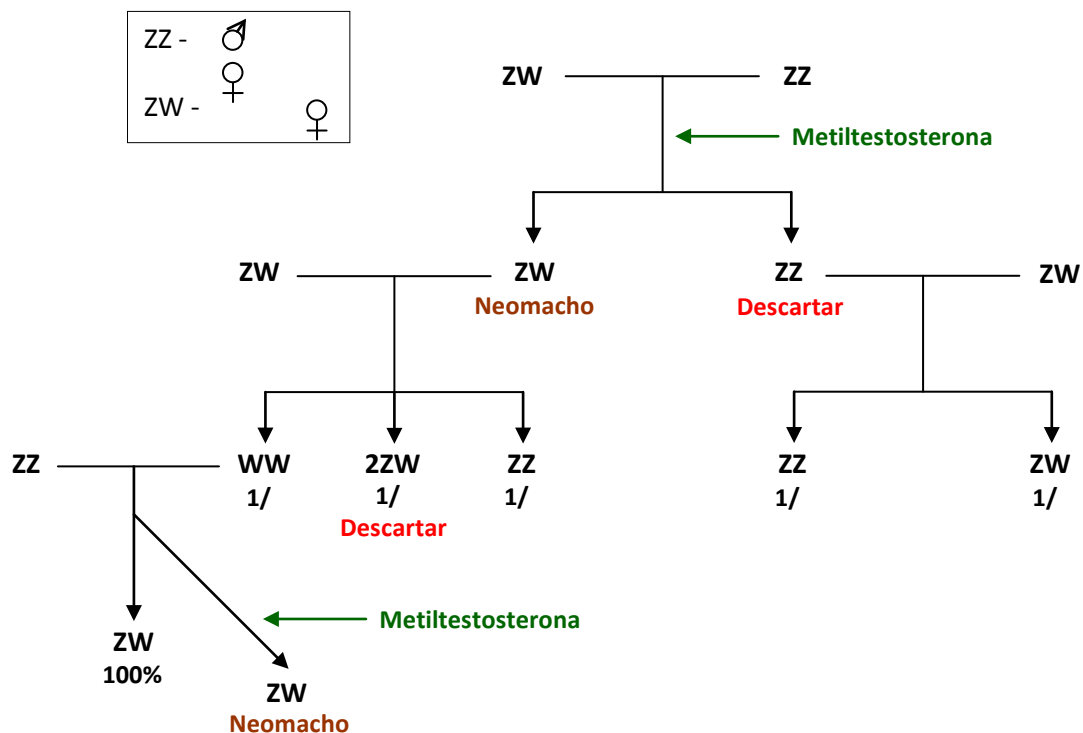


Figura 7. Esquema seguido para la obtención de poblaciones todo-hembras en una especie con un mecanismo de determinación ZZ/ZW, como el rodaballo.

Asimismo, dado que las especies del género *Scophthalmus* son afines en cuanto a su evolución, la homología global de los genomas al nivel de la secuencia de nucleótidos es elevada. Esto ha permitido la amplificación del marcador microsatélite M-SmaSD, útil para la identificación del sexo en rodaballo, en otra especie del género *Scophthalmus* de valor comercial, *S. rhombus*, denominado rémol o coruxo. Por tanto, aunque la presente herramienta se aplica a individuos de la especie *S. maximus*, los métodos que aquí se proporcionan podrían servir para la obtención de datos útiles y para el diagnóstico precoz del sexo en otras especies del género *Scophthalmus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Baroiller J.F. & D’Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **130**: 399-409.
- Bouza, C., Sánchez L. & Martínez P. 1994. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome, and restriction endonuclease banding techniques. *Mar Biol* **120**: 609-613.
- Bouza, C., Hermida M., Pardo B.G., Fernández C., Castro J., Fortes G., Sánchez L., Presa P., Pérez M., Sanjuán A., Comesaña S., Álvarez J. A., Calaza M., Cal R., Piferrer F. & Martínez P. 2007. A microsatellite genetic map in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* **177**: 2457-2467.
- Bouza, C., Hermida M., Millán A., Vilas R., Vera M., Fernández C., Calaza M., Pardo B.G. & Martínez P. 2008. Characterization of EST-derived microsatellites for gene mapping and evolutionary genomics in turbot. *Anim. Genet.* **39**: 666-670.
- Cal R.M., Vidal S., Gómez C., Álvarez-Blázquez B., Martínez P. & Piferrer F. 2006a. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **251**: 99-108.
- Cal R.M., Vidal S., Martínez P., Álvarez-Blázquez B., Gómez C. & Piferrer F. 2006b. Survival, growth, gonadal development, and sex ratios of gynogenetic diploid turbot. *J. Fish Biol.* **68**: 401-413.

- Cuñado N., Terrones J., Sánchez L., Martínez P. & Santos J.L. 2001. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Genome* **44**: 1143–1147.
- Cuñado N., Terrones J., Sánchez L., Martínez P. & Santos J.L. 2002. Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* **89**: 460-464.
- Erickson D.L., Fenster C.B., Stenoien H.K. & Price D. 2004. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Mol. Ecol.* **13**: 2505–2522.
- Kikuchi K., Kai W., Hosokawa A., Mizuno N., Suetake H., Asahina K. & Suzuki Y. 2007. The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* **175**: 2039-2042.
- LI C., GUOQING L. & ORTÍ G. 2008. Optimal data partitioning and a test case for ray-finned fishes (Actinopterygii) based on ten nuclear loci. *Syst. Biol.* **57**: 519–539.
- Martínez P., Hermida M., Pardo B.G., Fernández C., Castro J., Cal R.M., Alvarez-Dios J.A., Gómez-Tato A. & Bouza C. 2008 Centromere-linkage in the turbot (*Scophthalmus maximus*) through half-tetrad analysis in diploid meiogynogenetics. *Aquaculture* **280**: 81-88.
- Martínez P., Bouza C., Hermida M., Fernández J., Toro M.A., Vera M., Pardo B.G., Millán A., Fernández C., Vilas R., Viñas A., Sánchez L., Felip A., Piferrer F., Cabaleiro S. & A. Rianza 2009 Identification of a major sex-associated QTL in families and in a natural population of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* **183**: 1443-1452.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S. & Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* **417**: 559-563.
- Miya M., Takeshima H., Endo H., Ishiguro N.B., J.G. Inoue, Mukai T., Satoh T.P., Yamaguchi M., Kawaguchi A., Mabuchi K., Shirai S.M. & Nishida M.

2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **26**: 121–138.
- Peichel C.L., Ross J.A., Matson C.K., Dickson M., Grimwood J., Schmutz J., Myers J.R., Mori S., Schluter D. & Kingsley D. 2004. The master sex-determination locus in three-spined sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr. Biol.* **14**: 1416-1424.
- Piferrer F., Cal R.M., Álvarez-Blázquez B., Sánchez L., & Martínez P. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* **188**: 79-90.
- Piferrer, F. & Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev. Fish. Sci.* **16**: 35-55.
- Sarropoulou E., Nousdili D., Magoulas A. & Kotoulas G. 2008. Linking the genomes of nonmodel teleosts through comparative genomics. *Mar. Biotechnol.* **10**: 227–233.
- Seaton G., Hernandez J., Grunchev J.A., White I., Allen J., De Koning D.J., Wei W., Berry D., Haley C. & Knott S. 2006. GridQTL: A Grid Portal for QTL Mapping of Compute Intensive Datasets. Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006. Belo Horizonte, Brazil.
- Shirak A., Seroussi E., Cnaani A., Howe A.E., Domokhovskiy R., et al., 2006. Amh and Dmrta2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics* **174**: 1573–1581.
- Stemshorn K.C., Nolte A.W. & Tautz D. 2005 A genetic map of *Cottus gobio* (Pisces, Teleostei) based on microsatellites can be linked to the physical map of *Tetraodon nigroviridis*. *J. Evol. Biol.* **18**: 1619–1624.
- Walsh P.S., Metzger D.A. e Higuchi R. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**: 506-513.