

Informe final* del Proyecto LI003
Evaluación de alternativas para el control del cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) africano*

Responsable: Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro
Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Dirección: Pedro de Alba y Manuel L Barragán Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, NL, 66450 , México
Correo electrónico: roberto.mendozaal@uanl.edu.mx
Teléfono/Fax: 01 (81) 8329 4110
Fecha de inicio: Octubre 15, 2013.
Fecha de término: Diciembre 1, 2017.
Principales resultados: Informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Mendoza Alfaro, R., Aguilera González, C., Montemayor Leal, J., Montiel Condado, D., Luna, S., Arias Gámez, A., Barriga Vallejo, C., Lozano Peña, E., Flores Salinas, J., Garza Cuéllar, K., Aguilar Díaz de León, C., Castellanos Meléndez, M., Rivas Morales, S., Vazques Reyna, M., Rodríguez López, S. y Y. Pequeño Granados. 2017. Evaluación de alternativas para el control del cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) africano. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. **Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto No. LI003.** Ciudad de México.

Resumen:

El cíclido joya Africano (*Hemichromis guttatus*) fue introducido en 1996 en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila (uno de los Sitios prioritarios para la Conservación de la Biodiversidad Acuática Epicontinental). Se trata de una especie altamente agresiva hacia la ictiofauna nativa, cuyas poblaciones desde entonces se han incrementado. Se han confirmado los impactos del cíclido joya por competencia de los recursos con la consecuente disminución de poblaciones de peces nativos y endémicos que incluyen *Ictalurus sp.*, *Gambusia marshi*, *Herichthys minckleyi* y *Astyanax mexicanus* (Lozano-Vilano et al., 2006). En particular, se han visto afectadas las poblaciones del morfo molariforme de *H. minckleyi*, el cual se alimenta de caracoles, que a su vez se alimentan de los estromatolitos. De aquí, que la conservación de los estromatolitos dependa estrechamente de la presencia de esta forma. Considerando este contexto, el presente proyecto plantea la evaluación e implementación de un método de control de esta especie. El método está basado en la reversión sexual del cíclido joya para producción de machos YY ("supermachos"), que al reproducirse con hembras generan progenies exclusivamente de machos, con lo que las poblaciones irían disminuyendo paulatinamente. La progenie sería analizada morfológica, bioquímica y molecularmente para aseverar su masculinidad. Se llevarán a cabo igualmente experimentos para evaluar el comportamiento de las especies nativas y el cíclido joya en laboratorio y se pretenden realizar ensayos de control en campo.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**“Evaluación de alternativas para el control del cíclido
joya (*Hemichromis guttatus*) Africano” LI003**

Informe Final

Roberto Mendoza Alfaro

Responsable

Septiembre 2017

ÍNDICE

| | |
|------------------------|-----|
| 1.- Introducción..... | 3 |
| 2.- Objetivos..... | 30 |
| 3.- Justificación..... | 31 |
| 4.- Metodología..... | 32 |
| 5.- Resultados..... | 59 |
| 6.- Discusión..... | 144 |
| 7.- Conclusiones..... | 163 |
| 8.- Referencias..... | 165 |
| 9.- Anexos..... | 177 |

INTRODUCCIÓN

Como es bien sabido, en la actualidad uno de los temas claves en la conservación y uso de la Diversidad Biológica es la problemática relativa a las especies exóticas invasoras. En el caso particular de los ambientes acuáticos, la introducción de las especies exóticas ha sido identificada como uno de los riesgos ambientales más críticos a los que actualmente se enfrentan las especies, los hábitats y la biodiversidad en general (Hopkins, 2001). Aunque no todas las introducciones resultan viables, el número actual de especies introducidas y establecidas sobrepasa por mucho la tasa natural de invasión, entendida como la migración de nuevas especies a las comunidades locales, como consecuencia del surgimiento de una economía altamente globalizada en las últimas décadas (Miller *et al.*, 2002). El impacto de las especies exóticas invasoras sobre los ecosistemas puede ser enorme y a menudo su repercusión va más allá del daño a la biodiversidad. En efecto, las invasiones biológicas suelen implicar pérdidas económicas cuantiosas y problemas sanitarios severos, volviéndose así una amenaza directa para el bienestar humano (Pimentel *et al.*, 2005). Específicamente, los impactos de las especies acuáticas invasoras pueden ser dramáticos y normalmente irreversibles, como el colapso de las pesquerías, la eliminación de los stocks para la acuicultura, el incremento de los costos de producción, las amenazas a la salud humana o la alteración de la biodiversidad (UICN, 2007). Esto ha originado que se consideren las invasiones biológicas como la segunda causa de pérdida de biodiversidad, superada solamente por la reducción y deterioro de los hábitats (MA, 2005). Dada la magnitud del problema, recientemente Mendoza-Alfaro y Koleff-Osorio (2014) editaron una obra que sintetiza el estado del conocimiento actual sobre este tema en México para especies acuáticas invasoras, incluyendo problemas de salud y perspectivas a futuro.

Especies invasoras derivadas de la industria del acuarismo

A nivel mundial el acuarismo constituye una industria multimillonaria ya que anualmente se comercializan cerca de mil millones de peces ornamentales (Whittington y Chong 2007), con un valor aproximado de USD\$ 6 mil millones (Holthus y Gamain 2007) el cual se incrementa a USD\$ 15 mil millones al incluir diferentes insumos (acuarios, bombas, termostatos, etc.; Bartley 2000). Desde hace varios años esta industria ha venido creciendo a una tasa de 14% anual a nivel mundial (Padilla y Williams 2004) y en México se mantiene la misma tendencia ya que a lo largo de los años se ha observado un 8% de crecimiento anual (Mendoza *et al.* 2010).

Durante muchos años la acuicultura ornamental se ha desarrollado significativamente con la carencia de análisis de los riesgos ecológicos y se han soslayado las consecuencias negativas derivadas del movimiento de este enorme número de peces en todo el mundo (Tlusty 2004). A diferencia del cultivo de peces comestibles, donde un número relativamente pequeño de especies dominan el mercado, los peces ornamentales representan un enorme reservorio de especies potencialmente invasoras como resultado del comercio mundial de aproximadamente 5000 especies (McDowall 2004). Por otra parte, el riesgo de la liberación accidental de especies exóticas se incrementa día a día ya que gran parte de la producción de peces ornamentales se realiza fuera de su área de distribución nativa (Tlusty 2004). Como repercusión de este comercio carente de control, actualmente el acuarismo representa una de las cinco principales vías de introducción de especies acuáticas exóticas en el mundo (Ruiz *et al.* 1997) y de al menos 150 especies invasoras, de las cuales 115 son peces dulceacuícolas (Padilla y Williams 2004). De hecho, el acuarismo ha sido considerada como la principal vía de introducción de especies exóticas en algunas regiones (Lintermans 2004; Cobo *et al.* 2010; Low 2011) y se espera que la proporción de especies invasoras introducidas por esta vía

aumente en el futuro (Copp *et al.* 2007; Wolter y Röhr 2010; Ishikawa y Tachihara 2014).

En México la falta de regulación en el establecimiento y operación de las granjas de peces ornamentales ha resultado hasta el momento en el establecimiento de especies exóticas en nueve de las diez regiones acuáticas continentales del país, provocando severos impactos ambientales (60% de las extinciones de peces en México se han asociado a la presencia de especies no nativas; Contreras-Balderas *et al.* 2003) y económicos (Mendoza *et al.* 2010). Adicionalmente a los escapes de las granjas, la introducción a pequeña escala de organismos no deseados (efecto Nemo) y el drenaje del agua de tanques y acuarios públicos que aún contienen organismos vivos son vectores de introducción de especies exóticas con potencial invasor asociados con el comercio de especies ornamentales en México (Mendoza *et al.* 2014). Derivado del comercio de especies ornamentales, en 1996 fue reportada por primera vez la presencia del cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) en la poza Churince de Cuatrociénegas (Contreras-Balderas y Ludlow 2003).

Impacto del cíclido joya en peces de Cuatrociénegas

El Valle de Cuatrociénegas, localizado en la zona central de Coahuila está reconocido como una zona prioritaria debido a su alto nivel de endemismos, derivado de un ambiente relicto en una cuenca endorreica. Las condiciones ambientales son de alta evapotranspiración e intensos procesos de salinización sobre un sustrato gipsófilo, por lo que las comunidades bióticas han evolucionado en condiciones extremas (Arriaga *et al.*, 2000). Presenta pozas calientes y frías con salinidad variada que albergan una biota diversa la cual puede ser extremadamente sensible a la perturbación de su hábitat (Torres-Vera, 2012). El Valle de Cuatrociénegas fue decretado como Área Natural Protegida dentro de la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna. El decreto fue publicado en el Diario Oficial de la Federación el 7 de noviembre de 1994.

Un componente destacable de la biota de Cuatrociénegas es la presencia de estromatolitos, los cuales son depósitos microbianos bentónicos causados por la actividad biológica de los microorganismos al incorporar carbonato en su material extracelular. Las comunidades de estromatolitos florecieron en el precámbrico y decayeron en el fanerozoico, existiendo actualmente sólo en unos cuantos sitios a nivel mundial. Su declive se atribuye a la evolución y diversificación de metazoarios herbívoros (invertebrados actualmente) en el ordovícico medio.

Las especies exóticas invasoras representan una amenaza a los ecosistemas de forma general; sin embargo, los más vulnerables son aquellos en donde habitan especies endémicas. Dentro de este contexto, el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, es reconocido por albergar cerca de 1,237 especies de las cuales 72 son endémicas. Como se mencionó anteriormente el alto grado de endemismo se debe a las características abióticas que se encuentran en la región y también a que la mayoría de los cuerpos de agua no se encuentran conectados. En el Valle de Cuatrociénegas han sido reportadas 19 especies de peces, clasificadas taxonómicamente en 4 órdenes y 8 familias. De estas, al menos 12 son consideradas endémicas por tener la totalidad de su distribución dentro de la subcuenca (De la Maza-Benignos, 2015). En contraste, un total de 22 especies exóticas han sido reportadas en el sitio, de las cuales 4 son especies de peces: *Cyprinus carpio*, *Micropterus floridanus*, *Oreochromis aureus* y *Hemichromis guttatus*, siendo esta última especie la más abundante en la región.

Las especies nativas más ampliamente distribuidas son *Astyanax mexicanus* y *Gambusia marshi* (García-Ramírez, 2005). Estas especies se distribuyen en 7 grandes sistemas hidrológicos de la cuenca de Cuatrociénegas. De estos sistemas, el que se origina en las pozas Churince y la Becerra es uno de los más representativos de la región, fluyendo de forma superficial y/o subterránea hacia las lagunas conocidas como el Garabatal (Minckley, 1969). El subsistema Churince

está conformado principalmente por cuatro cuerpos de agua superficiales comunicados subterráneamente y por una serie de riachuelos: la Poza Churince y Poza Bonita que conforman la fuente del sistema, así como también la Laguna Intermedia y la hoy ya seca Laguna de Churince (De la Maza-Benignos, 2015). Debido a que este sistema se considera el origen de la introducción del cíclido joya, ha sido la principal zona de estudio para evaluar los efectos de esta especie invasora.

Hace cerca de 20 años en el sistema Churince se tenía registro de las especies *Herichthys minckleyi*, *Cyprinodon bifasciatus*, *C. atrorus*, *Astyanax mexicanus*, *Gambusia marshi*, *G. longispinis*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis megalotis*, *Dionda episcopa*, *Cyprinella xanthicara*, *Ictalurus lupus*, así como híbridos de *Cyprinodon bifasciatus* y *C. atrorus* (Minckley, 1977). La mayoría de estas especies se pueden encontrar desde el nacimiento de la poza Churince y se ha observado que se desplazan estacionalmente por el canal Churince, con excepción de *Cyprinodon atrorus*, *Gambusia longispinis* y los híbridos de *C. bifasciatus* y *C. atrorus* que se restringen al canal y resto del sistema Churince.

Aunque existen 19 especies de peces en Cuatrociénegas, solo algunas se encuentran en asociación con los estromatolitos, siendo los más destacables *C. bifasciatus* y el cíclido *H. minckleyi* (Dinger, Hendrickson, Winsborough, y Marks, 2006). Este último es una especie tróficamente polimórfica y aún se encuentra en la mayoría de las pozas de Cuatrociénegas. La forma molariforme tiene dientes faríngeos robustos, mientras que la papiliforme los tiene numerosos y finos. La forma molariforme se distingue por alimentarse exclusivamente de caracoles (Cohen, Hendrickson, Parmesan, y Marks, 2005). Debido a que los caracoles se alimentan de estromatolitos, la presencia de la forma molariforme de este cíclido es de gran importancia para el mantenimiento de estos microorganismos. Por lo tanto, es necesaria la conservación de este cíclido con la finalidad de mantener a las poblaciones de caracoles constantes y así mantener la presencia de los estromatolitos en las pozas de Cuatrociénegas. La introducción del

cíclido joya y su competencia con la etapa juvenil de *H. minckleyi* (Hendrickson, 2006) ha ocasionado una importante disminución en las poblaciones de esta última especie (Lozano-Vilano, Contreras-Balderas, y García-Ramírez, 2006), afectando también de forma indirecta a las poblaciones de estromatolitos. Este es un caso marcado particularmente en la poza Churince, la que se encuentra en un severo colapso ecológico, no solo por el daño antropogénico ocasionado por la afluencia de turistas, sino también por la presencia de diversas especies de plantas riparias exóticas. Por otra parte, la ictiofauna nativa de esta poza ha sufrido un grave descenso en sus poblaciones considerando que, de acuerdo con las observaciones más recientes (De la Maza-Benignos, 2015), de las especies anteriormente mencionadas solo se pudieron encontrar escasos ejemplares de *H. minckleyi*, en malas condiciones, pero utilizando trampas y redes de chinchorro se logró obtener un número considerable de ejemplares de cíclido joya.

En 1995, antes de la introducción del cíclido joya existían en la poza Churince abundantes grupos de *Cyprinodon bifasciatus*, *Herichthys minckleyi*, *Astyanax mexicanus* y *Gambusia marshi*. En ese momento *C. bifasciatus* dominaba el fondo del manantial distribuido de manera más o menos regular y con una densidad promedio de 1.2 organismos por m². *H. minckleyi* se localizaba en las partes más profundas junto con ejemplares aislados de *Micropterus salmoides*. Mientras que la superficie, los márgenes y el canal de salida estaban dominados por *Astyanax mexicanus* y *Gambusia marshi* (Aguilera, 1998).

No obstante, para el año 2010, una vez que se encontró establecido el cíclido joya, se reportó en esta localidad la desaparición de las especies *Cyprinodon bifasciatus* y *Astyanax mexicanus*, mientras que *Gambusia* spp., *Cyprinella xanthicara*, *Micropterus salmoides* y *Lepomis megalotis* solo fueron observados en el canal Churince (Dugan, 2014).

En fecha reciente, De la Maza-Benignos (2015) describió la presencia de *Gambusia marshi* en la poza Churince, de la cual se observaron poblaciones abundantes, en contraste se observaron menos de 50

ejemplares de *H. minckleyi* en un estado senil y con heridas y marcas de ataques y signos de enfermedad. Igualmente se observó la presencia de un ejemplar de *Micropterus salmoides*. El fondo de la poza se encuentra invadido por crecimientos algales anormales, que en algunas zonas superan el metro de espesor, y que brindan refugio y estructura reproductiva para la especie invasora *H. guttatus*. Probablemente dichos crecimientos anormales se deben principalmente a la desaparición de las especies herbívoras tanto de peces (e. g. *Cyprinodon bifasciatus*) como de los macroinvertebrados que los controlaban (Tabla 1). El análisis de esta tabla muestra que en el tiempo que transcurrió de un análisis a otro (1995 - 2015) desapareció *Cyprinella xanthicara* del sistema Becerra. Mientras que en el sistema Churince desaparecieron *Astyanax mexicanus*, *Cyprinella xanthicara*, *Cyprinodon bifasciatus*, *Gambusia longispinis* y *Lepomis megalotis*. Así mismo, se puede observar que en el complejo de pozas azules se perdieron *Cyprinodon bifasciatus* y *Dionda episcopa*. Por último, en Santa Tecla desaparecieron *Micropterus salmoides* y *Lepomis megalotis*.

Mediante el uso de isótopos, Marks *et al.* (2011), demostró que existía competencia alimenticia entre *H. guttatus* y las especies nativas *H. minckleyi* y *C. bifasciatus*. Tanto *H. guttatus* como *H. minckleyi* poseen una dentición papiliforme, lo que explicaría la rápida disminución de las poblaciones de ésta última en la Poza Churince como consecuencia de la introducción del cíclido joya (Hendrickson *et al.* 2008).

| Tabla 1. Relación de especies observadas en diferentes localidades y tiempos (X=presente; O=ausente) | | | | | | | | |
|---|-----------------|------|------------------|------|-----------------------|------|-------------|------|
| Especie/Año | Sistema Becerra | | Sistema Churince | | Complejo Pozas Azules | | Santa Tecla | |
| | 1995 | 2015 | 1995 | 2015 | 1995 | 2015 | 1995 | 2015 |
| <i>Astyanax mexicanus</i> | X | X | X | O | X | X | X | X |
| <i>Cyprinella xanthicara</i> | X | O | X | O | O | O | X | X |
| <i>Herichthys minckleyi</i> | X | X | X | X | X | X | O | O |
| <i>Cyprinodon bifasciatus</i> | X | X | X | O | X | O | O | O |
| <i>Gambusia marshi</i> | X | X | X | X | X | X | X | X |
| <i>Dionda episcopa</i> | O | O | X | X | X | O | O | O |
| <i>Gambusia longispinis</i> | O | O | X | O | O | O | O | O |
| <i>Cyprinella atrorus</i> | O | O | X | X | O | O | O | O |
| <i>Micropterus salmoides</i> | O | O | X | X | X | X | X | O |
| <i>Lepomis megalotis</i> | O | O | ? | O | X | X | X | O |
| <i>Ictalurus lupus</i> | X | X | O | O | X | X | O | O |
| <i>Xiphophorus gordonii</i> | O | O | O | O | O | O | X | X |
| <i>Herichthys cyanoguttatum</i> | O | O | O | O | O | O | X | X |

A pesar de que se ha puesto mayor atención en los efectos negativos provocados sobre el cíclido *H. minckleyi* (Dugan, 2014), probablemente los impactos más importantes a nivel del ecosistema son los producidos por el desplazamiento de *C. bifasciatus* de la poza Churince. Lo anterior tomando en cuenta su abundancia reportada sobre el fondo del manantial antes de la introducción del cíclido joya (Aguilera, 1998), así como por la invasión anormal de algas como consecuencia de la falta de esta especie como principal forrajera que controla estos florecimientos (De la Maza-Benignos, 2015). Esta diferencia en la composición del fondo de los manantiales también se puede apreciar comparando actualmente la poza Churince con la poza la Becerra en donde aún no está presente el cíclido joya y en la cual, a pesar de las alteraciones por la disminución de su nivel de agua, aún se observa una comunidad de peces en buenas condiciones de acuerdo con De la Maza-Benignos (2015). Estos cambios pueden influir sobre la abundancia de las otras especies, particularmente cuando las condiciones climáticas son extremas y alteran las condiciones fisicoquímicas (e. g. temperatura, oxígeno disuelto) de los ecosistemas más alejados de los manantiales como los canales, humedales y lagunas.

De tal forma que, las pozas representan ecosistemas vitales para el refugio de diversas especies de peces.

Control del cíclido joya y nuevas alternativas

Desde que fue confirmada la presencia del cíclido joya en Cuatro Ciénegas en 1996, se iniciaron los esfuerzos para intentar controlar las poblaciones de esta especie invasora (Contreras-Balderas y Ludlow, 2003). Posteriormente, se reportó un esfuerzo "aparentemente" exitoso, realizado del año 2000 al 2004 para eliminar el cíclido joya en el que se colectaron 19,071 ejemplares de esta especie combinado con la restauración de peces nativos en una poza de Cuatro Ciénegas (Lozano-Vilano *et al.* 2006). Mientras que de 2001 a 2003 García-Ramírez (2005) colectó un total de 35,721 ejemplares del cíclido joya en la poza Churince (25,328) y laguna de Juan Santos (10,393). Más recientemente, entre los programas implementados en las Áreas Naturales Protegidas para la atención de especies exóticas invasoras acuáticas se menciona uno referente a la erradicación del cíclido joya erradicación de 2002 a 2008, logrando capturar tan sólo en el último año 75,000 ejemplares en el sistema Churince (APFFCC, 2008). Todos estos esfuerzos se han realizado utilizando el método denominado "captura-eliminación", consistente en el empleo de redes o trampas para extraer los organismos de esta especie. Sin embargo, las limitaciones de estos métodos son evidentes al no registrarse la erradicación o control de la especie, a pesar del tamaño y confinamiento relativo de las pozas de Cuatro Ciénegas, además de los recursos, tiempo y esfuerzos invertidos. En efecto, en el reporte más reciente y detallado realizado por Dugan (2014), quien muestreó un total de 22 cuerpos de agua durante el verano del 2010, menciona que logró colectar 818 individuos de *H. guttatus* en 7 pozas distintas (Poza Churince (356), Río Churince (176), Poza Juan Santos (81), Poza Azul (1), Mojarral Este (34), Río Mezquites (130), Poza Los Remojos (40).

Debido a lo anterior resulta esencial implementar un método distinto de control para esta especie. Históricamente el control y erradicación de peces exóticos ha involucrado el uso de diversos químicos como los inhibidores de cadena respiratoria (e.g. rotenona) (Baldry, 2000), anestésicos como el AQUIS-S (Clearwater *et al.*, 2008), control biológico (Hoodle, 2004) y estrategias basadas en la modificación genética (Bergstedt y Twohey, 2007; Snow *et al.*, 2005). Sin embargo, muchas de estas estrategias son inespecíficas, controversiales o de difícil implementación (Myers *et al.* 2000; Gutierrez y Teem 2006). No obstante, una metodología viable que aún no se han explotado como medida de control, aunque si como medida preventiva, es la masculinización y feminización de poblaciones de peces (Hunter y Donaldson, 1983). Considerando este contexto, el presente proyecto plantea la evaluación e implementación de un método de control de esta especie, que considera sus características biológicas, las condiciones del valle de Cuatro Ciénegas y el uso de herramientas metodológicas disponibles en la actualidad. El cíclido joya, pertenece a la misma sub-familia de las Tilapias, con las cuales además comparten su origen africano y potencial invasivo, así como características biológicas en reproducción y comportamiento. Debido a la introducción de tilapias en todo el mundo con fines de acuacultura, existen muchas investigaciones sobre ellas para mejorar su producción (FAO, 2010), dentro de las que destacan el control de su excesiva reproducción y precocidad sexual, lo que limita su crecimiento en los sistemas de cultivo. De esta forma se han implementado diversas estrategias las cuales incluyen la cruce de diferentes especies de tilapias para obtener poblaciones monosexuales, la reversión sexual y castración química mediante aplicación de hormonas y la tecnología YY o Tilapias Genéticamente Machos (GMT), mediante la manipulación genética del sexo para producción exclusiva de machos (Herrera *et al.* 2001). Las tilapias GMT fueron creadas sin ingeniería genética, ya que la metodología implica una primera fase de reversión sexual y una segunda fase de pruebas de progenie. Los machos

resultantes son fértiles como cualquier otro, pero con la consecuencia de que solo producen machos. De esta manera se evitaría la presencia de hembras y su consecuente reproducción. De tal manera que si esta aproximación se usara con el cíclido joya sus poblaciones irían disminuyendo paulatinamente.

El método que se tiene contemplado desarrollar es el propuesto por Gutierrez y Teem (2006), denominado método del cromosoma troyano. Este método implica la introducción de organismos con doble cromosoma Y (machos YY o supermachos) con el fin de disminuir paulatinamente la proporción de hembras, lo cual es posible debido a que los machos YY, al cruzarse con una hembra, tienen una descendencia exclusiva de machos XY, evitando la presencia de hembras y su consecuente reproducción (Fig. 1). De esta forma, la introducción de machos YY de cíclido joya en las pozas de Cuatrociénegas conduciría a un incremento en la proporción de machos como consecuencia de un flujo desproporcionado del cromosoma Y, lo que generaría una importante reducción en el número de hembras a través de la introducción de varias generaciones de estos individuos, hasta la extinción de la población (Gutierrez y Teem 2006; Cotton y Wedekind 2007). Por otra parte, la introducción de machos YY no representaría gran riesgo para las especies nativas ya que los machos son menos agresivos que las hembras (BMELF, 1999). Por otra parte, este método ha sido ampliamente recomendado como uno de los mejores para la erradicación de peces invasores (Cotton y Wedekind, 2007; Wang *et al.*, 2013; Senior *et al.*, 2013).

En el caso de los triploides, estos son organismos estériles y no ofrecería ninguna ventaja introducirlos. La única posibilidad de erradicación usando organismos estériles (triploides) sería realizando la extracción de más del 90% de la población de peces invasores e introducir los organismos estériles para que disminuyera el esfuerzo reproductivo de la población invasora restante. Por otra parte, la triploidía no asegura 100% la esterilidad (Stanley, 1979). Adicionalmente, se ha reportado que los

triploides presentan mayores mortalidades que los diploides, tienen menor tolerancia a los estresores ambientales, presentan deformidades y anomalías en el crecimiento (Migaud, 2010).

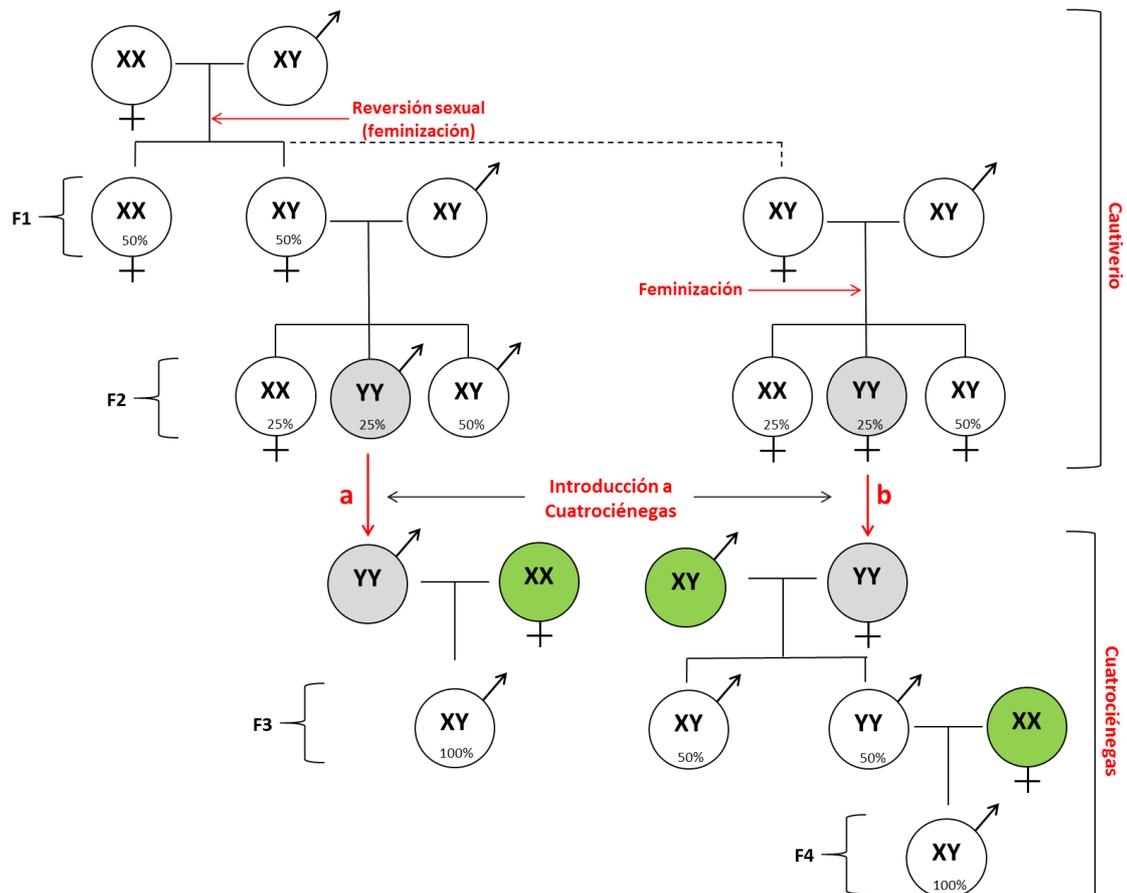


Figura 1. Esquema de los eventos de reproducción, reversión sexual e introducción de machos YY para el control del cíclido joya en Cuatrociénegas mediante TYC (adaptado de Gutierrez y Teem, 2006). a) Se muestra el efecto de la introducción de machos YY producidos en cautiverio (F2), cuya descendencia (F3) consiste sólo de machos XY. b) Adicionalmente sería posible introducir hembras YY para lo cual sería necesario un segundo paso de feminización de la F2. La introducción de estas hembras continuaría ejerciendo un aumento en la proporción de machos hasta la F4. El fenotipo sexual esperado de los individuos se muestra con el símbolo ♂ (macho) y ♀ (hembra), mientras que el genotipo sexual se indica con los cromosomas X y Y. Los porcentajes indican la proporción de los individuos en la descendencia correspondiente. El color verde indica los individuos silvestres presentes en Cuatrociénegas, mientras que el gris corresponde a los machos o hembras YY introducidos.

La implementación de este método requiere que la especie tenga un período de diferenciación sexual lábil, algo común en los cíclidos (Pandian y Sheela 1995; D'Cotta *et al.* 2001). Sin embargo, durante los eventos de producción de machos YY es necesario implementar procedimientos para evaluar la efectividad del tratamiento de reversión

sexual, además de la identificación de los distintos fenotipos y genotipos sexuales durante el desarrollo temprano. Para abordar estos aspectos se requiere desarrollar biomarcadores, como la expresión de la aromatasa y otros genes de determinación y diferenciación sexual, la vitelogenina, así como la determinación del cariotipo de la especie (Fig. 2).

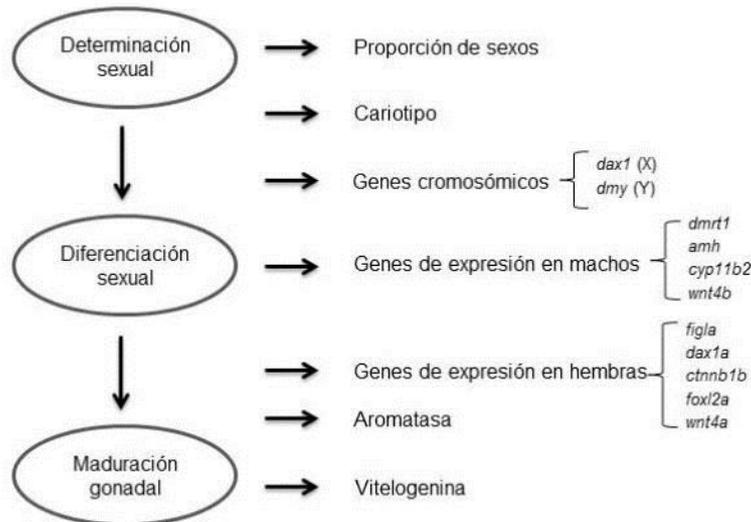


Figura 2. Esquema de los marcadores empleados para la identificación de genotipos sexuales de cíclido joya dentro del contexto de la biología reproductiva de los peces.

Evaluación de intersexualidad de las gónadas y verificación de la reversión sexual en el cíclido joya por medio de la identificación de ácidos nucleicos

La decisión del sexo de un embrión durante su proceso de desarrollo, así como la diferenciación de su fenotipo sexual se encuentra en su material genético y se ve afectada por el ambiente en el que se desarrolla. Por lo tanto, existen factores genéticos, ambientales, de comportamiento y fisiológicos que pueden afectar el destino de las células somáticas y germinales dentro de la gónada (Devlin y Nagahama, 2002). En el reino animal existen genes encargados de la determinación del sexo de una especie; específicamente en mamíferos y aves estos mecanismos están muy conservados, mientras que, en los

Teleósteos son muy diversos (Liu *et al.*, 2015). Pocos han sido los genes definidos a la fecha como determinantes del sexo en peces, entre ellos *Amhy* en *Odontesthes hatcheri* (Hattori *et al.*, 2013) y *Dmy* en medaka (*Oryzias latipes*) (Matsuda *et al.*, 2007). La determinación sexual específicamente en peces es un proceso muy flexible filogenéticamente; y dentro de los individuos puede estar sujeta a modificaciones por factores externos como se mencionó anteriormente (Devlin y Nagahama, 2002). Debido a la complejidad para definir genes determinantes del sexo, se opta por buscar genes que se expresen en etapas tempranas durante la diferenciación de las gónadas. El motivo es que estos genes permiten observar una expresión diferencial característica de cada sexo durante el proceso de diferenciación, indicando el sexo que se espera al culminar el desarrollo y el mismo podrá ser comprobado al final. En los Teleósteos, específicamente la familia de los cíclidos, debido a la gran diversidad de dichos mecanismos entre las especies y a los relativamente pocos estudios que hay sobre ellos, el interés y las investigaciones que buscan determinar los genes involucrados en la diferenciación sexual se han incrementado notablemente en los últimos años.

Genes marcadores de diferenciación sexual en machos

Se plantean para *Hemichromis guttatus*, los patrones de expresión de los genes *Dmrt1*, *Cyp11b2*, *Amh* y *Wnt4b* como marcadores del desarrollo sexual de machos. La elección de los mismos se fundamenta a continuación, con base en investigaciones previas donde se encuentra una clara asociación de estos marcadores al desarrollo sexual de machos en diferentes especies de peces.

- ***Dmrt1* (double-sex and mab-3-related transcription factor 1)**

Es un factor de transcripción con un dominio conservado de dedos de zinc con unión al DNA y la expresión de *Dmrt1* es exclusiva de las gónadas en vertebrados (Hong *et al.*, 2007). En el caso de los peces,

Dmrt1 se ha estudiado en *Oncorhynchus mykiss* especie en la que se registró su expresión únicamente durante la diferenciación testicular y no en la de los ovarios en hembras (Marchand *et al.*, 2000). En el mismo reporte de investigación, mediante qPCR, se observó que la expresión del gen *Dmrt1* descendió al aplicar tratamiento con estrógenos a los peces, confirmando así su papel en la diferenciación testicular de éstos. (Marchand *et al.*, 2000). En investigaciones con *Thalassoma bifasciatum* y *Danio rerio* se encontró de igual manera una sobreexpresión de este gen en testículos comparada con la expresión registrada en ovarios (Liu *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2010). Todos estos acontecimientos están reportados en peces alejados evolutivamente de la familia de los cíclidos, sin embargo, recientemente se ha propuesto este mismo papel de *Dmrt1* en cíclidos, tras reportarse una sobreexpresión del mismo en testículos, comparada con la expresión mínima en ovarios de las especies *Astatotilapia burtoni*, *Ophthalmotilapia ventralis*, *Julidochromis ornatus*, *Neolamprologus pulcher* y *Eretmodus cyanostictus* (Bohne *et al.*, 2013; Bohne *et al.*, 2014).

- ***Cyp11b2* (11-beta hidroxilasa)**

La importancia de *Cyp11b2* dentro del desarrollo sexual de machos reside principalmente en el papel de su producto, la enzima 11-beta hidroxilasa, que actúa en la síntesis de un potente andrógeno, la 11-ketotestosterona (Ijiri *et al.*, 2008). Además, *Cyp11b2* (también conocido como *Cyp11c1* en pez cebra) se ve involucrada en otros pasos de la esteroidogénesis en las gónadas (Liu *et al.*, 2015). Anteriormente se consideraba que la mayoría de los caracteres sexuales secundarios de los peces Teleósteos eran andrógeno-dependientes (Borg, 1994; Yamamoto, 1969). Sin embargo, en el cíclido *Oreochromis niloticus* se observó un incremento en la expresión de *Cyp11b2* después del día 30 en machos, mientras que en hembras hubo una nula expresión durante todo el ensayo (Ijiri *et al.*, 2008). Este hallazgo llevó a la especulación de

que la importancia de la presencia de los andrógenos respecto a la diferenciación sexual es secundaria a la importancia de los estrógenos, argumento que se confirma por Tao *et al.*, en el 2013. Éstos últimos investigadores estudiaron la expresión de enzimas responsables de la síntesis de andrógenos y estrógenos a los 5, 30, 90 y 180 días posteriores a la eclosión en *Oreochromis niloticus*, encontrando que, en efecto, en etapas tempranas la expresión de andrógenos era nula comparada con la de estrógenos, sin embargo, en etapas posteriores el patrón de expresión de *Cyp11b2* es característico de las gónadas de machos. En otro estudio en el pez cebra, donde se compara con la expresión de *Amh*, se confirmó que la sobreexpresión de *Cyp11b2* es secundaria a ésta, por lo que, aunque no es el inductor primario de la transformación gonadal de machos, si juega un papel importante en el proceso de su diferenciación sexual (Wang y Orban, 2007). Como en el caso de *Dmrt1*, en sus investigaciones del 2013 y 2014, Bohne *et al.*, encontraron una sobreexpresión de *Cyp11b2* en testículos, comparada con la expresión mínima en ovarios de los cíclidos *Astatotilapia burtoni*, *O. ventralis*, *J. ornatus*, *N. pulcher* y *E. cyanostictus*, lo que los llevó a postularlo de igual manera como un marcador de la diferenciación sexual de machos.

- ***Amh (hormona anti-Mülleriana)***

El gen *Amh*, cuyo producto es llamado también sustancia inhibitoria mulleriana (*MIS*), pertenece a la familia de factores de transformación- β de crecimiento (*TGF-B*) y está involucrado en la diferenciación sexual de machos en mamíferos, donde actúa en la regresión de los conductos de Müller (estructura fisiológica de las hembras) resultando en un fenotipo de macho (Rey *et al.*, 2013). Este gen se ha considerado un gen maestro en la diferenciación sexual en el pejerrey de la Patagonia (Hattori *et al.* 2012). En el pez cebra se detectó la expresión de *Amh* desde el 1er día post fertilización y una expresión aumentada después de 25 días, asociada con el período de diferenciación temprana gonadal; además

se detectó una sobreexpresión en machos, mientras que en las hembras la expresión se mantuvo mínima (Rudiger *et al.*, 2007). En el caso del cíclido *Oreochromis niloticus*, la expresión del gen se observó hasta el día 15 en machos, mientras que en hembras la expresión se mantuvo basal todo el tiempo (Ijiri *et al.*, 2008). Liu *et al.*, confirman en 2015 de igual manera la sobreexpresión en testículos de *Amh* en la especie *Thalassoma bifasciatum*.

- ***Wnt4b* (Wingless-type MMTV integration site family variant 4b)**

Wnt4b, el último de los genes propuestos para machos es conocido por corresponder a una molécula que está involucrada en la vía de señalización de la determinación del sexo femenino. Sin embargo, *Wnt4b* es propuesto aquí como posible marcador del desarrollo sexual de machos, ya que se considera relevante el hallazgo de una aparente subfuncionalización de esta molécula en los cíclidos: *Astatotilapia burtoni*, *O. ventralis*, *J. ornatus*, *N. pulcher* y *E. cyanostictus* (Bohne *et al.*, 2013; Bohne *et al.*, 2014). En efecto, al analizar la expresión de este gen se determinó que estaba involucrado en el desarrollo de los testículos. Además, en un estudio similar fue igualmente propuesto como un posible gen involucrado en el desarrollo sexual de machos de *Astatotilapia burtoni* (Heule *et al.*, 2014). En *Oncorhynchus mykiss*, se observó una expresión mayor en testículos en comparación con la expresión encontrada en los ovarios a los 18 días post-fertilización (Nicol *et al.*, 2012), por lo que se cree que de haberse ampliado el tiempo de estudio se hubieran podido obtener resultados en favor de lo aquí propuesto. Por otra parte, Liu *et al.*, 2015 encontraron también una expresión inesperada en la especie *Thalassoma bifasciatum*, al observar que este gen era mayormente expresado en testículos en comparación con la expresión encontrada en los ovarios, confirmando así lo anteriormente especulado. Otro aspecto interesante que considerar es que *T. bifasciatum* es capaz de cambiar de hembra a macho, pero se necesitaría una investigación

más profunda para demostrar que *Wnt4b* esté involucrado en este cambio de sexualidad del pez. Además, al no ser *Thalassoma bifasciatum* un cíclido, pero si un teleósteo, se cree que por la diversidad de patrones de desarrollo sexual en los teleósteos (refiriéndose tanto el sistema genético y ambiental de determinación del sexo), ésta subfuncionalización es propia de ellos (Liu *et al.*, 2015), por lo que podría ser un marcador de la sexualidad de machos.

Genes marcadores de diferenciación sexual en hembras

Con base en la literatura consultada se encontraron diferentes candidatos marcadores de sexo para hembras de *H. guttatus* de los cuales se identificaron 5 potenciales: *Wnt4a*, *Ctnnb1b*, *Dax1a* y *Figle*, siendo todos primordiales para la formación del ovario, tejido específico de hembras.

- ***Figa (Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix o factor alfa en la línea germinal)***

En los vertebrados con dimorfismo sexual, desde los peces hasta los humanos, se tiene conocimiento de que *FiglA* codifica para un factor de transcripción conocido como factor alfa en la línea germinal, que es el principal regulador positivo de los genes codificantes de proteínas de la zona pelúcida (*Zp2* y *Zp3*), y que se expresa desde los primeros días de la embriogénesis hasta la etapa adulta, actuando en la folículogénesis (Krisner, 2013).

La funcionalidad de *FiglA* se ha analizado en ratones hembras que presentan deficiencias o que han sido expresamente carenciados (*knockout*) en este gen, y se ha observado infertilidad debida a un bloqueo en la formación del folículo primordial y en la pérdida completa de los ovocitos. Mientras que la migración, diferenciación celular y desarrollo gonadal se dan de manera normal, comprobándose su papel

en la foliculogénesis. En este mismo tipo de ensayos de ratones *knockout* se ha observado que la detección de estos transcritos se reduce a casi cero en los ovarios de los ejemplares con la deficiencia, lo que hace evidente su implicación en la expresión de genes de la zona pelúcida (Krisher, 2013). También, otros estudios de expresión de genes relacionados a la diferenciación sexual en peces (Böhne *et al.*, 2013; Miyake, Sakai, y Kuniyoshi, 2012) confirman que la presencia de *Fig1A* se limita exclusivamente al tejido gonadal de hembras, considerándosele por esta causa como un posible marcador sexual dimórfico, y que por su función conservada es también considerado como un determinante sexual femenino (Li, 2010).

- ***Foxl2A (Forkhead box L2)***

Este gen es un miembro de la familia de los factores transcripcionales llamados *Forkhead* ya que contiene un dominio de 100 aminoácidos característico de unión al ADN (Cocquet, Pailhoux, y Jaubert, 2002). Es uno de los genes más estudiados ya que se ha demostrado su relación con el sexo femenino en diferentes especies de vertebrados (Wang, Kobayashi, Zhou, y Nagahama, 2004).

En ratones se demostró su función con ejemplares *knockout* para este gen y, ahora se sabe que es uno de los genes que en etapas tempranas regula de manera positiva el desarrollo del ovario en las hembras (Eggers, Ohnesorg, y Sinclair, 2014).

Por su parte, Wang *et al.* (2007) demuestran mediante ensayos de inmunohistoquímica, que este gen es un regulador en las rutas de determinación sexual para la diferenciación del ovario mediante la activación de la expresión de la aromatasa (*Cyp19a1A*), involucrada en la producción de estrógenos. En su estudio realizaron pruebas en gónadas de tilapia, con anticuerpos dirigidos al factor transcripcional codificado por *Foxl2A*, donde se observó que éste se encontraba presente desde el día 5 después de la eclosión, mientras que la

aromatasa se detecta a partir del día 10, y ambos mantienen su expresión hasta el día 20 (máximo analizado), tanto en gónadas de hembras como de machos feminizados con tratamientos hormonales. Aunado a esto realizaron pruebas para identificar la región de unión del factor *Foxl2A* en el ADN demostrándose que reconoce secuencias específicas dentro de la región promotora del gen que codifica para la aromatasa, comprobándose que *Foxl2A* es el responsable de la activación de su transcripción en los tejidos gonadales. Lo anterior resulta congruente con los perfiles de expresión por qPCR que reportan Böhne *et al.*, (2013), quienes determinaron que *Foxl2A* presenta altos niveles de expresión en gónadas de hembras. Previamente Baron *et al.* (2004) reportaron que, al menos en peces, existía una relación directa entre los niveles de expresión de *Foxl2A* y *Cyp19a1A* en individuos hembras.

- ***Wnt4A (Wingless-type MMTV integration site family variant 4a)***

Es miembro de la familia de moléculas de señalización Wnt, y la única variedad involucrada directamente en la determinación sexual. La proteína *Wnt4A* forma parte de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, involucrada en la pluripotencialidad de la célula y la decisión de su destino celular, es decir su diferenciación (Cell Signaling Technology, 2016; Nicol, Guerin, Fostier y Guiguen, 2011). La vía Wnt/ β -catenina es una de las dos vías a las que se vinculan las moléculas de la familia *Wnt*, en la que la activación de genes se logra mediante la interacción de la β -catenina y los factores de transcripción de la familia TCF (*T-cell Factor*) (vía canónica), mientras que en la otra vía se activan genes mediante una modulación interna de la concentración de calcio mediada por la proteína G (vía no-canónica). En la vía canónica, el complejo Wnt/ β -catenina con los factores TCF se unen al elemento de respuesta de TCF y activan la transcripción de los genes blanco (Jordan *et al.*, 2001).

Se sugiere un papel importante de la proteína *Wnt4A* en el desarrollo del ovario, ya que en ratones hembra con ausencia de este gen se han

desarrollado conductos masculinos internos y han degenerado los femeninos (Jordan *et al.*, 2001). Adicionalmente, según los resultados reportados por Jeays-Ward, Dandonneau, y Swain (2004) mediante ensayos de qPCR, hibridaciones *in situ* y cepas de ratones mutados, se demuestra que es *Wnt4* la variante que está presente en gónadas tanto de macho como de hembra en etapas tempranas del desarrollo de las mismas. Y por los perfiles de expresión reportados en el trabajo de Böhne *et al.*, (2013) se pudo definir que la variante A es la presente en gónadas de hembras debido a que presentó los más altos niveles de expresión en este tejido.

- ***Ctnnb1B (Catenina β 1 variante b)***

Este gen codifica para la proteína Catenina B o β -catenina, la cual forma parte de un complejo de activación de la transcripción de genes, vía *Wnt* (Clevers y Nusse, 2012). Y aunque no se ha estudiado más a fondo el papel específico del producto de este gen, ni se han encontrado estudios de organismos *knockout* para corroborar su función dentro de la ruta de diferenciación sexual, este gen es frecuentemente reportado por su participación en la vía *Wnt*, y por su importancia en el desarrollo y diferenciación del ovario (Eggers *et al.*, 2014; Jiang, Hou, She, y Yang, 2013; She y Yang, 2014). Esto al parecer es debido a su participación en la vía canónica que está considerada como importante en el desarrollo gonadal, ya que algunos de los genes activados mediante esta vía se encuentran vinculados con dicha función (Jeays-Ward *et al.*, 2004).

Tomando en cuenta los ensayos de qPCR de Böhne *et al.* (2013), donde las gónadas de las especies estudiadas presentaron altos niveles de expresión del transcrito de este gen, especialmente en gónadas de hembra, se considera este gen como candidato.

- ***Dax1A (dosage-sensitive sex reversal-AHC critical region on the X chromosome gene 1; NR0B1)***

Este gen codifica para un receptor nuclear hormonal que, en estudios de expresión realizados por *Northern blot* se demostró estar en sobre-expresado en ovarios, en comparación con tejido de hígado y gónadas de machos (Wang *et al.*, 2002). Los análisis se realizaron utilizando como sonda secuencias del gen *DAX1* marcada con P³², y empleando como control el gen de la β -actina.

En machos, este gen se expresa casi de manera similar que *Sry*, pero cuando se comienzan desarrollar los conductos testiculares su expresión comienza a disminuir drásticamente, mientras que en las hembras, continua expresándose, lo que sugiere un rol en la determinación sexual (Jiang *et al.*, 2013). Actualmente se conoce que el producto de este gen tiene un papel primordialmente anti-testículos, más que un determinante para el desarrollo de los ovarios, ya que su función radica en actuar como co-represor de *Sf1* y al formar este complejo impide la acción de *Sox9*, el cual a su vez es directamente un antagonista de *Sry*, bloqueando así la vía de diferenciación sexual de machos (Jiang *et al.*, 2013).

En estudios similares se encontró que los ensayos de qPCR de Böhne *et al.*, (2013) indican altos niveles de expresión de este gen en gónadas de hembras más que en las de machos o en algún otro tejido.

Es importante mencionar que, aunque la expresión de algunos de los genes aquí descritos es ubicua y no es exclusiva de las gónadas en los peces, es ahí donde se expresan mayormente y el tejido en el que se escogió evaluar sus patrones de expresión con el fin de ver directamente representada la diferenciación sexual del pez. Por la proximidad de algunas de las especies que se mencionaron como referencia y por la consistencia de los resultados encontrados en las investigaciones anteriormente expuestas, fueron propuestos y justificados estos genes para su empleo como marcadores del desarrollo sexual de machos.

Genes *housekeeping* y su importancia para monitorear expresión de génica

Otro aspecto importante, es la necesidad de identificar genes que sirvan como control en el análisis de expresión, sobre todo si se trata de especies extremadamente sensibles a variaciones ambientales, como es el caso de los cíclidos; por ejemplo, el uso de esteroides o estrógenos empleado en etapas tempranas del desarrollo alteran el estado fenotípico del pez y esto es debido a que también altera la expresión de sus genes.

Para ensayos de expresión por q-PCR es necesario evitar datos erróneos causados ya sea por las condiciones del ensayo, los diferentes tratamientos empleados o por fallas técnicas en la extracción del material empleado, para monitorear o detectar estas variaciones se deben emplear genes control que se adecuen a las necesidades experimentales.

Un buen gen control debe cumplir con las siguientes características:

1. Nivel de expresión constante, es decir, que no sea afectado por factores experimentales. Los genes *housekeeping* son un buen ejemplo.
2. Nivel de expresión con variabilidad mínima entre tejidos y estados fisiológicos del organismo.
3. Un ciclo *umbral* similar al de los genes a estudiar, es decir: que el número mínimo de ciclos para que se detecte su señal por q-PCR sea casi el mismo.
4. Debe mostrar variabilidad en caso de que existan errores técnicos durante la q-PCR o por la preparación de las muestras a estudiar.

Los genes más empleados son: GAPDH, β -Actina, TUBA y 18s rRNA, pero como se mencionó anteriormente, su uso depende completamente de las condiciones experimentales a las cuales se someterán los ensayos (Kozera y Rapacz, 2013).

- **18s Ribosomal como control en ensayos de expresión**

Se han realizado evaluaciones sobre la confiabilidad del uso de genes “housekeeping” utilizados en ensayos bajo la influencia de hormonas, entre ellos genes como *GAPDH*, *18s rRNA*, β -2-microglobulina y β -Actina; sin embargo su estabilidad bajo agentes como 17α -etfinilestradiol y octilfenol es demasiado variable, y sólo es aceptable en aquellos genes ribosomales, principalmente en el *18s rRNA*, el cual parece ser un buen gen control para ensayos de expresión ya que mantiene su expresión estable entre tejidos y durante condiciones de administración de hormonas esteroideas (Geng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Genovese *et al.*, 2012). Además, el gen *18s rRNA* es uno de los genes *housekeeping* por excelencia, ya que forma parte de la subunidad pequeña ribosomal 40s encargada de monitorear la complementariedad del tRNA y mRNA en la traducción de proteínas, por lo que siempre estará presente y su función es muy estable para evitar problemas en la traducción. Esto quiere decir que, hipotéticamente: no importa a qué condiciones, exógenas o endógenas, sea sometido el organismo, el *18s rRNA* mantendrá una expresión estable, un efecto que no siempre se observa con genes como *GAPDH*. El gen *GAPDH* codifica para una deshidrogenasa requerida en rutas metabólicas, mientras que la β -Actina está involucrada en la motilidad, estructura e integridad de las células; estos dos últimos genes a pesar de ser vitales para el organismo son susceptibles a cambios en el ambiente, por lo que no son del todo aptos para los fines de este ensayo (Pánek, Kolár, Vohradský y Shivaya Valášek, 2013; Tristan, Shahani, Sedlak, y Sawa, 2011; Perrin y Ervasti, 2010).

Marcadores de cromosomas sexuales

Identificar marcadores específicos de cromosomas para un organismo del cual no se tiene un genoma secuenciado, no es una tarea fácil y es en este punto en el cual los genes maestros del sexo, como el *SRY* y *DAX1* en humanos tienen un papel crucial para evitar algunas de las limitaciones que otros tipos de marcadores presentan, ya que se encuentran específicamente en los cromosomas sexuales, simplificando el sexado en mamíferos.

En cíclidos no se tiene un gen maestro presente específicamente en el cromosoma Y para todas las especies, existen polimorfismos que ayudan a su diferenciación y ya hay genes descritos que están involucrados en el desarrollo gonadal, los cuales coinciden con muchos de los usados por mamíferos, entre ellos *DAX1* y *CYP19A1*, los cuales se conocen por su importancia para la feminización.

- ***DAX1a*, marcador específico de hembra**

Uno de los genes 'maestros' ya descritos en cíclidos es *DAX1*, gen que está involucrado en la determinación sexual de hembras en mamíferos y posiblemente en vertebrados inferiores como el salmón; se expresa en etapas de desarrollo embrionario temprano, durante el periodo de determinación sexual, diferenciación neuronal y en las etapas tempranas de expresión gonadal.

Además, este gen juega un papel importante en la determinación sexual de los cíclidos como *O. niloticus* por la activación de la capacidad esteroidogénica que ocurre durante las etapas tempranas de expresión gonadal y se dice que participa en la activación de la β -*catenina*, la cual está involucrada en el desarrollo de ovarios, siendo activada por *Wnt4* y permitiendo así que β -*catenina* propicie la regulación negativa de los genes *Wnt* involucrados en el desarrollo de testículos, autorregulándose en el proceso (Böhne *et al.*, 2014). Se han realizado ensayos de expresión y presencia de este gen en el Bacalao del Atlántico, mostrando una expresión principal en hembras durante los primeros días después de la

eclosión, no obstante, se observado un pico de expresión a los 87 días en machos, esto debido a que *DAX1* también se encuentra involucrado en la producción de hormonas esteroideas (Martins *et al.*, 2013). En Tilapia, un cíclido más cercano, se mantuvo una expresión elevada en hembras de los días 5 al 35 después de la eclosión y aumentó en machos hasta el día 70. Esta función conservada entre peces y mamíferos es lo que lo vuelve un candidato potencial para ser un marcador específico de cromosoma, ya que si es un gen determinístico de hembras en sus primeras etapas de vida es posible que igual se trate de un fragmento específico de cromosoma sexual por esa función compartida (Shirak *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Sudhakumari *et al.*, 2005)

- ***CYP19A1* como marcador de feminización en machos**

La aromatasa es el producto del gen *CYP19*, perteneciente a la familia de los citocromos P450 que se expresa tanto en cerebro como gónadas. Los teleósteos tienen dos isoformas de esta enzima: *CYP19A1a* y *CYP19A1b* (Huffman *et al.*, 2013). La aromatasa es la responsable de la biosíntesis de estrógenos y se encuentra presente únicamente en las gónadas de hembras antes de la diferenciación morfológica en Tilapia y otros cíclidos (*CYP19A1a*) y en menor medida en el cerebro, mientras que *CYP19A1b* se encuentra principalmente en cerebro y en menor medida en gónadas antes de la diferenciación morfológica (Böhne *et al.*, 2013)

La expresión de aromatasa comienza a los 15 días después de la eclosión y se mantiene estable posterior al desarrollo gonadal (Ijiri *et al.*, 2007); se ha encontrado que la expresión de *CYP19A1a* aumenta mientras que *CYP19A1b* se encuentra disminuido en hembras y viceversa para machos de *O. niloticus*. Es este cambio de expresión detectado incluso a los 310 días después de la eclosión en hembras lo que vuelve a *CYP19A1a* un marcador potencial; su expresión difiere considerablemente entre machos y hembras, siendo *CYP19A1a* expresado en mayor cantidad en hembras y *CYP19A1b* en machos,

manteniéndose después de 168 y 310 días sobre los niveles de expresión presentados por hembras. Esto se debe a que la copia *CYP19A1a* se expresa principalmente en ovario y *CYP19A1b* en testículos (Göppert et al., 2016; Böhne et al., 2014; Heule et al., 2014).

Por todo lo anterior es que el desarrollo de herramientas moleculares que ayuden a la identificación del sexo de peces de importancia biológica como el cíclido joya y de genes con niveles de expresión no variables, nos permitirán facilitar un fino monitoreo de la proporción sexual de esta especie.

- **Competencia interespecífica entre *Hemichromis guttatus* y el cíclido nativo *Herichthys minckleyi* evaluada por medio de sus interacciones antagónicas**

La competencia intraespecífica se relaciona de forma positiva con el traslape en el uso de recursos, ya sea por la preferencia de elementos de la dieta o el espacio. Muchas especies utilizan la agresión para obtener y retener los recursos que necesitan (Kardy & Barreto, 2010), por ejemplo, el aumento de la agresividad en defensa de un área determinada denominado territorialidad, significa una mayor oportunidad de forrajeo y reproducción. En consecuencia, es común que los ejemplares más agresivos tengan mayores posibilidades de sobrevivir.

Este es el caso del cíclido joya, el que al igual que otros cíclidos africanos, presenta un comportamiento altamente territorial y agresivo. Debido a este comportamiento, particularmente durante la temporada de reproducción, pueden afectar las comunidades nativas de forma directa, por depredación y competencia por las presas en común; o indirecta, haciendo que sus competidores gasten más energía en evadir los ataques que en mantener los recursos (Schofield et al., 2014). Cuando un organismo con estas tendencias antagónicas es introducido a un nuevo ambiente, se presenta un momento crucial en el que se define la dominancia sobre los recursos y el refugio, si la especie nativa es capaz de competir, las interacciones antagónicas irán aumentando hasta que

una de las dos especies sea desplazada (Tran *et al.*, 2015). Esta sección del proyecto tiene como fin analizar la interacción entre la especie nativa y la invasora en pequeña escala, poniendo a prueba la supervivencia de ambas especies bajo condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un método para el control del cíclido joya Africano (*Hemichromis guttatus*)

Objetivos Particulares

- Recolecta de ejemplares del cíclido joya en Cuatrociénegas, Coahuila
- Feminización de machos por medio de estrógenos
- Reproducción, introgresión y obtención de machos YY ("supermachos") del cíclido joya
- Desarrollo y establecimiento de un inmunoensayo para la detección de VTG en el cíclido joya (Purificación de VTG del cíclido joya, Caracterización de la molécula, Desarrollo de anticuerpos policlonales anti-VTG)
- Desarrollo de un inmunoensayo y detección de espigina en el cíclido joya
- Determinación de la expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a*
- Evaluación de intersexualidad de las gónadas y verificación de reversión sexual en el cíclido joya por medio de la identificación de ácidos nucleicos
- Evaluación comportamental de ejemplares de cíclidos joya YY y la especie nativa *Herichthys minckleyi* en laboratorio

- Ensayos de control del cíclido joya

JUSTIFICACIÓN

H. guttatus es un cíclido africano que se distribuye a través del comercio de especies ornamentales y que se ha convertido en una especie invasora en las pozas de Cuatro Ciénegas Coahuila, México. La invasión fue reportada por primera vez por Contreras y Ludlow en 2003. Estos autores mencionan que el pez fue observado en la Poza Churince desde 1996 y en visitas posteriores observaron un aumento considerable de la población, sugiriendo que podían ocasionar daños a la fauna acuática regional, generalmente endémica.

Después de los reportes de invasión de la especie, entre el 2007 y el 2009, La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, en coordinación con el Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas (APFF) llevaron a cabo un Programa de Monitoreo y control de la especie con la finalidad de erradicar o minimizar el impacto de esta especie en el ecosistema. Se seleccionó el sistema Churince como área de trabajo, el cual se ubica en la parte central del APFF. Para la captura de la especie se utilizaron trampas metálicas en forma de embudo, las cuales se introducían por periodos de una hora, registrando el número y peso de los ejemplares de cíclido joya capturados (método de captura y eliminación). Los resultados demostraron que entre los años 2002 al 2007 el número de ejemplares capturados por jaula por hora no era mayor a 6, sin embargo, tan solo en el 2008 fueron capturados 75,000 ejemplares de cíclido joya, lo que demuestra la adaptación de la especie al medio, lo cual queda constatado por su éxito reproductivo y facilidad de desplazamiento, por lo que resulta inminente aumentar los esfuerzos de erradicación de la especie e intentar nuevas formas control.

Recolecta y mantenimiento de los organismos

Se realizaron tres salidas para recolectar 150 ejemplares del cíclido joya y 6 ejemplares de cada una de las especies nativas *H. minckleyi* y *C. bifasciatus* las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila (se anexan permisos de colecta). Los individuos de *H. guttatus* y *H. minckleyi* fueron trasladados al laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en bolsas con agua suplementadas con oxígeno. Después de dejarlos aclimatar, los individuos fueron sometidos a un tratamiento salino (10 ppt) intermitente por un período de una semana con la intención de eliminar parásitos. Mientras que los ejemplares de *C. bifasciatus* fueron transportados a la instalación de PRONATURA en Cuatrociénegas ya que por su fragilidad no podían ser traídos a Nuevo León.

Se acondicionarán acuarios de 20 y 40 galones, con agua que cumplía con los requisitos de calidad para la especie *H. guttatus*. En cada acuario se colocaron 3 hembras y 3 machos para observar la formación de parejas, lo cual fue constatado cuando el macho y la hembra desarrollaban una coloración nupcial, nadaban juntos y/o construían un nido. En seguida, cada una de estas parejas fueron colectadas y colocadas en acuarios del mismo tamaño por separado. Cada uno de los acuarios contaba con tres tipos de sustrato para el desove, con la finalidad de que los reproductores tuvieran alternativas para ese fin.

En el caso de *H. minckleyi* los 6 ejemplares fueron colocados en un tanque de 2.7 m de diámetro con una profundidad de agua de 80 cm. En el tanque se colocaron piezas de ladrillo, rafia y macetas para simular su medio ambiente natural y para que dispusieran de sustratos para desovar. Además, el tanque se acondicionó con un sistema de filtración y oxigenación de agua para mantener sus características fisicoquímicas en buenos niveles.

La alimentación de los reproductores fue variada, ofreciéndoles alimento formulado en forma de hojuelas y alimento vivo como Artemia, larvas de mosquito y quironómidos, así como pequeños trozos de hígado de res. Los acuarios fueron revisados diariamente para observar la presencia de desoves.

Identificación taxonómica

Un aspecto significativo sobre las especies invasoras es su verdadera identidad. En el presente caso la especie fue reportada como *Hemichromis guttatus* desde 1996 (Contreras-Balderas y Ludlow 2003). Para tener la certeza de que en efecto se tratara de esta especie se analizaron sus características morfológicas de acuerdo a las claves de Loiselle (1992) y adicionalmente se llevó a cabo un análisis molecular por medio de la técnica del de "código de barras de la vida" (Barcode) que consiste en la existencia de un fragmento de ADN estandarizado para identificar las especies de todos los organismos vivos y en el caso particular de animales, se utiliza el gen mitocondrial COI (Hebert *et al.*, 2003).

Reversión sexual

En peces se han reconocido una gran diversidad de mecanismos de determinación sexual. Sin embargo, los procesos que conducen a la diferenciación sexual se encuentran relativamente conservados (Ijiri *et al.* 2008; Wootton y Smith 2014), y muestran un alto grado de plasticidad, por lo que es común que el sexo se vea influenciado por disruptores ambientales (e. g. esteroides exógenos) (Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza 2010), el pH o la temperatura (Böhne *et al.*, 2013). En efecto, en

etapas tempranas de desarrollo existe un período crítico durante el cual se puede revertir el sexo (período lábil), por lo cual es posible producir poblaciones monosexuales experimentalmente (Fuentes-Silva *et al.* 2013). La administración de hormonas para revertir sexualmente a los peces es una técnica ampliamente utilizada en acuicultura, con la finalidad de crear poblaciones monosexuales y así obtener mayores rendimientos (Gutierrez y Teem, 2006). En particular, para la reversión de machos se suelen utilizar estrógenos, como el 17- β -estradiol, estrona, 17-etinilestradiol, dietilestilbestrol o antiandrógenos, como la flutamida, cuya forma de administración y concentración es especie-específica.

Feminización

Durante este experimento se feminizaron los juveniles de cíclido joya mediante su exposición a Flutamida y estradiol, por inmersión y por vía oral, respectivamente, como se indica a continuación. Se escogió el 17- β -estradiol y la Flutamida para los tratamientos de feminización. Se seleccionó el 17- β -estradiol ya que es el mayor estrógeno en los vertebrados, estando relacionado con el desarrollo del sistema reproductivo femenino y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (Welshons *et al.*, 2003). Mientras que la Flutamida es un potente anti-andrógeno no esteroideo que puede unirse competitivamente a los receptores de andrógenos, previniendo la unión de estos y regulando así los procesos mediados normalmente por andrógenos. (Bhatia, Kumar, Du, Chapman, y McLaughlin, 2015).

Estradiol

Cada tratamiento se realizó por triplicado, consistiendo en un total de 25 individuos por replica y un tiempo de exposición de 60 días (Vidal-López *et al.*, 2009). El inicio de la exposición fue a partir del día 15 después de la eclosión (DDE). El estradiol se administró en la dieta, utilizando como

vehículo nauplios de *Artemia* cuya dieta fue enriquecida con el estrógeno. Así, el estradiol fue disuelto en Selco utilizando una concentración de 200 mg/L de alimento para ser incorporado en los nauplios. Las crías de cíclido joya fueron alimentadas de manera continua por medio de un gotero (Fig. 3), para proveer un flujo de nauplios de *Artemia* de 17 nauplios/min durante 6 h hasta alcanzar 3,000 nauplios por réplica cada 3 h (Vidal-López *et al.*, 2009).

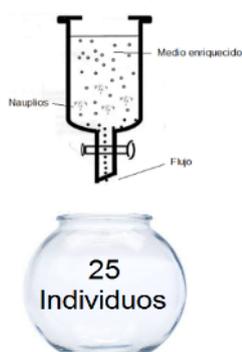


Figura 3. Mecanismo de alimentación de nauplios a la pecera con juveniles de cíclido joya.

Los nauplios de *Artemia* se obtuvieron de quistes comerciales y se decapsularon hidratándolos durante 1 hora. Posteriormente se agregó una solución con 10% de hipoclorito de sodio y se agitó durante 30 s.

Para detener la reacción se añadió tiosulfato de sodio. Finalmente, se transfirieron a un medio salino (30 ppm) con aireación desde el fondo para que eclosionaran de una manera óptima. Para enriquecer el medio de los nauplios se preparó una solución stock de 500 mg de 17- β -estradiol en 75ml de Selco, el cual fue agregado al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 6.66 mg/ml de 17- β -estradiol.

El Selco fue preparado de acuerdo con el protocolo descrito por (<http://acuarios.desdecostarica.com/foro/threads/receta-para-enriquecer-artemia.22032/>), el cual consiste, brevemente, en agregar 30 g de gelatina sin sabor en 800 ml de agua desionizada hervida y posteriormente enfriada hasta 40°C. Por otra parte, y de forma independiente se mezclaron 160 ml de aceite de bacalao y 1 g de β -

caroteno en una licuadora a la velocidad más alta por 30 segundos, a la cual se agregaron 30 g de mezcla de vitaminas (C, E y Complejo B) y 4 yemas de huevo. Finalmente se agregó la gelatina por 90 segundos y se almacenó a 4°C.

Un grupo control fue alimentado con nauplios de *Artemia* sin enriquecer. El suministro a las larvas en el caso de los tratamientos en los que se utilizaron nauplios de *Artemia* se llevó a cabo durante un periodo de 60 días. Después de este periodo los nauplios fueron reemplazados por una dieta comercial hasta que las larvas lograron alcanzar una talla que permitiera la disección de las gónadas. A lo largo del experimento se registró continuamente la supervivencia.

En los acuarios se registró el pH y la temperatura cada día durante todo el experimento para confirmar que estos parámetros se encontrarán dentro del rango aceptado para la especie (Dugan, 2014).

Flutamida

La flutamida es un compuesto anti-androgénico que actúa inhibiendo la acción de las hormonas sexuales masculinas, como la testosterona, por medio de su unión al receptor nuclear de los andrógenos (AR). Por lo que al actuar durante la gonadogénesis se comporta como un agente feminizante (Simard *et al.*, 1986; Filby, *et al.* 2007)

Para la feminización por flutamida, se utilizaron 90 individuos después de 15 días DDE, provenientes de la misma pareja de cíclidos joya (*H. guttatus*), por tratamiento y por replica. Los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado.

Se elaboró una solución stock disolviendo 200 mg de Flutamida en 10 ml de etanol. Se transfirieron 0.2 ml de ésta a tubos de vidrio para contar con 4 mg de Flutamida por tubo. Posteriormente, se dejó evaporar el alcohol y se almacenó para ser administrada según se fue requiriendo.

La Flutamida se administró por inmersión (Fig. 4) con la finalidad de que fuera absorbida por las branquias y el aparato digestivo a una concentración de 1 mg/L durante 60 días. Diariamente se adicionaron 500 ml de solución nueva y se reemplazó en cada repetición a una velocidad de 3 ml/min, con el propósito de mantener una concentración constante.



Figura 4.- Mecanismo de administración de Flutamida a los acuarios con juveniles de cíclido joya.

Masculinización

Se proporcionaron moléculas androgénicas a larvas de cíclido joya para su masculinización, con el propósito de obtener el mayor porcentaje posible de machos, mismos que fueron utilizados como controles negativos de expresión para la evaluación de la aromatasa.

- ***Inhibidores de aromatasa (Fadrozol)***

La exposición al Fadrozol provoca la inversión sexual al unirse a la aromatasa, impidiendo su actividad enzimática, lo cual conduce a una disminución de la biosíntesis de estradiol. El inhibidor de la aromatasa se suministró en forma de implante en dosis de 10 mg/Kg, ya que se ha comprobado que estas concentraciones inducían la inversión sexual y la terminación de la espermatogénesis hasta la fase masculina funcional en

los meros (*Epinephelus akaara* y *E. merra*) (Guang-Li *et al.*, 2006; Kumar Bhandari *et al.*, 2004).

Determinación del sexo por la técnica de squash

Se utilizó la técnica de squash descrita por Taylor *et al.* (2013), la cual consiste en remover las gónadas con unas pinzas finas y colocarlas en un portaobjetos previamente preparado con una gota de aceto-carmin. Después se colocó un cubreobjetos por encima de las gónadas para ser comprimidas. Las preparaciones fueron examinadas en un microscopio compuesto empleando magnificaciones de 25 a 50x.

Análisis Morfométrico

El análisis morfométrico de los peces es una herramienta importante para el estudio de sus estructuras poblacionales. Ya que en muchas especies de peces se conoce que diferentes partes del cuerpo crecen de manera distinta de acuerdo a las etapas ontogenéticas, particularmente durante la maduración sexual (Bhuiyan e Islam, 1990). De aquí, que las medidas específicas de las estructuras morfológicas de los peces y el análisis de su relación estadística entre ellas pueda ser de gran importancia para reconocer el fenotipo de “*supermacho*” o “macho YY” en tilapia (Abucay y Mair, 2004).

Para realizar el análisis morfométrico se tomó como muestra un desove completo en el que la hembra progenitora había sido tratada con estradiol durante su etapa de diferenciación sexual (experimento descrito anteriormente). Posteriormente, se sexó este desove siguiendo el método de squash. Previamente a la determinación del sexo se tomaron fotografías de cada ejemplar para realizar un análisis que consiste en definir una serie de marcas en los ejemplares utilizando el software TPSdig (Fig. 5). Las siguientes medidas fueron registradas en cada ejemplar: Longitud Total (LT) Longitud Estándar (LE) Longitud de la Cabeza (LC) y Altura del Cuerpo (AC).



Figura 5. Marcas para la generación de análisis morfométrico en un ejemplar de cíclido joya.

El software crea formas geométricas a partir de las marcas asignadas que pudieran ser indicativas de diferentes características en los distintos sexos. Una vez generadas estas formas, se analizaron las relaciones existentes entre ellas mediante el uso del software TPSrel. Ya que estas relaciones se obtienen de forma numérica, se llevó a cabo un análisis de componentes principales en R para lograr explicar cuál de los componentes tenía la mayor relevancia para explicar la variación de todas las relaciones geométricas que generó el software.

Análisis estadístico

Los resultados de la proporción de sexos de los peces en los distintos tratamientos fueron analizados por medio de una prueba de Fisher contra la proporción normal 50/50. La relación entre pesos y longitudes fue analizada con una t de student y se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett para demostrar que los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de t de student son ciertos. La

significancia estadística se aceptó a $\alpha=0.05$. Para los datos en los que la hipótesis de normalidad fue rechazada se realizó la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software R.

Purificación de la vitelogenina

La vitelogenina es una lipoglicocarotenofosfoproteína que se presenta únicamente en las hembras iniciando la etapa de pubertad en las especies ovíparas. Esta molécula posteriormente se convierte en el componente principal del vitelo presente en el ovocito, por lo cual resulta un marcador sumamente útil para la identificación de hembras (Arukwe y Goksøyr 2003). La vitelogenina se produce en el hígado durante la fase de crecimiento secundario del ovocito (vitelogénesis) estimulada por el estradiol liberado por las células del folículo ovárico (Lubzens *et al.* 2010). Considerando estas características se pretendía realizar la purificación de la vitelogenina mediante técnicas cromatográficas aprovechando su tamaño molecular (>300 kDa) y características bioquímicas (presencia de sacáridos, lípidos y grupos fosfato). Una vez aislada se procedería a la producción de anticuerpos específicos, mediante inmunización de ratones. Los anticuerpos serían útiles en la identificación de hembras durante los tratamientos empleando inmunoensayos enzimáticos (Mendoza *et al.* 2012). Sin embargo, debido a problemas técnicos con el equipo de cromatografía y las columnas, los cuales no han sido posible resolver debido a la falta de recursos económicos (producto de la variación en la paridad del dólar con el peso del momento en que el proyecto fue aprobado a la fecha), esta estrategia metodológica no fue posible completarla. No obstante, se emprendieron acciones complementarias para solventar este inconveniente mediante la implementación de una técnica alternativa para detectar y cuantificar la vitelogenina, consistente en la cuantificación de los grupos fosfatos asociados a esta proteína y cuya utilidad ha sido comprobado como un

procedimiento confiable para la detección y cuantificación de vitelogenina (Hallgren et al. 2009; Salomão y Marques 2014). Debido a que el gen se encuentra presente en ambos sexos, se espera la expresión de la vitelogenina en las hembras obtenidas durante la feminización del cíclido joya.

Marcadores moleculares

- **Colecta de ejemplares en cuatro Ciénegas, Coahuila**

Se realizó una disección *in situ* de los ejemplares de *Hemichromis sp* obtenidos de la colecta, procurando la conservación íntegra del tejido y otros más fueron disectados dentro de las instalaciones del laboratorio de Ecofisiología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

- **Extracción de DNA.**

La extracción de DNA se realizó mediante el protocolo de Fenol-cloroformo descrita por Chen y colaboradores (2007). El tejido empleado fue preferencialmente fresco y el DNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

- **Extracción de RNA.**

La extracción de RNA se realizó por medio del protocolo de Trizol y en algunos casos, con ayuda del kit de RNAeasy de Qiagen, esto dependiendo de las condiciones del tejido y la pureza necesaria. El RNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

- **Síntesis y diseño de oligonucleótidos**

Tomando en cuenta las diferentes publicaciones mencionadas, se solicitó la síntesis de los oligonucleótidos a un servicio externo y otros más

se diseñaron y verificaron de acuerdo con los recursos electrónicos disponibles en línea.

- **PCR punto final**

Los ensayos de PCR se realizaron para establecer las temperaturas óptimas de amplificación para cada par de oligonucleótidos, modificando las condiciones en los casos necesarios. Se empleó una concentración de DNA de al menos 50 ng/μl como templado y el resto de los reactivos en las cantidades indicadas en Tabla 2.

Tabla 2.- Reactivos y volúmenes utilizados por reacción para PCR en punto final

| Componente | Volumen/Reacción |
|----------------------------------|------------------|
| Buffer 5x | 1 μL |
| dNTPs Mix (4mM cada uno) | 1.34 μL |
| MgCl₂ (10 mM) | 3 μL |
| Agua libre de DNAsa | 2.2 μL |
| Oligos/Mix (5 μM) | 1 μL |
| Taq polimerasa | 0.133 μL |
| Templado DNAg (50ng) | 1.33 μL |
| Volumen total de reacción | 10 μL |

Para cada caso se siguió el siguiente protocolo: un *hot start* a 95°C por 3 minutos, desnaturalización por 30 segundos a 95°C y establecimiento de un gradiente específico para cada gen por 30s para el alineamiento de los *primers* y verificación de la mejor temperatura de alineamiento. Después se realizó la extensión a 72°C por 30 segundos y se repitieron los pasos 2-4 por 35-40 ciclos según era necesario. Se realizó una última extensión a 72°C por 1 minuto y posteriormente se almacenó a -20°C o resolvió en un gel de agarosa.

- **Retro transcripción**

La síntesis de cDNA se realizó por retro-transcripción con el uso de los *kits* Accuscript de Invitrogen y Omniscript de Qiagen, para así obtener el cDNA necesario para las reacciones de PCR y q-PCR en la estandarización de los genes candidato. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Preparación de material para su secuenciación:

- **Purificación de productos de PCR**

Con el fin de secuenciar los fragmentos obtenidos a partir de la RT-PCR, fue necesaria la purificación de los mismos y una concentración mínima de 50 ng/μL. Para los productos únicos se utilizó el *kit* QUIAQUICK de Qiagen; en cambio, para el resto de los productos se empleó el *kit* QUIAEXII de Qiagen para la purificación de los fragmentos a partir de gel de agarosa.

Todos los productos purificados se almacenaron a -20°C y/o cuantificaron por espectrofotometría.

- **Clonación**

Se empleó el *kit* Cloning plus de Qiagen para realizar la ligación y clonación de los fragmentos en células de *E. coli*. Para esto, se empleó el vector de clonación pDrive y células calcio-competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Se verificó su crecimiento en agar LB con Ampicilina, IPTG y X-GAL, para hacer una selección de clonas positivas o colonias blancas; así mismo, éstas se seleccionaron y crecieron en caldo LB con ampicilina para sembrarlas en otra placa para así poder contar con un stock de células positivas. Después se realizó PCR sobre las colonias ya separadas y se verificó la presencia o ausencia del fragmento con los *primers* M13 o *primers* específicos del fragmento clonado.

- **Obtención de plásmidos**

Se realizó la obtención de plásmidos a partir de los tubos con las clonas que resultaron positivas empleando la técnica de Mini preparación de DNA plasmídico, según Sambrook y Rusell (2006). Después se realizó su cuantificación con Nanodrop para verificar la cantidad mínima de 120 ng/μL, cantidad necesaria para la secuenciación automática óptima.

- **Análisis de secuencias y diseño de sondas específicas.**

Después de obtener la secuencia y los electroferogramas, se revisaron con los programas *Serial Cloner* y *Snap Gene viewer*. Así mismo, se corroboró su identidad mediante BLAST y alineamientos locales con otras secuencias de cíclidos disponibles en el NCBI para ver si los fragmentos obtenidos corresponden a los genes deseados.

- **Análisis de expresión mediante qPCR.**

El análisis de expresión de los genes marcadores de *Hemichromis sp.* mediante PCR cuantitativa se realizó en el Termociclador de BioRad CFX96 *Real-Time System*, empleando a la par el software Bio-Rad CFX Manager para la interpretación y análisis de los datos.

Expresión genética de la aromatasa cyp19a1a

La enzima citocromo P450 aromatasa, también conocida simplemente como aromatasa, es una enzima esteroideogénica que se encuentra implicada en la diferenciación sexual de los vertebrados, ya que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Piferrer y Blázquez, 2005; Guiguen et al., 2010). En tetrápodos la aromatasa es

codificada por un único gen (*cyp19*) el cual presenta diversos promotores específicos para su regulación en diversos tejidos (Simpson et al., 1994). Sin embargo, en teleósteos se han reportado dos isoformas, *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, cuya presencia se debe a un evento de duplicación cromosómica (Chiang et al., 2001; Guiguen et al., 2010), excepto en especies del orden Elopomorpha, las cuales parecen haber perdido la isoforma *cyp19a1b* durante su evolución (Jeng et al., 2005; Peñaranda et al., 2014). Ambas enzimas tienen afinidad por sustratos androgénicos, principalmente testosterona, aunque difieren poco en su secuencia y expresión. Así, una de las principales diferencias entre ambas isoformas es que el gen *cyp19a1a* se expresa generalmente en las gónadas, principalmente en el ovario (Piferrer y Guiguen, 2008; aunque véase Böhne et al., 2013), mientras que *cyp19a1b* se expresa de forma predominante en el cerebro (Chiang et al., 2001; Trant et al., 2001). La presencia de *cyp19a1b* indica que la aromatasa también se encuentra involucrada en mecanismos de neuroplasticidad y neurogénesis en teleósteos (Forlano et al., 2001; Kwon et al., 2001).

La actividad enzimática de la aromatasa es afectada principalmente por la temperatura, explicando que algunas especies tengan una influencia ambiental en el proceso de determinación y diferenciación sexual. Además, en especies hermafroditas secuenciales, se ha encontrado que la aromatasa participa en la remodelación de las gónadas durante la transición sexual (Sunobe, et al., 2005). La inhibición de esta enzima por diversas sustancias químicas como el Fadrozol también influye en el proceso de reversión sexual en algunas especies de peces (Ankley, et al., 2002). Además, se ha determinado que la presencia de la aromatasa en gónadas puede estar influenciada por el genotipo sexual (Kotula-Balak et al. 2008) y que los niveles de expresión difieren en machos y hembras desde el inicio del período de diferenciación sexual (Kitano et al. 1999), por lo cual su expresión resulta de gran utilidad para la identificación de machos YY.

Bajo esta premisa se evaluó el éxito de los experimentos de masculinización y feminización mediante el análisis de la expresión genética de la aromatasa por PCR en tiempo real como se indica a continuación.

Para la obtención de larvas se colectaron ejemplares adultos de cíclido joya directamente del sitio donde originalmente fueron introducidos, en la poza Churince (26° 50' 24.42" N; 102° 8' 2.31" O) del Área Natural Protegida de Cuatrociénegas, Coahuila. Para la colecta se utilizaron nasas (permiso de pesca de fomento PPF/DGOPA-188/14) en las que se introdujeron bombones de colores y alimento para perro como carnada. Posteriormente los organismos fueron trasladados y mantenidos en cautiverio en el laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., donde fueron realizados los bioensayos de reversión sexual.

Con el fin de inducir la reproducción para la obtención de larvas se acondicionaron acuarios de 20 galones, colocando rafias a modo vegetación y un macetero como sitio de anidación y desove. En cada acuario fueron colocados de 5 a 6 individuos adultos y se realizaron recambios de agua del 30% dos veces por semana para simular la temporada de lluvias e inducir la formación de parejas. Los individuos fueron alimentados tres veces al día a saciedad aparente con alimento vivo (lombrices de tierra, anfípodos y larvas de quironómidos y mosquitos) y/o dieta comercial (Nutripec, 32% proteína). Una vez formada una pareja, lo cual se constató por el cambio en la coloración de ambos individuos y la custodia del nido, se removió el resto de los peces y se continuó con las condiciones anteriores hasta el momento del desove (Greenberg, 1961). Debido a que la especie muestra cuidado biparental, las larvas fueron mantenidas con los progenitores hasta los 14 días después de la eclosión (DDE). Durante este periodo las larvas fueron alimentadas tres veces al día con *Paramecium* spp. desde que se observó el nado libre (3-4 DDE) y a los 12 DDE se comenzó la transición a la dieta con nauplios de *Artemia franciscana*. Al final del día 14 DDE las

larvas fueron distribuidas aleatoriamente en los acuarios destinados a los tratamientos de reversión sexual: control, feminización y masculinización; los cuales consistieron en el suministro de agentes feminizantes y masculinizantes a través de la dieta como se indica en la siguiente sección.

Los experimentos de reversión sexual consistieron en un tratamiento de feminización mediante administración de 17β -estradiol y uno de masculinización utilizando fadrozol, un inhibidor de la aromatasas (Sigma-Aldrich). Ambos reactivos fueron previamente disueltos en etanol al 70% (6.66 mg/ml) y se administraron a través de la dieta utilizando nauplios enriquecidos con la hormona correspondiente. El grupo control fue alimentado con nauplios sin enriquecer. Para el enriquecimiento de los nauplios se realizó una adaptación de protocolos establecidos previamente (Martin-Robichaud et al., 1994; Stewart et al., 2001; Vidal-López et al., 2009). Diariamente se hidrataron quistes comerciales de *Artemia franciscana* (Brine Shrimp Direct, Inc.) durante 1 hora y se decapsularon durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (cloro comercial). El cloro se desactivó con tiosulfato de sodio (anticloro comercial) y los quistes decapsulados fueron filtrados, enjuagados con agua dulce y transferidos a un recipiente cónico con aireación desde el fondo, donde se incubaron en un medio salino (30 ups) a 25 °C durante 24 horas. Después de la incubación los nauplios fueron colectados y transferidos en un recipiente limpio. Se calculó la densidad promediando el número de nauplios presentes en 10 muestras de 1 ml y se dividieron en tres medios de incubación de acuerdo a los tratamientos de reversión sexual. Para el tratamiento de feminización los nauplios se enriquecieron en un medio nutritivo (selco, modificado por Lozano-Peña, 2017) con 17β -estradiol a una concentración de 200 mg/kg de alimento. Lo anterior considerando que, para el lote de quistes utilizado, después de la eclosión había 100 nauplios por mg de peso y la incorporación de estradiol en los nauplios es de 461 ng/mg (Stewart et al., 2001) asumiendo un 100 de absorción.

Los tratamientos de reversión sexual se llevaron a cabo por triplicado en acuarios de 10 galones distribuidos de forma completamente aleatoria. Se utilizaron un total de 50 larvas por acuario, con un tiempo de exposición de 45 días a partir de los 15 DDE. Para los tratamientos de feminización y masculinización las larvas fueron alimentadas con los nauplios enriquecidos con 17β -estradiol y fadrozol, como se indicó en la sección anterior, y en el grupo control las larvas fueron alimentadas con los nauplios expuestos a etanol. La alimentación se realizó a saciedad aparente dos veces por día después de 2 y 5 horas de enriquecimiento de los nauplios. Los acuarios se mantuvieron a un volumen de 20 L, con aireación constante y se realizaron recambios del 50% dos veces por semana para mantener la calidad del agua. Se registraron los valores de temperatura tres veces por día, de pH dos veces por semana y de concentración de amoníaco, nitritos y nitratos una vez por semana utilizando un kit colorimétrico (*Freshwater master test kit*, API). Para los análisis de expresión genética se sacrificaron 12 larvas por tratamiento (cuatro por réplica) a los 15, 30, 45 y 60 DDE, para las cuales se cuantificó rápidamente el peso y la longitud total (LT; solo a los 60 DDE) e inmediatamente fueron almacenadas en RNAlater (Qiagen) a -20°C hasta la extracción de RNA. Al finalizar el tiempo de exposición a los tratamientos (60 DDE) se contaron los organismos sobrevivientes y se calculó el porcentaje de supervivencia. Posteriormente los organismos fueron alimentados a saciedad tres veces por día con una dieta comercial (*Nutripec*, 32% proteína).

Se determinó la proporción de sexos en cada tratamiento para evaluar la eficiencia de la reversión sexual y correlacionar los niveles de expresión genética. Para lo cual se sacrificaron 36 individuos a la edad de 199-235 DDE y se determinó el sexo mediante disección e inspección visual de la gónada o tinción con aceto-carmín. La técnica de tinción con aceto-carmín ha probado ser útil en la evaluación de sexos de forma rápida y eficiente, incluso al tratarse de individuos pequeños (Wassermann y Bertolla-Afonso, 2002). Para la tinción se preparó una

solución de aceto-carmín (índigo-carmín al 0.5%, ácido acético al 45%), la cual fue previamente calentada hasta ebullición por 5 min y filtrada para eliminar el exceso de colorante. Una vez removida la gónada se colocó una muestra de tejido sobre un cubreobjetos, se agregaron unas gotas de aceto-carmín y se presionó la muestra con un cubreobjetos (squash gonadal). La preparación fue analizada en un microscopio óptico a 100X y 200X para determinar el sexo de los organismos de acuerdo con las estructuras presentes (Guerrero y Shelton, 1974; Wassermann y Bertolla-Afonso, 2002).

Todas las pruebas moleculares fueron realizadas en el Laboratorio de Ciencias Genómicas de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Para cuantificar los niveles de expresión genética de la aromatasa se extrajo el RNA total de cada larva para construir el cDNA, el cual fue posteriormente amplificado mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos para este gen como se indica en las siguientes secciones.

El RNA total de cada larva fue extraído en Trizol (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante, utilizando 10 volúmenes del reactivo durante la homogenización para reducir la contaminación con DNA genómico (Heidary y Pahlevan, 2014). Brevemente, cada larva completa fue homogenizada en Trizol y centrifugada a 12,000 g (10 min, 4 °C). El sobrenadante fue incubado a temperatura ambiente durante 5 min, mezclado con cloroformo y centrifugado a 12,000 g (15 min, 4 °C). La fase superior acuosa fue recuperada e incubada toda la noche a -20 °C con isopropanol al 90%. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g (10 min, 4 °C) y el precipitado (RNA) fue lavado con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 7,500 g (5 min, 4°C) y el pellet se dejó secar durante 5-10 min en una campana de flujo laminar e inmediatamente se disolvió en agua estéril. El extracto de RNA fue cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop, ThermoScientific) utilizando 1.5 µl de la muestra y se determinó su calidad de acuerdo a su densidad óptica 260/280 (para lo cual se recomiendan valores entre 1.8 y 2). Además, se

evaluó la integridad de las subunidades 18s y 28s de RNA ribosomal por electroforesis de 1 µg de RNA total en un gel de agarosa al 1% incluyendo cloro comercial al 1% como agente desnaturalizante e inhibidor de ribonucleasas (Gayral et al., 2011; Aranda et al., 2012). Para la tinción se utilizó bromuro de etidio y los geles fueron analizados en un fotodocumentador Gel Doc XR+ utilizando el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad).

La construcción del DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit de transcripción reversa de Omniscript (Qiagen) utilizando hexámeros al azar de acuerdo con el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. El RNA total (125 ng) fue incubado a 65 °C por 5 min y a temperatura ambiente por 5 min. La transcripción reversa se realizó en un volumen de 10 µl con una mezcla de reacción de 0.125 µl de buffer RT 10X, 0.5 µl de dNTP 5 mM, 2.5 ng de hexámeros al azar, 0.125 µl de enzima RT, 0.01 µl de inhibidor de RNAsas y agua hasta completar el volumen final. La mezcla se incubó en un termociclador por 10 min a 25 °C, 60 min a 37 °C y 15 min a 70 °C, y se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20 °C hasta su amplificación en la reacción de PCR.

Para la amplificación de los fragmentos de la aromatasas *cyp19a1a* se diseñaron cebadores a partir de regiones conservadas de las secuencias disponibles para otras especies de cíclidos (*National Center for Biotechnology Information database*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el software MEGA7 para el alineamiento de las secuencias. Adicionalmente (ver resultados) se evaluó la expresión del gen *foxl2*. Como gen de referencia se utilizó el 18s ribosomal (mencionados previamente). La secuencia de cebadores, temperatura de alineamiento y el tamaño de fragmento esperado para cada gen (directo 5' CAT GAA CGA GAG AGG CAT CA 3', reverso 5' AGA TGT CCA CCA CAG TGC AG 3').

Los niveles de expresión fueron determinados mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando los valores de acumulación de fluorescencia durante la amplificación con el fluoróforo SYBRgreen

(SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Cada muestra fue analizada por duplicado en un volumen de reacción de 10 μ l (1 μ l de cDNA, 1 μ l de cebadores (5 μ M cada uno), 3 μ l de H₂O estéril y 5 μ l de SYBR Green 2X supermix). La amplificación se realizó en microplacas de 96 celdas en un termociclador CFX96 RealTime System (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: hot start de 95 °C (3 min); 40 ciclos de 95 °C (30 s), 58.8 °C (30 s), 72 °C (30 s); y extensión final a 72 °C (1 min). Se programaron las lecturas de fluorescencia al final de cada ciclo de extensión y para analizar la pureza del producto se realizó una curva de disociación con un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C en incrementos de 0.5 °C/5 s.

Solo los datos de crecimiento y supervivencia cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica. Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento en peso a los 30, 45 y 60 DDE, y longitud total a los 60 DDE. Los valores de supervivencia fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía después de ser transformados por medio de la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje. Debido a que los valores de expresión relativa no cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad, se evaluaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Conover-Iman para identificar diferencias entre los tratamientos. Para evaluar cambios en la expresión relativa de un tratamiento en dos días distintos se realizó una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (Pohlert, 2014; Göppert et al., 2016). La proporción de sexos fue evaluada mediante una prueba de χ^2 contra la proporción esperada de 1:1 (Mair et al., 2011). La significancia estadística se aceptó a $P \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R v3.3.1 (Logan, 2010).

Cariotipo

La determinación sexual es el mecanismo por el cual se define el sexo fenotípico de un organismo. En especies gonocóricas, como los cíclidos, se han reconocido dos principales mecanismos de

determinación sexual: genéticos (*Genetic Sex Determination, GSD*) y ambientales (*Environmental Sex Determination, ESD*). A diferencia de las especies con ESD, en especies con GSD el sexo es determinado al momento de la fertilización, lo cual usualmente se refleja en la presencia de cromosomas sexuales, como los XY (Wootton y Smith 2014). La forma de estos cromosomas y su comportamiento durante la meiosis puede ser utilizado para determinar el sexo heterogamético (*i.e.* machos en el caso de XY), debido a que sus cromosomas muestran un apareamiento anormal por las diferencias en su contenido genético (Carrasco *et al.* 1999).

El cariotipo es el patrón cromosómico de una especie expresada a través de la descripción del número, tamaño y forma de cada tipo de cromosoma del set completo de cromosomas, agrupados en pares homólogos y ordenados según su tamaño y forma, desde el más grande hasta el más pequeño.

Los peces se encuentran como un grupo parafilético que representa más de la mitad de las 55,000 especies de vertebrados vivientes (Helfman *et al* 2009). La descripción de nuevas especies pertenecientes al grupo de los anfibios, reptiles aves y mamíferos, no es muy frecuente, sin embargo, hasta ahora han sido reconocidas más de 33 065 especies de peces (Eschemeyer y Fong, 2014) y el registro anual indica que los registros de nuevas especies se seguirán incrementando.

Una herramienta que ha sido de gran utilidad para generar información importante para la distinción de especies en los peces es la Citogenética. No obstante, ésta técnica en ocasiones ha resultado bastante tediosa en peces, y poco informativa debido a la obtención de metafases de poca calidad en el análisis, principalmente a causa del tamaño y número de cromosomas en comparación con los mamíferos. Otro obstáculo es que a pesar de que el cariotipo es conocido para una pequeña proporción de peces, cuando se ha estudiado específicamente la presencia de cromosomas sexuales estos sólo se han

encontrado en un 50% de los casos (Devlin y Nagahama 2002; Wootton y Smith 2014).

Con la finalidad de poder corroborar y respaldar los resultados moleculares y bioquímicos de este proyecto se inició un análisis citogenético para la elaboración del cariotipo de la especie invasora.

La técnica del cariotipo se estandarizó con ejemplares de Tilapia, debido a que su tamaño es ideal para una correcta manipulación y evitar errores de identificación de órganos. Inicialmente se tomaron muestras de plasma mediante punción cardiaca utilizando una jeringa heparinizada. Sin embargo, debido a la dificultad de muestrear 0.5 ml de sangre de los ejemplares de *H. guttatus*, debido a su tamaño y por qué aun realizando la técnica con las medidas más asépticas posibles, sólo se obtenía crecimiento de bacterias y ninguna célula en metafase, se exploraron otras posibilidades utilizando diferentes órganos como hígado, riñón, gónada y branquias siguiendo las recomendaciones de Hernández y Arias (2015). Esto con la finalidad de determinar el órgano que diera como resultado mejores fases mitóticas.

Para la obtención de la muestra se sacrificaron ejemplares, sometiéndolos a una temperatura de -2°C durante 10 minutos (Fig. 6), o hasta que ya no presentaran movilidad, con el fin de facilitar su manipulación. para realizar una disección e identificar y extraer los órganos de interés.



Figura 6. Ejemplares: (machos) *Hemichromis guttatus*, con un tamaño aproximado de 1.5 a 2cm de ancho por 5cm de largo.

En el caso del cariotipo de *H. minckleyi* los ejemplares se anestesiaron previamente con Finquel MS-222 (Metanesulfonato de Tricaina) y posteriormente se abrieron los opérculos de cada pez para localizar las branquias y cortarlas con tijeras de disección previamente bañadas con alcohol 70%, teniendo extremo cuidado en no dañar al animal y permitir su supervivencia. Después de la toma de muestra, los animales fueron colocados en un acuario de 40 L al que se le agregaron algunas gotas de azul de metileno (cloruro de metiltionina) durante 15 min para desinfectar y contribuir a sanar la lesión.

Para *H. guttatus* cada órgano recolectado fue colocado en una caja de Petri que conteniendo 6mL de medio RPMI a temperatura ambiente y posteriormente se disoció el material. El tejido disociado se colocó en un tubo de centrifuga al que se agregaron 50µL de Colchicina previamente refrigerada. El tubo se agitó levemente y se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C. En seguida, la muestra fue centrifugada a 1,000 rpm durante 8 minutos, tiempo después del cual el sobrenadante fue desechado.

Posteriormente, se agregaron 6mL de solución hipotónica (KCl) a temperatura ambiente, se agitó el tubo levemente y después la muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 5 gotas de fijador frío (metanol - ácido acético 3:1). La muestra fue

resuspendida y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 6mL de fijador frío y resuspendieron y la muestra se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se agregaron 6 ml de solución fijadora fría. Nuevamente se procedió a centrifugar a 1,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

La separación de cromosomas se obtuvo por la técnica de goteo la cual consiste en tomar la muestra con una pipeta Pasteur y dejar caer de 2 a 3 gotas desde una altura de más de 1 metro de distancia del portaobjetos, exponiendo inmediatamente el portaobjetos a una temperatura ambiente hasta que las gotas se sequen (Fig. 7). Finalmente, se realizó una tinción Giemsa por 20 minutos y el portaobjetos fue sumergido en agua destilada 3 veces, repitiendo el procedimiento anterior hasta poder observar los cromosomas adecuadamente al microscopio óptico con un objetivo 40x y se seleccionaron los campos que presentaban las mejores células.



Figura 7.- Las laminillas son goteadas dejando caer la gota del botón celular con ayuda de una pipeta Pasteur, desde una altura de 1.5 metros

Técnicas de bandedo.

Continuando con el análisis y para mejorar la calidad de los cromosomas obtenidos, además de conocer las estructuras presentes en cada uno de ellos que permitieran clasificarlos, fue necesario realizar algunas pruebas

de bandeo específicas para determinar diferentes zonas en un cromosoma completo.

Técnicas como el bandeo C, localización de regiones organizadoras del nucléolo por impregnación con Nitrato de plata (Ag-NORs), y en menor escala, los bandeos G han aportado importantes resultados en la comparación de especies estrechamente emparentadas en la visualización de estadios iniciales de diferenciación de cromosomas sexuales y en la identificación de patrones de replicación de los cromosomas.

A continuación, se muestran las técnicas utilizadas:

Tabla 3.-Métodos de tinción de cromosomas

| BANDA | MÉTODO | CARACTERÍSTICAS |
|--------------|---|---|
| C | Extracción de DNA/proteínas, tinción con Giemsa | Resaltan las regiones centroméricas |
| G | Tinción con Giemsa, luego de pretratamiento del cromosoma | Patrón de bandas G oscuras (que corresponden a regiones de replicación tardía ricas en AT, mientras que las regiones claras corresponden a regiones de replicación temprana, ricas en GC) característico para cada cromosoma y cada brazo dentro de cada cromosoma. Las bandas surgen de la tinción desigual de las proteínas acompañantes del ácido desoxido ribonucleico. |
| NOR's | Tinción con plata (Ag) | Tiñen las regiones transcripcionales activas 18S y 28S |

Competencia interespecífica entre *H. guttatus* y *H. minckleyi*

Los individuos utilizados durante el experimento, tanto de la especie *H. guttatus* como *H. minckleyi* son producto del desove de los ejemplares colectados en Cuatro Ciénegas. De la especie invasora se utilizaron

individuos próximos a su madurez sexual, mientras que, de la especie nativa, se utilizaron juveniles (aproximadamente 1 año) los cuales son de tamaño similar y corresponden a la etapa en la que existe un mayor traslape de dietas y mayor interacción (Marks et al., 2011; Dugan, 2014). Con el fin de recrear las condiciones existentes en la naturaleza, en ambas especies el sexo fue indistinto.

Los ejemplares fueron distribuidos primeramente en acuarios de 5 galones y se mantuvieron aislados durante 24 horas con el fin de evitar la agresión por efecto de la residencia previa (Johnsson et al., 1999) y de familiaridad (Pinho-Neto et al., 2014). Posteriormente, fueron distribuidos en parejas en acuarios de 10 gal de acuerdo a su talla, siendo esta de 1.48-2.93 g y 4.2-5.7 cm para el cíclido joya, y 1.15-1.48 g 4.2-5.9 cm para *H. minckleyi*.

Durante el ensayo se evaluaron las interacciones intraespecíficas (nativo-nativo) e interespecíficas (nativo-exótico), en cuatro condiciones distintas de acuerdo a la presencia o ausencia de alimento y refugio:

- a) con alimento y refugio (CA/CR),
- b) con alimento y sin refugio (CA/SR),
- c) sin alimento y con refugio (SA/CR) y
- d) sin alimento y sin refugio (SA/SR).

Donde el refugio consistió en un único macetero por acuario, y como alimento se administró una dieta comercial Nutripec (32% de proteína). Para los tratamientos sin alimento se administró una dosis limitada cada tres días con el fin de que los animales sobrevivieran, mientras que al resto de los tratamientos se les suministró alimento diariamente. Esto con la intención de probar las tendencias de agresividad de los ejemplares frente a situaciones de recursos poco abundantes (Munday et al., 2001). Durante el ensayo se mantuvieron a temperatura ambiente (26°C promedio) con un fotoperiodo de 12:12.

Se registró la frecuencia de alimentación, el número de agresiones directas, la permanencia en el refugio y las persecuciones (Tabla 4) durante 15 min, distribuidos de la siguiente forma: un primer periodo de

observación de 5 minutos, administración del alimento y un segundo periodo de observación de 10 minutos.

Tabla 4.- Lista de etiquetas de comportamiento utilizadas durante las observaciones.

| COMPORTAMIENTO | DESCRIPCIÓN |
|-----------------------------------|---|
| Alimentación | el animal toma un fragmento de pellet o levanta parte del sustrato con el hocico |
| Refugio | Se colocan dentro, atrás o alrededor de la maceta. |
| Ataque directo | Nada directamente hacia su compañero, en ocasiones también mordiéndolo, pero no lo sigue cuando huye. |
| Persecución | El pez agresor mantiene una carrera detrás del pez que sale huyendo del enfrentamiento |
| Defensa de recurso | Uno de los peces agrede a su compañero cuando se acerca al alimento o al refugio. |
| Despliegue de aleta dorsal | El pez eriza la aleta dorsal, abre los opérculos y la boca. |

RESULTADOS

Recolectas

Se llevaron a cabo tres recolectas en distintas fechas del 2015.

Primera recolecta

La recolecta inicial de animales programada originalmente para diciembre del 2014 tuvo que ser pospuesta en distintas ocasiones debido a las bajas temperaturas atípicas que imperaron durante este mes y durante los primeros meses del 2015 (Fig. 8).

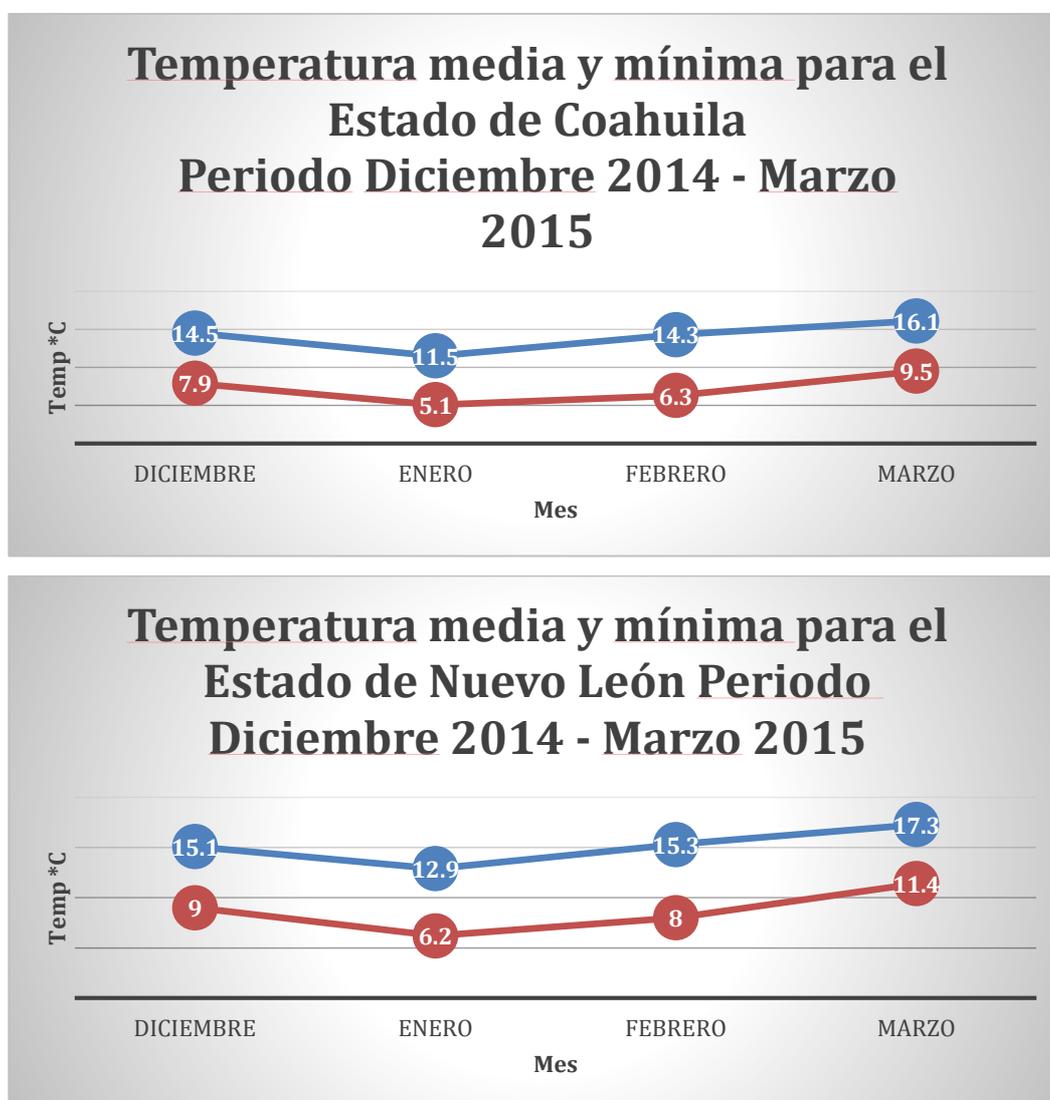


Figura 8.- Temperaturas mínimas y promedio para los estados de Coahuila y Nuevo León de diciembre de 2014 a marzo de 2015. Datos tomados de la Comisión Nacional del Agua (http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=112)

A pesar de que el Grupo Ecofisiología cuenta con dos invernaderos equipados, al ser los peces organismos poiquilotermos, las bajas temperaturas representaban sin duda una limitante para su supervivencia y en particular para su reproducción. De tal manera que nos dimos a la tarea desarrollar un sistema basado en microcontroladores ARDUINO para mantener la temperatura de grandes volúmenes de agua a niveles adecuados (Fig. 9a y 9b).

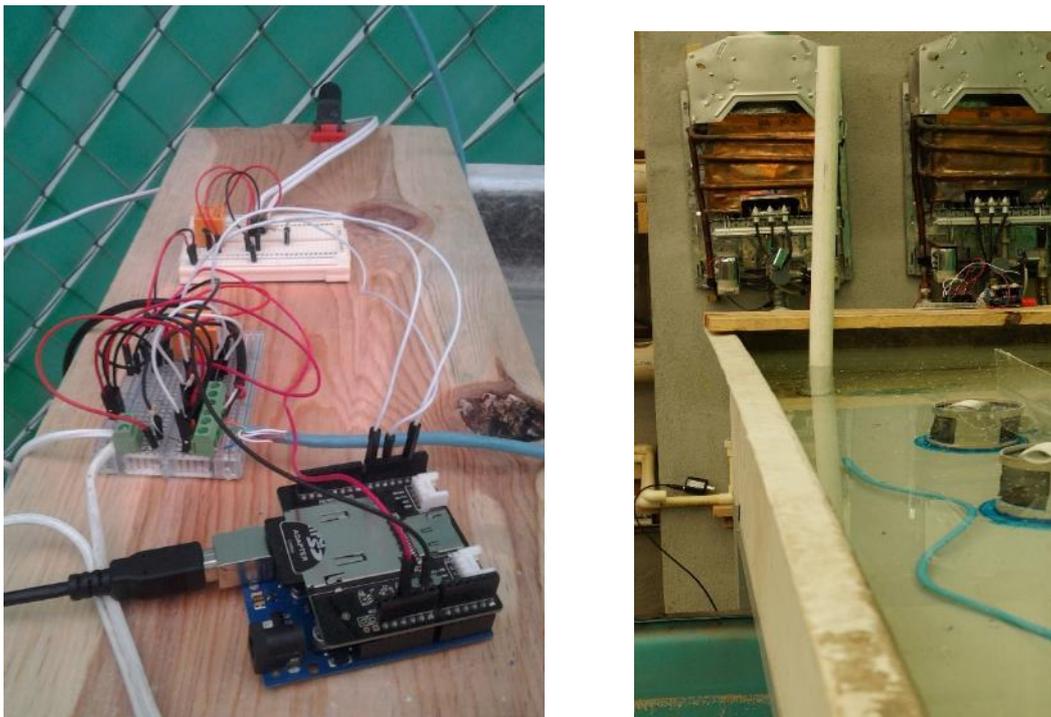


Figura 9. Microcontrolador ARDUINO diseñado para operar dos boilers destinados a mantener una temperatura estable de 29°C.

Fue hasta este momento (20 de marzo, 2015, se anexa aviso de la ANP) que se pudo realizar la primera colecta de peces. La colecta se llevó a cabo en la Poza Churince (26°50'24.42" N; 102°8'2.31" O) utilizando nasas en las que se introdujeron como carnada bombones de colores y alimento para perro (Fig. 10), que resultaron atractantes y efectivos para la captura de 50 ejemplares de cíclido joya (Fig. 11). Por otra parte, utilizando una atarraya se capturaron seis ejemplares de *H. minckleyi* (Fig. 12) en un canal aledaño a la Poza San José del Anteojo (26°58'10.62" N; 102°7'14.91" O). Los individuos de cíclido joya fueron colocados en

acuarios para que iniciara la formación de parejas, mientras que los individuos de *H. minckleyi* fueron colocados tanque de 5 m³ al cual se le colocó rafia para simular su refugio. Ambas especies fueron alimentadas con alimento comercial para tilapia.

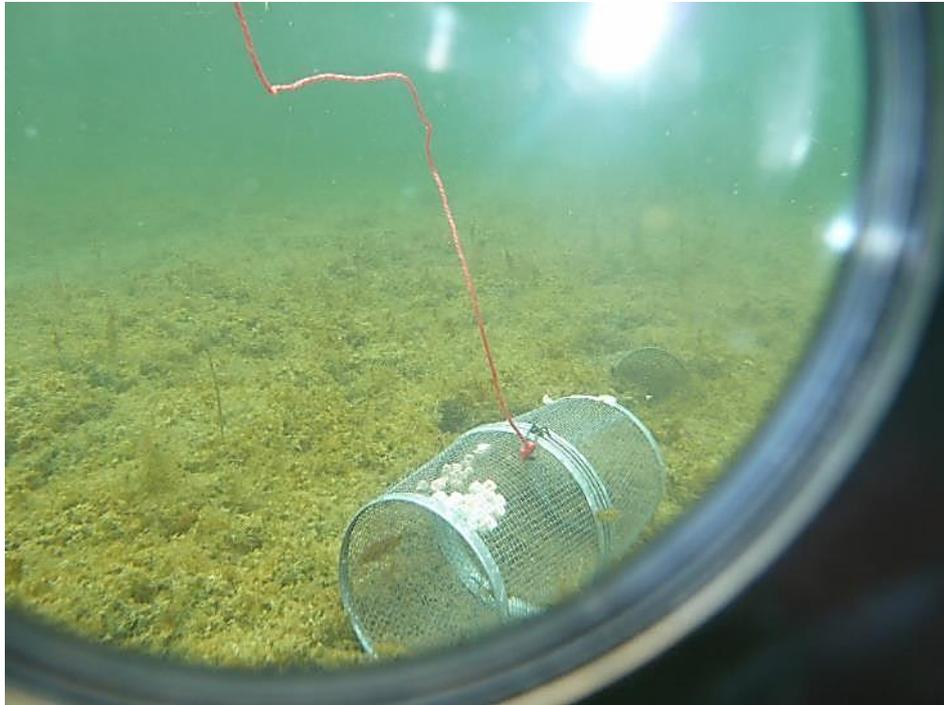


Figura 10. Nasa con carnada introducida para la captura de cíclido joya en la Poza Churince.



Figura 11. Individuo de cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) capturado en la Poza Churince



Figura 12. Ejemplares de *Herichthys minckleyi* capturados en un canal aledaño a la Poza el Anteojo

Durante el mismo periodo se construyó un dispositivo para la producción de biomasa de *Artemia salina* (Fig. 13) que fue destinada para la alimentación de las larvas de cíclido joya. Los nauplios de *Artemia* sirvieron como vehículo para introducir los estrógenos que se utilizaron para la feminización de las larvas.



Figura 13. Sistema de cultivo para la producción de biomasa de *Artemia salina*

Segunda recolecta

La segunda recolecta se llevó a cabo del 8 al 9 de junio y se recolectaron 100 ejemplares de cíclido joya de la Poza Churince para continuar con el programa de reproducción y la obtención de crías destinadas a los tratamientos de reversión sexual.

La recolecta se realizó como en la primera ocasión mediante el establecimiento de trampas (Fig. 14).



Figura 14. Establecimiento de las trampas para su posterior recolecta

Tercera Recolecta

La tercera recolecta se llevó a cabo del 6 al 7 de noviembre. En esta ocasión debido a que venció el permiso otorgado por CONAPESCA para la captura de la especie invasora y esta institución puso demasiadas trabas para renovarlo, se procedió únicamente a la recolecta de las especies nativas (*Cyprinodon bifasciatus*) (Figs. 15 y 16) en un canal aledaño a la Poza "El Anteojo". Debido a la fragilidad de la especie se evitó su transporte hasta Nuevo León y se colectó para que la pudiera reproducir el personal de PRONATURA quienes cuentan con una instalación para este propósito en Cuatrociénegas y con quienes

participamos en un proyecto común, con la finalidad de que nos proporcionaran las crías producto de la reproducción para llevar a cabo más adelante el estudio de mesocosmos en donde las crías de las especies nativas serán expuestas ante los machos YY del cíclido Joya.



Figura 15.- Aspecto de la captura de ejemplares de las especies nativas.



Figura 16.- Ejemplares de especies nativas capturados para su posterior reproducción.

Cabe mencionar que en una poza muy cercana al Poza El Anteojo se encuentra una población muy sana de *Herichthys minckleyi* (Fig. 17), en comparación de la poco abundante y deteriorada población de la Poza Churince (Fig. 18).



Figura 17.- Población de *H. minckleyi* de una poza próxima a la del Anteojo.



Figura 18.- Población de *H. minckleyi* de la poza Churince.

Estas observaciones concuerdan con un reporte publicado en fecha reciente por De la Maza-Benignos (2015) quien concluye por medio de un IBVI (*Índice Biótico Visual de Integridad*) el estado que guardan diferentes pozas del Valle de Cuatrociénegas (Tabla 5).

Tabla 5.- Cuadro comparativo de calificaciones entre los sitios estudiados, donde el menor puntaje posible es 40 (i.e. sistema colapsado) y el mayor puede ser igual o mayor de 100 (i.e. excelente), considerando los puntos extra que pueden recibir los sitios por presencia confirmada de algunas especies consideradas como raras (De la Maza-Benignos, 2015).

| SITIO | PUNTAJE | CALIFICACIÓN |
|---------------------------------------|----------------|------------------------------|
| Sistema Churince | 54 | Colapsado |
| Sistema Becerra/Garabatal | 89 | En buenas condiciones |
| Mezquites en las Palapas | 83 | En buenas condiciones |
| Anteojos | 93 | En muy buenas condiciones |
| Escobedo | 100 | En excelentes condiciones |
| Tío Cándido | 98 | En muy buenas condiciones |
| Poza doble en los Hundidos | 95 | En muy buenas condiciones |
| Los Gatos | 84 | En buenas condiciones |
| Complejo de Pozas Azules | 100 | En excelentes condiciones |
| Santa Tecla | 95 | En muy buenas condiciones |
| Teclitas | 63 | Altamente impactado |
| PROMEDIO GLOBAL | 87 | En buenas condiciones |
| PUNTAJE/CALIFICACIÓN POR ZONAS | | |
| Zona sureste | 75 | Medianamente impactado |
| Zona norte (anteojos) | 93 | En muy buenas condiciones |
| Sistema Tío Cándido-Hundidos | 94 | En muy buenas condiciones |
| Sistema Santa Tecla | 86 | En buenas condiciones |

En esta salida aprovechamos la ocasión para probar un arte de pesca diferente. Se trata de una red de bolsa con la que se optimiza la captura por unidad de esfuerzo (Fig. 19).

Vale la pena señalar que se observaron individuos de cíclido joya en etapa reproductiva de sólo 1.5 cm (Fig. 20). Lo que sin duda indica que

como consecuencia de las altas densidades se seleccionaron al enanismo.



Figura 19.- Captura de cíclido joya con red de bolsa.

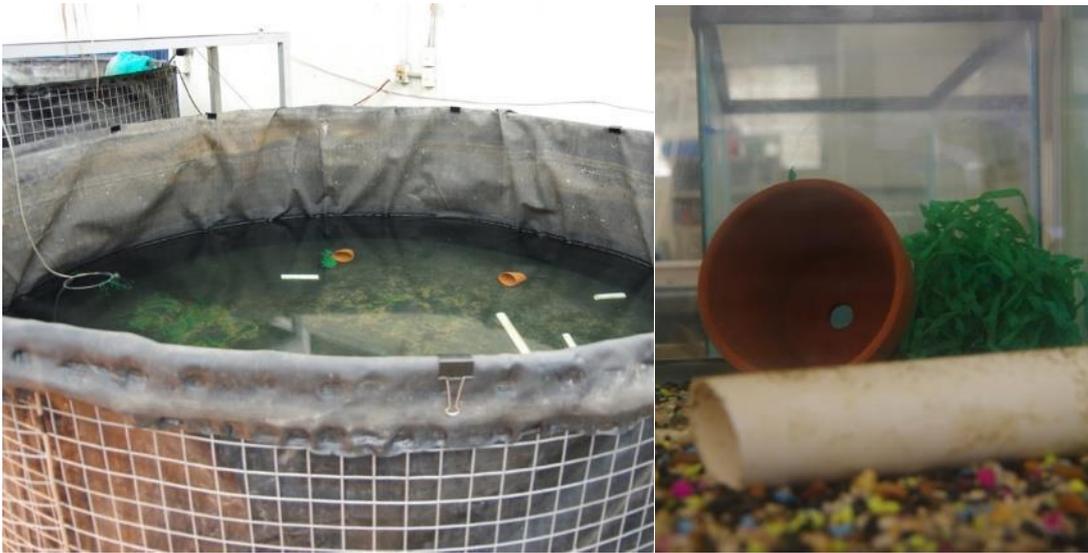


Figura 20.- Ejemplares de cíclido joya atrapados con la red de bolsa.

Formación de parejas e inducción al desove.

Para inducir la formación de parejas se colocaron los ejemplares adultos colectados en Cuatrociénegas en un tanque recubierto de liner (250 cm de circunferencia y 50 cm de columna de agua) y en acuarios de 20 y 40 galones (Figura 21). En los acuarios se colocaron de 4 a 5 adultos y realizaron recambios de agua de un 30% del volumen total de éstos, dos veces por semana, para provocar fluctuaciones en el volumen simulando la temporada de lluvias en su medio ambiente natural. Mientras que para

simular la vegetación natural y los refugios se colocaron rafias y macetas (Fig. 22).



Figuras 21.- Tanque para la formación de parejas de cíclido joya y rafia y maceta para simular las condiciones naturales de refugio y anidación.

Los reproductores (Fig. 23) fueron alimentados dos veces al día con lombrices de tierra, anfípodos, quironómidos, larvas de mosquitos y/o dieta comercial para tilapia con 32% de proteína (*Nutripec*) (Fig. 21). Una vez formadas las parejas se removía el resto de los peces y se continuaba con las condiciones anteriores hasta que se presentaba el desove.



Figura 22.- Ejemplares adultos de cíclido joya en la formación de parejas



Figura 23. Dieta comercial y lombrices para la alimentación de adultos del cíclido joya.

La primera pareja formada tuvo un desove que no fue observado hasta que las larvas (aproximadamente 300) nadaban libremente y habían absorbido casi todo el vitelo. Debido a esto las larvas no fueron utilizadas en los tratamientos de reversión, no obstante, fueron utilizadas para la cuantificación de RNA, lo cual era necesario para determinar la cantidad de larvas requeridas durante los muestreos.

La segunda pareja tuvo un desove de 501 huevos. En la Fig. 24 se puede apreciar a la hembra ventilando los huevos y el macho fuera. Debido a que la especie presenta cuidado biparental, ambos padres contribuyen en este proceso. Al siguiente día no se encontraron los huevos y en las siguientes dos semanas solo se observó una larva.



Figura 24.- Hembra ventilando los huevos recién eclosionados y macho resguardando el nido.

El tercer desove fue de 994 huevos los cuales fueron transferidos a un acuario de 10 galones con azul de metileno (Fig. 25) acondicionado a una temperatura de 25°C. En esta ocasión se observó un 93.76% eclosión y una supervivencia 92.7% a los 7 días DDE (Fig. 26).

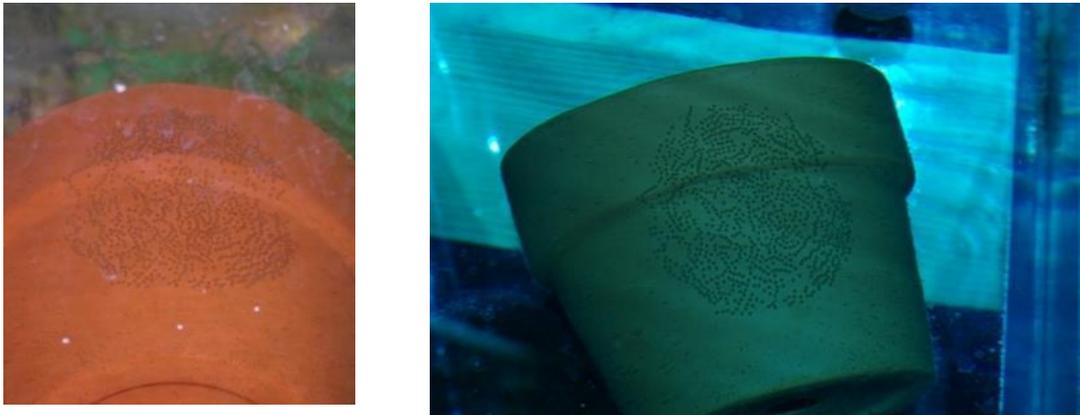


Figura 25.- Desove antes y después de transferirse a un acuario con azul de metileno



Figura 26.- Hembra con la coloración característica durante la temporada de reproducción y las larvas producto del desove.

En este momento las larvas (longitud estándar de 4 - 4.5 mm) se distribuyeron en 9 acuarios de 10 galones (90 larvas por acuario) para los tratamientos de reversión sexual y se alimentaron con paramecios desde ese momento. La temperatura en cada acuario fue regulada

independientemente con termostatos para ser mantenida a 25°C. La calidad del agua se aseguró mediante recambios de 50% cada tres días.

Identificación taxonómica

Los cíclidos son una familia avanzada, esencialmente dulceacuícola, la cual comprende más de mil especies que habitan en Sur y Centroamérica y localidades de África, sur de la India, Madagascar, Sri Lanka, Siria y las Indias Occidentales (Berra 2001). El número real de especies en esta familia no está claro debido a estimados que varían de 1300 a 3000 especies las cuales poseen gran diversidad de formas y características únicas haciendo de esta una de las familias más grandes de vertebrados. La forma del cuerpo varía de alta y comprimida a esbelta y alargada (Greenwood 1984).

El género *Hemichromis* en particular está conformado por especies de agua dulce perteneciente a la familia *Cichlidae*. Las especies de este género son nativas de África occidental y del noroeste, habitando ríos, lagos, charcas y arroyos con una gran variedad de calidades de agua, incluyendo inclusive algunas lagunas de agua salada (Loiselle, 1992).

Aunque originalmente la especie objeto de este estudio fue reportada como *Hemichromis guttatus* desde 1996 (Contreras-Balderas y Ludlow, 2003), al realizar el análisis de sus características morfológicas utilizando las claves taxonómicas de Loiselle (1992) se encontraron resultados que efectivamente confirman que se trata de esta especie. No obstante, existen individuos que presentan características de otra especie. En efecto, el análisis efectuado con 10 ejemplares colectados en Cuatrociénegas concuerda con la descripción de *H. guttatus*, pero también permitió observar la existencia de individuos con características de una especie que parecería ser más bien *H. letourneuxi*. Así se tiene:

***Hemichromis guttatus* Günther, 1862.**

Diagnosis: Es una especie exótica considera invasora para México. Los adultos presentan manchas metálicas de color azul sobre un fondo

rojo, cuerpo alargado y esbelto, lateralmente comprimido, línea lateral discontinúa y aleta caudal redondeada (Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas, 2008).

Como características específicas la especie presenta: a) Dientes un poco bulbosos, pero nunca molariformes. b) 22-24 dientes a lo largo del margen posterior del hueso inferior faríngeo (Fig. 27). C) Punto medio desigualmente dividido en dos, por la línea lateral media. D) Ambas maxilas iguales en longitud (Loisselle 1992) (Fig. 28).

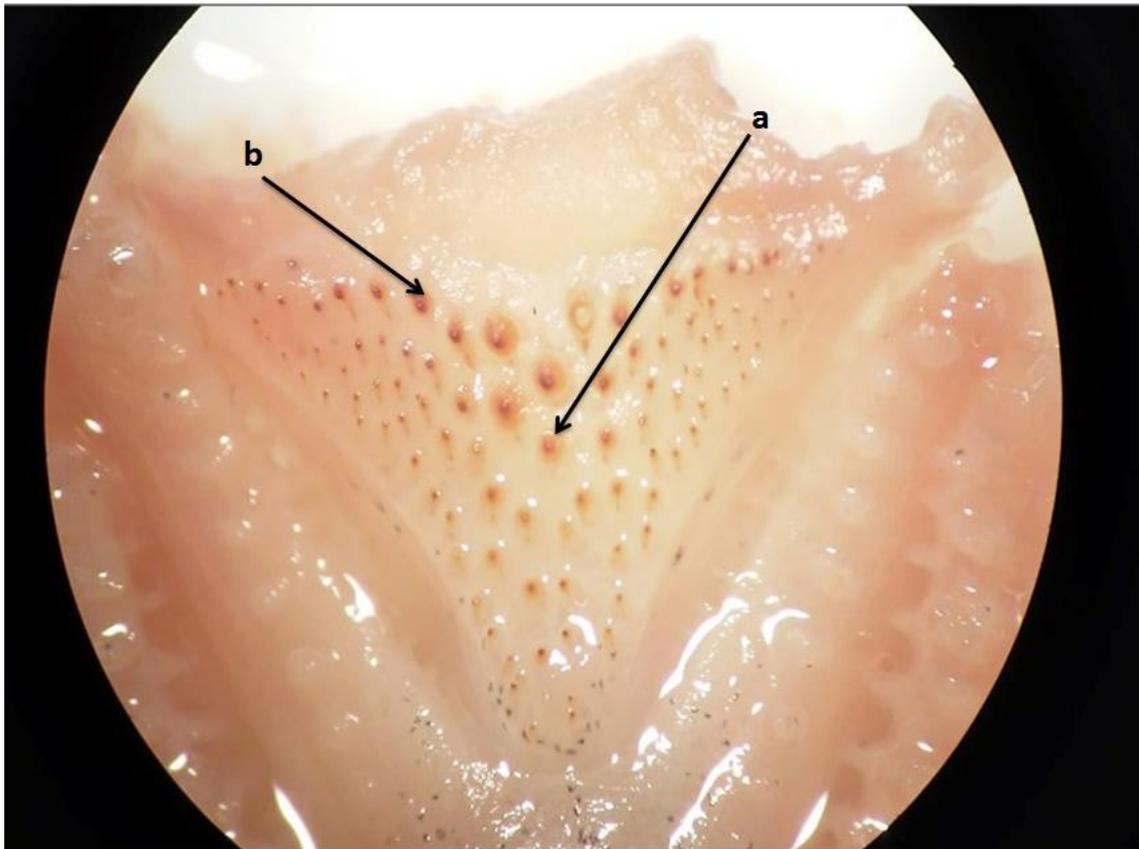


Figura 27.- Dentición del hueso inferior faríngeo de ejemplares de cíclido joya de Cuatrociénegas con características de *H. guttatus*



Figura 28.- Ejemplar de cíclido joya de Cuatrociénegas con características de *H. guttatus*

***Hemichromis letourneuxi* (Sauvage, 1880)**

Diagnosis. - Es una especie invasora para Florida, Hawaii, Puerto Rico e Islas Vírgenes. (Nico, et al. 2016). Los machos pueden llegar alcanzar tallas de 12 cm de longitud total (Loiselle 1979). Esta especie clasificada con un estatus de preocupación menor (Azeroual y Getahun, A. 2010) Como características específicas la especie presenta: a) Dientes medios molariformes a veces de forma masiva. b) 20-22 dientes a lo largo del margen posterior de hueso faríngeo (Fig. 29). c) Punto negro medio situado completamente por encima de la línea lateral media. d) Mandíbula inferior ligeramente prominente o ambas maxilas iguales en longitud (Loiselle 1992) (Fig. 30).

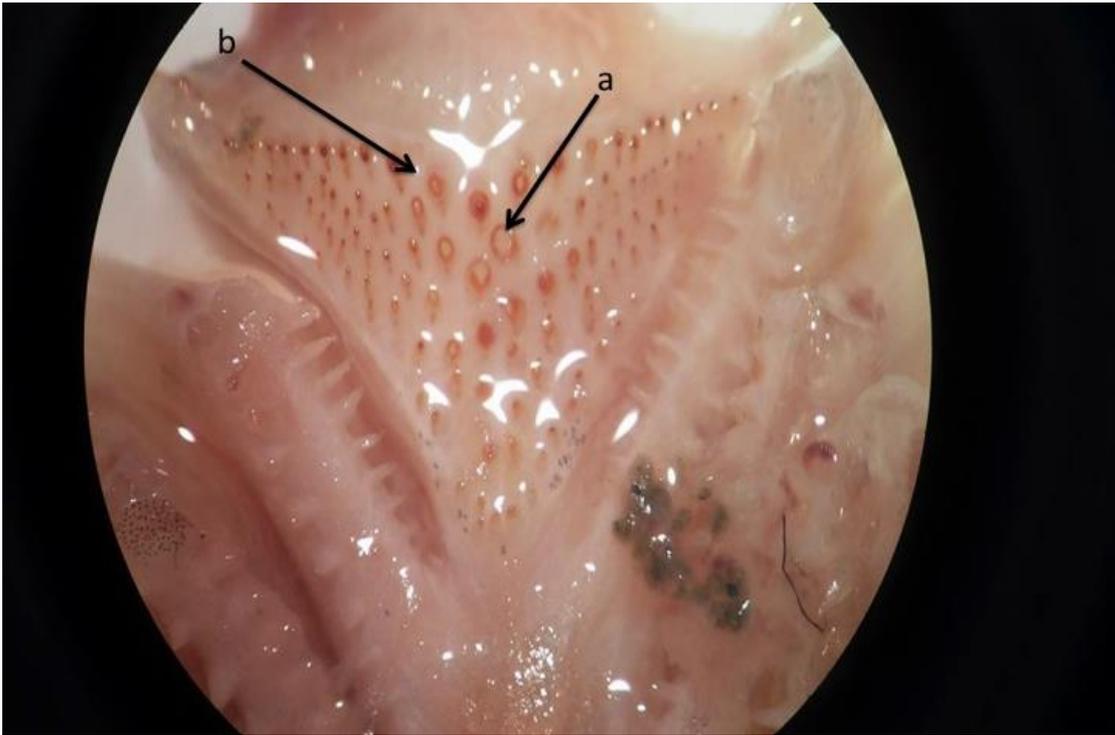


Figura 29.- Dentición del hueso inferior faríngeo ejemplares de cíclido joya de Cuatrociénegas con características de *H. guttatus*.



Figura 30.- Ejemplar de cíclido joya de Cuatrociénegas con características de *H. guttatus*.

Por otra parte, por medio del análisis molecular por Barcode se logró elaborar un árbol filogenético (Fig. 31), que pone en duda esta identidad, ya que de acuerdo con el análisis de la secuencia del gen citocromo oxidasa-I (COI) la especie se encuentra más cercana a *H. letourneuxi*. En el árbol de distancia genética se incluyó una secuencia de *H. guttatus* que se encuentra en la base de datos del GenBank, sin embargo, es muy similar a las secuencias de *H. letourneuxi*, por lo que probablemente haya sido una mala identificación, lamentablemente es la única secuencia del COI que está reportada para esta especie. Vale la pena señalar que *H. letourneuxi* es la misma especie que se encuentra en distintos sitios de Florida (Díaz-Ferguson et al. 2014; Schofield et al. 2014) y Austria (Rabitsch et al. 2013).

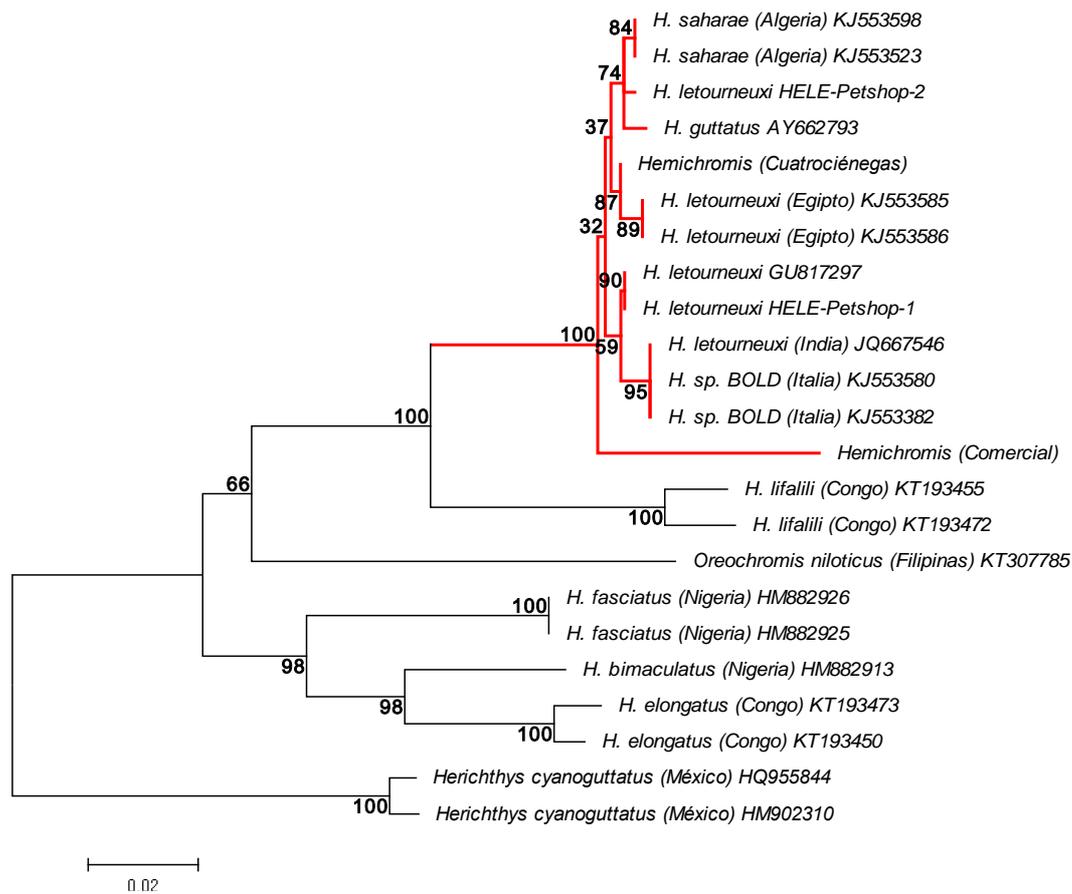


Figura 31. Árbol filogenético de distancia genética (*Neighbor-Joining*) construido a partir de 23 secuencias del gen Citocromo oxidasa I (ADNmt). Las distancias evolutivas fueron estimadas utilizando el modelo de distancia p (diferencias de base por sitio). El porcentaje de replicación de los árboles (bootstrap 1000) en que los taxa asociados se agruparon se muestran en cada nodo.

Ante esta duda se mandaron a confirmar más ejemplares de la Poza Churince mediante la técnica de Barcode y como muestran los resultados de la base de datos BOLD (en anexo), se confirma que la especie del cíclido joya que existe en la poza Churince de Cuatrociénegas es *H. letourneuxi*. Se continuará llamando a la especie *H. guttatus* a lo largo del reporte para apegarnos a la propuesta original y a sabiendas de que se trata de una especie distinta, como se especifica más adelante en la sección de discusión.

Reversión sexual

La reversión sexual del cíclido joya se realizó en larvas provenientes de la reproducción en cautiverio de los ejemplares colectados en Cuatrociénegas. Para lo cual se indujo la formación de parejas en cautiverio (Fig. 32 a y b) mediante la simulación de lluvias y refugios, además de una dieta basada en alimento vivo.

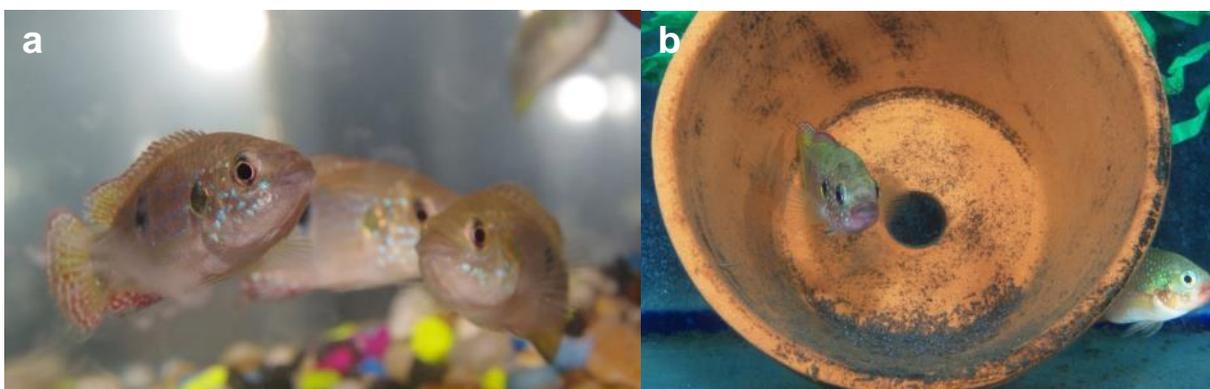


Figura 32. a) Ejemplares adultos de cíclido joya antes de la formación de parejas. b) Pareja formada: hembra ventilando los huevos del desove y macho resguardando el nido.

Tratamiento con Estradiol

Crecimiento y supervivencia

Los individuos del tratamiento con Estradiol resultaron con un peso y longitud total significativamente menores al control (Tabla 6). Por otra

parte, también se observaron diferencias entre el grupo control y el tratamiento con Estradiol en cuanto al factor de condición ya que el factor de condición en el grupo control fue de 1.80 ± 0.18 para las hembras y de 1.74 ± 0.15 para los machos, mientras que en las hembras resultantes de la reversión por tratamiento con estradiol el factor de condición fue de 1.91 ± 0.15 .

Tabla 6. Peso (mg) y longitud total (mm) de los diferentes tratamientos.

| Tratamiento | Control | Estradiol | Valor de P |
|---------------|---------------------|-------------------|------------|
| Peso (mg) | 421.46 ± 114.24 | 352.3 ± 67.21 | < 0.001 |
| Longitud (mm) | 28.36 ± 3.0 | 26.31 ± 1.67 | < 0.001 |

Se observó una supervivencia de los individuos del tratamiento con Estradiol considerablemente menor a la del grupo control (Tabla 7).¹

Tabla 7. Supervivencia de los diferentes tratamientos incluyendo la media.

| Tratamiento | Rep.1 | Rep.2 | Rep.3 | Media |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| Control | 64% | 64% | 52% | 60% |
| Estradiol | 24% | 12% | 28% | 21% |

Proporción de sexos

Todos los peces antes de ser sacrificados por hipotermia fueron anestesiados con MS222. Los ejemplares sacrificados fueron colocados con el vientre hacia arriba para realizar una incisión en la parte ventral desde la cloaca hasta el opérculo. Posteriormente, se tomaron con pinzas los dos extremos del pez para abrir la cavidad celómica y se retiró el intestino para apreciar las gónadas por encima de la vejiga natatoria (Fig. 33).

¹ No se llevó a cabo una prueba estadística en este caso, ya que los datos no eran normales (aún con transformación) y eran pocos datos para tratarlos con una prueba no paramétrica

Tratamiento con Flutamida

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia entre los individuos del tratamiento. Por otra parte, la comparación del Factor de Condición de hembras y machos de ambos tratamientos mostró igualmente la ausencia de diferencias significativas entre ellos $P=0.6812$. tampoco fueron significativamente diferentes entre ellos. Sin embargo, se observaron diferencias significativas al comparar la longitud total y el peso de los individuos de los tratamientos de Flutamida y control (Tabla 8).

Tabla 8. Peso (mg) y longitud total (mm) de los diferentes tratamientos.

| Tratamiento | Control | Flutamida | Valor de P |
|---------------|--------------------|--------------------|------------|
| Peso (mg) | 326.09 ± 80.65 | 246.95 ± 53.40 | < 0.001 |
| Longitud (mm) | 25.57 ± 2.06 | 23.56 ± 2.93 | < 0.001 |

Sexado de los animales

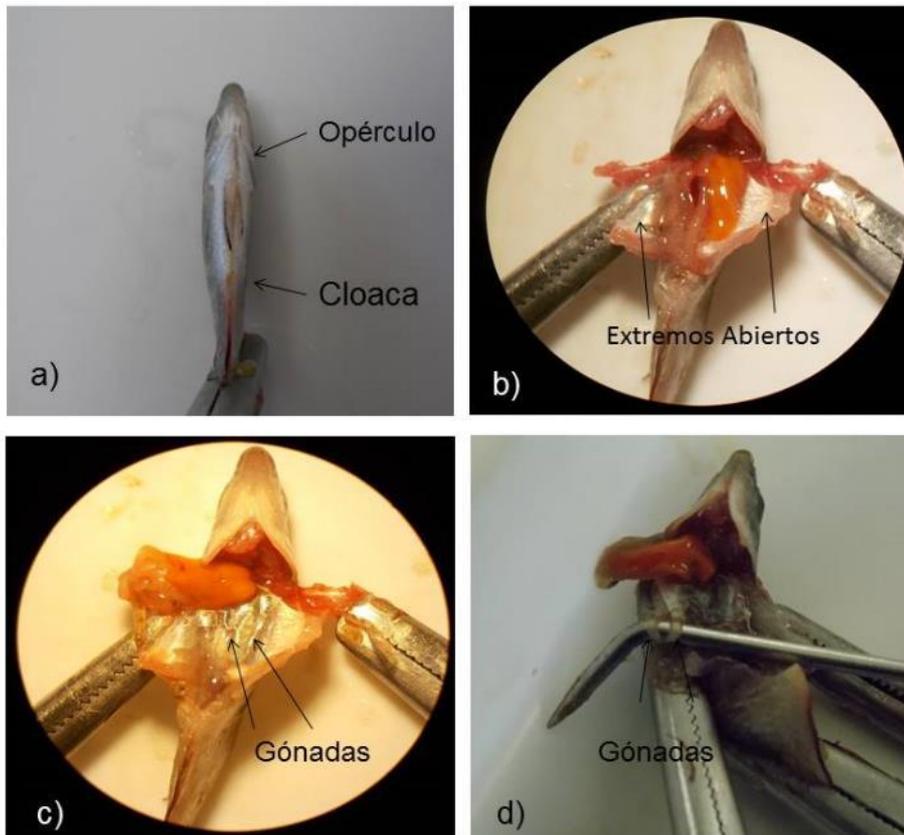


Figura 33. Distancia del corte (a) y órganos internos de *Hemichromis guttatus* (b). Gónadas de hembra dentro (c) y fuera del ejemplar (d).

Con precaución se retiraron las gónadas (Fig. 34), para no dañar la vejiga natatoria ya que si esto llegase a ocurrir se podría perder la ubicación de las gónadas (Fig. 35).

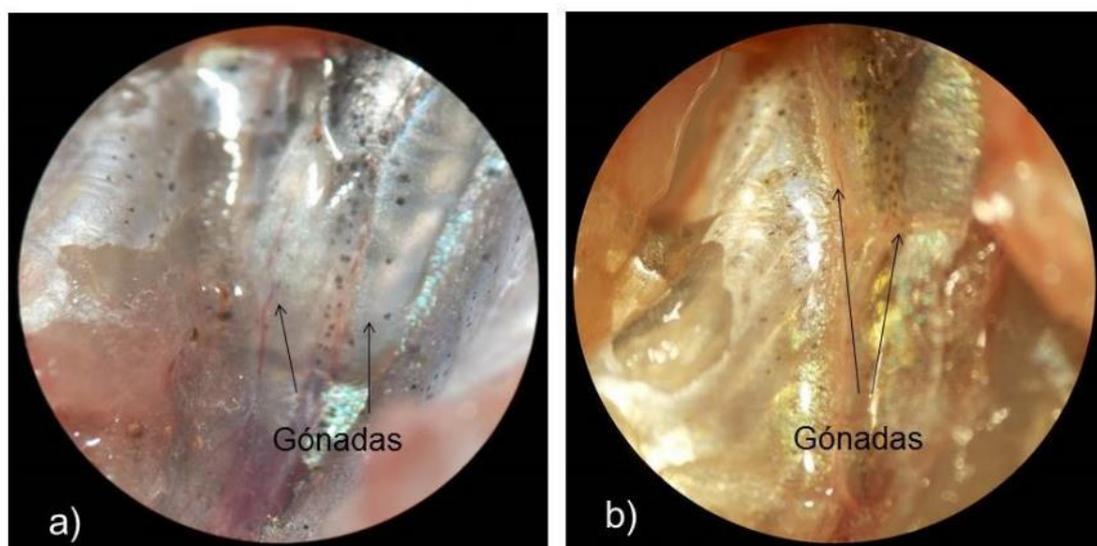


Figura 34. Gónadas de Hembra (a) y Macho (b).

Análisis por la técnica de squash de las gónadas

Una vez extraídas las gónadas se realizó la técnica de squash descrita anteriormente. Las larvas pudieron ser sexadas por este método desde el día 81 DDE hasta el día 84 DDE. La observación microscópica, de las gónadas en los dos tratamientos, reveló que machos y hembras presentaron desarrollo gonadal normal y ningún pez fue identificado como intersexo.

Esto a su vez permitió constatar la proporción sexual de acuerdo con los tratamientos como se muestra a continuación:

La proporción sexual del grupo control no fue significativamente diferente ($P=0.6732$) de la proporción teórica esperada 50/50 (Tabla 9). En contraste, el grupo tratado con Estradiol fue significativamente diferente comparado contra la proporción teórica ($P=0.0024$), así como también

resultó diferente del grupo control ($P=0.00005$), lo que implica que el tratamiento empleado logró generar de manera eficiente 100 % de hembras.

Tabla 9.- Proporción de sexos en los tratamientos con Estradiol y Control y análisis de la proporción teórica (50/50) mediante la prueba de Fisher.

| Tratamiento | Machos | Hembras | Valor de P |
|-------------|--------|---------|------------|
| Control | 25 | 20 | 0.6732 |
| Estradiol | 0 | 16 | 0.0024 |

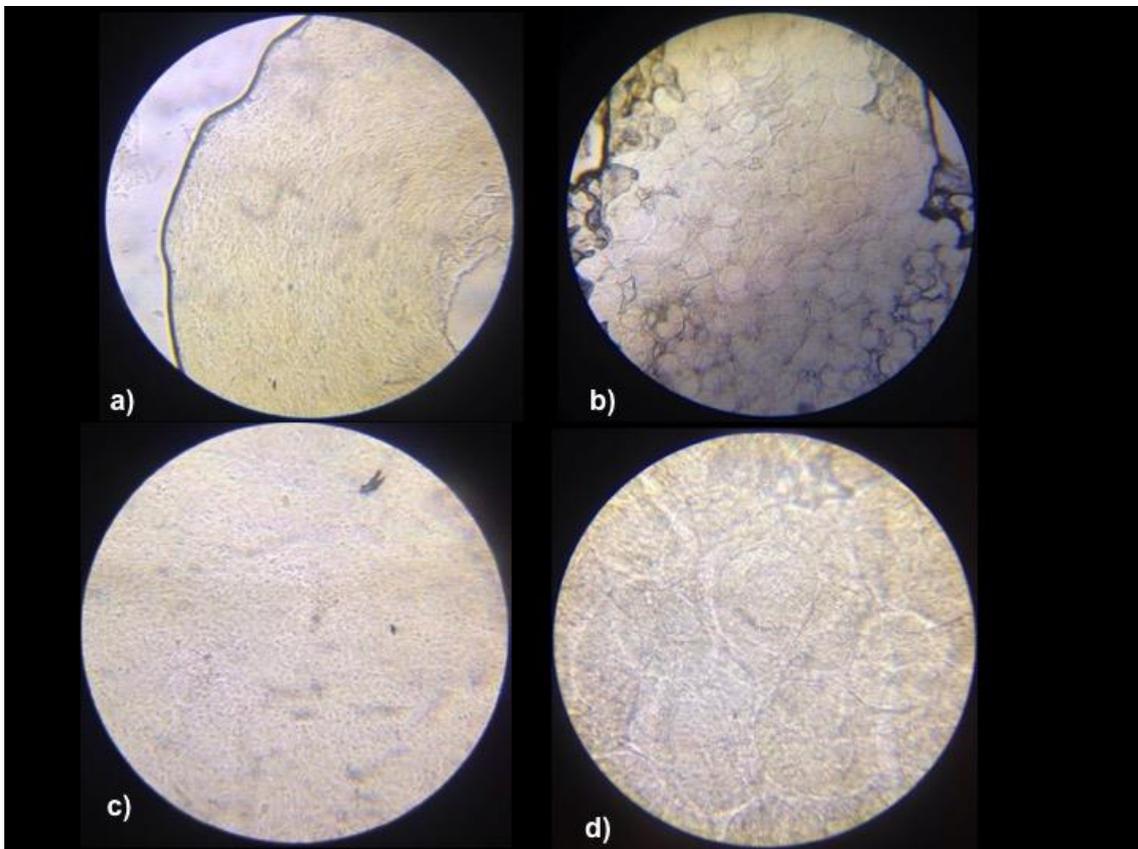


Figura 35. Sexos Fenotípicos de larvas cíclido joya usando la técnica de aceto-carmín. Gónadas de macho (a y c), y de hembra (b y d) a 100 y 200x, respectivamente.

Mientras que el análisis de la proporción sexual de los individuos del tratamiento con Flutamida y del tratamiento control reveló la ausencia de diferencias significativas al compararse con la proporción sexual teórica (50/50, $P=1$) (Tabla 10). Así mismo, al comparar la proporción sexual de los individuos del tratamiento con Flutamida con los individuos

del tratamiento control no se observaron tampoco diferencias significativas ($P= 0.2857$).

Tabla 10. Proporción de sexos en el tratamiento de flutamida y análisis de la proporción teórica (50/50) mediante la prueba exacta de Fisher.

| Tratamiento | Machos | Hembras | Valor de P |
|-------------|--------|---------|------------|
| Control | 15 | 15 | 1 |
| Flutamida | 17 | 13 | 0.3453 |

Neohembras

Gracias a la alta efectividad del método de reversión por medio de la exposición continua de las larvas al Estradiol se lograron obtener los primeros desoves de neohembras el 22 de abril del presente año y desde entonces se han obtenido 8 desoves más (Fig. 36). Esto asegura que existirá una proporción de machos YY que será comprobable en los siguientes días.

| Fechas Desoves | |
|--------------------------------|------------------------------|
| 25/05/15 | Desove Normal |
| 01/06/15 | Desove Tratado con Estradiol |
| 05/06/15 | Desove Normal |
| 03/07/15 | Desove Normal |
| 06/07/15 | Desove Normal |
| 06/07/15 | Desove Normal |
| 07/07/15 | Desove Normal |
| 07/07/15 | Desove Normal |
| 08/07/15 | Desove Normal |
| 20/04/16 | Desove Normal |
| 20/04/16 | Desove Normal |
| 22/04/16 | Desove de Neohembra |
| 23/04/16 | Desove Tratado Estradiol |
| 25/04/16 | Desove Normal |
| 25/04/16 | Desove de Neohembra |
| 26/04/16 | Desove de Neohembra |
| 26/04/16 | Desove Normal |
| 28/04/16 | Desove Normal |
| 28/04/16 | Desove de Neohembra |
| 28/04/16 | Desove Normal |
| 13/05/16 | Desove Normal |
| 09/06/16 | Desove Tratado con Flutamida |
| 03/06/16 | Desove de Neohembra |
| 30/05/16 | Desove de Neohembra |
| 09/06/16 | Desove de Neohembra |
| 21/06/16 | Desove de Neohembra |
| 13/06/16 | Desove de Neohembra |
| 02/06/16 | Desove de Neohembra |
| Promedio por desove 352 Larvas | |

Figura 36.- Línea de tiempo de los desoves obtenidos a lo largo del periodo experimental

Análisis Morfométrico

El análisis morfométrico permitió observar que la proporción sexual de la descendencia de un macho revertido (neohembra) era la esperada (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de machos y hembras a partir del desove de una Neohembra

| Sexo | Número | Porcentaje |
|---------|--------|------------|
| Hembras | 8 | 20% |
| Machos | 33 | 80% |

Ya que la proporción teórica de la progenie de una neohembra es de 75% machos y 25% hembras, por lo que estos resultados sugerirían que el cíclido joya cuenta con un sistema de determinación sexual "XY".

Por otra parte, al comparar los componentes principales encontrados se realizó un análisis Mann Whitney ya que la hipótesis de normalidad había sido rechazada previamente por una prueba de Shapiro-Wilk, esto permitió constatar la ausencia de diferencias significativas entre los componentes principales encontrados. Sin embargo, al realizar una regresión lineal de las diferentes medidas registradas se observó que la longitud de la cabeza estaba altamente correlacionada con las demás medidas registradas en machos, mientras que en el caso de las hembras esta relación no estaba bien representada ya que el valor de P fue mayor a 0.05 en todas las regresiones, contrariamente a los valores de P para los machos, los que resultaron menores a 0.05 en todos los casos (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de regresión de las estructuras morfométricas consideradas para ambos sexos.

| Machos | LC vs LT | LC vs LE | LC vs AC |
|----------------|-----------|-----------|-----------|
| P | 2.53E-09 | 4.78E-11 | 3.40E-09 |
| r ² | 0.8290363 | 0.8701954 | 0.8254368 |
| Hembras | LC vs LT | LC vs LE | LC vs AC |
| P | 0.1657 | 0.1978 | 0.1453 |
| r ² | 0.5414965 | 0.5089023 | 0.5641026 |

Reproducción de la especie endémica *Herichthys minckleyi*

Una vez adaptados los peces y para propiciar su reproducción, se incrementó el número de piezas de ladrillo, bloques de concreto y macetas. Por otra parte, además de proporcionarles una dieta basada exclusivamente en alimento vivo se les suministró trozos pequeños de filete de calamar y filete de pescado. Dentro de su mantenimiento cotidiano se estuvieron realizando cambios continuos de agua que permitían mantener diferentes niveles de profundidad.

Debido a que se trataba de juveniles en el momento en que fueron capturados, no fue sino hasta después de un año que se lograron reproducir (Fig. 37). Se obtuvieron tres desoves que fueron realizados a intervalos de 4 días c/u.

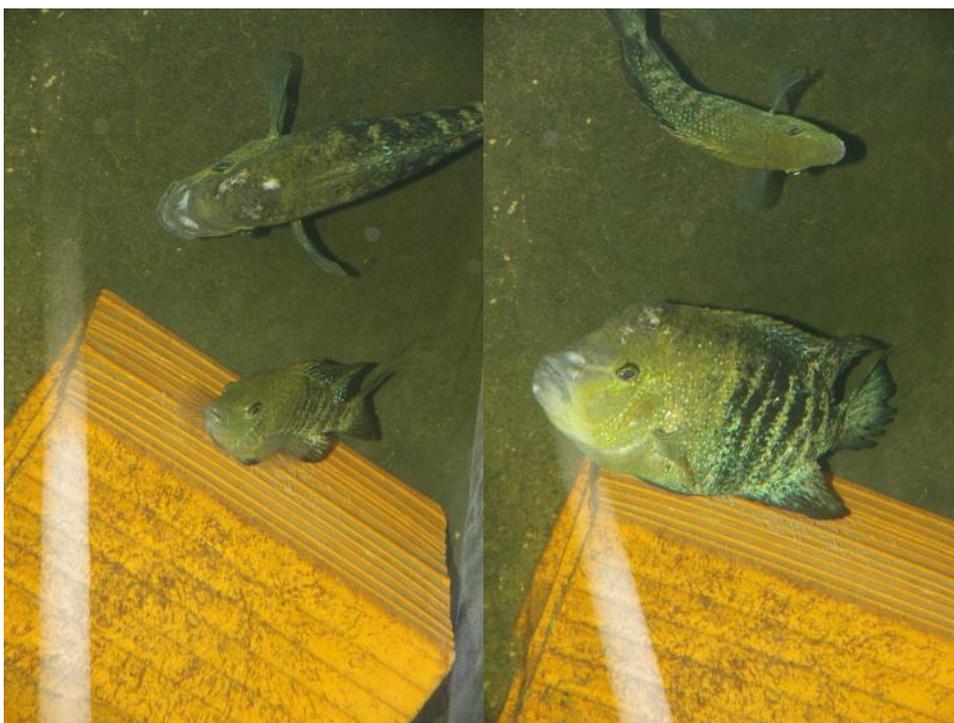


Figura 37. Hembra desovando en un ladrillo y macho fertilizando los óvulos



Figura 38. Pareja de reproductores de *H. minckleyi* desovando en el fondo del tanque.

Los desoves se presentaron tanto en las partes laterales de los ladrillos, dentro de los bloques de concreto, como en algunos lugares del fondo del tanque (Fig. 38). Tanto los bloques como los ladrillos (Fig. 39) fueron extraídos del tanque en donde se encontraban y fueron colocados en acuarios individuales en donde se llevó a cabo el desarrollo embrionario y la eclosión. En el caso de los desoves en el fondo del tanque los óvulos fertilizados fueron succionados con un sifón y los óvulos se trasladaron a acuarios individuales.



Figura 39. Bloque de concreto y ladrillo en el que se observan desoves fertilizados.

El tiempo de incubación fue de aproximadamente 4 días y los organismos recién eclosionados (Fig. 40) presentaban vitelo que se fue consumiendo en los siguientes 4 días, para dar paso a la alimentación exógena provista de *Paramecium* sp. y rotíferos obtenidos mediante cultivo.



Figura 40. Larvas de *H. minckleyi* recién eclosionadas.

Una vez alcanzada la primera semana de eclosión, los alevines fueron alimentados con nauplios de *Artemia salina*. Hasta que alcanzaron el primer mes de vida y una longitud total de 2 cm (Fig. 41). Después de este tiempo han sido alimentados con las diferentes dietas artificiales para cíclidos normalmente suministradas a los adultos.



Figura 41. Larvas de *H. minckleyi* de un mes.

En la actualidad contamos con tres lotes juveniles de la mojarra de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Fig. 42) con un número promedio de 150 ejemplares cada lote, los que se pretenden utilizar en los bioensayos de microcosmos y competencia contra el cíclido joya. Por otra parte, se tiene contemplado solicitar permiso para que los ejemplares restantes, sean liberados en el lugar de origen.

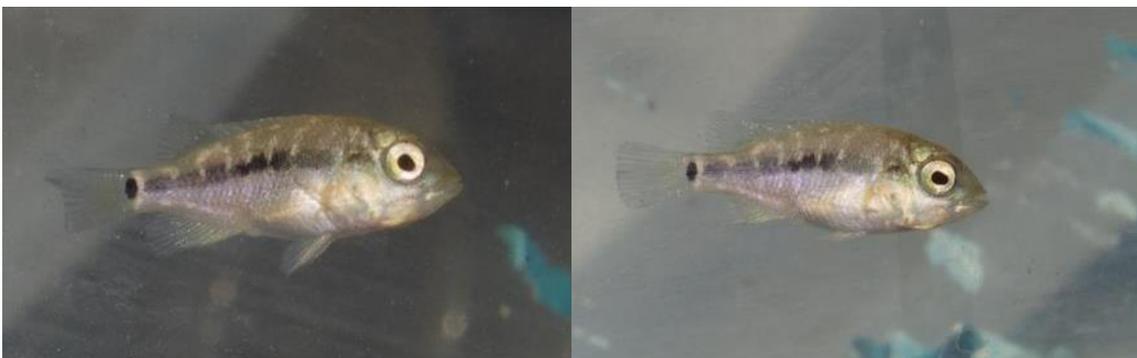


Figura 42.- Juveniles de *H. minckleyi*.

Purificación de la vitelogenina en el cíclido joya *Hemichromis guttatus* de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Cromatografía

Debido a la reducida talla de los ejemplares de la especie invasora lo que limitaba la cantidad necesaria de sangre o gónadas para realizar la separación y purificación de la vitelogenina, inicialmente se llevó a cabo la inducción gonadal de hembras adultas de tilapia (*Oreochromis sp.*) utilizando 17- β - Estradiol, esperando que tratándose de cíclidos los anticuerpos que se generaran pudieran reconocer la vitelogenina de los cíclidos joya. Para este efecto, se inyectaron cuatro hembras de tilapia de aproximadamente 500g, durante cuatro semanas, suministrándoles 0.5 mg de Estradiol en 0.5ml de Aceite de bacalao (1 mg de Estradiol por 1 kg de pez) una vez por semana. Al terminar la inducción hormonal se sacrificaron los ejemplares para extraer las gónadas y la sangre para la obtención del plasma.

La preparación del extracto de gónada se realizó homogenizando la muestra, con un buffer TRIS-HCl, conteniendo Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se guardó para su posterior utilización.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción caudal, colocándose en tubos eppendorff, los que posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C, lo que permitió la obtención del suero, el que se refrigeró. Posteriormente, siguiendo la técnica de Wiley et al., (1979) se precipitó la vitelogenina de los extractos de gónada para su posterior utilización. Esta técnica permite una separación de la vitelogenina de otras proteínas gracias a la unión de sus grupos fosfato con MgCl₂ y un agente quelante (EDTA).

Al mismo tiempo que se llevó a cabo la inducción gonadal se empacó una columna con Sephacryl S-200- HR (gel de poliacrilamida) y un buffer TRIS-HCl, NaCl, MgCl₂ pH 8. El volumen total de la columna es de 60ml ya

que por el tamaño de muestra esa columna es la recomendada. La calibración se llevó a cabo con diferentes moléculas (Fig. 43)



Figura 43.- Moléculas utilizadas para la calibración de la columna de exclusión molecular

Lamentablemente tuvimos problemas técnicos con las columnas que derivaron en fugas continuas por lo que tuvimos que abandonar esta alternativa.

Ensayo de inmunodifusión

Se realizó un ensayo de inmunodifusión utilizando anticuerpos anti-vitelogenina de catán (*Atractosteus spatula*), una especie primitiva cuya vitelogenina es similar a la de varias especies. Esta técnica se basa en la presencia de un precipitado visible como resultado de la combinación antígeno-anticuerpo, mediante el cual fue posible identificar la presencia de vitelogenina en el precipitado ovárico (Figura 44).

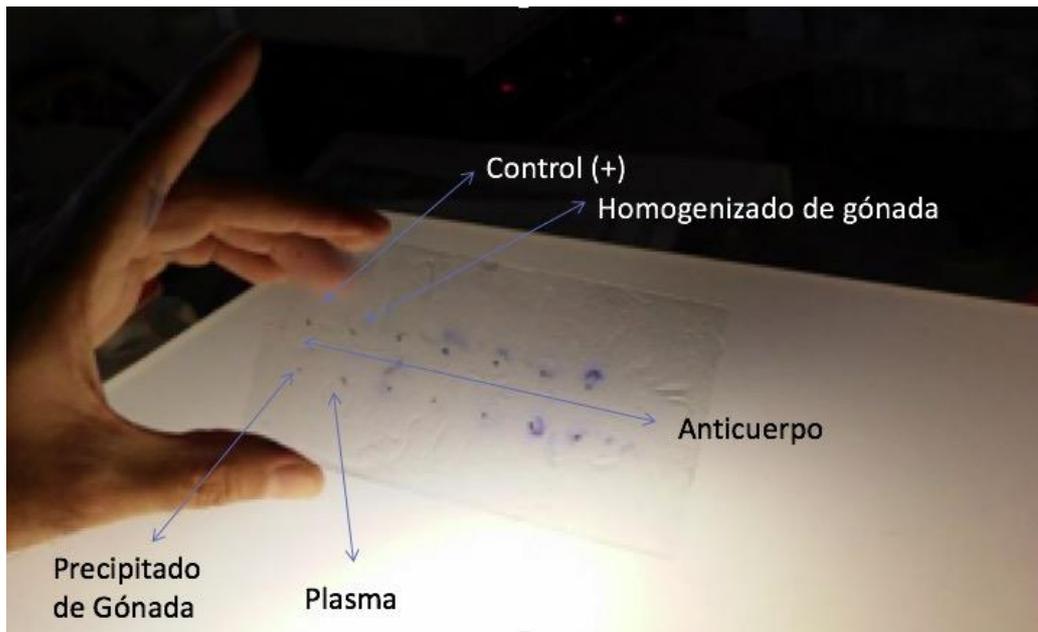


Fig. 44.- Aspecto de la placa de Inmunoprecipitación.

Desafortunadamente los anticuerpos de catán no reconocieron la vitelogenina del cíclido joya.

Electroelusión

En esta ocasión se decidió utilizar a los cíclidos joya capturados en Cuatrociénegas que fueron mantenidos en cautiverio hasta su maduración sexual y posteriormente fueron sacrificados para la extracción de las gónadas.

El extracto de gónadas fue homogenizado y se precipitó con EDTA y $MgCl_2$, como se indicó anteriormente. El precipitado fue conservado en 3 ml de buffer Tris-HCl 50mM pH 7.5 a 4 °C. Por otra parte, las muestras de sangre fueron colectadas en tubos heparinizados mediante punción caudal, se centrifugaron a 5,000 rpm, por 15 min a 4°C y el suero se almacenó a 4°C hasta su uso.

La cantidad de proteína presente en las muestras se cuantificó por el método de Bradford (1976) y se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida para posteriormente extraer la banda correspondiente a la vitelogenina por electroelusión.

Debido a su alto peso molecular (300-600 KDa) la migración de la vitelogenina en electroforesis es muy característica debido a que es retenida mientras que el resto de las proteínas de menor peso molecular avanzan fácilmente a través del gel (Fig. 45).

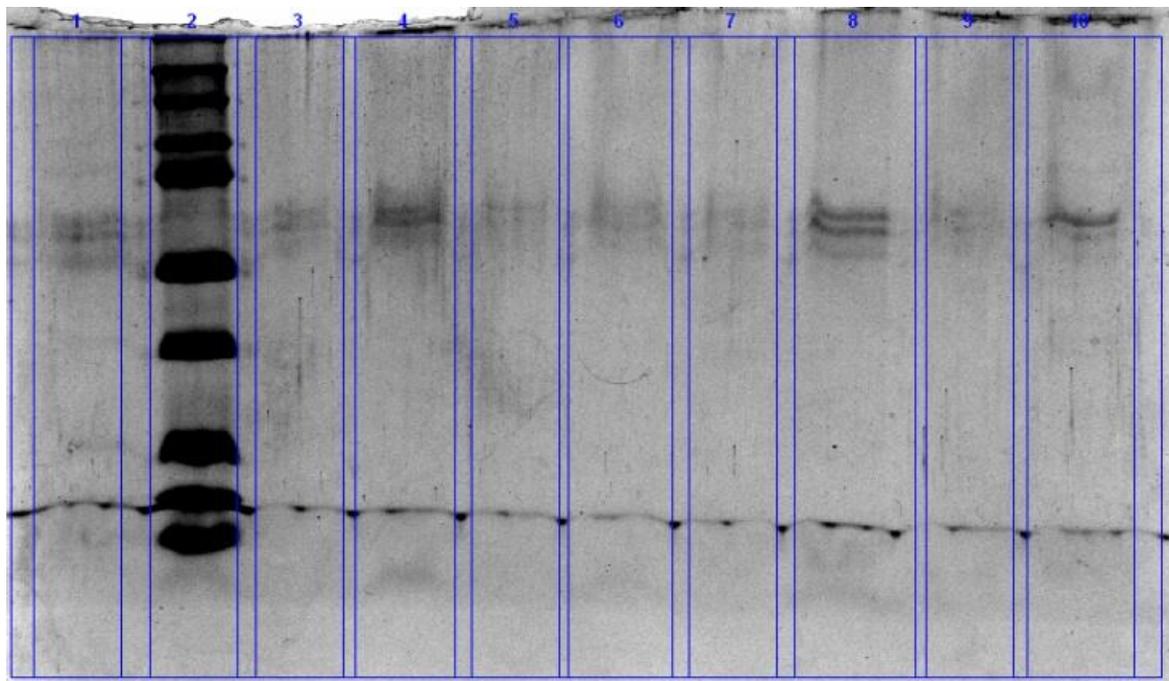


Figura 45. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los distintos pasos de la purificación de la vitelogenina: Carril (2) Marcador molecular, (4) Homogenizado, (6) plasma de Macho, (8) Plasma de hembra y (10) precipitado de gónada

Aunque existe algo de contaminación en las muestras se puede apreciar en el carril del homogenizado, en el de plasma de hembra y en el del precipitado de gónada la presencia de las bandas correspondientes a la vitelogenina.

Cuantificación de Vitelogenina mediante Fosfatos vía álcali

La vitelogenina es una proteína que contiene elevadas cantidades de grupos fosfatos, por lo que su cuantificación ha sido propuesta como un método indirecto para estimar la concentración de vitelogenina en muestras de peces, crustáceos y moluscos. Cuando se compara la concentración de fosfatos contra la concentración de vitelogenina (evaluada por diferentes métodos) en muestras de diferentes especies se han encontrado elevados coeficientes de correlación (0.73–0.99) a partir

de regresiones lineales. Adicionalmente, los métodos para cuantificar fosfatos resultan más sencillos, económicos y prácticos, cuando se comparan con las técnicas bioquímicas (e.g. electroforesis) o inmunológicas (e. g. ELISA) para cuantificar directamente la vitelogenina. De aquí que, se hayan desarrollado diferentes métodos para cuantificar indirectamente la VTG a través de la concentración de fosfatos. Considerando lo anterior, al igual que los problemas técnicos, económicos y de tiempo que se presentaron en este proyecto para desarrollar el ensayo propuesto ELISA-VTG, decidimos llevar a cabo la cuantificación de vitelogenina en diferentes tejidos de hembras y machos del cíclido joya utilizando un método recientemente modificado a través de la cuantificación de fosfatos ligados a la vitelogenina en diferentes peces, incluyendo otros cíclidos (Hallgren et al. 2009; Salomão y Marques 2014).

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre, obtenidas mediante punción caudal, fueron centrifugadas a 1,200 g durante 10 min, antes de las dos horas de ser tomadas. Las muestras de gónadas, músculo y branquias fueron homogenizadas en un Potter Elvehem con un buffer TRIS-HCl (1:4, p:v) conteniendo Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo. Posteriormente, se centrifugaron a 5,000 g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se guardó hasta su posterior utilización. Las muestras fueron almacenadas en alícuotas de 100 µl a -70°C.

Preparación de la muestra para determinación de Fosfatos

La muestra se preparó como se indica en la siguiente figura

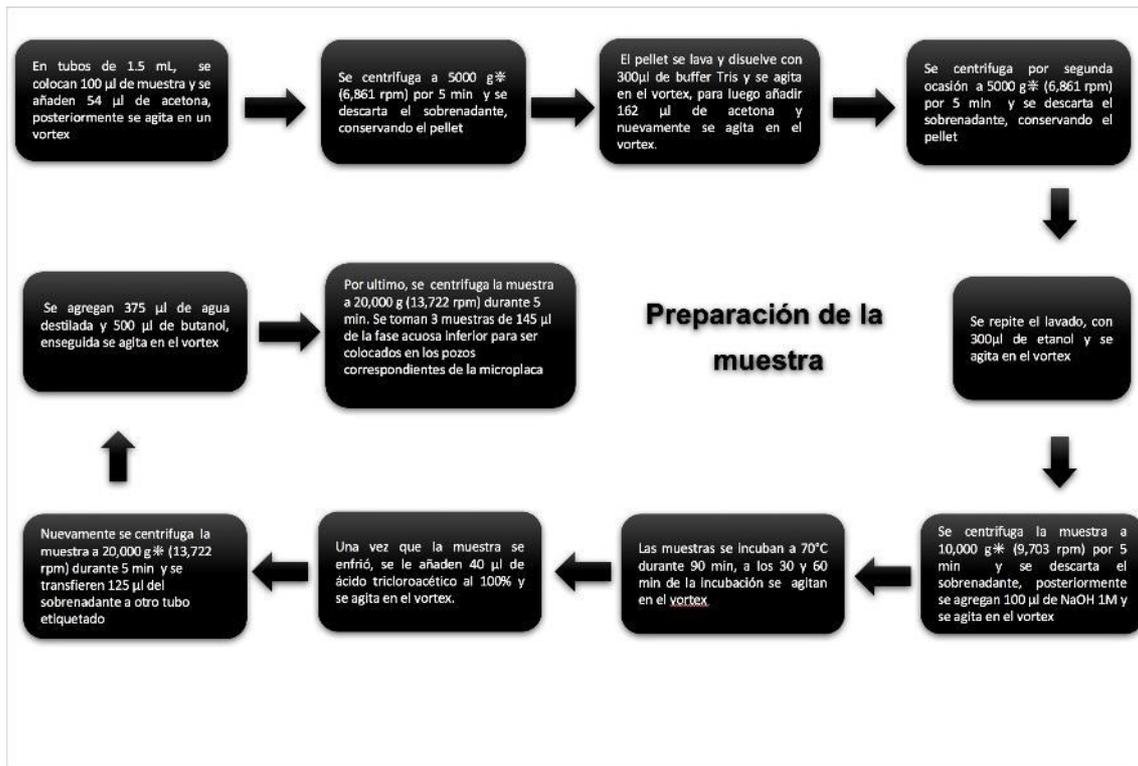


Figura 46.- Guía de preparación de la muestra para la determinación de fosfatos

Cuantificación de Fosfatos

Para la preparación de una curva estándar se elaboró un stock de 120 µg/ml PO₄³⁻ en NaOH 1M. Se tomaron 110 µl del stock y se agregaron 490 µl de agua bidestilada (22 µg/ml PO₄³⁻). Se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 11, 5.5, 2.75, 1.375 y 0.6875 µg/ml PO₄³⁻. Como blanco se agregan 55 µl de NaOH 1M y 245 µl de agua bidestilada. La regresión lineal ($Y = 3.43 \cdot 10^{-5} X + 0.29$) típica obtenida de la curva estándar, con coeficiente de correlación 0.999 se presenta en la Figura 47.

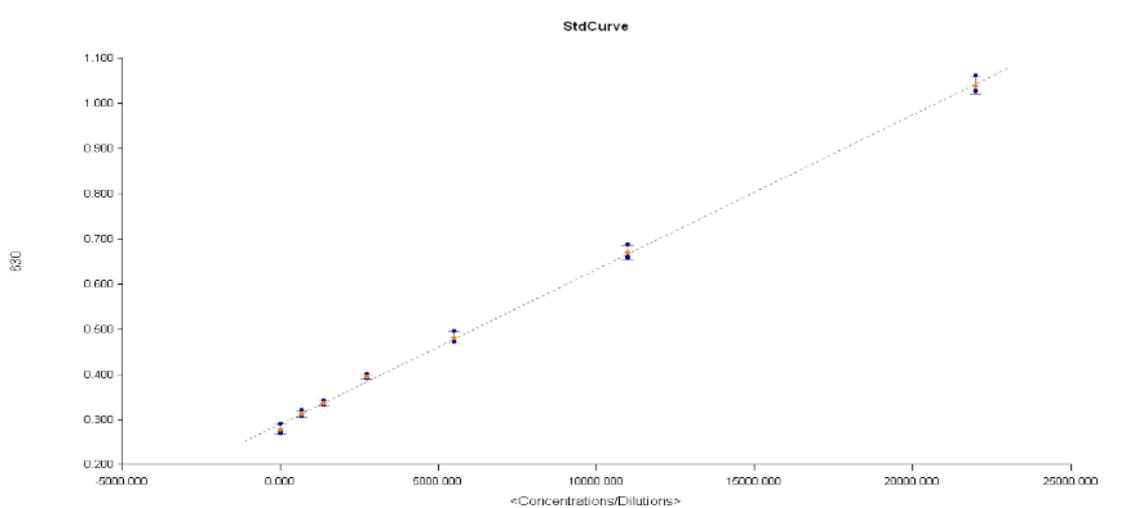


Figura 47. Curva estándar típica de fosfatos (PO_4^{3-}), con coeficiente de correlación 0.999 ($Y = 3.43 \cdot 10^{-5} X + 0.29$).

Se utilizaron microplacas de 96 pozos para medir la absorbancia, a las cuales se agregaron 145 μl de la curva estándar, o de la fase acuosa inferior de la muestra por duplicado. Se aplicaron 50 μl de solución de molibdato 1% en H_2SO_4 2M a todos los pozos. En seguida se aplicaron 50 μl de ácido ascórbico al 5% a todos los pozos. La placa se agitó durante 60 segundos y se incubó a 40°C durante 60 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas (ELx800, Biotek). Los cálculos de la curva estándar y concentración en la muestra se estimaron utilizando el software Gen5 (Biotek) integrado al lector. Las concentraciones de fosfatos y proteína soluble obtenida de diferentes tejidos de hembras y machos del cíclido joya se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de la determinación de fosfatos y su relación con la concentración de proteína en diferentes tejidos

| TEJIDO | Fosfatos ($\mu\text{g PO}_4^{3-}/\text{mL}$) | | Proteína (mg/mL) | | $\mu\text{g PO}_4^{3-}/\text{mg}$ proteína |
|----------------------|--|------------|------------------|------------|---|
| | Media | Desv. est. | Media | Desv. est. | |
| Gónada Hembra | 380.50 | 2.43 | 3.668 | 0.225 | 103.73 |
| Gónada Macho | 47.56 | 0.304 | 4.514 | 0.352 | 10.53 |

| | | | | | |
|------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Plasma Hembra | 205.81 | 90.73 | 3.808 | 0.836 | 48.40 |
| Plasma Macho | 13.00 | 0.65 | 2.248 | 0.200 | 5.77 |
| Hígado Hembra | 104.92 | 1.62 | 3.891 | 0.095 | 26.95 |
| Hígado Macho | 64.49 | 2.25 | 2.503 | 0.113 | 25.74 |
| Branquia Hembra | 116.07 | 0.58 | 4.401 | 0.451 | 26.36 |
| Branquia Macho | 21.42 | 6.63 | 2.237 | 0.878 | 8.82 |
| Musculo Hembra | 100.58 | 2.71 | 3.918 | 0.160 | 25.65 |
| Musculo Macho | 17.51 | 1.72 | 1.834 | 0.180 | 9.48 |
| Mucus Hembra | 21.35 | 0.39 | 1.060 | 0.057 | 20.13 |
| Mucus Macho | 14.50 | 0.65 | 0.226 | 0.009 | 63.98 |

Evaluación de intersexualidad de las gónadas y verificación de la reversión sexual en el cíclido joya por medio de la identificación de ácidos nucleicos

El DNA y RNA, de especímenes adultos y diferenciados sexualmente por *squashing* y fenotipo, fueron extraídos de músculo y gónadas respectivamente. Después de la visualización de la integridad de ambos ácidos nucleicos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Fig. 48), se cuantificaron usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000, para verificar que la D.O. en la relación 260/280 se mantuviera en un rango de 1.7-2.0 y un valor de 2.0 en la relación 260/230. Estas medidas se tomaron para asegurar que los ácidos nucleicos extraídos fueran un templado apropiado para los posteriores experimentos, ver tabla 13.

A)

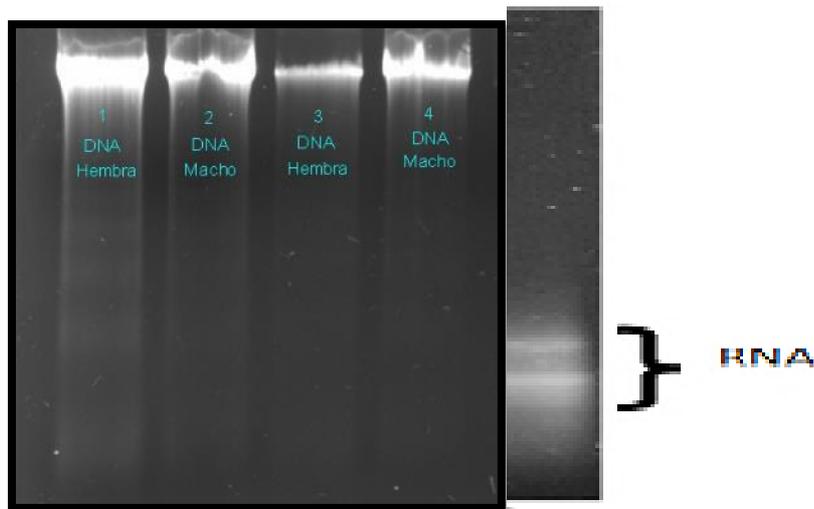


Figura 48. Gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de Etidio. **A)** Extracción de DNA. Se muestran los resultados de la extracción de DNAg por Fenol-Cloroformo de 100 mg de músculo de 4 de 6 adultos ya diferenciados debidamente por *squashing*: 2 hembras y dos machos respectivamente. **B)** Extracción de RNA. Protocolo del Trizol seguida de pasos de purificación empleando las columnas del kit RNAeasy de Qiagen. No se necesitó tratamiento con DNAsa ya que no se detectó contaminación por DNA.

Tabla 13.- Cuantificación y relación 260/280 del DNA obtenido por Fenol-Cloroformo.

| Nombre/Peso gónada | Sexo | Ng/ μ l | 260/280 |
|--------------------|--------|--------------------|---------|
| 10 mg | Macho | 547.6 ng/ μ l | 1.83 |
| 21.6 mg | Macho | 776.1 ng/ μ l | 1.88 |
| 191 mg | Hembra | 1304.7 ng/ μ l | 1.93 |
| 108 mg | Macho | 506.56 ng/ μ l | 1.83 |
| 18.3 mg | Macho | 1780.8 ng/ μ l | 1.92 |
| 16.6 mg | Hembra | 1541.3 ng/ μ l | 1.96 |

- **Identificación y amplificación de un fragmento de los genes propuestos como marcadores de machos, hembras y *housekeeping*.**

Para la especie estudiada, la secuencia de su genoma no ha sido publicada y tampoco hay reportes de secuencias genéticas parciales, sin embargo, dado que *Hemichromis guttatus* es un cíclido, se asumió que existía alta homología e identidad con otros cíclidos como *O. ventralis*, *J. Ornatus*, *E. cyanostictus* y *A. burtoni*; especies para las cuales ya se han

analizado los niveles de expresión de genes marcadores de diferenciación sexual.

Por lo tanto, tomando en cuenta los datos ya publicados, se solicitó la síntesis de los oligonucleótidos empleados en dichos estudios para poder realizar la amplificación parcial de los genes de interés usando como templado DNA genómico y posteriormente el cDNA obtenido a partir de RNA total de cada gónada analizada.

Para este paso el DNAg y RNA total fueron extraídos de músculo y gónada de un pez adulto, respectivamente.

Después de verificar la integridad por visualización de ambos materiales por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 49), se cuantificaron usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000, verificando que la D.O. en la relación 260/280 se mantuviera en un rango de 1.7-2.0 y un valor de 2.0 en la relación 260/230. Estas medidas se tomaron en cuenta para asegurar que los ácidos nucleicos extraídos eran apropiados para los posteriores experimentos.

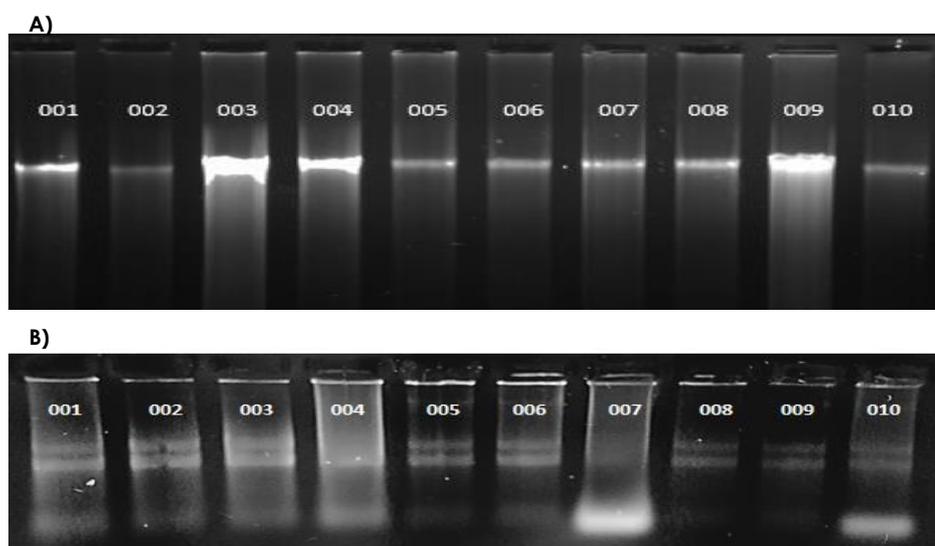


Figura 49. Extracción de ácidos nucleicos: A) Extracción de DNA genómico a partir de músculo B) Extracción de RNA total a partir de gónadas de especímenes adultos. En la Figura 5 A) se muestran las extracciones de DNA de músculo con su patrón característico de una banda. En el inciso B) se muestran las extracciones de RNA de gónadas de adultos cuyo sexo fue comprobado mediante squash gonadal.

Una vez que se verificó la calidad e integridad de los ácidos nucleicos se procedió a la amplificación por PCR y RT-PCR de los fragmentos de los genes para macho y hembra. Los oligos empleados para cada caso están indicados en la Tabla 14 (Böhne, A. *et al.*, 2013; Poonlaphdecha *et al.*, 2010). El tamaño esperado de los fragmentos amplificados para los genes: *Amh*, *Cyp11b2*, *Dmrt1*, *Wnt4b*, *Figla*, *Foxl2a*, *Ctnnb1b*, *Wnt4a*, *Dax 1*, *Cyp19a1* y *18s* fueron establecidos *in silico* hibridando los oligos vs los genomas de cíclidos secuenciados empleando la herramienta *Primer Blast*.

Tabla 14. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes marcadores de sexo (Böhne, A. et al., 2013; Poonlaphdecha et al., 2010).

| Gen | Primer Forward | Primer Reverse | Producto esperado |
|------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|
| GEN DMRT1 | 5'- CAAGTGCTCCCGCTGTAG AA-3' | 5'- AGCGCTTGTGTCCCTTCAGT -3' | 59 pb DNAG y cDNA |
| GEN AMH | 5'- AAGCAGCGCAAACATTA ACA-3' | 5'- GTCCAGTCCACAACCTCC A-3' | 169 pb DNAG y cDNA |
| GEN CYP11B2 | 5'- GCTCAACCTGCTGAAATT CTGG-3' | 5'- TTGAAGGTCCTCTCCATGTG C-3' | 72 pb DNAG y cDNA |
| GEN WNT4B | 5'- TCATGAACCTCCACAACA ACG-3' | 5'- CCAGACACACCGTGACAT TTACA-3' | 85 pb DNAG y cDNA |
| GEN FIGLA | 5'- GCCCAGCAAAGTGGAC ACA-3' | 5'- TTCTGCAAAACTGCAAGC A-3' | 70 pb DNAG y cDNA |
| GEN CTNNB1B | 5'- TTCACAACAACCTGGTCC TCA-3' | 5'- GGCGAGATGCCTCTTTCTTT G-3' | 200 pb DNAG y cDNA |
| GEN FOXL2A | 5'- CCGGATCCGTCCCAGAA -3' | 5'- CGGATAGCCATGGCAATG A-3' | 59 pb DNAG y cDNA |
| GEN WNT4A | 5'- AAGTGGTCACGCAAGGC ACC-3' | 5'- TGACCGCAAACGCCACA CT-3' | 85 pb cDNA |
| GEN DAX1 CHRX | 5'- TTTGCAGGAGGTCCGACA -3' | 5'- TCCACAACAGAGACGCC G-3' | 354 pb DNAG |
| GEN CYP19A1 | 5'- CATGAACGAGAGAGGC ATCA -'3 | 5'- AGATGTCCACCACAGTGC AG -'3. | 215 pb cDNA |
| GEN 18S RIBOSOMAL | 5'- GGACACGGAAAGGATTG ACAG -3' | 5'- GTTCGTTATCGGAATTAACC AGAC-3'. | 111 pb DNAG y cDNA |

Se demostró la eficacia de los oligos sintetizados y la presencia de los genes en el genoma de *H. guttatus* mediante PCR punto final. Se realizaron gradientes de temperatura para encontrar la temperatura óptima de amplificación en la que se obtenía un solo producto. La amplificación de los fragmentos fue confirmada al obtener los tamaños esperados según las predicciones *in silico*.

- **Genes marcadores para macho**

En lo que respecta a los genes propuestos como marcadores de machos, en todos los casos se obtuvo un producto amplificado del tamaño esperado por RT-PCR (Fig. 50). Esto permitió confirmar no solo la presencia de los genes en el genoma sino, también, que son genes que se están expresando y codificando para proteínas del desarrollo y/o diferenciación sexual. Con el gen *Wnt4b* se observó una diferencia en el tamaño del amplicón entre ambas muestras (DNA y cDNA), esto muy probablemente puede deberse a que este gen fue editado después de la transcripción para eliminar intrones. Para el caso de las variaciones en la amplificación del transcrito usando cDNA como templado, estas podrían deberse a la etapa en la que se encuentra el pez al momento de hacer la extracción de RNA total ya que podría tratarse de un gen que se expresa en un momento determinado de su desarrollo, sin embargo, aún queda por elucidar la causa real.

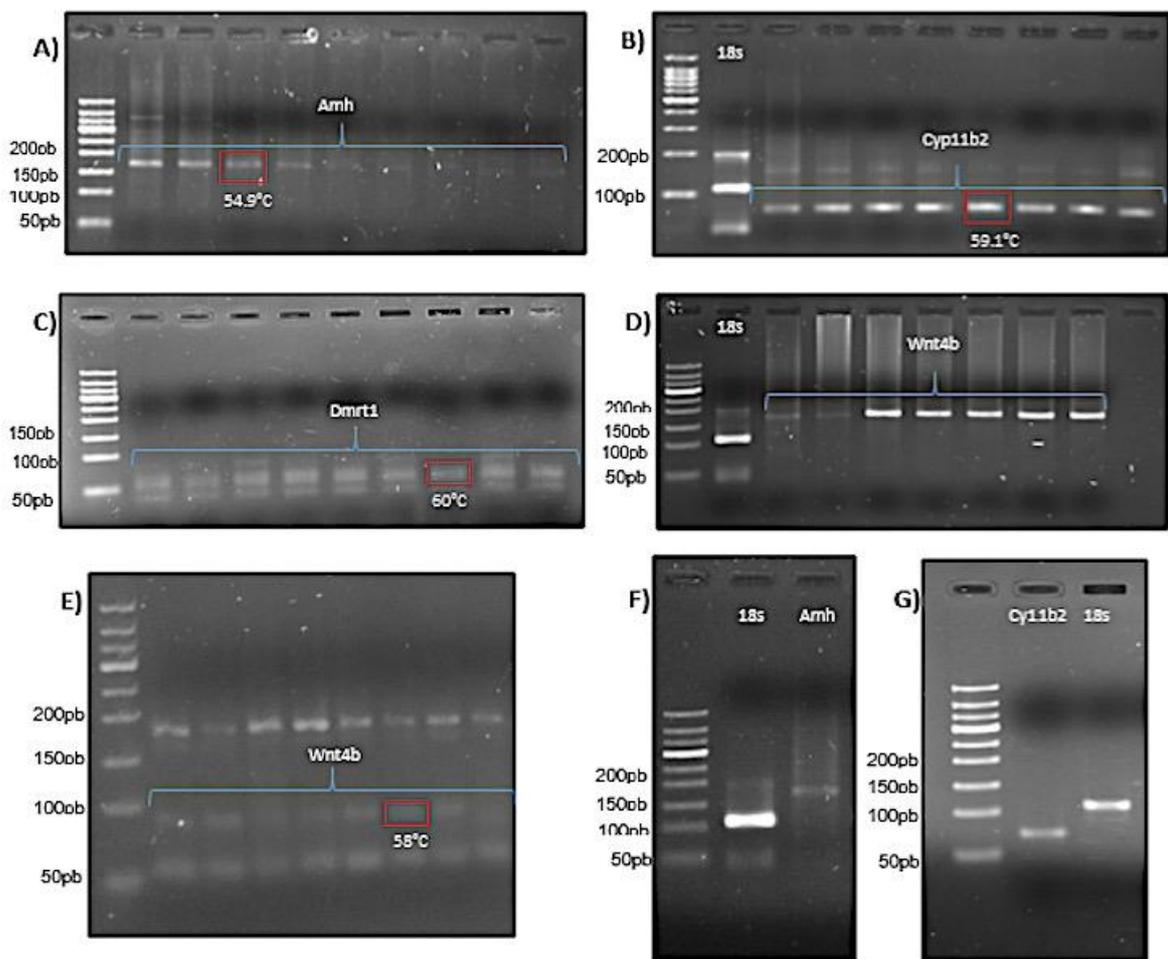


Figura 50. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los resultados: Genes marcadores para macho. **A)** Fragmentos de *Amh* amplificados en DNA: tamaño en pares de bases concuerda con el esperado(169bp). **B)** Fragmentos de *Cyp11b2*: el tamaño en pares de bases corresponde al esperado (72bp). **C)** Fragmentos de *Dmrt1* amplificados: el tamaño corresponde al esperado(59pb). **D)** Fragmentos de *Wnt4b* amplificados en DNA: el tamaño obtenido no corresponde al esperado, sin embargo, en cDNA su presencia y tamaño fue confirmada al obtener el tamaño de 85pb(**E**) por lo que podemos asumir que hay intrones en el producto de DNA.

Obtenidos los productos de la RT-PCR de los genes *Amh* y *Cyp11b2*, se procedió a la purificación de los mismos para su posterior clonación y secuenciación (Figura 51).

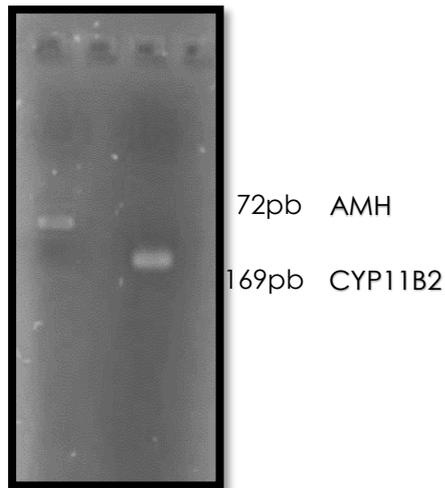


Figura 51. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de Etidio, donde se muestran los amplicones purificados para clonación de los productos de RT-PCR de los genes *Amh* y *Cyp11b2*.

Con los fragmentos anteriormente purificados fue posible la clonación de los mismos en un vector comercial. La eficiencia de la ligación y su clonación en la cepa de *E. coli DH5a* fue confirmada por ensayos de PCR sobre colonias transformadas. Las reacciones fueron analizadas en geles de agarosa al 2% tomando en cuenta el tamaño esperado de los fragmentos amplificados con los oligos del vector (Figura 52). Esto fue realizado para asegurar que la construcción contuviera el fragmento deseado.

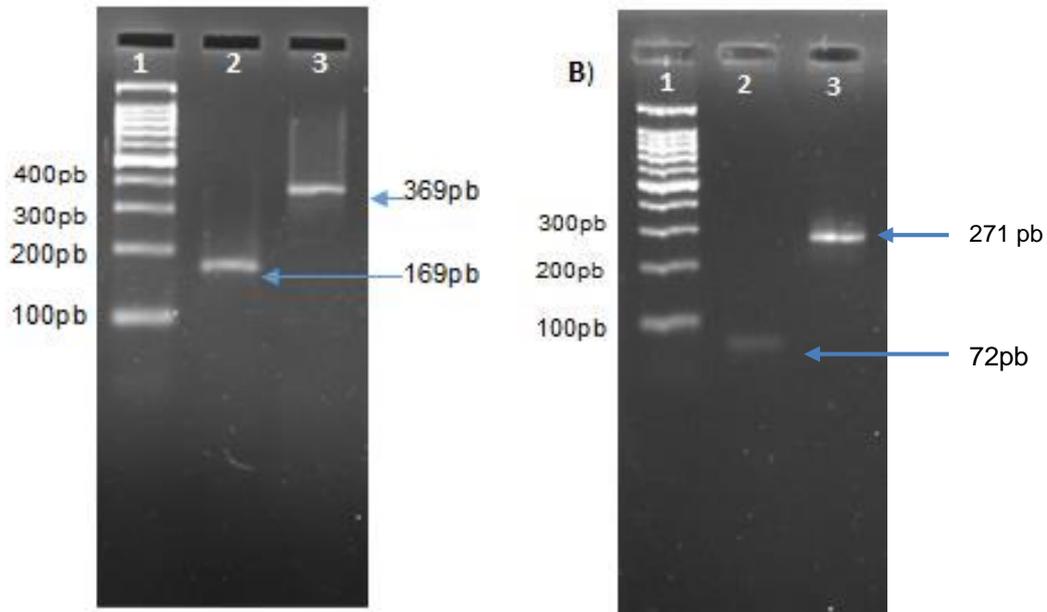


Figura 52. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los productos de PCR de colonia de los fragmentos clonados: **A)** Clonación del fragmento del gen *Amh*. En el carril 2 se visualiza una aproximación del tamaño esperado para el fragmento (169pb) de la PCR de colonia con los oligos para *Amh*. En el carril 3 el producto de la amplificación con los oligos de M13, concordando con el tamaño esperado de 368pb. **B)** Clonación del fragmento *Cyp11b2*. En el carril 2 se visualiza una aproximación del tamaño esperado para el fragmento (169pb) de la PCR de colonia con los oligos para *Cyp11b2*. En el carril 3 el producto de la amplificación con los oligos de M13, concordando con el tamaño esperado de 271pb.

Para la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* se siguió el protocolo estándar de *miniprep* y, como se observa en la Figura 53 estos fueron obtenidos en sus diferentes estados conformacionales con una alta pureza.

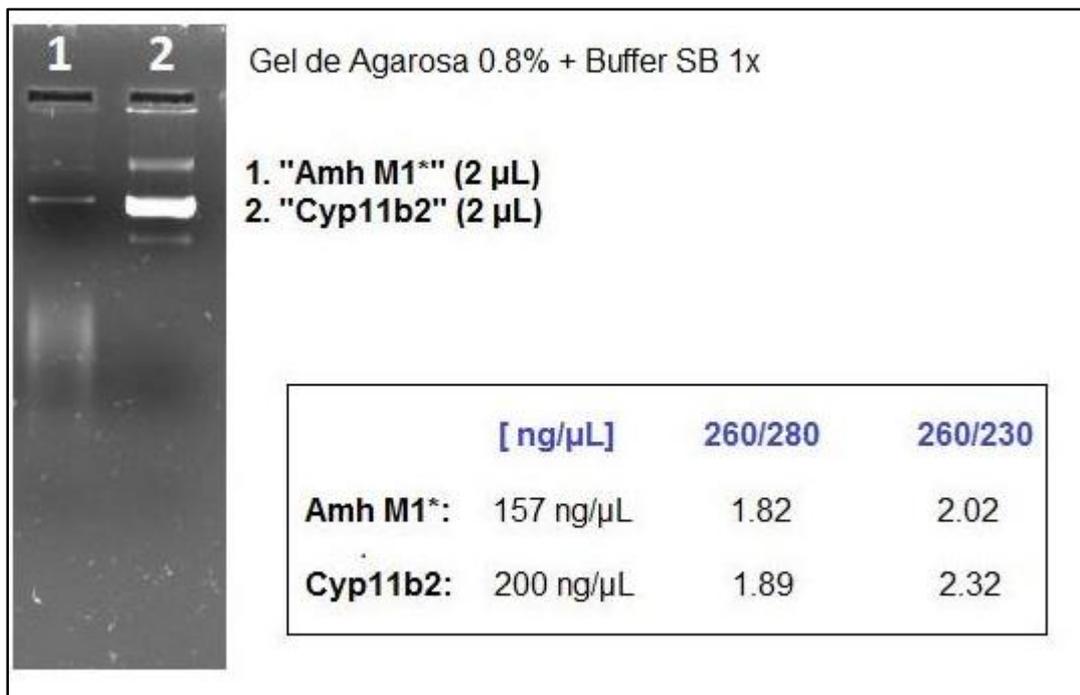


Figura 53. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio. Se observan los plásmidos obtenidos de la Miniprep de los cultivos de *E. coli Dh5a* transformados con los fragmentos *Amh* y *Cyp11b2*. En el carril 1 se muestra el DNA plasmídico con el fragmento de *Amh* y en el carril 2 con *Cyp11b2*. Se describen además los valores obtenidos en la cuantificación de las muestras por Nanodrop 2000.

Para conocer la secuencia de los RNAm de los genes *Amh* y *Cyp11b2*, los plásmidos anteriormente obtenidos se enviaron a un servicio de secuenciación automática externo. Un alineamiento múltiple *in silico* de la secuencia de *Amh* obtenida en este estudio demuestra que, en efecto, la identidad de la secuencia corresponde al fragmento de 169pb obtenido en estos ensayos. El 100% de la secuencia corregida es similar a las secuencias reportadas de *Amh* para otros cíclidos, respaldada por un 91% de identidad con todas ellas (Figura 54 E). Por lo que, estos resultados, confirman la presencia, expresión y efectiva amplificación del fragmento deseado a partir del genoma de *H. guttatus*.

Las secuencias obtenidas y verificadas serán reportados en el GenBank en cuanto tengamos lista la publicación correspondiente a este proceso. El mismo proceso de análisis se llevó a cabo para el fragmento amplificado y clonado de *Cyp11b2*. El tamaño del fragmento secuenciado corresponde al tamaño exacto esperado de 72pb y al

realizar los alineamientos en BLAST, se obtuvo un porcentaje de identidad del 100% con secuencias de otros cíclidos, sin embargo, la identidad de la misma indica que se trata del gen que codifica a *Cyp11b1* y no para *Cyp11b2*, como se planteó en un inicio (Figura 54 F); lo anterior quizás es debido a la poca información disponible de las secuencias de cíclidos. A pesar de este resultado, varios autores soportan la hipótesis de que *Cyp11b1* es, efectivamente, un marcador de la diferenciación sexual de machos; lo cual es apoyado con publicaciones adicionales en las que se plantea su importancia en la diferenciación sexual para machos (Blasco et al., 2010). Por lo tanto, los niveles de expresión de *Cyp11b1* se estarán empleando como un posible marcador de diferenciación sexual.

Con los resultados anteriormente descritos podemos asegurar que contamos con las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de los genes *Amh* y *Cyp11b1* del genoma de *H. guttatus*, lo cual nos permite ser de los primeros en contribuir a sentar las bases del material genético de la especie; ya que de momento su genoma no ha sido secuenciado y además ninguna secuencia genética parcial o total ha sido reportada. Para iniciar el análisis de expresión de los genes seleccionados se comenzarán a estudiar ejemplares adultos claramente diferenciados sexualmente, ya que el tejido de análisis son las gónadas. Una vez corroborada la expresión diferencial entre hembras y machos, se procederán a analizar ejemplares YY y diferentes etapas de desarrollo, con y sin tratamiento hormonal.



Figura 54. Análisis de datos obtenidos mediante SnapGene, Viewer y BLAST. **A)** Fragmento del electroferograma de *Amh*. **B)** Fragmento del electroferograma de *Cyp11b1*. **C)** Análisis de complementariedad de las secuencias de *Amh*. **D)** Análisis de complementariedad de las secuencias de *Cyp11b1*. **E)** Validación de la identidad del fragmento del gen *Amh* de *Hemichromis guttatus*. **F)** Validación de la identidad del fragmento del gen *Cyp11b1* de *Hemichromis guttatus*

Clonación de los fragmentos de los genes *Dmrt1* y *Wnt4b*

Previo a la clonación fue necesario purificar los fragmentos a partir de geles de agarosa para asegurar que el producto a insertar fuera el de interés. En la Fig. 55. se muestra la purificación exitosa del fragmento del gen *Dmrt1* y el fragmento del gen *Wnt4b*.

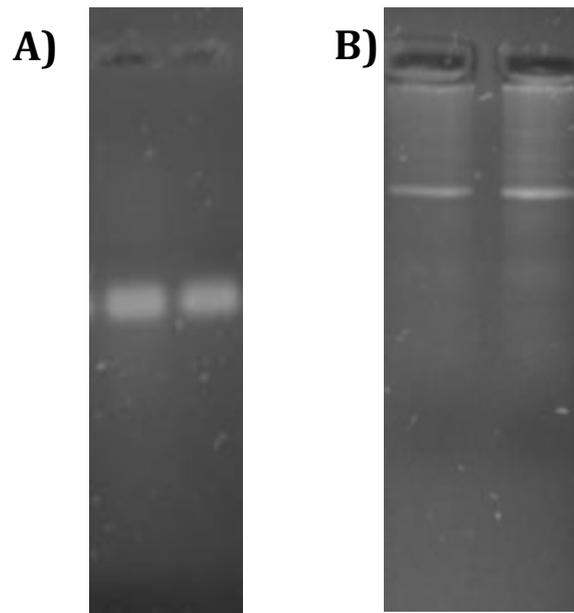


Figura 55.- Purificación de los fragmentos. A) Fragmento purificado del gen *Dmrt1* de 59 pb. B) Fragmento purificado del gen *Wnt4b* de 178 pb.

Una vez que se verificó en un minigel de agarosa la purificación, se procedió a la ligación de estos productos únicos a el vector de clonación pCR2.1 del Kit TA Cloning de Invitrogen. A la par se prepararon células *E. coli DH5alpha* calcio competentes que se transformaron con la Ligación anterior. El reactivo X-gal, ayudó a discernir entre las colonias transformadas con la ligación (blancas) y las no transformadas (azules) (Fig.56.).

De las colonias blancas transformadas se realizó una PCR de colonia, utilizando los oligos del vector y los oligos del gen en reacciones de diferentes. Esto para confirmar mediante el tamaño del amplificado en gel de electroforesis que la colonia transformada contiene el fragmento de interés y que además este se ha insertado solo una vez en el vector.

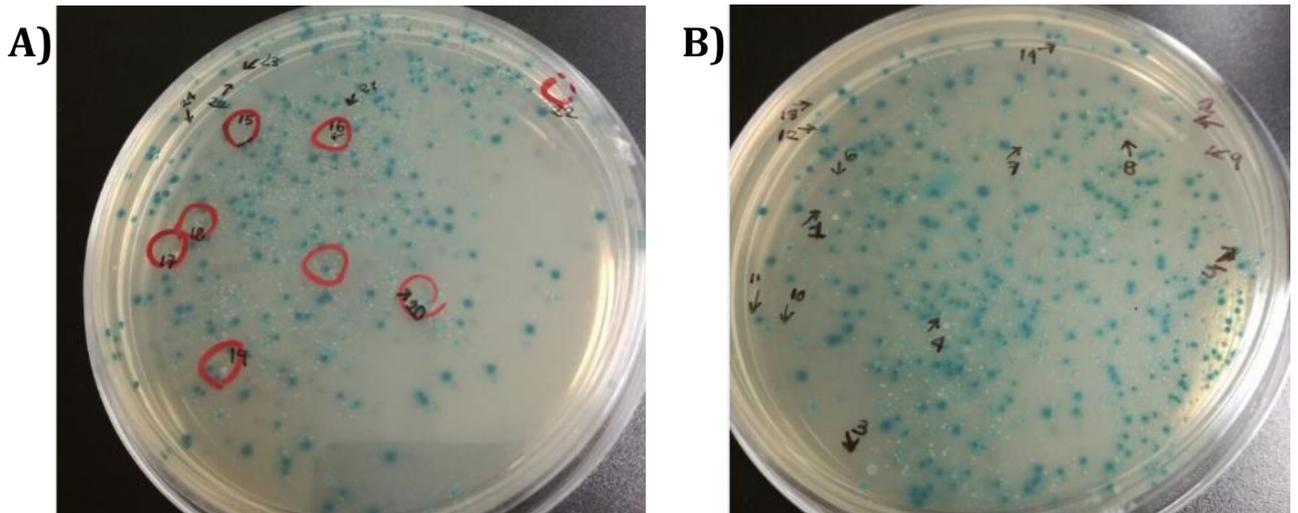


Figura 56. Tamizaje de colonias transformadas y sin transformar. A) Con ligación vector-fragmento *Dmrt1*. B) Con ligación vector- fragmento *Wnt4b*.

Para reconocer el tamaño correcto se debe tomar en cuenta que, si dicha PCR se hizo empleando los oligos M13 del vector, el tamaño en pb será el siguiente: 200 pb (pertenecientes al vector) + 59pb o 178pb que corresponden al inserto, es decir 259 o 378 pb respectivamente. Mientras que con los oligos de los fragmentos se esperaría observar únicamente el tamaño del inserto, es decir, 59-178pb (Fig.57.)

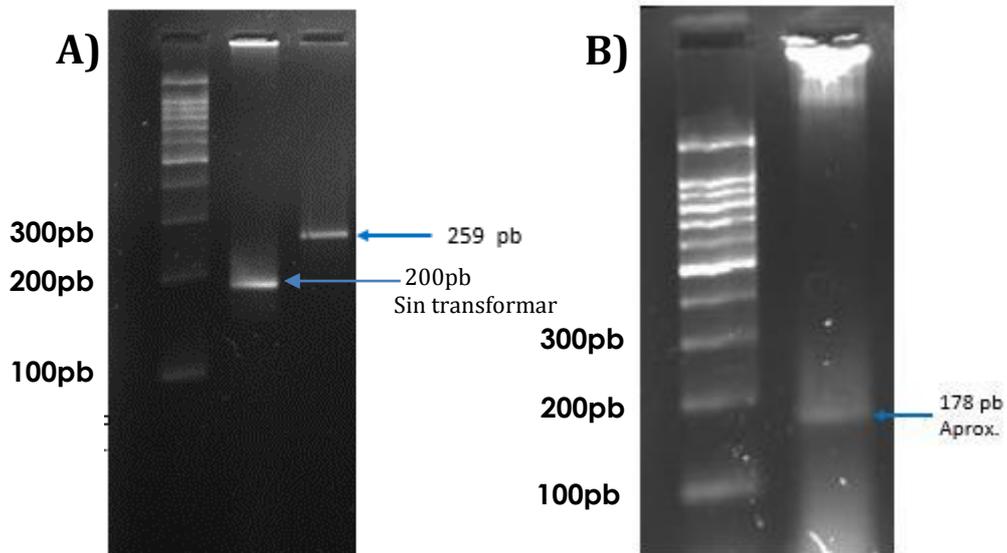


Figura 57. PCR de colonia. A) PCR de colonia transformada con Vector+*Dmrt1*, usando oligos M13. Tamaño esperado y confirmado de 259pb. B) PCR de colonia transformada con Vector + *Wnt4b*, usando oligos del gen. Tamaño esperado y confirmado de 178 pb.

Por último, mediante la metodología descrita anteriormente, una vez elegidas las colonias transformadas de interés se procedió a purificar los plásmidos mediante el protocolo estándar de Miniprep. Los plásmidos obtenidos resultaron de calidad y concentración suficiente para la secuenciación (Fig. 58)

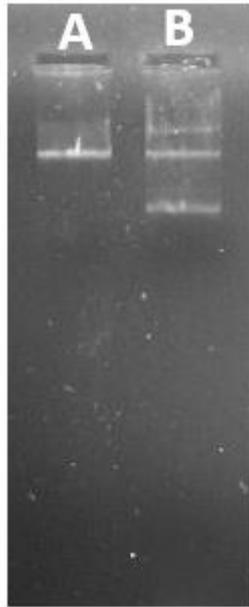


Figura 58.- Extracción de DNA plasmídico. A) Plásmido + *Dmrt1*. B) Plásmido + *Wnt4b*.

- **Genes marcadores para hembra**

En el caso de los genes marcadores para hembra: *Figla*, *Foxl2a*, *Ctnnb1b*, se realizaron las PCR a partir de ADN complementario y como se aprecia en la Figura 59, los productos corresponden a los tamaños esperados, razón por la cual se purificaron para ligarlos al vector de clonación y obtener plásmidos para su posterior secuenciación. Para el gen *Wnt4a*, si bien se ha logrado su amplificación en DNAg, a partir de cDNA se han presentado problemas para la obtención del fragmento esperado, debido probablemente a la edad o etapa en la que se encuentra el pez en el momento del análisis.

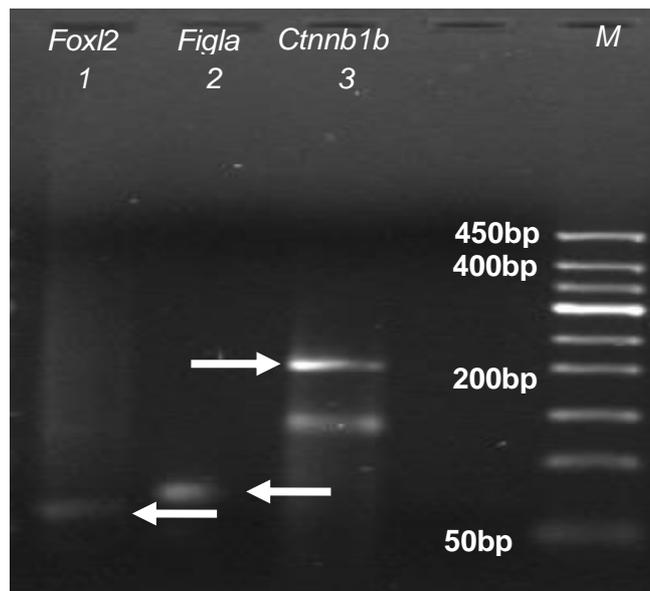


Figura 59. Genes marcadores para hembra. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los resultados de purificación de los genes *Fig12a*, *Foxl2a* y *Ctnnb1b* a partir de cDNA. En el carril 1 se muestra el producto amplificado de *Foxl2a* en el tamaño estimado de 59pb. En el siguiente carril (2) se observa el producto amplificado de *Figla* en el tamaño estimado de 70pb, y en el carril 3 el producto obtenido de *Ctnnb1b* en el estimado de 200pb, aquí se ve una banda adicional cerca de los 150pb como resultado de posible fragmentación del gen por el tiempo almacenado desde la purificación. El carril 4 corresponde al marcador de peso molecular.

El electroferograma obtenido de la secuenciación de *Fig1A* se muestra en la Fig. 60, en donde se puede apreciar la eficiencia de la reacción.

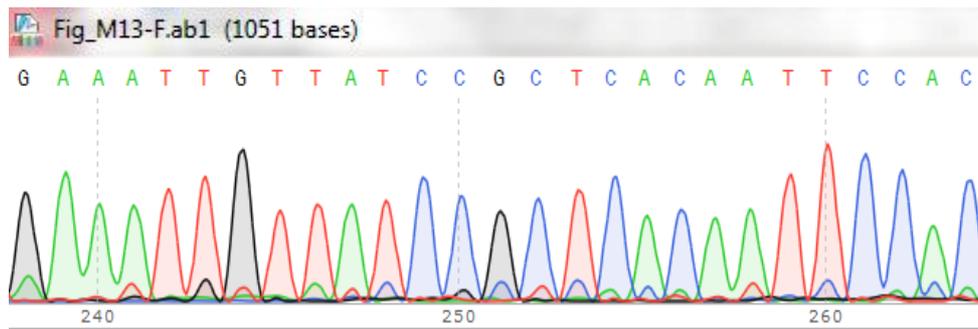


Figura 60. Parte del electroferograma obtenido de la secuenciación tipo Sanger del fragmento del gen *Figla* integrado en un vector de clonación.

Una vez obtenido los electroferogramas se realizó un alineamiento entre los productos obtenidos por la combinación de iniciadores empleados y los resultados se muestran en la Fig. 61.

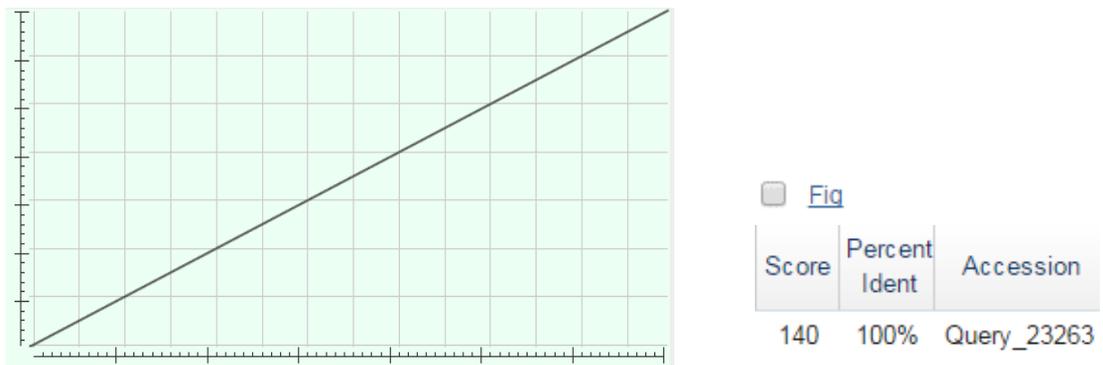


Figura 61.- Alineamiento *in silico* de las secuencias complementarias del fragmento del gen *Figla*. Se muestra una identidad del 100%, indicando que los resultados de secuenciación eran confiables.

Posteriormente, se realizó un alineamiento *in silico*, pero esta vez dirigido a la información contenida en la base de datos del NCBI, para corroborar el porcentaje de identidad entre el fragmento obtenido y las secuencias nucleotídicas reportadas en otras especies de cíclidos. Los resultados indican un porcentaje de identidad del 99% lo que indica que el gen *Figla* está codificado en el genoma de *H. guttatus* y que además se expresa, muy probablemente relacionado a una etapa de diferenciación sexual, como se muestran en la Fig. 62.

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------------------------|
| PREDICTED: Haplochromis burtoni factor in the germline alpha-like (LOC102300176), mRNA | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | XM_005945119.2 |
| PREDICTED: Oreochromis niloticus factor in the germline alpha-like (LOC100694426), transcript variant X1_m | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | XM_013273360.1 |
| Oreochromis niloticus factor in the germline alpha-like (LOC100694426), mRNA | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | NM_001311330.1 |
| PREDICTED: Neolamprologus brichardi factor in the germline alpha-like (LOC102792104), mRNA | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | XM_006797588.1 |
| PREDICTED: Pundamilia nyererei factor in the germline alpha-like (LOC102211532), mRNA | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | XM_005746120.1 |
| PREDICTED: Maylandia zebra factor in the germline alpha (LOC101465910), mRNA | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | XM_004567279.1 |
| Oreochromis mossambicus partial mRNA for factor in the germline alpha (fig1a gene) | 122 | 122 | 98% | 4e-27 | 99% | FN597056.1 |

Figura 62.- Resultados del alineamiento *in silico* de la secuencia del fragmento del gen *Figla* con el resto de las secuencias reportadas para cíclidos en la base de datos del NCBI. El fragmento solo alinea con secuencias de genes *Figla*. Presenta un 98% en cobertura de secuencia con todos los genes debido a que solo dos bases del fragmento en la especie *Hemichromis* son diferentes al resto de las secuencias encontradas razón por la cual la identidad no alcanza el 100%.

Para identificar las dos bases nucleotídicas que son distintas se realizó un alineamiento con la herramienta Mega, utilizando las secuencias de diferentes cíclidos y la obtenida de *Hemichromis* (Fig. 63). Los resultados indican que éste cambio no es significativo, es decir que no altera la secuencia de la proteína, ya sea generando un codón de paro prematuro o modificando la carga del aminoácido codificado por el codón correspondiente.

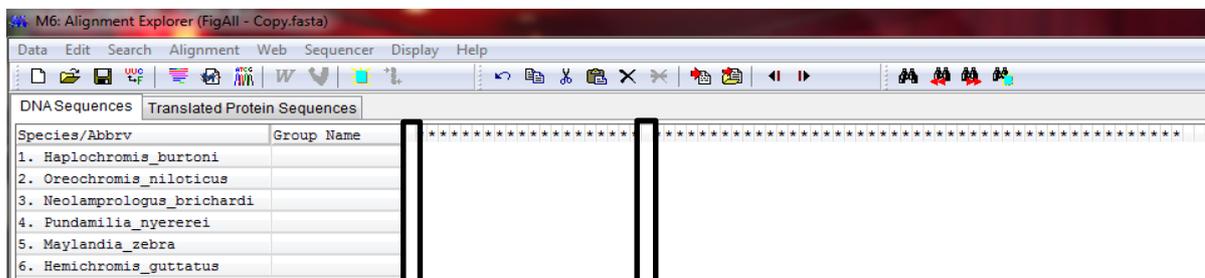


Figura 63. Alineamiento entre 6 diferentes secuencias de cíclidos, incluyendo la secuencia de la especie *Hemichromis*. Se muestran las dos posiciones donde las bases son distintas en la especie *Hemichromis*.

- **Genes control**

Enseguida, se realizaron las PCR correspondientes para los genes: 1. *Dax1*, marcador de sexo cromosomal de hembra, 2. *Cyp19a1*, que codifica para la aromatasa que se encuentra sobre-expresada en hembras y, 3.

18s rRNA housekeeping; y se demuestra que estos genes también están presentes en el genoma de *H. guttatus* y que el transcrito del gen *18s* es de un tamaño de 111 pb (Figura 64).

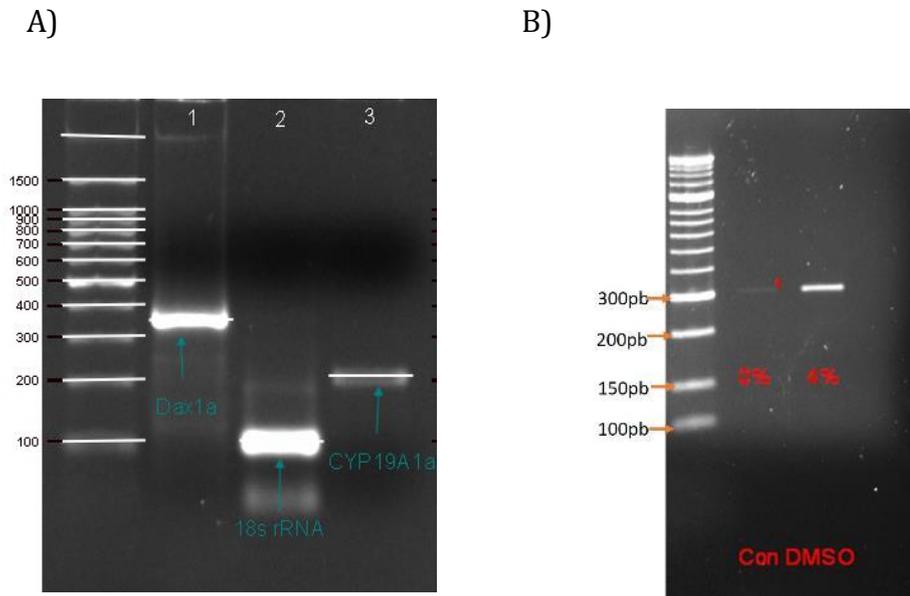


Figura 64. Genes marcadores de sexo cromosomal y *housekeeping*. A) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestra en el carril 1 el fragmento amplificado de *Dax1a* (354 pb), y en el carril 3 el de *Cyp19a1a* (215 pb), ambos a partir de DNA plasmídico. En el carril 2 se muestra el amplicón del gen *18s rRNA* (11 pb) obtenido a partir de cDNA y ya clonado. Se indica en el primer carril el marcador de peso molecular. B) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, se muestra la optimización de la reacción de PCR para el gen *Cyp19a1a* que codifica para la aromatasa.

Para conocer la secuencia, identidad y homología de los genes de interés aquí estudiados fue necesario clonarlos en un vector para enviarlos a secuenciación automática y realizar los análisis correspondientes. Los vectores de clonación empleados fueron pDrive y pCR2.1, con los cuales se emplearon los primers M13 que flanquean los sitios de clonación, esto con el objetivo de secuenciar todo el producto amplificado del pez joya.

Una vez recibidos los diferentes electroferogramas del servicio de secuenciación, se procedió a su análisis. Las secuencias nucleotídica de los genes marcadores de sexo y de los genes de referencia se observan descritas en la tabla 15.

Tabla 15.- Secuencias nucleotídica de los posibles genes marcadores de sexo de *H. guttatus*.

| Fragmento: | Secuencia nucleotídica 5´-3´: | DNA/mRNA |
|---------------------------------------|---|-----------------|
| Amh (169 pb) | AAGCAGCGCAAACATTAACAACACTGCCACGGCTCCTG CGCTTCCCTCTGACCAACACTAACAACCACGCCGTC CTGCTCAACTATCACATAGAGAGCGGCAACGCAGAT GAGCGCCGGCCCTGCTGCGTGCCCTTGGCCTACGA AGCCCTGGAGGTTGTGGACTGGAAC | mRNA |
| Cyp11b2 (72 pb) | TCTCAACCTGCTGAAATTCTGGAGAGAAAATCGCTTCC AGCAGCTTCACAAGCACATGGAGAGGACCTCAA | mRNA |
| Dmrt1 (59 pb) | CAAGTGCTCCCCTGCTGTAGAACATAATCAAGGTGCATGT TACTGAAGGGACACAAGCGCT | mRNA |
| Wnt4b (178 pb) | TCATGAACCTCCACAACAACGAGGCCGGTCGAAAG GTTGGCAACATCAGCGATTTCCTTATAGATTCCAACCTTC CATGTGAATTACAGCATTCTTTTTGTTCTTATGATTATCTC CTCCTCAGGCCATCCTTCATAACATGCAGGTTGAGTGTA AATGTCACGGTGTGTCTGG | DNA |
| Figla (70pb) | TCCCAGCAAAGTGGACACACTTAAAGCTGCCACAGA ATACATTCGACTGCTGCTTGCAGTTTTGCAGGAA | mRNA |
| Ctnnb1b (220 pb) | AACTGCTGTGCAGCGTCTTGCAGAACCATCGCAAATG CTAAAGCATGCTGTAGTTAACCTCATTAAATTATCAAGACG ATGCTGAGCTGGCCACTCGTGCGATCCCTGAGCTCAC TAAACTGCTTGATGATGAGGACCAGGTTGTTGTGAATAA AGCAGCTGTAATGGTGCATCAGTTGTCAAAGAAAGAG GCATCTCGCC | mRNA |
| Wnt4a (75pb) | AAGTGGTCACGCAAGGCACCCGTGAAGCAGCCTTTG TGTATGCCATCTCAGCAGCCAGTG†GGcGTTTGcGGTC A | mRNA |
| Dax1a (356 pb) | CGATTTCCACAACAGAGACGCCGGGTGCCCCCTGT TCTGGCCGCCCATAGCCTCGCTCTGCCTGTCCGGGC AGCCCGTGAGGATGCGCTGCAGCATGCTCGGCTCCA CGGTCTCCGTGGTCTCAAAGTCCACCCGGTCTTGTGC GAGTCCCAACACGAGCAGAGGGCGCCAGCCGCTC CGGATCAGCACGAGCTGGTCTCCTCGGGTAGTTCG CGGAAACAGGGGACGTTTTTACGAAGCGCAGCGTC TTCACCAGGACCGCGGACGCCGCTTGCAGGTCACC TGCGGGGAGCGAAGGACGCCCCCGGCGCCGAGTC GAGCCGCAGGAGCAAGCCTGCTGTCTGGACCTCCTG CA | DNA |
| Cyp19a1a (206 pb) | CATGAACGAGAGAGGCATCATATTTAACAACAACGTA ACTCTGTGGAAAAAGATACGGACTTATTTTGCTAAAGCT CTGACAGGCCCAAATGTGCAGCAGACGGTGGATGTT GCGTTTCTCCACACAGGCTCACCTGGACAGCCTGG ACAGCCTGGGACACGTTGACGTGCTCAGTTTGCTGCG CTGCACTGTGGTGGACATCT | mRNA |
| 18s ribosomal (111 pb) | TGTTTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCGCTCCACC AACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCACAGAAT CGGGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTCCGTGTC A | mRNA |

En la Figura 65A se observa una imagen representativa de los electroferogramas obtenidos y en la figura 5B el análisis por *Blastn* de las secuencias de los genes para machos, donde se confirma la identidad de entre un 80-100% los productos amplificados. Para el caso de los genes específicos de hembras, se obtuvo un porcentaje de identidad del 98-100%, con lo que se corrobora la presencia y expresión de estos mismos (datos no mostrados).



Figura 65. Análisis de secuencias obtenidas para machos. A) Electroferogramas parciales de los fragmentos secuenciados. B) Confirmación de identidad de los fragmentos mediante alineamiento múltiple de secuencias en BLAST.

En la Figura 66 se aprecia el resultado del análisis bioinformático *Blastn* para los genes: de referencia *18s ribosomal*, *Dax1a* específico de

cromosoma X y por último el gen *Cyp19a1a*, que codifica para la aromatasa que se sobre-expresa en las hembras. En todos los casos se confirma la identidad de los genes de estudio.

| A) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| | Pelmatolapia mariae isolate CES-277 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | 200 | 200 | 98% | 3e-50 | 99% | KJ774766.1 |
| | Oreochromis sp. CMH-2014 isolate CES-467 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | 200 | 200 | 98% | 3e-50 | 99% | KJ774724.1 |
| | Oreochromis mossambicus isolate CES-468 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | 200 | 200 | 98% | 3e-50 | 99% | KJ774723.1 |

| B) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------------------------|
| | Oreochromis niloticus DAX1 gene for orphan nuclear receptor Dax-1, partial cds, isolate: On1 | 610 | 610 | 100% | 4e-173 | 97% | AB915530.1 |
| | Oreochromis niloticus orphan nuclear receptor DAX1 (NR0B1a) gene, complete cds | 610 | 610 | 100% | 4e-173 | 97% | DQ269443.1 |
| | Oreochromis niloticus orphan nuclear receptor Dax-1 (nr0b1a), mRNA | 610 | 610 | 100% | 4e-173 | 97% | NM_001279699.1 |

| C) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------------------------|
| | PREDICTED: Neolamproloqus brichardi aromatase-like (LOC102783408), mRNA | 315 | 315 | 100% | 2e-84 | 94% | XM_006793932.1 |
| | Oreochromis aureus cytochrome p450 aromatase mRNA, complete cds | 309 | 309 | 100% | 1e-82 | 94% | DQ279891.1 |
| | Astronotus ocellatus cytochrome P450 aromatase (cyp19a) mRNA, partial cds | 303 | 303 | 100% | 5e-81 | 93% | KT337402.1 |

Figura 66. Análisis de las secuencias obtenidas para los genes de referencia. Porcentajes de similitud obtenidos de los genes candidatos secuenciados contra la base de datos de Cíclidos del NCBI por medio de la herramienta bioinformática *Blastn*. A) *18s rRNA* B) *Dax1a* C) *Cyp19a1a*. Se muestra un porcentaje de similitud mayor al 98% en las secuencias obtenidas contra la base de datos y una identidad mayor al 99% en todos los casos respecto al gen de interés.

Se realizó la comparación de la secuencia obtenida del gen *18s rRNA*, con respecto a las bases de datos como se muestra en la Tabla 16. La longitud de la secuencia de interés era la esperada según lo reportado por Geng y colaboradores en el 2013, contando con una longitud de 111pb. Al contar únicamente con secuencias parciales del gen de interés, no es posible conocer si existe una modificación del marco de lectura con los datos obtenidos, así mismo, se detectó un cambio de base en la posición 74 de la secuencia obtenida, con respecto a la posición 116 en la base de datos, dicho cambio fue constante en todas las secuencias parciales encontradas en la misma, dicho cambio no genera un codón de paro prematuro en la secuencia obtenida.

| | |
|------------|----------|
| TCG | Serina |
| CGG | Arginina |
| GGG | Glicina |

Tabla 16. Cambios nucleotídicos para 18s. Posibles codones generados por el cambio de base en la posición 74, utilizando el código genético universal.

Para el caso de la comparación de la secuencia obtenida del gen *DAX1a*, se encontraron 8 cambios de bases, situación constante entre la secuencia obtenida y las secuencias de cíclidos disponibles en la base de datos; con ayuda del software Mega5 se realizó un alineamiento de la secuencia codificante reportada en la base de datos de cíclidos del NCBI con respecto a la secuencia obtenida. Sólo dos de esos cambios tienen un efecto en la traducción de la proteína, siendo uno de estos un cambio de Treonina a Isoleucina, ambos con una naturaleza diferente, pero una estructura similar, por lo que la mutación podría no tener un efecto importante en el plegamiento o función del producto codificado. El segundo cambio es de Serina a Asparagina, siendo ambos aminoácidos de la misma naturaleza (Figura 67).

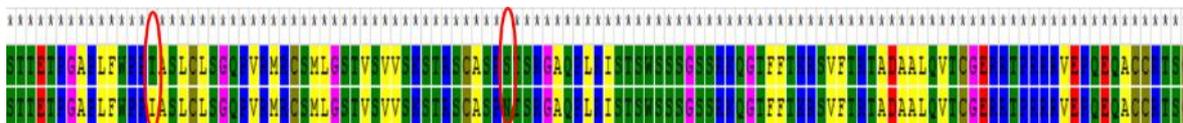


Figura 67. Alineamiento y traducción generadas con el programa Mega6 para el gen *Dax1*. Se muestran los cambios de aminoácidos en la secuencia obtenida (Secuencia de abajo) con respecto a una secuencia del mismo gen obtenida de la base de datos del NCBI (ID: DQ269443.1) (Secuencia de arriba). Las coincidencias se encuentran marcadas con un asterisco mientras los cambios están señalados con un círculo rojo.

Para el gen *Cyp19a1a*, se encontraron 12 cambios de pares de bases, comparando con la secuencia obtenida en el NCBI y con ayuda del software MEGA6 (Fig. 68), se realizó un alineamiento de la secuencia codificante y la secuencia obtenida del gen de interés, y su posterior traducción. Se detectaron 5 cambios de aminoácidos, entre Leucina y Valina, de la misma naturaleza, Isoleucina y Treonina cuyas estructuras difieren ligeramente, Histidina y Serina, siendo estos grupos con naturaleza positiva y polar respectivamente, Asparagina y Serina, junto con Leucina

y Valina, todos de naturaleza no polar. Existe una posibilidad de que el cambio entre Isoleucina y Treonina junto con Histidina y Serina provoquen un cambio en función o plegamiento de la proteína, más al no poseer la secuencia completa del gen de interés, no es posible saber si el marco de lectura es el mismo en la secuencia que se encuentra en la base de datos y en la del organismo de interés.

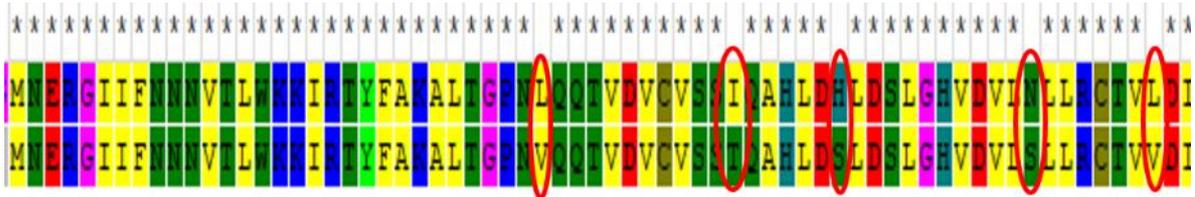


Figura 68. Alineamiento y traducción generadas con el programa Mega6 para Cyp19a1a. Se muestran los cambios de aminoácidos en la secuencia obtenida de (Secuencia de abajo) con respecto a una secuencia del mismo gen obtenida de la base de datos del NCBI (ID: DQ279891.1) (Secuencia de arriba). Las coincidencias se encuentran marcadas con un asterisco, mientras los cambios están señalados con un círculo rojo.

Estructuras hipotéticas de las proteínas codificadas por los genes marcadores para hembras.

Si bien todas las secuencias estudiadas fueron analizadas, a continuación, se muestra los resultados obtenidos para los genes marcadores de hembras. Por ejemplo, con secuencias homologas a Figla, se analizó la estructura protéica hipotética y se obtuvo la imagen de la Figura 69. Se trata de una proteína monomérica, con una secuencia primaria de 242 aminoácidos que dan como estructura secundaria dos laminas alfa hélice, separadas por un bucle; lo cual coincide con lo anteriormente reportado para esta clase de factores de transcripción. En cuanto a sus características fisicoquímicas, esta proteína tiene un pI de 5.39 (valor obtenido con la herramienta ProtParam).



Figura 69. Estructura proteína en 3D. Modelo hipotético de la estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *Fig1A* de la especie *Hemichromis guttatus*, obtenido utilizando la plataforma SWISS-MODEL.

La proteína Fox2 consta de 303 aminoácidos, que le otorgan alrededor de 34 KDa de peso molecular, y un punto isoeléctrico o pI de 9.21 (valor obtenido con la herramienta ProtParam). La estructura tridimensional formada se puede observar en la Figura 70, dónde se muestra una proteína formada por tres alfa hélices y dos betas plegadas separadas por un bucle, característica de las proteínas con unión al DNA.

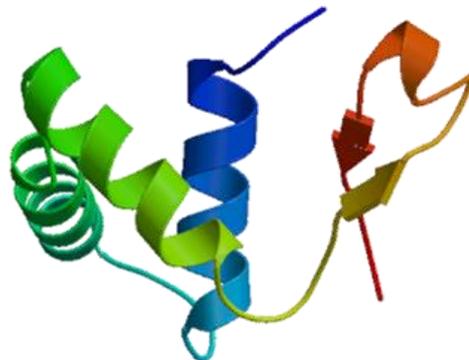


Figura 70. Estructura proteína en 3D. Modelo hipotético de la estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *Foxl2a* de la especie *Hemichromis guttatus*, obtenido utilizando la plataforma SWISS-MODEL.

Haciendo uso de las mismas herramientas bioinformáticas que empleadas para la secuencia anterior, en la imagen continua (Figura 71) se muestra la estructura proteica hipotética codificada por el gen *Wnt4A*, Esta proteína monomérica tiene una secuencia primaria de 352 aminoácidos, que dan como estructura secundaria siete laminas alfa hélice y 7 betas plegadas, separadas por un bucle. En cuanto a sus características fisicoquímicas, esta proteína tiene un pI 8.55 (valor

obtenido con la herramienta ProtParam). Esta proteína actúa como ligando para receptores transmembranales que activan la expresión de genes de diferenciación para hembras.

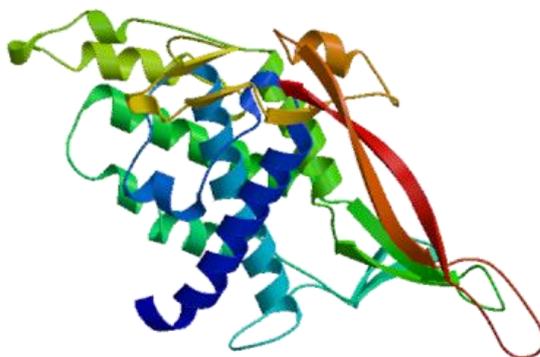


Figura 71. Estructura proteína 3D. Modelo hipotético de la estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *Wnt4A* de la especie *Hemichromis guttatus*, obtenido utilizando la plataforma SWISS-MODEL.

- **Correlación de los niveles de expresión de los genes con el sexo aparente de los peces de *H. guttatus***

Para este objetivo era necesario realizar la extracción de RNA a partir de larvas completas de 75 DDE (días después de la eclosión) y se está trabajando en la purificación de RNA de ejemplares de 90 DDE. Estas muestras de RNA serán utilizadas como plantillas para obtener cDNA para los ensayos de qPCR. Los resultados de la extracción de RNA se presentan en la Figura 72. Se observó, tanto en el gel como en la cuantificación por absorbancia, que se obtuvo mayor cantidad de RNA de los troncos, debido a la mayor cantidad de tejido utilizado. Se observa un patrón de bandeo característico de una extracción de RNA, con dos bandas intensas que representan las subunidades del RNA ribosomal además de diferentes bandas en los extremos que resultan de otros tipos de RNA como el mensajero, ya que el protocolo utilizado es para extracción de RNA total de la célula. Las larvas procesadas correspondían a ejemplares bajo tratamientos de feminización, masculinización y también del grupo control; el resto de las muestras presentaron el mismo patrón de RNA por lo que no se consideró necesario poner imagen de cada una de las extracciones.

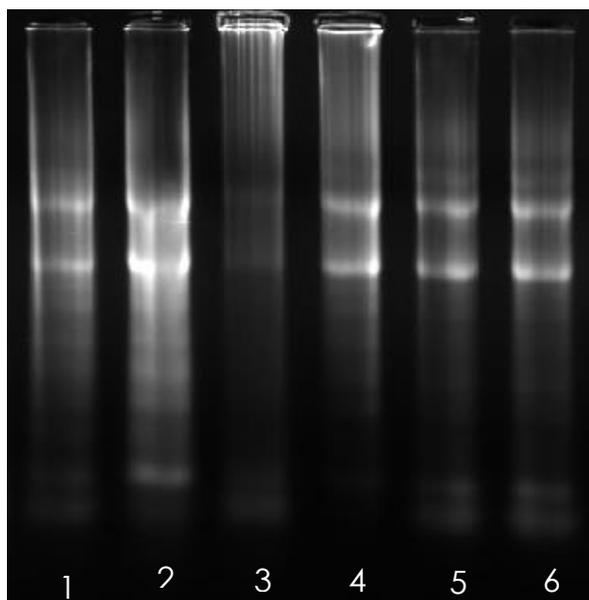


Figura 72. RNAs Totales de larvas completas de 75 DDE. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, donde todos los carriles muestran productos de la extracción de ARN de diferentes larvas completas, divididas en tronco y cabeza, de 75 dde. Los números impares (1, 3 y 5) representan la extracción de ARN de la cabeza de las larvas, mientras que los numero pares (2, 4 y 6) pertenecen al ARN del tronco de las larvas.

Determinación de la expresión de la aromatasas

Las larvas expuestas a la reversión sexual fueron obtenidas a partir del desove de dos parejas distintas (Figs. 73). La longitud y peso de las larvas al inicio del tratamiento de reversión sexual fue de 6.31 ± 0.42 mm y 2.42 ± 0.46 mg respectivamente y la densidad en cada acuario fue de 2.5 larvas/litro. La supervivencia promedio al final de los tratamientos fue de 75, 71 y 72 %, para el tratamiento control, tratamiento de feminización y tratamiento de masculinización respectivamente (Fig. 74). Cabe destacar que la mayor parte de la mortalidad ocurrió durante la primera semana, lo cual posiblemente se deba a la manipulación física y no a un efecto de los tratamientos hormonales.

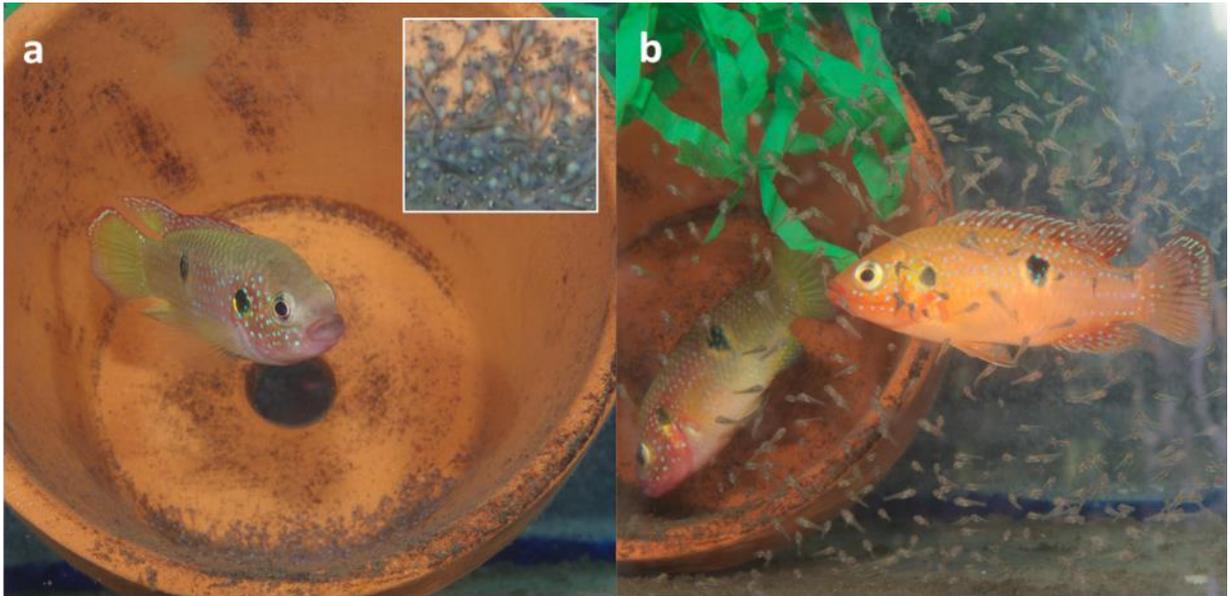


Figura 73. Cuidado biparental de las larvas antes de los tratamientos. Se observa la coloración nupcial característica de la especie durante la temporada reproductiva. En el acercamiento se observan las larvas aun con reservas de vitelo (a, b).

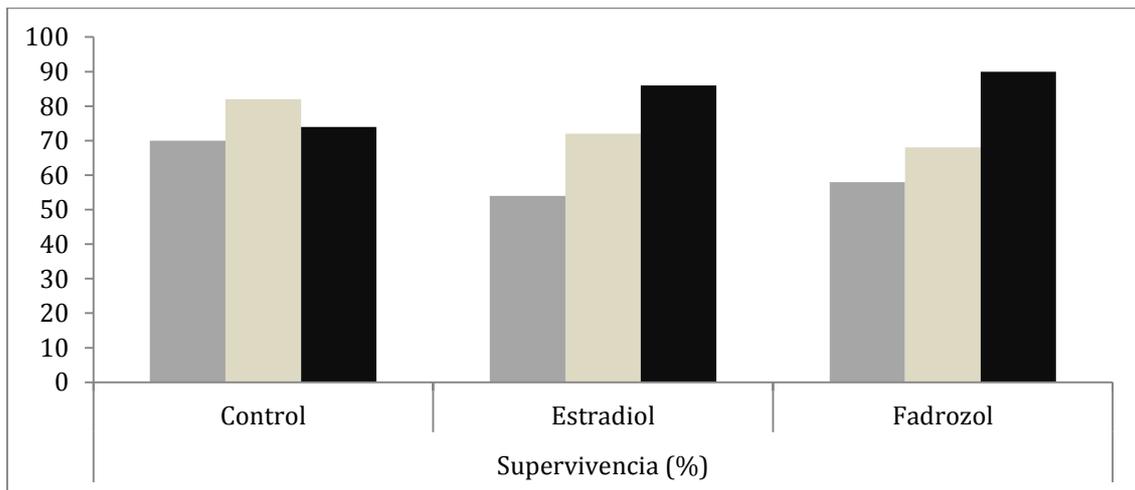


Figura 74. Supervivencia de larvas del cíclido joya durante los tratamientos de reversión sexual.

Las condiciones de la calidad del agua se mantuvieron dentro de los rangos óptimos para la especie (Tabla 17), y la temperatura no superó el umbral de 35 °C para el cual se ha reportado masculinización en otras especies de cíclidos como la tilapia.

Tabla 17. Condiciones de calidad de agua durante los tratamientos de reversión sexual

| Tratamiento | Temperatura (°C) | pH | Nitritos (ppm) | Nitratos (ppm) | Amonio (ppm) |
|-----------------|------------------|------------|----------------|----------------|--------------|
| Control | 27 ± 2.2 | 8.2 ± 0.25 | 0 | 0 | 0 |
| Feminización | 27.3 ± 2.3 | 8.4 ± 0.22 | 0 | 0 | 0 |
| Masculinización | 27.4 ± 2.2 | 8.4 ± 0.31 | 0 | 0 | 0 |

Durante el experimento las larvas fueron alimentadas sin ningún problema con los nauplios de *Artemia* enriquecidos.

Durante los tratamientos se determinó y analizó el peso de los individuos sin encontrar diferencias significativas en el día 30 ($p=0.487$), 45 ($p=0.664$) y 60 después de la eclosión ($p=0.891$; Fig. 75 y 76).

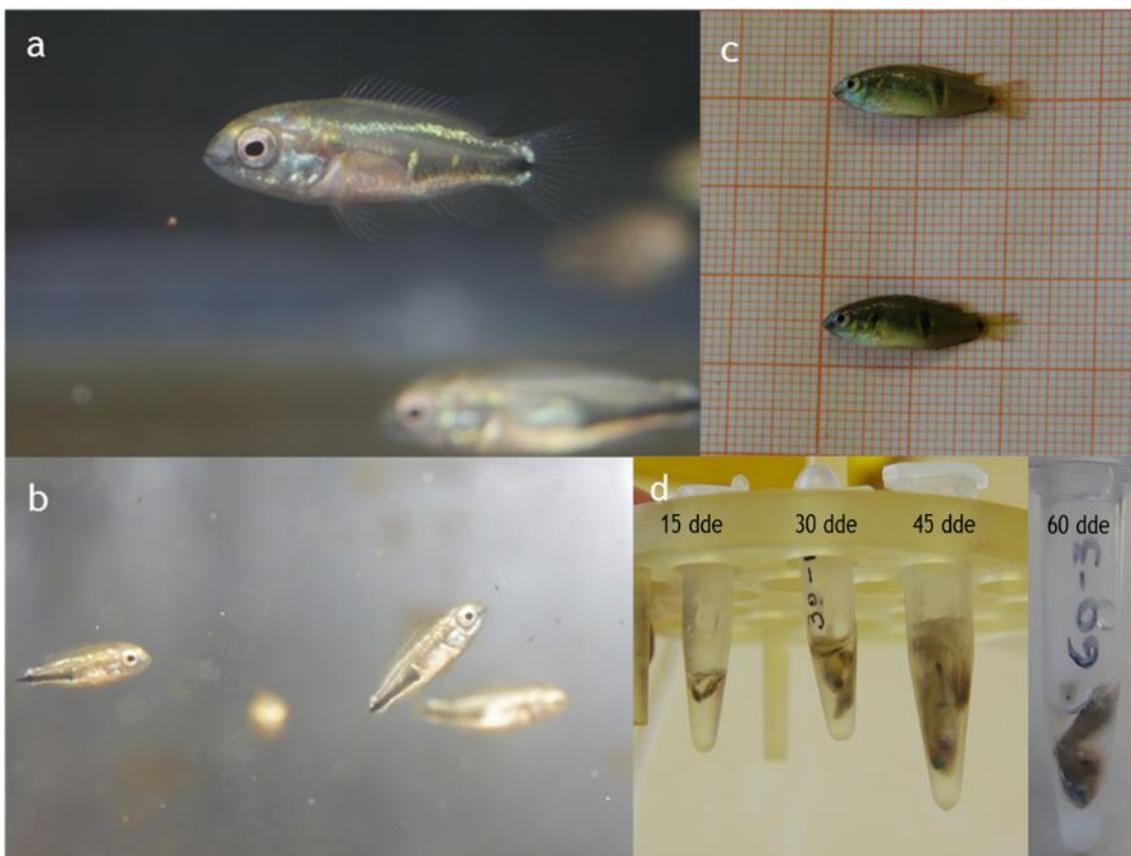


Fig. 75. Tamaño de las larvas en los 34 y 36 y 60 después de la eclosión durante los tratamientos de reversión sexual (a, b y c). d) Larvas sacrificadas y almacenadas en RNAlater.

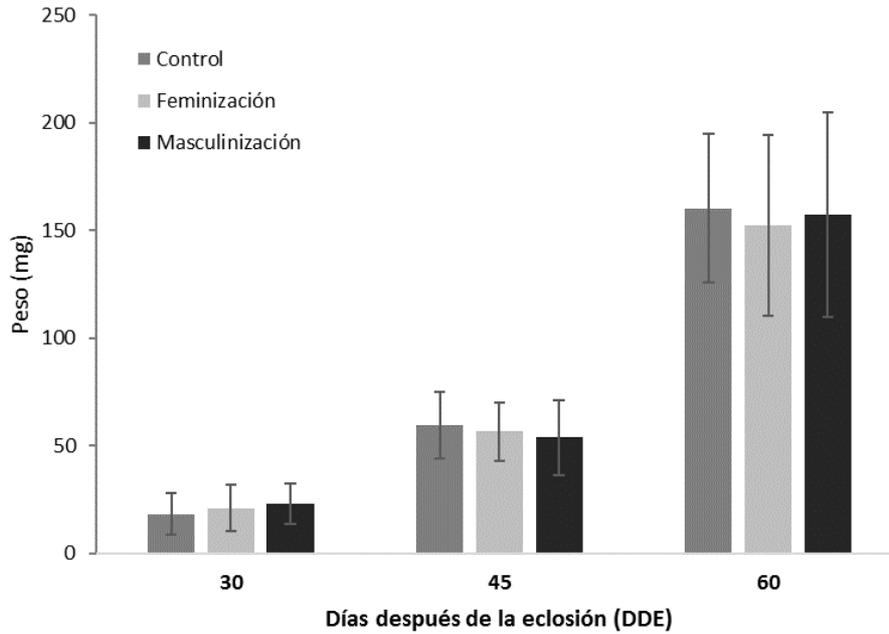


Figura 76. Peso de los ejemplares de cíclido joya expuestos a los tratamientos de reversión sexual. Media \pm SD. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para cada día ($P > 0.05$).

Para determinar la proporción de sexos se sacrificaron 36 individuos por tratamiento. En el grupo control presentó 58% de hembras, lo cual no resultó estadísticamente significativo respecto a la proporción esperada de 50% ($X^2=1$; $p=0.31$), mientras que el tratamiento de feminización las diferencias fueron altamente significativas debido a que se encontraron 100% de hembras ($X^2=32$; $p<0.001$). Sin embargo, el tratamiento de masculinización, a pesar de tener un menor porcentaje de hembras (50%) no presentó diferencias respecto al control (X^2 ; $p=0.8$), por lo cual posiblemente la dosis de Fadrozol utilizada no fue suficiente para ejercer un efecto masculinizante en el cíclido joya.

Respecto a las pruebas moleculares, se logró la amplificación del cDNA de la aromatasa en el cíclido joya con los cebadores diseñados para este estudio. Los resultados del análisis de 26 geles fotodocumentados muestran que el tamaño del producto amplificado por RT-PCR fue de aproximadamente (\sim) 210 pares de bases (pb; Figura 77a), mientras que por PCR se amplificó un producto de \sim 322 pb (Figura 77b), lo cual corresponde al tamaño de los fragmentos esperados para cíclidos: 206 y 318 pb, respectivamente (Ye et al., 2012). El alineamiento de las

secuencias de los cebadores en tilapia (*Oreochromis niloticus*) muestra que el fragmento corresponde a una región parcial del cDNA de la aromatasa abarcando los exones 3 y 4 (nucleótidos 453-658 del cDNA), mientras que en DNA el amplicon también incluye el intron 3, de un tamaño de 112 pb (Figura 78; Chang et al., 1997, 2005). Cabe destacar que esta diferencia en el tamaño del fragmento permitió distinguir la contaminación por DNA genómico durante la estandarización del protocolo de extracción de RNA y posterior amplificación mediante PCR.

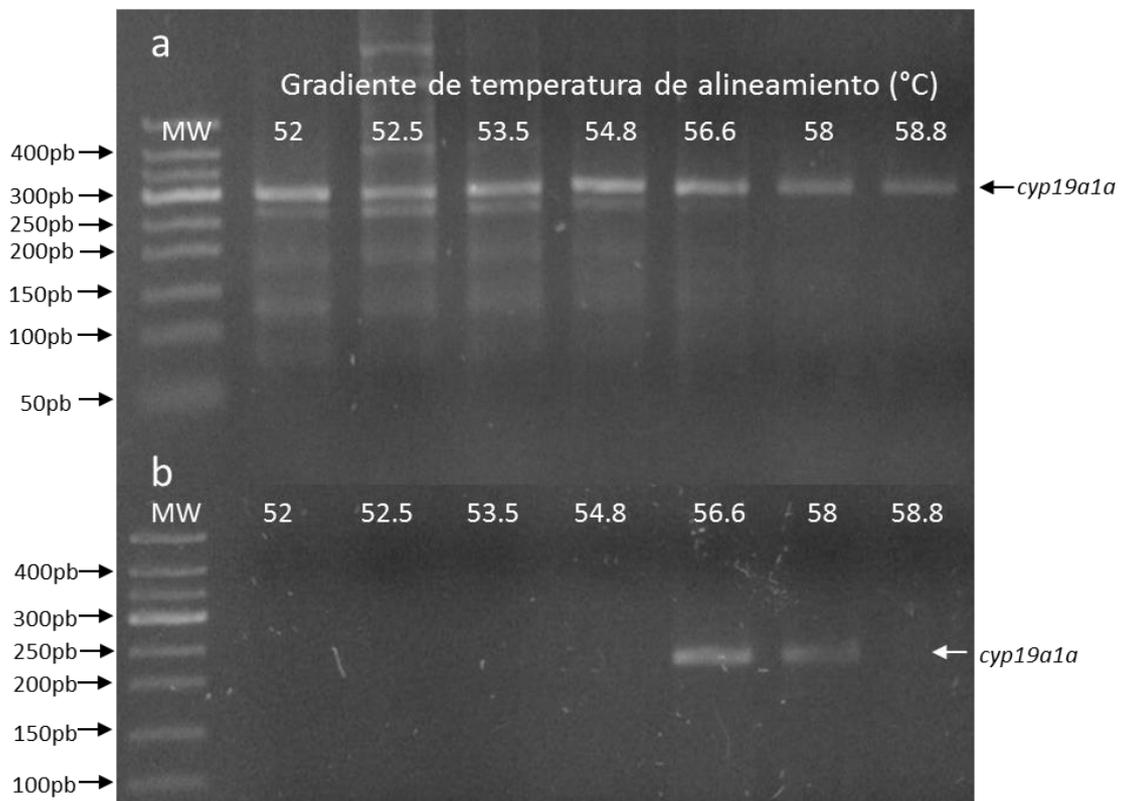


Figura 77. Producto de amplificación de la aromatasa *cyp19a1a* sobre DNA (a) y cDNA ovárico (b) con los cebadores diseñados para el cíclido joya. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

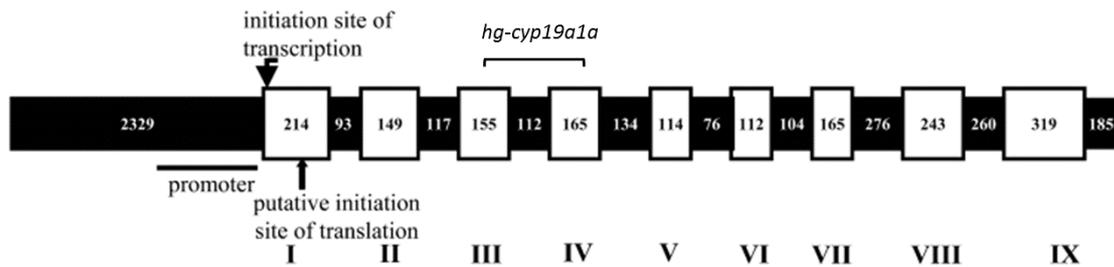


Figura 78. Diagrama de la estructura del gen de la aromatasa *cyp19a1a* en tilapia (*Oreochromis niloticus*; tomado de Chang et al., 2005). Las regiones correspondientes a los exones (I-IX) e intrones se muestran en blanco y negro, respectivamente. Se indica el tamaño de cada sección en pares de bases y la región correspondiente al fragmento amplificado en el cíclido joya (*hg-cyp19a1a*).

Debido al tamaño de los organismos al inicio de los tratamientos las muestras de los 15 DDE fueron procesadas en grupos de tres larvas. En estas muestras no fue posible cuantificar la expresión de la aromatasa mediante RT-qPCR, debido a que al migrar el producto amplificado se observaron bandas inespecíficas de ~300 y ~500 pb (Figura 79). No obstante, el fragmento esperado para cDNA (~208 pb) sí estuvo presente, lo cual sugiere que la aromatasa sí se expresa a los 15 DDE. La presencia de estas bandas no permitió cuantificar la amplificación mediante los valores de fluorescencia obtenidos en qPCR, sin embargo, al analizar el gel en el fotodocumentador se determinó que para los fragmentos de 208 pb la intensidad relativa de la banda más intensa fue 10.73 veces mayor respecto a la banda más tenue. Lo anterior puede reflejar diferencias en los niveles de expresión entre machos y hembras, ya que estas larvas se muestrearon antes de su primera alimentación con los nauplios enriquecidos, por lo que no hay influencia de los tratamientos hormonales.

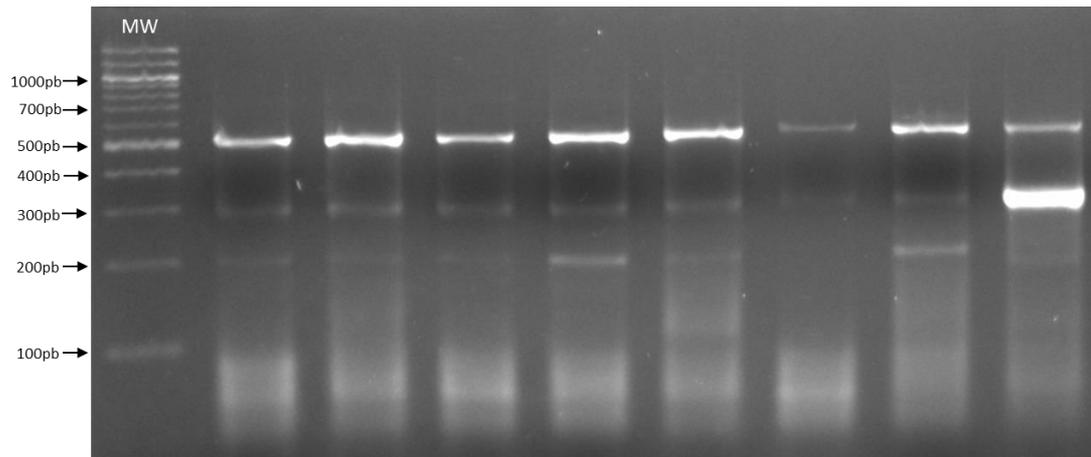


Figura 79. Producto de amplificación de la aromatasa *cyp19a1a* por RT-qPCR en muestras de larvas de cíclido joya a los 15 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

Posteriormente se procesaron las muestras de individuos de 30 y 45 DDE, las cuales, a diferencia de los 15 DDE, si fueron manejadas de forma individual por su mayor tamaño. Por RT-qPCR no se encontraron niveles significativos de expresión de aromatasa en las larvas de estas edades, ya que los niveles de fluorescencia detectados durante la amplificación fueron muy bajos y cercanos al control NTC ($C_q = 27.3-28.1$; Figura 80). Esto pudo ser confirmado al no observarse el producto mediante electroforesis. Igualmente, no fue posible detectar la expresión de la aromatasa en muestras de 60 DDE por RT-PCR, incluso al extraer el RNA de la sección del tronco de los organismos. Lo anterior se realizó con el fin de reducir la dilución de los mRNA de aromatasa en el RNA total de la larva, ya que en este día los individuos tenían una longitud promedio de 20 mm lo cual facilitó su disección.

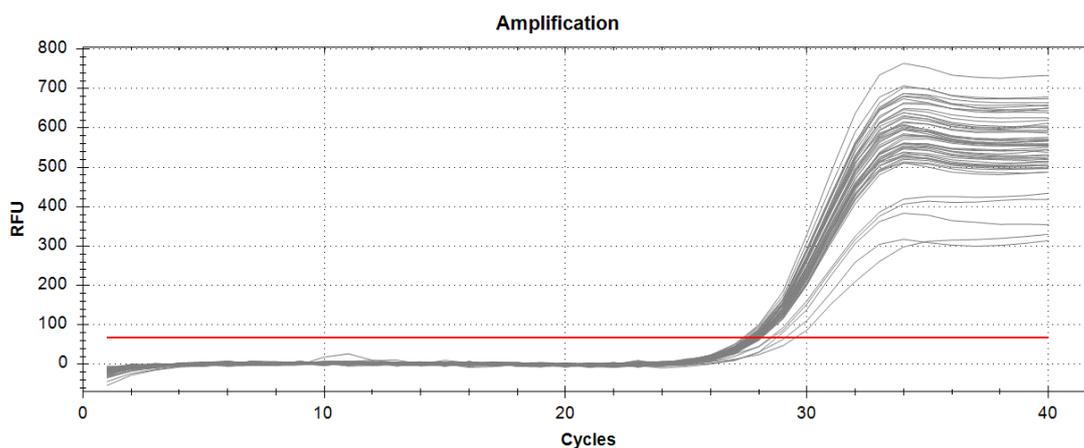


Figura 80.- Curva de acumulación de fluorescencia durante la amplificación de aromatasa *cyp19a1a* a los 45 DDE mediante qPCR. La línea roja horizontal indica el nivel umbral de fluorescencia (determinado en el software CFX manager, Bio-Rad). RFU: Unidades de fluorescencia relativa.

Para descartar un posible efecto debido al tamaño del producto amplificado (>150 pb) se realizaron distintas modificaciones en los protocolos de extracción de RNA y transcripción reversa. Sin embargo, no se obtuvo amplificación de la aromatasa a los 30, 45 y 60 DDE (Figura 81). En contraste, si fue posible amplificar el gen 18s ribosomal y otros genes que se estuvieron trabajando para esta especie (datos no mostrados), entre ellos *foxl2* (Figura 82), uno de los principales reguladores de la transcripción de la aromatasa.

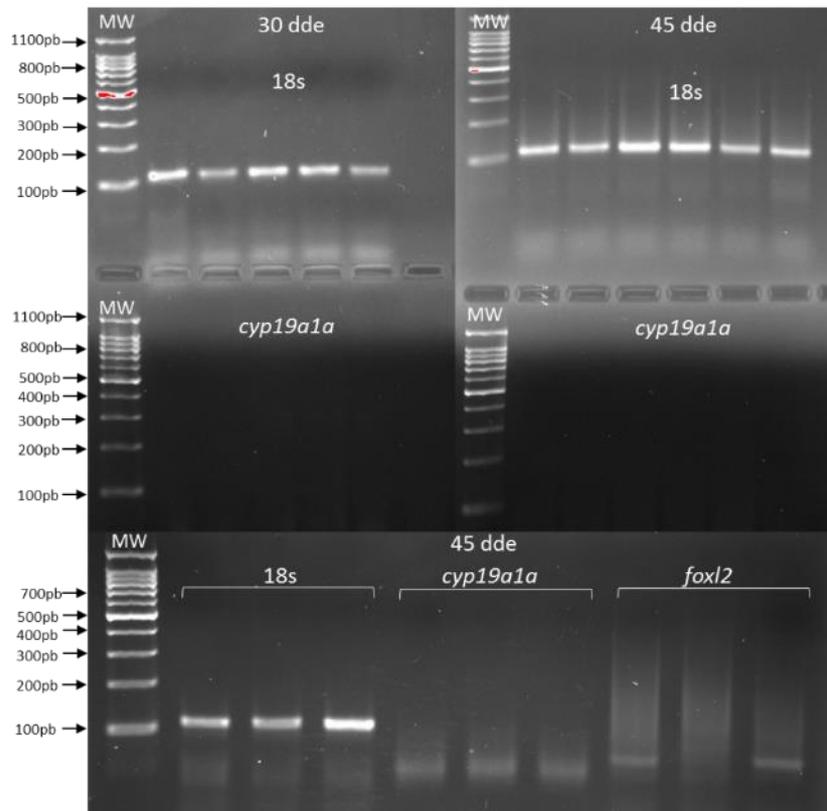


Figura 81.- Amplificación de aromatasa *cyp19a1a*, *foxl2* y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 45 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

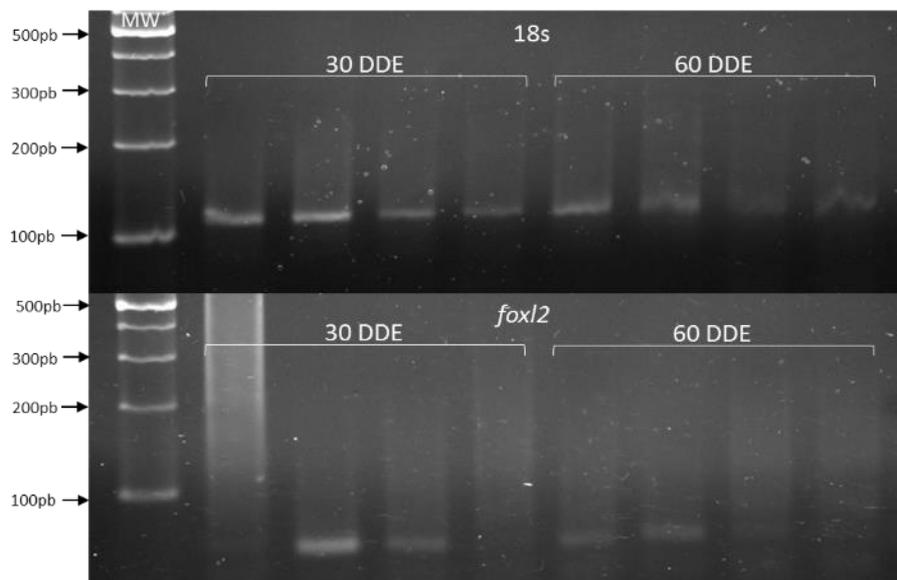


Figura 82.- Amplificación de *foxl2* y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 60 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

Debido a que *foxl2* es un factor transcripcional que promueve la expresión de la aromatasa y cuya expresión sí fue evidenciada mediante RT-PCR en los días 30 y 45, se decidió cuantificar los niveles de expresión relativa de este gen mediante RT-qPCR (Figura 83). Como resultado se observó que, al normalizar los niveles con el gen de referencia, se encontraron diferencias significativas en la expresión entre tratamientos a los 30 DDE (Kruskal-Wallis $X^2= 8.39$, $df= 2$, $P= 0.01$). Específicamente la expresión en el tratamiento control fue significativamente mayor que en el tratamiento de feminización (Conover's-test, $P> 0.01$) y el tratamiento de masculinización, aunque en este último no alcanzó la significancia estadística (Conover's-test, $P= 0.11$). A los 45 DDE no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los tratamientos (Kruskal-Wallis $X^2 = 2.02$, $df= 2$, $P= 0.36$). De acuerdo a los resultados de RT-PCR a los 60 DDE los niveles de expresión de *foxl2* fueron menores respecto a los días 30 y 45, por lo cual no fueron cuantificados mediante qPCR.

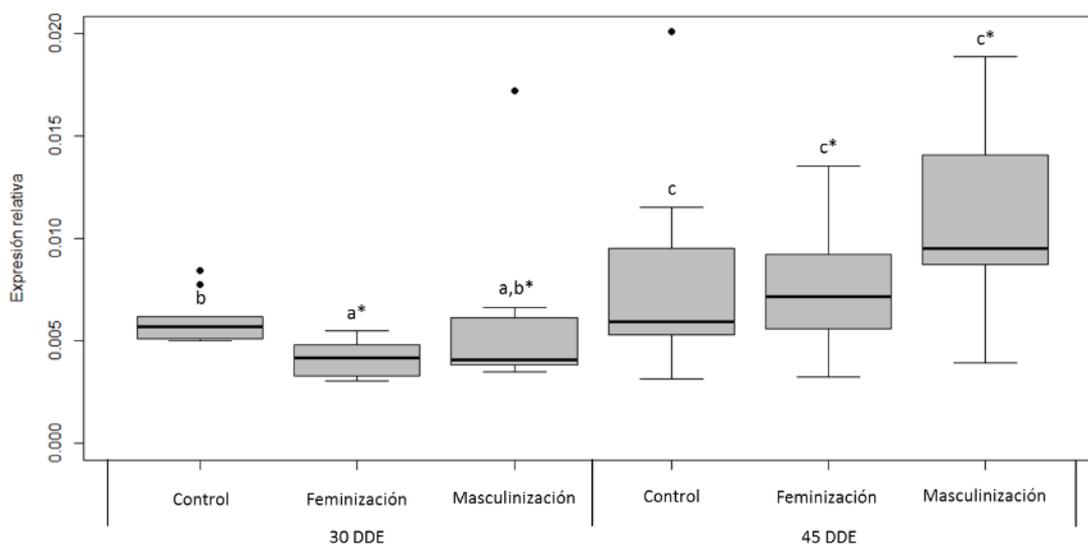


Figura 83.- Expresión relativa de *foxl2* en juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual a los 30 y 45 DDE. Se muestra la mediana, cuartiles, rango y puntos extremos ($n= 9$). Las letras indican diferencias significativas en los niveles de expresión entre tratamientos para cada día, mientras que el asterisco (*) indica diferencias para cada tratamiento entre los dos días ($P< 0.05$).

Debido a que no existe un equivalente no paramétrico para el ANOVA de dos vías, se utilizó una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon para

evaluar cambios en la expresión relativa de cada tratamiento en el tiempo. Observándose que en todos los tratamientos los valores mostraron una mayor variación, y respecto al día 30 los niveles de expresión a los 45 DDE fueron significativamente mayores para los tratamientos de feminización ($W= 12, P= 0.01$) y masculinización ($W= 14, P= 0.02$), aunque no en el tratamiento control ($W= 35, P= 0.65$).

Cariotipo

Después de múltiples intentos la técnica para el análisis citogenético fue estandarizada y actualmente ya se han logrado visualizar los cromosomas (Fig. 84 y 85), aunque el conteo total, así como la identificación morfológica de estos está aún en proceso. Por otra parte, debido al reto que representaba el volumen de la muestra de sangre debido al diminuto tamaño de los individuos y a que se presentaba contaminación bacteriana todo el tiempo, se exploró la técnica con diferentes tejidos, lo que permitió concluir que las branquias eran el tejido idóneo en cuanto a células en metafase y ya que fue el que permitió observar una mejor morfología de cromosomas, además que su extracción no requiere sacrificar al ejemplar, en comparación con los demás órganos que se examinaron.

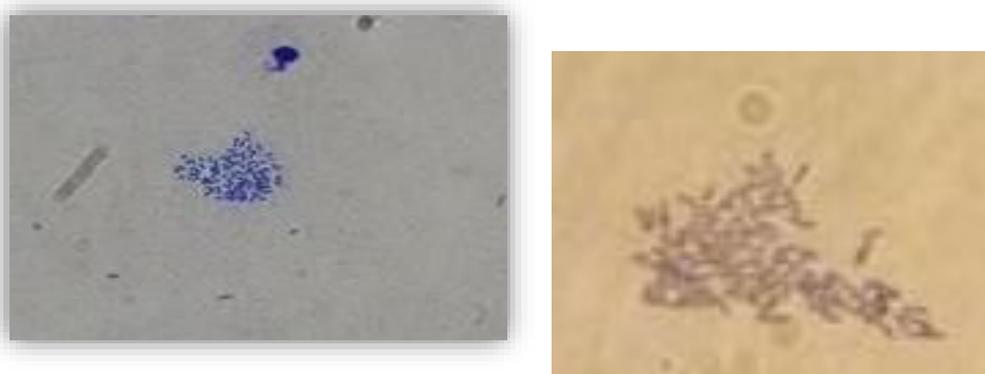


Fig. 84. Cromosomas del cíclido joya *H. guttatus* observados en microscopio óptico en aumento 100x

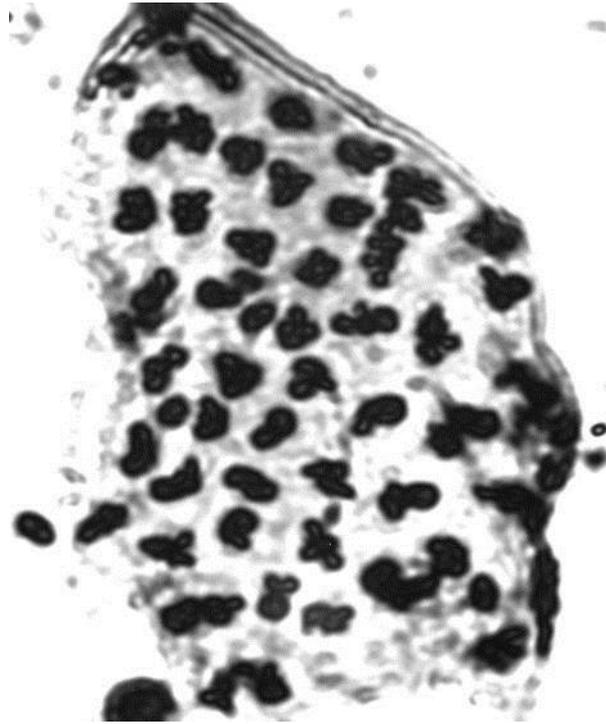


Figura 85. Célula mitótica teñida con Giemsa, objetivo: 40x, obtenida mediante la técnica citogenética de cariotipo general. Se observan cromosomas separados y una morfología típica.

El bandeo "G" es el más sencillo de realizar y adquiere su nombre debido al colorante (GIEMSA) que se emplea. En este tipo de tinción lo ideal es obtener cromosomas con diferentes bandas en su estructura, es decir encontrar bandas oscuras que corresponden a regiones de replicación tardía ricas en AT, mientras que las regiones claras corresponden a regiones de replicación temprana, ricas en GC, también denominadas bandas R. Este bandeo se da por una respuesta diferencial de los cromosomas al ser penetrados con tripsina, antes de ser coloreados con GIEMSA (Fig. 86). Sin embargo, cabe mencionar que con esta técnica no se ha logrado obtener el resultado esperado, puesto que no se ha logrado establecer el tiempo adecuado del pretratamiento tripsina para lograr la penetración del colorante y así distinguir cada una de las bandas.

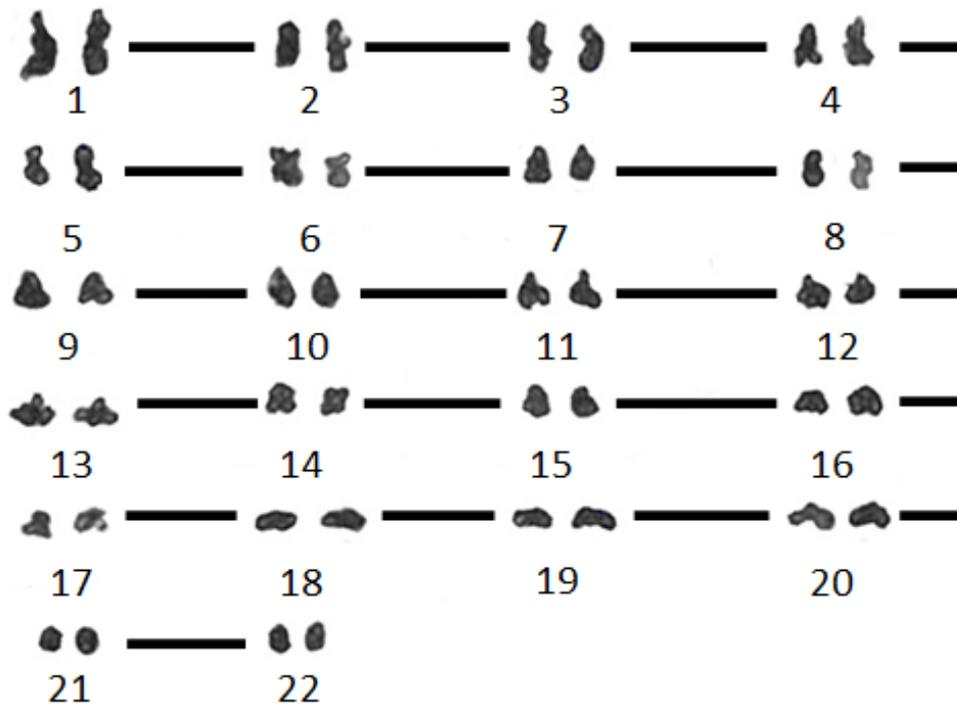


Figura 86. Cariotipo general de *H. guttatus* con tinción Giemsa

El cariotipo descrito anteriormente presenta 22 pares cromosómicos. De acuerdo a la posición del centrómero, se clasificaron los cromosomas. El resultado es el siguiente:

4 pares metacéntricos. (Par 1,5,6 y 14).

3 pares submetacéntricos (Par 2, 3 y 4).

9 pares sub telocéntricos (Par 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 y 17).

6 pares acrocéntricos (Par 16, 18, 19, 20, 21 y 22).

Tinción NOR's.

Esta técnica identifica en los cromosomas las regiones llamadas Organizadoras Nucleolares (NORs) que forman y mantienen el nucléolo en la interfase. Las NORs pueden ser visualizadas de forma indirecta, por el método de paso único de Howell y Black (1980), técnica que se basa en la afinidad que presenta el nitrato de plata por las proteínas ácidas como la nucleolina asociada a la estructura fibrilar del nucléolo y el pre-RNA naciente. Estas proteínas persisten en la región de la constricción

secundaria durante todo el ciclo celular, permitiendo colorear los nucléolos en interfase y dichas regiones en cromosomas metafásicos.

En los peces, las NORs generalmente están ubicadas en constricciones secundarias de los cromosomas, pueden observarse en un solo par cromosómico o distribuidas en varios cromosomas del complemento y su número, posición y localización cromosómica es especie-específica para varios grupos de peces (Nirchio et al. 2007).

Tomando como referencia el cariotipo general que se estableció de *H. guttatus*, se determinaron los patrones de bandeo característicos de la tinción NOR's. En las figuras 87 y 88 se muestra el cariotipo general con tinción Giemsa, y subrayado de color rojo los pares de cromosomas que corresponden a la tinción NOR's.

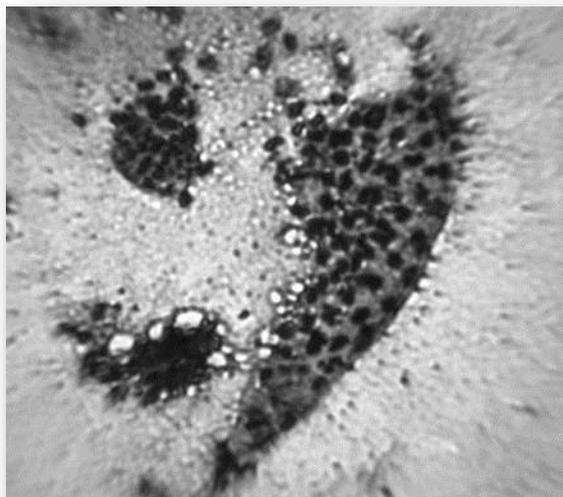


Figura 87. Tinción NOR's (microscopía electrónica, objetivo 40x)



Figura 88.- Cariotipo general y bandas NOR's. Se observan 4 pares de cromosomas que presentan patrones de bandeo característicos a la tinción NOR's

Bandeo C

Esta técnica tiñe heterocromatina constitutiva, sobre todo en la parte central de un cromosoma, por lo que se esperamos observar los centrómeros. La técnica de bandeo-C más comúnmente utilizada involucra la depurinización de la cromatina con un tratamiento ácido (HCl), desnaturalización del DNA con tratamiento alcalino (BaOH), quiebre de las cadenas de DNA en los sitios depurinizados y remoción de las cadenas de DNA desnaturalizado en solución salina caliente (2xSSC) lo que permite, luego de la tinción con colorante de Giemsa, revelar bloques más intensamente coloreados que el material cromosómico restante, el cual presenta una coloración más pálida (Sumner, 1971).

Prosiguiendo a la caracterización de los cromosomas, se realizó el bandeo C, el cual se comparó con el cariotipo general ya establecido de *H. guttatus*. Se lograron diferenciar los pares cromosómicos con patrones específicos de las bandas C. En las figuras 89 y 90 se muestra el cariotipo general con tinción Giemsa, y subrayado de color azul los pares de cromosomas que corresponden a la tinción C.



Figura 89. 1.2 tinción "C" (microscopia electrónica objetivo 40x)



Figura 90. Cariotipo general y bandas C. Se observan 2 pares de cromosomas que presentan patrones de bandeo característicos a la tinción C.

Cariotipo de *H. Minckleyi*

Considerando el estado de conservación de la especie *endémica H. minckleyi* (en peligro, NOM-059), se requiere de más información para su preservación y hasta el momento sólo se dispone de información fenotípica, pero se carece de información sobre el patrón cromosómico

y su respectiva tipificación. De aquí, que se haya emprendido esta aproximación en el presente estudio con el fin de conocer más a fondo su genética y taxonomía para fines futuros tales como la manipulación o preservación de éste cíclido. Adicionalmente, identificar y conocer el número y las características de los cromosomas de *H. minckleyi*, contribuiría a sentar las bases para conocer mejor su situación filogenética y la identificación de polimorfismos.

Cabe mencionar que se utilizaron juveniles producido en el laboratorio y dos adultos, de los cuales únicamente se muestreó una branquia y no fueron sacrificados. La elección de las branquias juega un papel muy importante y positivo para la conservación del cíclido, ya que no solo los ejemplares no se sacrifican, sino que se ha demostrado que los peces tienen la capacidad de regenerar las branquias siempre y cuando no se haya cortado desde el cartílago (Reyes et. al. 2011)

A continuación, se presentan las fotografías de los cariotipos obtenidos. Las Figuras (91 a 98) corresponden a los 3 primeros cíclidos juveniles de los cuales se desconoce el sexo y las Figuras 99 a 102 corresponden a adultos (hembra y macho).

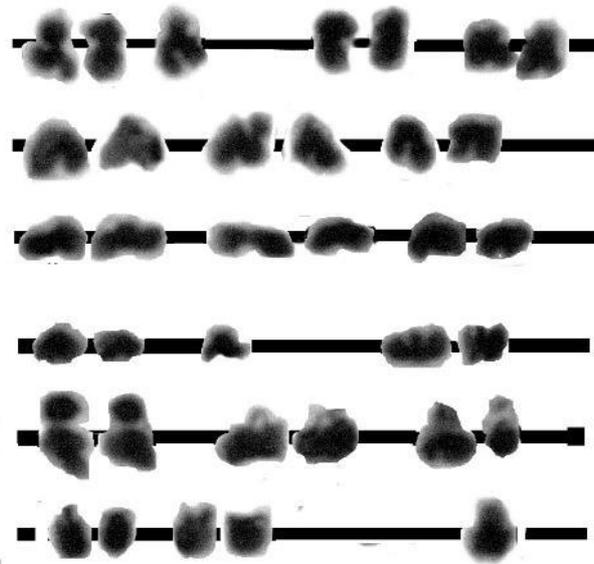


Figura 91. Cariotipo general con tinción Giemsa. Los espacios vacíos aún se están trabajando para encontrar el par, ya que algunos cromosomas vienen sobrepuestos.

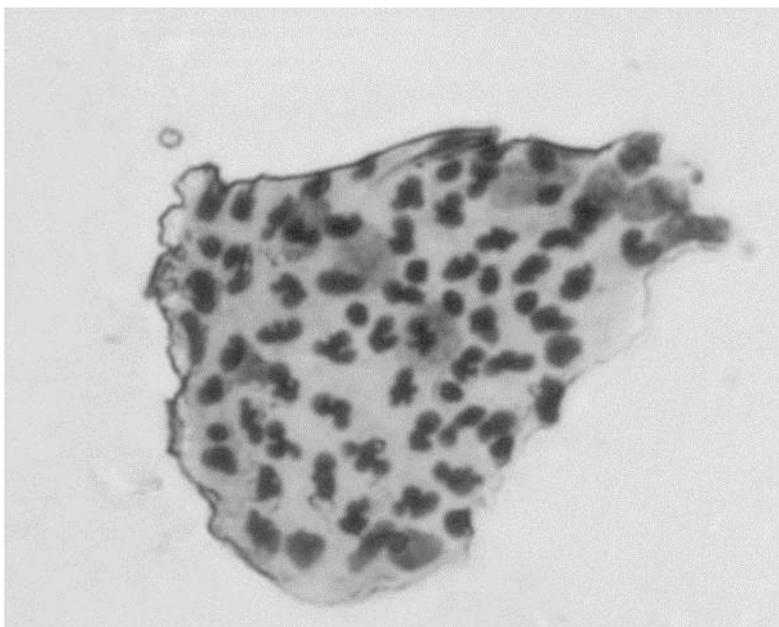


Figura 92.- Imagen original del cariotipo anterior.

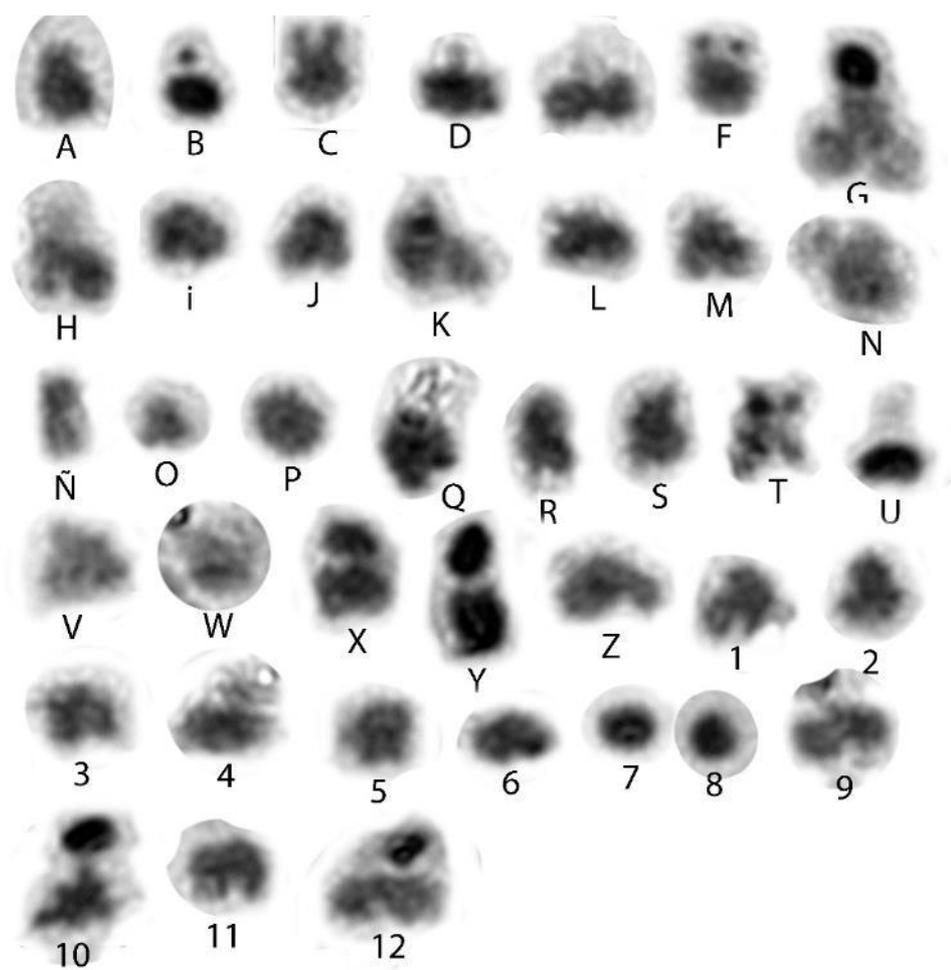


Figura 93.- Cromosomas con Bando C.

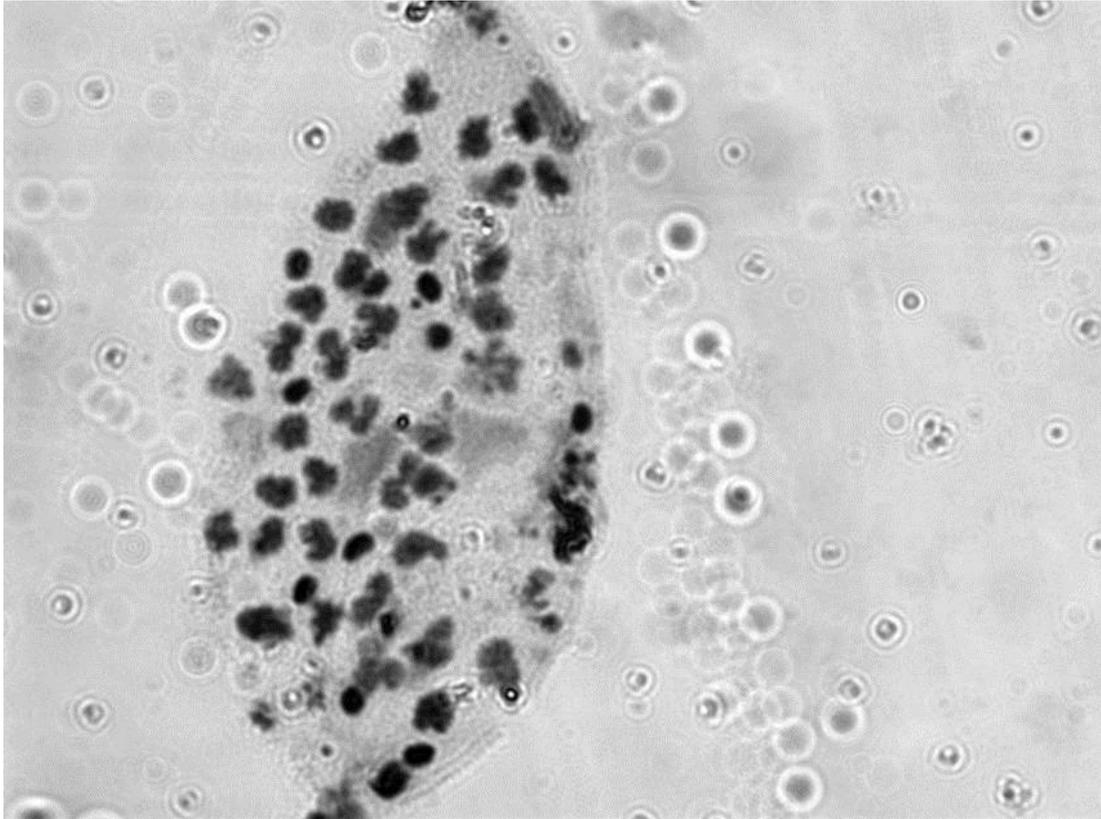


Figura 94.- Imagen original de los cromosomas en Bando C.

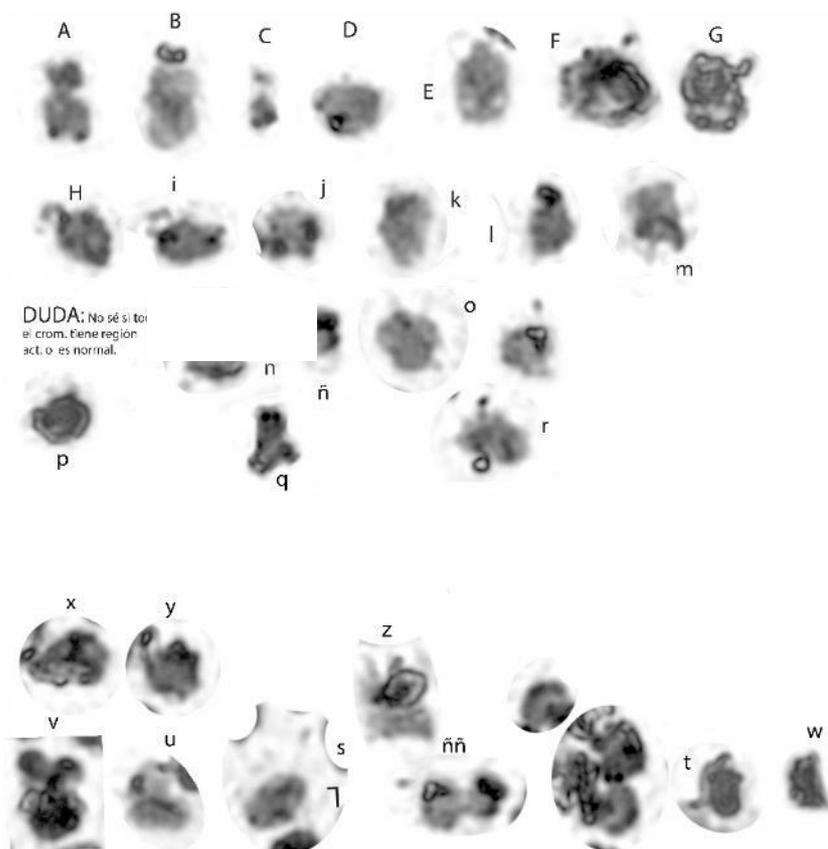


Fig 95.- Cromosomas teñidos con NORs.

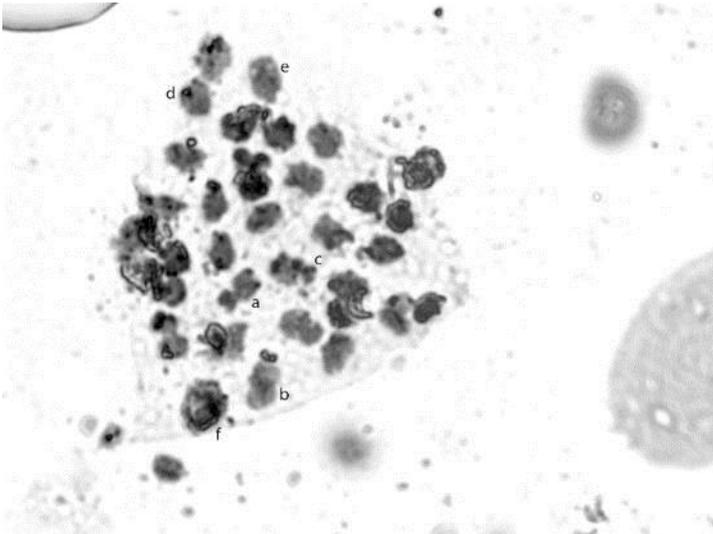


Figura 96.- Fotografía original de los cromosomas en NORS.

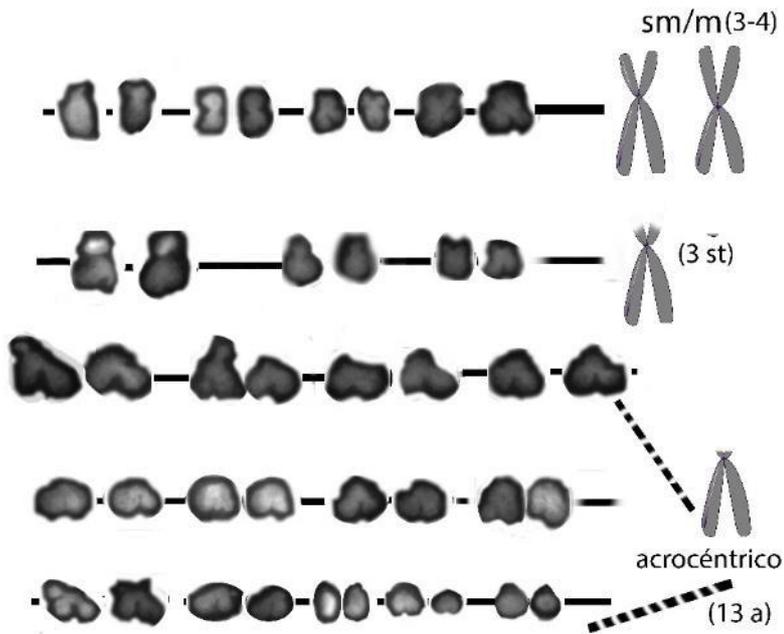


Figura 97. - Cariotipo con 20 pares de cromosomas semi-armado. Técnica de Yoduro.

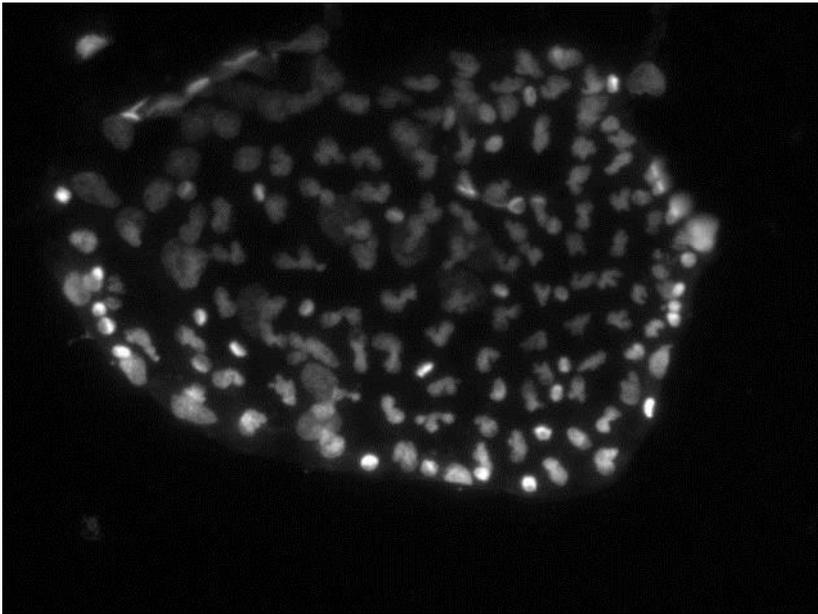


Figura 98.- Se observan dos o tres células juntas con la técnica con Yoduro.



Fig 99.- Emparejamiento de cromosomas para cíclido hembra adulta.

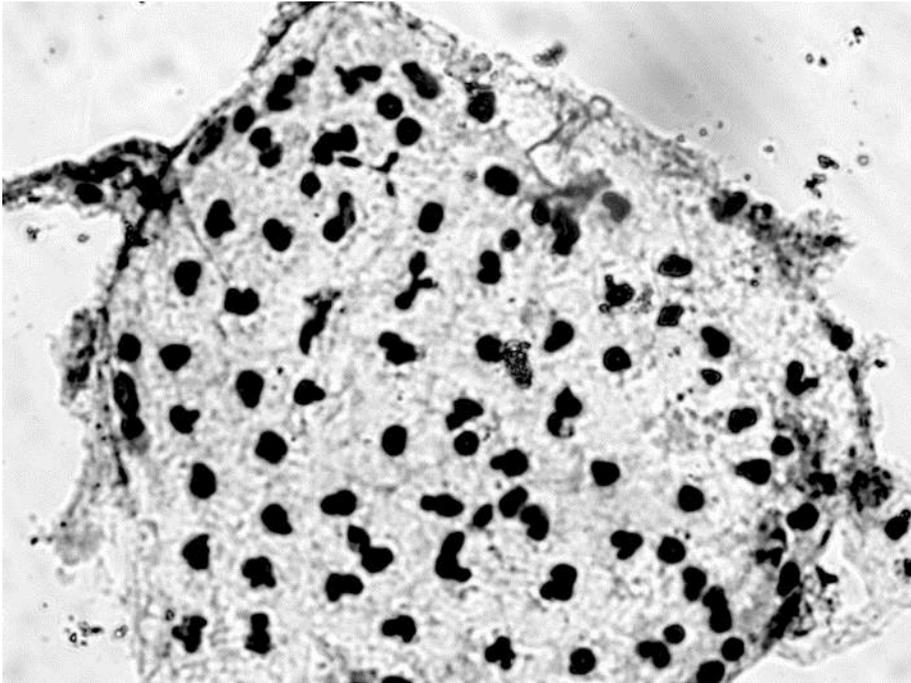


Figura 100.- Fotografía real en microscopio de los cromosomas en hembra adulta.

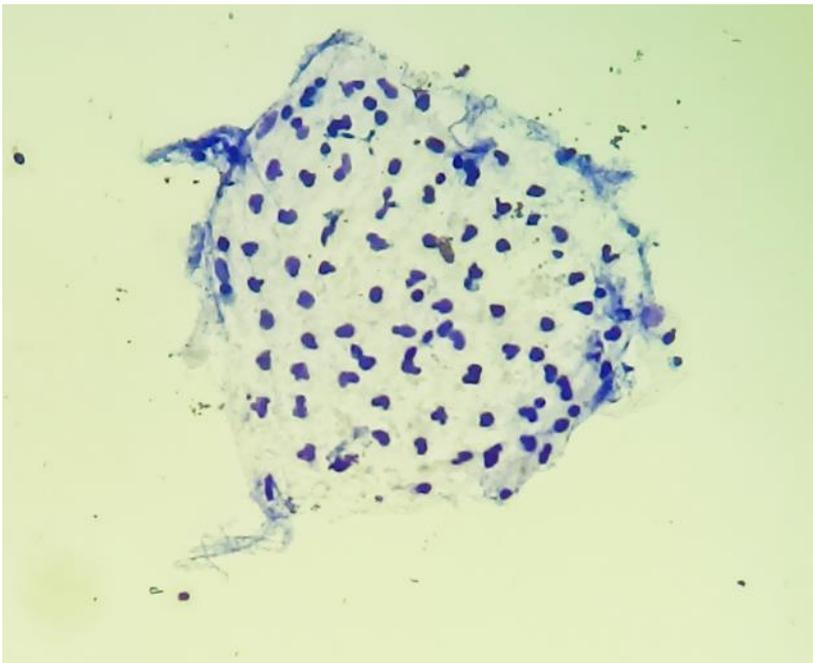


Figura 101.- Fotografía a color de los cromosomas anteriores de hembra adulta.

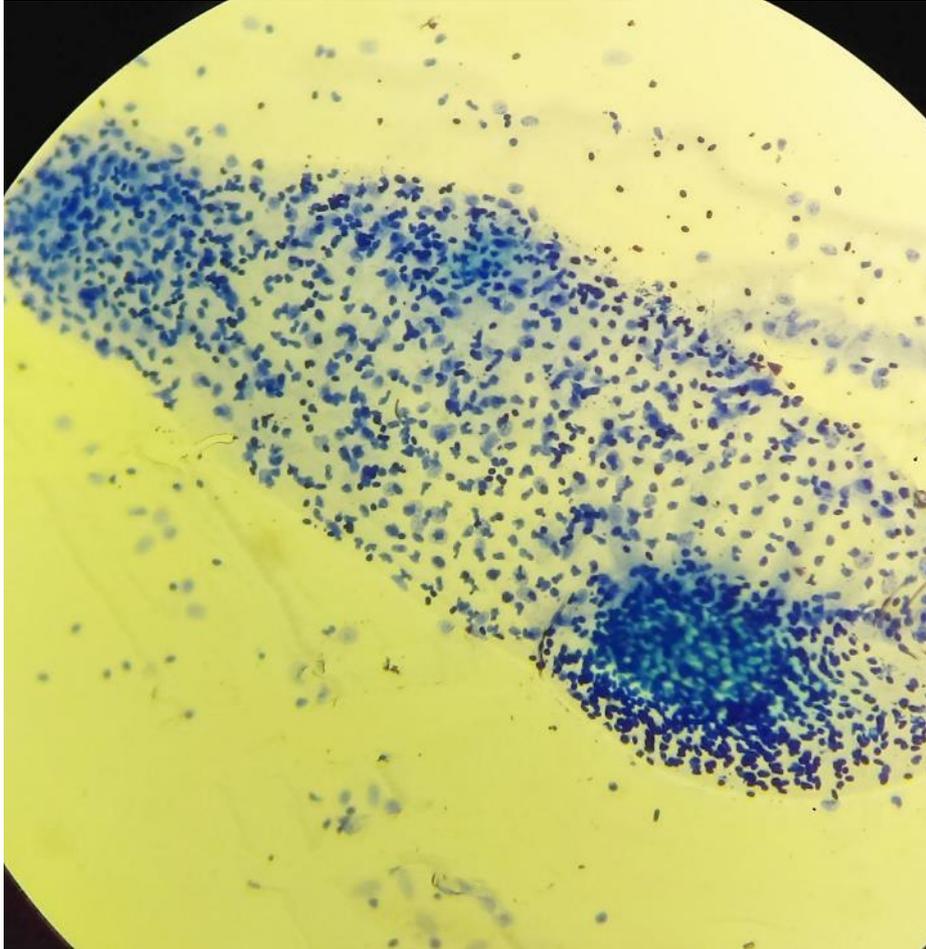


Figura 102. Cromosomas del cíclido macho adulto.

Actualmente, se encuentran en proceso de conclusión tres proyectos de tesis para la determinación del cariotipo entre las dos diferentes especies aparentes de cíclido joya (*H. guttatus* y *H. letourneuxi*), la determinación del cariotipo de los machos YY y la determinación del cariotipo de *H. minckleyi*.

Competencia interespecífica entre *H. guttatus* y *Herichthys minckleyi*

Las observaciones fueron registradas en etogramas para cada pecera, los cuales se muestran en la Tabla 18. Entre las observaciones más destacadas se encuentra la agresión que se observó entre los individuos de la especie nativa, ya que, de los cuatro tratamientos, en tres de ellos se mostró mortalidad a causa de la agresión de parte de sus compañeros. Así mismo, las peceras colindantes con ejemplares de *H.*

minckleyi pasaban más tiempo desplegando conductas agresivas a través del vidrio de la pecera hacia sus conspecíficos.

Por otro lado, en el ensayo de competencia interespecífica, los peces nativos solo mostraron la iniciativa en las interacciones antagónicas el primer y segundo día, permitiendo a los cíclidos joya tomar posesión del refugio, y buscando más activamente el alimento, a diferencia de los invasores que se mostraban renuentes a salir del refugio para alimentarse.

Tabla 18. Cuantificación de agresiones en ambos tipos de competencia (intraespecífica con *H. minckleyi*; interespecífica con joya y nativos). Las celdas en cero representan la muerte de uno de los peces dentro del periodo.

| COMPETENCIA | TRATAMIENTO | DIAS | | |
|-----------------|-------------|--------|---------|----------|
| | | 1 al 5 | 6 al 10 | 10 al 15 |
| INTERESPECIFICA | CA/CR | 7 | 4 | 36 |
| | CA/SR | 10 | 6 | 47 |
| | SA/CR | 15 | 0 | 0 |
| | SA/SR | 47 | 5 | 31 |
| INTRAESPECIFICA | CA/CR | 19 | 70 | 52 |
| | CA/SR | 19 | 0 | 0 |
| | SA/CR | 0 | 0 | 0 |
| | SA/SR | 91 | 0 | 0 |

Como era de esperarse se apreció una mayor frecuencia de agresiones en los tratamientos sin alimento ni refugio, y una tendencia hacia el incremento en las interacciones antagónicas conforme transcurrían los días de observación en los tratamientos con alimento y refugio.

Reversión sexual

La efectividad relativa de los químicos en la feminización de los cíclidos depende del tipo de hormona, la especie, la etapa larval, la dosis y la duración del tratamiento (El-Sayed 2006). Así, los resultados observados en el presente estudio concuerdan con los de Rosenstein y Hulata (1992) quienes intentaron feminizar a la tilapia de Mozambique (*O. mossambicus*) utilizando inmersiones cortas de huevos fertilizados en una solución con Flutamida y de Flutamida + Progesterona, pero encontraron un número similar de hembras y machos que en el tratamiento control. No obstante, estos mismos autores reportaron 100% de reversión utilizando agentes estrogénicos (Etinil-Estradiol y Dietilestilbestrol), de manera similar al presente estudio.

Adicionalmente, los efectos observados por la exposición de las larvas del cíclido joya al Estradiol también concuerdan con lo reportado por otros autores quienes pudieron comprobar que el Estradiol afectaba negativamente la supervivencia de las larvas del cíclido convicto (*Amatitlania nigrofasciata*) (George y Pandian, 1996). No obstante, se debe considerar que diferentes factores pueden afectar la supervivencia, tales como la sensibilidad de la especie, el tiempo de exposición y la concentración de los químicos, siendo estos los más importantes. Así mismo, se ha encontrado que el Estradiol afecta negativamente el crecimiento durante la exposición al esteroide (George y Pandian, 1996; Karsli, Aral y Yes, 2016). Sin embargo, se ha reportado que se reestablece el crecimiento normal meses después de suspender la exposición al mismo (Babiak et al., 2012; Schill, Heindel, Campbell, Meyer y Mamer, 2016; Wang et al., 2008). Este efecto negativo sobre el crecimiento se puede atribuir a que, el Estradiol actúa a nivel de la pituitaria incrementando la cantidad de receptores de la

Somatostatina (SRIF-14) afectando consecuentemente la síntesis y secreción de la GH (Cardenas et al., 2003).

Otro de los aspectos que se observó que variaba es el factor de condición. El factor de condición es normalmente utilizado para comparar la relación que existe entre la longitud y el peso y se ha relacionado con el bienestar general y la salud del pez (Reynold, 1968). A este respecto, no se encontraron diferencias estadísticas entre el factor de condición de hembras y machos del tratamiento control, resultados similares se han reportado en otros cíclidos como la tilapia (Khallaf et al., 2003). Sin embargo, fueron notables las diferencias altamente significativas ($P > 0.001$) entre ambos sexos del grupo control comparados con las hembras resultantes de la reversión por el tratamiento con Estradiol, siendo el factor de condición significativamente más alto en éstas últimas. A este respecto se ha reportado que el factor de condición de las hembras está relacionado con el desarrollo gonadal (Le Cren et al., 1951) y que este factor puede fluctuar de acuerdo a la estación del año (El-Sayed et al., 2007) y con el contenido de grasas y proteínas encontradas en el cuerpo del pez (Salam y Davies, 1994), muy posiblemente provenientes de la gónada. Lo que a la vez concuerda con una disminución en el factor de condición después de la temporada reproductiva, (Khallaf, 1986). Por consiguiente, las diferencias observadas en el presente estudio podrían ser explicadas en función del desarrollo gonadal de los juveniles. En relación con esto, no se pudo estimar el índice gonadosomático debido a lo diminuto de los ejemplares y la dificultad para extraer la totalidad de las gónadas.

Sin embargo, más allá de la mortalidad y el factor de condición vale la pena resaltar la efectividad del tratamiento de exposición de las larvas al Estradiol el cual culminó en la producción de Neohembras comprobadas al momento del establecimiento de parejas y su reproducción.

Contrariamente al tratamiento con Estradiol, los ejemplares expuestos a la Flutamida no mostraron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia, ni al factor de condición, lo cual posiblemente se deba a la concentración de Flutamida utilizada. Sin embargo, en el experimento de Flutamida al igual que en el de Estradiol, la longitud total y el peso de los organismos tratados fue significativamente diferente de los organismos del tratamiento control esto se podría atribuir a que la flutamida interviene con el hipotálamo inhibiendo la acción de los andrógenos y de esta manera es capaz de generar un ambiente estrogénico que puede desembocar en efectos similares al tratamiento de estradiol incluyendo un aumento de estradiol en el suero sanguíneo (Jensen et al., 2004).

En el presente estudio se llevaron a cabo tratamientos de reversión sexual con larvas del cíclido joya utilizando nauplios como vehículo de los tratamientos hormonales. Como era de esperarse en el tratamiento control la proporción de sexos no fue diferente de la proporción esperada de 1:1, lo que confirma que no existió una influencia marcada de la temperatura en la reversión sexual. Esto debido a que la temperatura es uno de los factores de mayor importancia durante la diferenciación sexual en peces teleósteos, ya que suele influir en la proporción de sexos. Aunque no se han reportado estudios de la influencia de la temperatura sobre la proporción de sexos en especies de cíclido joya, en la tilapia *Oreochromis niloticus* se ha determinado una temperatura umbral de 36 °C, más allá de la cual se han registrado niveles significativos de masculinización de los organismos (Bezault et al., 2007; Azaza et al., 2008).

En lo que respecta a la efectividad de los tratamientos hormonales, se logró la feminización del 100% de las larvas de cíclido joya expuestas a 17 β -estradiol a una concentración de 200 mg/kg de los nauplios de artemia enriquecidos, sin afectar significativamente el crecimiento y supervivencia de los organismos. Cabe destacar que en el presente

estudio se asumió un 100% de asimilación de estradiol por los nauplios de artemia. Sin embargo, se ha reportado que los nauplios enriquecidos con estradiol pueden llegar a perder hasta 13% de la hormona asimilada después de 4 horas del enriquecimiento (Martin-Robichaud, et al., 1994), por lo cual es posible que la concentración real de estradiol ingerida por las larvas de cíclido joya haya sido menor. Independientemente de esto, la alimentación de las larvas de cíclido joya con los nauplios enriquecidos a esta concentración logró el 100% de reversión sexual. En estudios similares se ha logrado un 100% feminización en larvas de la lobina *Micropterus salmoides* y un 98% en larvas del lumpo *Cyclopterus lumpus*, utilizando nauplios de artemia incubados en estradiol a una concentración de 5 y 20 mg/L, respectivamente (Garrett, 1989). Ya que estos autores no reportan la densidad de nauplios presentes en el medio de enriquecimiento, no es posible comparar estas concentraciones con las utilizadas en el presente estudio; no obstante, esto reafirma la efectividad de la administración del estradiol por este medio.

En cuanto, al tratamiento de masculinización, aunque el porcentaje de machos fue mayor que en el control (50% y 41.6% respectivamente), no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proporción de sexos. Aunque en la estrategia empleada para la producción de machos YY no es necesario ningún paso de masculinización, el tratamiento con fadrozol se llevó a cabo para contar con un control negativo de expresión de la aromatasa, ya que en el tratamiento control se esperaba una proporción sexual de 1:1, por lo que en los análisis moleculares se obtendría niveles de expresión genética de machos y hembras. La baja eficiencia de tratamiento de masculinización probablemente se deba a que es requerida una mayor concentración de fadrozol para el cíclido joya. Sin embargo, en otras especies de peces se ha logrado un 100% de reversión con la misma dosis de fadrozol, e incluso se han alcanzado niveles significativos de masculinización a concentraciones más bajas. Por ejemplo, empleando una concentración similar a la utilizada en el

presente estudio (100 mg/kg de alimento) se logró la masculinización del 100% de hembras de *Danio rerio*, y hasta un 62.5% de masculinización al administrar 10 mg/kg (Uchida et al., 2004). En el lenguado *Paralichthys olivaceus*, a 100 mg/kg se alcanzó el 100% de reversión, y una dosis de 1 mg/kg de fadrozol logró masculinizar a un 25% de las hembras, lo cual es estadísticamente significativo (Kitano et al., 2000). No obstante, en otras especies de cíclidos se han reportado resultados contradictorios, como en la tilapia *Oreochromis niloticus*, para la cual se ha reportado un 100% de masculinización con dosis de 75 o 100 mg/kg durante 30 días (Afonso et al., 2001).

Si bien, en los estudios anteriores el fadrozol se administró a través de una dieta, no se puede descartar un efecto por la forma de administración, ya que no se ha reportado enriquecimiento de nauplios con fadrozol para tratamientos de reversión sexual. En cambio, como se mencionó anteriormente, al enriquecer nauplios con 17β -estradiol se han reportado pérdidas de la hormona después del enriquecimiento (Martin-Robichaud et al., 1994). Por lo cual se vuelve necesario confirmar si la concentración de fadrozol disminuye en los nauplios después del enriquecimiento.

Análisis morfométrico

Ya que el cíclido joya tiene un dimorfismo sexual limitado se realizó un análisis morfométrico con el objetivo de revelar diferencias estructurales entre los sexos de las etapas larvales de esta especie. Este análisis ha probado ser efectivo para evidenciar diferencias estructurales entre géneros en *Limanda ferruginea* (Cadrin y Silva, 2005), entre polimorfismos de *Cichlasoma citrinellum* (Meyer, 1990), y polimorfismos de *Salvelinus alpinus* (Adams et al., 1998). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las estructuras de ambos sexos del cíclido joya al compararse con una prueba de Mann Whitney. Por otro lado, al realizar

un análisis de regresión entre las medidas registradas se observó que la relación entre la longitud de la cabeza – longitud estándar, longitud de la cabeza-longitud total y longitud de la cabeza-altura del cuerpo, fueron diferentes entre machos y hembras, siendo la relación de estas medidas mayor en machos que en hembras, pero al compararse las correlaciones de las medidas sin tomar en cuenta la longitud de la cabeza no se observaron diferencias. Estos resultados sugieren un dimorfismo sexual estructural definido por el carácter de la longitud de la cabeza. Resultados similares han sido reportados previamente para el pargo (*Pagrus auratus*) (Moran *et al.*, 1999). Esto permite establecer con claridad que la alometría del cíclido joya es distinta en hembras y machos siendo la longitud de la cabeza de estos últimos el carácter que causa esta diferencia y que por ende permite identificar a sus géneros.

Identificación de la especie invasora y origen de la invasión

En función de las observaciones moleculares (por medio de la técnica de Barcode) de los individuos recolectados en Cuatrociénegas, se pudo constatar la presencia de una especie distinta a la reportada originalmente por Contreras y Ludlow (2003). No obstante, las observaciones morfológicas indican la posible presencia de otra especie, variedad o un híbrido (lo que sólo se podría elucidar mediante el análisis de genes nucleares). A este respecto son varias las posibles teorías acerca de la ocurrencia de dos especies invasoras en el valle de Cuatrociénegas.

- **Especies comerciales mezcladas**

Al tratarse de especies comerciales muy similares es probable que, en virtud de la dificultad para discernir taxonómicamente entre éstas, debido a la complejidad de su morfología, se hallan mezclado al no ser identificadas correctamente. Loiselle (1992) discute esta complejidad y menciona como ha venido creciendo con el tiempo.

Esta no sería la primera vez que las especies se confundieran ya que al inicio de la invasión que acontece actualmente en Florida se creyó que *H. letourneuxi* era *H. bimaculatus* (Rivas 1965) y ejemplares de *H. guttatus* de Cuatrociénegas han sido descritos como *H. bimaculatus* (Aguilar-Aguilar et al., 2014). Por otra parte, Contreras y Ludlow (2003) señalan al momento de describir a *H. guttatus* de las poblaciones de Cuatrociénegas que encontraron, dos ejemplares que presentaban dientes faríngeos centrales molariformes (similares a los de *H. letourneuxi* descritos en el presente informe), indicando que dicha condición merecía un estudio posterior.

Por supuesto que otro factor a tomar en consideración es la falta de conocimiento o de conciencia de algunos vendedores, los cuales no se van a detener a identificar correctamente los ejemplares que venden.

- **Introducciones de dos especies diferentes en Cuatrociénegas en diferentes tiempos.**

A simple vista los ejemplares de *H. guttatus* y *H. letourneuxi* presentan características físicas externas muy similares, que en el pasado debido a la escasa información disponible pudo derivar en una identificación errónea, dando por hecho que todos los individuos representaban a la misma especie. Lo que posiblemente podría significar múltiples introducciones deliberadas, en las cuales se introdujeron diferentes especies.

- **Hibridación de estas especies antes o posteriormente a la introducción**

La hibridación es posible en la naturaleza, pero ésta representa solamente una pequeña porción de las posibles combinaciones entre diferentes especies. No obstante, al ser el acuarismo una industria de moda en la que constantemente se están renovando las variedades, muchos productores se dedican a hibridar diferentes especies de

cíclidos. Un ejemplo se puede encontrar en la siguiente página web <http://www.monsterfishkeepers.com/forums/threads/the-big-cichlid-hybrid-example-thread-load-warning.491862/>

Por lo cual no se puede descartar la posibilidad de que esto hubiera pasado antes de la introducción de los cíclidos invasores en las pozas de Cuatrociénegas. Por otra parte, debido a las condiciones específicas del sitio y en particular al aislamiento de las pozas, esto pudo impulsar al entrecruzamiento de dos especies similares tanto morfológica como genéticamente. La solución a este problema es la construcción de Árboles filogenéticos de distancia genética, para analizar las relaciones de los clados del género.

Considerando estas hipótesis mandamos nuevamente ejemplares con características morfológicas de *H. guttatus* y *H. letourneuxi* para confirmar su identificación por medio de código de barras (Barcode). Los resultados confirmaron que la especie que se encuentra en las pozas en las que se muestreó es *H. letourneuxi*.

- **Hipótesis sobre el origen de la invasión**

De acuerdo con Contreras y Ludlow (2003) la invasión inició a mediados de los 90's, ya que se registraron los primeros avistamientos en 1996, para el siguiente año ellos registraron algunos cientos de peces y para 1998 ya se contaban por miles. Desde nuestro punto de vista la introducción obviamente fue deliberada, considerando la ausencia de las especies en la región y debido al aislamiento de las pozas, pero también debió necesariamente ser muy numerosa en cada una de las pozas. Esto debido a que si se hubieran introducido solo algunos cuantos individuos la invasión no habría prosperado por la presencia y dominancia no solo de los individuos de *H. minckleyi* ya presentes, sino también por la presencia de la lobina (*Micropterus salmoides*) en algunas de las pozas. Debido al atractivo turístico que representa Cuatrociénegas y a que hace 20 años se permitía el acceso recreativo a las pozas es probable

que hubieran introducido al cíclido joya para contar con una mayor variedad de peces e incrementar de esta manera el atractivo de las pozas.

Reproducción en cautiverio de *H. guttatus* y *H. minckleyi*

El establecimiento de las condiciones óptimas para la reproducción de ambas especies radicó en una alimentación de calidad y variada, ajustada a las diferentes etapas de desarrollo, la regulación de la temperatura por medio de microcontroladores, el tipo de sustratos para refugio y reproducción, la luminosidad y variaciones de volumen para imitar su ambiente natural y desde luego del buen manejo de los individuos.

Un aspecto importante dentro de este proyecto era la reproducción de las especies nativas para generar crías y establecer los estudios de mesocosmos. A pesar de que se capturaron solo seis juveniles sin dimorfismo sexual aparente se logró encontrar una proporción adecuada para la formación de dos parejas y actualmente se cuenta con un valioso lote de juveniles que permitirá continuar el estudio planeado. Vale la pena mencionar que los patrones de coloración de los reproductores durante el cortejo y el desove concuerdan con los recién publicados por Oldfield *et al* (2015). Resta aún la obtención de crías de *C. bifasciatus*.

Cariotipo

El establecimiento de la técnica para conocer el cariotipo de *H. guttatus* contribuirá sin duda al reconocimiento de los machos YY y permitirá igualmente corroborar la presencia de algunos de los genes secuenciados en los cromosomas. Mientras que en el caso de *H. minckleyi* hasta el momento sólo se dispone de información fenotípica, pero se carece de información sobre el patrón cromosómico y su respectiva tipificación. De aquí que el establecimiento de una técnica

citogenética adecuada contribuirá a sentar las bases para su precisa identificación taxonómica, lo que a su vez permitirá conocer mejor su situación filogenética y la identificación de polimorfismos.

Vitelogenina

Más allá de las dificultades técnicas que se presentaron (fuga de las columnas de cromatografía), sin duda el reto más grande en este estudio fue la obtención de muestras de plasma y gónada suficientes para la purificación, particularmente debido al diminuto tamaño de los reproductores (menos de 2 cm). Afortunadamente este aspecto fue compensado con la implementación de una técnica indirecta para cuantificar la vitelogenina. Esta técnica, basada en la cuantificación de fosfatos presentes en esta proteína, cumple con los requisitos para considerarla válida. En primera instancia, la técnica asegura la separación de lipofosfoproteínas con un solvente orgánico, eliminando otras proteínas fosforiladas del metabolismo celular. Mientras que los fosfatos de los fosfolípidos son eliminados durante los lavados con etanol. De tal forma, que los fosfatos cuantificados provienen de la vitelogenina la cual es producida desde que las hembras entran en pubertad y se incrementa en cada temporada reproductiva. No obstante, los machos cuentan con el mecanismo sintético en los hepatocitos para producirla, aunque ante la imposibilidad de ser capturada por los ovocitos, por no tener ovarios, esta queda en la circulación. En este sentido, como era de esperarse, la concentración de fosfatos fue más elevada en hembras, para todos los tejidos analizados. Sin embargo, cuando ajustamos el contenido de fosfatos con la proteína soluble, lo anterior fue particularmente válido para aquellos tejidos directamente involucrados en la acumulación (gónada 9.8 veces mayor en hembras) y transporte (plasma 8.38 veces mayor en hembras) de la vitelogenina. En el caso del hígado, responsable de la síntesis de vitelogenina, esta relación fue apenas 1.04 veces mayor en hembras, lo cual puede ser atribuido a que,

como se mencionó, los machos tienen igualmente la capacidad de sintetizar vitelogenina. La presencia de vitelogenina en machos se ha atribuido a que puede tener funciones diferentes a las hembras o bien por exposición a compuestos estrogénicos ambientales o provenientes del alimento. En el caso de las branquias y músculo esta relación fue 2.98 y 2.7 veces mayor en hembras respectivamente, lo cual puede estar relacionado con la irrigación sanguínea de estos tejidos. Sin embargo, en el caso del mucus esta relación se invierte resultando 3.17 veces mayor en machos, lo cual puede ser explicado por el papel de la vitelogenina en el mucus, en donde puede servir como fuente de alimento en aquellos cíclidos que exhiben un comportamiento parental, como el caso del cíclido joya Africano (Kishida & Specker 1994; Kishida & Specker 2000), y se ha hipotetizado que el mucus puede desempeñar un papel significativo como vía excretoria, particularmente en los machos que carecen de un sitio de deposición (ovario) para la vitelogenina (Moncaut et al. 2003).

Marcadores moleculares

Esta parte trabajo se enfocó en identificar y evaluar la expresión de algunos de los genes de determinación y diferenciación sexual en ejemplares de *H. guttatus*, ya que esto permitiría evaluar la eficiencia de la reversión sexual en machos feminizados para el control de esta especie invasora. Sin embargo, debido a la ausencia de secuencias nucleotídicas publicadas del genoma de *H. guttatus* fue necesario tomar en cuenta lo reportado para otros cíclidos relacionados. Adicionalmente, para poder hacer estos estudios cuantitativos se buscó un gen *housekeeping* que permitiera evaluar eficientemente los niveles de expresión.

Los genes candidato se seleccionaron con base en la comparación de sus niveles de expresión tanto en gónada como en cerebro, ya que en estos dos tejidos ocurre la determinación y diferenciación sexual,

eligiendo los transcritos que comúnmente presentan sobreexpresión diferencial en gónadas (ovario y testículos).

Cuando se realizaron los estudios de PCR punto final empleando DNAG de hembras y machos, se demostró por primera vez que los genes *Amh*, *Cyp11b1*, *Ctnnb1b*, *Dmrt1*, *Wnt4b*, *Foxl2a*, *Figl2a*, *Cyp19a1a*, *Dax1a* y 18s ribosomal están codificados en el genoma de *Hemichromis sp.*; tal como ha sido reportado en los otros cíclidos, confirmando que pertenecen a la misma familia y que pueden estar usando una ruta molecular común a otros peces para la determinación y diferenciación del sexo.

Adicionalmente, se demuestra la presencia de exones e intrones en los genes *Wnt4b* y *Cyp19a1*, ya que al realizar los ensayos de RT-PCR se ve una diferencia de más de 100 pb, tal como sucede en algunos genes que sufren edición.

Al evaluar si los genes de interés además de estar codificados en el genoma podrían estarse expresando, sugiriendo su participación durante el desarrollo y definición sexual, quedo demostrado que todos ellos se expresan en gónada en la etapa adulta, 100 DDE. Es por esto que para confirmar la importancia de los genes previamente descritos y su participación en las rutas de diferenciación sexual es necesario realizar al menos tres diferentes ensayos de qPCR: 1) durante el desarrollo después de la eclosión, 2) en la fase adulta y 3) durante el tratamiento hormonal para feminización o masculinización. De esta manera se podría estar evaluando la reversión sexual por tratamientos y las rutas implicadas de manera normal. Es por esta razón que el contar con un gen de referencia como lo es el gen 18s rRNA será de gran ayuda para los análisis posteriores. Adicionalmente, el análisis de expresión de los genes seleccionados se hará a los 75 y 95 días después de la eclosión. Para lo cual, peces de cada uno de los diferentes acuarios (divididos en controles, tratamiento con estradiol y tratamiento con Fadrozol), ya se obtuvieron. El análisis de expresión de los genes se podrá realizar tanto de cerebro como de las gónadas, por lo que cada pez ya se dividió en tronco y cabeza. Hasta ahora, se ha realizado solamente el

procesamiento y extracción exitosa de RNA total de las muestras de 75 días.

Finalmente, es un reto genómico el trabajar con una especie cuyo DNA no está descrito y es por esto que estamos cerca de enviar el resto de todos los fragmentos clonados a secuenciar para compartir y difundir la información hasta aquí generada.

Aromatasa

La razón por la cual no se encontraron variaciones importantes en los niveles de expresión de aromatasa entre hembras y machos es intrigante, sin embargo, observaciones recientes realizadas por Böhne et al (2013 y 2014) revelaron que a pesar de que los patrones de expresión del gen *cyp19a1A* y *cyp19a1B* en una especie estudiada (*N. pulcher*) era consistente con la tendencia general en los teleósteos, i.e. la expresión de la copia A en los ovarios y la copia B en el cerebro, un miembro de la extraordinariamente diversa tribu de cíclidos, los haplocrominos (*A. burtoni*), mostró un patrón fuera de lo común. En *A. burtoni*, el *cyp19a1B* se encontró que estaba sobreexpresado en los testículos y no en el cerebro. También el *cyp19a1A* muestra una desviación de la tendencia general en los teleósteos, ya que en el caso de un miembro de la tribu de los Ectodinios (*O. ventralis*), se detectaron niveles de expresión similares de *cyp19a1A* en testículos y ovarios. Sorprendentemente, también encontraron que en esta especie se sobreexpresaba en los testículos un gen del receptor de estrógenos (*esr2b*) y en *A. burtoni*, especie en la que se sobreexpresaba el gen de la aromatasa típica del cerebro (*cyp19a1B*) en los testículos, también sobreexpresaba en los testículos un gen del receptor de estrógenos (*esr1*). Igualmente, de forma paradójica encontraron que el gen del receptor de los andrógenos *arB* estaba sobreexpresado en los ovarios de *O. ventralis* y *J. ornatius*.

Se ha tratado de explicar la sobreexpresión de la aromatasa en los testículos como un mecanismo para sobreproducción de estrógenos lo que provoca agresividad en los cíclidos, no obstante, los estrógenos que confieren agresividad al parecer no son de origen testicular (Böhne et al.,

2014). Por otra parte, existen sitios de unión en el promotor de *cyp19a1A* para *SF-1* y *Dmrt-1* (factores transcripcionales importantes en la regulación embriológica masculina) y la expresión de ambos factores es consistente con la acción represiva de estos factores transcripcionales sobre la expresión de *cyp19a1A* en los testículos.

Una explicación más plausible es la participación de la aromatasa como productora de estrógenos para la inducción de la mitosis durante las primeras etapas de la espermatogénesis (Miura y Miura, 2001). En efecto, Blasco et al. (2010) observaron la expresión del gen *cyp19a1A* durante la diferenciación de los testículos y que su expresión seguía aumentando con la edad. En el mismo sentido, pero con algunas variaciones Viñas y Piferrer (2008) observaron que la expresión del gen *cyp19a1A* se incrementaba de la etapa de espermatogonia a espermatocito, pero decrecía en la transición de espermatida a espermatozoide en larvas del robalo (*Dicentrarchus labrax*). Por otra parte, se ha demostrado que los tratamientos con Estradiol inducen las etapas finales de la espermatogénesis en la dorada (*Sparus aurata*) (Viñas y Piferrer 2008).

En conjunto estas observaciones indican la importancia del balance relativo de esteroides sexuales durante el periodo de la gonadogénesis y la complejidad de la participación de enzimas en la producción de hormonas claves para el desarrollo de estos procesos de manera específica.

Expresión de aromatasa durante la reversión sexual

En este trabajo se pretendía asociar la expresión del gen *cyp19a1a* con la reversión sexual en el cíclido joya, tal como ha sido reportado en otros teleósteos (Ijiri et al., 2008). Los resultados sugieren que efectivamente a los 15 DDE la aromatasa se estaba expresando. No obstante, los niveles de expresión no pudieron ser cuantificados por la presencia de dos bandas inespecíficas de 306 y 550 pb en la electroforesis del producto de la qPCR, lo cual se corroboró con la presencia de 3 picos en la curva de disociación. Cabe mencionar que durante la estandarización se

amplificó cDNA obtenido de organismos juveniles (>30 DDE) o de gónadas de adultos, por lo que es posible que esta banda corresponda a un transcrito específico del día 15 DDE. En cuanto a la banda de 300 pb, ya que corresponde al tamaño esperado de aromatasa en DNA genómico, posiblemente sea producto de contaminación por DNA durante la extracción del RNA. Algo común durante el procedimiento de extracción de RNA por Trizol en muestras pequeñas, ya que durante la precipitación con cloroformo las fases están muy cercanas por lo que existe una importante probabilidad de contaminación durante el pipeteo (Gayral et al., 2011).

A pesar de estas dificultades técnicas, si se logró observar un producto de ~208 pb, correspondiente al tamaño esperado para la aromatasa en cDNA, lo que sugiere la existencia de expresión a los 15 DDE. Además, el análisis semicuantitativo en el fotodocumentador mostró variaciones en la intensidad relativa de este fragmento en las muestras. Específicamente la banda más intensa fue 10.73 veces mayor respecto a la banda más tenue, lo que presumiblemente puede reflejar diferencias en los niveles de expresión de aromatasa entre machos y hembras en este día.

El mismo análisis se realizó para las muestras de larvas a los 30, 45 y 60 DDE, y en estos casos no se observó el fragmento esperado. Debido a que no se obtuvo amplificación de aromatasa a los 30, 45 y 60 DDE, es probable que este gen se haya expresado de forma significativa en un período muy precoz y hasta antes de los 30 DDE. De hecho, mediante histología se ha revelado la presencia de estructuras gonadales en tilapia (*Oreochromis niloticus*) a los 15 días después de la fertilización (DDF) y para el día 36 DDF los ovarios ya son distinguibles. En cuanto a la aromatasa, en esta misma especie se ha reportado que los niveles de expresión difieren entre machos y hembras a partir de los 8 DDE (Li et al., 2013) e incluso se han encontrado incrementos significativos en hembras desde los 5 DDE (Tao et al., 2013). Por lo cual no se descarta que los patrones de expresión de la aromatasa en el cíclido joya pudieran ser similares a los de la tilapia.

Aunque, no fue posible correlacionar los niveles de expresión de la aromatasa con los tratamientos de reversión sexual, si fue posible cuantificar la expresión de otro gen asociado al desarrollo sexual, *foxl2*. El gen *foxl2* codifica un factor de transcripción que está implicado en la diferenciación sexual, inhibiendo la acción de genes masculinos y promoviendo la expresión de la aromatasa (Li et al., 2013; Tao et al., 2013). Específicamente se une a la región promotora del gen *cyp19a1a*, la cual tiene diversos sitios de unión para este factor transcripcional, activando su transcripción a través de su dominio forkhead (Wang et al., 2007).

Por el número de muestras solo fue posible evaluar la expresión de *foxl2* en los días 30, 45 y 60 DDE, observándose que a los 30 DDE la expresión relativa fue mayor para el tratamiento control, respecto al de masculinización, aunque no de forma significativa ($P= 0.11$). Lo cual era de esperarse dado que ambos presentaron la misma proporción de sexos. No obstante, el tratamiento de masculinización mostró niveles de expresión más cercanos a los del tratamiento de feminización ($P= 0.79$), lo que sugiere que el fadrozol si pudo haber influido en la expresión genética de los organismos expuestos a este tratamiento. Lo cual explicaría el incremento (no significativo) en el número de machos (50%) con respecto al control (41.6%), aunque los niveles no fueron suficientes para lograr la reversión de un mayor número de ejemplares. Por lo que se podría esperar que a una mayor concentración de fadrozol los niveles de *foxl2* pudieran descender aún más.

De hecho, se ha reportado que en hembras de tilapia la expresión de *foxl2* en las gónadas disminuye durante un tratamiento de masculinización con fadrozol a una concentración de 200 mg/kg de alimento (Sun et al., 2014). Mientras que una concentración igual a la que se utilizó en el presente estudio reduce significativamente la expresión de *foxl2* en el tejido ovárico del bagre *Silurus meridionalis* (Liu et al., 2003).

De forma contraria a la esperada, la expresión de *foxl2* en el tratamiento de feminización fue significativamente menor que en el control a los 30 DDE ($P> 0.01$). Esto podría deberse a una retroalimentación negativa en

donde el estradiol exógeno fue suficiente para llevar a cabo la diferenciación sexual suprimiendo la subsecuente expresión de *foxl2*. No obstante, no se ha reportado la disminución en la expresión de *foxl2* por tratamiento con estradiol exógeno en otras especies. De hecho, se ha reportado lo contrario; en la tilapia *Oreochromis niloticus* la expresión de *foxl2* aumentó en hembras normales y revertidas a los 10 y 20 DDE, mientras que en machos no se observaron niveles significativos (Wang et al., 2007). De igual forma, del ciprínido *Gobiocypris rarus* y de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* a tratamientos con estradiol produce un aumento en los niveles de expresión de *foxl2* (Wang et al., 2012). Igualmente, en medaka, *Oryzias latipes*, la administración de estradiol conduce a un aumento en los niveles de expresión de *foxl2* en días posteriores a su administración (Nakamoto et al., 2006). Incluso, la delección de *foxl2* en el genoma de hembras de la tilapia *Oreochromis niloticus* ocasiona distintos grados de degeneración en las estructuras ováricas, e incluso la reversión sexual completa en algunos individuos (Li et al., 2013), corroborando su importancia en los eventos de diferenciación de las hembras.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la proporción de sexos, la expresión de *foxl2* en los organismos feminizados es la única que se puede asociar con el sexo fenotípico, ya que los otros tratamientos mostraron una proporción de sexos cercana a 1:1. De hecho, solo en los organismos tratados con estradiol se observó que los niveles de expresión relativa de *foxl2* presentaron normalidad estadística, mientras que en el tratamiento control los niveles no fueron normales, lo cual probablemente deriva de que en este último tratamiento existe un patrón bimodal de expresión: uno para hembras y otro para machos, algo que ya ha sido reportado en los niveles de esteroides sexuales durante la etapa de diferenciación sexual en tilapia (Hines et al., 1999).

A los 45 DDE no se encontraron diferencias en la expresión de *foxl2* en los tratamientos. Además, los niveles encontrados en el tratamiento control no mostraron un aumento significativo respecto al día 30 DDE, aunque los

niveles si fueron significativamente mayores para los tratamientos de feminización y masculinización respecto al muestreo anterior. Esto parece indicar que el estradiol y fadrozol continuaron ejerciendo su efecto a través del tiempo. A los 60 DDE los niveles de expresión de este gen disminuyeron, de acuerdo con pruebas de RT-PCR. Por lo cual posiblemente en el cíclido joya los niveles de expresión de este gen alcancen un máximo entre los 30 y 60 DDE y posteriormente descienden a niveles basales.

Tomando en cuenta que en el tratamiento control los niveles no aumentaron significativamente entre el día 30 y 45, y que disminuyeron hacia el día 60, es probable que el tiempo de exposición a estradiol se pudiera acortar, reduciendo el uso de reactivos y alimento vivo, ya que es recomendable una intervención mínima. Por lo que sería recomendable realizar pruebas reduciendo el tiempo de duración de la exposición a estradiol. En efecto, el período sensible para la reversión sexual en tilapia se encuentra entre los días 14 y 30 DDE (Mair et al., 2011), y ya que el género *Oreochromis* se encuentra filogenéticamente muy cercano de *Hemichromis* (Farias et al., 1999), es probable que el periodo de exposición también se pueda reducir a 15 días, en lugar de 45.

Competencia interespecífica entre *H. guttatus* y *H. minckleyi*

Una de las razones por las que los peces de la especie invasora defendían el refugio era por la cercanía a su madurez sexual, ya que como menciona Pinho-Neto et al. (2014) los machos y las hembras desarrollan conductas más agresivas para asegurar su reproducción. De acuerdo a Johnsson et al. (1999), la inversión de energía en la defensa del territorio incrementa su valor para el residente, haciendo más difícil que los intrusos o la especie competidora pueda despojarlo, si a esto se le agrega que los peces nativos aún están en un estadio juvenil.

El sexo de los juveniles nativos podría contribuir a explicar la cantidad de agresiones registradas, ya que se ha demostrado que los machos son más

propensos a iniciar las interacciones antagónicas, aunque según Johnsson *et al.* (2001), no necesariamente las ganan.

Línea de tiempo del proyecto

Con el fin de justificar nuestro retraso en la consecución de los objetivos nos permitimos explicar algunas externalidades que dieron pie a que el proyecto no se concluyera como se había planeado.

- Recibimos la notificación de la aprobación del proyecto el 19 de Septiembre del 2013. En ese momento solicitamos postergar la erogación de los recursos hasta obtener los permisos de colecta de SEMARNAT (Dirección General de Vida Silvestre) y SAGARPA (CONAPESCA), ya que de otra manera correría el tiempo del proyecto sin haber colectado los peces
- El 2 de Mayo del 2014 la DGVS nos otorgó el permiso para la recolecta de las especies nativas
- El permiso de recolecta de la especie invasora por parte de CONAPESCA desafortunadamente nos fue otorgado hasta el 1ero de Septiembre del 2014, no obstante haberlo solicitado un año antes
- El trámite para el depósito del recurso inició en junio del 2014, incluyendo un convenio entre CONABIO y la UANL. El depósito se pudo realizar hasta finales de Octubre del 2014.
- El traspaso del recurso de Rectoría la FCB se realizó hasta Diciembre del 2014
- Nuestro laboratorio tuvo acceso al recurso hasta Enero del 2015
- Como se aclara en el informe los primeros meses del 2015 fueron sumamente fríos por lo que no podíamos muestrear y el primer muestreo lo realizamos el 20 de Marzo del 2015
- Los siguientes muestreos se realizaron en Junio y Noviembre, solo que en Septiembre del 2015 venció el permiso para la recolecta de la especie invasora, mismo que solicitamos a CONAPESCA de

inmediato, pero se negaron a renovarlo, lo que retrasó la formación de parejas. De aquí que fuera hasta finales de Mayo del 2015 cuando obtuvimos los primeros desoves.

CONCLUSIONES

El método de reversión sexual por medio de Estradiol fue sumamente eficaz logrando generar neohembras comprobadas mediante la formación de parejas y su reproducción lo que garantiza la existencia de una proporción de machos YY, algunos de los cuales ya tienen 100 días de edad y que por lo tanto ya podrán ser sexados

La reproducción en cautiverio de *H. minckleyi* abre una interesante perspectiva para la repoblación de la especie como estrategia para la recuperación de sus poblaciones. En efecto, si en el futuro próximo además de introducir los machos YY de *H. guttatus/letourneuxi*, se introducen al mismo tiempo juveniles de *H. minckleyi*, se incrementan las posibilidades de restaurar el equilibrio original de los ecosistemas de las pozas

La estrategia multidisciplinaria para establecer marcadores moleculares, bioquímicos y citogenéticos dio resultado, ya que actualmente se cuenta con una prometedora batería de genes que en poco tiempo nos permitirán discernir con precisión el género de las larvas. De igual manera, el establecimiento de la técnica de fosfatos vía álcali para estimar la vitelogenina y la tipificación de los cromosomas por medio del cariotipo permitirá corroborar las identificaciones moleculares y bioquímicas, lo que además será complementado por la técnica de squash gonadal y del análisis morfométrico.

Un logro considerable es contar ya con las secuencias que permiten confirmar que en el genoma de *H. guttatus* están presentes los genes de

diferenciación sexual *Dmrt1*, *Cyp11b2*, *Amh* y *Wnt4b* reportados para machos; mientras que para hembras están los genes *Figla*, *Wnt4a* y *Ctnnb1B*. Aunque mediante la amplificación ya se había determinado previamente que no había diferencia en el tamaño de amplificadas en DNA y cDNA, con excepción de *Wnt4b*; con el análisis de la secuenciación se pudo determinar que en efecto el resto de los amplificadas corresponden a fragmentos de secuencias codificadoras en las cuáles no hay intrones. En el caso de *Wnt4b*, se anotó un intrón de 90 nucleótidos entre 2 exones. El conocimiento de esta información es parte de los primeros grupos de secuencias que serán reportadas para *H. guttatus*. Para conocer más del genoma de *H. guttatus*, estas secuencias podrían usarse como sondas para localizar los genes en los cromosomas y/o aislar los genes completos. Además, con estos genes ahora identificados, se podría diseñar un kit de para realizar ensayos de expresión competentes para identificación de sexo del cíclido joya africano.

Así mismo, con las herramientas bioinformáticas fue posible analizar y modelar las secuencias y marcos de lectura para cada uno de los genes de interés de este proyecto, confirmándose su identidad y posible función.

Los ensayos de control del cíclido joya no se lograron llevar a cabo por falta de presupuesto, ya que de la propuesta original a la fecha la paridad del peso con el dólar cambió en una proporción considerable y los recursos económicos se agotaron. De hecho, recurrimos a otros proyectos de nuestro laboratorio para la compra de reactivos y la continuación de los estudios de cariotipo y moleculares. Por otra parte, estos ensayos requieren de estudios de varias generaciones como se explica en la introducción para probar su eficacia, lo que implicaría años de seguimiento. No obstante, el desarrollo de la tecnología ha sido llevado a cabo con éxito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C. E., Fraser, D., Huntingford, F. A., Greer, R. B., Askew, C. M. & Walker, A. F. 1998. Trophic polymorphism amongst Arctic charr from Loch Rannoch, Scotland. *Journal of Fish Biology* 52(6): 1259–1271.
- Afonso, L. O., Wassermann, G. J., Terezinha de Oliveira, R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *The Journal of Experimental Zoology*. 290(2): 177-181.
- Aguilera, C. J. 1998). Conservación en cautiverio de peces amenazados del noreste de México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G005. México D. F.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., et al. 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci* 67:121–130.
- Aranda, P. S., LaJoie, Dollie, M., & Jorcyk, L. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2): 366-369.
- Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas. 2008. Monitoreo del Pez Joya (*Hemichromis guttatus*) en el Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Disponible en internet desde: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/cuatrociénegas/info/info.pdf> [Consulta: 16 de febrero de 2011]
- Arriaga, L., Espinoza, J. M., Aguilar, C., Martínez, E., Gómez, L. & Loa, E. 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. *Comisión Nacional Para El Conocimiento Y Uso de La Biodiversidad, México*. 309–311.
- Arukwe, A. & Goksøyr, A. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol*. 2:4.
- Azaza, M. S., Dhraïef, M. N. & Kraïem, M. M. 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, 33(2): 98-105.
- Azeroual, A. & Getahun, A. 2010. *Hemichromis letourneuxi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T182783A7967736. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T182783A7967736.en>. Downloaded on 08 September 2016.
- Babiak, J., Babiak, I., van Nes, S., Harboe, T., Haugen, T., & Norberg, B. 2012. Induced sex reversal using an aromatase inhibitor, Fadrozole, in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*. 324-325.
- Baldry, I. 2000 Effect of Common Carp (*Cyprinus carpio*) on Aquatic Restorations (On-line). Accessed 2 April 2002 at <http://www.hort.agri.umn.edu/h5015/00papers/baldry.htm>.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., & Veitia, R. A. 2004. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 33(3): 705–715.
- Bartley, D. 2000. Responsible ornamental fisheries. *FAO Aquac News* 24:10–14.

- Beardmore, J. A., Mair, G. C. & Lewis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197: 283–301.
- Bergstedt, R. A., Twohey, M. B. 2007. Research to support sterile-male-release and genetic alteration techniques for sea lampre control. *J Great Lakes Res* 33: 48–69.
- Berra, T. M. 2001. *Freshwater Fish Distribution*. Academic Press, Nueva York-Londres. xxxviii + 604 pp.
- Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., Baroiller, J. F. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, 272(S1): S3-S16
- Bhatia, H., Kumar, A., Du, J., Chapman, J. C., & McLaughlin, M. J. 2015. Co-treatment with the non-steroidal anti-androgen drug, flutamide and the natural estrogen, 17 β -estradiol does not lead to additive reproductive impairment in juvenile Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Journal of Applied Toxicology*.
- Black, D. A. & Howell, M. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1014
- Blasco, M., Fernandino, J. I., Guilgur, L. G., Strüssmann, C. A., Somoza, G. M. & Vizziano-Cantonnet, D. 2010. Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(1): 110-118.
- BMELF (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten). 1999. Gutachten über Mindestanforderungen an die Haltung von Zierfischen (Süßwasser). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BMELF), Bonn, Germany. 16 p.
- Böhne, A., Heule, C., Boileau, N. & Salzburger, W. 2013. Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in east african cichlid fishes. *Mol Biol Evol* 30: 2268–2285.
- Böhne, A, Sengstag, T. & Salzburger, W. 2014. Comparative transcriptomics in East African cichlids reveals sex- and species-specific expression and new candidates for sex differentiation in fishes. *Genome Biol Evol* 6: 2567–2585.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C(3): 219–245.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.
- Cadrin, S. X. & Silva, V. M. 2005. Morphometric variation of yellowtail flounder. *ICES Journal of Marine Science*. 62(4): 683–694.
- Carrasco, L., Penman, D. J. & Bromage, N. 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*. 173: 207–218.
- Cell Signaling Technology. 2016. Wnt/ β -Catenin signaling pathway. <http://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-stem-cell-markers/wnt-catenin-signaling-pathway/pathways-wnt>. accesado 6 feb 2016

- Chang, X., Kobayashi, T., Kajiura, H., Nakamura, M. & Nagahama, Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*. 18: 57-66.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C. & Nagahama, Y. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*. 141(2): 101-115
- Chen, S., Li, J., Deng, S., Tian, Y., Wang, Q., Zhuang, Z., & Xu, J. 2007. Isolation of Female-Specific AFLP Markers and Molecular Identification of Genetic Sex in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*. 9, 273–280.
- Clearwater, S. J., Hickey, C. W. & Martin, M. L. 2008. Overview of potential piscicides and molluscicides for controlling aquatic pest species in New Zealand. *Science for Conservation* 283. 76 pp
- Clevers, H. & Nusse, R. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 149: 1192–205.
- Cobo, F., Vieira-Lanero, R., Rego, E. & Servia, M. J. 2010. Temporal trends in non-indigenous freshwater species records during the 20th century: a case study in the Iberian Peninsula. *Biodivers Conserv* 19: 3471–3487.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., & Jaubert, F. 2002. Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics*. 916–921.
- Cohen, A. E., Hendrickson, D., Parmesan, C. & Marks, J. C. 2005. Habitat Segregation among Trophic Morphs of the Cuatro Ciénegas Cichlid (*Herichthys minckleyi*). *Hidrobiologica*. 15: 169–181.
- Contreras-Balderas, S., Almada-Villela, P., Lozano-Vilano, L. & García-Ramírez, M. E. 2003. Freshwater fish at risk or extinct in México. *Rev Fish Biol Fish* 12: 241–251.
- Contreras-Balderas, S. & Ludlow, A. 2003. *Hemichromis guttatus* Günther, 1862 (Pisces: Cichlidae), nueva introducción en México, en Cuatro Ciénegas, Coahuila. *Vertebr Mex* 12: 1–5.
- Copp, G. H, Templeton, M. & Gozlan, R. E. 2007. Propagule pressure and the invasion risks of non-native freshwater fishes: a case study in England. *J Fish Biol* 71: 148–159.
- Cotton, S. & Wedekind, C. 2007. Control of introduced species using Trojan sex chromosomes. *Trends Ecol Evol*. 22: 441–443.
- D'Cotta, H., Fostier, A. & Guiguen, Y. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature- induced sex differentiation of Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59: 265–276.
- de la Maza-Benignos, M. (ed) 2015. Plan de manejo para las especies de peces de Cuatro Ciénegas, Coah. Pronatura Noreste, A. C. 101p.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
- Díaz-Ferguson, E., Herod, J., Galvez, J. & Moyer, G. 2014. Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool

- for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Manag Biol Invasions* 5:121–131.
- Dinger, E. C., Hendrickson, D., Winsborough, B. M. & Marks, J. C. 2006. Role of fish in structuring invertebrates on stromatolites in Cuatro Ciénegas, México. *Hydrobiologia*, 563(1): 407–420.
- Dugan, L. E. 2014. Invasion risk and impacts of a popular aquarium trade fish and the implications for policy and conservation management. PhD Dissertation, University of Texas at Austin, 180p.
- Eggers, S., Ohnesorg, T. & Sinclair, A. 2014. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(11): 673–683.
- Eschmeyer, W. N. & Fong, J.D. 2014. Species by Family/ Subfamily. Online Version: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> (Updated 18 Nov 2014).
- FAO. 2010. Fisheries and Aquaculture Department. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome.
- Farias, I. P., Orfí, G., Sampaio, I., Schneider, H. & Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution*, 703-711.
- Filby, A. L., Thorpe, K. L., Maack, G. & Tyler, C. R. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen-and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*. 81(2): 219-231.
- Fuentes-Silva, C., Soto-Zarazúa, G., Torres-Pacheco, I. & Flores-Rangel, A. 2013. Male tilapia production techniques: a mini-review. *African J Biotechnol* 12: 5496–5502.
- García-Ramírez, M. E. 2005. Ecología y distribución de peces en áreas selectas del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. PhD Dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León, 242p.
- Garrett, G. 1989. Hormonal sex control of largemouth bass. *The Progressive Fish-Culturist*, 51(3): 146-148.
- Gayral, P., Weinert, L., Chiari, Y., Tsagkogeorga, G., Ballenghien, M., & Galtier, N. 2011. Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in nonmodel animals. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 650-661.
- Geng, C., Li, X., Tian, J., Liu, W., Wu, F., Jiang, M. & Wen, H. 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene*, 527(1): 183–192.
- Genovese, G., Regueira, M., Piazza, Y., Walter, D., Cristina, M., & Lo, F. 2012. Time-course recovery of estrogen-responsive genes of a cichlid fish exposed to waterborne octylphenol. *Aquatic Toxicology*, 114-115: 1–13.
- Göppert, C., Harris, R. M., Theis, A., Boila, A., Hohl, S., Rüegg, A., & Böhne, A. 2016. Inhibition of Aromatase Induces Partial Sex Change in a Cichlid Fish: Distinct Functions for Sex Steroids in Brains and Gonads. *Sexual Development*, 10(2): 97-110.
- Greenberg, B. 1961. Spawning and parental behavior in female pairs of the jewel fish, *Hemichromis bimaculatus* Gill. *Behaviour*, 18(1): 44-61.

- Greenwood, P. H. 1984. African cichlids and evolutionary theories. Pp. 141–154, 5 figs., in A. A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, University of Maine Press, Orono
- Guang-Li, L., Xiao-Chun, L., Yong Z. & Hao-Ran L. 2006. Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. *Aquaculture Research* 37(5): 484–491
- Guerrero-Estévez, S. & Moreno-Mendoza, N. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 20:101–121.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F. & Chang, C. F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 352–366.
- Gutierrez, J.B. & Teem, J. L. 2006. A model describing the effect of sex-reversed YY fish in an established wild population: the use of a Trojan Y chromosome to cause extinction of an introduced exotic species. *J Theor Biol* 241: 333–341.
- Hallgren, P., Mårtensson, L. & Mathiasson, L. 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish plasma—a cost effective approach for assessment of endocrine disruption, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89: 1023-1042.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 2955–2959.
- Hattori, R., Stussmann, C., Fernandino, J. & Somoza, G. 2013. Genotypic sex determination in teleosts: Insights from the testis-determining amhy gene. *General and Comparative Endocrinology*, 192: 55-59
- Haugen, T., Almeida, F.F. & Andersson, E. 2012. Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. *Reprod Biol Endocrinol* 10:47.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. & de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.
- Heidary, M. & Pahlevan, M. 2014. TRIzol-based RNA extraction: a gold standard method for gene expression studies. *Journal of Sciences*, 25(1): 13-17.
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. 2009. The diversity of fishes: *Biology, Evolution, and Ecology*. West Sussex, Wiley-Blackwell, 720p.
- Hendrickson, D.A., Marks, J.C., Moline, A.B., Dinger, E.C. & Cohen, A.E. 2008. Combining ecological research and conservation: a case study in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. pp. 127–157 *Aridland Springs in North America Ecology and Conservation*. The University of Arizona Press and The Arizona-Sonora Desert Museum.
- Hendrickson, D. 2006. Ficha Técnica de *Herichthys minckleyi*. Evaluación del riesgo de extinción de los cíclidos mexicanos y de los peces de la frontera sur incluidos en la NOM-059. El Colegio de la Frontera Sur(ECOSUR). Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No.CK001. México. D., (1982), pp. 1–5.

- Herrera, A., R. & The Fish Genetic Breeding Program Project (2001) Developmental Biology of the Supermale YY Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Histogenesis of the Reproductive System. *Science Diliman*. 13(1): 33-40.
- Heule, C., Göppert, C., Salzburger, W. & Böhne, A. 2014. Genetics and timing of sex determination in the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genet* 15:140.
- Hines, G. A., Boots, L.R., Wibbels, T. & Watts, S.A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the Tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *General and Comparative Endocrinology*, 114(2): 235-248.
- Hoddle, M.S. 2004. Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conserv Biol* 18: 38–49.
- Holthus, P. & Gamain, N. 2007. Del arrecife al minorista. *Conserv Mund* 37: 19.
- Hong, C., S., Park, B., Y., Sait-Jeannet & J., P. 2007. The function of Dmrt genes in vertebrate development: it is not just about sex. *Dev Biol* 310(1): 1-9.
- Huffman, L. S., Connell, L. A. O., & Hofmann, H. A. 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiology & Behavior*, 112-113: 77–83.
- Hunter, G. A. & Donaldson, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: W.S. Hoar, D.J. Randall, y E.M. Donaldson (Editors), *Fish Physiology, Reproduction, Behaviour, and Fertility Control*, Vol. IX-B. Academic Press, New York, pp. 223- 303.
- Ijiri, S., Kaneko, H. & Kobayashi, T. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78:333–341.
- Ishikawa, T. & Tachihara, K. 2014. Introduction history of non-native freshwater fish in Okinawa-jima Island: ornamental aquarium fish pose the greatest risk for future invasions. *Ichthyol Res* 61:17–26.
- Jeays-Ward, K., Dandonneau, M. & Swain, A. 2004 Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 276:431–440.
- Jensen, K. M., Kahl, M., Makynen, E. A., Korte, J. J., Leino, R. L., Butterworth, B. C. & Ankley, G. T. 2004. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 70(2): 99–110.
- Jiang, T., Hou, C. C., She, Z. Y., & Yang, W. X. 2013. The SOX gene family: Function and regulation in testis determination and male fertility maintenance. *Molecular Biology Reports*, 40(3), 2187–2194.
- Johnsson, J. I., Nöbbelin, F. & Bohlin, T. 1999. Territorial competition among wild brown trout fry: effects of ownership and body size. *Journal of Fish Biology*. 54(2): 469-472.
- Johnsson, J. I., Sernland, E., & Blixt, M. 2001. Sex-Specific Aggression and Antipredator Behaviour in Young Brown Trout. *Ethology*. 107(7): 587-599.
- Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Délot, E., Chen, X. N., Dewing, P. & Vilain, E. 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics*, 68(5): 1102–9.

- Kadry, V. O., & Barreto, R. E. 2010. Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, during resident-intruder interactions. *Neotropical Ichthyology*. 8(2): 329-332.
- Khallaf, E. A., Latif, A.F.A. & Alne-na-ei, A. A. 1986. Reproduction of *Tilapia nilotica* and *T.zilli* in a Nile canal and its interaction with the environment. *Delta J. Sci., Tanta*. Univ. Press, Tanta, Egypt 10, 724-47.
- Kishida, M. & Specker, J. L. 1994. Vitellogenin in the Surface mucus of tilapia (*Oreochromis mossambicus*); possibility for uptake by the free-swimming embryos. *The Journal of Experimental Zoology* 268, 259-268.
- Kitano, T., Takamune, K. & Kobayashi, T. 1999 Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Mol Endocrinol* 23:167–176.
- Kotula-Balak, M., Zielińska, R., Glogowski, J. 2008 Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 149:188–196.
- Kozera, B., & Rapacz, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. *Applied Genetics*, 54, 391–406.
- Krisher, R. 2013. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-470-95920-6. 248 pages.
- Kumar R., Komuro, H., Higa, M. & Nakamura, M. 2004 Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephalus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoological Science* 21:305-310
- Li, J. 2010. Sex determination in the genus *Salmo*. Simon Fraser University
- Li, M., Wang, L., Wang, H., Liang, H., Zheng, Y., Qin, F. & Wang, Z. 2013. Molecular cloning and characterization of *amh*, *dax1* and *cyp19a1a* genes and their response to 17 α -methyltestosterone in Pengze crucian carp. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 157(4), 372–381.
- Lintermans, M. 2004 Human-assisted dispersal of alien freshwater fish in Australia. *New Zeal J Mar Freshw Res* 38:481–501.
- Liu, H., Lamm, M.S., Rutherford, K. 2015 Large-scale transcriptome sequencing reveals novel expression patterns for key sex-related genes in a sex-changing fish. *Biol Sex Differ* 6:26.
- Logan, M. 2010. *Biostatistical design and analysis using R: a practical guide* (1.st ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Loiselle, P. V. 1992. An annotated key to the genus *Hemichromis* Peters, 1858. *Buntbarsche Bulletin*. (n. 148), pp. 2-19.
- Loiselle, P. V. 1979. A revision of the genus *Hemichromis* Peters 1858. The *Hemichromis guttatus* species group. *Ann. Mus. Roy. Afr. Centr.* [Sciences zoologiques] (228):41-65]
- Low, T. 2011. Australia: invasions. En: Simberloff D, Rejmánek M (eds) *Encyclopedia of biological invasions*. University of California Press, pp 36–42

- Lozano-Vilano, M., Contreras-Balderas, A. J., & García-Ramírez, M. 2006. Eradication of Spotted Jewelfish, *Hemichromis guttatus*, From Poza San José Del Anteojo, Cuatro Ciénegas Bolsón, Coahuila, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 51(4), 553–555.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. & Cerda, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165: 367–389.
- Mair, G.C., Abucay, J.S., Abella, T.A., Beardmore, J.A. & Skibinski, D. 2011. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 404(1991), 396-404.
- Marchand, O., Govorum, 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*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 180–187.
- Marks, J.C., Williamson, C., Hendrickson & D.A. 2011. Coupling stable isotope studies with food web manipulations to predict the effects of exotic fish: lessons from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 21:317–323.
- Martin-Robichaud, D.J., Peterson, R.H., Benfey, T.J., Crim & L.W. 1994. Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) using 17 β -oestradiol-enriched *Artemia* as food. *Aquaculture*, 123(1-2), 137-151.
- Martins, R. S. T., Power, D. M., Fuentes, J., Deloffre, L. A. M., & Canário, A. V. M. 2013. DAX1 regulatory networks unveil conserved and potentially new functions. *Gene*, 1–9.
- Matsuda, M., Nagahama, Y, Shinomiya A. 2007. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563.
- McDowall, R.M. 2004. Shoot first, and then ask questions: a look at aquarium fish imports and invasiveness in New Zealand. *New Zeal J Mar Freshw Res* 38:503–510.
- Mendoza, R., Contreras, S., Koleff, P., Álvarez, P. 2010. Aquarium trade as a pathway for the introduction of invasive species into Mexico. En: De Carlo F, Bassano A (eds) *Freshwater ecosystems and aquaculture research*, 1ª edn. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp 209–224
- Mendoza, R., Ramírez-Martínez, C., Aguilera, C., Meave del Castillo, M.E. 2014. Principales vías de introducción de las especies exóticas. En: Mendoza R, Koleff P (eds) *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp 43–73
- Mendoza, R., Santillán, O., Revol, A. 2012 Alligator gar (*Atractosteus spatula*, Lacépede 1803) vitellogenin: purification, characterization and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquac Res* 43:649–661.
- Mendoza-Alfaro, R., & Koleff-Osorio, P. 2014. *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Meyer, M. 1990. Morphometrics and allometry in the trophically polymorphic cichlid fish, *Cichlasoma citrinellum*: alternative adaptations and ontogenic changes in shape, *Journal of Zoology*: 237–260.
- Migaud, H. 2010. Triploid salmon: Current knowledge, new concepts and further developments Institute of Aquaculture, University of Stirling. Introduction - Salmotrip: Feasibility Study Of Triploid Atlantic Salmon Production 2008 - 2010

- Minckley, W.L. 1977. Endemic fishes of the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. Pp. 383-404, En Roland H, Riskind, W, Riskind D (eds.) Symposium on the Biological Resources of the Chihuahuan Desert Region, United States and Mexico. U.S. National Park Service Transactions and Proceedings Series 3. Government Printing Office, Washington, District of Columbia USA.
- Minckley, W.L., Lytle, G.L. 1969. *Notropis xanthicara*, a new cyprinid fish from the Cuatro Ciénegas basin, north-central Mexico. Proceedings of the Biological Society of Washington 82(40):491-501.
- Mitsuyo, K. & Specker J. L. 2000. Paternal Mouthbrooding in the Black-Chinned Tilapia, *Sarotherodon melanothron* (Pisces: Cichlidae): Changes in Gonadal Steroids and Potential for Vitellogenin Transfer to Larvae. *Hormones and Behavior*. 37: 40–48.
- Miyake, Y., Sakai, Y., Kuniyoshi, H. 2012. Molecular cloning and expression profile of sex-specific genes, Figla and Dmrt1, in the protogynous hermaphroditic fish, *Halichoeres poecilopterus*. *Zoolog Sci* 29:690–701.
- Moncaut, N., Lo Nostro F. & Maggese, M. C. 2003 Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17beta. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*. 63: 127-137.
- Moran, M., Burton, C., & Caputi, N. 1999. Sexual and local variation in head morphology of snapper, *Pagrus auratus*, Sparidae, in the Shark Bay region of Western Australia. *Marine and Freshwater Research*, 50(1), 27.
- Miura, T. & Miura, C. 2001. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. *Zool Sci*: 18:1055–1063.
- Munday, P. L., Jones, G. P. & Caley, M. J. 2001. Interspecific competition and coexistence in a guild of coral-dwelling fishes. *Ecology*. 82(8): 2177-2189.
- Myers, J.H., Simberloff, D., Kuris, A.M. & Carey, J.R. 2000. Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol Evol*. 15: 316–320.
- Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D.S., Nagahama, Y. & Shibata, N. 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1): 353-361.
- Nico, L. G., P. Fuller, P. J. Schofield & M. Neilson. 2016. *Hemichromis letourneuxi*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. <http://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=457> Revision Date: 10/22/2013
- Nicol, B., Guerin, A., Fostier, A. & Guiguen, Y. 2012. Ovary-predominant wnt4 expression during gonadal differentiation is not conserved in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* 79:51–63.
- Nirchio, M., Ferreira, A., Granado, A., Oliveira, C. & Ron E. 2007. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 25-30
- Oldfield R.G., K. Mandrekar, M. X. Nieves, D. A. Hendrickson, P. Chakrabarty, B. O. Swanson y H. A. Hofmann (2015) Parental care in the Cuatro Ciénegas cichlid, *Herichthys minckleyi* (Teleostei: Cichlidae) *Hydrobiologia* 748:233–257 DOI 10.1007/s10750-014-2081-4

- Padilla, D.K. & Williams, S.L. 2004. Beyond ballast water: aquarium and ornamental trades as sources of invasive species in aquatic ecosystems. *Front Ecol Environ* 2:131–138.
- Pandian, T.J. & Sheela, S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138:1–22.
- Pánek, J., Kolář, M., Vohradský, J., & Shivaya Valášek, L. 2013. An evolutionary conserved pattern of 18S rRNA sequence complementarity to mRNA 5' UTRs and its implications for eukaryotic gene translation regulation. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7625–7634.
- Perrin, B. J. & Ervasti, J. M. 2010. The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton*, 67(10): 630–634.
- Piferrer, F. & Blázquez, M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31: 215–226.
- Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological economics*, 52(3), 273-288. Poonlaphdecha et al., 2010
- Pinho-Neto, C. F., Miyai, C. A., Sanches, F. H., Giaquinto, P. C., Delicio, H. C., Barcellos, L. J. G. & Barreto, R. E. 2014. Does sex influence intraspecific aggression and dominance in Nile tilapia juveniles?. *Behavioural processes*. 105: 15-18.
- Rabitsch W, Milasowszky N, Nehring S, et al (2013) The times are changing: temporal shifts in patterns of fish invasions in central European fresh waters. *J Fish Biol* 82:17–33.
- Rasheeda, M.K., Sridevi, P. & Senthilkumaran, B. 2010. Cytochrome P450 aromatases: impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen Comp Endocrinol* 167:234–245.
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C. & Bedecarrás, P. 2013. AMH/MIS: What we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 211:21–31.
- Reynold, T.D. 1968. The biology of the clupeids in the New Volta. In: Man-made Lakes. The Accra Symposium. Ghana University Press, Accra.
- Ruiz, G.M., Carlton, J.T., Grosholz, E.D. & Hines, A.H. 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *Am Zool* 37:621–632.
- Salomão, A. & Marques, M. 2014. Quantification of alkali-labile phosphate groups in the plasma of *Oreochromis niloticus* exposed to intermittent discharges of oestrogens: effect of concentration vs. load, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94:11, 1161-1172, DOI: 10.1080/03067319.2014.930845
- Sambrook, J., & Russell, D. W. 2006. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ISBN 0-87969-772-5.
- Schofield, P. J., Slone, D. H., Gregoire, D. R., & Loftus, W. F. 2014. Effects of a non-native cichlid fish (African jewelfish, *Hemichromis letourneuxi* Sauvage 1880) on a simulated Everglades aquatic community. *Hydrobiologia*, 722(1), 171-182.
- Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.

- Senior, A. M., Krkosek, M., y Nakagawa, S. 2013. The practicality of Trojan sex chromosomes as a biological control: an agent based model of two highly invasive *Gambusia* species. *Biological invasions*, 15(8), 1765-1782.
- She, Z. Y. & Yang, W. X. 2014. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(1).
- Simard, J., Luthy, I., Guay, J., Belanger, A., & Labrie, F. 1986. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Molecular and cellular endocrinology*, 44(3), 261-270.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., et al. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342–355.
- Snow, A., Andow, D., Gepts, P., et al. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecol Appl* 15:377–404.
- Stanley, J. G. 1979. Control sex in fish with special reference to grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). In: Proceedings of the grass carp conference (J.V. Shireman ed.), pp 201-242. University of Florida Gainesville
- Stewart, A. B., Spicer, A. V., Inskip, E. K., & Dailey, R. A. 2001. Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 202(1-2), 177-181. doi:10.1016/S0044-8486(01)00598-1
- Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Kajjura-Kobayashi, H., Wang, D. S., Yoshikuni, M., & Nagahama, Y. 2005. Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(2005), 129–135.
- Sumner, A. T., Evans H. J. & Buckland R. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature, New Biol.* 323,31-32.
- Sunobe, T, Nakamura, M, Kobayashi Y, et al 2005 Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 141:54–59.
- Tao, W., Yuan, J., Zhou, L., Sun, L., Sun, Y., Yang, S., Li, M., Zeng, S., Huang, B., Wang, D. 2013. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes. *PLoS ONE*, 8(5), e63604.
- Taylor, P., Iii, R. D. G., y Shelton, W. L. 2013. The Progressive Fish-Culturist An Aceto-Carmine Squash Method for Sexing Juvenile Fishes An Aceto-Carmine Method Juvenile, (April).
- Tlusty M 2004. Ornamental aquaculture. Small scale of production does not automatically mean small scale of impact. *OFI J* 46:6–9.
- Torres-Vera, M.-A. 2012. Change analysis (1977-2000) in the area covered by the hot and cold pools in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico, 44(1), 59–68.
- Tran, T. N. Q., Jackson, M. C., Sheath, D., Verreycken, H., & Britton, J. R. 2015. Patterns of trophic niche divergence between invasive and native fishes in wild communities are predictable from mesocosm studies. *Journal of Animal Ecology*, 84(4), 1071-1080.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., y Sawa, A. 2011. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling*, 23(2), 317–323.

- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal, 137(3), 11-20.
- UICN, 2007. Guía para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Mediterránea. Interacciones entre la Acuicultura y el Medio Ambiente. UICN Gland, Suiza y Málaga, España. VI + 114 páginas.
- Vidal-López J, Álvarez-González C, Contreras-Sánchez W, Hernández-Vidal U 2009 Masculinización del cíclido nativo Tenhuayaca, *Petenia splendida* (Günther, 1862), usando nauplios de *Artemia* como vehículo del esteroide 17- α metilttestosterona. *Hidrobiológica* 19:211–216.
- Viñas J y F Piferrer 2008. Stage-Specific Gene Expression During Fish Spermatogenesis as Determined by Laser-Capture Microdissection and Quantitative-PCR in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Gonads. *Biology of Reproduction* 79: 738–747
- Wang DS, Kobayashi T, Senthilkumaran B, et al 2002. Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 297:632–640.
- Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Nagahama Y 2004. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:83–89.
- Wang, X. G., y Orban, L. 2007. Anti-Müllerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 236(5), 1329–38.
- Wassermann, G.J., Bertolla-Afonso, L.O. 2002. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Ciência Rural*, 32(1), 133-139.
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., y vom Saal, F. S. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 994–1006.
- Whittington RJ, Chong R 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev Vet Med* 81:92–116. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.04.007
- Wiley, H. S., Opresko, L. y Wallace, R. A. 1979. New Methods for Purification of Vertebrate Vitellogenin. *Analytical Biochemistry* 97: 145-152.
- Wolter C, Röhr F 2010. Distribution history of non-native freshwater fish species in Germany: how invasive are they? *J Appl Ichthyol* 26:19–27.
- Wootton R, Smith C 2014. Reproductive biology of teleost fishes. John Wiley & Sons, Ltd.
- Yamamoto, T. O. 1969. Sex Differentiation. *Fish physiology*, 3, 117-175.

ANEXOS

En anexo se agregaron los avisos a la ANP de Cuatrociénegas, los permisos de colecta, la solicitud de extensión de permiso para la especie invasora, la carta de colaboración con PRONATURA, los anteproyectos de tesis registrados y la aceptación de tres trabajos a un congreso internacional. Los resúmenes *in extenso* para este congreso y los certificados de presentación en el congreso y el reconocimiento por el primer lugar en el área de Biotecnología y Ciencias Agropecuarias en el Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UANL.

Se anexan además una tesis de maestría y la información más reciente de la base de datos BOLD, en la cual se confirma la especie del cíclido joya que existe en la poza Churince de Cuatrociénegas.