

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL
LENGUADO DE CALIFORNIA, *Paralichthys californicus* (AYRES, 1859)

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el
grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

LUIS ALBERTO MÁRQUEZ REYES

Ensenada, Baja California, México, Julio de 2009.

Julio de 2009

TESIS DEFENDIDA POR
LUIS ALBERTO MÁRQUEZ REYES
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

DR. BENJAMÍN BARÓN SEVILLA
Director del Comité

DR. JUAN PABLO LAZO CORVERA
Miembro del Comité

DR. ERNESTO GARCÍA MENDOZA
Miembro del Comité

DRA. MERITXELL RIQUELME PÉREZ
*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias*

DR. DAVID HILARIO COVARRUBIAS
ROSALES
Director de Estudios de Posgrado

Julio de 2009

RESUMEN de la tesis de Luis Alberto Márquez Reyes, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Julio de 2009.

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de Tesis

Efecto De La Temperatura Sobre La Diferenciación Sexual Del Lenguado De California, *Paralichthys californicus* (Ayres, 1859).

El lenguado de California es la especie de pez plano de mayor importancia comercial en la costa Noroeste de México y actualmente se considera un excelente candidato para la acuicultura. Las hembras de algunas especies de peces planos del género *Paralichthys* son de mayor tamaño que los machos de la misma edad. En este sentido, el cultivo monosexual de hembras de *P. californicus* puede representar una ventaja para el cultivo del lenguado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre el proceso de diferenciación sexual en el lenguado de California. Las larvas de una edad de 15 días después de la eclosión (DDE) se colocaron en 15 estanques de 100 l cada uno. Los lenguados se expusieron a las temperaturas de 15, 18, 21, 24 y 27°C por un periodo de 183 días. La identificación del sexo de los organismos se efectuó mediante histología por congelación y por inclusión en parafina los días 214 y 243 DDE respectivamente. Para describir el crecimiento, se efectuaron mediciones de la longitud y el peso y se clasificó el grado de desarrollo larval a los 23, 28, 33, 38, 44, 49, 63, 81, 99, 123 y 158 DDE. Los resultados obtenidos de los dos análisis histológicos mostraron que en las cinco temperaturas estudiadas el 100% de los organismos analizados fueron machos. Los organismos cultivados a 27°C tuvieron el mayor crecimiento en longitud total (LT) hasta 63 DDE. Para el día 123 DDE los organismos cultivados a 24°C tuvieron la mayor LT y para el día 158 DDE, los organismos cultivados a 21°C tuvieron la mayor LT con 107 ± 22.9 mm, que fue superior en 1.16 y 67.9% a la LT registrada en los peces cultivados a 24 y 15°C, respectivamente ($p < 0.001$). Los organismos mantenidos en 15°C, presentaron el menor crecimiento. Se sugiere estudiar nuevamente el efecto de la temperatura sobre el sexo de los organismos.

Palabras Clave: *Paralichthys*, monosexo, temperatura.

ABSTRACT of the thesis presented by Luis Alberto Márquez Reyes as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México. July of 2009

Effect Of The Temperature On The Sexual Differentiation Of the Halibut Of California, *Paralichthys californicus* (Ayres, 1859).

The California halibut (*Paralichthys californicus*) is the species of flatfish of greater commercial importance in the Northwest coast of Mexico fisheries and is currently consider an excellent aquaculture candidate. Females of most species of the genus *Paralichthys*, grow faster and larger than males. In this respect, female mono-sexual culture could represent a great advantage to the development of the aquaculture industry of this species. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of temperature on sexual differentiation in the California halibut. Fifteen day of larvae were placed in 100-L oval plastic tanks in a flow-thorough water system. California halibut larvae were exposed for 183 days to water temperatures of 15, 18, 21, 24 and 27°C. Juvenile sex identification was performed on 214 and 243 days old juveniles using histological techniques; either by freezing with a cryostat or paraffin inclusions, respectively. In order to assess growth and development among treatments, on days 23, 28, 33, 38, 44, 49, 63, 81, 99, 123 and 158 total length (TL) and wet weight were taken and larval development classified. Results from both types of histological analyses showed that in all temperatures evaluated, 100% of the analyzed organisms were males. The organisms cultured at 27°C had the highest growth Total Long (TL) 63 DAH (days after hatching) while 123 DAH the organisms cultured at 24°C had highest growth. At the end of the experimental period (158 DAH), larvae cultured at 21°C had significantly higher growth (TL, 107 ± 22,9 mm) compared to larvae raised at 15 and 18°C, but were not significantly different from larvae raised at 21 and 27°C (i.e., growth was 1.16 and 67.9% higher compared to 24 and 15°C, respectively. The organisms maintained at 15°C had the smaller growth during the experimental period. It is suggested to continue with the study of the temperature effect on the sex of the organisms.

Keywords: *Paralichthys*, monosex, temperature.

Dedicatorias

Dedico este documento a todos los que me ayudaron a realizar mis objetivos.

A mi esposa Paola, lo mejor en mi vida

Mis padres Julia y Raymundo

todos mis hermanos, especialmente a Mariana y Carlos

a mis sobrinos

Doña Juanita, por enseñarme la verdadera lealtad

Cada salida es una entrada a otro lugar.
Tom Stoppard

Agradecimientos

A Paola por su aguantar tantas horas en el laboratorio, por su comentarios, ayuda, su entusiasmo, por lo mucho que me ha dado, por su paciencia y por aguantarme cuando las cosas salieron mal.

A Marco Antonio Anzueto por su ayuda en todo.

A CICESE por abrirme las puertas y darme un espacio para crecer como profesional.

A los profesores.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo y haber realizado este proyecto de tesis con recursos de su laboratorio. Además, por las aportaciones y comentarios a lo largo mi estancia en CICESE.

Al personal que colaboró en el Laboratorio de Peces Marinos, los técnicos, Adrián Celaya, José Espinosa, Mario Galavis, José Ángel, Francisco Valenzuela, Charly y Luis Mouriño. Agradezco a los compañeros que conformaron el equipo para realizar el cultivo de lenguados: Marco Antonio, Verónica, Fernando, Getsemani y Marisol.

A la M. en C. Yanet Guerrero por facilitarme parte de las instalaciones del Laboratorio de Patología, por capacitarme en las técnicas de histología y por realizar tan valioso esfuerzo para encontrar las gónadas de los peces.

Muchas gracias a todos los investigadores de CICESE por las aportaciones a mis conocimientos, los consejos y la ayuda. Muy en especial a la Dra. Ma. Del Pilar Saavedra por apoyarnos.

Y por los buenos momentos que compartimos durante mi estancia en Ensenada: Flaco Antonio, Emmanuel, Gordo, Soco, Vicky, Mimi, Rich y los que faltaron.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| I.I Reproducción | 1 |
| I.II Desarrollo de las gónadas | 3 |
| I.III La Diferenciación Sexual | 4 |
| I.IV El Lenguado de California | 8 |
| I.IV.I Habitat de <i>Paralichthys californicus</i> | 11 |
| I.IV.II Estrategias de Producción | 11 |
| II. ANTECEDENTES | 13 |
| III. JUSTIFICACION | 15 |
| IV. HIPOTESIS | 16 |
| V. OBJETIVOS | 16 |
| V.I. Objetivos específicos | 16 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS | 17 |
| VI.I. Origen de las larvas de lenguado y protocolo de cultivo | 17 |
| VI.II. Control de la Temperatura | 18 |
| VI.III. Identificación del periodo de sensibilidad para la inducción del sexo. | 23 |
| VI.IV. Identificación del sexo | 25 |
| VI.V. Análisis Estadístico | 25 |
| VII. RESULTADOS | 27 |
| VII.I Control de la temperatura | 28 |
| VII. II Desarrollo larval a 15 y 18°C (T15 Y T18) | 35 |
| VII. III Desarrollo larval a 21°C (T21) | 37 |
| VII. IV Desarrollo larval a 24°C (T24) | 38 |
| VII. V Desarrollo larval a 27°C (T27) | 38 |

| | |
|---|----|
| VI.VI Sobrevivencia | 40 |
| CONTENIDO (continuación) | |
| VI. VII Diferenciación sexual | 42 |
| VII. VIII Efecto de los esteroides | 48 |
| VIII. DISCUSION | 50 |
| VIII.I.I Efecto de la temperatura durante el periodo de incubación y previo al inicio del experimento | 50 |
| VIII.I.II Efecto de la temperatura sobre el crecimiento | 52 |
| VIII.I.III Sobrevivencia | 57 |
| VIII.I.IV Efecto de la temperatura en el desarrollo ontogénico | 59 |
| VIII.I.V Efecto de la temperatura en la diferenciación sexual | 62 |
| IX. CONCLUSION | 68 |
| X. LITERATURA CITADA | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Desembarques anuales comerciales (libras) del lenguado de California de 1916 a 2001. Tomado de Wertz <i>et al.</i> (2004). | 10 |
| 2 | Crecimiento de hembras y machos del lenguado de California, <i>Paralichthys californicus</i> , de acuerdo a Hobbs <i>et al.</i> (1990). | 12 |
| 3 | Diagrama del protocolo para estudiar el periodo de sensibilidad a la inducción del sexo en <i>Paralichthys californicus</i> , con la aplicación de 17 α metilttestosterona (MT) en diferentes estadios de vida. | 22 |
| 4 | Extracción de la gónada de <i>P. californicus</i> para ser procesada por histología. | 24 |
| 5 | Registros diarios de la temperatura en los estanques de cultivo de <i>Paralichthys californicus</i> expuesto a cinco condiciones térmicas (15, 18, 21, 24 y 27°C). | 30 |
| 6 | Curvas de crecimiento de <i>Paralichthys californicus</i> en longitud total (mm) cultivado durante un periodo de 158 días contados a partir de la eclosión, en diferentes condiciones térmicas (15, 18, 21, 24 y 27°C). | 32 |
| 7 | Tasa específica de crecimiento para <i>Paralichthys californicus</i> cultivados en diferentes condiciones térmicas durante 243 días. | 33 |
| 8 | Larvas de <i>Paralichthys Calinornicus</i> . A y B 23 DDE y cultivadas en T15; C 28 DDE y cultivadas en T15 y T18. | 36 |
| 9 | Larvas de <i>Paralichthys calinornicus</i> (A y B) cultivados a 21°C después de 23 DDE. En el panel A se observa una larva sin la migración del ojo. En el organismo del panel B, el ojo izquierdo presenta un avanzado estado de migración con los radios anteriores de la aleta dorsal reducidos. | 37 |
| 10 | Larvas de <i>Paralichthys californicus</i> (A y B) cultivados a 27°C después de 23 DDE, A, se observa la reducción de los radios anteriores de la aleta dorsal. B, los ojos derecho o izquierdo en un avanzado estado de migración. | 39 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| | | |
|----|---|----|
| 11 | Larvas de <i>Paralichthys californicus</i> de 28 DDE cultivadas a 27°C. A, larva con pigmentación anormal. B, larva con pigmentación normal. | 40 |
| 12 | Juveniles del lenguado de California, <i>Paralichthys californicus</i> , de 111 DDE con lesiones en la piel, indicadas con las flechas | 42 |
| 13 | Primordio gonadal de <i>Paralichthys californicus</i> a 46 DDE y cultivado a 18°C. Cg (cel. germinales), Cs (cel. somáticas), td (tracto digestivo) 400X. | 43 |
| 14 | Corte histológico de la gónada de un juvenil del lenguado <i>Paralichthys californicus</i> de 214 DDE y cultivado a 18°C. Esg: espermatogonias. | 45 |
| 15 | Diferentes etapas de desarrollo de la gónada de los juveniles del lenguado <i>Paralichthys californicus</i> de 243 DDE, cultivados a 24°C. Esg: espermatogonias; Esm I: espermatocito primario; Esm II: espermatocito secundario; L s: lóbulo seminal; T: tubulo seminifero; C d: conducto deferente; e: espermátidas y ez espermatozoides. A) 1000X, B) y C) 400x y D) 100X. | 48 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| I | Concentración de oxígeno (mg/l) para los diferentes tratamientos durante la etapa de experimentación con <i>Paralichthys californicus</i> . | 27 |
| II | Temperatura de los tanques de cultivo de <i>Paralichthys californicus</i> . Superíndices diferentes indican diferencias significativas. Des. Est. = desviación estándar. | 28 |
| III | Longitud total promedio de <i>Paralichthys californicus</i> (mm \pm desviación estándar) después de un periodo de cultivo de 158 DDE a diferentes temperaturas. Superíndices diferentes indican diferencias significativas. | 33 |
| IV | Cronología en del desarrollo ontogenético de <i>Paralichthys californicus</i> (días después de la eclosión) cultivado a diferentes temperaturas 15, 18, 21, 24 y 27°C. Los estadios desarrollo de acuerdo con los criterios de Gadomski <i>et al.</i> (1990). | 35 |
| V | Proporción sexual de los juveniles del lenguado <i>Paralichthys californicus</i> cultivados hasta el día 214 DE en diferentes condiciones térmicas. | 45 |
| VI | Proporción sexual de los juveniles del lenguado <i>Paralichthys californicus</i> cultivados hasta el día 243 DE en diferentes condiciones térmicas. | 47 |
| VII | Proporción sexual de los juveniles del lenguado <i>Paralichthys californicus</i> cultivados hasta el día 222 DE después de haber sido alimentados con MT. | 49 |

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Reproducción

La reproducción es un proceso biológico que permite la producción de nuevos organismos, con la finalidad de transmitir la información genética a la siguiente generación y que les permita una mejor adaptación al entorno natural con mayores posibilidades de sobrevivir a las variaciones ambientales.

La reproducción de los vertebrados es sexual, puede ser gonocórica (en donde los gametos masculinos y femeninos son producidos por individuos distintos de la misma especie y su sexo no cambia en ningún momento de la vida) o hermafrodita (un mismo organismo con los aparatos sexuales masculino y femenino o un aparato mixto), con fecundación interna o externa y el desarrollo de los embriones puede ser interno (vivíparos) o externo (ovíparos). En algunos casos la reproducción es partenogenética (donde el material genético proviene solo de la madre), como ocurre en algunas especies de reptiles como *Cnemidophorus laredoensis* (Abuhteba *et al.* 2000) y *Ramphotyphlops braminus* (Kamosawa y Ota, 1996). Los mamíferos han desarrollado la mayor complejidad reproductiva, ya que el embrión se desarrolla en el interior de la madre donde recibe la protección y los nutrientes necesarios a través de la placenta. Algunos peces óseos y otros cartilaginosos han evolucionado hasta el punto de presentar un vínculo entre la madre y los embriones a través de tejidos similares a la placenta (Holden y Raitt, 1975 y Reznick *et al.* 2002).

Los peces son el grupo más numeroso y diverso de los vertebrados, con cerca de 24,000 especies reconocidas (Nelson, 1994), esta diversidad está relacionada en gran parte con la variedad de estrategias reproductivas y numerosas estructuras anatómicas y procesos especializados que han desarrollado para transmitir su herencia genética (Redding y Patiño, 2000). La mayoría de los peces son iteróparos (tienen más de una reproducción en su vida), sin embargo, un número menor de

especies como los salmones son semélparos, ya que se reproducen una sola vez en su vida y mueren poco después del desove (Yaron y Sivan, 2006).

Un mayor número de especies de peces son ovíparas, donde la fertilización del ovocito por el esperma ocurre externamente. En algunas especies de peces ovíparas, después del desarrollo interno se genera un comportamiento de protección y en algunos casos la progenie se alimenta de los padres como sucede en *Symphysodon aequifasciatus* (Brown, 1985). En las especies de peces vivíparos (cerca del 3% de las especies de peces conocidas) la fertilización es interna y el grado de cuidado parental varía entre las especies, la mayoría simplemente abandona a su progenie después del desove (Redding y Patiño, 2000).

En los machos los testículos producen esperma, mientras en las hembras los ovarios producen óvulos (Redding y Patiño, 2000). Algunas especies de peces teleósteos son hermafroditas, una condición en la cual un individuo puede expresar ambos sexos en forma simultánea o secuencial (Patiño y Redding, 2000). Los pargos del género *Serranus* sp. son capaces de alternar su sexo para producir óvulos o esperma (Oliver, 1997). Entre los hermafroditas secuenciales, algunos, como *Sparus aurata*, primero se desarrollan y maduran como machos (protándricos) y posteriormente se desarrollan como hembras (Godwin *et al.* 1996 y Bruslé Sicard y Fourcault, 1997). Otros se desarrollan y maduran primero como hembras (protóginos) y posteriormente se desarrollan como machos (Reinboth y Bruslé Sicard, 1997).

I.II Desarrollo de las gónadas

En los vertebrados, las gónadas se desarrollan en la región dorsal de la cavidad celómica, a partir del borde superior de la capa visceral del mesodermo de la placa lateral, en la mitad posterior del cuerpo y están intensamente relacionadas al sistema renal. El primer esbozo aparece formando una banda longitudinal engrosada de epitelio mesodérmico, que recubre la cavidad del cuerpo. Este engrosamiento se llama cresta germinal. La cresta adquiere la forma de columnas altas, pero pronto las células se disponen formando una masa compacta de varias células de grosor, sobresaliendo la cresta. Enseguida, la conexión entre la masa de células y la pared del peritoneo se constriñe lateralmente y la gónada queda suspendida de la pared del peritoneo por una doble capa del mismo, el mesorquio o mesovario (Balinsky, 1978). Sin embargo, en esta etapa la gónada aun no completa su desarrollo, debido a que faltan las células que darán origen finalmente a los gametos, estas células se conocen como "células germinales primordiales" (CGP). Su origen se ha situado en una región cercana al polo vegetal del citoplasma del óvulo, que es diferente al resto del material contenido en el citoplasma (Wei y Mahowald, 1994). En el pez zebra, *Danio rerio*, se ha observado que en etapas iniciales del desarrollo embrionario, una población de cuatro CGP darán origen al tejido germinal de la gónada (Yaron y Sivan, 2006).

Las CGP migran desde el endodermo del saco vitelino, a través de los tejidos, hasta el sitio donde se desarrollan las crestas germinales para poblar la gónada indiferenciada (Patiño y Redding, 2000).

En los vertebrados superiores y elasmobranquios, el origen de las gónadas es dual y esto tiene una íntima relación con la diferenciación sexual. Las gónadas indiferenciadas consisten de dos tipos de células somáticas: el cortex y la medula. Se originan en la pared del peritoneo, que se deriva del blastema mesonéfrico. Durante la diferenciación del ovario, el cortex se desarrolla y la medula degenera. Contrariamente,

durante la génesis del testículo el cortex degenera y la medula se desarrolla (Nakamura *et al.* 1998). La gónada de los peces teleósteos se desarrollan a partir de tejido somático que es de un origen embrionario único (Hoar, 1969).

El primordio gonadal consiste de dos cordones paralelos situados a lo largo de la pared superior del peritoneo. En este punto el desarrollo de los cordones tiene una estructura simple que consiste de CGP y estroma.

La diferenciación del ovario en los teleósteos generalmente precede a la diferenciación testicular y se puede reconocer por un incremento en la actividad mitótica de las células germinales (oogonias) y el alargamiento del ovario putativo (Patiño y Redding, 2000).

I.III La Diferenciación Sexual

La determinación del sexo en los vertebrados es genética, sin embargo, en un número importante de vertebrados, la expresión de los genes determinantes del sexo puede ser modificada por factores ambientales tales como la temperatura y el pH, esto ocurre en algunas especies de tortugas y cocodrilos (Jeyasuria y Place, 1998; Pieau *et al.* 1999; y Maldonado y Merchant, 2006). La determinación ambiental del sexo también se ha encontrado en algunas especies de peces tales como el pejerrey del Atlántico, *Menidia menidia* (Conover y Kynard, 1981), la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Nakamura *et al.* 1998; Contreras-Sánchez, 2001 y D'Cotta *et al.* 2001a) y el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Yamato, 1999).

En este sentido, Nakamura *et al.* (1998), mencionan que la diferenciación sexual de los peces es coordinada por factores genéticos pero puede ser influenciada por el ambiente (Conover y Kynard, 1981). Por su parte, Bull (1980), menciona que las temperaturas intermedias

producen machos en algunas especies de peces, mientras que temperaturas extremas frías o calientes resultan en hembras.

Conover y Heins (1987), mencionan que existen dos mecanismos para la determinación del sexo en los peces, uno es genético y otro ambiental. La determinación genotípica del sexo ocurre durante la fertilización, mientras la diferenciación ambiental del sexo ocurre durante la embriogénesis o durante el desarrollo temprano (Patiño y Redding, 2000). Por su parte, Yamazaki (1981) revisó la diversidad sexual en los peces y menciona que el sexo genético y el sexo fenotípico no necesariamente son el mismo en un individuo.

La determinación del sexo puede ser poligénica como por ejemplo en algunas especies de salmones y ciclidos (Wohlfarth y Wedekind, 1991). En otras especies, el sexo es determinado por cromosomas sexuales, donde la hembra es homogamética (XX) y el macho heterogamético (XY), como en algunos ciclidos (Mair *et al.* 1991; Wohlfarth y Wedekind, 1991; Baras *et al.* 2001). En cruzas realizadas con hembras XX y machos XX (hembras revertidas), las progenies resultantes están constituidas predominantemente por hembras y por una fracción menor de machos. Esto sugiere que la determinación del sexo no depende completamente de un gen (Calhoun y Shelton, 1983).

A la fecha se han identificado algunos mecanismos que se cree están involucrados en la diferenciación final del sexo de los organismos. El gen *Sry* se ha identificado en mamíferos como determinante sexual (Sinclair *et al.* 1990). Sin embargo, no es comparable con ningún gen encontrado en otros vertebrados.

Entre los genes relacionados con la determinación sexual de los teleósteos, se ha sugerido que el gen *CYP19* (D'Cotta *et al.* 2001a), codifica la enzima citocromo P450 aromatasa (González, 2003), que convierte testosterona en 17β -estradiol, esta última hormona es la

responsable de inducir el desarrollo del ovario (Baroiller y D´Cotta, 2001). Se ha encontrado que las altas temperaturas suprimen la expresión de este gen en especies de tilapia (D´Cotta *et al.* 2001b). De acuerdo con Kwon *et al.* (2001), Harvey *et al.* (2003) y Tzchori *et al.* (2004), en el ovario y el cerebro de algunas especies de peces se han identificado genes que codifican la enzima aromatasa (CYP19a y CYP19b respectivamente) y ninguno de ellos está localizado en los cromosomas sexuales.

En los machos heterogaméticos del pez medaka (*Oryzias latipes*) se ha identificado un gen (DMRT o DMRT1) localizado en el cromosoma Y, que se ha definido como el gen responsable de la diferenciación del sexo (Matsuda *et al.* 2002). Además, este gen participa en el desarrollo de los machos de otros vertebrados. Es posible que el gen DMRT o DMRT1 participe en la diferenciación y/o determinación sexual, no obstante, aun no existe la suficiente información al respecto (Kondo *et al.* 2002). Las diferentes expresiones que puede realizar el gen maestro DMRT no son similares en todas las especies de peces (Veith *et al.* 2003) e incluso no se ha detectado en todas las especies del género *Oryzias* (Voff y Scharl, 2002). Scharl (2004), sugiere que existen diferentes genes maestro en la determinación sexual de los peces.

En años recientes se ha investigado el efecto del ambiente, principalmente de la temperatura, sobre la proporción de sexos en poblaciones de ciclidos y salmones (Beardmore *et al.*, 2001; Kwon *et al.* 2002). Algunos trabajos destacan que las temperaturas elevadas estimulan una mayor proporción de machos (Baroiller *et al.* 1995; Desprez y Melard, 1998; Wang y Tsai, 2000; Karayuecel *et al.* 2002). Esto sugiere que el mecanismo de diferenciación sexual en peces es más complejo de lo que se creía (Kitano y Abe, 2008).

La determinación sexual involucra los procesos genéticos y ambientales que coordinan la diferenciación sexual. Mientras que la diferenciación sexual involucra la adquisición del fenotipo sexual, es decir, la realización física (morfológica, molecular y fisiológica) del sistema reproductor (testículos u ovarios) (Devlin y Nagahama, 2002) y de los órganos (conductos deferentes, oviductos, aletas especializadas, entre otros) y tejidos anexos (hipotálamo e hipófisis), así como de los rasgos de la conducta que aseguran la reproducción (Che *et al.* 2002). La diferenciación sexual primaria involucra a las gónadas y la secundaria se refiere a todos los demás tejidos (Strüssmann y Patiño, 1999).

La diferenciación sexual y la formación de las gónadas de los peces es generalmente un proceso lábil, pero una vez que se ha desarrollado como un testículo o un ovario, entonces permanece estable (Devlin y Nagahama, 2002). En muchos poiquilotermos, la temperatura puede influir en la diferenciación del sexo por encima del componente genético. El sistema de determinación del sexo en estos organismos se conoce con el término de determinación sexual por temperatura (DST) (Conover y Heins, 1987).

Las hormonas esteroides que dan lugar a la diferenciación sexual son derivadas del colesterol (27 Carbonos), el cual es obtenido vía exógena al ingerir alimentos o de forma endógena mediante la síntesis de la Acetil co-enzima A. El sistema enzimático que cataliza la reacción de degradación del colesterol a moléculas más pequeñas como la testosterona (19 C) y el estradiol (18 C), es efectuado por la familia de enzimas oxidasas del grupo citocromo P450. Cuando la temperatura es elevada, la energía cinética de las moléculas aumenta, con lo que se desorganiza la estructura de las proteínas, se destruyen las interacciones débiles, de forma que el interior hidrófobo de la proteína interacciona con el medio acuoso, resultando en una proteína desnaturalizada (Lodish *et al.* 2004)

La temperatura puede influir dramáticamente en la estructura y función de las proteínas y enzimas que participan en la producción de esteroides sexuales, ya que su síntesis depende de la transformación intramitocondrial del colesterol, mediante un sistema complejo de enzimas (Pankhurst, 2008), así como de la acción de receptores y sistemas de mensajeros secundarios (Devlin y Nagahama, 2002). Es por ello que cambios en la temperatura puedan ocasionar variaciones en la producción de esteroides sexuales y como resultado progenies con una proporción de un sexo sesgada.

En años recientes se ha comenzado a investigar el efecto de la temperatura sobre la proporción sexual en los peces planos, principalmente en el lenguado japonés, *P. olivaceus*, que se distribuye en las costas de Japón, encontrando que temperaturas extremas producen hasta 96% de machos (Yamamoto, 1999).

I.IV El Lenguado de California

En el noroeste de México se encuentra el lenguado de California, *Paralichthys californicus*, especie con la que recientemente ha iniciado el cultivo comercial en Baja California.

El lenguado de California está entre las especies de peces planos comerciales más importantes de los mares templados. Se distribuye desde Long Beach, Washington EUA, hasta Bahía Magdalena en Baja California, México. Es la especie de mayor tamaño del género *Paralichthys* (Young, 1969), llega a medir hasta 1.5 m de largo y a pesar hasta 32.25 kg (Miller y Lea, 1972), por lo que es muy atractivo para la pesca deportiva (Allen, 1988). Además, tiene gran aceptación por la textura y sabor de su carne. Se comercializa a precios del orden 10 a 20 dólares por kilogramo, dependiendo de su presentación.

El lenguado de California, pertenece a la familia Paralichthyidae (Ahlstrom *et al.* 1984). La característica principal es su cuerpo

comprimido, aplanado y de forma elíptica, su cráneo es asimétrico, ya que tiene ambos ojos de un solo lado de la cabeza, aproximadamente el 48% de los organismos tienen el ojo izquierdo del lado derecho del cuerpo (Escobar-Fernández, 1989). Tienen una coloración uniforme (Millar y Lea, 1972) ó café grisácea a café oscuro, pueden presentar manchas negras, pardas amarillentas ó pequeños lunares blancos en la cabeza (Barnhart, 1936). Además, poseen la capacidad de cambiar de color (mimetismo u homocromia), reproduciendo a la perfección el color del fondo e incluso detalles del ambiente que les rodea (Carrillo-Cortes, 1994).

La reproducción se realiza fuera de la costa donde los principales desoves ocurren a principios de primavera y coinciden estacionalmente con las condiciones del agua calida de todos los habitats costeros de su área de distribución (Kramer, 1990). Los huevos eclosionan a los dos días de fertilizados y las larvas son arrastradas hacia la zona costera donde utilizan zonas protegidas como áreas de crianza. El desarrollo de las larvas es muy similar al de otros peces, pero a partir del primer mes de desarrollo, con aproximadamente 8 mm de longitud estándar, ocurre la metamorfosis e inicia el comportamiento de asentamiento, por lo que las larvas tienden a asentarse sobre un costado de su cuerpo en el sustrato (Schawtz, 1977). Después de aproximadamente un año, alcanzan la edad adulta, cambian de habitat protegido por aguas mas profundas, por lo que se ha clasificado como una especie costera-estuarina (Allen y Smith, 1998).

La pesquería del lenguado de California esta concentrada en Bodega Bay al Norte de San Diego en el estado de California, UEA. Los primeros registros de captura datan de 1916. Justo después del inicio del desarrollo de la industria pesquera, capturándose hasta 2.13 millones de kg en 1919 (Fig. 1). Sin embargo, en los años siguientes, las capturas fueron variables, con una clara tendencia a la disminución. A partir de la

década de 1980, las capturas han sido constantes con aproximadamente 453 mil kg por año, con excepción de 1994 que disminuyó, debido a cambios en las artes de pesca (Ish y Stroman, 2006). La pesca deportiva del lenguado ha crecido enormemente desde la década de 1980.

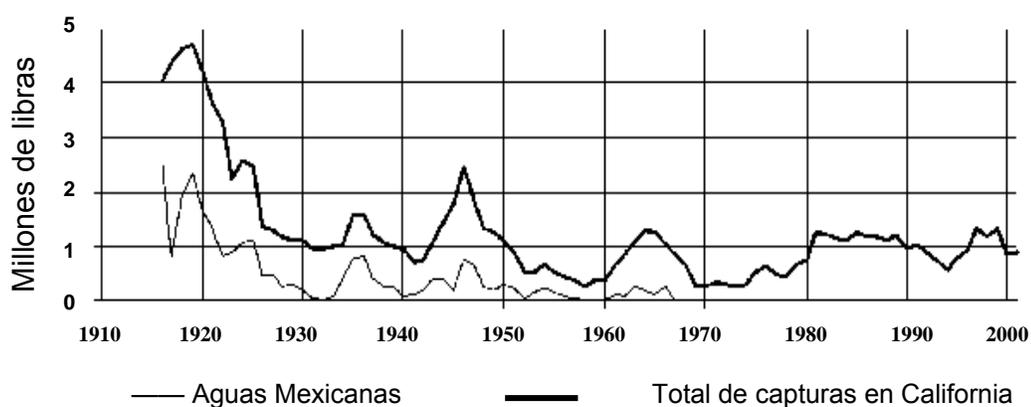


Figura 1. Desembarques anuales comerciales (libras) del lenguado de California de 1916 a 2001. Tomado de Wertz *et al.* (2004).

No se cuenta con estadísticas de la captura fiables por especie de lenguado asociada a la pesca artesanal o deportiva para Baja California y Baja California Sur.

I.IV.I Habitat de *Paralichthys californicus*

Haaker (1975) reportó la proporción sexual de lenguado de California en 1:2.03 (H:M); Plumier *et al.* (1983) reportó en San Onofre 1:4.01; Ramírez-González (1990) en la Bahía de Todos los Santos 1:2.2 y Navarro-Mendoza (1985), reportó una proporción sexual de 1:0.68 en el estero de Punta Banda. Esta última proporción se explica por la migración que realizan los machos a áreas de la costa con profundidades entre los 10 y 30 m. La edad de primera madurez para los machos está entre los 2 y 3 años y para las hembras entre los 4 y 5 años (Kucas, 1986).

La temperatura del agua influye en el crecimiento y la supervivencia del lenguado de California, particularmente en el periodo comprendido entre la etapa huevo hasta juvenil de tres meses de edad, donde los intervalos de la temperatura óptima pueden cambiar la ontogenia. Esta especie tolera un intervalo amplio de temperaturas, desde 13.8°C a 24.7°C (Castillo-Sánchez *et al.* 1998). Esquer (2006), estudió la temperatura preferida para juveniles y encontró el óptimo en 18.4°C.

I.IV.II Estrategias de Producción

Se ha encontrado que las hembras de algunas especies de peces planos del género *Paralichthys* e *Hippoglossus* son de mayor tamaño que los machos de la misma edad (Yamamoto, 1999; Luckenbach *et al.* 2003; Angeles y Mendo, 2005; Björnsson, 1995). Es por esto que se ha generado un interés en realizar cultivos monosexuales de hembras de peces planos.

La idea principal de la producción de poblaciones monosexuales es cultivar el sexo con el mayor potencial de crecimiento, para incrementar el rendimiento en las granjas acuícolas (Morales, 1991) para generar una mayor biomasa en el menor tiempo posible. Para esto, es necesario conocer el desarrollo sexual de la especie seleccionada, así

como el efecto de diferentes factores ambientales o agentes químicos sobre los procesos de diferenciación sexual, pero evitando el uso de esteroides, que están prohibidos para la industria alimenticia.

Hobbs *et al.* (1990), propusieron modelos de crecimiento para hembras y machos de *P. californicus*, tomando como base datos obtenidos de las pesquerías de California. Al graficar las ecuaciones se observa que las hembras son más grandes que los machos de la misma edad (Fig. 2).

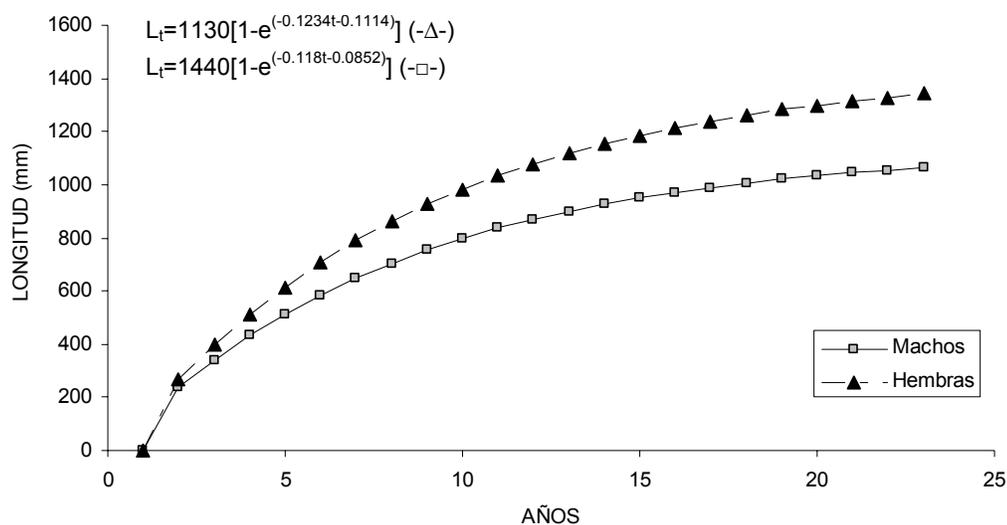


Figura 2. Crecimiento de hembras y machos del lenguado de California, *Paralichthys californicus*, de acuerdo a Hobbs *et al.* (1990).

II. ANTECEDENTES

La temperatura influye sobre el desarrollo sexual de los peces del genero *Paralichthys*.

Yamamoto (1995), encontró que en *P. olivaceus*, el periodo crítico de diferenciación sexual ocurre en longitudes menores a 40 mm, que es donde los tratamientos con esteroides y la temperatura del agua de cultivo inciden sobre la diferenciación de la gónada. La distinción entre el ovario y los testículos se basó en la morfogénesis de elementos de la gónada en un intervalo entre 27 a 37 mm de longitud total. La división meiotica en el ovario fue registrada a los 69 mm, mientras que en el testículo fue a los 129 mm de longitud total.

Posteriormente, Yamamoto (1999), desarrolló métodos de feminización para *P. olivaceus*. Así mismo, estudió la proporción sexual de progenies diploides ginogenicos y de diploides cultivados a 15, 17.5, 20, 22.5, 25 y 27.5°C. Estableció que el macho de esta especie determina el sexo al ser heterogametico. Por otro lado, la diferenciación sexual de las hembras genéticas (XX) se presume es inestable a causa de las temperaturas extremas ya que generaron hasta un 96% de machos. Se concluyó que *P. olivaceus* es una especie con una diferenciación inestable influenciada por factores ambientales.

En el lenguado Sureño, *P. lethostigma*, Luckenbach *et al.* (2003) reportan que en los presuntivos ovarios de lenguado, el desarrollo de la cavidad ovárica ocurre entre los 75 y 100 mm de longitud total. Además, se observaron ovocitos a los 115 mm de longitud total. Por su parte, los túbulos seminíferos se observan por primera vez a los 100 mm. Todos los organismos mayores a 120 mm presentaron una clara diferenciación sexual y sus células se encontraron en meiosis. Además, analizaron el efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual después de exponer a los lenguados por 243 días a 18, 23 y 28°C. Las temperaturas alta y baja (18 y 28°C) produjeron una mayor proporción de machos, 96 y 78%, respectivamente. Mientras que a 23°C se encontró una proporción

1:1, entre hembras y machos. Esto sugiere que el lenguado del Sur posee un mecanismo de diferenciación sexual sensible a la temperatura, similar al observado en *P. olivaceus*.

La temperatura es el factor abiótico más dominante en los sistemas biológicos de la naturaleza, el cual controla la ingesta de alimento y el crecimiento de los organismos (Brett, 1979). Muchas especies presenta un patrón de crecimiento definido respecto a la temperatura, al aumentar, la tasa de crecimiento también se incrementa, hasta llegar a un punto óptimo. Sin embargo, esta tendencia no se mantiene de manera permanente debido a que si la temperatura se incrementa demasiado, los efectos pueden ser negativos e incluso conducir a la muerte. La temperatura óptima de crecimiento aumenta a medida que la especie se adapta a aguas más calientes y viceversa (Calderer, 2001). Gadomski y Caddell (1991) encontraron que el crecimiento y la supervivencia del lenguado California son influenciados por la temperatura del agua durante su desarrollo, desde la etapa de huevo hasta los tres meses de edad.

Se ha estudiado el crecimiento de diferentes especies de peces planos expuestos a diferentes temperaturas. En el lenguado de Verano *P. dentatus*, las larvas fueron mantenidas entre 19 y 21°C, hasta terminada la metamorfosis alcanzando longitudes de hasta 14.1 mm (King y Howell, 2000); Kira y Targett (1991), expusieron juveniles del lenguado de Verano de 41 a 80 mm a diferentes temperaturas (2, 6, 10, 14, 18 °C) durante 16 días. Encontraron que la temperatura tuvo un efecto sobre la tasa específica de crecimiento, siendo la de 18°C el doble comparada con la de 14°C y determinaron que *P. dentatus* puede sobrevivir a temperaturas tan bajas como 2°C. Por su parte Bolasina *et al.* (2006) cultivaron larvas y juveniles de *P. olivaceus* a 18°C obteniendo longitudes entre 11.5 mm y 26.5 mm. Por ultimo, en *P. californicus*, cultivaron juveniles de 11.7 g durante ocho semanas a 22°C obteniendo pesos de hasta 23.9 g (Merino *et al.* 2007).

III. JUSTIFICACION

El lenguado de California es una especie con un alto valor comercial, además recientemente en Baja California, se esta iniciando el desarrollo del cultivo comercial, alcanzando tasas de crecimiento moderadas. Es importante que estas actividades acuiculturales se realicen enfocándose en incrementar los rendimientos del cultivo para obtener cosechas con tallas homogéneas y en un tiempo menor del que toma actualmente.

El cultivo de poblaciones monosexuales no solo limita la reproducción sino que también permite seleccionar al sexo cuya tasa de crecimiento sea mayor, para incrementar el rendimiento en las granjas acuícolas a pequeña y gran escala (Morales, 1991).

Se ha encontrado que en *P. olivaceus* existe una tasa de crecimiento diferencial entre los sexos, las hembras son de mayor tamaño que los machos de la misma edad. No obstante, para desarrollar una biotécnica para *P. californicus* es necesario conocer el proceso de la diferenciación sexual y el efecto de los factores ambientales sobre el desarrollo de la gónada. En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual con el fin de producir progenies de hembras.

IV. HIPOTESIS

La temperatura influye en el proceso de diferenciación sexual de los peces, entonces la exposición del lenguado *Paralichthys californicus* a diferentes temperaturas durante las etapas tempranas de desarrollo resultará en diferentes proporciones sexuales.

V. OBJETIVOS

V.I Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre el proceso de diferenciación sexual en el lenguado de California.

V.II. Objetivos específicos

- ❖ Describir el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y supervivencia del lenguado de California.
- ❖ Caracterizar el desarrollo morfológico del lenguado de California a diferentes temperaturas.
- ❖ Describir el desarrollo gonadal de los juveniles del lenguado de California cultivados a distintas temperatura.
- ❖ Determinar el efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual de los juveniles del lenguado de California.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El bioensayo se realizó en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, Baja California, México.

VI.I. Origen de las larvas de lenguado y protocolo de cultivo

Los huevos de lenguado se obtuvieron de un desove espontáneo de reproductores del laboratorio de peces marinos de Santa Mónica, California, EUA.

Los huevos fecundados se cuantificaron tomando una alícuota de 50 ml del agua donde se contenían los huevos del desove. A continuación, fueron colocados en los estanques experimentales a una densidad de 15 huevos/l, donde se incubaron por 36 h hasta el momento de la eclosión. Posteriormente, se colocaron aproximadamente 1500 larvas en cada una de las unidades experimentales. La temperatura del agua se mantuvo a 20°C, con una salinidad de 34 UPS durante 15 días.

El sistema experimental consistió en 15 estanques de 100 l cada uno. La distribución de los tratamientos en el dispositivo experimental se hizo en grupos de tres, con la finalidad de evitar la mezcla de agua y la transferencia de calor entre los estanques con diferentes temperaturas. Para asegurar una aireación constante en cada estanque, se emplearon piedras difusoras, que además promovieron una temperatura homogénea en todo el volumen de agua. Para mantener la calidad del agua, los estanques se conectaron al sistema de recirculación cerrada del Departamento de Acuicultura. Para eliminar los restos de alimento y heces, diariamente cada estanque se limpió cuidadosamente con un sifón, evitando la succión de las larvas.

Durante la primera semana de experimentación, que correspondió a la primera semana del desarrollo ontogenético de los lenguados, se mantuvo un 0% de recambio de agua, para evitar movimientos bruscos que provocaran la muerte de las larvas,

posteriormente conforme las larvas incrementaron su talla se aumentó la tasa de recambio de agua hasta llegar a 100% cada hora.

Una vez que las larvas comenzaron a alimentarse, cuatro días después de la eclosión (DDE), se les suministraron rotíferos (*Brachionus plicatilis*) hasta el día 13 DDE. A partir del día 14 DDE se proporcionó una mezcla de rotíferos con nauplios de artemía, ambos enriquecidos con una emulsión rica en ácidos grasos polinsaturados (Algamac 2000, Aquafauna Bio-Marine). Después del día 18 y hasta el día 40 DDE, las larvas se alimentaron exclusivamente con nauplios de Artemia enriquecidos, a partir de este momento, paulatinamente se sustituyeron los nauplios de Artemia por una dieta formulada microparticulada (Otohime, Reed Mariculture, Campbell, CA) hasta que alcanzaron los 80 mm de longitud total (Zacarías-Soto *et al.* 2006). El tamaño de la primera dieta formulada Otohime fue de 400 a 600 μm , seguida de partículas de 600 a 800 μm y por último se suministraron partículas de 920 a 1040 μm . Posteriormente y hasta el final del experimento, los organismos se alimentaron a saciedad con un alimento para trucha (Steelhead, Alimentos el Pedregal, Toluca, México) de 2.38 mm de diámetro con 42% de proteína y 15% grasa. Este protocolo de alimentación se modificó de acuerdo al crecimiento de los organismos, debido a que las mayores temperaturas promovieron un crecimiento más acelerado, por lo tanto el periodo en que se suministro cada uno de los alimentos se ajustó de acuerdo con el crecimiento registrado en cada una de las temperaturas.

VI.II. Control de la Temperatura

Para definir las temperaturas experimentales se tomó como referencia la temperatura preferida final de 18°C (Esquer, 2006). A partir de esta temperatura se definió una inferior y tres superiores, lo que resultó

en un arreglo final de cinco temperaturas: 15, 18, 21, 24 y 27°C (T15, T18, T21, T24 y T27).

Para las temperaturas de 21, 24 y 27°C se utilizaron calentadores para acuario de 250 w, colocados en la pared de los estanques sobre los difusores de aire, para garantizar la distribución homogénea del calor. Para asegurar una temperatura constante en los estanques, una semana antes del inicio del experimento se regularon los calentadores. Para las temperaturas de 15 y 18°C se utilizó un enfriador de agua, conectado a un sistema de intercambio de calor, constituido por una manguera de polietileno negro de 19 mm de diámetro que se colocó en el interior de cada estanque.

El bioensayo contó con tres repeticiones para cada nivel del factor temperatura, por lo que se consideraron en total 15 unidades experimentales. Una vez colocados en las unidades experimentales, las larvas se aclimataron durante varias horas antes de activar los calentadores y los enfriadores previamente calibrados.

Se realizó un registro diario, a las 8:00 y a las 16:00 horas, de la temperatura (0.1°C de precisión), la salinidad (0.01 ‰ de precisión) y el oxígeno disuelto (0.01 mg/l de precisión) en las unidades experimentales, empleando un medidor digital (YSI, modelo 85). La concentración de amoníaco se cuantificó cada tercer día durante los primeros 15 días y posteriormente cada semana, con un kit colorimétrico comercial (0.1 mg/l de precisión, Nutrafin).

La duración de la exposición a la temperatura fue de 183 días a partir del día 15 después de la eclosión (DE). La duración total del bioensayo fue de 243 días a partir de la eclosión.

Se evaluó la sobrevivencia de los organismos al final del experimento y se expresó en porcentaje utilizando la siguiente fórmula (1):

$$(1) \quad S = \frac{N_f}{N_i} * 100$$

Donde S = sobrevivencia expresada en forma porcentual

Ni = número de organismos al inicio del bioensayo

Nf = número de organismos al final del bioensayo

Para evaluar el crecimiento durante el periodo experimental, se tomaron muestras de 60 organismos, se anestesiaron con metanosulfonato de tricaina (MS-222) y se evaluó la longitud total y el grado de desarrollo, se clasificó de acuerdo con los criterios propuestos por Gadomski *et al.* (1990) y Gisbert *et al.* (2004) hasta el día 44 DE. Las mediciones de la longitud total (LT) de las larvas premetamórficas se efectuaron con un microscopio estereoscopio (Olympus) equipado con una reglilla micrométrica. Las larvas post-metamórficas y los juveniles se midieron con un vernier marca Scala con una precisión de 0.1 mm. Para la cuantificación del peso húmedo se utilizó una balanza analítica marca OHAUS Adventurer modelo AR1530 con una precisión de 0.001 gr. Las biometrías se efectuaron los días 23, 28, 33, 38, 44, 49, 63, 81, 99, 123, 158, 214 y 243 DE.

Se cuantificó la tasa específica de crecimiento (TEC) de los organismos para cada biometría. La TEC es empleada para describir el crecimiento de los peces juveniles por periodos cortos cuando el crecimiento se ajusta a una función exponencial (ecuación 1). Los resultados se expresan como el porcentaje de la ganancia en longitud por día (% día⁻¹).

Tasa Específica de Crecimiento (TEC) para la longitud total (Lt)

(2)

$$(2) \quad TEC = \frac{\ln L_{t+1} - \ln L_t}{\text{tiempo}} * 100$$

Donde:

$\ln (L_{t+1})$ = es el logaritmo natural de la longitud total al tiempo $t+1$

$\ln (L_t)$ = es el logaritmo natural de la longitud al tiempo inicial

tiempo = tiempo transcurrido Δt

VI.III. Identificación del periodo de sensibilidad para la inducción del sexo.

Para identificar el periodo de sensibilidad a la inducción sexual mediante el uso de hormonas esteroides, se realizó un bioensayo que consistió en el suministro del andrógeno 17 α metiltestosterona (MT) en la dieta de las larvas de lenguado (i.e., rotíferos, Artemia y/o microdieta). Con este propósito se consideraron tres tratamientos: 1) exposición pre-metamórfica (PreMet); 2) post-metamórfica (PosMet); y 3) juvenil (Juve). Cada tratamiento se realizó por triplicado, para lo cual, un total de 900 larvas se distribuyeron en grupos de 100 en un sistema de 9 estanques de 20 l de capacidad cada uno, con 17 l de agua. Cada estanque se mantuvo con aireación constante a través de difusores que ayudaron a mantener una temperatura homogénea en todo el volumen de agua. Los estanques se conectaron al sistema de recirculación cerrada del Departamento de Acuicultura. Para eliminar los restos de alimento y heces, cada estanque fue limpiado cuidadosamente con un sifón, evitando la succión de las larvas.

El primer tratamiento consistió en la exposición de las larvas a la MT durante el periodo comprendido entre el día 7 al 47 DE (pre-metamórfico), tomando en consideración el protocolo de alimentación descrito por Zacarías-Soto *et al.* (2006). Como se menciono anteriormente, los diferentes tipos de alimento vivo fueron previamente

enriquecidos con el esteroide antes de suministrárselos a las larvas. Durante la primera etapa, las larvas se alimentaron con rotíferos, del día 7 al 13 DE; en la segunda etapa, del día 14 al 18, las larvas se alimentaron con rotíferos y nauplios de *Artemia* y durante la tercera etapa del día 19 al 40, se alimentaron sólo con nauplios de *Artemia*.

En el segundo tratamiento, el alimento enriquecido con esteroide se suministró del día 48 al 113 DE (PosMet), este periodo se subdividió en dos etapas: la primera del día 40 al 48 se alimentaron con nauplios de *Artemia* y alimento formulado. La segunda etapa de alimentación fue con la dieta Otohime del día 49 al 113 DE.

El tercer tratamiento consistió en el suministro del alimento enriquecido con el esteroide del día 114 al 179 DE (Juve), durante este periodo las larvas se alimentaron con la dieta formulada Otohime (Fig. 3).

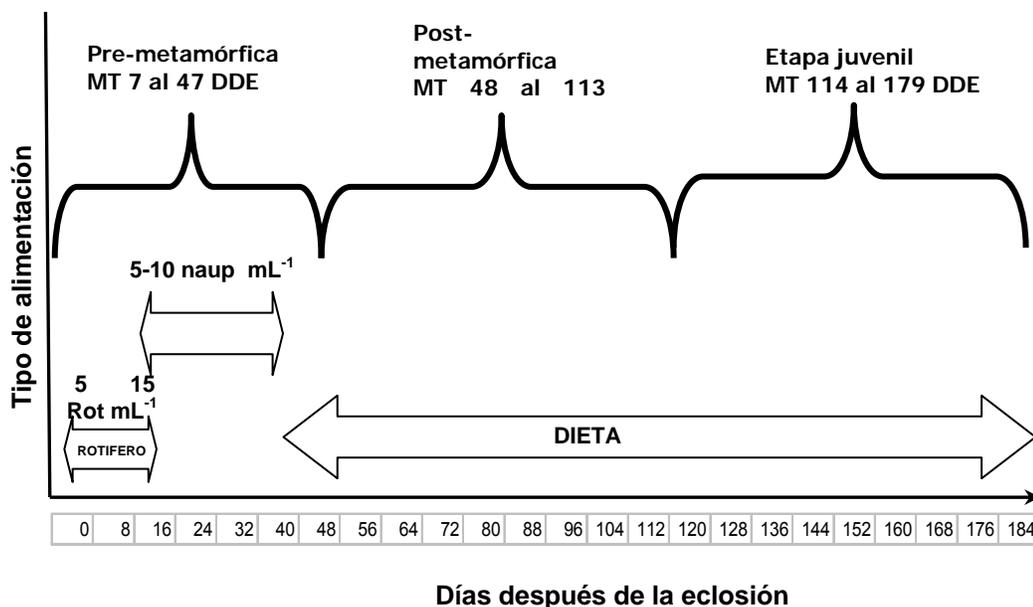


Figura 3. Diagrama del protocolo para estudiar el periodo de sensibilidad a la inducción del sexo en *Paralichthys californicus*, con la aplicación de 17 α metilttestosterona (MT) en diferentes estadios de vida.

Para enriquecer los rotíferos (*B. plicatilis*) y los nauplios de *Artemia* con el esteroide (MT), se colocaron por 18 h en un baño enriquecido con una emulsión rica en ácidos grasos polinsaturados (Algamac 2000, Aquafauna Bio-Marine) y MT a una concentración de 10 mg/l. La dieta microparticulada Otohime se enriqueció con el esteroide por medio de una solución de MT disuelta en alcohol, que fue dispersada sobre el alimento. Posteriormente, el alcohol fue eliminado al volatilizarse a temperatura ambiente. Se adiciono MT para obtener una concentración final en la microdieta de 10 mg de MT/kg (Stewart *et al.* 2001).

VI.IV. Identificación del sexo

Se efectuaron dos muestreos para la identificación del sexo en los juveniles: a los 214 y 243 DDE. Se analizaron 33 organismos de los tratamientos de T18, T21, T24 y T27. No se analizaron organismos de 15°C debido a que aun no tenían la talla adecuada propuesta para *P. olivaceus*. Los organismos cuya longitud aproximada fue de 9.5 cm, fueron sacrificados con una sobredosis del anestésico MS-222. Posteriormente, se procedió a disecar la región abdominal del organismo para quitar el resto de los tejidos (Fig. 4). El tejido correspondiente a las gónadas de los juveniles y tejidos asociados (conducto ovárico o vasos deferentes), se congelaron sobre un bloque de hielo seco (CO₂) a -80°C y se incluyó en medio criosolidificable para histología por congelación (OCT-Compound, Tissue-Tek 4583, Distribuidor Bayer S.A).



Figura 4. Extracción de la gónada de *P. californicus* para ser procesada por histología.

Se realizaron cortes de seis μm de espesor en un crióstato Leica CM-1510-S. Los cortes fueron recuperados en portaobjetos y se rotularon. Para lograr un mayor contraste entre los órganos internos en los cortes histológicos y así lograr identificar el sexo, se efectuó una tinción con hematoxilina-eosina, siguiendo el procedimiento descrito por Wolf y Wolf (1974) que a continuación se describe brevemente:

- A) 3-5 min Hematoxilina
- B) Lavado con agua corriente 5 min.
- C) 10 inmersiones en Alcohol ácido
- D) Virar con agua carbonatada (Na ó Li)
- E) Lavar con agua corriente (dos inmersiones)
- F) Sumergir en alcohol etílico al 95% por 1 min.
- G) 45 seg.-1 min. en eosina
- H) 2 Cambios en Alcohol etílico al 96% (1 minuto c/uno)
- I) 2 Cambios en Alcohol etílico al 100% (1 minuto c/uno)

- J) Alcohol Etilico - Xileno 1:1 (1 minuto)
- K) 2 Cambios Xileno (3-4 minutos c/uno)
- L) Montaje con resina sintética

Para el segundo muestreo (243 DDE), se realizó el mismo procedimiento de disección y extracción de las gónadas (Figura 4), tomando organismos de T15, T18, T21 y T24 únicamente, debido a que ya no se contaba con juveniles del tratamiento de T27. Una vez disecada, la gónada se colocó en cajas de histología para sumergirlas en una solución fijadora Bouin (ácido pícrico, formalina y ácido acético) por 24 h. Después se realizaron tres lavados con alcohol al 70%, cada uno por tres h. A continuación, las muestras fueron colocadas en un deshidratador de tejidos automático Leica TP 1040, el cual las baño en soluciones sucesivas de etanol, benceno y finalmente incluidas en parafina.

Las muestras procesadas fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes de 4 μm en un micrótopo rotatorio marca Leica. Los cortes fueron montados en portaobjetos y pasaron por el proceso de desparafinado (soluciones continuas de xileno y etanol al 100 y 96%) e hidratación (agua destilada). Terminado este proceso se efectuó la tinción con Hematoxilina-Eosina siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto Olympus IX 71 con un aumento de 50x a 1000x

VI.V. Análisis Estadístico

Las medidas de la longitud total obtenidas a lo largo del experimento fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza de 95%. Los resultados de la tasa de crecimiento se analizaron mediante un ANOVA de una vía. Las

comparaciones de las medias se realizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para ello se empleó el programa Statistica 6.0. Se calcularon las proporciones sexuales en los diferentes tratamientos y se analizaron mediante una prueba de X^2 .

VII. RESULTADOS

La duración total del bioensayo fue de 243 días. Los organismos se mantuvieron bajo las condiciones experimentales durante 183 días.

La concentración media de oxígeno disuelto para cada uno de los tratamientos térmicos se mantuvo en el intervalo de 6.56 a 4.77 mg/l, el valor mínimo de 3.38 mg/l se registró en el tratamiento de 24°C. La concentración máxima fue de 9.89 mg/l a 18°C (Tabla I).

El análisis de varianza efectuado para los valores de la concentración de oxígeno mostró que existieron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). La prueba Tukey de comparaciones múltiples mostró que las concentraciones de oxígeno disuelto en T15, T18 y T21 fueron significativamente diferentes entre sí. Además, fueron superiores a las concentraciones de oxígeno de T24 y T27 y éstas últimas no presentaron diferencias entre sí (Tabla I).

Tabla I. Concentración de oxígeno (mg/l) para los diferentes tratamientos durante la etapa de experimentación con *Paralichthys californicus*.

| Temperatura | Media (mg/l) | Mínimo | Máximo | Desviación estándar |
|-------------|-------------------|--------|--------|---------------------|
| 15 | 6.56 ^a | 3.95 | 8.55 | 0.60 |
| 18 | 6.00 ^b | 3.72 | 9.89 | 0.51 |
| 21 | 5.46 ^c | 3.86 | 6.74 | 0.41 |
| 24 | 4.79 ^d | 3.38 | 6.70 | 0.55 |
| 27 | 4.77 ^d | 3.47 | 6.60 | 0.51 |

Superíndices diferentes indican diferencias ($p < 0.05$)

La concentración de amonio total promedio en los estanques de cultivo del lenguado de California expresada como NH_3 fue de 0.25 ± 0.2 mg de $\text{NH}_4\text{-NH}_3/\text{l}$.

VII.I Control de la temperatura

El sistema de control de las temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) permitió establecer adecuadamente el diseño experimental deseado (15, 18, 21, 24 y 27°C). Las temperaturas superiores a 20°C se controlaron empleando calentadores individuales de 250 vatios, en tanto que las temperaturas de 15 y 18°C se controlaron con un sistema de intercambio de calor, utilizando agua enfriada a 14 y 16°C , respectivamente. La mayor variabilidad en los tratamientos se presentó en T21 con una desviación estándar de 1.16°C , mientras que la menor fue en T18 con 0.71°C (Tabla II).

El análisis de varianza efectuado a las temperaturas registradas durante el experimento indicó que existían diferencias significativas ($p < 0.001$). La prueba de Tukey de comparaciones múltiples confirmó que existían diferencias entre todas las temperaturas (Tabla II).

Tabla II. Temperatura de los tanques de cultivo de *Paralichthys californicus*. Superíndices diferentes indican diferencias significativas. Des. Est. = desviación estándar.

| Temperatura | Media ($^{\circ}\text{C}$) | Mínimo ($^{\circ}\text{C}$) | Máximo ($^{\circ}\text{C}$) | Des. Est. ($^{\circ}\text{C}$) |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 15 | 15.09 ^a | 12.4 | 21 | 0.97 |
| 18 | 17.74 ^b | 15.8 | 24.4 | 0.71 |
| 21 | 20.80 ^c | 17.4 | 25.2 | 1.16 |
| 24 | 23.97 ^d | 20.3 | 26.3 | 0.86 |
| 27 | 26.54 ^e | 20.3 | 28.6 | 1.02 |

Superíndices diferentes indican diferencias ($p < 0.05$)

Las variaciones más importantes de la temperatura se registraron entre los días 29 y 31 DE, ya que la temperatura ambiental se elevó provocando que el agua de recambio en los tanques ingresara más caliente, esta variación ambiental implicó una nueva calibración en los calentadores y enfriadores, sin embargo la corrección tardó un par de días (Fig. 5).

En el tratamiento de 18°C se registraron las menores fluctuaciones. Por su parte, en el tratamiento de 21°C, las fluctuaciones más importantes se presentaron del día 119 al 133 DE.

Durante el otoño (44 al 143 DDE) se presentaron las mayores fluctuaciones de temperatura en el tratamiento de 15°C. Por su parte, durante el invierno (144 al 196 DDE) se registraron temperaturas ambientales inferiores a los 18°C en promedio, lo que ocasionó fluctuaciones de entre 19.3 y 21.6°C y entre 24.8 y 27.4°C para los tratamientos de 21 y 27°C, respectivamente (Fig. 5).

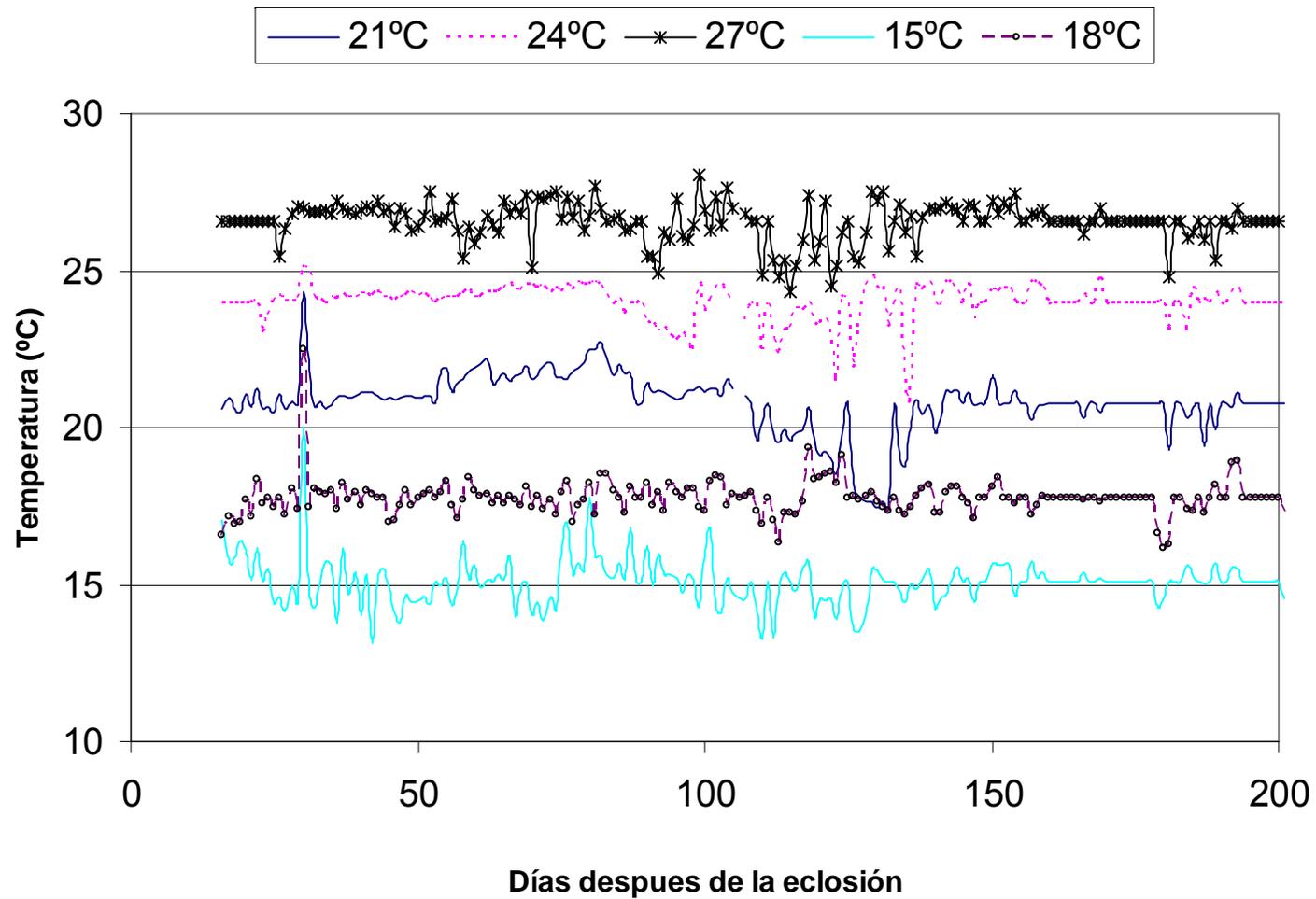


Figura 5. Registros diarios de la temperatura en los estanques de cultivo de *Paralichthys californicus* expuesto a cinco condiciones térmicas (15, 18, 21, 24 y 27°C).

Las larvas de lenguado, con una edad de dos DDE se distribuyeron de manera aleatoria en las 15 unidades experimentales, en cantidades homogéneas. Se mantuvieron durante 11 días a una temperatura inicial promedio de 16°C antes de encender los calentadores y los enfriadores para obtener la temperatura del agua en cada tratamiento.

Se realizaron biometrías periódicas los días 23, 28, 33, 38, 44, 49, 63, 81, 99, 123, 158, 214 y 243 DDE. A partir de la primera biometría se observaron diferencias significativas en la longitud de los peces que se mantuvieron en las distintas condiciones térmicas ($p < 0.001$). Destacando los tratamientos T24 y T27, en donde se presentó un crecimiento mayor. Para el día 38 DE, las diferencias entre las condiciones térmicas fueron muy significativas ($p < 0.001$), el mayor crecimiento se registró en T27 con 18.5 mm. El crecimiento fue menor en los tratamientos con las temperaturas más bajas, siendo T15 donde se registró el menor promedio en longitud total con 7.6 mm. Este patrón de crecimiento se mantuvo hasta los 63 DDE.

Para el día 81 los organismos mantenidos en T24 alcanzaron la mayor longitud con 67.1 mm, lo cual fue 10.2% superior a lo observado en T27. Este comportamiento se mantuvo hasta los 99 DDE (Fig. 6).

La biometría realizada el día 123 DE reveló que los organismos con el mayor crecimiento fueron los cultivados en T24, seguidos por los de T21. El promedio de la longitud total (Lt) varió entre 21.4 y 96.5 mm, los organismos de T15 fueron los más pequeños. Por otro lado, los peces que se mantuvieron en T24 presentaron la mayor longitud con 96.5 ± 8 mm, la cual resultó ser 77.8% superior a la registrada en los organismos mantenidos en T15.

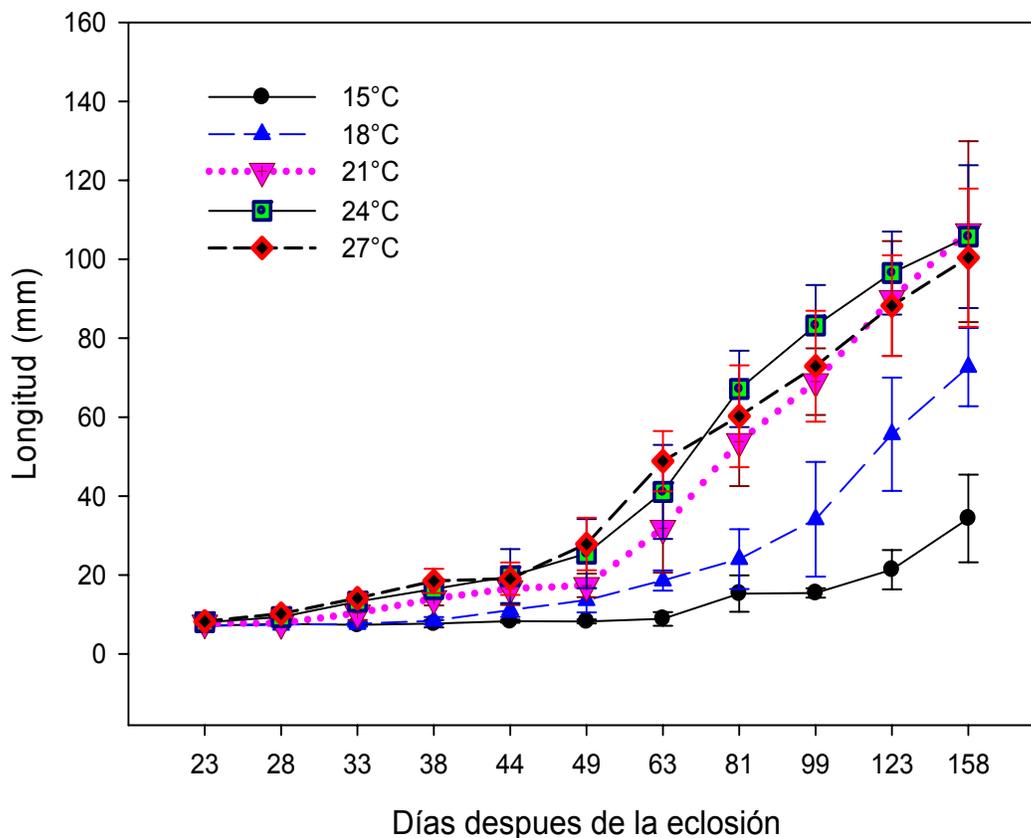


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Paralichthys californicus* en longitud total (mm) cultivado durante un periodo de 158 días contados a partir de la eclosión, en diferentes condiciones térmicas (15, 18, 21, 24 y 27°C).

Para el día 158 DE, los organismos mantenidos en T21 mostraron la mayor LT con 107 ± 22.9 mm, que fue superior en 1.16 y 67.9% a la longitud registrada en T24 y T15, respectivamente.

El análisis de varianza efectuado a los datos de LT registrados a los 158 DDE mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). La prueba de comparaciones múltiples mostró que los tratamientos de T21, T24 y T27 fueron estadísticamente iguales y diferentes de T15 y T18, además las longitudes observadas en éstas últimas temperaturas son significativamente diferentes entre sí (Tabla III).

Tabla III. Longitud total promedio de *Paralichthys californicus* (mm \pm desviación estándar) después de un periodo de cultivo de 158 DDE a diferentes temperaturas.

| Tratamiento (°C) | Media (mm) |
|------------------|-------------------------------|
| 15 | 34.3 \pm 11.1 ^a |
| 18 | 72.7 \pm 9.9 ^b |
| 21 | 107.0 \pm 22.9 ^c |
| 24 | 105.7 \pm 18.1 ^c |
| 27 | 100.4 \pm 17.5 ^c |

Superíndices diferentes indican diferencias ($p < 0.05$)

La tasa específica de crecimiento se incrementó de manera importante en dos ocasiones cuando los lenguados se cultivaron en T24 y T27, primero alrededor del día 33 DE y posteriormente el día 49 DE, con valores mayores a 6.4 y 5.1% de incremento de la longitud por día, respectivamente (Fig. 7). Los organismos mantenidos en T15 presentaron las menores tasas con un máximo de 3.02 % de incremento de la longitud por día en el día 81 DE.

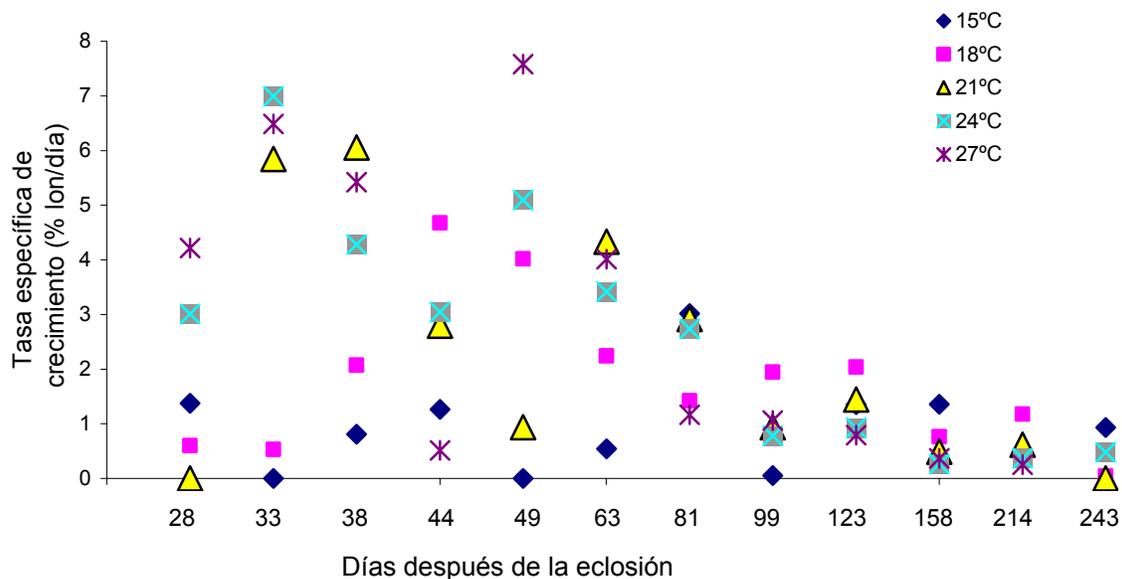


Figura 7. Tasa específica de crecimiento para *Paralichthys californicus* cultivados en diferentes condiciones térmicas durante 243 días.

Gadomski *et al.* (1990), propusieron una escala de desarrollo para las larvas de *P. Californicus*, cultivadas en 16 y 20°C, tomando como base la formación de diferentes estructuras y el desarrollo de conductas específicas. A continuación se enumeran los rasgos del desarrollo:

- I, pigmentación completa de los ojos
- II, absorción del saco vitelino
- III, inicio del alargamiento de los primeros radios de la aleta dorsal
- IV, inicio de la flexión de la notocorda
- V, conducta de asentamiento
- VI, inicio de la migración ocular
- VII, reducción de la longitud de los radios anteriores de la aleta dorsal
- VIII, metamorfosis completa (culmina el asentamiento, la migración de los ojos y la reducción de radios anteriores de la aleta dorsal)
- IX, inicia la formación de las escamas.

De acuerdo con esta escala, el desarrollo de las larvas cultivadas a diferentes temperaturas se modificó de manera similar a lo que ocurrió con el crecimiento, en términos generales, los diferentes estadios de desarrollo transcurren más rápidamente cuando la temperatura es mayor (Tabla IV).

Tabla IV. Cronología en del desarrollo ontogenético de *Paralichthys californicus* (días después de la eclosión) cultivado a diferentes temperaturas 15, 18, 21, 24 y 27°C. Los estadios de desarrollo se clasificaron de acuerdo con los criterios de Gadomski *et al.* (1990).

| Estadio | T15 | T18 | T21 | T24 | T27 |
|---------|-------|-------|-----|-----|-----|
| I | | | | | |
| II | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| III | 23-44 | 23-28 | | | |
| IV | | 33 | 23 | 23 | |
| V | | 33 | 23 | 23 | |
| VI | | 38 | 28 | 23 | 23 |
| VII | | 38 | 28 | 28 | 23 |
| VIII | 99 | 44 | 33 | 28 | |
| IX | | 44 | 33 | 33 | 28 |

VII. II Desarrollo larval a 15 y 18°C (T15 Y T18)

Los organismos cultivados en T15 presentan poca pigmentación (23 DDE), en general son traslucidos con pequeños puntos oscuros a lo largo de su notocordio. El peritoneo también está pigmentado. Otra franja de pigmento inicia en la zona cercana al cerebro y continúa hasta la aleta caudal, formando una banda paralela a la aleta dorsal. Los ojos están bien pigmentados y se encuentran uno a cada lado de la cabeza (Fig. 8 A). Además, los primeros cinco radios de la aleta dorsal están alargados, formando una especie de penacho (Fig. 8 B y C).

Los organismos que se mantuvieron en T18 presentaron cinco radios alargados formando un penacho. En general fueron similares a las larvas que se

mantuvieron en T15. Después de 28 DDE, los organismos que se mantuvieron en T15 y T18 se encontraban en el mismo estadio III de desarrollo (Fig. 8C).

No se presentó ningún cambio en el desarrollo de los organismos mantenidos en 15°C hasta 99 DDE (15.45 mm), cuando la mayor parte de la población había completado la metamorfosis.

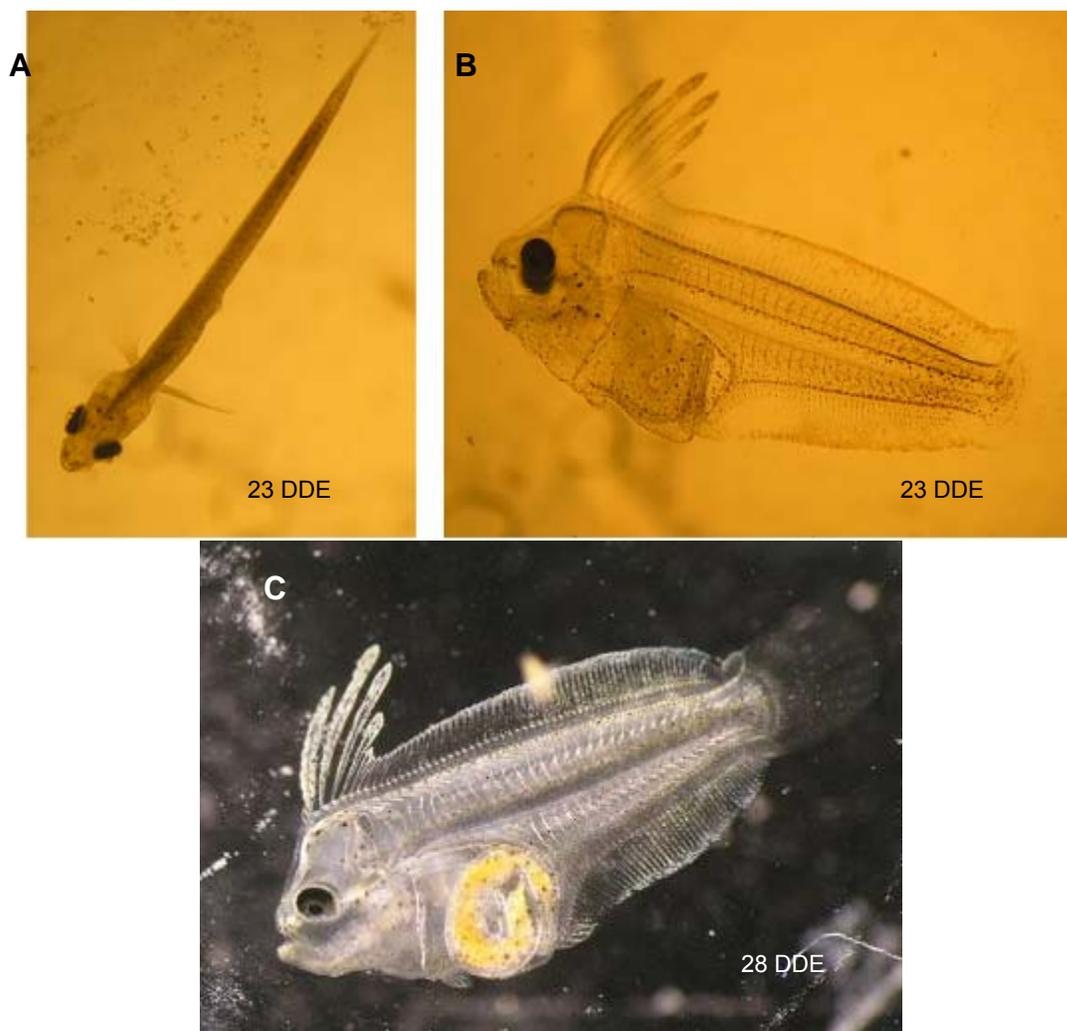


Figura 8. Larvas de *Paralichthys Calinornicus*. A y B 23 DDE y cultivadas en T15; C 28 DDE y cultivadas en T15 y T18.

Transcurridos 28 DDE en T18 se encontraron larvas en estadio IV, sin embargo, la mayor parte de la población aun se mantenía en el estadio III. A los 33 DDE, su desarrollo correspondía a los estadios IV y V. A los 38 DDE las larvas se encontraban en los estadios de desarrollo VI y VII, con una longitud total de 8.41 ± 0.93 mm. Para los 44 DDE ya se había completado la transformación de los organismos y se desarrolló una franja de color claro por detrás del opérculo (Fig. 11 B).

VII. III Desarrollo larval a 21°C (T21)

Para el día 23 DDE, las larvas mantenidas en T21, presentaron la pigmentación de los bordes longitudinales más intensa que lo encontrado en T15 y T18. De igual forma ocurrió con la que corre por encima del notocordio (Fig. 9 A). Además, en una fracción de la población la pigmentación ya era abundante en la zona de la cabeza y sobre la masa visceral. También se observó su comportamiento de asentamiento, que coincidió con el inicio de una ligera flexión en el cuerpo. En algunos organismos se apreció el inicio de la migración del ojo (Fig. 9 B).

Al cabo de 28 DDE las larvas cultivadas en T21 se encontraron entre los estadios VI y VII de desarrollo, en donde comienza la reducción de los radios de la aleta dorsal, que se aprecian muy traslucidos y delgados. Después de 33 DDE la mitad de la población había terminado su desarrollo y comenzó a presentar una franja de escamas claras por el lado oculado comenzando por detrás del opérculo. Posterior a esto, ya no se observaron mayores cambios morfológicos en los organismos.

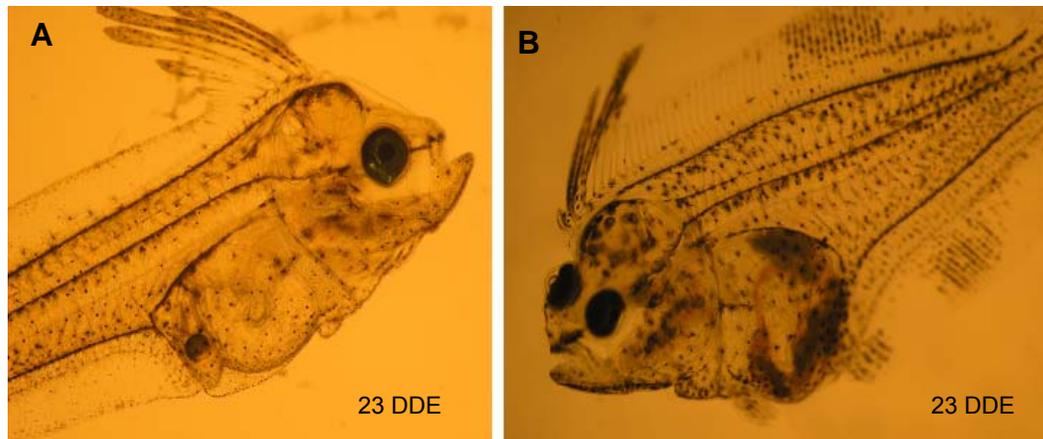


Figura 9. Larvas de *Paralichthys californicus* (A y B) cultivados a 21°C después de 23 DDE. En el panel A se observa una larva sin la migración del ojo. En el organismo del panel B, el ojo izquierdo presenta un avanzado estado de migración con los radios anteriores de la aleta dorsal reducidos.

VII. IV Desarrollo larval a 24°C (T24)

A esta temperatura de cultivo, en las larvas con mayor desarrollo se observó una reducción en la cantidad de radios anteriores de la aleta dorsal (23 DDE), con una longitud total de 8.04 mm. La pigmentación en la aleta anal y dorsal fue más intensa que en los organismos de las demás temperaturas. También se observaron organismos en estadios de desarrollo inferiores, similares a los observados en el tratamiento T15 (Fig. 9 A y B).

Después de 28 DDE, las larvas presentaban una longitud de 9.35 ± 1.19 mm y se encontraron en el estadio VII y VIII de desarrollo. Los radios de la aleta caudal ya eran notorios a simple vista y de mayor grosor.

Los organismos cultivados en T24 no presentaron cambios evidentes en su anatomía a partir del día 33 DE con 13.26 mm, donde la mayor parte de la población se encontró en estadio IX. Así misma, apareció la franja clara en el lado oculado de los peces.

VII. V Desarrollo larval a 27°C (T27)

Los organismos que se mantuvieron durante 10 días a 27°C (23 DDE), presentaron un desarrollo mayor que los organismos cultivados a temperaturas inferiores. La mayoría de las larvas habían alcanzado el estadio VI, con la migración del ojo casi completa y la reducción de los radios de la aleta dorsal (Fig. 10 A y B).

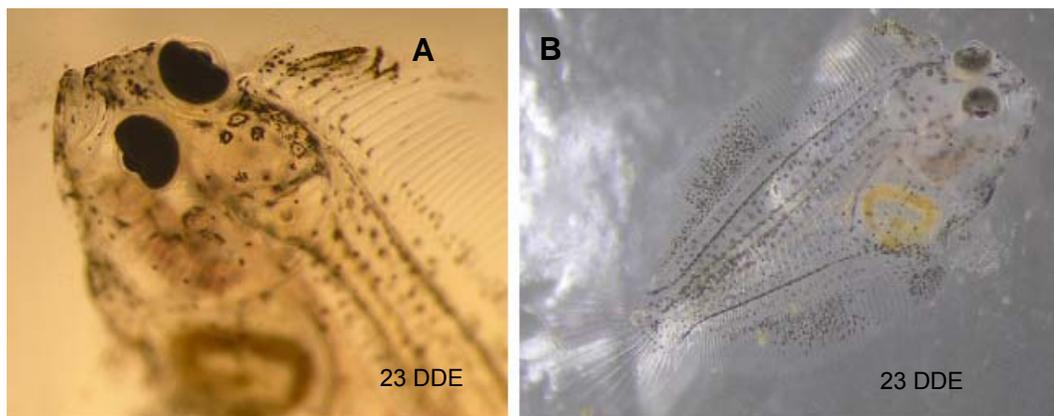


Figura 10. Larvas de *Paralichthys californicus* (A y B) cultivados a 27°C después de 23 DDE. En el panel A se observa la reducción de los radios anteriores de la aleta dorsal. En el organismo del panel B, los ojos derecho o izquierdo en un avanzado estado de migración.

A los 28 DDE las larvas se encontraban en el estadio IX. La mayoría de los organismos habían completado la metamorfosis y comenzaba la formación de las escamas. Una pequeña parte de la población aun no se había asentado y se mantenía nadando con una coloración más oscura. En este tiempo (talla: 10.2 ± 0.88 mm), comenzó a hacerse evidente la falta de pigmentación normal en algunas de las larvas (i.e. sedoalbinas con manchas, no obstante, esto no afectó el crecimiento (Fig. 11 A y B). Los organismos que presentaron una pigmentación normal, desarrollaron una franja de escamas de color claro de la

aleta dorsal a la anal, por detrás del opérculo, cubriendo la masa visceral. Las aletas pectorales están en medio de esta franja (Fig. 11 B).

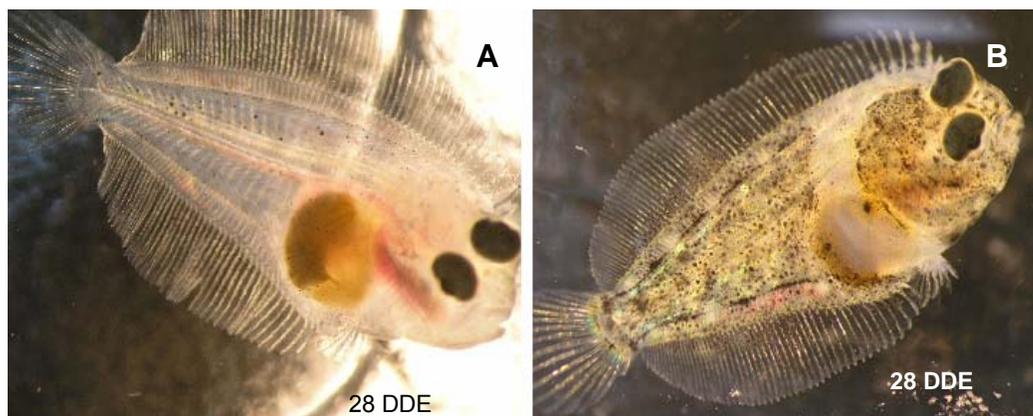


Figura 11. Larvas de *Paralichthys californicus* de 28 DDE cultivadas a 27°C. A, larva con pigmentación anormal. B, larva con pigmentación normal.

Los organismos mantenidos en 27°C no presentaron cambios evidentes en su anatomía a partir del día 28 DE, donde la mayor parte de la población se encontró en estadio IX.

VI.VI Sobrevivencia

Debido al tamaño de las larvas y al proceso de descomposición tan acelerado no fue posible realizar estimaciones de la mortalidad instantánea durante las etapas tempranas de desarrollo. Al inicio del ensayo se sembraron 1500 larvas por estanque y se volvieron a contar hasta el final del experimento. No obstante de la dificultad para observar la mortalidad, se identificaron momentos críticos en el desarrollo del cultivo que se tradujeron en una disminución evidente de la población. El primero fue durante y al término de la

absorción del saco vitelino; un segundo evento ocurrió cuando los organismos abrieron la boca y comenzaron a comer (primera alimentación). El tercer evento de mortalidad se observó durante la metamorfosis y la intensidad del mismo parece estar relacionada a la temperatura. El cuarto evento se presentó al comienzo del destete, cuando se sustituyó el alimento vivo (nauplios de *Artemia*), por la dieta microparticulada.

La sobrevivencia fue baja, con porcentajes de 1.6, 2.2, 2.4, 7.3, 0.8% para T15, T18, T21, T24 y T27, respectivamente. La mayor sobrevivencia se registró en T24.

Se registro una padecimiento patológico a los 111 DDE provocada presuntamente por un protozoario (*Uronema marinum*) y que ocasionó lesiones en la piel, parecidas a una quemadura y que necrosaron las membranas interradales de las aletas, mermando la salud de los organismos hasta el termino del experimento (Fig. 12 A y B). Además, los organismos fueron atacados por bacterias (no determinadas) cuando ya se encontraban débiles, esto ocurrió en los tratamientos de T21, T24 y T27 donde se tenía un mayor número de juveniles. Se realizaron disecciones desde el momento de la aparición de las enfermedades hasta el término del experimento. En las disecciones efectuadas a los organismos afectados por los patógenos, se encontró una coloración casi blanca en el hígado y con una consistencia porosa y quebradiza. El riñón estaba muy afectado en varios de los juveniles al grado de tener una consistencia casi liquida. Además, el tracto digestivo se encontró vacío y en algunos casos se encontró una especie de quistes. Se tomó sangre de varios organismos y se observó una gran cantidad de bacterias detectadas a una amplificación de 1000X.

Para tratar de erradicar el protozoario, se aplicaron baños de cloroquina a una concentración de 10 mg/l por 5 h cada 10 días.

También se utilizó oxitetraciclina a una concentración de 50 mg/l para eliminar las bacterias que proliferaron en las heridas abiertas de los juveniles de lenguado. Para su aplicación se siguió el mismo procedimiento que con la cloroquina (Noga, 2000).

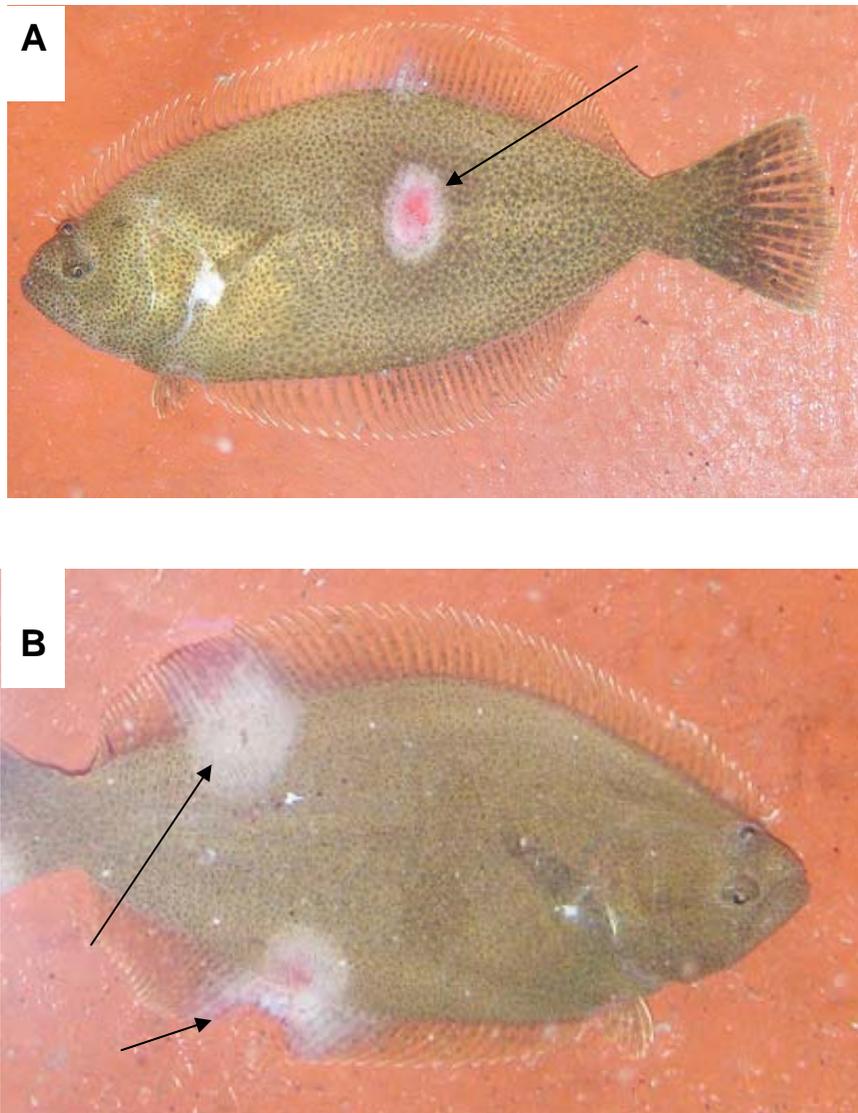


Figura 12. Juveniles del lenguado de California, *Paralichthys californicus*, de 111 DDE con lesiones en la piel, indicadas con las flechas.

VI. VII Diferenciación sexual

Con la finalidad de identificar el momento en que ocurre la diferenciación de las gónadas, se recolectaron muestras de las larvas y se efectuaron cortes histológicos, sin embargo, no se observó claramente este evento.

En los cortes realizados en organismos post metamórficos (46 DDE) cultivados en T18 se observó el primordio gonadal situado entre los conductos mesonefricos y el tracto digestivo. La histología de la gónada se caracteriza por las células somáticas que tienen su origen en la pared del peritoneo y que rodean a las células germinales primordiales (CGP) (Fig. 13).



Figura 13. Primordio gonadal de *Paralichthys californicus* a 46 DDE y cultivado a 18°C. Cg (cel. germinales), Cs (cel. somáticas), td (tracto digestivo) 400X.

Para la ubicación de las gónadas en las larvas y después en los juveniles del lenguado se requirió de mucho tiempo y varios cientos de cortes histológicos, debido a lo difícil que fue encontrar una estructura tan pequeña colocada en una posición tan singular. Para localizar las gónadas se pueden utilizar como referencia los radios de las aletas. Después de 214 DDE la gónada se puede ubicar en la parte distal de la cavidad abdominal, estrechamente ligada por tejido conectivo a la región terminal del riñón (Fig. 4) entre los radios 8 y 11 de la aleta anal y entre el 25 y 28 de la dorsal. Durante la disección de los juveniles las gónadas fueron evidentes a simple vista. Las gónadas derecha e izquierda son dos órganos independientes en esta etapa del desarrollo y se unen en la región terminal del riñón y el extremo distal, que se constituirá en los conductos gonadales (ovárico o espermático), se extienden hasta la región urogenital. Además, los lóbulos de la gónada están adheridos a la vejiga, uno a cada lado. Las gónadas son pareadas con una coloración blanca-amarilla y tienen una forma singular parecida a una "Y" recostada, con una prolongación hacia la parte posterior del pez, esta característica se observó en los juveniles sacrificados (Fig. 4). En los organismos de mayor talla se observó una pequeña cavidad que albergaba la diminuta prolongación, en los peces pequeños solo fue una ligera depresión la que albergó a las gónadas. El desarrollo de las gónadas se correlacionó directamente con la talla del organismo. Los gonoductos tienen una coloración amarilla clara translúcida y se disponen paralelos al uréter.

El análisis histológico, empleando el método de congelación, de las gónadas de los juveniles que se sacrificaron el día 214 DE, reveló que el 100% de los organismos analizados se diferenciaron como machos en las cuatro temperaturas muestreadas (Tabla V).

Los organismos sometidos a 18°C presentaron el menor desarrollo gonádico de las cuatro condiciones. Se encontró un gran número de CGP que se multiplican mediante mitosis, además de mayor abundancia de células somáticas y de estroma, lo cual constituyó un tejido uniforme sin que se resaltara ninguna estructura. En las gónadas con mayor grado de desarrollo de

este tratamiento se pudo ubicar la formación de lóbulos seminales poblados por espermatogonias.

El grado de desarrollo gonadal de los lenguados cultivados a 24°C fue mayor. Fue evidente la formación de los lóbulos seminales, que contenían las espermatogonias, separados por una capa fibrosa de tejido conectivo. Además, se encontraron vasos sanguíneos entre los lóbulos seminales. En las gónadas con mayor desarrollo dentro de los lóbulos seminales se encontraron nidadas de células, probablemente espermatoцитos de primer y segundo orden (Fig. 14).

No se pudo evaluar el sexo de los organismos que se mantuvieron en T15 debido a que eran muy pequeños y fue muy difícil localizar la gónada.

Tabla V. Proporción sexual de los juveniles del lenguado *Paralichthys californicus* cultivados hasta el día 214 DE en diferentes condiciones térmicas.

| Tratamiento (°C) | % machos | N |
|------------------|----------|----|
| 15 | | |
| 18 | 100 | 33 |
| 21 | 100 | 33 |
| 24 | 100 | 33 |
| 27 | 100 | 30 |

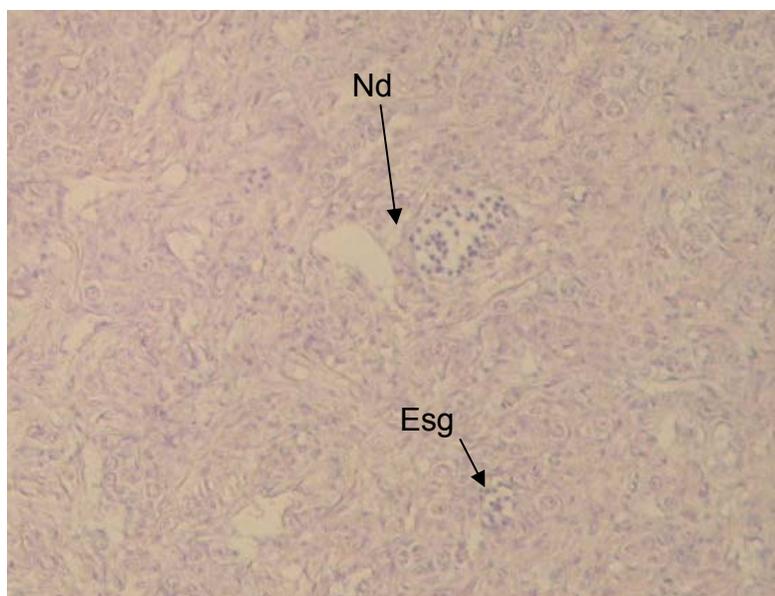


Figura 14. Corte histológico de la gónada de un juvenil del lenguado *Paralichthys californicus* de 214 DDE y cultivado a 18°C. Esg: espermatogonias; Nd: nidada de células. 400X.

Con la finalidad de confirmar el diagnóstico obtenido a los 214 DDE, se realizó un segundo análisis a los 243 DDE. El poder de resolución que se puede obtener utilizando técnicas histológicas de inclusión en parafina y tinción, es mayor a la que se obtiene utilizando la técnica de congelación y corte en el criostato, es por ello que este segundo análisis fue más preciso. Para este análisis ya no contábamos con juveniles cultivados en T27, por ello no fue identificado el sexo en este tratamiento a esta edad.

Mediante esta técnica se observó una población de organismos con un desarrollo gonadal temprano, en donde predominaban las CGP junto con células somáticas y tejido conjuntivo. La apariencia de la gónada en esta etapa de desarrollo constituyó un tejido uniforme sin que se resaltara ninguna estructura. Estas características se presentaron en organismos de los tratamientos T15, T21 y T24, siendo T15 el que presentó el mayor porcentaje de machos (85.7%) con un estadio de desarrollo gonádico temprano (Tabla VI). En

el resto de los juveniles de estos tratamientos se observaron los lóbulos seminales, que contenían las espermatogonias, separados por una capa fibrosa de tejido conectivo (Fig. 15 B). Además, dentro de los lóbulos seminales se encontraron nidadas de células, probablemente espermatocitos de primer y segundo orden. El 100% de los lenguados analizados del tratamiento T18 presentó estas características.

Tabla VI. Proporción sexual de los juveniles del lenguado *Paralichthys californicus* cultivados hasta el día 243 DE en diferentes condiciones térmicas.

| Tratamiento (°C) | % machos definidos | % machos con desarrollo temprano | N | % de la población analizada |
|------------------|--------------------|----------------------------------|----|-----------------------------|
| 15 | 14.3 | 85.7 | 16 | 22.2 |
| 18 | 100 | | 30 | 29.7 |
| 21 | 63.3 | 36.6 | 30 | 27.3 |
| 24 | 93.3 | 6.7 | 30 | 9.09 |
| 27 | | | | |

En algunos de los juveniles de lenguados sacrificados a los 243 DDE se llegó a observar un mayor grado de desarrollo gonadal, particularmente en aquellos cultivados a 24°C. Además de las nidadas de espermatocitos de primero y segundo orden se pudieron identificar espermatides e incluso es posible que las gónadas estuvieran pobladas con espermatozoides viables (Fig. 15 A).

En organismos con mayor desarrollo se observaron los tubulos seminales, que permiten el paso a los espermatozoides hacia el conducto deferente y después al poro genital (Fig. 15 C y D).

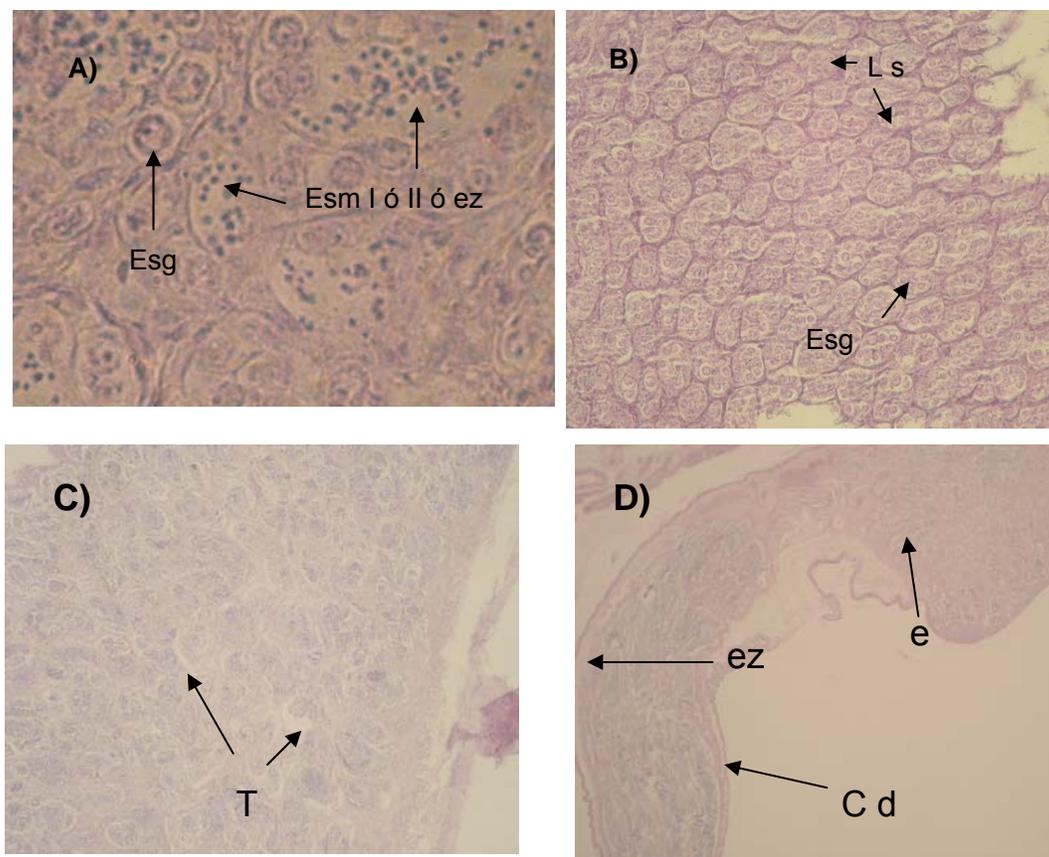


Figura 15. Diferentes etapas de desarrollo de la gónada de los juveniles del lenguado *Paralichthys californicus* de 243 DDE, cultivados a 24°C. Esg: espermatogonias; Esm I: espermatocito primario; Esm II: espermatocito secundario; L s: lóbulo seminal; T: tubulo seminifero; C d: conducto deferente; e: espermátidas y ez espermatozoides. A) 1000X, B) y C) 400x y D) 100X.

VII. VIII Efecto de los esteroides

Los organismos alimentados con la dieta enriquecida con esteroides se sacrificaron para identificar su sexo después de 222 días de la eclosión (Tabla VII). El análisis de varianza determinó que existían diferencias significativas en el crecimiento en longitud ($p < 0.001$) y en peso ($p < 0.001$).

Para determinar el sexo los juveniles se analizaron todos los organismos de los tres tratamientos. El resultado en los tratamientos fue de 100% machos. Estos organismos presentaron un grado de desarrollo gonadal similar a lo encontrado

en los juveniles de 214 DDE. La sobrevivencia mayor para el experimento se encontró en el tratamiento PosMe con 30%.

Tabla VII. Proporción sexual de los juveniles del lenguado *Paralichthys californicus* cultivados hasta el día 222 DE después de haber sido alimentados con MT.

| Tratamiento | Long mm | Peso gr | % Sobrevivencia | N | % machos | % de la población analizada |
|-------------|----------------|--------------|--------------------|----|-------------|-----------------------------------|
| PreMe | 93.6 ± 14.1 a | 9.2 ± 4.6 a | 15.6 | 14 | 100 | 100 |
| PostMe | 113.3 ± 16.4 b | 15.6 ± 6.2 b | 30 | 27 | 100 | 100 |
| Juve | 119.0 ± 12.7 b | 19.0 ± 5.7 b | 2.2 | 2 | 100 | 100 |

Superíndices diferentes indican diferencias (p<0.05)

VIII. DISCUSIÓN

Las temperaturas empleadas en cada uno de los tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí. Sin embargo, se registraron fluctuaciones durante el periodo experimental, aunque estas fluctuaciones fueron similares en todos los tratamientos. Es importante mencionar, que las fluctuaciones que se registraron al inicio del experimento y hasta el día 43 DE ocurrieron durante el verano, que fue la estación más calurosa del año en esta región del país. Durante ese periodo la temperatura ambiente osciló entre los 15 y 31°C, ocasionando que el agua del sistema de recirculación presentara temperaturas de hasta 24°C en la entrada de los tanques de cultivo, causando un incremento de temperatura en los tanques con los tratamientos de temperatura menores a 21°C. Sin embargo, durante el experimento los organismos permanecieron por lapsos cortos (dos días) en temperaturas superiores o inferiores a las programadas y resulta poco probable que exposiciones cortas a temperaturas distintas provoque un cambio en el desarrollo de los organismos, principalmente durante la diferenciación sexual.

VIII.I. Efecto de la temperatura durante el periodo de incubación y previo al inicio del experimento

La temperatura es el factor abiótico más dominante sobre los sistemas biológicos, el cual controla entre otros factores, la ingesta de alimento, el crecimiento y las reacciones bioquímicas de los seres vivos, por lo que está íntimamente ligado con el metabolismo de los organismos (Brett 1979).

Muchas especies tienen un patrón de crecimiento que se correlaciona positivamente con la temperatura, hasta alcanzar el máximo, que coincide con la temperatura óptima. Sin embargo, esta tendencia no se mantiene de forma lineal, debido a que un incremento más allá del óptimo, puede tener efectos negativos. La temperatura óptima de crecimiento aumenta a medida que la especie se aclimata a un ambiente de mayor temperatura y viceversa (Calderer, 2001). Es por ello que desde el punto de vista acuícola, resulta importante conocer el efecto de la temperatura sobre la biología de las

especies, para lograr obtener los mejores rendimientos en términos de crecimiento el menor tiempo de cultivo.

En este trabajo, los huevos de lenguado se incubaron a 20°C hasta el momento de la eclosión, una condición de igual forma que lo reportado por Gisbert *et al.* (2002) para esta especie. Posteriormente, durante el periodo comprendido entre el momento de la eclosión y los 12 días DE (inicio del experimento) se mantuvo a 16.3°C, debido a la temperatura del laboratorio y al poco recambio de agua en esta etapa del cultivo. Gadomski y Caddell (1991), encontraron un desarrollo normal en las larvas de *P. californicus* que fueron incubadas en 12, 16 y 20°C. La condición para el desarrollo temprano en nuestro trabajo es inferior al intervalo de 18 a 20°C utilizado para *P. olivaceus* (Dou *et al.* 2004). En contraste, *P. lethostigma* se cultiva en temperaturas de 12 y 18°C, sin un efecto en el crecimiento entre ambas condiciones térmicas (Daniels *et al.* 1996). Incluso se han mantenido hasta a 2°C por dos días antes de morir (Prentice, 1989). Por su parte, Burke *et al.* (1999) incubaron los huevos de *P. dentatus* entre 15 y 16°C por espacio de 4 días y después de la eclosión los organismos se mantuvieron 8 días a 18°C. Durante las etapas tempranas de su vida, el lenguado de California utiliza las zonas protegidas como áreas de crianza y como adulto cambia su habitat migrando primero hacia las bahías y después a aguas mas profundas, por lo que se ha clasificado como una especie costera-estuarina (Allen y Smith, 1998). La distribución de *P. californicus* en las zonas estuarinas de la localidad de Punta Banda en Baja California, México esta asociada con un intervalo de temperatura de 14 a 24°C a lo largo del año (López-Rasgado, 2006). Basado en estas experiencias y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que la temperatura de 16.3°C, en la que se mantuvieron las larvas antes de iniciar los tratamientos no ocasiono ningún problema para el crecimiento de los organismo

A principios de primavera, la temperatura del mar frente a la costa, en la región donde habita el lenguado de California, varía entre los 12 y los 19°C (Kramer, 1990) y es en esta temporada del año cuando se registran los desoves

de esta especie (Lavenberg *et al.* 1986). Los huevos permanecen en la columna de agua y son arrastrados hacia la costa donde eclosionan después de dos días (Gadomski *et al.* 1990). Las larvas que son arrastradas a las bahías donde el agua es más cálida y presentan condiciones ventajosas para la alimentación, supervivencia y crecimiento, con temperaturas entre 17 y 23°C. La temperatura durante el periodo inicial del experimento (16.3°C), se encontró por debajo de este intervalo térmico. Sin embargo, no se pudo determinar si la temperatura inicial provocó un efecto negativo sobre el crecimiento de las larvas.

VIII.II. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

La temperatura de cultivo tuvo un efecto directo sobre el crecimiento de los organismos. Gadomski *et al.* (1990) mencionan que los organismos mantenidos a temperaturas superiores presentan la metamorfosis a una edad más temprana y alcanzaron una mayor talla en menor tiempo. En el medio natural las larvas migran hacia las zonas de crianza con temperaturas superiores, las cuales otorgan mejores condiciones ambientales para un crecimiento mayor. Así, como una estrategia adaptativa al crecer a mayor velocidad tienen menores probabilidades de ser depredados. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las larvas fue evidente desde la primera biometría con tan solo 10 días bajo las condiciones experimentales (23 DDE), los organismos de los tratamientos T24 y T27 tuvieron las tallas mayores.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento en este experimento se debe en gran medida al tiempo de exposición, ya que después de 183 días de exposición bajo distintas condiciones térmicas, se presentó una diferencia máxima en la longitud del 44.2% entre los grupos de organismos más grandes y más pequeños expuestos a las diferentes temperaturas. Dou *et al.* (2003), mencionan que la variación de tallas en los peces planos jóvenes se debe a factores ambientales principalmente la temperatura.

La temperatura de 15°C ocasionó un crecimiento casi nulo hasta el día 63 DE. Esta temperatura fue capaz de retrasar el crecimiento a un punto tal de frenarlo totalmente. Estos organismos se alimentaban muy poco en

comparación con los otros de la misma talla pero cultivados a temperaturas superiores y aunque no se cuantificó su condición, fue evidente que se encontraban en una condición subóptima. La exposición de las larvas y juveniles a bajas temperaturas puede reducir su tasa de ingestión (Malloy y Targett, 1991), no obstante que mantienen un nivel bajo de requerimientos metabólicos y actividad, resultando en un efecto negativo sobre el crecimiento. Además es posible que los organismos del presente estudio se mantuvieran en una condición de estrés crónico, que puede detener el crecimiento (Pankhurst y Van Der Kraak, 1997 y Procarione *et al.* 1999).

Para el día 60 DE, los organismos cultivados T27 crecieron más. Es posible que esta temperatura haya sido la más favorable para organismos de esta edad al maximizar sus funciones fisiológicas. Sin embargo, aproximadamente a los 63 DDE, la tasa de crecimiento comenzó a disminuir y fueron superados por los cultivados en T24. De igual forma ocurrió con estos últimos alrededor de los 158 DDE, cuando fueron alcanzados por los de T21. La ingestión y el crecimiento máximo ocurre en el intervalo de temperaturas óptima y disminuyen cuando la temperatura está por encima del intervalo óptimo (Alamar *et al.* 2001).

A medida que el lenguado de California crece, busca temperaturas más frías. En este sentido, Kramer (1991) determinó que existe una relación directa entre la talla de los lenguados y la profundidad a la que habitan lo que esta relacionado a una preferencia térmica, también se ha encontrado que a mayor profundidad menor temperatura (Yáñez *et al.* 1995). En un estudio realizado en peces planos se observó que dependiendo de la talla de los organismos existe una temperatura óptima para el crecimiento, donde la eficiencia alimentaría es superior y esta disminuye con el incremento de la longitud del organismo (Björnsson y Tryggvadottir, 1996). Los organismos de los distintos tratamientos del presente experimento contaban con una longitud entre los 107 y 127 mm, encontrándose cerca de la longitud a la cual inician la migración en el medio natural a zonas mas frías.

En su ambiente natural, los lenguados pequeños buscan la costa con aguas mas calidas, debido a que allí se encuentran mayores concentraciones de sus presas habituales (Allen, 1990; Innis, 1990 y Madon 2002). Por otro lado, los

juveniles entre los 15 y 20 cm de LT, migran hacia aguas oceánicas más profundas con menores temperaturas (Kucas y Hassler, 1986) y se les considera como estenotérmicos al igual que los adultos, ya que son menos tolerantes a los cambios de temperatura.

De acuerdo a Davis y Parker (1990), las altas temperaturas provocan en los peces un estrés fisiológico que se traduce en una disminución de la presión osmótica y un decremento de electrolitos, lo que ocasiona un gasto energético para tratar de compensar este problema, cuando dicha energía podría ser utilizada para el crecimiento.

Lo que se puede concluir de los resultados de este experimento en los tratamientos T24 y T27, es que tiempos largos de exposición (más de seis meses) a temperaturas elevadas no resultan adecuados, debido a que la velocidad de crecimiento disminuye.

Cuando los organismos alcanzaron alrededor de 90 mm de longitud total, comenzaron a presentar un comportamiento de nervioso con movimientos repentinos y bruscos que en ocasiones concluía en la salida de los peces del estanque, cada vez que alguien se acercaba al área de cultivo para alimentarlos o para efectuar la limpieza diaria. Es posible que esta causa aunada el efecto de los tratamientos por temperatura afectara de forma negativa el crecimiento del lenguado de California. Esto se comenzó a presentar primero en los tratamientos T24 y T27 aproximadamente a los 123 DDE y después en T21 y por último en T18. En los cultivos existen diversas variables que pueden ser estresores para los organismos, tales como: temperatura, el manejo de los organismos, la intensidad de la luz y la densidad (Marcaccio y Specker, 2004).

En algunas especies de peces planos se han registrado TEC entre 2.4 y 3.5% (Malloy y Targett, 1991 y Irwin *et al.* 1999). Conklin *et al.* (2003), reportaron una TEC de 1.16 para el lenguado de California con un peso entre 0.2 y 4.2 g cultivados a 21°C, una TEC superior a la encontrada en el presente experimento a 15°C e inferior a la registrada en todos los demás tratamientos de temperatura. Merino *et al.* (2007), encontraron en organismos de 100 mm de *P.*

californicus TEC entre 1.18 y 0.88% de ganancia de peso/día, cuando fueron cultivados a 22°C, estos resultados son superiores a lo encontrados para T21, T24 Y T27 e inferiores hasta en un 25% a reportado para T18, cuando los organismos presentaron alrededor de 100 mm. Burke *et al.* (1999) mencionan que la tasa de crecimiento y el desarrollo se modifican con la temperatura, a mayores temperaturas sin que se exceda el límite de la especie, las tasas de crecimiento son más elevadas y ocurre un desarrollo más rápido de los organismos. Las tasas de crecimiento individual pueden ser utilizadas para evaluar la calidad del habitat, lo que permite suponer que las bajas tasas de crecimiento reflejan condiciones inadecuadas para los peces. Una de estas pudo ser el color del fondo del tanque (entre rojo y marrón), debido a que los lenguados no se podían mimetizar con su entorno. Turner (2008), observo que en larvas de *P. lethostigma*, el color del fondo de los tanques de cultivo tienen un efecto sobre el crecimiento, colores claros son menos favorables, mientras que el color gris y negro son más indicados. Es posible que al no poder mimetizarse con el medio, temperatura, el manejo de los organismos, la intensidad de la luz y la densidad, esto se convierta en una condición estresante para las larvas.

Después de que ocurrió el asentamiento de la mayoría de los lenguados, se observaron organismos pequeños que no habían completado la metamorfosis, con una coloración más oscura y con las aletas dañadas (con una apariencia deshilachada) y en aquellos tratamientos con mayor temperatura, se mantenían nadando en la columna de agua, incluso después de 45 DDE, que es el tiempo en el que normalmente la metamorfosis ha concluido y se encuentran asentadas en el fondo, estos tanques tenían las mayores densidades, y las altas densidades de cultivo se correlacionan con alteraciones en el proceso de asentamiento (Bolsina *et al.* 2006). La conducta agresiva de los peces de mayor tamaño sugiere que fue la causa del daño a las aletas, por esta razón los organismos pequeños fueron retirados de los tanques de cultivo, de no ser así hubieron sido devorados o asesinados por sus congéneres en un par de días, como estaba ocurriendo.

La conducta agresiva de los organismos de mayor tamaño, se presentó sobre todo durante la alimentación y en los periodos comprendidos entre la última alimentación del día y la primera del siguiente. Este tipo de conducta entraña una jerarquía social basada en la dominancia y la subordinación. La dominancia jerárquica se desarrolla en un cultivo debido a la competencia intraespecífica y provocan una disminución en el crecimiento y un incremento en la variación de las tallas de la población en cultivo (Alanara, 1997 y Schram *et al.* 2006). Los organismos dominantes pueden desarrollar una mayor capacidad para alimentarse y por lo tanto crecerán más, mientras que en los organismos subordinados aumenta el estrés, el daño en las aletas, se altera la tasa metabólica e incluso se incrementa la mortalidad. Existen distintos factores que originan esto, los principales son: la temperatura del agua, la ración alimenticia y la densidad de cultivo (Dou *et al.* 2003).

Dou *et al.* (2004) mencionan que no existen jerarquías cuando los organismos del lenguado Japonés son pequeños, pero se incrementan en relación con la talla y están determinadas por el tamaño de un pez respecto a sus congéneres. Además, el efecto de la talla sobre la dominancia jerárquica podría variar con la etapa de vida de los peces, así como por las condiciones ambientales. En los peces pequeños de 0.37 a 1.07 g se pueden registrar hasta un 37% de mortalidad en presencia de organismos grandes (Dou *et al.* 2004). En los tratamientos donde el crecimiento fue mayor (T21, T24 y T27) se observó una población con dominancia jerárquica, lo que ocasionó una disminución en la cantidad de organismos, debido a que su comportamiento no solo fue dominante, evitando que los peces pequeños comieran, sino que también se observó que los peces grandes practicaron el canibalismo constantemente.

En la población de los organismos cultivados a 15°C no se registró la dominancia jerárquica, además cabe señalar que estos peces prácticamente no presentaban movimiento incluso cuando se alimentaban, indicando que esta temperatura es desfavorable para el crecimiento en esta etapa del lenguado de California. Lasswell *et al.* (1977), no observaron canibalismo entre las larvas postmetamórficas de *P. lethostigma* a una densidad de 7/l y 18°C.

VIII.III. Sobrevivencia

Las larvas de lenguado pasan por etapas críticas durante su desarrollo: la primera es la eclosión y absorción del saco vitelino, después, la primera alimentación. En los peces planos otra etapa crítica es la metamorfosis.

En este experimento no se pudo determinar con certeza la mortalidad durante cada etapa crítica, debido a que las larvas son muy pequeñas y frágiles. Sin embargo, fue evidente que durante la absorción del saco vitelino y la primera alimentación murieron gran cantidad de larvas. Smigielski (1975), reporta altas mortalidades (90-95%) en *P. dentatus* al momento de la primera alimentación, pero no determinó la causa. De acuerdo a Tagawa *et al.* (2004) la primera gran mortalidad ocurre después de la absorción del saco vitelino y el inicio de la primera alimentación, solo el 50% de las larvas sobrevive después de 12 días. Esta etapa se considera una de las más críticas en el cultivo de peces marinos y una posible explicación es la baja calidad de los huevos desovados, lo que conlleva una deficiencia de nutrientes en las larvas y recién eclosionadas causando altas mortalidades (Burke *et al.* 1999). También, es probable que el primer alimento (i.e., rotíferos) proporcionado a las larvas sea nutricionalmente inadecuado, ya que los rotíferos son naturalmente deficientes en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) con respecto a los requerimientos de las larvas. Así mismo, las larvas quizá no los puedan consumir adecuadamente, debido a un mayor tamaño y velocidad de la presa o por falta de visibilidad de las larvas. Por su parte, Gisbert *et al.* (2003), determinaron el punto de no retorno en el lenguado de California entre los 6 y 8 DDE a 18°C. Es probable que todos estos factores se agruparan para ocasionar la primera mortalidad importante en la población en cultivo del lenguado de California.

La siguiente etapa crítica de la mortalidad en el desarrollo se dio durante la metamorfosis, que involucra la transformación de las larvas pelágicas en peces bentónicos asentados en el fondo con poco movimiento. Este proceso tuvo desfase en los distintos tratamientos, por el efecto de la temperatura de cultivo, iniciando alrededor de los 20, 22, 33 y 67 DDE para las larvas cultivadas en T24 y T27, T21, T18 y T15, respectivamente. Bolosina *et al.* (2006), reportan altas mortalidades en *P. olivaceus* cultivados en 18°C después de 30 DDE.

Durante este periodo, también se observa un incremento en la mortalidad, producto del comportamiento de canibalismo durante el periodo de asentamiento (Burke *et al.* 1999 y Fairchild y Howell, 2001).

En el cultivo de larvas de peces marinos, otra de las etapas críticas ocurre durante el destete, cuando se cambia el alimento vivo (nauplios de *Artemia*) por una microdieta formulada, la cual resulta menos atractiva para los peces, provocando que no se alimenten y que mueran por inanición.

Al momento del destete, en los tratamientos T18, T21, T24 y T27, los organismos contaban con una talla mayor a 9 mm, por lo cual fue más sencillo contabilizar la mortalidad, ya que los organismos muertos eran visibles fácilmente y fueron retirados de forma manual de los tanques de cultivo. Al igual que ocurrió durante la metamorfosis, la mortalidad durante el destete se desfasó con respecto a la temperatura, inicialmente fue evidente en los organismos que se cultivaron en T27. Los peces que no aceptaron la dieta formulada murieron por inanición después de unos días y otros más fueron presas de sus congéneres de mayor talla, que si aceptaron la dieta formulada. Los resultados finales de mortalidad de este experimento se encontraron entre 99.2 y 92.7%. Estas mortalidades son comparables a las reportadas por Smigielski (1975), para *P. dentatus*, ya que alcanzan mortalidades entre 90-95%.

Después de estas etapas críticas del desarrollo, no se encontraron organismos muertos, por lo que la mortalidad disminuyó a medida que la talla de los lenguados se incrementó. Sin embargo, a los 111 DDE se registraron lesiones provocadas por un protozoario presuntamente (*Uronema marinum*). Además, los organismos se debilitaron con el paso de los días y aparentemente fueron infectados por bacterias (no identificadas), esto ocurrió en los tratamientos T21, T24 y T27 donde se tenía un mayor número de juveniles. Bolosina *et al.* (2006), reportan un crecimiento pobre en organismos de 46 DDE y un incremento en la incidencia de enfermedades en cultivos densidades de 9100 organismos/m². Martínez-Tapia y Fernández-Pato (1991), reportaron problemas de enfermedades en *Scophthalmus maximus* provocados por *Aeromonas* spp y *Pseudomonas* spp que provocaron altas mortalidades en sus cultivos. Los problemas patológicos encontrados en los organismos durante el

presente bioensayo resaltan la necesidad de estudiar aspectos de sanidad y patología en esta especie, debido a que las soluciones empleadas para tratar de erradicar las enfermedades no dieron buenos resultados. No obstante algunos presentaron mejorías, sin embargo a menudo se registraron nuevos brotes de la enfermedad en la población en cultivo.

VIII.IV. Efecto de la temperatura en el desarrollo ontogénico

Analizando el desarrollo ontogenético de los organismos cultivados bajo las distintas condiciones térmicas, se observó que fue similar al inicio del experimento en todas las larvas, y se caracterizó por la aparición de los melanóforos a lo largo del notocordio. Se han encontrado melanóforos a partir del día 6 DE y estos se incrementan en número en todas las regiones del cuerpo con el paso de los días (Gisbert *et al.* 2002). Burke *et al.* (1999), reportan hipomelanosis en cerca del 10% de los juveniles de *P. dentatus* y observaron una relación inversa con respecto a la temperatura. En el presente estudio, no se cuantificó el porcentaje de organismos no pigmentados, no obstante, fue evidente que una fracción de los organismos cultivados en las diferentes condiciones térmicas tuvo alguna anomalía pigmentaria. Sin embargo, con el paso de los días los peces con hipomelanosis comenzaron a desarrollar pigmento en las áreas del cuerpo que en un principio no lo tenían, al grado de quedar completamente pigmentados, aunque con un tono más oscuro que el de la población normal.

El desarrollo de las larvas del lenguado de California varió con respecto a la temperatura, siendo más lento en T15. Burke *et al.* (1999), encontraron que existió una correlación positiva entre la metamorfosis de las larvas y la temperatura de cultivo, la cual se presentó el día 20, 25 y 30 DE para 22, 20 y 18°C, respectivamente. La influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento continúa más allá del proceso de la metamorfosis hasta el final de la vida (Cushing, 1990).

Los juveniles del lenguado de California se asientan cuando tienen una longitud entre 7 y 12 mm de longitud estandar (Allen *et al.* 1988; Moser, 1996;

Burke *et al.* 1999). De acuerdo a Gisbert *et al.* (2002), los organismos bien alimentados y con un rápido crecimiento completan la metamorfosis después de 42 DDE cuando se cultivan a 18°C. Por otro lado, Daniels *et al.* (1996) encontraron que la metamorfosis se lleva a cabo entre en la mayoría de los organismos cuando tienen una longitud total entre 10 y 16 mm, no obstante, aquellos de menor longitud, que no completan la metamorfosis a esa talla, lo hacen después de 90 DDE, pero con tan solo 8 mm de LT. En el ambiente natural las larvas inician el proceso de metamorfosis entre los 7 y 10 mm y posteriormente se asientan en los estuarios o zonas costeras (Allen, 1988).

En este estudio, el desarrollo de los organismos fue afectado por la temperatura de cultivo, ya que aquellos que se cultivaron en T24 y T27 lograron la metamorfosis a los 28 DDE, los de T21 a los 33 DDE, los de T18 a los 44 DDE y por último los de T15 completaron la metamorfosis a los 99 DDE. La longitud de los organismos durante esta etapa coincidió con lo reportado por otros autores. Sin embargo, existieron pequeñas diferencias, ya que mientras en los organismos de T21, T24 y T27 la metamorfosis ocurrió cuando tenían una longitud entre los 9.3 y 10.2 mm, los de T18 tenían 11.13 mm y por último los de T15 tenían 15.45 mm, una longitud 39.8% mas grande que la registrada en las temperaturas más elevadas. La cadena de eventos en el desarrollo morfológico de las larvas del lenguado de California fue similar a la descrita por Gisbert *et al.* (2002) a 18°C.

En resumen, la temperatura de cultivo puede reducir el tiempo y la longitud en la cual los organismos completan la metamorfosis, lo cual se puede utilizar como una herramienta para mejorar el cultivo de la especie, debido a que se puede extender o acortar la etapa larval, logrando un abastecimiento de crías por mucho más tiempo e incluso, se podrían tener organismos listos para sembrarse en condiciones de engorda en los meses donde ya no se pueden obtener huevos y/o larvas. De esta forma se tendría un abastecimiento constante de larvas durante todo el año.

Otra ventaja de reducir la duración de cultivo larval es el costo de producción de cada larva, ya que al reducir el tiempo estimado para el destete, se requerirá por menos tiempo de rotíferos y artemía, lo que conlleva a

la reducción en los costos. Pero se debe tomar en cuenta el tiempo de exposición de los organismos a altas y bajas temperaturas, ya que fue evidente que tiempos prolongados tienen un efecto negativo sobre el crecimiento y la sobrevivencia.

Para reducir el tiempo de cultivo, se propone mantener a los organismos en 27°C durante aproximadamente 50 DDE, calculando la ración alimenticia adecuada. Después, reducir la temperatura gradualmente (tres días) hasta 24°C por espacio de 30 días, al término de este tiempo los organismos se deben mantener en su temperatura preferida, alrededor de 18°C, porque es donde realizan con mayor eficiencia los procesos metabólicos de obtención, conservación y utilización de la energía para el mantenimiento y crecimiento corporal (Esquer, 2006).

Si lo que se busca es extender la etapa larvaria, logrando un abastecimiento de crías por mucho más tiempo e incluso, tener organismos listos para sembrarse en condiciones de engorda en los meses donde ya no se pueden obtener huevos y/o larvas, lo cual resulta conveniente ya que se pueden mantener gran número de organismo en poco espacio. Para ello se sugiere lo siguiente: reducir la temperatura a 15°C hasta por 80 días, durante este tiempo la mayoría de los organismos aun no habrán terminado con la metamorfosis. Después será recomendable elevar gradualmente (20 días) la temperatura a 27°C y repetir la secuencia utilizada para reducir el tiempo de cultivo.

En una prueba realizada en forma paralela a este experimento, a una muestra de organismos que se cultivaron a 15°C por 85 días, se les elevó la temperatura del agua a 18 y 21°C, entonces se registró un incremento en la tasa de crecimiento, superior a la registrada en 15°C. Esto sugiere que esta especie evidenció el fenómeno conocido como crecimiento compensatorio. Este proceso se lleva al cabo cuando se presenta una fase acelerada de crecimiento después de un periodo de condiciones desfavorables y se reestablecen las condiciones favorables para su desarrollo (Ali *et al.* 2003). A la luz de esta información, se necesitan realizar estudios complementarios para

establecer los tiempos en los cuales es posible estimular el crecimiento compensatorio en organismos cultivados a bajas temperaturas.

Los organismos que se mantienen a bajas temperaturas por un periodo mayor que 90 días, llegan al punto de no retorno, después del cual aunque las condiciones para su crecimiento sean las óptimas, ya no tienen la capacidad para adaptarse a las nuevas condiciones y su crecimiento es pobre e incluso mueren, dado que el cambio a un ambiente térmico superior les demanda una mayor cantidad energía que no tienen disponible.

Es importante recordar que la exposición a las temperaturas experimentales ocurrió a partir del día 14 DDE. Es posible que iniciando antes de este tiempo se puedan acortar o alargar aun más los tiempos de cultivo.

Esquer (2006) menciona que *P. californicus* evita temperaturas superiores a 26.2°C. No obstante, es necesario explorar el crecimiento del lenguado de California en temperaturas superiores a los 27°C para reducir los tiempos de cultivo.

VIII.V. Efecto de la temperatura en la diferenciación sexual

Los resultados obtenidos en este experimento con respecto a la proporción sexual fueron de 100% machos en las cinco condiciones térmicas. Con estos resultados no fue posible determinar el efecto de las distintas temperaturas sobre la diferenciación sexual. Por su parte, Kitano *et al.* (1999), observaron en una población de hembras ginogenéticas de *P. olivaceus*, que cuando se expuso a altas temperaturas, se desarrollaron machos funcionales. Yamamoto (1999), evaluó el efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual, empleando progenies de hembras ginogenéticas y poblaciones normales (1H:1M) de *P. olivaceus*. Reportó que la proporción de hembras que se obtuvieron al exponer a los organismos a temperaturas de 15, 17.5, 20, 22.5, 25 y 27.5°C, sigue una tendencia parabólica, en cuyos extremos es baja, 70 y 0% en la población ginogenética y 20 y 0% en la población normal. Sólo en las temperaturas medias se desarrolla un mayor porcentaje de hembras. Por su parte Luckenbach *et al.* (2003), observaron en juveniles de *P. lethostigma* una

proporción sexual de 1:1 (hembras y machos) cuando los organismos fueron cultivados a 23°C, mientras los porcentajes de hembras para 18 y 28°C fueron de 22 y 4%, respectivamente. En el presente trabajo, es probable que la temperatura inicial de 16.3°C a la cual fueron expuestos los organismos por espacio de 12 días, antes de iniciar el experimento haya tenido influencia sobre la diferenciación sexual. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el intervalo donde se desarrollaron los alevines en ese periodo esta muy cercano a las temperaturas presentes en su habitat y las proporciones sexuales en las poblaciones silvestres son aproximadamente 1:1 (H:M). Por su parte, Tabata y Gorie (1987), reportaron en *P. olivaceus*, que sus organismos diploides mostraron una proporción de 100% machos. Es posible que en el lapso entre la eclosión y los 12 DDE en que los organismos estuvieron expuestos a 16.3°C, se pudo inducir la masculinización, de manera similar a lo que ocurre con el lenguado japonés, ya que cuando se cultiva a 15°C 80% de la progenie es de machos (Yamamoto, 1999).

Yamamoto (1995), por otro lado encontró que las larvas y las larvas post metamórficas estaban sexualmente indiferenciadas y sólo cuando tenían una longitud entre 27 y 37 mm, fue posible discernir entre el tejido ovárico y el testicular. En este estudio, las larvas de lenguado contaban sólo con un tercio de esa longitud hasta el momento en que se realizaron los ajustes de la temperatura, por lo que estuvieron expuestos a 16.3°C durante ese periodo, sin embargo, no se pudo determinar el momento de la diferenciación sexual. Además, este valor térmico se presenta en el medio natural en las áreas de desove y las proporciones sexuales (hembra:macho) en el lenguado de California oscilan entre 1:0.68 a 1:4 (Haaker, 1975; Plumier *et al.* 1983; Navarro-Mendoza, 1985 y Ramírez-González, 1990).

Luckenbach *et al.* (2003), reportan para *P. lethostigma* un porcentaje aproximado del 45% de hembras cuando se cultivan a 23°C por 243 días. Por su parte, Yamamoto (1999), registró para *P. olivaceus* porcentajes entre 45 y 20% de hembras en 25°C. Ambos resultados son superiores a lo encontrado en este experimento con temperaturas similares.

Bull (1980), menciona que temperaturas intermedias para las especie con determinación sexual ambiental, producen machos en algunas de ellas, mientras que las temperaturas extremas frías o calientes inducen el desarrollo de hembras. Baras *et al.* (2001) y Fujioka (2002), propusieron un modelo lineal de masculinización para *Oreochromis niloticus* y *Carassius carassius grandoculis*, en el cual las temperaturas altas producen un mayor porcentaje de machos. En algunos peces de la familia Cichlidae, en condiciones normales, se pueden producir progenies con porcentajes que van desde 0% hasta cerca del 100% machos (Contreras-Sánchez, 2001; Phelps y Lee, 2001); no obstante, al considerar un gran número de eventos reproductivos (varios desoves), el balance final da como resultado una proporción 1:1 entre hembras y machos (Carvalho *et al.* 1998).

En *P. olivaceus*, el periodo crítico de la diferenciación sexual ocurre cuando tienen longitudes menores a 40 mm y es en esta etapa del desarrollo cuando los tratamientos con esteroides o la temperatura del agua inciden sobre el desarrollo de la gónada (Yamamoto, 1995). Yamamoto (1999), menciona que el periodo susceptible para la reversión sexual de hembras genéticas a machos fisiológicos ocurre entre los 20 y 32 mm de LT, no obstante temperaturas intermedias inducen el menor porcentaje de machos, cerca del 50%. En el lenguado Japonés, se ha observado que la diferenciación sexual de hembras genéticas (XX) es inestable y que de forma espontánea se puede producir una reversión sexual a machos fisiológicos, esto puede ser causado por factores exógenos, especialmente altas y bajas temperatura. *P. olivaceus* es una especie con una diferenciación inestable influenciada por factores ambientales. Sin embargo, machos genéticos nunca han sido revertidos a hembras fisiológicas mediante el uso de temperatura y ninguno de los regímenes de temperatura de agua durante el desarrollo larval ha producido altas proporciones de hembras.

Los resultados obtenidos en *P. olivaceus* demostraron que ninguna de las temperaturas fue capaz de inducir un porcentaje mayor al 50% de machos en poblaciones normales. Esto concuerda con lo encontrado en este experimento,

donde las larvas de *P. californicus* estuvieron expuestas a diversas temperaturas durante el periodo crítico de diferenciación.

En las distintas especies de lenguado, los ovarios se desarrollan antes que los testículos, cuando los organismos tienen una longitud entre 60 y 100 mm (Yamamoto, 1999; King *et al.* 2001 y Luckenbach *et al.* 2003). En este trabajo todos los juveniles sacrificados tenían longitudes superiores. Es por ello, que resulta difícil pensar que en la revisión del sexo mediante la técnica de congelación existiera algún error, debido a que se revisaron más de 200 organismos previos a obtener el resultado. Esto se comprobó al emplear la técnica de inclusión en parafina, donde no se observó ninguna hembra y si machos con desarrollo temprano. Además, se revisaron empleando la técnica de congelación 60 juveniles de mas de 200 mm cultivados el año anterior a 18°C en el Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura y solo se encontró una hembra.

Una posible explicación a los resultados de la proporción sexual obtenidos en este experimento se encuentra en el gen CYP19 (D´Cotta *et al.* 2001a) que se encarga de codificar la proteína clave para la diferenciación sexual, la citocromo P450 aromatasa (González, 2003), la enzima que convierte a la testosterona en estradiol, induciendo el desarrollo de un ovario (Baroiller y D´Cotta, 2001). Se ha generalizado que la expresión de la aromatasa se reduce con el incremento de la temperatura, resultando en hembras (XX) revertidas a machos (Baroiller y D`Cotta, 2001). Quizá, debido a que la temperatura del habitat del lenguado de California esta cercana a los 20°C, es posible que en los tratamientos T24 y T27 la expresión del gen se interrumpiera o la enzima se haya desnaturalizado.

Otra explicación posible del sesgo en la proporción sexual es el estrés. Ya que una condición estresante puede ser provocada por la temperatura, la intensidad de luz, el manejo, las relaciones intraespecíficas e incluso el color del fondo del tanque de cultivo. Turner (2008), reporta que en los juveniles de *P. lethostigma* de 94 DDE, cultivados en condiciones de intensidad luminosa alta y fondos claros en los tanques de cultivo, causan mayor estrés en los organismos y esto afectó los niveles de cortisol. El cortisol es el principal glucocorticosteroide

en los peces y afecta la biosíntesis de esteroides incluyendo la conversión de testosterona a estradiol (Perry y Grober, 2003). Turner (2008), propone que cuando los niveles de cortisol son elevados, la biosíntesis de estradiol es bloqueada por la supresión de la P450 aromatasa, resultando en la diferenciación sexual de un macho. El estrés provocado por las temperaturas altas y bajas puede explicar los resultados encontrados en los organismos cultivados en T15, T24 y T27. Sin embargo, no explica lo ocurrido en las demás temperaturas. También, fue posible que el estrés en los organismos cultivados en T18 y T21 bloqueara la biosíntesis de estradiol.

Lo que es un hecho es que una baja actividad de la expresión de la aromatasa durante el periodo crucial de diferenciación siempre resulta en masculinización independientemente del genotipo y la temperatura (Kwon *et al.*, 2002). Con el empleo de inhibidores químicos de la actividad de la aromatasa, mezclados en el alimento, se puede lograr un alto porcentaje de masculinización en crías de tilapia (Bertolla *et al.* 2001).

Al respecto de las proporciones sexuales, no se puede descartar la posibilidad de que en el sistema cerrado del Departamento de Acuicultura, al cual estuvieron conectados los tanques de cultivo, se encontraran disueltas en el agua, moléculas estables difíciles de degradar por el biofiltro con alguna capacidad andrógénica, que haya dado como resultado 100% machos en todos los tratamientos. O es posible que su capacidad sea supresora de alguna molécula encargada de producir estrógenos e incluso algún supresor de genes. Existen contaminantes ambientales que interfieren con el sistema endocrino, conocidas como sustancias endocrinas interruptoras, EDS Endocrine disrupting substances por sus siglas en inglés (Olsson *et al.* 1998).

La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América define los EDS como "sustancias exógenas que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento" (EPA, 1998).

Existen cuatro mecanismos por los cuales actúan los EDS: a) por imitación de las hormonas endógenas y causando la activación de rutas de segundo orden; b) por antagonismo de las hormonas endógenas y bloqueando las rutas establecidas; c) por interferencia en la síntesis y metabolitos de hormonas endógenas y sus metabolitos y d) por interferencia con la regulación de los niveles del receptor (Olsson *et al.* 2008). Las hormonas esteroides y las sexuales en particular son muy sensibles y fácilmente modificadas por los EDS (Holmes *et al.* 1998).

También es posible que se tenga una elevada acumulación de andrógenos en el agua del sistema, producto de la excreción de otros organismos como: lenguados, abulones, tiburones, langostas, camarones y algunos otros invertebrados que se han mantenido en el laboratorio a través de los años. O incluso por alguna sustancia producto del metabolismo de las microalgas.

Al no tener un análisis completo de las sustancias que circulan en el sistema cerrado de agua de mar del Departamento, es difícil conjeturar sobre el agente causante de la masculinización total de los lenguados.

La información publicada acerca de la proporción sexual de los peces planos y su relación con la exposición a diferentes temperaturas, hizo pensar que *P. californicus* tendría una distribución en forma de parábola respecto al porcentaje de hembras, sin embargo esto no ocurrió así.

Es necesario realizar experimentos para aclarar si la temperatura tiene un efecto sobre la diferenciación sexual del lenguado de California. Para ello se sugiere emplear un sistema cerrado con agua oceánica nueva o un sistema con agua oceánica sintética para evitar la intromisión de alguna sustancia extraña. Por otro lado, se sugiere medir la actividad de la P450 aromatasa para intentar elucidar el mecanismo de acción por el cual se está presentando la masculinización de toda la población.

IX. CONCLUSIONES

- Las temperaturas de cultivo para el crecimiento del lenguado de California a 21 y 24°C fueron superiores después 183 días, con respecto a lo encontrado en los organismos cultivados en 18°C en 18 y 10%, respectivamente. Mientras que para 15 y 27°C el crecimiento fue inferior en 43 y 6%, respectivamente.
- Tiempos largos de exposición (mas de 140 días) a temperaturas superiores a 24°C no resultan adecuados para el lenguado de California cuando se alcanzan mas 95 mm de longitud total, debido a que la velocidad de crecimiento disminuye.
- El desarrollo morfológico se vio acelerado por efecto de las temperaturas superiores (21, 24 y 27°C), mientras que 15°C retraso el desarrollo hasta en 80 días, respecto a 18°C.
- La Tasa Especifica de Crecimiento (TEC) fue superior al inicio del experimento excepto para 15°C que se mantuvo con pocos cambios y al final del experimento las tasas fueron parecidas en todas las condiciones térmicas.
- El desarrollo morfológico de las gónadas se correlacionó directamente con la talla de los organismos.
- En organismos cultivados en 18°C después de 46 DDE se observa la gónada indiferenciada.
- En organismos superiores a 100 mm fueron evidentes las estructuras características de una gónada masculina.

- Las diferentes condiciones térmicas de cultivo provocaron un distinto grado de desarrollo en las gónadas de los organismos analizados, siendo 24°C donde se encontró en mayor desarrollo.
- En las condiciones de cultivo utilizadas en el presente trabajo, la temperatura no tuvo un efecto sobre la proporción sexual del lenguado de California.

X. LITERATURA CITADA

Abuhteba, R. M., J. M. Walker y J. E. Cordes. 2000. Genetic homogeneity based on skin histocompatibility and the evolution and systematics of parthenogenetic *Cnemidophorus laredoensis* (Sauria: Teiidae). *Canadian Journal of Zoology*. 78:895-904.

Ahlstrom, E. H. y H. G. Moser. 1975. Distributional atlas of fish larvae en the California current region: flatfishes, 1955-1960. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invert. Atlas 23.

Airchialndd E. F. y Huniitinhgo W. W. 2001. Optimal Stocking Density for Juvenile Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal Of The World Aquaculture Society*. 32(3):300-308

Alamar, M., Estruch, V., Pastor, J. y Vidal, A. Modelo aleatorio de crecimiento CCT biparamétrico. *Revista AquaTIC*, nº 13, Mayo 2001. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=118>

Alanara, A. 1997. Feeding behavior and growth performance of fish within a dominance hierarchy. Page 10. En D. Houlihan, A. Kiessling, and T. Boujard, editors. Voluntary food intake in fish. COST 827 Workshop, Aberdeen, UK.

Ali, M., Nicieza, A. y Wootton, R. J. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth Depression. *Fish and Fisheries*. 4:147-190.

Allen, L. G. 1988. Recruitment, distribution and feeding habits of young-of-the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay-Long Beach Harbor, California, 1983-1985. *Bulletin South California Academic Science*. 87:19-30.

Allen, L. G., Jensen, R. E. y J. R. Sears. 1990. Open coast settlement and distribution of young-of-the-year California halibut (*Paralichthys californicus*) along the southern California coast between Point Conception and San Mateo Point, June-October, 1988. *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries*, C. W. Haugen, ed. Calif. Dep. Fish Game, Fish Bull. 174.

Allen, M. J. y G. B. Smith. 1998 Atlas and zoogeography of common fishes in the Bering sea and northeastern Pacif. U. S. Dept. commerce, NOAA Tech. Rep., NMFS-66. 151 pp.

Angeles, B. y Mendo, J. 2005. Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner) de la costa central del Perú. *Ecología Aplicada*. 4(1,2):105-112.

Balinsky, B. I. 1978. Introducción a la embriología. Barcelona, España. Omega S. A. (Ed.). 644 p.

Baras, E., Jacobs, B. y Melard, C. 2001. Effect of water on survival, growth and phenotypic sex mixed (XX-XY) progenies of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 192:187-199.

Barnhart, P. S. 1936. Marine Fishes of Southern California. University of California Press. Berkeley Ca. U.S.A.. 209 p.

Baroiller, J. F., Chourrout, D y Jalabert, B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*. 272:213-223.

Baroiller J.F. y D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 130:399-409.

Beardmore, J. A., Mair, G.C. y Lewis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*. 197:283-301.

Björnsson, B. 1995. The growth pattern and sexual maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large tank for 3 years. *Aquaculture*. 138:281-290.

Björnsson, B. y Tryggvadottir, S. V. 1996. Effects of size on optimal temperature for growth and growth efficiency of immature Atlantichalibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *Aquaculture*. 142:33-42.

Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y. y Tanaka, M. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 259:432-443

Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y. y Tanaka, M. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 259:432-443

Brett, J. R. (1979). Environmental factors and growth. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Brett, J. R. (eds.) *Fish Physiology*, Vol. 8, Bioenergetics and growth. Academic Press, New York, p. 599-667

Brett, J. R. 1979. Environmental factors and growth. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds). *Fish Physiology*. Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 599-675.

Brown, R. E. 1985. Hormones and Paternal Behavior in Vertebrates. *American Zoologist*. 25(3):895-910.

Bruslé, Sicard, S., Fourcault, B., 1997. Recognition of sex-inverting protandric *Sparus aurata*: ultrastructural aspects. *J. Fish Biol.* 50, 1094-1103.

Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. 55:3-21.

Burke, J. S., Seikai, T., Tanaka, Y. y Tanaka, M. 1999. Experimental intensive culture of summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*. 176:135-144.

Calderer, R. A. 2001. Influencia de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada (*Sparus aurata* L.) Universidad de Barcelona. España. Tesis de doctorado. Pág. 195.

Calhoun, W. E. y Shelton, W. L., 1983. Sex ratios of progeny from mass spawnings of sex-reversed broodstock of *Tilapia nilotica*. *Aquaculture*. 33:365-371.

Carvalho, E. D. y Foresti, F. 1996. Sex reversal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Trewavas, 1983, induced by 17-alpha-methyltestosterone: Sex ratio and histological studies on the gonads. *Revista Brasileira de Biología*. 56(2): 249-262.

Castillo-Sánchez, E., Rosales-Caisán, J. A. y Pérez-Ponce, L. G. 1998. Helminths parasites of *Paralichthys californicus* (osteichthyes: paralichthyidae) en el estero de punta banda, Bahía de Todos Santos y Bahía de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 24(4):443-462.

Chen, S., Hong, Y. y Scharl, M. 2002. Development of a positive-negative selection procedure for gene targeting in fish cell. *Aquaculture*. 214:67-79.

Conklin, D. E., Piedrahita, R. H., Merino, G. E., Muguet, J., Bush, D. E., Gisbert, E., Rounds, J. y Cervantes-Trujano, M. 2003. Development of California Halibut, *Paralichthys californicus*, Cultura. *Journal of Applied Aquaculture*. 14(3/4):143-154.

Conover, D. O. y Heins, S. W. 1987. The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae). *Copeia*. 732-743.

Conover, D. O. y Kynard, B. E. 1981. Environmental sex Determination: Interaction of temperatura and genotype in a fish. *Science*. 213:577-579.

Contreras-Sánchez, W. M. 2001. Sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Gene expression masculinization methods, and environmental effects. Thesis for the degree of doctor. Oregon State University, E. U. 193 p.

Contreras-Sánchez, W. M., Fitzpatrick, M. S. y Schreck, C. B. 2001. Masculinization of tilapia by immersion in trenbolone acetate: growth performance of trenbolone acetate-immersed tilapia. 43-46. *In*: K. McElwee, D. Burke, M. Niles, y H. Egna. (Eds). Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon. 123 p.

Cushing, D. H. 1990. Plankton production and year class strength in fish populations and update of the match/mismatch hypothesis. *A. Mar. Biology*. 26:250-293.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M. y Baroiller, J-F. 2001a. Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*. 290:574-585.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M. y Baroiller, J. F. 2001b. Aromatase Plays a Key Role During Normal and Temperature-Induced Sex Differentiation of Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction And Development*: 59:265-276

Daniels, H. V., Berlins, D. L., Hodson, R. G. y Sullivan, C. V. 1996. Effects of Stocking Density, Salinity, and Light Intensity on Growth and Survival of Southern Flounder *Paralichthys lethostigma* Larvae. *Journal Of The World Aquaculture Society*. 27(2):153-159.

Daniels, H. V., Boyd, C. E. y Minton, R. V. 1987. Acute toxicity of ammonia and nitrite to spotted seatrout. *The Progressive Fish-Culturist*. 49:260-263.

Davis, K.B. y Parker, N.C., 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*. 91:349-358.

Desprez, D. y Melard, C. 1998. Effect of ambient water temperature on sex determination in the blue Tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 162:79-84.

Devlin, R. H. y Nagahama Y. 2002. Sex determination and differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.

Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M. y Tsukamoto, K. 2004. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 233:237-249.

Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M., Tsukamoto, K., 2003. Identification of factors affecting the growth and survival of the settling Japanese flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 218, 309–327.

Dou, S., Seikai, T. y Tsukamoto, K., 2000. Cannibalism in Japanese flounder juveniles, *Paralichthys olivaceus*, reared under controlled conditions. *Aquaculture*. 182:149–159

EPA. United States Environmental Protection Agency. 1998. ORD. Research plan for endocrine disruptors. EPA/600/R-98/087

Escobar-Fernández, R. 1989. Tiburones y peces de escama. La pesca en Baja California. Mario Siri Chiesa/Patricia Moctezuma (Eds). U. A. B. C. 211 p.

Esquer-Méndez, J. L. 2006. Comportamiento termoregulador del Lenguado de California *Paralichthys californicus* (Ayres, 1859). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Ecuación Superior de Ensenada (CICESE). 71 p.

Fairchild, E. A. y Howell, W.H., 2001. Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *J. World Aquac. Soc.* 32(3):300-308.

Fujioka, Y. 2002. Effects of hormone treatments and temperature on sex-reversal of Nigorobuna *Carassius carassius grandoculis*. *Fisheries Science*. 68: 889–893

Gadomski, D. M. y Caddell, S. M. 1991. Effects of temperature on early-life-history stages of California halibut *Paralichthys californicus*. *Fishery Bulletin*. 89(4):567-576.

Gadomski, D. M., Caddell, S. M., Abbott, L. R. y Caro, T. C. 1990. Growth and development of larval and juvenile California Halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. *Fishery Bulletin*. 174:85-98.

Gadomski, D. M., Caddell, S. M. Abbott, L. R. y Caro, T. C. 1990. Growth and development of larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. En: Haugen, C. W. (Ed). *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries*. *Fish. Bull. Cal. Fish Game*. 174:85-98

Gisbert, E., D.E. Conklin, y R.H. Piedrahita. 2003. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut (*Paralichthyes californicus*) larvae. *Journal of Fish Biology*. 64(1):116-132.

Gisbert, E., Merino, G., Muguet, J. B., Bush, D., Piedrahita, R. H. y Conklin, D. E. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *Journal of Fish Biology*. 61:1217-1229.

Gisbert, E., Piedrahita, R. H. y Conklin, D. E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232(1-4):455-470.

Godwin, J., Crews, D., Warner, R.R., 1996. Behavioural sex change in the absence of gonads in a coral reef fish. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 263, 1683-1688.

González, C. A. 2003. Actividad citocromo P450 aromatasa en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España. 226 p.

Harvey, S. C., Kwon, J. Y. y Penman, D. J. 2003. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by fluorescence in situ hybridization. *Animal Genetics*. 34:62-64.

Hoar, W. S. 1969. Reproduction. In: *Fish physiology*, Vol. III- W. S. Hoar y D. J. Randall, eds. Academic Press, New York. Pp. 1-72.

Holden, M.J y Raitt, D. F. S. 1975. Manual de ciencia pesquera parte 2- Métodos para la investigar los recursos y su aplicación. FAO. <http://www.fao.org/docrep/003/F0752S/F0752S00.htm#toc>

Holmes, P., Humfrey, C., Scullion, M. y Taylor, M. 1998. Appraisal Of Test Methods For Sex-Hormone Disrupting Chemicals Capable Of Affecting The Reproductive Process. Institute for Environment and Health for the UK Department of Environment, Transport and the Regions. www.oecd.org/dataoecd/58/27/1898464.pdf

Innis, D. B. 1990. Juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, growth in relation to thermal effluent. 153-165. *En: Haugen, C. W. 1990. The California halibut *Paralichthys californicus*, Resource and Fisheries. Fish Bulletin 174. 475 Pág.*

Irwin, S., O'Halloran, J. y FitzGerald, R.D. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178:77-88

Irwin, S., O'Halloran, J. y FitzGerald, R.D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*. 178:77-88.

Ish, T. y Stroman, F. 2006. California Halibut *Paralichthys californicus*. Sustainable Fishery Advocates. Seafood Report. Final Report. Pag. 28.

Jeyasuria, P. y Place, A. R. 1998. Embryonic brain-gonadal axis temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *Journal of Experimental Zoology*. 281:428-449.

Kamosawa, M. y Ota, H. 1996. Reproductive biology of the brahminy blind snake (*Ramphotyphlops braminus*) from the Ryukyu Archipelago, Japan. *Journal of Herpetology*. 30(1):9-14.

Kanaiwa, M. y Harada, Y. 2002. Genetic risk involved in stock enhancement of fish having environmental sex determination. *Population Ecology*. 44(1):7-15

Karayuecel, I., Penman, D., Karayuecel, S. y McAndrew, B. 2002. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*. 55(2):114-122.

King, N. J. y Howell W. H. 2000. Effects of Larval Stocking Density on Laboratory-Scale and Commercial-Scale Production of Summer Flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal Of The World Aquaculture Society*. 31(3):436-445

King, N. J., Nardo, G. H. y Jones, C. J. 2001. Sex-Linked Growth Divergence of Summer Flounder from a Commercial Farm: Are Males Worth the Effort?. *Journal of Applied Aquaculture*. 11(1,2):77-88.

Kirk, D. M., y Targett, T. E. 1991. Feeding, growth and survival of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*: experimental analysis of the effects of temperature and salinity. *Ecology progress series*. 72:213-223.

Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. y Abe S. 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*). *Journal of Molecular Endocrinology*. 23:167-176.

Kondo M, Froschauer A, Kitano A, Nanda I, Hornung U, Volf JN, Asakawa S, Mitani H, Naruse K, Tanaka M, Schmid M, Shimizu N, Scharl M, Shima. 2002. A. Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*. 7;295(2):213-22.

Kramer, S. H. 1990. Distribution and Abundance on juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, in Shallow water of San Diego County. In C. W. Haugen, (ed). The California halibut, *Paralichthys californicus* resource and fisheries. Calif. Dep.. Fish and Game. Fish. Bull. 174:99-126.

Kucas, S. T. y Hassler, T. J. 1986. Species Profiles: Life Histories And Environmental Requirements Of Coastal Fishes And Invertebrates (Pacific Southwest). California Halibut. U. S. Fish Wildl. Serv. Biological Report. 82 (11.44). U. S. Army Corps of Engineers. 8 p.

Kucas, S. T., and T.J. Hassler (1986). Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Southwest)—California Halibut, US Fish and Wildlife Service. Biol. rep.82. U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4. 8pp.

Kwon J.Y., McAndrew B.J. y Penman D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Molecular Reproduction and Development. 59:359–70.

Kwon, J. Y., McAndrew, B. J. y Penman, D. J. 2002. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. Journal of Fish Biology. 60:625-636.

Lasswell, J. L., G. Garza and W. H. Bailey. 1977. Status of marine fish introductions into freshwater of Texas. Texas Parks and Wildlife Department. PWD Report No. 3000-35.

Lavenberg, R.J., G.E. McGowan, A.E. Jahn, J.H. Petersen, and T.C. Sciarrota. 1986. Abundance of southern California nearshore ichthyoplankton: 1979–1984. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 27:53–64.

López-Rasgado, F. J. 2006. Evaluación del habitat de crianza estuarino de juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*) con base en el crecimiento y la abundancia relativa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 103 Pag.

Lodish, H. F., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. Krieger, M., Scott, M., Zipursky L., y Darnell, J. E. 2004. Molecular Cell Biology. 5th ed. Scientific American Press, N.Y. Pág. 961.

Luckenbach, J. A., Godwin, J., Daniels, H.V. y Borski, R. J. 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquaculture. 216: 315–327.

Madon, S. P. 2002. Ecophysiology of juvenile California Halibut *Paralichthys californicus* in relation to body size, water temperature and salinity. Mar. Ecol. Prog. Ser. 243:235-249.

Mair, G. C., Scott, A. G., Penman, D. J., Skibisnski, D. O. F. y Beardmore, J. A. 1991. Sex determination in genus *Oreochromis*. Theory Applicate Genetic. 82:153-160.

Maldonado, T. L. C. y Merchant, L. H. 2006. Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas. Ciencia Ergo Sum.13(2):176-182.

Malloy, K. D. y Targett, T. E. 1991. Feeding, growth and survival of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*: experimental analysis of the effects of temperature and salinity. Ecology Progress Series. 72:213-223.

Marcaccio, N. D. y Specker, J. L. 2004. Stress in summer flounder: anesthesia mitigates transportation-induced stress response and increases post-transport performance. Integrative and Comparative Biology. 43:(6)928.

Martinez-Tapia, C. y Fernandez-Pato, C.A., 1991. Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) growth. ICES CM 1991/F:20.

Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Humaguchi, S. y Sakaizumi, M. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563 (2002).

Merino, G. E., Piedrahita, R. H. y Conklin, D. E. 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. Aquaculture. 265(1-4):176-186

Miller, D. y R. Lea. 1972. Guide to coastal marine fish of California. Department of fish and Game. Fish Bulletin. 157. 235 p.

Morales, D. A. 1991. La Tilapia en México. Biología, cultivo y pesquerías. A. G. T. Editor S. A. México, D. F. 190 p.

Moser, H.G. 1996. The early stages of fishes in the California Current Region. CalCOFI Atlas No. 33. Allen Press, Inc., (ed.) Lawrence, KS. 1505 p.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X-T. y Nagahama, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Zoology. 281:362-372.

Navarro-Mendoza, M. 1985. Ecología trófica de la comunidad íctica, en el Estero de Punta Banda, Ensenada, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología. Ensenada, México. Pág. 178.

Nelson, J.S., 1994. Fishes of the World. Wiley, New York, NY, 600 pp.

Noga, E. J. 2000. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Segunda edición Wiley-Blackwell. Pág. 367.

Oliver, A. S. 1997. Size and density dependent mating tactics in the simultaneously hermaphroditic seabass *Serranus subligarius* (Cope, 1870). Behaviour. 134:563–594.

Olsson, P., Karlsson, J., Larsson, A., Modig, C. y Meyer I. 2008. Molecular Markers of androgen disruption. En: Rocha, M. J., Aruke, A. y Kapoor, B. G. (Eds). Fish reproduction. Science Publishers, USA, 421-434 p.

Olsson, P., Borg, B., Brunström, B., Håkansson, H. y Klasson-Wehler, E. 1998. Endocrine disrupting substances. Impairment of reproduction and development. Elanders Gotab (Eds). Stockholm, Sweden. Pág. 150

Pankhurst, N. W. y Van Der Kraak, G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish: In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J. P., Schreck, C.B (Eds). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp.73-79.

Pankurst N.W. 2008. Gonadal steroids: Functions and patterns of change 67-111 p. In: Rocha M.J., Arukwe A. and Kapoor B.G. (Eds). Fish Reproduction. Science Publisher, Enfield.

Yáñez, R. E., González, C. A. y Barbieri, B. M. A. 1995. Estructura térmica superficial del mar asociada a la distribución espacio-temporal de sardina y anchoveta en la zona norte de Chile entre 1987 y 1992. Investigación Marina. 33:123-147.

Perry, A. N. y Grober, M. S. 2003. A model for social control of sex change: interactions of behavior, neuropeptides, glucocorticoids, and sex steroids. Hormones and Behavior. 43:31-38.

Phelps, R. P. y Lee, W. R. 2001. Methods for the contribution from the male and female genome to sex inheritance. 37-42. In: A. Gupta, K. McElwee, D. Burke, J. Burreight, X. Cummings, y H. Egná (Eds), Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon. 145 p.

Pieau, C., Dorizzi, M. y Richard-Mercier, N. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences. 55:887–900.

Prentice, J. A. (1989). Low-temperature tolerance of southern flounder in Texas. *Trans. Am. Fish. Soc.* 118: 30-35

Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *N. Am. J. Aquac.* 61(2):91– 96

Quattro, J. M., Avise, J. C. y Vrijenhoek, R. C. 1991. Molecular evidence for origins of hybridogenetic fish clones (Poeciliidae: Poeciliopsis). *Genetics.* 127:391-398.

Redding, J. M y Patiño, R. 2000. Reproductive systems. *In: The handbook of experimental animal. The laboratory fish.* Academic press (Eds.). 261-267.

Reinboth, R., Bruslé Sicard, S., 1997. Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *J. Fish Biol.* 51, 738–749.

Reznick, D. N., Mateos, M. y Springer, M. S. 2002. Independent origins and rapid evolution of the placenta in the fish genus *Poeciliopsis*. *Science.* 298(5595):1018-1020.

Schartl, M. 2004. A comparative view on sex determination in medaka. *Mech Dev.* 121(7-8):639-45.

Schlupp, I., Parzefall, J. y Schartl, M. 2002. Biogeography of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Journal of Biogeography.* 29(1):1-6.

Schram, E., Van der Heul, J. W., Kamstra, A. y Verdegem, M. C. J. 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252:339– 347

Schwartz, V. 1977. Embriología animal comparada. OMEGA. Barcelona. 417 p.

Secretaria de Pesca. 1976. Catalogo de peces mexicanos. Secretaria de Industria y Comercio. México. 464 p.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. y Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346:240-244

Smigielski, A. S. 1975. Hormone-induced spawnings of the summer flounder and rearing of the larvae in the laboratory. *The Progressive Fish-Culturist.* 37(1):3-8.

Stewart, A. B., Spicer, A. V., Inskeep, E. K. y Dailey, R. A. 2001 Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 202:177–181.

Strüssmann, C. A. y Patiño, R. 1999. Sex determination, environmental. 402-409. In: Academia Press (Eds), San Diego. Encyclopedia of reproduction. Volumen 4. E. U. 1348 p.

Tabata, T. y Gorie, S. 1987. Teion shokku ni yoru hirame no shiseihassei nibaitai yuki ni oyobosu yuko suion hani nitsuite (Effective range of cold shock on induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*). Hyogo ken ritsu suisan shiken jo kenkyu hokoku_Bulletin of the Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station. 25:33–35. En Japonés. Resumen en inglés.

Tagawa, M., Kaji, T., Kinoshita, M. and Tanaka, M. (2004) Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 230: 517-525

Tago, A., Yamamoto, Y., Teshima, S. y Kanazawa, A. 1999. Effects of 1,2-di-20:5–phosphatidylcholine (PC) and 1,2-di-22:6–PC on growth and stress tolerance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Aquaculture* 179:231–239

Turner, P. M. 2008. Effects of Light Intensity and Tank Background Color on Sex Determination in Southern Flounder (*Paralichthys lethostigma*). Master of Science. Faculty of North Carolina State University. Pág.71.

Tzchori, I., Degani, G., Hurvitz, A. y Moav, B. 2004. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology* 138:271–280.

Veith, A. M., Froschauer, A., Körting, C., Nanda, I., Hanel, R., Schmid, M., Scharl, M. y Volff, J. N. 2003. Cloning of the dmrt1 gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene*. 317(1-2):59-66.

Volff J. N. y Scharl, M. 2002 Sex determination and sex chromosome evolution in the medaka, *Oryzias latipes*, and the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cytogenet Genome Res.* 99(1-4):170-177.

Wang, L. y Tsai, C. 2000. Effects of temperature on the Deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology* 286: 534-537.

Wei, G., Mahowald, A.P., 1994. The germline: familiar and newly uncovered properties. *Annu. Rev. Genet.* 28:309–324.

Wertz, S. P., Kramer, S. H. y Sunada, J. S. (2004). Annual Status of the Fisheries Report Through 2003, California Department of Fish and Game: Marine region: 14-1- 14-11.

Wolf, B., Wolf, H. 1974. Ultrastructure of sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen. Preservation. Int Journal of Fertility. 19;217

Wohlfarth, G. W. y Wedekind, H. 1991. The heredity of sex determination in tilapias. Aquaculture 92:143-156.

Yamamoto, E., 1995. Hirame no jiniteki sei togyo to kuron shudan sakushutsu ni kansuru kenkyu. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bulletin of the Tottori Prefectural Fisheries Experimental Station. 34, 1-145, in Japanese; with English summary.

Yamamoto, E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Aquaculture. 173:235-246.

Yamazaki, F., 1981. Sex control and manipulation of fish. Aquaculture 33, 329-354.

Yaron, Z. y Sivan, B. 2006. Reproduction. In: Evans, D. H. y Claiborne, J. B. The physiology of fishes. Tercera edicion. Taylor y Francis (Ed.) Florida. 601 p.

Young, P. H. 1969. The California partyboat fishery, 1947-1967. Department of Fish Game. Fish Bull. 145

Zacarías-Soto, M., Muget, J. B. y Lazo, J. P. 2006. Proteolytic Activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*) Journal of the World Aquaculture Society. 37(2):175-185.