

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN TRUCHA COMÚN MIGRADORA UTILIZANDO MARCADORES GENÉTICOS

Noemi González González

e- mail: noemicelanova@hotmail.com

Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutora:

- Paloma Morán Martínez

Departamento de Bioquímica,

Genética e Inmunología

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

En este estudio se efectuó una aproximación experimental al proceso de determinación sexual basada en la amplificación parcial del gen *sdY* de Yano et al. (2013) en *Salmo trutta*. Comprobamos la precisión del método en poblaciones del río Lérez determinando el sexo y estudiando su relación con otros parámetros: talla, peso, edad río y edad mar. Los resultados determinaron que la amplificación por PCR del fragmento del *sdY* es un método válido para la determinación del sexo, la proporción de hembras es superior a la de machos en un porcentaje similar a la de otras poblaciones estudiadas y que no se aprecian diferencias significativas en peso y longitud entre machos y hembras como tampoco las hay para la edad de río y edad de mar.

Palabras clave: *gen sdY, determinación sexual, reo, amplificación por PCR, Salmo trutta, río Lérez.*

INTRODUCCIÓN

La trucha común (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) es una especie de salmónido que exhibe diferentes comportamientos de migración dependiendo del ambiente. La distribución geográfica de esta especie se extiende de forma natural desde el océano Ártico (norte de Noruega) y el mar Blanco (Rusia), hasta las montañas del Atlas en el norte de África. También desde Islandia hasta el mar Aral en Afganistán y Pakistán (Behnke, 1972).

En ríos con acceso al mar los juveniles pueden migrar al mar y retornar al río de nacimiento para completar su ciclo de vida (trucha anádroma o reo) o permanecer en agua dulce durante todo su ciclo vital realizando movimientos restringidos dentro del río (trucha residente o trucha). Este fenómeno por el cual la población se divide entre individuos migradores y residentes se denomina migración parcial (Jonsson & Jonsson, 1993). Normalmente, en los ríos localizados en áreas costeras con acceso al mar, ambos tipos viven en simpatria. Cuando los adultos migradores vuelven al río de origen para el desove, las truchas residentes y los reos pueden reproducirse entre ellos y los juveniles crecen sin distinción alguna en el mismo río. Cuando llega la época del esguinado, la decisión entre migrar o permanecer en el río se toma cuando se excede cierto umbral de condiciones ecológicas y genéticas, lo que presenta un claro ejemplo de plasticidad fenotípica (Ferguson, 2006).

En muchas poblaciones descritas en la literatura, predominan las hembras sobre los machos entre la fracción migradora de la trucha común. Las poblaciones de reo se caracterizan, generalmente, por tener una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho (Baglinière *et al.* 2001).

Los reos, al igual que las truchas residentes, se reproducen entre diciembre y mediados de febrero. Los juveniles, tras permanecer entre 1 y 4 años en el río, migran al mar como esguines en primavera. Aproximadamente el 50% de la población retorna al río el mismo año del esguinado a partir del mes de junio, aunque no siempre con fines reproductores. La edad de primera maduración tiene lugar entre el primer y el tercer invierno tras el esguinado. El 25% de los reos retornan al río para reproducirse por lo menos una segunda vez, habiéndose detectado individuos que habían frezado hasta en cuatro ocasiones (Baglinière *et al.* 2001).

Es en la etapa de reproducción cuando comienza la aparición de caracteres sexuales secundarios y donde se puede realizar un sexado visual fiable. Por lo general, la determinación del sexo en esta etapa no representa dificultad, ya que se puede determinar el sexo por las características externas. En cambio, en etapas previas es necesario abrir la cavidad visceral y exponer las gónadas para determinar el sexo. Incluso así, la diferenciación entre machos y hembras en fases tempranas de la madurez sexual puede ser difícil siendo necesario el empleo de equipos ópticos para identificar las gónadas. La identificación no invasiva del sexo en salmónidos es en determinadas etapas de su ciclo vital muy complicada.

La determinación de la proporción de sexos y la sucesión de cambios en la fase de maduración que ocurren durante el año son de enorme importancia para adquirir un conocimiento completo de la biología de una población explotada. Por otro lado, la determinación de los sexos tiene como aplicación primordial proporcionar información esencial sobre la dinámica de la reproducción de una población. La información obtenida de estos análisis es útil para: establecer edad y talla en las que los peces alcanzan la madurez sexual, el momento y lugar de reproducción y la duración del ciclo desde el comienzo del desarrollo del ovario hasta la puesta de los huevos. Junto con las estimaciones de la fecundidad, esta información puede emplearse para calcular las dimensiones de la población y su potencial reproductivo. Los datos tienen varios usos prácticos. La edad y la talla en el momento de la madurez sexual son importantes para evaluar la edad óptima de la primera captura de una especie. Otro aspecto a considerar es el momento y lugar del desove, que facilita la organización de la pesca recreativa.

Todas las especies de salmónidos investigadas hasta la fecha han estado caracterizadas por un sistema de determinación sexual masculino heterogamético. Se ha demostrado que en su mayoría comparten un sistema de determinación sexual común (XX/XY) pero no tienen cromosomas sexuales reconocibles al microscopio (Devlin & Nagahama, 2002). Es por ello que se abre el debate sobre si comparten un gen maestro de determinación del sexo.

El descubrimiento del gen *sdY* como el gen de determinación sexual en la trucha arco iris (Yano *et al.*, 2012) ha sido especialmente relevante. El gen *sdY* (sexually dimorphic on the Y-chromosome) codifica una proteína de 192 aminoácidos mostrando una secuencia homóloga con el dominio carboxilo terminal del factor regulador del interferón 9 (IRF9). La estructura del gen que se deduce del alineamiento del ADNc *sdY* (nº de acceso del GenBank AB626896) con la secuencia *OmyY1*, muestra que está compuesto por 4 exones que comprenden 7,694 pb de la secuencia de 21,126 pb de *OmyY1*.

En una investigación posterior (Yano *et al.*, 2013) demuestran que la secuencia del gen *sdY* está conservada en varias especies de salmónidos y que está estrechamente vinculada al locus de determinación sexual.

Yano *et al.* (2013) proponen un método de determinación del sexo basado en la amplificación parcial del gen *sdY*. De modo que después de la amplificación se detectaría la presencia de banda en machos que estaría ausente en hembras.

Objetivos

- Comprobar la precisión de que el procedimiento de sexado genético realizado en salmónidos puede tener éxito en las poblaciones de trucha (*Salmo trutta*) de ríos que drenan al atlántico.
- Determinar, por métodos genéticos, el sexo de la población de reos del río Lérez durante los años 2010 y 2011.
- Estudiar la relación del sexo con otros parámetros (talla, peso, edad río y edad mar) en la población del río Lérez.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Como muestras control del método de sexado se dispone de 80 muestras de aleta adiposa de truchas macho y hembra, conservadas en etanol, de los ríos Lézé y Ulla que fueron sexadas visualmente de forma inequívoca.

Como muestras problema se dispone de 372 muestras de ADN extraído de la aleta de reos retornados al río Lézé y que fueron capturados en la presa de Bora como parte de una investigación anterior (Marco-Rius, 2013). Corresponden 149 al año 2010 y 223 al año 2011. Todas las muestras habían sido amplificadas por PCR para 6 microsatélites. Esta amplificación se considera como control positivo de la buena calidad del ADN.

De estas muestras hay datos de peso y longitud tomados en el momento de su captura. Además, para algunos peces, hay datos de la edad de río (años de permanencia en el río) y la edad de mar (años de permanencia en mar). Las edades fueron calculadas mediante la lectura de escamas según se explica en Marco-Rius *et al.*, (2012) por Mateo de la Fuente como parte de su TFG (Facultad de Ciencias del Mar).

Las escamas son las estructuras más utilizadas en salmónidos por su facilidad de extracción y por no causar un grave traumatismo al pez. La escalimetría permite, no solamente determinar la edad del pez, sino que también posibilita el reconocimiento de diferentes fases vitales que ocurren en medios distintos. También hace posible conocer las reproducciones que ha realizado y en qué momento, estableciendo el crecimiento del individuo. En el caso de un pez anádromo –reo- es posible distinguir la fase juvenil que tiene lugar en el río, de la fase de crecimiento marino. El establecimiento de la edad fluvial y marina en los distintos individuos analizados permite conocer la edad media de esguinado y de mar de la población (Baglinière *et al.*, 1985).

Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de una pieza de aleta con resina de Chelex (BioRad).

Para ello se calienta el chelex en agitación a 60°C y se añade a cada tubo 400 µL y 20 µL de pronasa (concentración de 20 mg/mL). Posteriormente se calienta la mezcla a 55°C en agitación para almacenar en nevera o congelador.

Amplificación de ADN

Para evitar contaminaciones las muestras se prepararon en una cabina de flujo laminar y la amplificación se realizó en un volumen de 1 µL de ADN genómico. Para obtener el volumen final de 20 µL añadimos 16,5 µL de agua, 2 µL de buffer 10x, 1 µL de dNTPs 10mM, 0,2 µL de KAPA Taq (Kapa Biosystems) y por último 0,2 µL de cada cebador 10mM.

El protocolo de amplificación por PCR consiste en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos que constan de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de anillamiento a 60°C, 30 segundos de extensión a 72°C y por último un paso de elongación.

Se utilizó la PCR 270 Thermal cycler de Applied Biosystem. El nombre y la secuencia de los cebadores específicos, directo e inverso son respectivamente *sdY E1S1*: 5'-ATGGCTGACAGAGAGCCAGAATCCAA-3' y *sdY E2AS4*: 5'-CTTAAACCACTCCACCCTCCAT-3' (Yano *et al.*, 2013).

Electroforesis en gel de agarosa

Para observar los resultados y asegurar que la amplificación ha sido correcta, los productos de la PCR se cargaron en geles de agarosa al 2% junto con un marcador de peso molecular. Las condiciones de la Electroforesis son 100 mv durante 20 – 30 minutos.

Visualización del gel

Una vez terminada la electroforesis se observa el gel de agarosa con una cámara CCD *Video Cámara module* y con luz ultravioleta.

Análisis estadístico

Los análisis se llevaron a cabo usando el software estadístico SPSS Statistics de IBM y el software R (R Development Core Team, 2014).

Mediante el software SPSS se estudió la proporción de individuos de cada sexo. Con el paquete *ggplot2* del software R se realizaron las gráficas donde se representa el número de reos en función del mes de entrada en el río, del peso y de la longitud.

Con el objetivo de evaluar la relación del sexo con la longitud y el peso de los individuos se utilizó un modelo lineal del software R. El análisis de regresión lineal es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables cuantitativas. Del mismo modo se analizó la relación entre el sexo y la migración con el objetivo de estudiar si hembras y machos migran al mar con la misma edad y si vuelven al río con la misma edad.

Las preguntas que se plantean en el análisis son las siguientes:

- ¿Hay diferencias en peso entre machos y hembras?
- ¿Hay diferencias en tamaño entre machos y hembras?
- ¿Hay diferencias en la edad de río entre machos y hembras? Es decir, ¿migran antes las hembras o los machos?
- ¿Hay diferencias en la edad de mar entre machos y hembras? Es decir, ¿retornan antes las hembras o los machos?

RESULTADOS

Extracción de ADN

El protocolo de extracción con resina de Chelex ha permitido una sencilla y rápida extracción de ADN. La cantidad y calidad de ADN extraído ha sido suficiente para llevar a cabo una adecuada amplificación.

Amplificación de ADN

Una de las mayores dificultades de este proceso es la alta probabilidad de contaminación de las muestras.

La preparación de las muestras en una cabina de flujo laminar junto con los correspondientes controles positivos y negativos permitió amplificar las muestras estudiadas y obtener buenos resultados libres de contaminación. En la Figura 1 se observan las bandas correspondientes a la amplificación de la secuencia conservada del gen *sdY* en genomas masculinos de reo. Las muestras donde se aprecia una ausencia de banda se corresponden con las hembras.

Análisis de datos

En la Tabla 1 podemos ver el resultado global del sexado en *Salmo trutta* analizado con el software estadístico SPSS Statistics de IBM. El 78,0% de las 372 muestras analizadas se corresponde con hembras y el 22,0% con machos. Observamos cómo predominan éstas sobre los machos con una proporción de 3,5 hembras por macho.

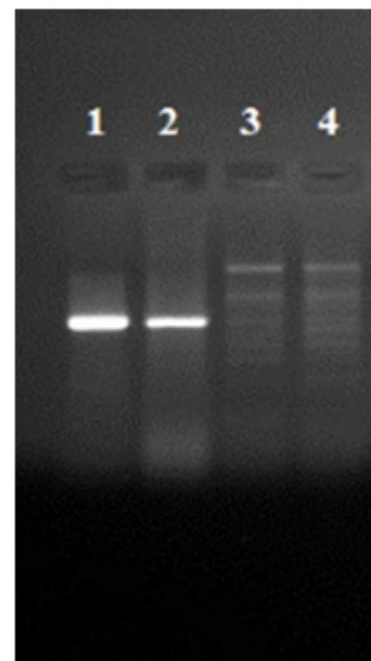


Figura 1. Amplificación del gen *sdY* en *Salmo trutta*. En la calle 1 se visualiza un control de macho, en la calle 2, un macho y en las calles 3-4 hembras.

Tabla 1. Resultado del sexado. H: hembra, M: macho, N: número de individuos

		N	PORCENTAJE
	H	290	78,0 %
SEXO	M	82	22,0 %
	Total	372	100,0 %

Si analizamos la distribución por sexos de las muestras para cada año analizado observamos cómo se mantienen unos porcentajes muy similares predominando las hembras sobre los machos con una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado del sexado por año. H: hembra, M: macho, N: número de individuos

Sexo	2010		2011	
	N	%	N	%
H	113	75,8%	177	79,40 %
M	36	24,2%	46	20,60 %
TOTAL	149	100,0%	223	100 %

Para el trabajo se disponía de una tabla con la información detallada de cada pez: fechas de recogida, datos de longitud, peso, factor de condición (relación volumétrica en función del peso) y el sexado visual realizado por los pescadores en algunas muestras. De algunas muestras se conocía la edad de río y mar calculada mediante la lectura de las escamas.

Tabla 3. Calendario de la migración de adultos de retorno al río Lézé (2010-2011)

MES	N	%
ABRIL	4	1,07 %
MAYO	10	2,69 %
JUNIO	66	17,74 %
JULIO	141	37,90 %
AGOSTO	67	18,01 %
SEPTIEMBRE	19	5,11 %
OCTUBRE	16	4,30 %
NOVIEMBRE	29	7,79 %
DICIEMBRE	20	5,38 %

Observando el mes de retorno de los 372 reos en el río Lézé podemos ver cómo la migración de adultos se inicia tímidamente en el mes de abril y algo más en mayo. La proporción de reos capturados se incrementa notablemente en junio (17,74%) para alcanzar su máximo en julio (37,90%). Tras este pico se inicia un descenso que alcanza su mínimo en octubre (4%), seguido de un remonte otoñal en noviembre relacionado con la reproducción, pero de menor magnitud que el estival (Tabla 3 y Figura 2).

Los 372 reos capturados en la presa de Bora entre 2010 y 2011 presentan una talla media de 344 mm y un peso medio de 490 g.

Respecto al total de las muestras fueron 86 las que fueron sexadas visualmente por los pescadores, de las que solamente 64 concordaron con el sexado genético. Lo que representa un acierto del 55,04%.

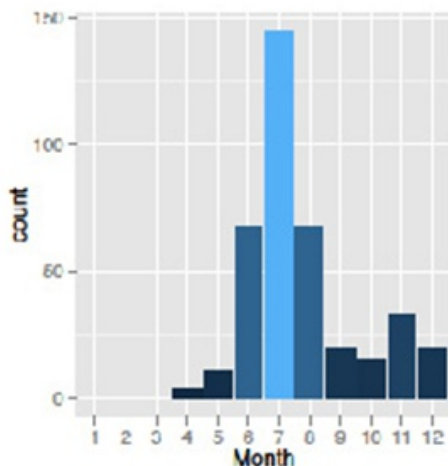


Figura 2. Representación de la migración de adultos de retorno de reo. En el eje X se indica el mes de retorno (month) y en el eje Y, el número de individuos (count)

Mediante los análisis que se llevaron a cabo usando el software R (R Development Core Team, 2014) se obtuvieron las siguientes estimaciones para las preguntas planteadas:

- ¿Hay diferencias en peso entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = 6.61; P = 0.86)

- ¿Hay diferencias en tamaño entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.86; P = 0.92)

- ¿Hay diferencias en la edad de río entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.07; P = 0.61)

- ¿Hay diferencias en la edad de mar entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.05; P = 0.77)

DISCUSIÓN

Observando los resultados se puede afirmar que el método llevado a cabo en este estudio es fiable para la identificación no destructiva del sexo en las poblaciones atlánticas de *Salmo trutta*. A pesar de requerir el manejo del animal para realizar un corte de la aleta para la extracción de ADN, este método no necesita abrir la cavidad visceral para exponer las gónadas matando al pez. En el artículo de Petterson *et al.*, (2014) se relata cómo el hecho de realizar el corte en la aleta adiposa no afecta a los peces.

El método tiene dos inconvenientes. Por una parte, al tratarse de un método basado en la ausencia-presencia de una banda amplificada, es necesario realizar controles internos de amplificación. Si el ADN no está en buenas condiciones o hay presencia de inhibidores se obtendría un falso positivo para la presencia de machos.

Por otra parte la contaminación. Esta resultó ser un problema importante en el inicio de este trabajo ya que muchos controles se vieron afectados. Sin embargo, el problema se solucionó realizando las amplificaciones en una cabina de flujo laminar y utilizando material (tubos, puntas, gradillas, agua...) en exclusiva para este experimento.

La eficacia de este método queda patente en las amplificaciones de ADN realizadas con los controles de los ríos Lérez y Ulla. Estas muestras fueron sexadas mediante criterios morfológicos de forma inequívoca con el fin de tener en cuenta todos los posibles errores del método. Este es un paso previo e imprescindible para validar la efectividad del método ya que en la literatura hay referencias sobre falsos positivos o negativos del marcador en algunas poblaciones. En el estudio llevado a cabo por Yano *et al.*, (2012) se encontraron dos especies de la subfamilia *Coregoninae* (*Coregonus lavaretus* y *Coregonus clupeaformis*) que amplificaban el gen *sdY* en ambos genomas, tanto en machos como en hembras. En el mismo trabajo se indica también la incapacidad para amplificar el gen en *Esox lucius* de la familia Esocidae que es considerado como la especie hermana más próxima a los salmónidos.

Hasta la aparición de métodos como el utilizado en este trabajo la identificación no invasiva del sexo en salmónidos se realizaba mediante el método inmunoenzimático de la vitelogenina (Pérez *et al.*, 2005; Saura *et al.*, 2009). Es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos que se encuentra presente durante el ciclo de maduración ovárica. Para que sea válido este método es necesario que se haya iniciado en el adulto la fase de producción de huevos para que la vitelogenina esté presente en la sangre del individuo. Su gran inconveniente en comparación con la amplificación del gen *sdY* es que no es válido para juveniles.

Las proporciones de sexos obtenidas en este estudio concuerdan con la mayoría de poblaciones

estudiadas hasta ahora (Jonsson, 1985; Richard, 1986; Bagliniere, 2001; Caballero, 2002). Las poblaciones migradoras de reo se caracterizan, generalmente, por tener una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho, lo cual representa una estrategia reproductiva que fomenta la fecundidad pero que obliga a una mayor competencia entre machos sedentarios y anádromos. Las hembras anádromas consiguen un aumento en la fecundidad con el aumento del tamaño corporal al desarrollarse en el ambiente marino. El proceso de maduración en el río se desencadena con mayor facilidad en los machos, que no requieren de un aumento de tamaño para incrementar la calidad de sus gametos. Por esta razón el ciclo de vida sedentario es mayoritario en este sexo (Toledo, 1996; Caballero, 2003).

Cuando se comparan los datos obtenidos con la proporción de sexos realizada visualmente por los pescadores, utilizando los individuos capturados en la estación de Bora, su acierto es solamente del 55,0% debido a la falta de caracteres sexuales secundarios en los peces que retornan al río. Sobre todo los que lo hacen tempranamente, bien en edad o en el mes de retorno. Por lo tanto el método de sexado genético es muy útil para la gestión de las poblaciones.

Los análisis realizados utilizando los datos disponibles de peso y longitud indican que el sexo no es determinante ni para el tamaño ni para peso de los adultos por lo que no se observan diferencias significativas entre machos y hembras. El tamaño de los individuos es muy importante en el río ya que es un rasgo vital para la supervivencia en la migración al mar debido a la mayor capacidad de osmorregulación de los individuos mayores. En el mar el tamaño deja de ser importante porque ya han sobrevivido al cambio de ambiente. Sucede tanto en machos como en hembras y todos los individuos, independientemente del sexo, tienden a compensar su tamaño en el mar. Esto hace que los más pequeños crezcan un poco más y los grandes dejen de crecer hasta equipararse (Marco-Rius *et al.*, 2012).

Por último, observamos que no hay diferencias entre la edad de río y de mar entre hembras y machos. Se concluye por tanto que el sexo es determinante sólo en ámbitos de migración ya que las hembras en el medio marino consiguen un aumento en la fecundidad con el aumento del tamaño corporal. El tamaño favorece una mayor producción de huevos y acceder a territorios de alta calidad para el desove y desarrollo de los huevos (Jonsson & Jonsson, 1993).

CONCLUSIONES

- La amplificación por PCR del fragmento del gen sdY es un método válido para la determinación del sexo en truchas del río Lérez y Ulla.
- En los reos del río Lérez la proporción de hembras es superior a la de machos en un porcentaje similar a la de otras poblaciones analizadas.
- No hay diferencias significativas en peso y longitud entre machos y hembras como tampoco las hay para la edad de río y de mar.

BIBLIOGRAFÍA

Baglinière, J. L., Bomassi, P., Bousquet, B., Chancerel, F., De Pontual, H., Dumas, J., Euzenat, G., Fontenelle, G., Fournel, F., Gayou, F., Luquet, J.F., Maisse, G., Martin Ventura, J.A., Marty, A., Nihouarn, N., Porcher, J.P., Prevost, E., Prouzet, P., Pustelnik, G., Richard, A., & Troadec, H. (1985). La détermination de l'âge par scalimétrie chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*) dans son aire de répartition méridionale: utilisation pratique et difficultés de la méthode. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*. 298: 69-105.

- Baglinière, J. L., Ombredane, D., & Marchand, F. (2001). Critères morphologiques pour l'identification des deux formes (rivière et mer) de truite (*Salmo trutta*) présentes sur un même bassin. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*. 357-360: 375-383.
- Behnke, R. J. (1972). The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 29: 639-671.
- Caballero, P. (2002). Ciclo vital del reo (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) en la cuenca del río Ulla. Memoria Diploma de Estudios Avanzados. Santiago de Compostela.
- Caballero, P. (2013). Biología y ecología del salmón atlántico (*Salmo salar*) y el reo o trucha de mar (*Salmo trutta*) en Galicia. *Sociedad de ciencias de Galicia*. 77-99.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191-364.
- Ferguson, A. (2006). Genetics of sea trout, with particular reference to Britain and Ireland. *Sea Trout. Biology, conservation and management*. 12: 157-182.
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (1993). Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 3: 348-365.
- Marco-Rius, F., Caballero, P., Morán, P., & de Leaniz, C. G. (2012). And the last shall be first: heterochrony and compensatory marine growth in sea trout (*Salmo trutta*). *PloS one*. 7: e45528.
- Marco-Rius F., Sotelo G., Caballero P., Morán P. (2013). Insights for planning an effective stocking program in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 70: 1092-1100.
- Pérez J., Izquierdo J.I., García-Vázquez E. (2005). Female biased harvest on Atlantic salmon in Spain. *Fisheries Research*. 74: 127-133.
- Petersson, E., Rask, J., Ragnarsson, B., Karlsson, L., & Persson, J. (2014). Effects of fin-clipping regarding adult return rates in hatchery-reared brown trout. *Aquaculture*. 422: 249-252.
- Richard, A. (1986). Les populations de truit de mer, *Salmo trutta* L., de L'Orne et de las Touques (Basse-Normandie): Scalimétrie, sexage, caractéristiques biométriques, démographiques et migratoires. These Doc. Univ. de Rennes.
- Saura, M., Caballero, P., Caballero, A., & Morán, P. (2009). Determinación de la proporción de sexos en salmones capturados durante la temporada de pesca. *Investigación: cultura, ciencia y tecnología*. 1: 56-59.
- Toledo, M. M. (1996). Ciclos de vida y estrategias reproductivas de la trucha común (*Salmo trutta* L.). Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2012). An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*. 22: 1423-1428.
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., & Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary applications*. 6: 486-496.