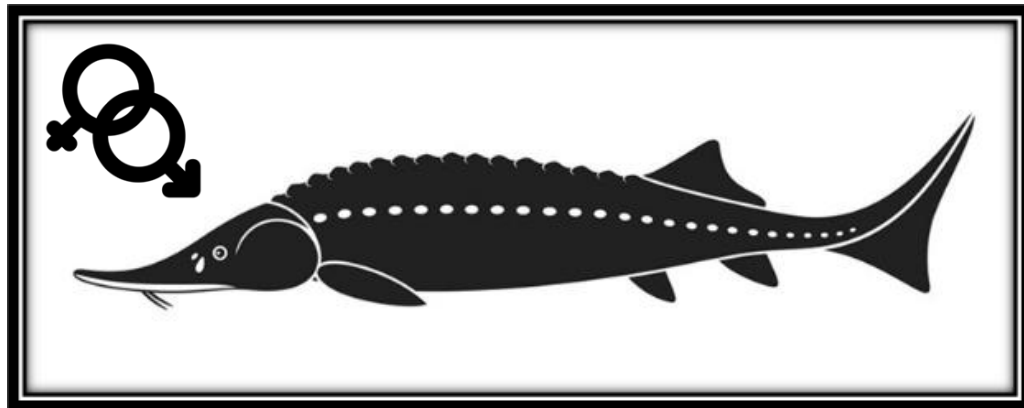


Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Estudio del programa de diferenciación sexual femenino y búsqueda de marcadores sexo específicos para el esturión siberiano
Acipenser baerii

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS



Autor: Lic. André Lasalle Gerla

Directora de tesis: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Diciembre de 2024

Agradecimientos

Esta tesis de Doctorado resume muchos años de trabajo, de investigación, de experimentales que fallaron y se repitieron hasta encontrarle la vuelta, de muchas horas de laboratorio, de muestreo y sobre todo de mucho apoyo, de mi familia, mis amigos, mi tutora y mis compañeros. Siempre supe que el camino iba a ser largo y difícil, pero en estos años nunca tuve dudas de que también iba a encontrar grandes satisfacciones y lograr concluir esta etapa. Por todo esto, agradezco enormemente a todos ellos, los que están hoy al lado mío, y a los que ya no están, pero fueron enormemente importantes en marcar mi vida, mi forma de pensar y de actuar, y por eso parte de este resultado, de todo este Doctorado, les pertenece a ellos.

Gracias y seguimos...

Índice

Resumen general	6
Introducción general	8
1. Determinación del sexo.....	8
a. Proceso de determinación del sexo	8
b. Determinación del sexo en peces	10
2. Diferenciación del sexo gonadal.....	13
a. Proceso de diferenciación del sexo	13
b. Diferenciación mediada por esteroides	17
c. Diferenciación no esteroidea	19
3. Introducción a los acipenseriformes	20
a. Generalidades de los esturiones	20
i. Historia vida de los esturiones.....	21
ii. Producción de acuicultura	27
Modelo de estudio: el esturión siberiano <i>Acipenser baerii</i>	29
Antecedentes de estudios de determinación y diferenciación del sexo en esturiones	30
4. Estrategia experimental	Error! Bookmark not defined.
5. Hipótesis y objetivos.....	34
Capítulo 1: Identificación del sexo de esturiones siberianos morfológicamente indiferenciados mediante el análisis estadístico de los patrones de expresión génica	
a. Resumen	36
b. Introducción	37
c. Materiales y métodos.....	38
d. Resultados	42
e. Discusión	45
f. Bibliografía	47
g. Conclusiones capítulo 1	49
Capítulo 2: Búsqueda de un marcador sexo específico para el esturión Siberiano en el marco de la búsqueda del determinante del sexo	
a. Resumen	50

b. Introducción	51
c. Materiales y métodos.....	52
d. Resultados	60
e. Discusión	66
f. Conclusiones capítulo 2	69
g. Bibliografía	70
h. Publicación técnica.....	73

Capítulo 3: a) *hsdl7b1* es un gen clave para la diferenciación ovárica del esturión siberiano

a. Resumen	77
b. Introducción	78
c. Materiales y métodos.....	80
d. Resultados	82
e. Discusión	83
f. Conclusión	89
g. Bibliografía	90

b) Regulación de los principales genes femeninos por esteroides sexuales

a. Introducción	94
b. Materiales y métodos	95
c. Resultados	98
d. Discusión	101
e. Conclusiones capítulo 3	103

Capítulo 4: Primeros estudios de la diferenciación del sexo en etapas tempranas del desarrollo, utilizando transcriptómica en individuos sexados genéticamente

a. Resumen	104
b. Introducción	106
c. Materiales y métodos.....	109
d. Resultados	115
e. Discusión	130
f. Conclusiones capítulo 4.....	150

5. Discusión general	152
6. Conclusión y perspectivas.....	161
7. Bibliografía General	163
8. Anexos (Formato digital)	
a. Material suplementario Capítulo 2	
b. Material suplementario Capítulo 4.....	

Resumen general

El esturión siberiano es una especie de interés a nivel de la investigación básica, pero también a nivel comercial. A nivel de investigación, sus características de desarrollo sexual lento y su posición basal a nivel filogenético, ubicándose en la base de los Actinopterygios, lo convierte en un modelo sumamente interesante para estudiar los procesos de determinación y diferenciación del sexo. El lento desarrollo mencionado, hace que se logre abordar la diferenciación del sexo en detalle en varios puntos temporales durante el período de diferenciación molecular, y además tener la posibilidad de hacerlo en un animal basal permite entender mejor como este proceso se continuó a nivel evolutivo hacia los peces modernos. Se comenzó este trabajo de tesis desde en un lugar con poca información, y sin posibilidades de sexar a los individuos previamente a que ocurriese la diferenciación morfológica del sexo. Gracias a estudios anteriores (Vizziano-Cantonnet et al., 2016), teniendo claro el período de diferenciación molecular del sexo y mediante el análisis de un transcriptoma gonadal realizado sobre poblaciones mixtas (machos y hembras sin sexar) (Vizziano Cantonnet et al., 2018), se identificó un grupo de genes femeninos que fueron utilizados en conjunto y mediante sus niveles de expresión para generar una herramienta de sexado para individuos indiferenciados en un período temprano. Se realizó la búsqueda de marcadores genéticos del sexo teniendo en cuenta el postulado de que este pez tiene un sistema de determinación del tipo ZZ/ZW, y que por lo tanto el genoma masculino y femenino deben estar diferenciados. La técnica utilizada para este objetivo fue RAD-sequencing, sin embargo, no fue posible encontrar un marcador, pero si se publicó la base de datos generada a partir de este trabajo. Finalmente, en 2021, se publicó el primer marcador genético del sexo por Kuhl et al., este marcador permitió sexar a los animales en cualquier estadio de desarrollo mediante una sencilla PCR en tiempo final. A partir de ese momento y utilizando inicialmente una técnica gen candidato y más tarde transcriptómica sobre las etapas iniciales de la diferenciación del sexo, se lograron detallar estos procesos en la vía masculina y

femenina. Se confirmaron genes vinculados a ambas vías de diferenciación, y se encontraron nuevos genes que no fueron descritos hasta el momento. Se comprobó que los estrógenos son los encargados de llevar adelante el proceso de diferenciación sexual femenino en estos peces basales al igual que sucede en la enorme mayoría de los teleósteos, indicando que esta forma de diferenciación surge en especies muy antiguas, anteriores a la aparición de los peces modernos. Además, se demostró que los genes vinculados a la producción de estrógenos ya están activos desde los 2,5 meses de edad, y que el proceso de diferenciación del sexo debe iniciarse incluso antes de este punto temporal. Por último, se postuló al gen *hsd17b1* como el mejor gen candidato hallado hasta el momento para actuar como gen determinante del sexo. Este trabajo de tesis además de aportar resultados originales deja muchas puertas abiertas para continuar los estudios de la determinación y diferenciación del sexo en esturión siberiano, y para ello uno de los pasos más importantes será comenzar a realizar pruebas funcionales que muestren empíricamente la acción de esos genes sobre las vías de cada uno de los sexos.

Introducción general

Determinación del sexo

Proceso de determinación del sexo

Se define la determinación del sexo como el proceso por el cual se establece el sexo biológico de un organismo. Existen al menos dos grandes grupos en los que se puede dividir la forma de determinación del sexo, en estos dos grupos principales se define la determinación genética del sexo, y la determinación del sexo mediada por el ambiente; luego dentro de estas dos categorías principales encontraremos diversas variaciones de los procesos (Gamble & Zarkower, 2012; Nagahama et al., 2021; Penman & Piferrer, 2008). La determinación genética del sexo (GSD; del inglés, Genetic Sex Determination) es aquella donde el sexo queda establecido por factores genéticos y por lo tanto esto sucede en el momento de la fecundación. El proceso más sencillo dentro de la categoría GSD es la determinación monofactorial del sexo. Esto refiere a que un único factor genético es el que determina el sexo de un organismo. Este tipo de determinación es el que se encuentra de manera muy conservada en mamíferos terios, donde la presencia del gen *Sex determining region Y (Sry)* en el cromosoma Y de machos determina el sexo masculino, y su ausencia lleva por lo tanto al desarrollo de una hembra (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993; Sinclair et al., 1990). Una vez que este factor se activa comienza una la acción de una red de factores moleculares que se expresarán durante un período determinado, que puede variar en tiempo dependiendo de la especie de que se trate, y durante el cual se diferencia la gónada primordial bipotencial a un testículo. Si el factor determinante no está presente, la red de factores que se activará será la femenina dando lugar a la formación de un ovario. Esto se conoce como la diferenciación del sexo gonadal (Brennan & Capel, 2004; Koopman, 1999; Nagahama et al., 2021), y será tratado más adelante. En el caso mencionado, es decir en mamíferos terios, hablamos de sistemas de

determinación del tipo XX/XY, heterogaméticos masculinos, sin embargo, en otros grupos de organismos podemos encontrar variaciones de estos sistemas. Dentro de los que son los vertebrados, las aves cuentan con un sistema de determinación heterogamético femenino del tipo ZZ/ZW (hembra ZW) y los reptiles (tortugas, lagartos y víboras) y peces cuentan con ambos variando según la especie (Gamble & Zarkower, 2012). En aves, al igual que lo descrito en mamíferos, la determinación del sexo se produce mediante un único factor, que en este caso se trata del gen *Dmrt1* (del inglés *Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*). La determinación es por lo tanto monofactorial, sin embargo, a diferencia de los mamíferos el sexo queda definido por un doble dosaje de este gen ligado al cromosoma Z que determina por lo tanto el sexo masculino. La presencia de dos copias del factor *Dmrt1* en la composición cromosómica ZZ determina el sexo, en el caso de que haya una única copia, como sucede naturalmente en individuos ZW, o por una afección en machos ZZ, se desarrolla una hembra (Smith et al., 2009). Se ha encontrado al menos una especie de anfibio (*Xenopus leavis*) con determinación del tipo ZZ/ZW monofactorial femenina relacionada con la presencia del gen *Dm-W* (ortólogo de *Dmrt1*) (Yoshimoto et al., 2008; Yoshimoto et al., 2010). Por otro lado, y mostrando la variabilidad de estos sistemas, se presume que para la especie *Shinisaurus crocodilurus* que cuenta con un sistema ZZ/ZW, la determinación de su sexo se produce de manera dosis dependiente determinando hembras. En este caso particular las hembras cuentan con tres copias del gen *Foxl2*, un gen muy importante a nivel evolutivo en el desarrollo femenino. Las hembras de esta especie cuentan con una copia del gen en cuestión asociada al cromosoma Z y dos asociadas al cromosoma W, mientras que los machos cuentan con dos copias del gen (cada una asociada a uno de los cromosomas Z) (Pinto et al., 2024). Más allá de esto, no hay registro de ninguna especie conocida al momento con un sistema del tipo XX/XY con determinación femenina por doble dosaje de un factor único (similar a lo que sucede en aves, pero con un factor feminizante) (Marshall Graves, 2013). Otros organismos GSD no determinan su sexo mediante la activación de un único

gen, sino que es la expresión de un conjunto de factores en cromosomas autosomales distribuidos a lo largo del genoma que llevan a la determinación del sexo (Moore & Roberts, 2013; Schartl et al., 2023). Estos organismos son llamados poligénicos. Una de las principales características observables en este tipo de determinación, es que las proporciones de sexos pueden variar mucho entre las progenies obtenidas de la cruce de dos individuos (Liew et al., 2012; Rice, 1986; Vandeputte et al., 2007), algunos ejemplos de esto se encuentran en las especies de peces *Dicentrarchus labrax* (lubina, Palaioikostas et al., 2015), *Danio rerio* (zebrafish, Liew et al., 2012) y *Metriacrima spp*, un género de cíclidos africanos (Moore & Roberts, 2013; Roberts et al., 2016). Entre aquellos organismos que tienen sistemas de determinación GSD, algunos se encuentran en un punto intermedio donde la determinación genética puede ser afectada por factores ambientales siendo el más relevante la temperatura, mientras que otros organismos tienen sistemas de determinación totalmente ESD (del inglés Environmental Sex Determination) (Penman & Piferrer, 2008) como por ejemplo algunas tortugas, lagartos y cocodrilos, en los cuales la temperatura de incubación de los huevos en el nido determinará el sexo de la progenie (Bull, 1980; Deeming & Ferguson, 1989; Lang & Andrews, 1994). Para la especie *Alligator mississippiensis* por ejemplo, temperaturas de incubación de 30°C generan una determinación sexual 100% femenina mientras que a 33°C se desarrollaran 100% machos (Deeming & Ferguson, 1989), pero esto puede variar dependiendo del grupo y especie en estudio (Bull, 1980).

Determinación del sexo en peces

Los peces siendo el grupo más diverso dentro de los vertebrados contando con más de 32000 especies de entre las aproximadamente 60000 especies de vertebrados existentes (Nelson et al., 2016), (es decir que la mitad de ellas son peces), son también el grupo con más diversidad de mecanismos de determinación del sexo. En este grupo encontramos especies que tienen

determinación del sexo del tipo GSD y ESD, pasando a su vez por mecanismos que son intermedios, es decir que determinan el sexo por una combinación de factores genéticos y ambientales (Devlin & Nagahama, 2002; Penman & Piferrer, 2008; Yamamoto & Luckenbach, 2023). En varias especies de peces se han identificado sistemas de determinación genéticos monofactoriales y los respectivos genes maestros (Cui et al., 2017; Hattori et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Koyama et al., 2019; Li et al., 2015; Matsuda et al., 2002; Myosho et al., 2012; Pan et al., 2019; Reichwald et al., 2015; Takehana et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; Yano et al., 2012), es decir sistemas similares al de mamíferos, sin embargo a diferencia de ese grupo cuyo gen de determinación del sexo está muy conservado (*Sry*), en peces el gen determinante no lo está y varía entre diferentes especies e incluso dentro de un mismo género (Tabla 1).

Tabla 1. Genes determinantes del sexo en peces. Los genes indicados han sido verificados mediante pruebas funcionales.

Organismo	Gen determinante	Función	Sistema de determinación GSD	Referencia
Medaka, <i>Oryzias latipes</i> / <i>Oryzias curvinotus</i>	<i>dm-Y</i>	Factor de transcripción	XX/XY	Matsuda et al., 2002
Medaka, <i>Oryzias luzonensis</i>	<i>gsdf-Y</i>	Factor de Crecimiento	XX/XY	Myosho et al., 2012
Pejerrey, <i>Odontesthes hatcheri</i> / <i>Odontesthes bonaerensis</i> / <i>Tilapia,</i> <i>Oreochromis niloticus</i> / <i>Lucio, Esox Lucius</i>	<i>amh-Y</i> / <i>amhb-Y</i>	Factor de crecimiento	XX/XY	Hattori et al., 2012 ; Yamamoto et al., 2014 ; Li et al., 2015 ; Pan et al., 2019
Fugu, <i>Takifugu rubripes</i>	<i>amhr2</i>	Receptor de factor de crecimiento amh	XX/XY	Kamiya et al., 2012
Trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>sd-Y</i>	Factor del sistema inmune	XX/XY	Yano et al., 2012
Medaka, <i>Oryzias dancena</i>	<i>sox3</i>	Factor de transcripción	XX/XY	Takehana et al., 2014
Turquoise Killfish, <i>Nothobranchius furzieri</i>	<i>gdf6-Y</i>	Factor de crecimiento	XX/XY	Reichwald et al., 2015

Lenguado chino, <i>Cynoglossus semileavis</i>	<i>dmrt1</i>	Factor de transcripción	ZZ/ZW	Cui et al., 2017
Seriola, <i>Seriola lalandi</i>	<i>hsd17b1</i>	Gen de la esteroidogénesis	ZZ/ZW	Koyama et al., 2019

Durante los últimos años el avance en técnicas de secuenciado de genomas y transcriptomas generó la aparición de muchos genes que han sido propuestos como determinantes del sexo en peces (Kitano et al., 2024), sin embargo, para la mayoría de estos nuevos genes no se han realizado pruebas funcionales que los validen como verdaderos genes maestros determinantes del sexo.

Existen también las llamadas especies poligénicas, como es el caso de *D. labrax* (Piferrer et al., 2005; Vandeputte et al., 2007), una especie de valor comercial, y otras que combinan la determinación genética y la influencia de factores ambientales como puede suceder con la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Baroiller et al., 2009) o el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*; Yamamoto et al., 2014). Otro punto importante es la variabilidad en los sistemas cromosómicos, que a diferencia de mamíferos donde se conserva el sistema XX/XY o de aves donde se conserva el sistema ZZ/ZW, en peces con GSD podemos encontrar ambos sistemas (Gamble & Zarkower, 2012), e incluso pueden presentarse ambos en un mismo género y especie como sucede en algunos poecílidos (ej. *Poecilia sphenops*) (Volff & Scharl, 2002). El conjunto de las características mencionadas para los peces hace muy difícil el estudio de la determinación del sexo y los procesos que enmarca. También encontramos en varias especies de peces la determinación sexual ESD, en donde al igual que en reptiles el factor más relevante es la temperatura. La dependencia de la temperatura fue encontrada por primera vez en *Menidia menidia* (Conover & Heins, 1987) y ahora se sabe que tiene efecto sobre un gran número de especies (Devlin & Nagahama, 2002). Además, se han observado otros factores que son capaces de determinar el sexo como por ejemplo el pH, la densidad poblacional e incluso la interacción social (Baroiller et al., 2009; Reddon & Hurd, 2013;

Rubin, 1985; Shapiro, 1979), mostrando que se trata de un proceso por demás complejo, donde entran en juego múltiples variables que pueden tener efectos relevantes.

Diferenciación del sexo gonadal

Proceso de diferenciación del sexo

La diferenciación del sexo gonadal se define como el proceso en el cual una serie de eventos a nivel bioquímico y molecular llevan a la formación de un ovario o un testículo partiendo inicialmente de una gónada primordial bipotencial e indiferenciada (Matsuda 2018; Nicol et al., 2022), una característica que se mantiene conservada entre organismos tan distantes como pueden ser la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y hasta el ratón (*Mus musculus*) (Capel, 2017). Como fue mencionado anteriormente, la diferenciación gonadal se produce durante una ventana temporal acotada que puede variar mucho en duración según el grupo y la especie estudiada, e incluso dentro de un mismo grupo. Durante ese período se produce la expresión de los genes necesarios para que se lleve adelante el desarrollo de un testículo o un ovario dependiendo de la vía de diferenciación que se active. En los mamíferos el proceso de diferenciación del sexo se inicia por lo tanto una vez se expresa el gen *Sry* en machos, o ante la falta de su expresión en hembras (Brennan & Capel, 2004). Las vías moleculares que llevan a la diferenciación gonadal de mamíferos están bastante bien definidas, más allá de que se sigue estudiando el accionar de los genes involucrados. En la vía testicular luego de la activación del gen *Sry*, se expresa el *Sox9* (del inglés, SRY-Box Transcription Factor 9) y el *Fgf9* (del inglés *fibroblast growth factor 9*) quienes presentan un bucle de regulación positivo y tienen como rol clave reprimir e impedir que se expresen genes fundamentales de la vía canónica femenina, entre ellos el miembro 4 de la familia de Wnt (*Wnt4*, del inglés, *Wingless-type MMTV integration site family, member 4*), la *Rspo1* (del inglés *Rspondina 1*) y la *Ctnnb1* (*beta catenina 1*) (Capel, 2017; Eggers et al., 2014). Se ha demostrado que mutaciones

que causen la pérdida de la acción de los genes mencionados de la vía femenina en una hembra durante la diferenciación sexual llevan a la reversión del sexo de hembras hacia machos (Capel, 2006; Parma et al., 2006). En algunos casos la reversión del sexo se produce en forma parcial, sin embargo, la afectación es suficientemente importante como para que no se forme un ovario funcional, mostrando la importancia de la vía *Wnt4-Rspo1-Ctnnb1* (Chassot et al., 2014; Chassot et al., 2008; Tomizuka et al., 2008; Vainio et al., 1999), que junto a los genes *Foxl2* (del inglés, *Forkhead Box L2*) y *folistatina* (*Fst*) son los principales actores de la vía femenina en mamíferos (Brennan & Capel, 2004; Capel, 2017). De esta forma, queda clara la importancia de *Sox9* o *Fgf9* en la vía masculina ya que si se genera su pérdida de función se produce la reversión y desarrollo de la gónada femenina, mediada por la activación de genes de la vía de diferenciación ovárica (Colvin et al., 2001; Kim et al., 2006). La vía de diferenciación masculina ha sido aún más caracterizada, luego de la activación de los genes anteriormente mencionados se continúa con la expresión de otros genes cuyo accionar y productos son claves para terminar el proceso de diferenciación testicular. Entre estos genes se encuentran por ejemplo los que codifican para factores de crecimiento: *Pdgf* (del inglés, *Platelet-derived growth factor*), *Pdgfra* (del inglés, *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*), y *Fgfr2* (del inglés, *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*); los factores de transcripción: *Arx* (del inglés, *Aristaless Related Homeobox*), y *Sox8–Sox10* (del inglés, *SRY-Box Transcription Factor*); las enzimas *Ptgds* (del inglés, *Prostaglandin D2 synthase*), *Cyp26b1* (del inglés, *Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member*), la hormona *Amh* (hormona anti-Mülleriana), y otros como el gen codificante para la proteína de señalización *Dhh* (del inglés, *Desert hedgehog*), la *Vnn1* (*Vanin 1*), y la *Cbln4* (del inglés, *Cerebellin 4 Precursor*) (Brennan & Capel, 2004; Brennan et al., 2003; Eggers et al., 2014; Nagahama et al., 2021; Wilhelm et al., 2007; Yao et al., 2002). Una vez que la gónada está diferenciada los genes *Sox9* y *Dmrt1* junto a los andrógenos serán necesarios para mantener el testículo funcional, mientras que por el lado de la gónada femenina

el gen *Foxl2* junto a los estrógenos serán los encargados de mantener al ovario funcional (Capel, 2017; Nagahama et al., 2021).

Algunos de los genes claves mencionados en la diferenciación de mamíferos también son esenciales en otros grupos, *Dmrt1*, *Sox9* y *Amh* junto con los andrógenos, se mantienen en las vías de diferenciación testicular de aves y reptiles. Por otra parte, los genes de la vía canónica *Wnt4*, *Rspo1* y *Ctnnb1* tienen acción directa en la vía de diferenciación ovárica en aves junto a los genes que codifican para factores de transcripción como *Foxl2* o enzimas de la vía de producción de estrógenos como la aromatasa *Cyp19a1* (del inglés, *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*), mientras que en ciertos reptiles los únicos que lideran la diferenciación ovárica son *Foxl2* y *Cyp19a1* a través de la producción de estrógenos (Nagahama et al., 2021).

En peces, la misma diversidad que genera una gran variabilidad en sistemas de determinación, hace que los genes involucrados en la diferenciación sean también muy variables. Las estrategias reproductivas existentes hacen que se planteen diferentes formas de resolver el proceso de diferenciación gonadal. Dentro del grupo existen especies hermafroditas sincrónicas y secuenciales (protogínicas, protándricas), y como se mencionó anteriormente también las hay gonocóricas, es decir que no pasan nunca por un cambio de sexo, y esto lleva a procesos que deben variar para diferenciar el sexo o transdiferenciar el sexo en el caso de los hermafroditas.

En peces gonocóricos, una vez la gónada se diferencia morfológicamente, queda definida de esa manera hasta el final de la vida del individuo (Devlin & Nagahama, 2002), aunque puede ser revertida al menos parcialmente y en forma funcional en algunas especies bajo tratamientos agresivos (Piferrer, 2001) por ejemplo con hormonas esteroideas (Kobayashi et al., 1991; Redding et al., 1987) o con inhibidores de hormonas esteroideas como el fadrozole (Ogawa et al., 2008), lo

que muestra que en etapas diferenciadas existe cierta plasticidad gonadal (Guiguen et al., 2010; Nagahama et al., 2021).

En aquellos peces con determinación del sexo monofactorial, es decir donde actúa un gen maestro, este proceso siempre se desencadena posteriormente a la activación del gen determinante del sexo, por lo que la expresión de este gen será el disparador de los eventos que lleven a la diferenciación sexual (Yamamoto & Luckenbach, 2023). Los genes de la diferenciación gonadal en peces no están completamente dilucidados, sin embargo, algunos de ellos parecen estar conservados dentro del grupo en los procesos de diferenciación femenina y masculina (Siegfried, 2010). Los más relevantes incluso están conservados a nivel evolutivo desde los organismos más simples hasta los más complejos, como ejemplo de esto, se encuentran a los genes de la familia *Dmrt* y *Sox* vinculados al proceso de diferenciación sexual y reproducción incluyendo a los poríferos, cnidarios, artrópodos, y vertebrados (Picard et al., 2021). Las vías de diferenciación sexual han sido sobre todo estudiadas en teleosteos (Kitano et al., 2024; Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008; Yamamoto & Luckenbach, 2023), y en estos también se han identificado ciertos genes que parecen conservarse y ser indispensables para el proceso de diferenciación. Entre ellos aparecen los genes masculinos que codifican para factores de transcripción como *dmrt*, *sox9a/b*, previamente mencionados, así como factores de crecimiento como el *gsdf* (*gonadal soma-derived factor*) y la *amh* (Kitano et al., 2024; Nagahama et al., 2021; Yamamoto & Luckenbach, 2023; Yoshinaga et al., 2004); también genes femeninos entre ellos algunos de la vía canónica como *rspo1* y *wnt4*, factores de transcripción como el *foxl2*, su parólogo *foxl3* (del inglés, *forkhead Box L3*) y el *figla* (Baron et al., 2004; Guiguen et al., 2010; Kitano et al., 2024; Nagahama et al., 2021; Vizziano-Cantonnet et al., 2018; Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Vizziano et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007; Yamamoto & Luckenbach, 2023). Los genes *rspo1* y *wnt4* en particular, participantes en la vía canónica *rspo1*-*wnt4*-*ctnnb1*,

han sido identificados como relevantes para la diferenciación del sexo en una gran cantidad de especies de peces (Nagahama et al., 2021; Yamamoto & Luckenbach, 2023), sin embargo, su accionar en el proceso de diferenciación no es universal para los teleósteos. Además, se ha descripto la activación de enzimas relacionadas con la producción de andrógenos gonadales como la *cyp11c* (del inglés, *cytochrome P450, family 11, subfamily c*) (Blasco et al., 2013; Vizziano et al., 2007) que convierte andrógenos aromatizables en andrógenos 11-oxigenados y la *hsd11b2* (*hidroxiesteroide deshidrogenasa 11-β-2*) que permite la producción de 11-ketotestosterona en futuras gónadas masculinas; así como enzimas involucradas en la producción de estrógenos como la *cyp19a1a* que transforma andrógenos en estrógenos (Guiguen et al., 2010) y la *hsd17b1* (*hidroxiesteroide deshidrogenasa 17β-1*) que transforma estrona en estradiol-17β y que se encuentran activadas especialmente en futuras gónadas femeninas de peces teleósteos (Koyama et al., 2019; Yamamoto & Luckenbach, 2023).

Diferenciación mediada por esteroides

Los esteroides sexuales han sido centro de atención en lo que refiere a la diferenciación gonadal en peces desde hace décadas, momento en que Yamamoto (1969) propone que ellos son los principales controladores de la diferenciación sexual. A partir de allí se realizaron muchos estudios de administración de hormonas esteroideas exógenas, así como estudios de inhibición de enzimas productoras de hormonas sexuales, y finalmente con las nuevas herramientas de biología molecular se ha incursionado en la delección de genes que median la producción de estrógenos (Baroiller et al., 1999; Devlin & Nagahama, 2002; Guiguen et al., 2010; Nagahama et al., 2021; Nakamura et al., 1998; Piferrer, 2001; Piferrer & Guiguen, 2008). Estos experimentos muestran que la administración de estradiol-17β, durante etapas tempranas de indiferenciación en machos induce el desarrollo fenotípico de una gónada femenina, así como la administración de bloqueadores de aromatasa en

etapas de indiferenciación revierte hembras genéticas a machos fenotípicos, formándose finalmente un testículo. De allí que los estrógenos han sido aceptados como los principales mediadores de la diferenciación ovárica en peces teleósteos, teniendo como principal actor al estradiol-17 β , producido por la acción de la enzima aromatasa (codificada por el gen *cyp19a1a*) que utiliza como sustrato a la testosterona (Guiguen et al., 2010; Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008; Yamamoto & Luckenbach, 2023). En este mismo proceso de producción de estrógenos se encuentra la acción de otros genes, uno de ellos es *foxl2* cuya expresión es estimulada por el estradiol y que a su vez regula positivamente a la aromatasa (Guiguen et al., 2010). Otro gen importante en este proceso en el cual se involucran las hormonas sexuales es la *hsd17b1*, este gen también codifica para una enzima que como se mencionó se encarga de producir estradiol, en este caso el sustrato que utiliza es la estrona (Mindnich et al., 2004) que a su vez se forma por acción de la aromatasa por medio de la conversión de androstenediona en estrona. La acción de estos genes para la producción temprana de estrógenos se ha visto involucrada en la diferenciación ovárica para la mayoría de teleósteos, mostrando que los estrógenos endógenos son los principales actores en este complejo proceso (Guiguen et al., 2010; Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008; Yamamoto & Luckenbach, 2023). Sin embargo, como sucede normalmente en la biología, ciertas especies parecen escapar a esta regla, por ejemplo, para algunas de ellas se observa una activación de la aromatasa y por lo tanto una producción diferencial de estrógenos posterior al período de diferenciación de la gónada (Brown et al., 2022; Imarazene et al., 2021; Kawahara & Yamashita, 2000; Zhou et al., 2016), por lo que en estas especies habría una vía independiente a la acción de hormonas estrogénicas para llevar adelante la diferenciación ovárica (Kitano, 2018). Más allá de lo mencionado, aún quedan muchas especies por estudiar, entre las que están aquellas con aparición evolutiva más temprana como por ejemplo el esturión, una especie que está ubicada a nivel filogenético por fuera del grupo de los teleósteos (Grande & Bemis, 1996).

En lo que refiere a la diferenciación sexual masculina no queda claro que los esteroides sexuales masculinos sean los principales controladores de la diferenciación testicular (Yamamoto & Luckenbach, 2023), ya que en muchas especies no se observa una producción de andrógenos endógenos durante el período ventana de diferenciación molecular del sexo, sin embargo se ha visto por ejemplo en tilapias y lenguado japonés, que la administración exógena de andrógenos 11 oxigenados durante la diferenciación molecular del sexo son suficientemente potentes para generar la reversión de una hembra genotípica a un macho fenotípico desarrollando un testículo funcional (Kitano et al., 2000; Kobayashi et al., 2008). Se postula para diferentes especies, que la diferenciación testicular podría estar dada por la falta de estrógenos en el ambiente de desarrollo gonadal y no por una producción de andrógenos endógenos (Yamamoto & Luckenbach, 2023). Sin embargo, hay otras especies como la trucha arco iris y el pejerrey que muestran una producción de andrógenos muy temprana durante el período de indiferenciación gonadal, mediada por la acción de la enzima *cyp11c* que se encarga de transformar androstenediona en 11 β -hidroxiandrostenediona, y la testosterona en 11 β -hidroxitestosterona (Blasco et al., 2013; Vizziano et al., 2007).

Diferenciación no esteroidea

Como se mencionó anteriormente algunos peces se diferencian sexualmente mediante una vía no esteroidea, esto quiere decir que previo a que se observe una diferenciación de la gónada hacia un ovario o un testículo, y durante la ventana de diferenciación molecular no hay presencia de esteroides sexuales en el ambiente en el que la gónada se diferencia. En mamíferos, en los cuales la diferenciación gonadal se produce sin acción directa de esteroides sexuales, se ha descrito a la vía *Rspo1-Wnt4-Ctnnb1* como fundamental en el proceso. Es interesante remarcar que el medaka (*Oryzias latipes*), un pez cuya diferenciación sexual femenina se produce en forma independiente a los estrógenos también utiliza esta vía canónica *rspo1-wnt4-ctnnb1* que se activa para que el ovario

se desarrolle correctamente (Kawahara & Yamashita, 2000; Zhou et al., 2016). Esta vía de diferenciación ha sido poco estudiada en peces, pero los antecedentes la hacen lo suficientemente relevante ya que tiene un rol fundamental en algunas especies, y por lo tanto también debe ser tomada en cuenta como una posible vía de diferenciación con relevancia en peces basales de los que aún queda mucho por saber de este proceso. Esta misma vía también se mostró como fundamental para la diferenciación femenina en otro teleósteo muy usado a nivel de laboratorio como lo es el zebrafish (*Danio rerio*), en donde la inhibición de la vía de señalización *Wnt*, como parte de la vía canónica de interés lleva a un aumento en la proporción de machos y una represión de la expresión de genes clásicos femeninos (Sreenivasan et al., 2014).

Introducción a los Acipenseriformes

Generalidades de los esturiones

Existen muchas especies de esturiones, en total se contabilizan 25 aún vivas además de varias ya extintas. Los esturiones son Actinoptergios basales y se clasifican en la subclase Chondrostei, donde se encuentra el orden de los Acipenseriformes y la familia Acipenseridae que agrupa a los llamados “esturiones reales” (dentro del grupo Acipenseriformes también encontramos los peces espátula, familia Polydontidae). Las 25 especies de esturiones mencionadas se dividen a su vez en cuatro géneros (*Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* y *Pseudoscaphirhynchus*), donde el género *Acipenser* es el que reúne a la mayoría de las especies del orden (Tabla 2) (Bemis & Kynard, 1997).

Tabla 2. Especies de esturiones existentes, se presenta su nombre científico, nombre común, y la distribución más común conocida para cada una de ellas. Las especies extintas no han sido incluidas.

Nombre Científico	Nombre Común	Distribución mayoritaria de poblaciones salvajes
<i>Acipenser baerii</i>	Esturión Siberiano	Ríos y lagos de Siberia
<i>Acipenser brevirostrum</i>	Esturión de Nariz Corta (hociquicorto)	Costa Este de América del Norte
<i>Acipenser dabryanus</i>	Esturión del Yangtsé	Río Yangtsé, China
<i>Acipenser fulvescens</i>	Esturión de Lago	Grandes Lagos y ríos de América del Norte
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Esturión Ruso	Mar Caspio, Mar Negro, y ríos adyacentes
<i>Acipenser medirostris</i>	Esturión Verde	Costa Oeste de América del Norte
<i>Acipenser mikadoi</i>	Esturión del Sakhalin	Rusia y Japón
<i>Acipenser naccarii</i>	Esturión Adriático	Ríos de la cuenca del Adriático
<i>Acipenser nudiiventris</i>	Esturión Bastardo	Mar Caspio, Mar Negro, y ríos adyacentes
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	Esturión del Atlántico	Costa Este de América del Norte
<i>Acipenser persicus</i>	Esturión Persa	Mar Caspio
<i>Acipenser ruthenus</i>	Esturión Esterlet	Ríos del Mar Negro, Mar Caspio y Mar de Azov
<i>Acipenser schrenckii</i>	Esturión del Amur	Río Amur, China y Rusia
<i>Acipenser sinensis</i>	Esturión Chino	Ríos del Este de China
<i>Acipenser stellatus</i>	Esturión Estrellado	Mar Caspio, Mar Negro y Mar de Azov
<i>Acipenser sturio</i>	Esturión Común	Ríos de Europa Occidental
<i>Acipenser transmontanus</i>	Esturión Blanco	Costa Oeste de América del Norte
<i>Huso dauricus</i>	Kaluga	Río Amur, China y Rusia
<i>Huso huso</i>	Beluga	Mar Caspio y Mar Negro
<i>Pseudoscaphirhynchus kaufmanni</i>	Esturión del Sir Daria	Río Sir Daria, Asia Central
<i>Pseudoscaphirhynchus hermanni</i>	Esturión del Amu Daria	Río Amu Daria, Asia Central
<i>Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi</i>	Esturión del Daria	Río Amu Daria, Asia Central
<i>Scaphirhynchus albus</i>	Esturión Pálido	Río Missouri y Río Mississippi, EE.UU.
<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	Esturión Shovelnose (Nariz de pala)	Río Mississippi y sus afluentes, EE.UU.
<i>Scaphirhynchus suttkusi</i>	Esturión de Alabama	Río Mobile y afluentes, Alabama, EE.UU.

Historia vida de los esturiones

La aparición de los esturiones esta datada de hace al menos 200 millones de años (Bemis et al., 1997) es decir del período Jurásico Temprano, información corroborada gracias a los registros fósiles encontrados (Figura 1). Estos indican que los esturiones estaban asociados a Laurasia y su aparición habría surgido en la región conocida como el Mar de Tethys, para luego dispersarse, y posteriormente a la separación de los continentes alcanzar una distribución que abarca hoy en día todo el hemisferio norte (América del Norte, Europa y Asia). Las regiones identificadas con el establecimiento de poblaciones salvajes son: en Norte América, la región de los Grandes Lagos, la costa oeste de Norte América (Pacífico), el río Mississippi y Golfo de México y la costa este de Norte América (Atlántico). Por otro lado, encontramos la costa atlántica de la península ibérica, la región Ponto-Caspiana (Mar Mediterráneo, Mar Negro, Mar de Azov y Mar Caspio); Siberia y Océano Ártico; el Río Amur, Mar de Ojotsk y Mar de Japón, y finalmente la región del este de China (Ruban, 2018). Las regiones nombradas anteriormente fueron caracterizadas en base a los datos obtenidos del estudio de los ríos que los esturiones utilizan para su reproducción, es decir, tomando como la unidad biogeográfica de mayor importancia para las diferentes especies a las zonas de desove (Bemis & Kynard, 1997; Grande & Bemis, 1996). Las poblaciones también han sido definidas a nivel filogenético en diferentes clados: el clado de esturiones de mar (*Acipenser sturio* y *Acipenser oxyrinchus*), el clado de esturiones *Scaphirynchus*, el clado de los esturiones del Pacífico, y el clado de los esturiones del Atlántico (Peng et al., 2007; Rajkov et al., 2014).

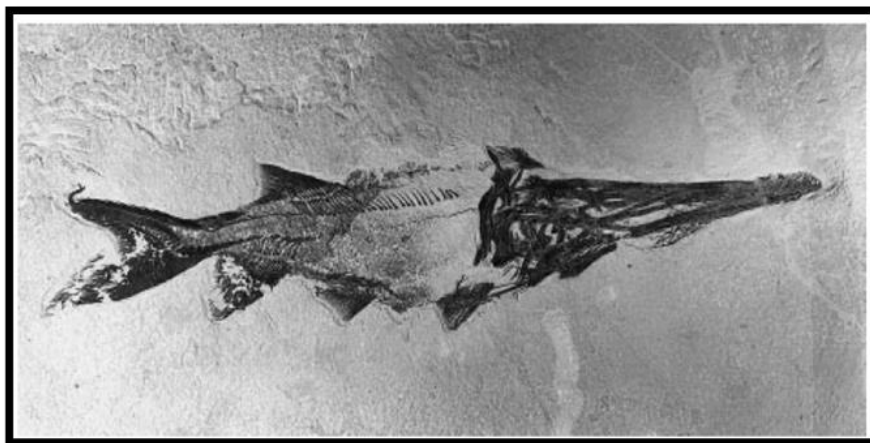


Figura 1. Imagen de un fósil de un Acipenseriforme, registrado en la formación "Green River" (Imagen obtenida de Grande & Bemis 1991)

Según estudios realizados sobre las historias de vida de los esturiones, las diferentes especies realizan distintos tipos de migraciones, teniendo como objetivo la alimentación, y la reproducción que se produce siempre en agua dulce (ríos) (Heublein et al., 2009; Paragamian & Kruse, 2001). Las migraciones río abajo ocurren durante el período de búsqueda de alimento, ya que este es más abundante en zonas estuarinas, mientras que las migraciones río arriba las realizan para encontrar las zonas de desove. Las mismas zonas de desove serán utilizadas en cada período de puesta ya que son las elegidas por tener las condiciones físicoquímicas que les aseguran un mejor éxito reproductivo (Wirgin et al., 1997).

Los esturiones son peces migratorios que presentan patrones variados entre grupos. Los diádromos migran entre zonas de agua dulce y de agua salada (McDowall, 1992; McDowall, 1988), dentro de ellos clasificamos por un lado a los anádromos que son aquellos que pasan la mayor parte de su vida en el mar e ingresan a zonas de agua dulce como los ríos al momento de la reproducción, (McDowall, 1992; McDowall, 1988; Myers, 1949) como lo hacen las especies de género *Huso* (McEnroe & Cech Jr, 1987). Por otro lado, están los anfidromos, cuyas migraciones son desde agua dulce hacia agua salada o a la inversa, pero sin tener como objetivo final la reproducción (McDowall, 1992). Existe una única especie confirmada como anfidroma, se trata del esturión hociquicorto

(*Acipenser brevirostrum*) (Billard & Lecointre, 2000; Kynard, 1997). Finalmente están los potádromos, estos realizan migraciones únicamente entre cuerpos de agua dulce (Quiros & Vidal, 2000). Dentro de los esturiones, aquellos del género *Scaphirhynchus* tienen este tipo de patrón migratorio (Bemis et al., 1997) (Figura 2).

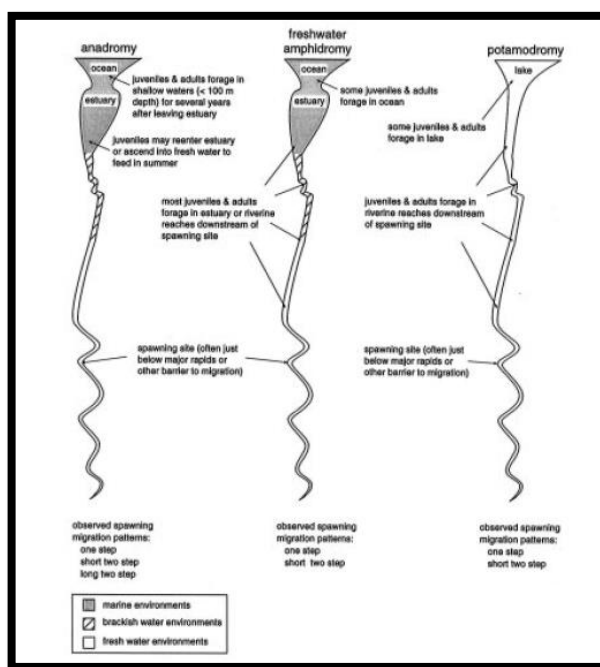


Figura 2. Esquema explicativo de patrones migratorios de peces anádromos, anfídromos y potádromos. (Imagen obtenida de Bemis & Kynard, 1997)

Este grupo filogenéticamente basal ha sufrido mínimas alteraciones a lo largo del tiempo y por eso se los conoce comúnmente como fósiles vivos, y los convierte en especies sumamente atractivas para estudios básicos a nivel evolutivo. Muchas características fenotípicas y genotípicas los diferencian de los peces modernos (teleósteos), y también entre las especies de *Acipenseriformes*. Entre las características más importantes marcando diferencias con los peces teleósteos está la gran cantidad de cartílago que posee su esqueleto, sin embargo, se cree que su antepasado fue un pez óseo y que los esturiones llegaron a tener esta condición por procesos

evolutivos que llevaron a reducción del esqueleto osificado (Bemis et al., 1997; Vecsei & Peterson, 2004).

Como mencionamos anteriormente la familia Acipenseridae reúne un gran conjunto de especies (25), y en ellas se refleja la variabilidad en la historia de vida de los diferentes grupos. A nivel fenotípico y como características principales los esturiones son peces que comparten un cuerpo alargado con la parte inferior de la cabeza, vientre, y aletas pectorales y pélvicas aplanadas, estas características son útiles para estos peces que se suelen posar sobre los lechos de los ríos que habitan. La cabeza de los esturiones tiene una morfología muy característica, poseen un *rostrum*, es decir una prolongación de la cabeza que puede ser más o menos ahusada dependiendo de la especie, ambiente donde se encuentre y de la alimentación más común para cada una. Todos cuentan con bocas protráctiles y falta de dientes. El género *Huso* y las especies que este agrupa; *Huso huso* y *Huso dauricus* (comúnmente conocidos como Beluga y Kaluga respectivamente) son cazadores y se alimentan de peces, por lo que tienen la boca en una posición frontal, el resto de los Acipenseriformes tienen la boca ubicada en la parte inferior de la cabeza, y se alimentan de organismos del fondo. Además, todos cuentan con cuatro barbas posicionadas por delante de la boca, estas son órganos que tienen como función censar el ambiente y ayudar al esturión a conseguir alimento. Todos los esturiones cuentan con una serie de escudos de origen óseo que están distribuidos en forma longitudinal a su cuerpo en cinco filas, una dorsal, dos laterales y dos ventrales y todas las especies cuentan con cola heterocerca (Bemis et al., 1997; Bemis & Kynard, 1997).

Entre las diferencias más notables que podemos encontrar dentro del grupo de los Acipenseriformes, están los tamaños y edades de madurez reproductivas de las diferentes especies, que cubren un rango muy amplio. Los esturiones son organismos longevos, que pueden alcanzar por lo general grandes tamaños y tienen un desarrollo lento, esta última característica los hace

especialmente interesantes para estudiar procesos de diferenciación sexual. Los registros de diferentes especies han identificado individuos en la región Ponto-Caspiana (para el caso del esturión Beluga) con una talla máxima de 8,5 metros de largo total y 1300 kg de peso máximo. Mientras tanto otras especies como el esturión enano (*Pseudoscaphirhynchus hermanni*) o el esturión de Amur Darya (*Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*) apenas alcanzan los 30 o 40 cm de largo total y un peso máximo de 3 kg. Más allá de estas especies mencionadas, que son las de mayor y menores tamaños, el resto de ellas tienen medidas y pesos que varían dentro de este rango (Billard & Lecointre, 2000). Los tiempos que tardan las diferentes especies para llegar a la madurez sexual también es muy variable, se ha registrado para el esturión Beluga que las hembras alcanzan su pubertad en estado salvaje en el río Volga entre los 19 y 22 años, mientras que los machos entre los 14 y 16 años. El *Acipenser brevirostrum* es el que tiene una madurez más temprana alcanzado este estado entre 4 y 6 años para las hembras y entre los 2 y 3 años para los machos. También se ha observado que en condiciones de cultivo estos tiempos pueden variar drásticamente, este es el caso por ejemplo para el *Acipenser baerii* (esturión siberiano), que en el río Ob llega a la pubertad entre los 11 y 13 años o entre los 9 y 18 años para machos y hembras respectivamente. Sin embargo, en las plantas de acuicultura se ha logrado adelantar su pubertad a períodos de 3 a 4 años para los machos y 7 a 8 para las hembras (Billard & Lecointre, 2000), en Uruguay se ha conseguido tener hembras en pubertad a los 5 años de edad (Ryncowski, no publicado).

La variabilidad en los tamaños del genoma de las diferentes especies también es algo que llama la atención dentro de este grupo. Los estudios citogenéticos mostraron cariotipos que resultan muy variables. Justamente mediante el estudio del cariotipo se han caracterizado mayormente tres grupos, uno diploide con $2n=120$ cromosomas, otro $4n=240$ y el último caracterizado con una

ploidía 6n, con hasta 372 cromosomas, esto hace que sus genomas sean muy grandes y extremadamente complejos (Havelka et al., 2011).

Ante las 25 especies de esturiones componiendo la familia Acipenseridae, es importante tener en cuenta que el estado de conservación es delicado, la mayoría de sus especies están amenazadas según los estándares de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) lo que supone el riesgo de una posible extinción de muchas de ellas (Holčík, 1989; IUCN, 2015; Williot et al., 2002). Algunas de las causas que llevaron y aún continúan causando esta situación son la sobrepesca, la contaminación de ríos con pesticidas y metales pesados y la construcción de represas que impiden que se produzcan las migraciones reproductivas (Bacalbasa-Dobrovici, 1991; Bacalbaşa-Dobrovici, 1997; Krüger & Pudenz, 2002; Wei et al., 1997). Se realizaron campañas de repoblación y conservación y se han encontrado resultados alentadores para algunas de las especies con las que se trabaja, sin embargo, más allá de estos esfuerzos el estatus conservación de las especies de este grupo aún no ha mejorado (Arlati et al., 2001; Congiu et al., 2023; Daskin & Tilman, 2022).

Producción de acuicultura

La acuicultura de esturiones es una industria pequeña dedicada a la producción de caviar (que son ovocitos en estadio previo a la maduración final) y de carne. La producción de caviar ocurre en muchos países, entre ellos se destacan Rusia, Italia, Francia, Estados Unidos y China. En el hemisferio sur se destaca el Uruguay como el primer productor de caviar y se encuentra posicionado en el noveno lugar a nivel mundial (Figura 3).

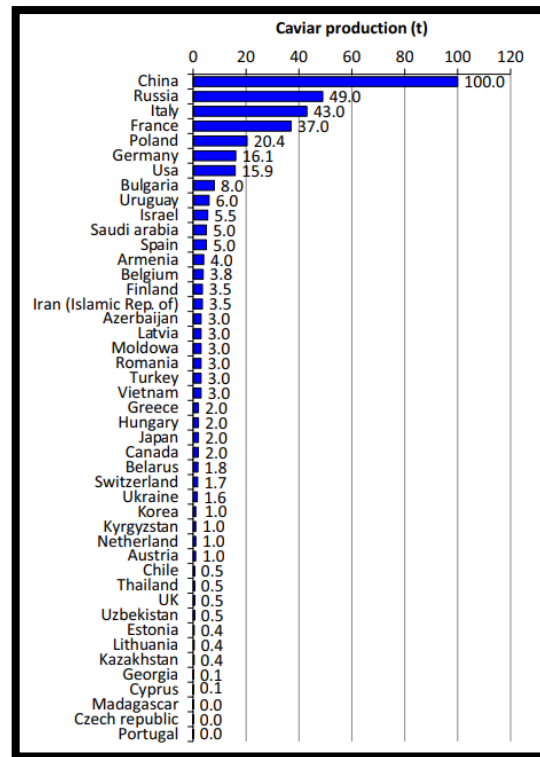


Figura 3. Países con mayor producción legal de caviar a nivel mundial. La producción se muestra en toneladas (t). Uruguay se posicionó en el año 2017 en noveno lugar con 6 toneladas. (Figura tomada de Bronzi et al., 2019)

El cultivo del esturión Siberiano con una producción mundial de ~27.500 toneladas por año (Chebanov & Williot, 2018), se considera una producción artesanal cuando se compara con otras industrias de piscicultura por ejemplo la de salmónidos o tilapia (Tvetaras, 2016). Sin embargo, el crecimiento de la acuicultura de esturión ha aumentado en forma muy marcada durante las últimas décadas debido al estímulo de producción de caviar, la disminución de la pesca y el aumento de protección de las poblaciones de esturiones en estado salvaje (Bronzi et al., 2019).

En Uruguay existen dos emprendimientos que producen caviar situados en el Río Negro. El primero fue situado en la represa de Baygorria (Durazno) y el segundo, más reciente, está situado en el lago de la represa del Rincón del Bonete en la localidad de San Gregorio de Polanco (Tacuarembó). Estos emprendimientos se enfocan sobre todo en la producción de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), y esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Ambos han prosperado debido

a la existencia de ríos similares a los que se observan en Rusia (en cuanto al ambiente), y a factores como la temperatura, que siendo más cálidas que en la zona de donde son originarios los esturiones, se ha visto que favorece una maduración sexual en períodos más cortos que en otros países donde se realiza el cultivo con temperaturas más frías (Francia, Italia, Rusia).

El crecimiento de la industria se conecta con el desarrollo de investigación científica de calidad, que busca obtener información básica y resolver los problemas que enfrentan los productores. Uno de los puntos de interés del sector productivo tiene que ver con la posibilidad de realizar sexado temprano y controlar el sexo del esturión siberiano. Para ello es necesario por un lado lograr identificar marcadores del sexo y por el otro comprender los mecanismos de determinación y diferenciación sexual de la especie. Esto permitirá tener las herramientas teóricas para, por ejemplo, ser capaces de invertir el sexo de los peces con el fin de generar a largo plazo poblaciones monosexo genéticas.

Modelo de estudio: El esturión siberiano *Acipenser baerii*

El *Acipenser baerii*, especie que se utiliza como modelo de estudio en este trabajo, forma parte del grupo anteriormente descrito. Sus poblaciones naturales habitan la región de la Siberia. Comparte la mayoría de sus características morfológicas mencionadas con el resto de los esturiones, alcanzan grandes tallas y pesos elevados pudiendo llegar a 3 metros de largo y 200 kg de peso (Billard & Lecointre, 2000). La madurez sexual en estado salvaje se produce entre los 11 y 13 años para los machos y entre los 9 y 12 años para las hembras en río Ob (Ruban, 2018), aunque varía mucho según el registro y la región específica que habitan. Las hembras de la población con un período de madurez más tardío son las del Lago Baikal y lo alcanzan entre los 26 y 34 años de vida (Ruban, 2018). Es interesante que esta especie en particular, muy utilizada para cultivo y producción de caviar tiene una gran capacidad de adaptarse a distintos climas y es por ello que se cultiva en 50

países incluyendo al Uruguay (Williot & Chebanov 2018) donde se ha adaptado bien a las condiciones de criadero y se ha logrado bajar el período de madurez sexual a mínimos de 5 años de edad en Uruguay (Rynkowski, no publicado).

Antecedentes de estudios de determinación y diferenciación del sexo en esturiones

Los estudios filogenéticos utilizando datos moleculares muestran que el *Acipenser baerii* forma parte de los esturiones Atlánticos (también llamados Ponto-Caspianos), y que está precedido por tres rondas de duplicación completa del genoma (Mugue & Barmintseva, 2018; Peng et al., 2007; Rajkov et al., 2014) que explican su ploidía $4n$ y el gran peso de su genoma de 8,3 pg (Bytyutskyy et al., 2012; Zhou et al., 2011), duplicando el peso del genoma de un pez diploide como el zebra fish (*Danio rerio*) y de varias otras especies de esturión (Lamatsch et al., 2000). El tamaño de su genoma se ve reflejado en su cariotipo con una gran cantidad de cromosomas (246 ± 8) que además son homomórficos, es decir donde no se distinguen los cromosomas sexuales (Fontana, 1994), características que dificultan los estudios de determinación del sexo.

En lo que respecta justamente a la determinación y diferenciación sexual en esta especie basal en particular y otros esturiones, diversos estudios a nivel genético se han realizado a lo largo de los años sin poder esclarecer cual es el modo en que determinan su sexo. Los estudios de ginogénesis han aportado las pistas más claras, y estas sugieren que poseen un mecanismo de determinación sexual genético de tipo ZZ/ZW (Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Omoto et al., 2005; Saber & Hallajian, 2014; Van Eenennaam et al., 1999), es decir con hembras heterogaméticas. Sin embargo, este tipo de determinación del sexo no se ha demostrado formalmente. La comprobación formal implica la inversión hormonal sexual y el cruzamiento con individuos normales con el fin de analizar los porcentajes de machos y hembras de la progenie. El tipo de determinación del sexo postulada en esta tesis es que se trata de un sistema similar al sistema de

determinación del sexo en mamíferos, pero con un gen maestro femenino, similar al que se da en la especie *Xenopus laevis* con su gen determinante *dm-W* (Yoshimoto et al., 2008; Yoshimoto et al., 2010). El gen maestro se expresaría en forma temprana durante el período de diferenciación molecular del sexo y daría lugar luego a una red de expresión génica que controla la diferenciación de los distintos tipos celulares. La publicación en 2021 de un marcador genético femenino (Kuhl et al., 2021) apoya esta idea. Más allá de esto, siguiendo esta hipótesis aún no ha sido posible encontrar un gen determinante femenino ligado al cromosoma W en los esturiones.

El período de diferenciación sexual del esturión siberiano, como en otras especies, es prolongado, de varios meses (Vizziano-Cantonnet et al., 2016), lo que lo convierte en un excelente modelo para el estudio de esta temática en particular. Nosotros postulamos que es lo suficientemente extenso como para permitir registrar con detalle la modulación de los genes vinculados a la red molecular del proceso de diferenciación durante varios puntos temporales del período. Cuando se inició este trabajo de tesis las primeras señales morfológicas de diferenciación se podían observar alrededor los 8 meses de edad (Vizziano-Cantonnet et al., 2016), sin embargo, esto varía según las especies y el país donde se las cultiva (Chen et al., 2006; Grandi & Chicca, 2008; Rzepkowska & Ostaszewska, 2013). A su vez las primeras señales moleculares de diferenciación sexual fueron reportadas entre los 3 y los 4 meses basados en la activación de genes candidatos masculinos (*dmrt1*, *amh*, *sox9*, *ar*), femeninos (*foxl2*) y relacionados con la producción de esteroides (*cyp17a1*, *cyp19a1*) (Vizziano-Cantonnet et al., 2016), elegidos de la literatura de peces teleósteos que introdujimos previamente. Sin embargo, y pesar de observar una activación de todos estos genes en el período de indiferenciación gonadal, en ese momento fue imposible determinar cuales se activaban en las gónadas de futuras hembras y cuales lo hicieron en futuros machos. Previo al inicio de esta tesis contábamos con un primer transcriptoma gonadal del esturión siberiano conteniendo estadíos

indiferenciados en varios puntos temporales dentro del período de diferenciación sexual (Vizziano-Cantonnet et al., 2018). En ese trabajo se identificaron 72 genes sobre regulados en futuras hembras de 5 a 6 meses de edad en comparación con futuros machos de 5 a 6 meses de edad, teniendo especial relevancia *aromatasa*, *foxl2*, es decir aquellos que se vinculan directamente con la producción de estrógenos mediante una retro regulación positiva (Guiguen et al., 2010). También se observó en ese primer transcriptoma, aunque no se publicó en aquel momento, la activación de la enzima *hsd17b1*. De modo que cuando esta tesis comenzó se manejaba la idea de que había tres genes potencialmente femeninos (*cyp19a1*, *foxl2*) fundamentado en las muchas publicaciones en peces teleósteos y en la activación observada en hembras potenciales de 5 y 6 meses y un gen involucrado en la vía de síntesis de estrógenos (*hsd17b1*) para el cual no había publicaciones en aquel momento. A su vez se habían descrito, pero no se habían validado por qPCR un conjunto de genes sobre expresados en futuros ovarios de animales de 5 y 6 meses de edad. En un trabajo complementario se estudiaron las tendencias de expresión de *cyp19a1* y de *foxl2* en poblaciones mixtas sin sexar por falta de un marcador del sexo, de 3, 4, 5 y 6 meses (Vizziano-Cantonnet et al., 2018). Los resultados mostraron una cierta coherencia en animales que presentaron una activación en estos dos genes femeninos, y por ello se empezó a considerar la idea de que la *cyp19a1* y el *foxl2* eran potenciales marcadores femeninos a nivel gonadal.

Estrategia experimental

En ausencia de un marcador del sexo se iniciaron estudios de la expresión por qPCR de un conjunto de genes potenciales femeninos identificados en el trabajo de transcriptómica previo (*cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *ix3*, *irx5*, *lhx2*) (Vizziano-Cantonnet et al., 2018), pero centrándonos en todo el período de diferenciación molecular del sexo, en gónadas de peces de 3 a 6 meses de edad. Al no contar con marcadores del sexo se aplicaron métodos estadísticos para identificar el sexo de

las futuras hembras a partir de los tres meses de edad, utilizando los patrones de expresión génica (Capítulo 1, Artículo 1 Lasalle et al., 2021a).

Más allá de ese primer avance, la ausencia de un marcador del sexo era una traba importante para poder profundizar en el estudio de los genes involucrados en diferenciación sexual. Eso nos impulsó a la búsqueda de un marcador del sexo usando la metodología de secuenciado del ADN genómico mediante RAD-sequencing (del inglés, Restriction Site Associated DNA sequencing) y la construcción de una base de marcadores SNPs en la cual se buscó la asociación de ciertos SNPs con el sexo femenino heterocigoto (ZW) (Capítulo 2, Lasalle et al. 2021a).

A fines de 2021 se publica un marcador genético del sexo (Kuhl et al 2021) y eso permitió iniciar estudios de validación de los datos obtenidos por nuestro grupo de investigación. Es así que se eligen genes candidatos femeninos, genes relacionados con la esteroidogénesis y genes candidatos masculinos y se estudian por qPCR durante el período de diferenciación molecular del sexo (2,5 a 6 meses de edad). Los genes masculinos forman parte de la tesis de Maestría del Lic. Germán Benech, pero fueron publicados en conjunto con los genes candidatos femeninos. Esto constituyó el Capítulo 3 de esta tesis (Lasalle et al., 2024). Este último trabajo permitió hipotetizar que la activación del gen determinante del sexo y de los genes de la diferenciación sexual temprana ocurren entre la formación de la gónada, alrededor del mes de edad, (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013) y los 2,5 a 3 meses de edad.

Para tener una visión amplificada del panorama molecular durante la diferenciación del sexo, más allá de lo que se pudo obtener con la estrategia gen candidato, nos embarcamos en la tarea de obtener ARN de muy alta calidad para secuenciar y realizar un transcriptoma gonadal de machos y hembras en la etapa más incipiente conocida de la diferenciación sexual. A pesar de que las gónadas son muy pequeñas en estas edades tempranas y la obtención de ARN de cada una de ellas era un

paso crítico de fundamental importancia, se lograron colectar gónadas de 2,5 meses de edad de individuos sexados (6 machos y 6 hembras) y realizar un transcriptoma de excelente calidad. Esto permitió comparar la expresión génica de machos y hembras en forma global en el estadio de diferenciación del sexo más temprano hasta el momento (Capítulo 4).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

De los antecedentes expuestos sobre la temática se plantean las siguientes hipótesis:

- Los genomas de machos y hembras están diferenciados (ZZ/ZW) y por lo tanto existe un marcador del sexo.

- Los estrógenos son los reguladores de la diferenciación del sexo en el *A. baerii*.

Objetivo general

- Identificar un marcador genético del sexo.

- Determinar que genes están directamente involucrados en la diferenciación sexual femenina del esturión siberiano.

Objetivos específicos

Objetivo 1.- Generar una herramienta que permita identificar poblaciones de potenciales hembras y potenciales machos mediante el estudio de la expresión de genes del programa femenino (*cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *ix3*, *irx5*, *lhx2*) utilizando qPCR durante el período de diferenciación molecular del sexo (Capítulo 1).

Objetivo 2.- Buscar un marcador genético del sexo utilizando datos de RAD-seq obtenidos por secuenciado masivo (Capítulo 2).

Objetivo 3.- Caracterizar el programa femenino en individuos indiferenciados sexados genéticamente, a nivel molecular durante el período completo de la diferenciación molecular del sexo (Capítulo 3a).

Objetivo 4.- Determinar el efecto de los esteroides sexuales sobre los genes involucrados en la diferenciación femenina (Capítulo 3b).

Objetivo 5.- Utilizar la transcriptómica en el período más temprano de la ventana de diferenciación molecular para identificar los genes que inician el proceso de diferenciación femenino y masculino, e identificar un potencial gen determinante del sexo (Capítulo 4).

Capítulo 1:

Identificación del sexo de esturiones siberianos morfológicamente indiferenciados mediante el análisis estadístico de los patrones de expresión génica

Resumen

El propósito de este estudio fue generar una estrategia simple para determinar el sexo de peces morfológicamente indiferenciados, mediante el uso del análisis estadístico de patrones de expresión génica gonadal caracterizados por PCR cuantitativa. Este enfoque es especialmente relevante para especies en las cuales no se conozcan marcadores genómicos de sexo. El método fue desarrollado para la identificación temprana de hembras de esturión siberiano como parte de un estudio genómico. Ese estudio mostró la activación del gen que codifica para la enzima *hsd17b1* (17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa) en futuros ovarios a los tres meses de edad, junto con un pequeño pico del gen que codifica para el factor de transcripción *foxl2* y la expresión emergente de la enzima que codifica para la aromatasa (*cyp19a1*). Los mayores picos de *cyp19a1* y *foxl2* se dieron en presuntas gónadas femeninas a los 5-6 meses. Este patrón sugiere un relé genético que media la producción de estrógenos a lo largo de la diferenciación, posiblemente para mantener la feminidad gonadal. Los genes involucrados en la proliferación de células madre *lhx2* (del inglés, *lim homeobox 2*) y el mantenimiento de la interacción entre células somáticas y germinales *irx5* o *irx3* (del inglés, *iroquois homeobox 5* e *iroquois homeobox 3* respectivamente) también se expresaron durante la diferenciación molecular, a los 5-6 meses. Los roles de *lhx2*, *irx3* e *irx5* en la diferenciación sexual de peces deben confirmarse utilizando otras metodologías. Estos resultados sugirieron fuertemente que los estrógenos son cruciales para la diferenciación ovárica de esturiones, que son peces no teleósteos basales, siendo consistentes con patrones bien establecidos en teleósteos. La *hsd17b1* aparece como uno de los primeros biomarcadores del desarrollo gonadal.

Sex identification of morphologically-undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns

André Lasalle  | Walter Norbis  | Denise Vizziano-Cantonnet 

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Denise Vizziano-Cantonnet, Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.
Email: vizziano@gmail.com

Funding information

The work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República Oriental del Uruguay (UdelaR), Grant C225-348-Uruguay, and Agencia Nacional de Investigación e Innovación Project FMV_1_2017_1_135908.

Abstract

The purpose of this study was to detail a simple strategy for sexing morphologically-undifferentiated fish using statistical analysis of gene expression patterns characterized by quantitative PCR. This approach is especially relevant for species without known genomic sex markers. The method was developed for early identification of female Siberian sturgeon as part of a genomics study. That study documented activation of the enzyme *17 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase* (*hsd17b1*) in future ovarian tissue at 3 months of age, concurrent with a small *forkhead box L2* (*foxl2*) peak and emerging *cytochrome P450, family 19, subfamily A* (*cyp19a1*) expression. Major *cyp19a1* and *foxl2* peaks occurred in presumptive female gonads at 5–6 months. This pattern suggested a genetic relay mediating estrogen production throughout differentiation, possibly to maintain gonadal femininity. Genes involved in stem cell proliferation (*lim homeobox 2* (*lhx2*)) and somatic-germ cell interaction maintenance (*iroquois homeobox 5* (*irx5*) and *iroquois homeobox 3* (*irx3*)) were also expressed during molecular differentiation, at 5–6 months. The roles of *lhx2*, *irx3*, and *irx5* in fish sex differentiation should be confirmed using other methodologies. These results indicate that estrogens are crucial for ovarian differentiation in basal non-teleost fish, consistent with well-established patterns in teleosts, with *hsd17b1* as one of the earliest biomarkers of gonadal development.

KEYWORDS

gene expression, gonads, real-time qPCR, sex differentiation, sex identification, Siberian sturgeon

1 | INTRODUCTION

Sex identification is a key step in sex determination and differentiation research in fish. These processes are poorly understood in most fish species, partly due to the challenge of identifying sex prior to morphological differentiation. Precocious sex identification is difficult in part because there is no common master gene for sex determination among fish (Capel, 2017; Kikuchi & Hamaguchi, 2013), in contrast to eutherian mammals, which conserve the sex-determining region Y (SRY) gene that triggers the male phenotype (Koopman et al., 1991; Marshall Graves, 2013; Sinclair et al., 1990;

Wilhelm et al., 2007). Moreover, most fish species lack known sexually-differentiated chromosomes or genetic markers (Devlin & Nagahama, 2002; Penman & Piferrer, 2008). These challenges have complicated our molecular genomics research on ovarian differentiation in *Acipenser baerii* Siberian sturgeon.

Comparative studies of the female program in vertebrates have noted that, unlike in mammals, ovarian differentiation in fish depends heavily on the presence of estrogens (Cutting et al., 2013). In mammals, *wingless-type MMTV integration site family, member 4b* (*Wnt4*); *bone morphogenetic protein 2* (*Bmp2*); *forkhead box L2* (*Foxl2*); and *folliculin* (*Fst*) (Brennan & Capel, 2004;

Wilhelm et al., 2007) have been described as crucial factors in female sex determination. Ovarian differentiation is largely independent of steroids in these animals. In contrast, estrogens play a well-documented role in mediating sex differentiation in teleost fish (see reviews by Baroiller et al. (1999), Guiguen et al. (2010), Nagahama et al. (2021) and Piferrer & Guiguen (2008)). *Cytochrome P450, family 19, subfamily A (cyp19a1)*, which codes for the enzyme aromatase, is the most well-studied gene in teleost sex differentiation because of its role in converting androgens into estrogens. In some teleost fish, *cyp19a1* activation is one of the first ovarian markers detectable in the morphologically-undifferentiated gonads of future females. This finding has been replicated in genetic (Ijiri et al., 2008; Vizziano et al., 2007) and temperature-induced (Fernandino et al., 2008) monosex populations. Moreover, inhibiting *cyp19a1* enzyme expression and activity during the key sex-differentiation period has been shown to result in female-to-male sex inversion, underlining the importance of this enzyme and thus the vital role of estrogens in ovarian differentiation (Baroiller et al., 1999; Bhandari et al., 2006; Guiguen et al., 1999; Piferrer et al., 1994; Vizziano et al., 2008). *cyp19a1* and *foxl2* activation are concurrent in teleost fish (Baron et al., 2004, 2005; Ijiri et al., 2008; Vizziano et al., 2007). *cyp19a1* expression is stimulated by *foxl2* (Wang et al., 2007), and estrogen stimulates expression of *foxl2* (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2008) during early ovarian development. The importance of *cyp19a1* and *foxl2* was also confirmed recently in a gene deletion study, where female-to-male gonadal inversion was observed in *foxl2* $-/-$ and *cyp19a1* $-/-$ mutated *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia Zhang et al., 2017). 17 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase (*hsd17b1*), which controls the conversion of estrone into estradiol-17 β , has been studied in the context of sex differentiation in some fish (Hagihara et al., 2014; Ijiri et al., 2008). In particular, recent studies in the genus *Seriola* suggested that the combination of *hsd17b1* alleles determined sex by modulating endogenous estrogens (Koyama et al., 2019). In sum, *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1* have been found to be involved in estradiol production and activated very early during gonadal sex differentiation.

The female genes selected for this study were chosen from a list of activated genes obtained by comparing the gonadal transcriptomes of future female and potential male *Acipenser baerii* (Siberian sturgeon) during the molecular sex differentiation period (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). *cyp19a1* and *foxl2* activation was confirmed at 6 months of age by quantitative PCR (qPCR) after the transcriptomic study (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). In addition, a second independent study using only qPCR showed trends compatible with *cyp19a1* and *foxl2* activation during the female program (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). *cyp19a1a* and *foxl2* were activated along with *hsd17b1* in the Siberian sturgeon prior to morphological sex differentiation (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018), consistent with prior findings in presumptive female *Acipenser gueldenstaedtii* (Russian sturgeon) gonads at 9 months of age (Hagihara et al., 2014). Therefore, we considered *cyp19a1*, *foxl2*,

and *hsd17b1* to be relevant biomarkers of the Siberian sturgeon female program.

Several other genes have been found to be activated concurrently in Siberian sturgeon, including some involved in stem-cell niche interaction (*iroquois homeobox 3 (irx3)* and *iroquois homeobox 5 (irx5)*) (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). These genes have not been studied previously in the context of fish sex differentiation. However, the genes have been shown to be important for mammalian ovarian development, as they sustain the somatic-germ cell interactions crucial for this process (Kim et al., 2011). *irx3*, *irx5*, and *irx6* deletions affect germ cell proliferation and disrupt somatic-germ cell interaction in the ovary (Kim et al., 2011). *lim homeobox 2 (lhx2)* is another gene activated in the Siberian sturgeon ovarian program but not previously studied in this context. This transcription factor plays essential roles in morphogenesis and patterning of ectodermal derivatives, as well as in controlling stem cell activity (Mardaryev et al., 2011). *irx3*, *irx5*, and *lhx2* are likely involved in the development of the stem-cell niche and proliferation of germ cells that precede the germline cysts observed in Siberian sturgeon ovaries (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018).

The classic male markers described in teleost fish, such as *dmrt1*, *sox9*, *amh*, *gsdf*, and *dax1* (Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008) have not been found to be activated in potential Siberian sturgeon males prior to morphological sex differentiation (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). Furthermore, no clear male sex biomarkers have been identified to date for the molecular sex differentiation period in this species. Therefore, we were unable to use male sex biomarkers during the morphologically-undifferentiated stages.

Our hypothesis was that fish showing activation of classic female genes were future females, and those showing repression were future males or undetermined fish.

The present work describes the process we used to classify potential future female Siberian sturgeon prior to morphological differentiation and assess changes in expression of six female genes during the molecular sex-differentiation period.

2 | MATERIAL AND METHODS

Research procedures involving animal experimentation complied with international principles on the use and care of laboratory animals

TABLE 1 Fish characteristics by age (SD: standard deviation)

Age (months)	n	Average length (cm) $\pm$ SD	Average weight (g) $\pm$ SD
3	30	11.95 $\pm$ 0.76	5.95 $\pm$ 1.03
4	30	16.21 $\pm$ 1.61	15.13 $\pm$ 3.8
5	30	23.85 $\pm$ 2.94	36.98 $\pm$ 11.75
6	30	26.83 $\pm$ 3.81	47.14 $\pm$ 19.07

TABLE 2 Primer set used for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product (bp)
<i>cyp19a1</i>	5' GTCCAGCTTCAGACAGGATG 3'	5'AGATGGTGTCTGCAATGTT 3'	164
<i>foxl2</i>	5' TACGAGAAGAACAAGAAAGTTGGCA 3'	5' GTGTTTGTCTGCTGCTCCCA 3'	680
<i>hsd17b1</i>	5' GAGAAGAAGGTGGACATTCTAGT 3'	5' ACCCCTCCACTGCAAATTAC 3'	250
<i>irx3</i>	5' CTTGTACAATTGGTTCACACG 3'	5' CCTCAAAACCAACTGAAGCC 3'	320
<i>irx5</i>	5' GCATCTCCTCGTCACAAATG 3'	5' TGTGCAAAATGCATCACTCA 3'	80
<i>lhx2</i>	5' CGAAACGAATATGCCCTCTA 3'	5' TTCACAACACTTCAAACAGC 3'	132
<i>18S</i>	5' GAGGTGAAATTCTGGACCGG 3'	5' GGTGCCCTTCGTCAATTCC 3'	260

	3 months	4 months	5 months	6 months	Total
3 months	30	0	0	0	30
4 months	0	27	2	1	30
5 months	0	0	30	0	30
6 months	2	0	0	28	30
Total	32	27	32	39	120

TABLE 3 Confusion matrix obtained from the canonical discriminant analysis (see Materials and Methods)

Note: 95.83% of individuals correctly classified to original stage.

TABLE 4 Results of pairwise Bonferroni-corrected Hotelling's tests comparing gene expression by age group (3, 4, 5, and 6 months; prior to morphological differentiation in all cases)

	3 months	4 months	5 months	6 months
3 months		$p < .001$	$p < .001$	$p < .001$
4 months			$p < .001$	$p < .001$
5 months				$p < .001$

Note: p -values $< .05$ reflect significant differences between groups.

and Uruguayan animal welfare regulations (Comisión Honoraria de Experimentación Animal: CHEA). The protocol was approved by the "Comisión de Ética en el Uso de Animales" of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal CHEA of Uruguay (authorization number 240011-002227-16).

2.1 | Animals and sampling

All animals were provided by Estuario del Plata fish farm and reared at natural temperatures (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). Fish were transported to the aquaculture facilities at the Facultad de Ciencias (Universidad de la República Oriental del Uruguay). Sampling of 3-, 4-, 5-, and 6-month-old fish ($n = 30$ per age) was performed in our laboratory at the Facultad de Ciencias. The characteristics of the fish sampled are shown in Table 1.

Sampling was performed under sterile conditions; gonads were extracted and conserved in liquid nitrogen (N_2) to prevent degradation.

After the fish were sampled, tissues were stored at -80°C until the RNA extraction procedure.

2.2 | RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) according to manufacturer instructions. The presence of genomic DNA was verified after RNA purification by PCR using primers for 18S and using RNA as the substrate. Samples with genomic DNA were treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen) and checked again by PCR after the DNase treatment. cDNA synthesis was carried out using 1 μg of total RNA in a 20- μl volume reaction. RNA was denatured in the presence of 200 ng of random primers and 0.5 mM of dNTP for 5 min at 65°C and then chilled on ice. Reverse transcription was performed at 37°C for 50 min using M-MLV RT (Invitrogen) according to manufacturer instructions. The cDNA samples obtained were used to analyze expression of selected genes by qPCR.

2.3 | Quantitative PCR

foxl2 and *18S* primers were validated in a previous work (Vizziano-Cantonnet et al., 2016). The primers used for *cyp19a1*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, and *lhx2* are shown in Table 2 and were designed using the specific gene sequence obtained in the transcriptome study (Klopp et al., 2020; Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). Amplified fragments (qualitative real-time PCR) were validated by inspection on 1% agarose gel and sequencing. The sequence

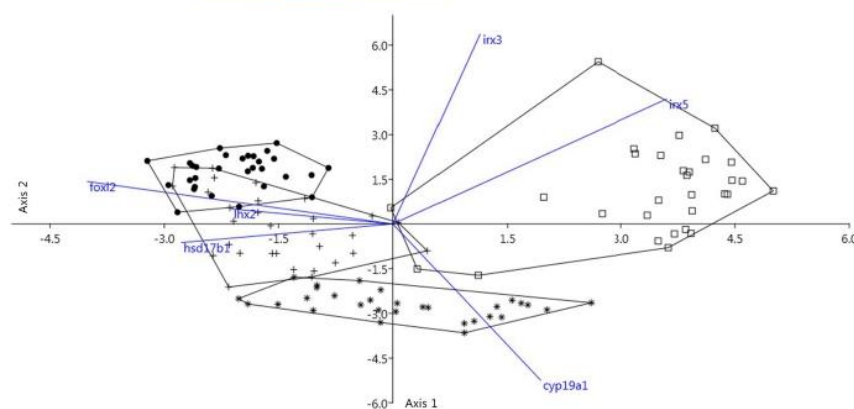


FIGURE 1 Discriminant analysis of 3-, 4-, 5- and 6-month-old fish based on gene expression, measured by real-time PCR (6 genes: *hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*, *irx3*, *irx5*, and *lhx2*). Plus symbols represent 3-month-old fish; white squares represent 4-month-old fish; asterisks represent 5-month-old fish; and black points represent 6-month-old fish. The contribution of the genes to discriminating the resultant groups is shown with blue lines

Age (months)	nMDS (stress value)	Cluster (cophenetic correlation value)	Number of groups	Percentage of fish in each group
3	0.09775	0.77	2	37:63
4	0.1027	0.83	3	23:40:37
5	0.06172	0.80	3	7:27:66
6	0.08124	0.69	2	38:62

Note: Stress values <0.15 indicate that the nMDS provides a very good representation of the dataset, and cophenetic correlation coefficients >0.7 indicate that the cluster provides a good representation of the groups.

TABLE 5 Number of groups produced by ordination (nMDS: nonmetric multidimensional scaling) and classification (cluster analysis) methods based on relative gene expression by age ($n = 30$ fish)

obtained was analyzed using BioEdit software and blasted against the NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and our transcriptome database to confirm sequence identity (Klopp et al., 2020). Validation by melting curve analysis in qPCR was then performed.

Real-time PCR experiments were carried out on an Applied Biosystems instrument (ABI 7500) using 96-well plates. Reactions were performed in a total volume of 12 μ l. Each reaction was constituted by 200 of nM forward and reverse primers, Low ROX, Kapa Sybr Green qPCR Master Mix, and 5 ng cDNA for target genes and 1.6 ng of cDNA for the housekeeping gene. The run method performed was a holding stage at 95°C for 5 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and finally the melting curve stage, at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 30 s, and 60°C for 15 s. The validity of the qPCR experiment was confirmed by checking the melting curves, melting temperatures of the samples, and negative controls. A standard curve was developed for the assay with each gene. The efficiencies were 101% for 18S, 102% for *cyp19a1*, 81% for *foxl2*, 100% for *hsd17b1*, 94% for *irx3*, 94% for *irx5*, and 86% for *lhx2*. Real-time PCR efficiencies (E) and systemizing quotients (SQ) for the reactions were calculated using the formulas: $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ and $SQ = [10^{(\text{Ct-intercept}/\text{slope})}]^{-1}$ (Baron et al., 2005).

Relative gene expression was measured by dividing the SQ of the target gene by the SQ of the reference gene (18S), which was validated for undifferentiated and differentiated gonads in previous works (Berbejillo et al., 2012; Vizziano-Cantonnet et al., 2016).

2.4 | Statistical analysis

2.4.1 | Identification of gene expression patterns by age group

Canonical discriminant analysis (CDA) was used to assess for statistical differences between age groups in terms of expression levels for the selected genes (Manly & Alberto, 2016). Wilk's lambda was used to test the significant differences between groups. Wilks' lambda is a measure of how well each function separates cases into groups. This statistic varies between 0 and 1; smaller values of Wilks' lambda indicate greater discriminatory ability of the function. This statistic follows an asymptotic Snedecor F distribution with the number of groups and variables in the nominator and the degrees of freedom of the dispersion matrices in the denominator (Rao, 1951).

To develop the CDA, we built a matrix with the expression values for the 120 fish used (30 fish at 4 months of age) for the six genes used. Each age group (3-, 4-, 5- and 6-month-old fish) was identified using a specific symbol. The CDA was performed with this matrix using Past3 software (Version 3.26; 2019). The CDA analysis was designed to evaluate for separation of fish into groups based on global gene expression. All fish ($n = 120$) and all selected genes ($n = 6$) were included. The CDA assessed the separation between individuals by stage through canonical and discriminant axes, evaluating for the presence of groups in a multivariate space by maximizing the variation between them (Manly & Alberto, 2016). CDA has been used previously to sex undifferentiated fish in species where genetic sex cannot be determined due

FIGURE 2 Relative *cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, and *lhx2* expression in 3-month-old fish, measured by real-time PCR. Groups were produced with statistical methods (nMDS and cluster analysis, using "Horn's index" in both cases). Different letters indicate significant differences in relative gene expression between groups ($p < .05$)

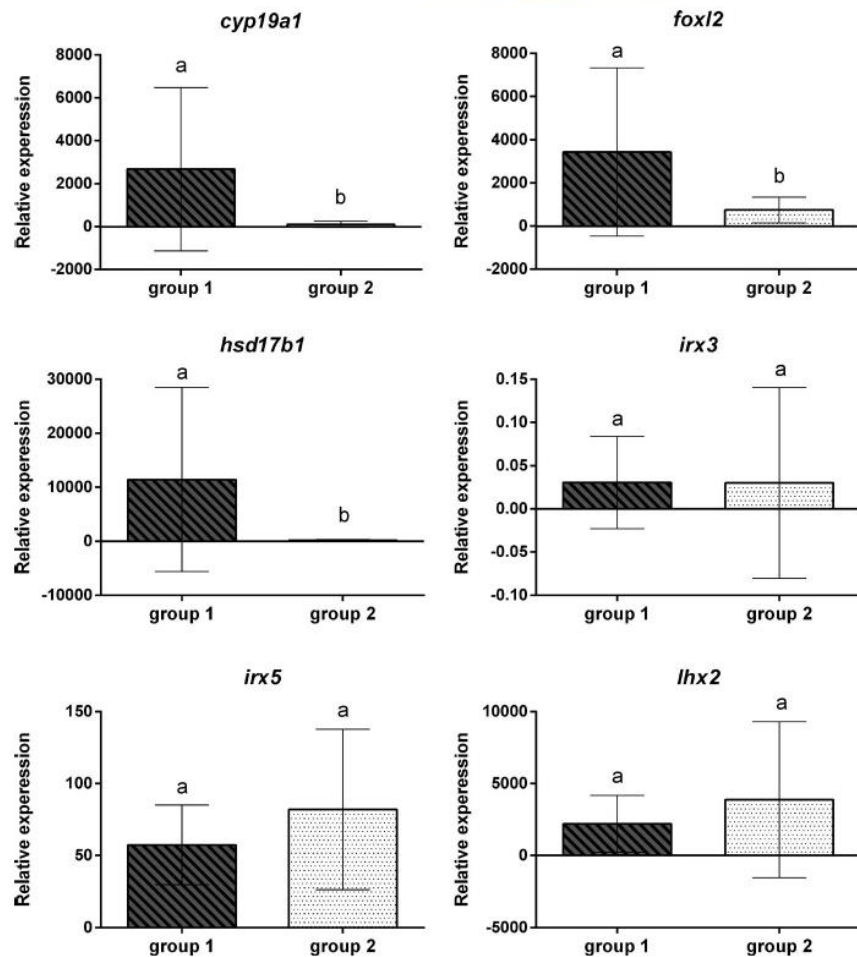


TABLE 6 Percentage of fish classified as future females based on ovarian program gene expression versus expected 1:1 sex ratio (chi-square, Monte Carlo method) (R)

Age (months)	Percentage of fish classified as future females (%)	Expected percentage of females	Significant difference
3	37	50	No ($p = .21$)
4	37	50	No ($p = .21$)
5	34	50	No ($p = .1$)
6	62	50	No ($p = .36$)

to a lack of simple sex-determining markers (Blazquez et al., 2009). CDA is known to be reasonably robust to deviations from multivariate normality (McLachlan, 1992) and provides a quite stable classification rule (Hastie et al., 2009). The classification success rate was evaluated based on the percentage of individuals correctly assigned to their original stage (Table 3). CDA group assignment was also cross-validated using a leave-one-out procedure (jackknife method). Differences between the four sexually-undifferentiated stages were analyzed using pairwise Bonferroni-corrected Hotelling's tests (Table 4). Contingency testing (Monte Carlo method) was carried out to assess differences in sex ratios between the groups produced by our analysis vs. populations in the wild, where the proportion of males to females is 50:50. The analysis was performed using Past3 (Version 3.26; 2019).

2.4.2 | Determination of minimum number of genes needed to sex fish

The minimum number of candidate genes for Siberian sturgeon was determined based on nMDS analysis. In the nMDS analysis based on the Horn similarity index (Horn, 1966), genes ordinated closer together were presumed to be more similar to one another in their expression than those ordinated farther from each other.

When we used the three female genes *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1*, the stress value from the Sheppard plot was >0.2 , indicating that the groups produced by the nMDS were not valid. When the three female genes *irx3*, *irx5*, and *lhx2* (Vizziano-Cantonnet, Di Landro,

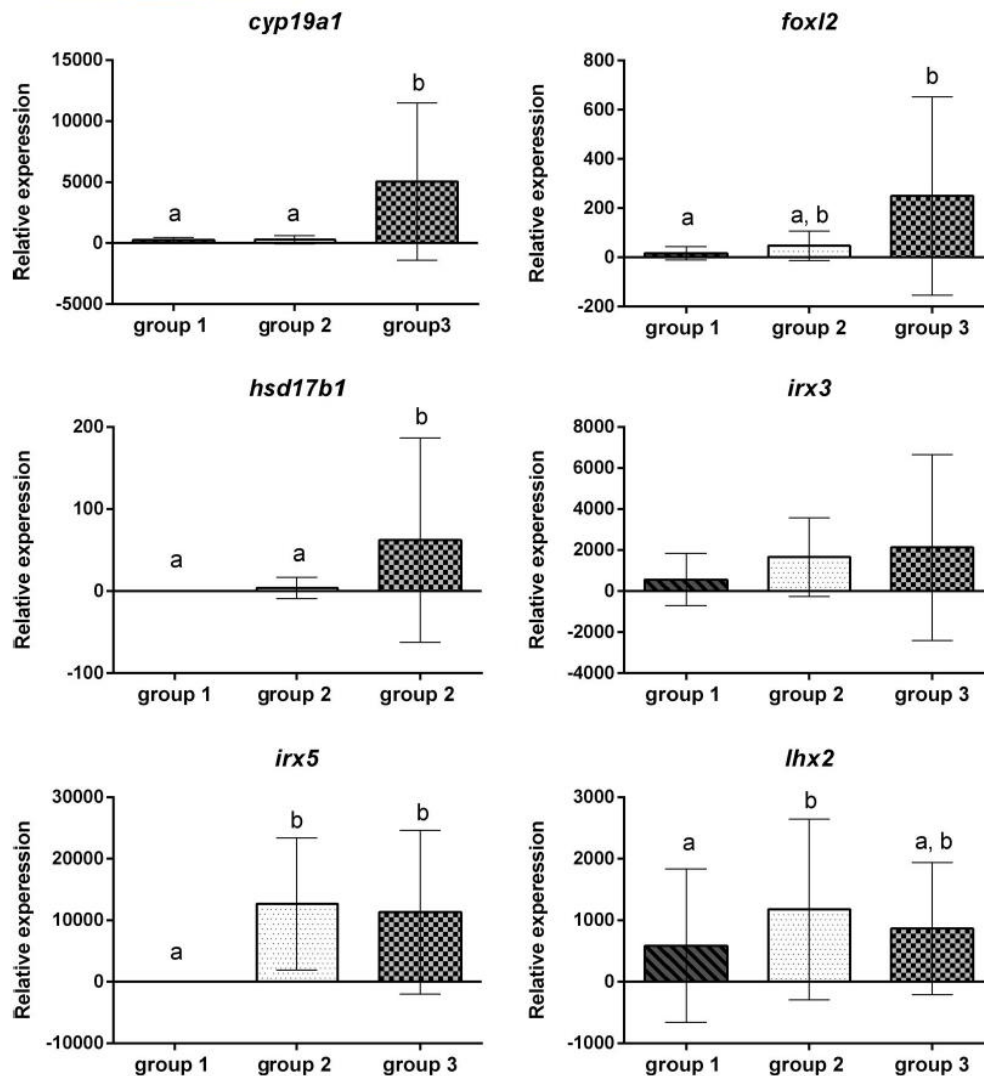


FIGURE 3 Relative *cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, and *lh2* expression in 4-month-old fish, measured by real-time PCR. Groups were produced with statistical methods (nMDS and cluster analysis, using "Horn's index" in both cases). Different letters indicate significant differences in relative gene expression between groups ($p < .05$)

et al., 2018) were added to the analysis, the stress value dropped to <0.2 , validating the groups produced by the nMDS. Furthermore, this version of analysis was more consistent in terms of representation. In sum, all six female biomarkers were required for accurate group formation using nMDS in Siberian sturgeon gonadal tissue during the molecular sex differentiation period.

2.4.3 | Identification of groups within each timepoint and classification of future females

Individuals were grouped according to the similarity of their gene expression patterns at each timepoint using a cluster analysis based on the Horn similarity index (Horn, 1966) and unweighted pair-group averages method (UPGMA). Normality of data and homogeneity of variance assumptions were evaluated. Kruskal-Wallis (K-W) and pairwise Mann-Whitney

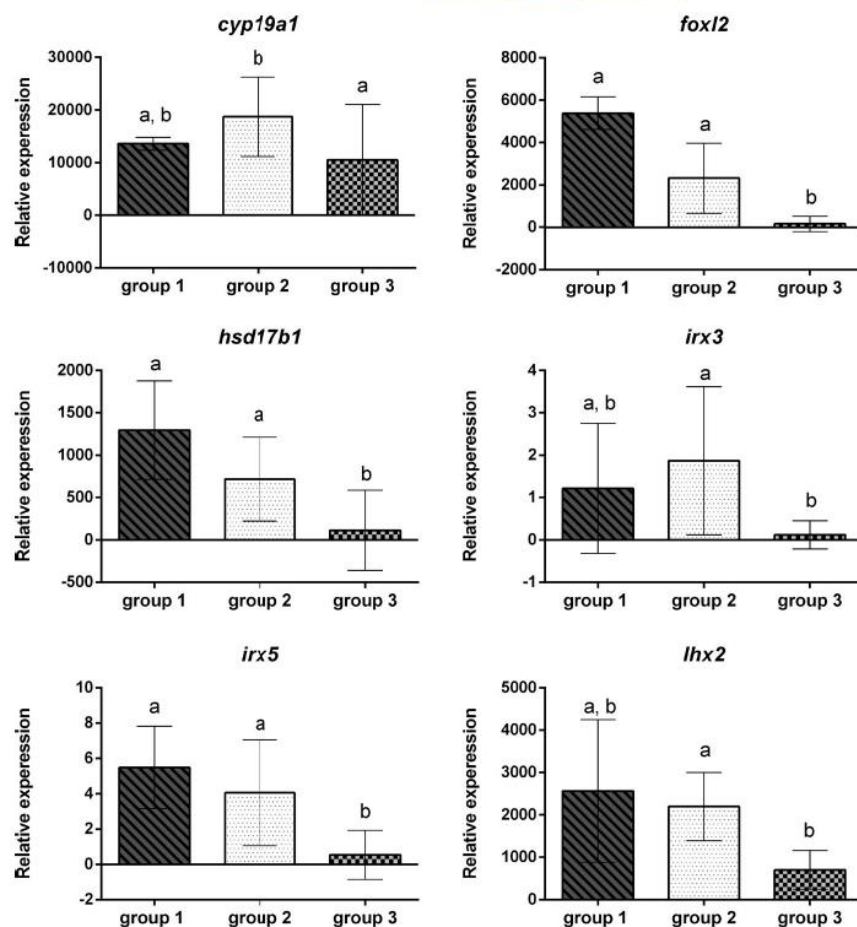
(Bonferroni-corrected p -values) analyses were performed to evaluate for significant differences in gene expression by timepoint when the assumptions of normality and homogeneity of variance were rejected. ANOVA and Student's t -tests were used when the assumptions of normality and homogeneity of variance were not rejected (Sokal & Rohlf, 1995).

3 | RESULTS

3.1 | Global gene expression pattern (CDA analysis)

Expression patterns differed significantly between all four timepoints (Figure 1) (Wilks $\lambda = .01609$, $F_{n,m} = 57.75$, $p < .001$; Pillai = 2.206; $F_{n,m} = 52.33$, $p < .001$). The first canonical factor explained 50.22% of the total discrimination and the second 31.77%. Classification accuracy was $>95.83\%$ according to correct assignment to original

FIGURE 4 Relative *cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, and *lhx2* expression in 5-month-old fish, measured by real-time PCR. Groups were produced with statistical methods (nMDS and cluster analysis, using "Horn's index" in both cases). Different letters indicate significant differences in relative gene expression between groups ($p < .05$)



stage and 95% according to cross-validation using the jackknife method (Table 3).

The genes with the strongest contributions to discriminating the four stages were *cyp19a1* (0.3688 axis 1; -1.001 axis 2), *irx3* (0.217 axis 1; 1.217 axis 2), *irx5* (0.688 axis 1; 0.801 axis 2), *foxl2* (-0.766 axis 1; 0.272 axis 2), *hsd17b1* (-0.530 axis 1; -0.119 axis 2), and *lhx2* (-0.405 axis 1; 0.096 axis 2) (Figure 1). The pairwise Hotelling's tests indicated significant differences in expression patterns among all timepoints (Table 4).

In sum, the gonadal tissue of the 3-month-old fish was discriminated from that of the older fish mainly by *hsd17b1* expression, and to a lesser extent, by *foxl2* and *lhx2* (Figure 1). When gene expression over time was analyzed, the gonadal tissue was characterized primarily by *irx5* expression at 4 months, *cyp19a1* and *hsd17b1* at 5 months, and *foxl2* at 6 months. None of the stages studied were characterized primarily by *irx3* expression (Figure 1).

3.2 | Identification of groups within each timepoint (cluster analysis)

The presence of different groups of fish within each age group (3, 4, 5, and 6 months) was assessed by cluster analysis, based on relative

expression of the six genes studied. Two groups were observed at 3 and 6 months of age and three groups at 4 and 5 months (Table 5).

The criteria used to classify females in each group were female gene expression levels. At 3 months of age (Figure 2), group 1 showed significantly higher expression levels for three female biomarkers: *cyp19a1* (Mann-Whitney, $U_{(11,19)} = 23$, $p < .001$), *foxl2* (Mann-Whitney, $U_{(11,19)} = 49$, $p < .02$), and *hsd17b1* (Mann-Whitney, $U_{(11,19)} = 8$, $p < .001$), while *irx3* (Student's t -test₍₂₈₎ = 0.0254, $p = .9799$), *irx5* (Student's t -test₍₂₈₎ = 1.36, $p = .1836$), and *lhx2* (Student's t -test₍₂₈₎ = 0.9812, $p = .3348$) were not sex-differentiated at this age. Among the 3-month-old fish, group 1 was classified as female. *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1* were significantly activated in 37% of fish; this percentage did not deviate significantly from the expected 1:1 sex ratio (Table 6). *irx3*, *irx5*, and *lhx2* expression did not differ by group (Figure 2).

By 4 months of age (Figure 3), group 3 showed significantly higher expression levels for the three female biomarkers *cyp19a1* (K-W = 17.25, $p < .001$), *foxl2* (K-W = 9.11, $p < .01$), and *hsd17b1* (K-W = 19.03, $p < .001$), while *irx3* (ANOVA, $F_{(2,27)} = 0.5589$, $p = .5783$) was not sex-differentiated. *irx5* (K-W = 16.03, $p < .001$) was activated in more fish than expected (groups 2 and 3), and *lhx2* (ANOVA, $F_{(2,27)} = 0.486$, $p < .040$) expression was not associated with any well-defined group. Among the 4-month-old fish, group

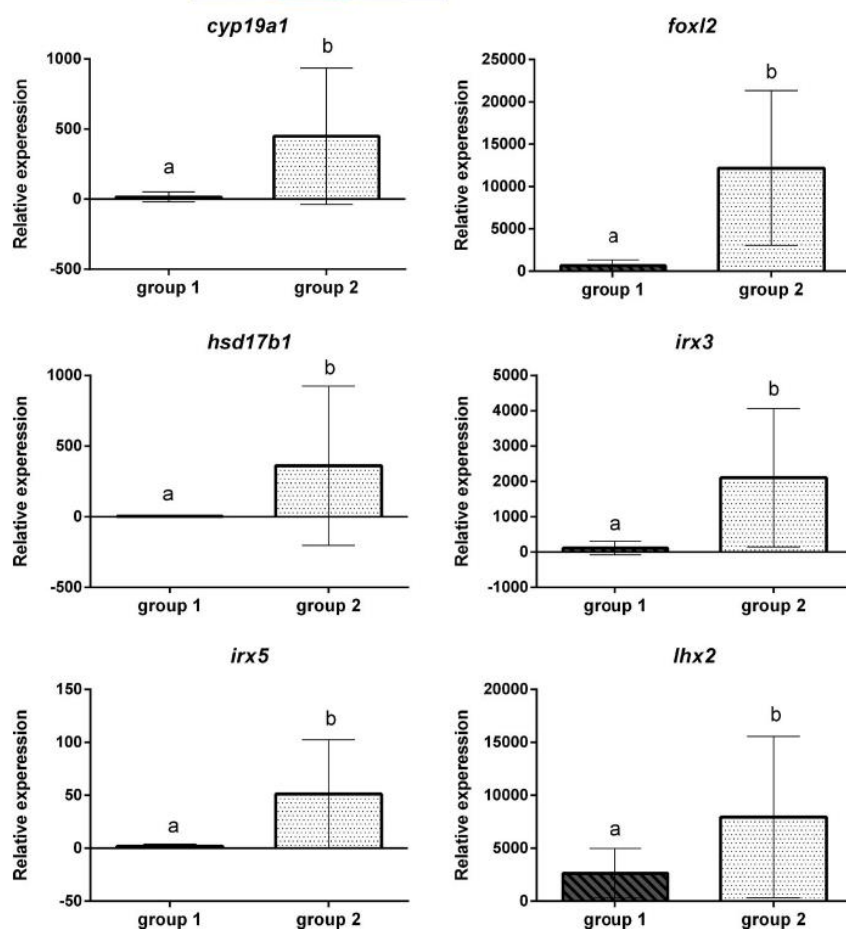


FIGURE 5 Relative *cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, and *lh2* expression in 6-month-old fish, measured by real-time PCR. Groups were produced with statistical methods (nMDS and cluster analysis, using "Horn's index" in both cases). Different letters indicate significant differences in relative gene expression between groups ($p < .05$)

3 was classified as female. Consistent with the previous timepoint, *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1* were activated in 37% of fish, which did not deviate from the 1:1 ratio (Table 6).

foxl2 (K-W = 18.21, $p < .001$), *hsd17b1* (ANOVA, $F_{(2,27)} = 8.501$, $p < .001$), and *irx5* (ANOVA, $F_{(2,27)} = 12.87$, $p < .001$) expression was significantly higher in groups 1 and 2 in the 5-month-old fish (Figure 4), while *cyp19a1*, *irx3*, and *lh2* expression was not associated with any well-defined group. Groups 1 and 2 were determined to represent the females. At this age, *foxl2*, *hsd17b1*, and *irx5* were significantly activated in 34% of fish. This percentage did not deviate from the 1:1 ratio.

Finally, at 6 months (Figure 5), group 2 showed significantly higher expression levels for all six genes tested (*cyp19a1*: Mann-Whitney, $U_{(11,18)} = 6$, $p < .001$; *foxl2*: Mann-Whitney, $U_{(11,18)} = 0$, $p < .001$; *hsd17b1*: Mann-Whitney, $U_{(11,18)} = 0$, $p < .001$; *irx3*: Mann-Whitney, $U_{(11,18)} = 4$, $p < .001$; *irx5*: Mann-Whitney, $U_{(11,18)} = 3$, $p < .001$; and *lh2*: Student's t -test₍₂₈₎ = 2.227, $p < .037$). Group 2 was therefore classified as female. A total of 62% of the fish showed activation of all of the genes tested (*cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, *lh2*) at this timepoint; these percentages did not deviate from the 1:1 sex ratio (Table 6, Figure 5).

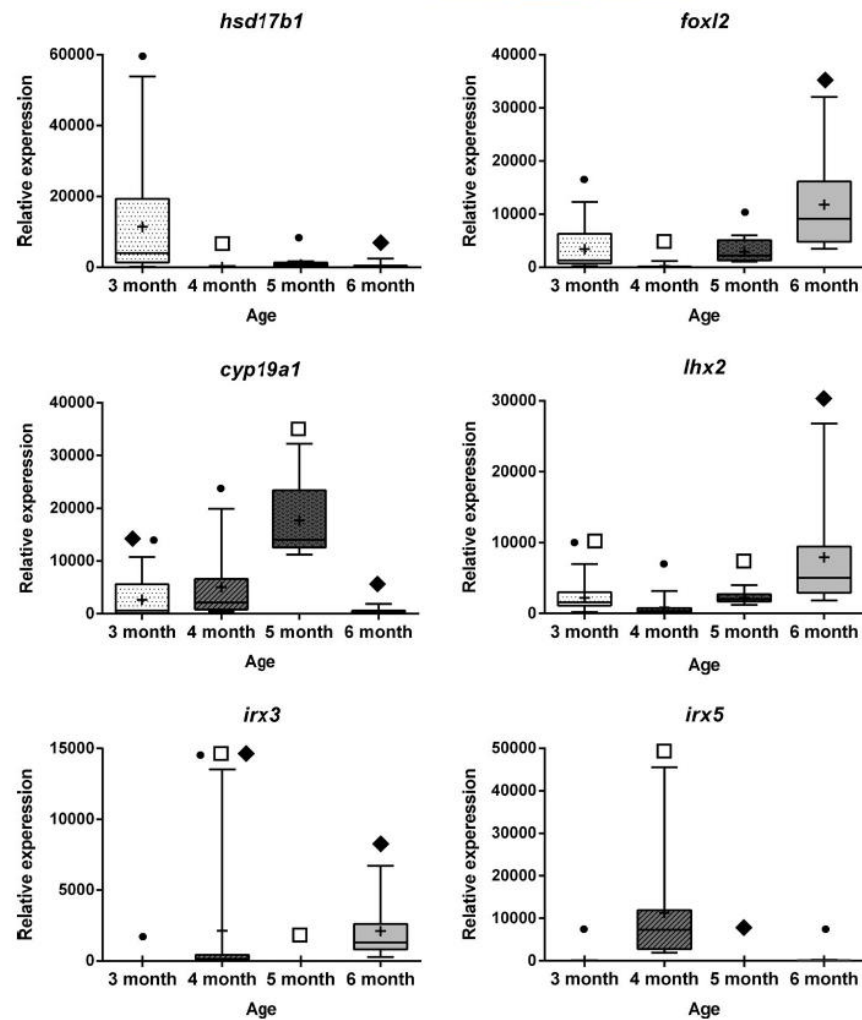
Figure 6 shows the comparative expression levels of the six genes studied at each timepoint, within the female groups as defined previously.

In sum, the fish identified as future females were: group 1 at 3 months of age (Figure 2), group 3 at 4 months of age (Figure 3); group 2 at 5 months of age (Figure 4); and group 2 at 6 months of age (Figure 5).

3.3 | Quantitative temporal expression of female gene expression

Figure 6 displays the relative quantitative expression of genes selected for their presumptive involvement in the Siberian sturgeon ovarian program. At 3 months of age, the gonadal tissue of future females exhibited a peak of *hsd17b1* expression ($-K-W = 31.37$, $p < .001$) as compared to older fish (4–6 months; Figure 6). *foxl2* expression was greater (K-W = 33.42, $p < .001$) at this early stage than at 4 months, with *cyp19a1*, *lh2*, *irx3*, and *irx5* already activated. The 4–6-month period was characterized by successive peaks of gene expression. *irx5* showed maximum expression at 4 months (K-W = 37.82, $p < .001$), *cyp19a1* (K-W = 30.36, $p < .001$) at 5 months, and *foxl2* (K-W = 32.42, $p < .001$), and *lh2* (K-W = 25.92, $p < .001$) at 6 months of age. *irx3* expression was highly variable, but a peak appeared to occur at 6 months (K-W = 33.71, $p < .001$).

FIGURE 6 Relative *hsd17b1*, *foxl2*, *cyp19a1*, *lhx2*, *irx3*, and *irx5* expression in 3-, 4-, 5- and 6-month-old presumptive females, measured by real-time PCR. The timepoint of peak expression for each gene indicated with the letter "a" (*hsd17b1* at 3 months, *foxl2* at 6 months, *cyp19a1* at 5 months, *lhx2* at 6 months, and *irx5* at 4 months)



4 | DISCUSSION

Quantitative PCR was used to determine gene expression patterns in a sample of Siberian sturgeon, and statistical analysis was then used for clustering of the samples within age groups. The study assessed six genes involved in gonadal sex differentiation across several timepoints during morphologically-undifferentiated stages of development (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). The aim was to identify fish undergoing ovarian differentiation and quantitatively assess temporal expression patterns in a species lacking known genetic sex markers.

The molecular differentiation process was already underway by the earliest stage sampled here (3 months) (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016), although the gonads remained morphologically undifferentiated (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018; Vizziano-Cantonnet et al., 2016). The strategy we describe provides for the possibility of identifying gonadal tissue likely undergoing ovarian differentiation even before the appearance of morphological signs. At 3 months of age, 37% of the fish showed significant gonadal activation of *cyp19a*, *foxl2*, and *hsd17b1* and were classified as future females. The remaining fish

(63%) have corresponded to undifferentiated, intersex, and/or future male individuals according to previous morphological studies in this species (Rzepkowska et al., 2014). The lack of male markers for sturgeon precluded identification of future males using gonadal gene expression (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018).

The percentage of fish showing *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1* activation rose to 62% by 6 months of age. There is limited information in the literature on the proportions of fish typically recruited to female or male pathways during the molecular differentiation period. However, the present results are consistent with prior studies in Siberian sturgeon using *cyp19a1* and *foxl2* as sex markers (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). The use of female markers allowed us to quantitatively assess changes in gene expression over time.

The discriminant analysis identified genes characterizing each stage of gonadal maturation. These results were consistent with those of the quantitative temporal expression analysis. The earliest stage evaluated (3 months) was characterized by high levels of *hsd17b1* and *foxl2* expression, as well as relatively low *cyp19a1* levels, according to both the discriminant and temporal expression analyses. *hsd17b1* has been studied in the context of fish sex differentiation for some species (Ijiri et al., 2008), including a type of sturgeon

(Hagihara et al., 2014). Moreover, recent studies in *Seriola* have suggested that the enzyme coded by this gene is a key factor in estrogen production, but only in females, acting as a sex-determination hormone (Koyama et al., 2019). Our results also indicate that *hsd17b1* could be crucial for early sex differentiation in Siberian sturgeon gonads. Studies involving *hsd17b1* deletion could provide additional insight into the role of this gene in the Siberian sturgeon female program.

foxl2 showed two peaks of expression, at 3 and then 6 months of age. The latter peak will be discussed later. The peak at 3 months could be related to early regulation of estrogen production, as has been described in teleost fish (Baron et al., 2004; Guiguen et al., 2010; Vizziano et al., 2008) and proposed in Nile tilapia after *foxl2* deletion (Koyama et al., 2019). *cyp19a1* showed similar patterns as in teleosts, remaining near maximum levels throughout the sex differentiation period (Fernandino et al., 2008; Ijiri et al., 2008; Vizziano et al., 2007). This finding confirmed the trends observed in previous transcriptomic studies (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018).

Taken together, the results support the concept that estrogens play a crucial role during early gonadal differentiation in Siberian sturgeon. The enzyme coded by *hsd17b1* is likely a key early factor in this species, while *foxl2* and *cyp19a1* may be important for sustaining the estrogen production levels needed to maintain gonadal femininity. In situ hybridization and gene deletion studies would be helpful for clarifying the participation of these genes in early sex differentiation in sturgeon.

At 6 months of age, gonads were discriminated by two genes: *foxl2* and *lhx2*. These genes showed a significant peak of expression at this stage, confirming the results of a previous transcriptomics study (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). Initial signs of follicle development in Siberian sturgeon have been detected around 8 months of age (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016). Therefore, high levels of *foxl2* and *lhx2* activation preceded formation of the ovarian follicles, suggesting that these genes may be involved in regulating the process. In fact, *foxl2* regulates folliculogenesis in some mammals (Yao, 2005). *Lhx2* is a transcription factor with essential roles in morphogenesis and patterning of ectodermal derivatives, as well as in controlling stem cell activity (Mardaryev et al., 2011). Its activation has been shown to precede the onset of germ cell proliferation in Siberian sturgeon, which reportedly occurs at 6.5 months of age (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013). We propose that *lhx2* participates in female sex differentiation by stimulating stem cell proliferation in the stem-cell niche, as has been described in mammals (Piprek et al., 2018).

In contrast to the estrogen-related genes, two genes associated with stem-cell niche interaction, *irx5* and *irx3*, were strongly expressed in the gonadal tissue at 4 and 6 months of age, respectively. Some members of the Iroquois homeobox transcription factor family (*Ir*) are essential for somatic-germ cell interactions in mammals, where *Ir3*, *Ir5*, and *Ir6* deletion affects germ cell proliferation and disrupts somatic-germ cell interaction (Kim et al., 2011). Gonadal structure and function depends on germ and somatic cell interactions and conservation of the stem-cell niche (Kim

et al., 2011). Therefore, activation of transcription factors such as *irx3* and *irx5* may contribute to later stages of sex differentiation in sturgeon, including the transition of female primordial germ cells from mitotic proliferation to meiotic cell division as well as the organization of germ-cell cysts. This concept would be consistent with results obtained in mice at birth, prior to primordial follicle development (Jorgensen & Gao, 2005). The germ-cell cysts and follicles observed in sturgeon (Grandi & Chicca, 2008; Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016) are similar to the germinal cradle described in the medaka ovary (Nakamura et al., 2010). These structures constitute a stem-cell niche, at least at the morphological level. The activation of *irx5* at 4 months and *irx3* at 6 months reported in the present work indicates a potential function in the formation of the germ-cell cysts at 8–9 months in Siberian sturgeon (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016).

In summary, our work shows a particular molecular expression pattern characterizing each month of the early sex differentiation period. The female patterns identified by the discriminant analysis elucidate the evolution of the sex differentiation process. The findings suggest a genetic relay mediating estrogen production throughout differentiation, possibly to maintain gonadal femininity. The roles of *lhx2*, *irx3*, and *irx5* merit further attention in future studies on fish sex differentiation.

Recently, a genomic sex marker was discovered for different sturgeon species (Kuhl et al., 2021). This finding will be very useful for identifying genomic areas associated with sex determination and will facilitate a more precise study of sex differentiation in sturgeon.

One of the major contributions of the present work is the development of a simple strategy that allows for sex identification before morphological differentiation in fish. Genomic DNA sex markers remain to be discovered for most of the 30,000 fish species (Nelson et al., 2016). Our procedure involved a statistical approach to analyzing molecular expression of selected female genes. This method provides a precedent for future research that depends on identification of future male and female fish prior to sex differentiation, especially in species lacking known genetic sex markers. This combined molecular and statistical approach offers an advantageous strategy for clarifying the sex differentiation process in fish.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Chief Executive Officer of Estuario del Plata, Facundo Márquez and the entire Estuario del Plata (Uruguay) staff for their ample support and kindness during this project. We thank an anonymous reviewer whose suggestions helped improve and clarify this manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

We have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data is available in this article.

ORCID

André Lasalle  <https://orcid.org/0000-0001-5420-5149>

Walter Norbis  <https://orcid.org/0000-0002-7819-3450>

Denise Vizziano-Cantonnet  <https://orcid.org/0000-0001-7529-7556>

REFERENCES

- Baroiller, J. F., Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 910–931. <https://doi.org/10.1007/s000180050344>
- Baron, D., Batista, F., Chaffaux, S., Cocquet, J., Cotinot, C., Cribiu, E., De Baere, E., Guiguen, Y., Jaubert, F., & Pailhoux, E. (2005). Foxl2 gene and the development of the ovary: A story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 377–382. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005028>
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., & Veitia, R. A. (2004). An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33, 705–715. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01566>
- Berbejillo, J., Martínez-Bengochea, A., Bedo, G., Brunet, F., Volff, J. N., & Vizziano-Cantonnet, D. (2012). Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 504–516. <https://doi.org/10.1002/mrd.22053>
- Bhandari, R., Nakamura, M., & Nagahama, Y. (2006). Estrogen is essential for the maintenance of female sex in fish. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative and Experimental Biology*, 305A, 111.
- Blazquez, M., Navarro-Martin, L., & Piferrer, F. (2009). Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312B(7), 686–700. <https://doi.org/10.1002/jezb.21286>
- Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5, 509–521. <https://doi.org/10.1038/nrg1381>
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*, 18, 675–689. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>
- Cutting, A., Chue, J., & Smith, C. A. (2013). Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*, 242, 380–387. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23944>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Kimura, H., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2008). Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 237, 3192–3199. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21731>
- Grandi, G., & Chicca, M. (2008). Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, *Chondrostei*). *Journal of Morphology*, 269, 1238–1262. <https://doi.org/10.1002/jmor.10657>
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., McMeel, O., Martin, S., & Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 54, 154–162. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199910\)54:2<154::AID-MRD7>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199910)54:2<154::AID-MRD7>3.0.CO;2-5)
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>
- Hagihara, S., Yamashita, R., Yamamoto, S., Ishihara, M., Abe, T., Ijiri, S., & Adachi, S. (2014). Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic expression pattern in undifferentiated gonads of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(6), 1557–1564. <https://doi.org/10.1111/jai.12588>
- Hastie, T., Rosset, S., Zhu, J., & Zou, H. (2009). Multi-class adaboost. *Statistics and Its Interface*, 2, 349–360. <https://doi.org/10.4310/SII.2009.v2.n3.a8>
- Horn, H. S. (1966). Measurement of "overlap" in comparative ecological studies. *The American Naturalist*, 100, 419–424. <https://doi.org/10.1086/282436>
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78, 333–341. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>
- Jorgensen, J. S., & Gao, L. (2005). Irx3 is differentially up-regulated in female gonads during sex determination. *Gene Expression Patterns*, 5, 756–762. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.04.011>
- Kikuchi, K., & Hamaguchi, S. (2013). Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242, 339–353. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23927>
- Kim, B., Kim, Y., Cooke, P. S., Rüther, U., & Jorgensen, J. S. (2011). The fused toes locus is essential for somatic-germ cell interactions that foster germ cell maturation in developing gonads in mice. *Biology of Reproduction*, 84, 1024–1032. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088559>
- Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., & Vizziano-Cantonnet, D. (2020). RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon. *Data in Brief*, 31, 105741. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105741>
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351, 117–121. <https://doi.org/10.1038/351117a0>
- Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., Kuruma, Y., Mizuno, N., Suzuki, M., Okada, Y., Ieda, R., Uchino, T., Tasumi, S., Hosoya, S., Uno, S., Koyama, J., Toyoda, A., Kikuchi, K., & Sakamoto, T. (2019). A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in seriola fishes. *Current Biology*, 11, 1901–1909. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.069>
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Keuz, E., Klopp, C., Du, K., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E. S., Ciorpac, M., & Gessner, J. (2021). A 180 my-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089>
- Manly, B. F., & Alberto, J. A. N. (2016). *Multivariate statistical methods: A primer* (4th ed.).
- Mardaryev, A. N., Meier, N., Poterlowicz, K., Sharov, A. A., Sharova, T. Y., Ahmed, M. I., Rapisarda, V., Lewis, C., Fessing, M. Y., Ruenger, T. M., Bhawan, J., Werner, S., Paus, R., & Botchkarev, V. A. (2011). Lhx2 differentially regulates Sox9, Tcf4 and Lgr5 in hair follicle stem cells to promote epidermal regeneration after injury. *Development*, 138, 4843–4852. <https://doi.org/10.1242/dev.070284>
- Marshall Graves, J. A. (2013). How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Developmental Dynamics*, 242, 354–359. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23887>
- McLachlan, G. (1992). Cluster analysis and related techniques in medical research. *Statistical Methods in Medical Research*, 1, 27–48. <https://doi.org/10.1177/096228029200100103>

- Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., & Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological Reviews*, 101, 1237–1308. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2019>
- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. I., & Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science*, 328, 1561–1563. <https://doi.org/10.1126/science.1185473>
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the world* (5th ed.). John Wiley & Sons.
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. Part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 16–34. <https://doi.org/10.1080/10641260802324610>
- Piferrer, F., & Guiguen, Y. (2008). Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 35–55. <https://doi.org/10.1080/10641260802324644>
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I. I., Devlin, R. H., & Donaldson, E. M. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *Journal of Experimental Zoology*, 270, 255–262. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700304>
- Piprek, R. P., Kolasa, M., Podkowa, D., Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2018). Transcriptional profiling validates involvement of extracellular matrix and proteinases genes in mouse gonad development. *Mechanisms of Development*, 149, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.11.001>
- Rzepkowska, M., & Ostaszewska, T. (2013). Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, 6, 75–88. <https://doi.org/10.1111/raq.12027>
- Rzepkowska, M., Ostaszewska, T., Gibala, M., & Roszko, M. L. (2014). Intersex gonad differentiation in cultured Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon. *Biology of Reproduction*, 31, 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112813>
- 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., & 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. <https://doi.org/10.1038/346240a0>
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research* (3rd ed.). W. H. Freeman.
- Vizziano, D., Baron, D., Randuineau, G., Mahe, S., Cauty, C., & Guiguen, Y. (2008). Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biology of Reproduction*, 78, 939–946. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065961>
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., & Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 236, 2198–2206. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21212>
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., & Lasalle, A. (2018). Sex determination and differentiation of the siberian sturgeon. In P. Williot, G. Nonnotte, D. Vizziano-Cantonnet & M. Chebanov, (Eds.), *The Siberian sturgeon* (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) (Vol. 1-Biology, pp. 93–113). Springer.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 83, 19–36. <https://doi.org/10.1002/mrd.22589>
- Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., & Genthon, C. (2018). De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and Comparative Endocrinology*, 268, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.007>
- Wang, D. S., Kobayashi, T., Zhou, L. Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K.-I., & Nagahama, Y. (2007). Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Molecular Endocrinology*, 21, 712–725. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0248>
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87, 1–28. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Yao, H. H. C. (2005). The pathway to femaleness: Current knowledge on embryonic development of the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 230, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.11.003>
- Zhang, X., Li, M., Ma, H., Liu, X., Shi, H., Li, M., & Wang, D. (2017). Mutation of foxl2 or cyp19a1a results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia. *Endocrinology*, 158, 2634–2647. <https://doi.org/10.1007/s000180050344>

How to cite this article: Lasalle, A., Norbis, W., & Vizziano-Cantonnet, D. (2021). Sex identification of morphologically-undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns. *Journal of Applied Ichthyology*, 00, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jai.14268>

Conclusiones del Capítulo 1.

En el trabajo generado se demostró que es posible identificar poblaciones de potenciales hembras y machos mediante el uso de genes claves vinculados a la diferenciación sexual, una herramienta fundamental para continuar con estudios durante etapas de desarrollo con gonadal indiferenciado, e importante teniendo en cuenta que la gran mayoría de las especies de peces no tienen marcadores sexuales identificados, por lo que este tipo de análisis puede ser utilizado en otras especies. Además, esta primera aproximación a los procesos de diferenciación demostró que los individuos clasificados como hembras tienen a los estrógenos íntimamente vinculados con el proceso de diferenciación sexual, estando *hsd17b1*, *foxl2* y *cyp19a1* sobre expresado desde las etapas más tempranas y mantenidos durante el periodo de diferenciación molecular del sexo.

Si bien se logró avanzar en el reconocimiento del sexo de las gónadas indiferenciadas a través de estos estudios de expresión génica con marcadores gonadales, quedó claro que era necesario contar con un marcador genético del sexo que nos permitiera realizar el sexado de los animales con gónadas indiferenciadas, y de esta manera poder validar definitivamente los genes propuestos como claves para la diferenciación sexual con estudios de qPCR, así como abrir nuevos horizontes a través del uso de transcriptómica. Es por ello que en paralelo con este trabajo de expresión génica se comenzó la búsqueda de un marcador genético del sexo a través de RAD-sequencing. Los resultados de esta búsqueda se presentan en el Capítulo 2.

Capítulo 2:

Búsqueda de un marcador genético del sexo usando datos de transcriptómica y de RAD sequencing (Restriction Site Associated DNA sequencing)

Resumen

Los esturiones son un grupo de peces Actinopterigios especialmente interesante para el estudio de los procesos de determinación del sexo, por un lado, porque se trata de especies antiguas y basales a nivel filogenético, por lo que su estudio genera un aporte en lo que respecta a la determinación del sexo desde un punto de vista evolutivo. Por otra parte, estos animales son comercialmente importantes para la producción de caviar. La identificación del sexo en etapas tempranas de desarrollo es por lo tanto un hito clave para el avance tanto de la investigación básica sobre estos animales, así como para el del sector comercial de producción de caviar. Hasta el momento en el que se realizó este trabajo no se habían identificado marcadores genéticos del sexo que permitiesen sexar de manera rápida y en cualquier estadio de desarrollo a los animales; así como permitir la búsqueda del gen determinante del sexo y de los genes que conducen la diferenciación sexual en los estadios más tempranos. Bajo la hipótesis que el esturión siberiano tiene un sistema de determinación del sexo del tipo ZZ/ZW, se realizó un secuenciado masivo mediante la técnica de RAD-seq, la identificación de SNPs significativos asociados a un sistema de determinación heterogamético femenino y la evaluación en cada sexo mediante HRM (del inglés High Resolution Melting) de los marcadores retenidos, con el objetivo de distinguir hembras de machos. Los resultados de HRM no fueron concluyentes en cuanto a que los SNPs seleccionados puedan funcionar como marcadores genéticos del sexo. Se identificaron puntos críticos relacionados con la biología del organismo que resultan en dificultades que no permiten resolverse con la técnica en cuestión (HRM). Hemos generado igualmente un panel de SNP > 74 K, de alta calidad realizado a

partir de muestras obtenidas de hembras y machos de *Acipenser baerii*, utilizando un enfoque de alta profundidad. Este panel de SNPs se publicó en bases internacionales públicas y podrá ser utilizado como una fuente de datos para diferentes estudios genéticos que se quieran realizar a futuro. El artículo técnico Lasalle et al. (2021) se encuentra al final de este capítulo.

Introducción

Como ya hemos mencionado los esturiones son un grupo filogenéticamente basal (Grande & Bemis, 1996), de gran importancia comercial (Bronzi et al., 2019) y considerados como especie amenazada por la UICN. En este contexto es muy interesante poder identificar y controlar el sexo, y para ello es fundamental desarrollar estudios de determinación y diferenciación del sexo. Para llevar adelante este tipo de objetivos, es necesario contar con un marcador el sexo genético.

Durante años se buscaron marcadores del sexo y se intentó comprender el sistema de determinación sexual de los esturiones (Keyvanshokoo & Gharaei, 2010; Khodaparast et al., 2014; Wuertz et al., 2006). Como ya mencionamos en la introducción general lo más probable es que los esturiones estén utilizando un sistema de determinación del sexo del tipo ZZ/ZW (Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Omoto et al., 2005; Saber & Hallajian, 2014; Van Eenennaam et al., 1999; Van Eenennaam, 1997). Sin embargo, esto no se ha confirmado formalmente. A su vez las proporciones de sexos encontradas en las cohortes estudiadas tanto en pisciculturas como en poblaciones naturales indican que estas son 50:50 (machos : hembras) (Lasalle et al., 2021, presente tesis Capítulo 1; Sanfilippo et al., 2022), y esto apoya la hipótesis de que el tipo de determinación del sexo debe regirse por un modo genético y monofactorial, es decir que la presencia de un factor mayor determinará el sexo de cada individuo. En el inicio de esta Tesis no contábamos con un marcador genético del sexo y es por ello que basados en la idea de que el esturión siberiano usa un sistema de

determinación del sexo del tipo ZZ/ZW se postuló la presencia de un marcador genético del sexo asociado al cromosoma W presente únicamente en el genoma femenino.

Las técnicas de secuenciación masiva desarrolladas durante los últimos años generaron una oportunidad para identificar marcadores del sexo. En este capítulo se plantea el uso de secuenciación RAD-seq para identificar un marcador genético del tipo polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que permitiese distinguir los sexos mediante el posterior uso de la técnica HRM (del inglés High Resolution Melting) en forma rápida y eficiente, realizando el análisis de las curvas de fusión generadas por la amplificación de secuencias conteniendo los marcadores SNP seleccionados. En esturiones la técnica de RAD-seq se ha realizado, pero con un enfoque diferente (Ogden et al., 2013), apuntando a objetivos de conservación y a la identificación de SNPs asociados a diferentes especies como el esturión ruso y el persa. Sin embargo, la capacidad que se le ha visto para la identificación de marcadores del sexo en peces modernos como en algunos teleósteos (Gamble, 2016), sumado a que se había publicado el primer genoma del esturión sterlet (*Acipenser ruthenus*, Du et al., 2020) y que éste puede ser utilizado como referencia para nuestro estudio, fueron una buena base para iniciar estudios de búsqueda de marcadores del sexo en esturión siberiano con esta técnica en particular.

Materiales y métodos

Animales

Los animales fueron provistos por la planta de acuicultura de esturiones “Estuario del Plata” ubicada en San Gregorio de Polanco, departamento de Tacuarembó, Uruguay. Se utilizaron un total de 24 animales: 12 machos y 12 hembras sexualmente diferenciados de 6 años de edad. Todos los animales muestreados fueron aquellos que la empresa procesa en el momento de la faena, es decir las hembras para la producción de caviar, y los machos de los cuales procesa la carne para su venta, por esa razón los animales se sacrificaron por parte de la empresa y se aprovecharon las distintas

faenas para el muestreo de tejido biológico. En un segundo muestreo se obtuvieron con el mismo procedimiento, muestras de 27 machos y 42 hembras para realizar la validación de resultados de HRM.

Muestreo

El muestreo se realizó en la planta de acuicultura en San Gregorio de Polanco. Se dividió en dos días siguiendo el protocolo de procedimiento que realiza la empresa durante la faena, en la cual se realizan los sacrificios por sexo en días distintos. El primer día se obtuvieron las muestras de machos y el segundo día se obtuvieron las muestras de hembras. Para cada toma de muestras se recibieron los animales recién sacrificados. Cada animal de los utilizados (machos y hembras) para el secuenciado fue medido con un error de ± 1 mm (Tabla 1.2). El peso se pudo relevar únicamente para los machos, utilizando un dinamómetro, ya que las hembras fueron procesadas para la obtención de caviar por lo que se le retiraron las gónadas previamente a que fueran entregadas para la toma de muestras biológicas. Para cada animal se obtuvieron muestras de aleta (caudal) y de músculo. Las muestras fueron procesadas cuidadosamente, para obtenerlas se utilizaron pinzas, tijeras y bisturíes, y los manipuladores utilizaron guantes y túnica durante el proceso completo. Todos los instrumentos fueron esterilizados utilizando alcohol etílico 95% y posterior flameado entre cada toma de muestras para evitar cualquier tipo de contaminación. Cada una de las muestras obtenidas fue inmediatamente conservada en etanol absoluto hasta el momento de la extracción de ADN genómico. Se identificaron cada una de las muestras anotando el número de animal del muestreo y el sexo correspondiente en papel calco para no perder la anotación.

Tabla 1.2. Largo (cm) y Peso (Kg) de los animales utilizados para RAD-seq. (ND=No Data).

Muestra	Largo (cm)	Peso (Kg)
M16 (Macho)	98	4,17
M18 (Macho)	103	4,13
M22 (Macho)	105	5,3
M23 (Macho)	92,5	3,27
M25 (Macho)	107	4,76
M26 (Macho)	101	4,78
M27 (Macho)	105,5	3,98
M30 (Macho)	108	4,73
M31 (Macho)	95	3,39
M32 (Macho)	99	3,68
M33 (Macho)	109	5,5
M34 (Macho)	104,7	4,14
H16 (Hembra)	97	ND
H17 (Hembra)	115	ND
H19 (Hembra)	100,6	ND
H20 (Hembra)	94	ND
H21 (Hembra)	103	ND
H22 (Hembra)	108,2	ND
H23 (Hembra)	107	ND
H24 (Hembra)	105	ND
H25 (Hembra)	106,5	ND
H27 (Hembra)	101	ND
H28 (Hembra)	106	ND
H29 (Hembra)	104	ND

Extracción y validación de ADN de alta calidad

La extracción de ADN es el punto crítico de esta técnica, ya que el objetivo fundamental es realizar un secuenciado masivo y por lo tanto se necesita obtener un ADN de alta calidad bajo las exigencias que demanda la empresa Floragenex de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) (<https://www.floragenex.com/>), donde se realiza la técnica de RAD-seq. Para obtener el ADN se utilizó un kit comercial de Qiagen, con modificaciones realizadas sobre el protocolo original del kit buscando la mejora de la muestra final obtenida. Las muestras que se utilizaron fueron de tejido muscular. Se cortaron 10 mg de tejido en trozos, sobre placas de petri estériles e individuales, y se eliminó el exceso de etanol en el cual se había conservado la muestra utilizando un papel absorbente.

Se siguió el protocolo de extracción de ADN genómico del Kit Qiagen “Blood and tissue” incorporando las siguientes modificaciones: 1- El tiempo de lisado de tejido fue de 3 a 4 horas. 2- En ningún caso se realizó el vortexeo de muestras, sino que se mezcló suavemente la muestra mediante agitación manual, buscando tener un ADN lo más integro posible y evitando rupturas por un tratamiento mecánico violento.

El ADN se midió inicialmente por un espectrofotómetro que mide microvolúmenes llamado corrientemente Nanodrop y se llevó una alícuota a una concentración final de 20 ng/μl, se cargaron 100 ng totales en un gel de agarosa al 2%, y se corrió una electroforesis para validar la obtención de ADN integro de alto peso molecular (Figura 1.2). Aquellas muestras de alta calidad se midieron por Qbit, como es demandado por la empresa Floragenex y se enviaron para cada una de las muestras a secuenciar 50ul a una concentración mínima de 20 ng/μl.

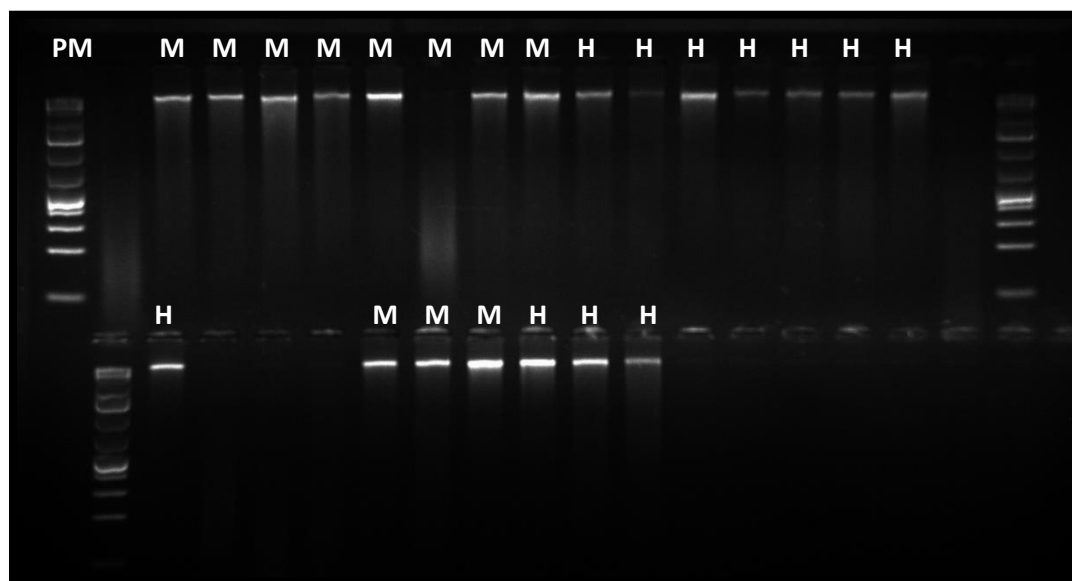


Figura 1.2. Muestras de ADN genómico de alta calidad obtenidas de machos (M) y hembras (H) de esturión siberiano utilizadas para RAD-seq, sembradas en gel de agarosa al 2%. Se cargaron 10 μl totales a concentración 20 ng/μl. Se observan para la gran mayoría de las muestras, productos de alto peso molecular con baja degradación; PM indica el marcador de peso molecular.

Secuenciado RAD-Seq

Se enviaron 12 muestras de machos y 12 muestras de hembras para su secuenciado masivo en EEUU. Dada la complejidad del genoma ($n=246 \pm 8$ cromosomas; y 8,3 pg) se decidió secuenciar cada una de las muestras por cuatriplicado para aumentar la profundidad y así obtener la máxima cantidad de datos posibles intentando no perder un potencial marcador que estuviese poco representado en el genoma.

La preparación y secuenciación de las bibliotecas RAD-seq fueron realizadas por Floragenex (FL, EE.UU.), de acuerdo con Truong et al., (2012). Los protocolos utilizados por la empresa son los siguientes: para cada muestra aproximadamente 125 ng de ADN genómico de cada uno de los 24 peces (más un control) se digirieron durante 120 min a 37°C en una reacción de 20 µl con 20 unidades (U) de PstI y 2,75 U de MseI (New England Biolabs), 4,0 µl de buffer RL A (Keygene), 3,325 µl de buffer RL B (Keygene) y agua. Tras la digestión, las muestras se inactivaron térmicamente durante 10 min a 80 °C, luego se añadieron de 2,5 µl de adaptador P1 1 µM y 0,1 µl de adaptador MseI 250 µM. Los adaptadores PstI P1 contenían cada uno un índice de secuencia multiplex (código de barras). Los adaptadores P1 y P2 se añadieron a cada muestra junto con 1 µl de buffer RL A (Keygene), 0,83 µl de buffer RL B (Keygene), 0,5 µl de ATP 10 mM, ligasa de ADN T4 (alta concentración [HC], Enzymatics, Inc), 0,3125 U MseI 0,25 U PstI en un volumen final de 25 µl que luego se incubó a 37 °C durante 180 min. Las muestras se diluyeron 1:10 en agua y 2,5 µl de este producto se utilizó en una amplificación por PCR con 10x PCR Buffer 1 (Applied Biosystems), 0,2 U AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems), 0,1 µl de 20 nM de dNTP mix, 0,3 µl de 50 ng/µl de cebador MseI, 0,05 µl de cebador PstI, y 6,01 µl de H₂O. El producto amplificado de cada muestra se agrupó y se mezcló. Se purificaron 125 µl del producto agrupado con un kit de limpieza de reacciones enzimáticas MinElute (Qiagen), eluyó en 15 µl y se corrió en

un gel de agarosa al 1,5%. El ADN de 200 pb a 800 pb y se purificó con el MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). La biblioteca se diluyó a 10 nM y se secuenció en el HiSeq 4000 (1 x 100 pb) (University de Oregón).

Identificación de SNPs

La muestra con el mayor número de lecturas (14.228.772) se utilizó para generar el ensamblado de contigs mediante scripts Perl personalizados. Las lecturas de referencia se alinearon con los nuevos clústeres utilizando BWA v0.6.1 (Li & Durbin, 2009), para poder eliminar las regiones repetitivas y altamente homólogas, y se estableció un número máximo de cuatro haplotipos por clúster. Tras el control de calidad FastQC, quedó un total de 14.047.926 lecturas para esta muestra. Se utilizó BOWTIE v1.1.1 (Langmead et al., 2009) para el alineamiento de las muestras con los clusters de referencia, con una profundidad de cobertura de 5x a 1500x y alcanzando una alineación media del 51%. Los SNP se identificaron utilizando tres niveles de rigor utilizando SAMTOOLS v0.1.16 (Li et al., 2009): “relaxed”, “estándar” y “stringent”, que variaron en términos de tasa mínima de identificación SNP, profundidad de secuenciación y calidad del genotipo. Otros parámetros utilizados para la identificación de SNP fueron: puntuación mínima de calidad FASTQ = 20, frecuencia alélica menor = 0,2, distancia mínima libre de otras variantes = 50. El número total de variantes descubiertas fue de 374.540, tras aplicar cada uno de los tres filtros se optó por continuar el análisis de resultados con los datos de variantes retornadas por el filtro “stringent”, con un total de 74,052 (Lasalle et al., 2021; artículo técnico mostrado en este capítulo).

Selección de marcadores SNP obtenidos de RAD-seq

La selección de los SNPs se realizó junto con un equipo de genetistas de la Sección de Bioestadística aplicada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Chile dirigido por el Dr.

José Manuel Yáñez. Para ello se realizó el análisis bioinformático donde se utilizaron los genotipos y fenotipos para realizar la asociación de los k-meros (secuencia nucleotídica correspondiente en la cual se produce la variante) y las variantes obtenidas con el sexo correspondiente. Los marcadores fueron evaluados mediante el uso del test de Fisher para saber si su asociación era estadísticamente significativa con machos o hembras. Aquellos marcadores con un p-valor $< 0,05$ fueron retenidos para continuar con el estudio. Teniendo en cuenta nuestra hipótesis, apoyada por las experimentales más relevantes, se propone que el esturión tendría un sistema de determinación del tipo ZZ/ZW donde el sexo heterogamético es el femenino, de allí se hizo hincapié en la selección de aquellos marcadores que se mostraron homocigotos para machos y heterocigotas para hembras. Una vez seleccionado cada marcador que referencia a una variante específica, se identificó el k-mero al cual se asocia, y allí se identificó a su vez la posición del nucleótido para el cual el SNP resulta significativo. Cada k-mero tiene una secuencia total de 95 pares de bases (pb). A partir de estos se diseñaron los cebadores correspondientes para cada uno de los marcadores SNP significativos, para posteriormente evaluar su capacidad de distinguir machos de hembras mediante HRM. Las condiciones evaluadas anteriormente mencionadas para los marcadores se pueden ver en la tabla MS 2.1 (sistema ZZ/ZW) en el material suplementario. Se seleccionaron los primeros 25 marcadores significativos asociados a un sistema ZZ/ZW para realizar las HRM.

Análisis del primer transcriptoma para identificación demarcadores SNPs y puesta a punto de HRM

El transcriptoma generado por nuestro laboratorio y publicado por Klopp et al., (2020a), nos permitió identificar algunos SNPs. Estos marcadores no fueron asociados con una condición en particular, pero fueron el primer paso que permitió probar la técnica de HRM con SNP de esturión junto al Dr. Cristian Araneda del Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía de la

Universidad de Chile. Igual que mencionamos anteriormente, para estos marcadores se diseñaron cebadores sobre las secuencias que contenían a las variantes, secuencias con las que contábamos en nuestro transcriptoma. Luego de haber probado esta técnica en Chile, durante la pandemia se puso a punto utilizando los equipos de PCR del Laboratorio de Animales de producción de Facultad de Veterinaria (Dra. Ana Meikle) y del Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Dra. Susana González).

Diseño de cebadores para análisis de HRM

Teniendo las secuencias de los k-meros seleccionados con variantes asociadas como potenciales marcadores del sexo, y la posición de los SNPs significativos, se diseñaron los cebadores de forma de que la posición del SNP de interés quedara flanqueada por estos. De esta manera el objetivo fue poder amplificar la región que contiene únicamente ese SNP en forma diferencial entre sexos y así poder identificar esa pequeña diferencia entre secuencias por HRM. Es importante remarcar que existen otros SNPs identificados que no son significativos pero que pueden estar presentes en las secuencias en análisis, es por esto que siempre que fue posible se buscó también que esos SNPs “secundarios” no quedaran contenidos en las secuencias que amplifican los cebadores diseñados. Teniendo en cuenta ese punto, se diseñaron cebadores para los 24 k-meros con potencial de ser marcadores del sexo a nivel genético.

High Resolution Melting (HRM)

La técnica de High Resolution Melting se realizó utilizando un termociclador marca Corbett modelo rotor gene 6000 con capacidad de realizar HRM. El mix utilizado para cada muestra se compuso de: 6 µl de Mix específico para HRM SensiFAST de la marca Bioline, que contiene el

marcador “Eva Green”, dNTPs, estabilizadores y potenciadores de reacción; 0,12 µl de cebadores Fw y Rv (concentración final 0.6 µM); 5,01 µl de H₂O ultrapura; y 1 µl de ADNg (~20 ng/µl). El programa de corrida fue 1 ciclo de calentamiento de 3 minutos a 95°C, una etapa de ciclos de 95°C, 5 segundos y otro 60°C y 30 segundos que se repite 40 veces, en este punto realiza una toma de datos (“acquiring”). Finalmente, se realiza la etapa de HRM con los siguientes parámetros para la fase de curva de fusión: temperatura de la rampa de 70 a 95°C incrementando de a 0,1°C, con espera en la etapa de inicio “prefusión” de 90 segundos, y con una espera de dos segundos entre cada paso de medición de la curva de fusión. Los parámetros de la etapa de fusión de HRM refiere a la metodología indicada por el fabricante y es específica para el termociclador Corbett Rotor Gene 6000 utilizado. Las curvas obtenidas también se analizaron con el programa del termociclador Corbett para identificar posibles diferencias existentes entre curvas de hembras y de machos. Los mejores marcadores fueron seleccionados en función de la capacidad de separar las curvas entre sexos, esos marcadores seleccionados fueron probados sobre más muestras de ADNg de alta calidad, más específicamente sobre otros 27 machos y 42 hembras para comprobar su capacidad para distinguir sexos mediante las curvas. Todas las HRM iniciales se evaluaron sobre un total de 12 machos y 12 hembras.

Resultados

Los primeros SNPs obtenidos del transcriptoma gonadal fueron probados y utilizados únicamente para la puesta a punto de la técnica en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. El trabajo con estos marcadores como ya se mencionó fue de gran importancia para este trabajo por ser la primera vez que se probó la HRM sobre SNPs de esturión, y necesario además para tener la experiencia a nivel técnico y luego realizar las HRM en el laboratorio en Uruguay.

De los k-meros obtenidos de RAD-seq que resultaron mostrar SNPs estadísticamente asociados a un sexo y ser heterocigotas hembras y homocigotos machos (siguiendo la hipótesis de determinación del sexo en el siberiano del tipo ZZ/ZW), se seleccionaron los 25 mejores marcadores, dos de ellos presentes en un mismo k-mero, por lo que las secuencias analizadas fueron un total de 24 (Tabla 2.2). Es relevante mencionar que ninguno de los marcadores resultó ser heterocigoto para todas hembras y homocigoto para todos los machos simultáneamente como se esperaba para el caso de un marcador del sexo a nivel genético. Las HRM realizadas resultaron en curvas de fusión que mostraron diferentes patrones para los marcadores analizados. Tras el análisis de estas, únicamente uno de ellos (RAD-kmer 0219735) tuvo inicialmente una mejor capacidad de distinguir y agrupar las curvas de fusión de hembras por un lado y de machos por otro, sin embargo, en ninguno de los casos obtuvimos un marcador que lograra generar curvas que separaran los sexos en la totalidad de los individuos (Figuras 3.2; 4.2; 5.2). El k-mero que consiguió un mejor porcentaje de separación de sexos clasificó correctamente al 83% de las hembras y a un 50% de los machos, sin embargo, cuatro de los machos iniciales estudiados del total de 12 se agruparon junto con las hembras (Figura 6.2). Este k-mero, por su muy buena agrupación de hembras y una correcta separación de machos, fue reevaluado con un total de 27 machos y 42 hembras más, para confirmar que esa capacidad de identificación de sexos se mantuviera, y así tener al menos un marcador con una capacidad parcial, pero buena, de identificación del sexo. Los resultados mostraron que ese marcador en particular tampoco logró generar una separación lo suficientemente potente como para poder utilizarlo como un marcador del sexo relevante. En este caso se observó nuevamente la generación de dos curvas de fusión, en la superior se agruparon 12 hembras (44%) y 14 (33%) machos, y en la inferior 15 hembras (56%) y 28 machos (66%) (Figura 7.2).

Tabla 2.2. 24 k-meros con marcadores “femeninos” seleccionados luego del estudio de los resultados de RAD-seq. Se indica para cada sexo si se encuentra la variante como heterocigota u homocigota.

	Hembras	Machos
	AB/BB	AB/BB
RAD_kmer_0176660	12;0	2;10
RAD_kmer_0249848	10;2	0;12
RAD_kmer_0105121	11;1	1;11
RAD_kmer_0174251	11;1	1;11
RAD_kmer_0174504	11;1	1;11
RAD_kmer_0256319	9;3	0;11
RAD_kmer_0037470	12;0	3;9
RAD_kmer_0117530	12;0	3;9
RAD_kmer_0130854	12;0	3;9
RAD_kmer_0160755	12;0	3;9
RAD_kmer_0278868	12;0	3;9
RAD_kmer_0038373	11;1	2;10
RAD_kmer_0102300	10;2	11;1
RAD_kmer_0148003	11;1	2;10
RAD_kmer_0161260	11;1	2;10
RAD_kmer_0207081	11;1	2;10
RAD_kmer_0049377	12;0	4;8
RAD_kmer_0105468	12;0	4;8
RAD_kmer_0121488	12;0	4;8
RAD_kmer_0132424	12;0	4;8
RAD_kmer_0219735	12;0	4;8
RAD_kmer_0219735	12;0	4;8
RAD_kmer_0237882	12;0	4;8
RAD_kmer_0259397	12;0	4;8
RAD_kmer_0011868	8;4	0;12

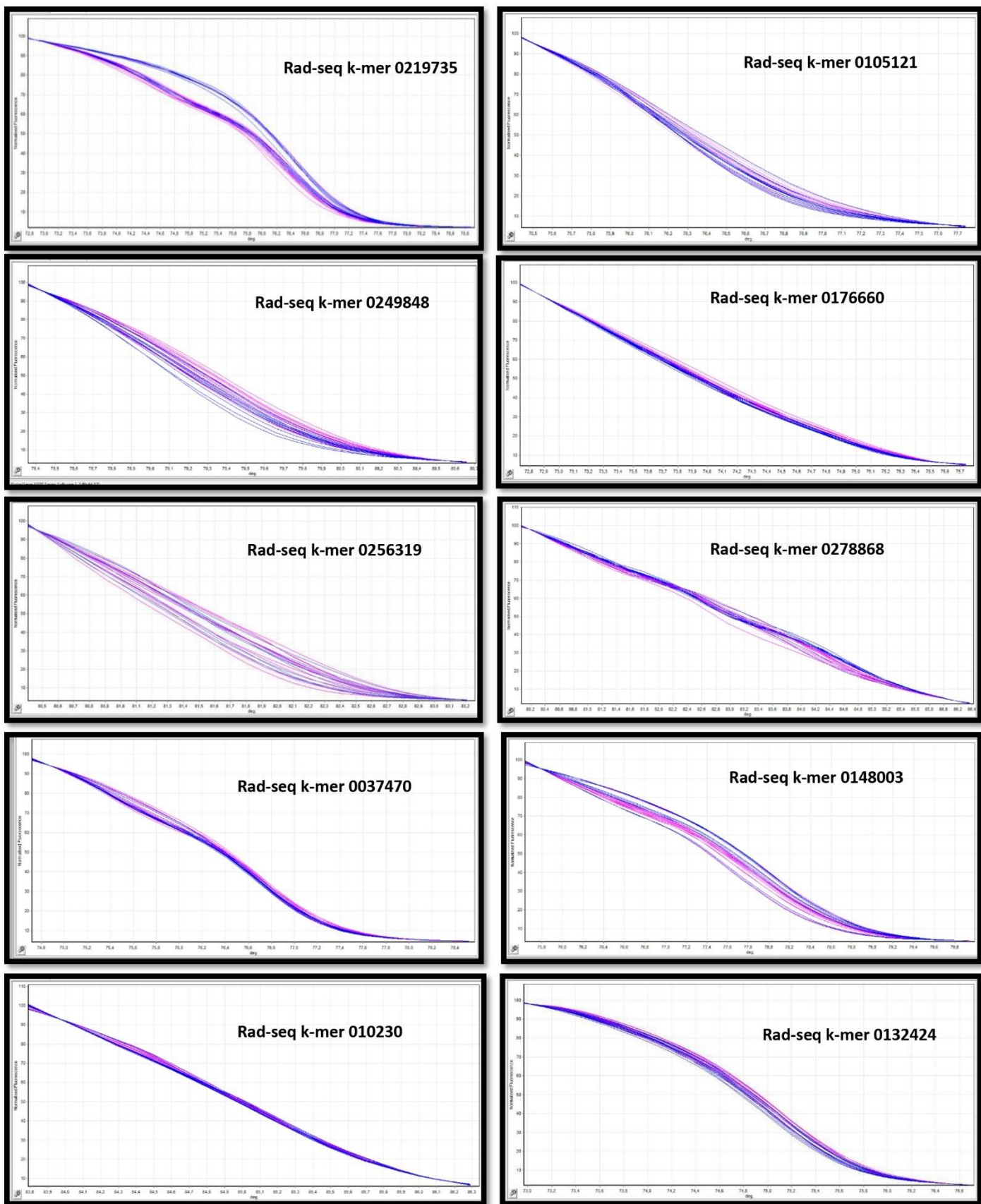


Figura 3.2. Curvas de fusión obtenidas de HRM de k-meros con SNPs asociados en forma diferencial de manera heterocigota en hembras esturión siberiano. En azul se muestran las curvas obtenidas de la amplificación de muestras de machos y rosado las curvas obtenidas de hembras

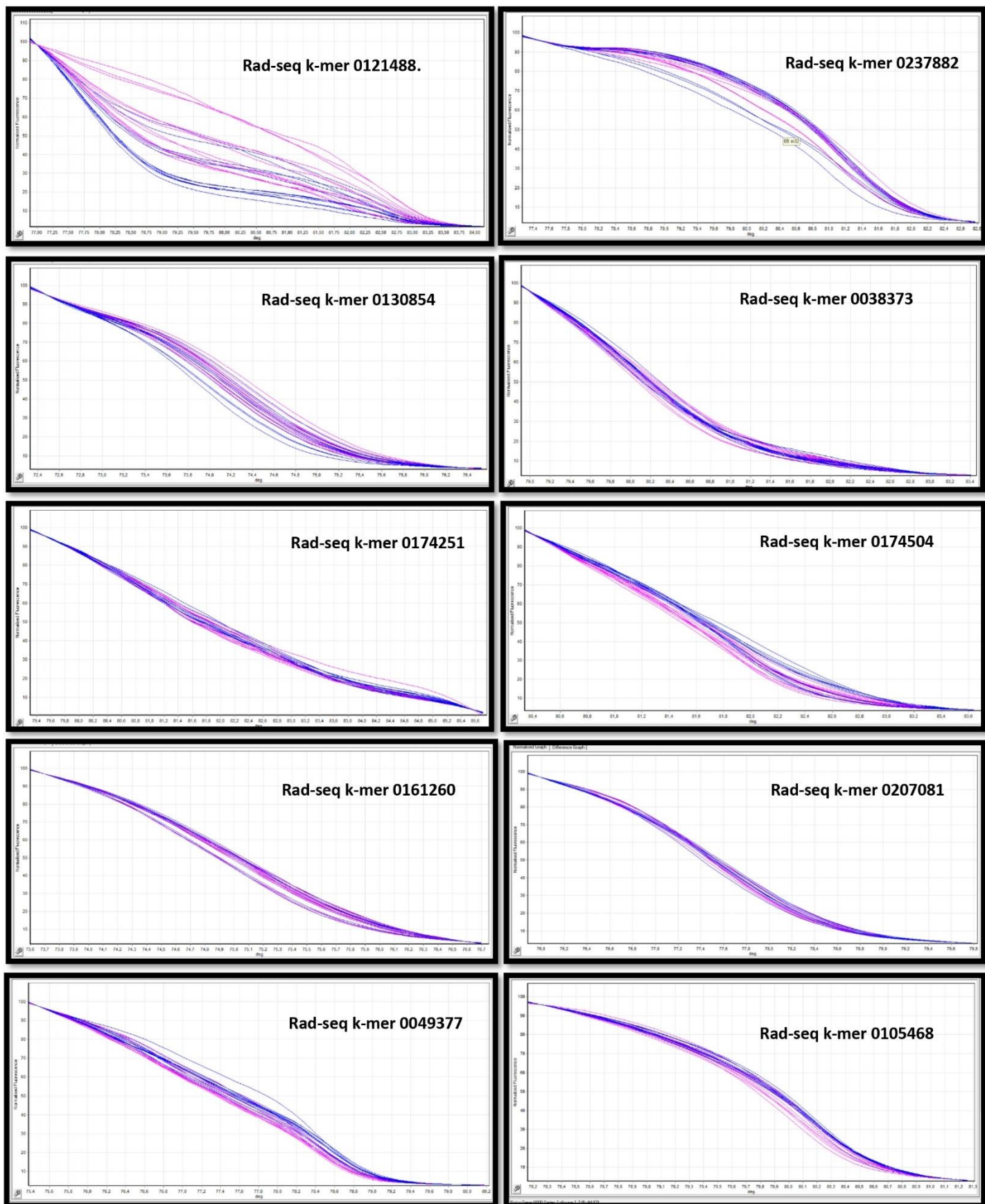


Figura 4.2. Curvas de fusión obtenidas de HRM de k-meros con SNPs asociados en forma diferencial de manera heterocigota en hembras esturión siberiano. En azul se muestran las curvas obtenidas de la amplificación de muestras de machos y rosado las curvas obtenidas de hembras

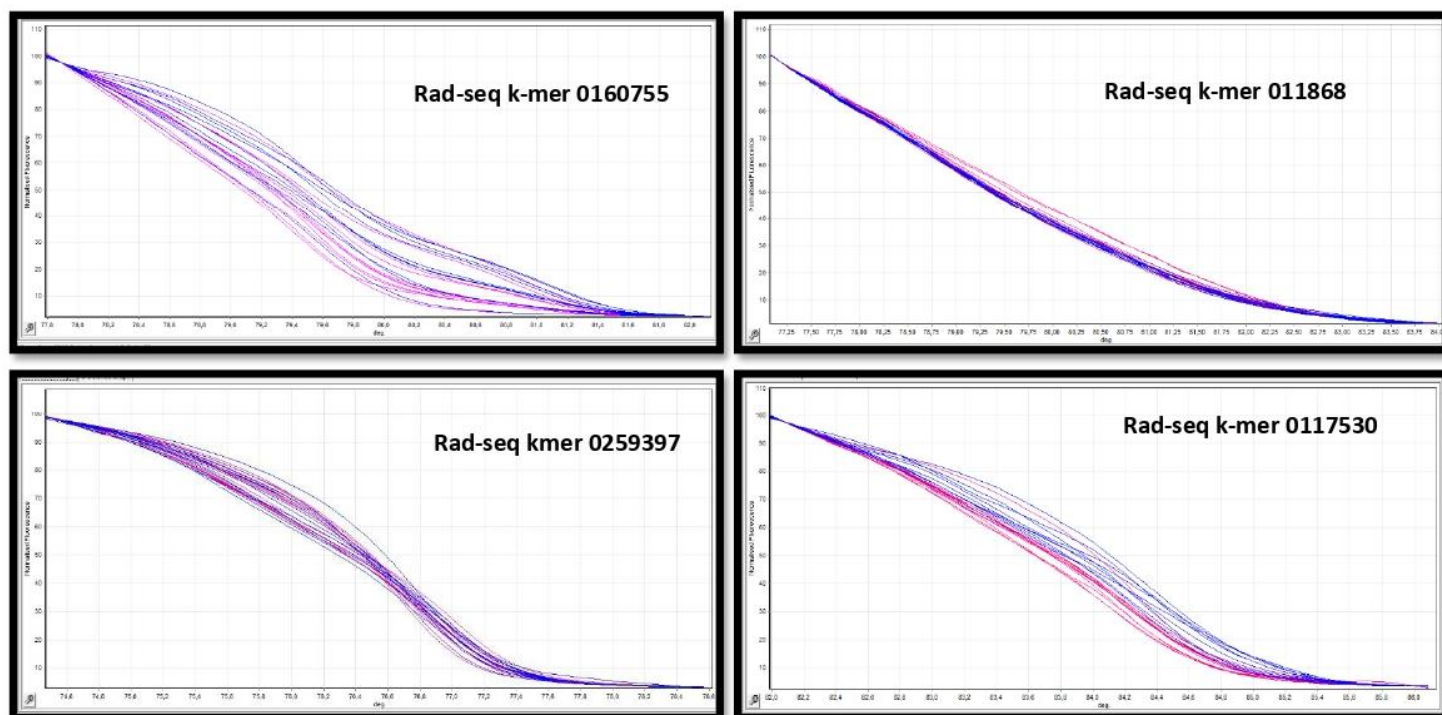


Figura 5.2. Curvas de fusión obtenidas de HRM de k-meros con SNPs asociados en forma diferencial de manera heterocigota en hembras esturión siberiano. En azul se muestran las curvas obtenidas de la amplificación de muestras de machos y rosado las curvas

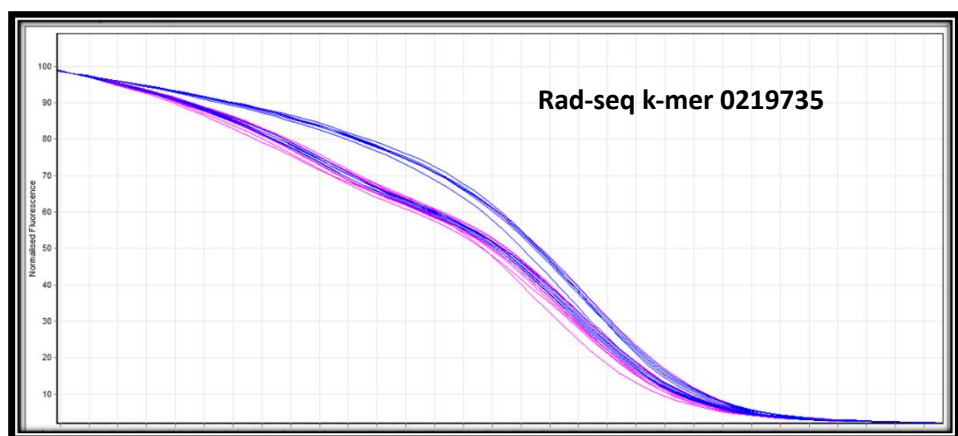


Figura 6.2. Curva de fusión obtenidas de HRM para el k-mero RAD-seq 0219735. En azul se muestran las curvas obtenidas de la amplificación de muestras de machos y rosado las curvas obtenidas de hembras. 11 hembras se agruparon juntas (AB), 1 hembra se clasificó como una Variante y 1 como BB (agrupada con machos). Para los machos 6 se agruparon como BB, 2 como Variantes y 4 como AB (agrupados con las hembras). AB hace referencia a la variante hallada como heterocigota, BB hace referencia a la variante encontrada en homocigosis; Variante hace referencia a la generación de una curva que no coincide con las generadas por un tipo AB o BB. La tabla muestra el resultado del análisis sobre las curvas de fusión de HRM para el k-mero 0219735. Se observa el nombre de la muestra utilizada (H indica hembras; M indica machos), el genotipo y la confianza asignados por el análisis de pertenecer a un grupo en particular (ZW/ZZ) (%). La "referencia" indica cual muestra utilizó el programa como base para realizar la identificación del resto. En rosado Hembras correctamente clasificadas; en azul Machos correctamente clasificados, en naranja muestras incorrectamente clasificadas y en negro variaciones (no clasificadas ni como ZW ni como ZZ)

	Muestra	Genotipo	Confianza de ID (%)
	H16	zw	96,22
	H17	zw	90,08
	H19	zw	97,32
	H20	zz	98,67
	H21	zw	96,9
	H22	Variación	
	H23	zw	91,53
	H24	zw	91,35
	H25	zw	96,49
	H27	zw	99,76
referencia	H28	zw	100
	H29	zw	96,72
	M16	zw	97,79
	M18	zw	97,5
	M22	zz	97,5
referencia	M23	zz	100
	M25	zz	97,46
	M26	zz	98,62
	M27	zw	90,43
	M30	zw	90,02
	M31	Variación	
	M32	zz	97,8
	M33	Variación	
	M34	zz	98,66

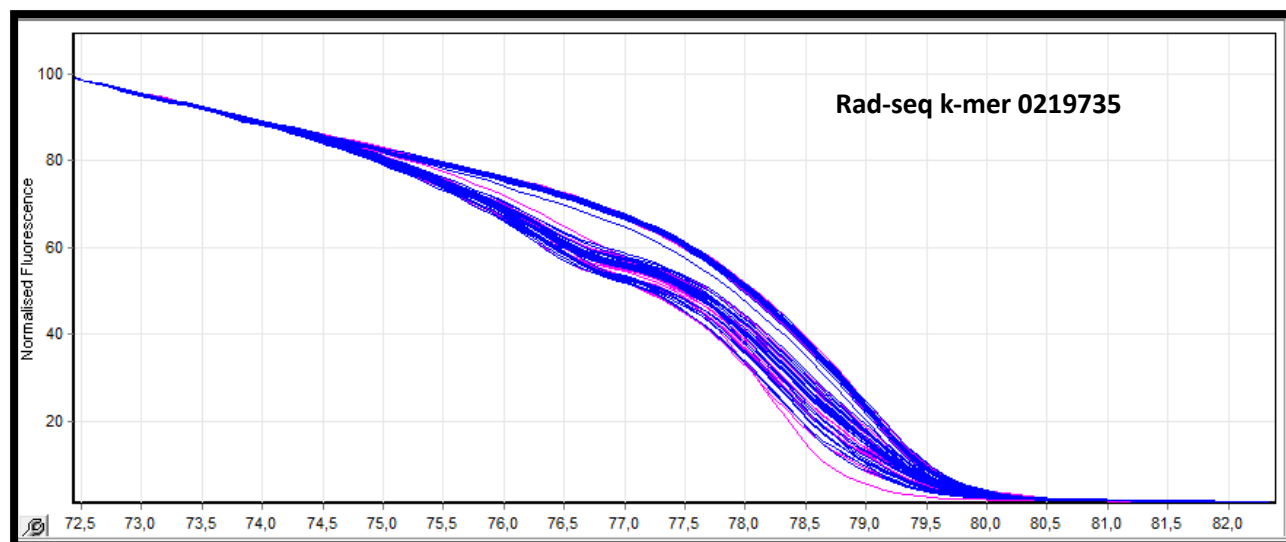


Figura 7.2. Curva de fusión obtenidas de HRM para el k-mero de RAD-seq 0219735 utilizando 27 hembras y 42 machos. En azul se muestran las curvas obtenidas de la amplificación de muestras de machos y rosado las curvas obtenidas de hembras.

Discusión

La capacidad de distinguir sexos en las diferentes especies de esturión y en particular en el esturión siberiano es un objetivo clave para las futuras investigaciones. La posibilidad de avanzar en forma rápida y clara tanto en lo que refiere al conocimiento básico de los procesos biológicos como en investigaciones para el sector productivo tiene una base sólida en la capacidad de poder sexar a los individuos desde etapas muy tempranas del desarrollo. De allí es que la técnica de HRM para la identificación de SNPs asociados al sexo obtenidos de la secuenciación del ADN genómico de machos y hembras mediante la técnica de RAD-seq se postula como una herramienta relevante para obtener un marcador genético del sexo que permita resolver la incógnita. Esta técnica en particular ha sido útil para resolver diversas problemáticas que se plantearon en cuanto a la identificación de rasgos particulares dentro de diferentes especies. En peces en particular se ha utilizado el RAD-seq para identificar marcadores asociados a la capacidad de resistir enfermedades producidas por parásitos (Correa et al., 2017) y otras, por ejemplo, la enfermedad piscirickettsia

(Barría et al., 2018) producida por una bacteria, siendo esta enfermedad una de las más importantes a nivel de la piscicultura de salmones, y relevante por la generación de pérdidas económicas millonarias en la industria. En estos, la comparación entre peces que muestran resistencia a la enfermedad contra otros que son afectados permitió encontrar marcadores que identifican la base genética de esa resistencia. Esto puede luego ser utilizado para seleccionar en nuevas cohortes individuos resistentes a estas enfermedades. También se han buscado y encontrado marcadores del tipo SNP para seleccionar individuos que tengan un crecimiento más rápido que una población promedio (Gutiérrez et al., 2015), por ejemplo, en salmón o en el mero (Wang et al., 2019). Todos estos marcadores son seleccionados dentro de un panel de SNPs producido a partir de un secuenciado masivo por la técnica de RAD-seq. Hasta el momento, sin embargo, pocos estudios de este tipo fueron utilizados con el fin de identificar un marcador del sexo en una especie de pez, pero esta técnica ha resultado exitosa para sexar algunas especies de peces, por ejemplo, para *Sebastes chrysomelas* y *Sebastes carnatus* (Fowler & Buonaccorsi, 2016; Gamble, 2016). En el actual estudio particularmente, se logró realizar una secuenciación exitosa con una gran calidad y profundidad, ya que se utilizaron cuatro réplicas por muestra. Este diseño experimental llevo a la producción de un panel de más de 74000 SNPs (artículo del presente capítulo adjunto; Lasalle et al., 2021). Los marcadores asociados al sexo y seleccionados en relación con el sistema ZZ/ZW postulado como el utilizado por los esturiones para determinar su sexo, no fueron eficientes para poder definir el sexo de los individuos mediante el uso de HRM. Existen varios puntos a ser considerados cuando se analiza la causa del fallo de esta técnica para encontrar un marcador genético del sexo. Uno de los puntos principales es que el esturión siberiano es un organismo que consta con un genoma extremadamente grande y complejo. El esturión siberiano es tetraploide y cuenta con 246 cromosomas (Mugue & Barmintseva, 2018; Peng et al., 2007; Rajkov et al., 2014), y un peso de genoma de 8,3 pg (4,2Gb) (Bytyutskyy et al., 2012; Klopp et al., 2020b; Zhou et al., 2011). Esto

hace que esta especie cuente con gran cantidad de duplicaciones y elementos que complican la posibilidad de encontrar un marcador genético específico asociado al sexo, así como tampoco lo pudo encontrar el equipo de Du et al., (2020) en un trabajo similar utilizando la misma técnica, y donde plantea además la enorme similaridad que existe entre el genoma de macho y hembra con muy poca diferenciación, en conjunto esto hace casi imposible que una herramienta de representación reducida del genoma como lo es RAD-seq pueda ser muy efectiva. En la misma línea se debe mencionar que más allá de los marcadores significativos que se identificaron, también se encontraron una enorme cantidad de SNP que no fueron seleccionados como significativos a nivel estadístico en su asociación con el sexo, pero que están presentes en las mismas secuencias que los que fueron de interés. Estos SNPs que podremos llamar secundarios son un gran problema a nivel técnico. Las secuencias de los k-meros secuenciados tienen apenas 95 pares de bases entre las cuales se encuentra el SNP significativo, es decir el que podría actuar como marcador genético del sexo, sin embargo, en prácticamente todas las secuencias de los k-meros existen uno o más SNPs secundarios (ver MS 2.2) que al momento de realizar las HRM generan diferencias en las temperaturas de las curvas fusión, suficiente para no poder obtener curvas consistentes para cada sexo. Debido a esto existe la posibilidad de que algunos de los SNPs seleccionados a partir de nuestro estudio de RAD-seq puedan funcionar como marcadores genéticos del sexo, pero que la técnica (HRM) utilizada para revelar esa capacidad haya sido empañada por estos SNPs secundarios que generan curvas de fusión que no están únicamente asociadas a la presencia del SNP significativo, que sería lo deseado. El tamaño de los k-meros no es lo suficientemente grande como para permitir en todos los casos realizar juegos de cebadores que permitan aislar en el producto a amplificar al SNP significativo, sin amplificar ningún otro, y esto es uno de los mayores problemas. El avance de la técnica está consiguiendo generar secuencias (k-meros) más largas, actualmente las salidas de RAD-seq generadas son 150 pb, esto es, un 50% más grandes de lo que se secuenció en el actual

trabajo, y otorga al investigador la posibilidad de tener una región más amplia para el diseño de cebadores para amplificar la región con SNPs significativos buscando eliminar cualquier otro. Es de destacar que en el mismo año en el cual se publica este artículo técnico (2021) un grupo de colegas europeos que trabajaron en el secuenciado y ensamblado del genoma del esturión sterlet (*Acipenser ruthenus*) encontraron un marcador del sexo genético exclusivo de las hembras y lo publicaron (Kuhl et al., 2021). El marcador descubierto sirve como marcador del sexo de diversos esturiones incluyendo nuestra especie de estudio *Acipenser baerii*. Esto permitió retornar a los estudios de expresión génica (qPCR) en gónadas muy pequeñas de individuos de 2,5 meses de edad completamente indiferenciados a nivel gonadal y ensayar sobre diversos genes de la diferenciación sexual. Los resultados de estos trabajos de expresión génica son presentados en el Capítulo 3a.

Conclusiones del Capítulo 2.

Más allá de que la técnica no fue efectiva para la identificación de un marcador genético del sexo, fue el primer trabajo en publicar una base de datos de más de 74000 SNPs de alta calidad obtenidos de la secuenciación de machos y hembras para cualquier especie de esturión (ver artículo técnico, Lasalle et al., 2021) y un primer acercamiento a la técnica que permite tener nuevas perspectivas para mejorar las estrategias para próximas oportunidades donde se generen estudios de RAD-seq.

Bibliografía

- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(6-7), 910-931.
- Baroiller, J., & D'cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 130(4), 399-409.
- Barría, A., Christensen, K. A., Yoshida, G. M., Correa, K., Jedlicki, A., Lhorente, J. P., . . . Yáñez, J. M. (2018). Genomic predictions and genome-wide association study of resistance against *Piscirickettsia salmonis* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using ddRAD sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(4), 1183-1194.
- Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedo, G., Brunet, F., Volff, J. N., & Vizziano-Cantonnet, D. (2012). Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction and Development*, 79(8), 504-516.
- Bytyutskyy, D., Srp, J., & Flajšhans, M. (2012). Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(5), 704-708.
- Conover, D. O., & Fleisher, M. H. (1986). Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(3), 514-520.
- Correa, K., Lhorente, J. P., Bassini, L., López, M. E., Di Genova, A., Maass, A., . . . Yáñez, J. M. (2017). Genome wide association study for resistance to *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using a 50K SNP genotyping array. *Aquaculture*, 472, 61-65.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191-364.
- Du, K., Stöck, M., Kneitz, S., Klopp, C., Woltering, J. M., Adolphi, M. C., . . . Kichigin, I. (2020). The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. *Nature Ecology and Evolution*, 4, 841-852.
- Flynn, S., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D., & Benfey, T. (2006). Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, 253(1), 721-727.
- Fopp-Bayat, D. (2010). Induction of diploid gynogenesis in Wels catfish (*Silurus glanis*) using UV-irradiated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 313(1), 24-27.
- Fowler, B. L. S., & Buonaccorsi, V. P. (2016). Genomic characterization of sex-identification markers in *Sebastes carnatus* and *Sebastes chrysomelas* rockfishes. *Molecular Ecology*, 25(10), 2165-2175.
- Gamble, T. (2016). Using RAD-seq to recognize sex-specific markers and sex chromosome systems. In: Wiley Online Library.
- Gutierrez, A. P., Yáñez, J. M., Fukui, S., Swift, B., & Davidson, W. S. (2015). Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PloS One*, 10(3), e0119730.
- Keyvanshokoo, S., & Gharaei, A. (2010). A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research*, 41(9), e1-e7.

- Khodaparast, M., Keyvanshokoo, S., Pourkazemi, M., Hosseini, S., & Zolgharnein, H. (2014). Searching the genome of beluga (*Huso huso*) for sex markers based on targeted Bulk Segregant Analysis (BSA). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 12(2), 185-195.
- Klopp, C., Cabau, C., Greif, G., Lasalle, A., Di Landro, S., & Vizziano-Cantonnet, D. J. D. (2020b). Siberian sturgeon multi-tissue reference transcriptome database. *Database*, 2020.
- Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., & Vizziano-Cantonnet, D. (2020a). RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon. *Data in Brief*, 105741.
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., . . . Stöck, M. (2021). A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200089.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10, 1-10.
- Lasalle, A., Norbis, W., & Vizziano-Cantonnet, D. (2021). Sex identification of morphologically-undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns. *Journal of Applied Ichthyology*, 37(6), 835-846.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Genome Project Data Processing, S. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Mugue, N., & Barmintseva, A. (2018). Genetic Variability in Wild Populations and Farmed Broodstocks of the Siberian Sturgeon in Russia. In P. Williot, G. Nonnotte, & M. Chebanov (Eds.), *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 - Farming* (pp. 347-369).
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*: John Wiley & Sons.
- Ogden, R., Gharbi, K., Mugue, N., Martinsohn, J., Senn, H., Davey, J. W., . . . Congiu, L. (2013). Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing. *Molecular Ecology*, 22(11), 3112-3123.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., & Yamauchi, K. (2005). Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*, 245(1), 39-47.
- Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wei, Q., & He, S. (2007). Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 854-862.
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16-34.
- Rajkov, J., Shao, Z., & Berrebi, P. (2014). Evolution of polyploidy and functional diploidization in sturgeons: microsatellite analysis in 10 sturgeon species. *Journal of Heredity*, 105(4), 521-531.
- Rubin, D. A. (1985). Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 233-235.
- Saber, M. H., & Hallajian, A. (2014). Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture international*, 22(1), 273-279.

- Sanfilippo, G. E., Riedy, J. J., Larson, D. L., & Scribner, K. T. (2022). Multi-year evidence of unbiased sex ratios in hatchery and wild-reared age-0 lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 48(5), 1306-1313.
- Truong, H. T., Ramos, A. M., Yalcin, F., de Ruiter, M., van der Poel, H. J., Huvenaars, K. H., . . . van Orsouw, N. J. J. P. o. (2012). Sequence-based genotyping for marker discovery and co-dominant scoring in germplasm and populations. *PLoS One*, 7(5), e37565.
- Van Eenennaam, A., Van Eenennaam, J., Medrano, J., & Doroshov, S. (1999). Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, 90(1), 231-233.
- Van Eenennaam, A. L. (1997). Genetic Analysis of the Sex Determination Mechanism of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *University of California, Davis*.
- Vizziano-Cantonnet, D., Benech-Correa, G., & Lasalle, A. (2025). Estradiol-17 β but not 11 β -hydroxyandrostenedione induces sex transdifferentiation in Siberian sturgeon. *Aquaculture*, 741735.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., & Lasalle, A. (2018a). Sex Determination and Differentiation of the Siberian Sturgeon. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology* (pp. 93-113).
- Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., & Genthon, C. (2018b). De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and Comparative Endocrinology*, 268, 96-109.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 19-36.
- Wang, X., Jiang, S., Zheng, L., Xiao, L., Zhang, X., Wang, D., . . . Lin, H. (2019). An SNP-based genetic map and QTL mapping for growth traits in the red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Genes*, 10(10), 793.
- Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., . . . Zane, L. (2006). Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*, 258(1), 685-688.
- Zhou, H., Fujimoto, T., Adachi, S., Yamaha, E., & Arai, K. (2011). Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of *Acipenseriformes*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 484-491.

Artículo Técnico publicado (Lasalle et al., 2021)

Desarrollo de un panel SNP denso para el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) utilizando RAD-seq de alta profundidad

Resumen

Los esturiones son peces comercialmente importantes para la producción de caviar. Actualmente están en peligro de extinción debido a la sobrepesca, la contaminación de los ríos y la acción humana. Hemos generado un panel de SNP > 74 K de alta calidad realizado a partir de muestras obtenidas de hembras y machos de *Acipenser baerii*, utilizando un enfoque RAD-seq de alta profundidad. Este panel de SNPs facilitará muchos tipos de estudios genéticos, incluido el análisis genómico de alta resolución. Estos datos pueden utilizarse para desarrollar estrategias de conservación de las poblaciones salvajes y mejorar la producción de caviar de acuicultura.



Development of a dense SNP panel for the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using high-depth RAD-seq

André Lasalle¹ · Pablo Cáceres² · Tamara Montenegro² · Cristian Araneda³ · José Yáñez² · Denise Vizziano-Cantonnet¹

Received: 19 July 2021 / Accepted: 10 November 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Sturgeons are fish commercially important for caviar production. They are endangered in the wild due to overfishing, river pollution, and human action. We have generated a high-quality > 74 K SNP panel from female and male *Acipenser baerii* using a high-depth RAD-seq approach. This SNP panel will facilitate many types of genetic studies, including high-resolution genomic analysis. This data can be used to develop strategies to conserve wild populations and improve aquaculture caviar production.

Keywords Siberian sturgeon · SNPs · RAD sequencing · Database

The Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, is an ancient fish that faces critical conservation problems (Sokolov and Vasil'ev 1989; Birstein 1993). This long-lived and late-maturing species has been severely affected by compounding anthropogenic factors and years of overfishing. The International Union for Conservation of Nature (IUCN) classifies the species as endangered.

A highly-informative SNP panel for this species would be useful for population-level and quantitative genetic studies to assess genetic diversity, evaluating population structure, and mapping genes that control biologically, ecologically, and economically-important traits. Here, we present a genome-wide SNP panel for male and female *A. baerii* developed using RAD-seq.

Muscle samples of adult male and female of *A. baerii* (6 years old) were collected at sturgeon farm (Uruguay) during the caviar and meat production. Total length $\pm$ SD was 104 ± 5.5 cm for females and 102 ± 5.3 cm for males. Total weight of males was 4.3 ± 0.7 kg.

DNA extraction has been made using the “Blood and Tissue” kit from Qiagen. Sample concentration was measured using Qubit and brought to a final concentration of 20 ng/ μ l. DNA integrity was assessed on a 1% agarose gel.

The RAD-seq library preparation and sequencing was done by Floragenex (FL, USA), according to Truong et al. (2012). Briefly, ~ 125 ng of genomic DNA from 24 fish (plus a control) was digested for 120 min at 37 °C in a 20 μ l reaction with 20 units (U) of *Pst*I and 2.75 U of *Mse*I (New England Biolabs), 4.0 μ l RL Buffer A (Keygene), 3.325 μ l RL Buffer B (Keygene), and water. After digestion, samples were heat-inactivated for 10 min at 80 °C followed by addition of 2.5 μ l of 1 μ M P1 adapter and 0.1 μ l of 250 μ M *Mse*I adapter. *Pst*I P1 adapters each contained a unique multiplex sequence index (barcode). P1 and P2 adapters were added to each sample along with 1 μ l RL Buffer A (Keygene), 0.83 μ l RL Buffer B (Keygene), 0.5 μ l 10 mM ATP, T4 DNA Ligase (high concentration [HC], Enzymatics, Inc), 0.3125 U *Mse*I, 0.25 U *Pst*I in a final volume of 25 μ l which was then incubated at 37 °C for 180 min.

Samples were diluted 1:10 in water and 2.5 μ l of this product was used in a PCR amplification with 10 $\times$ PCR Buffer 1 (Applied Biosystems), 0.2 U AmpliTaq DNA

✉ Denise Vizziano-Cantonnet
vizziano@gmail.com

¹ Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Iguaú 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

² Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Av Santa Rosa, 11735, La Pintana, Santiago, Chile

³ Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Avenida Santa Rosa 11315, Santiago, Chile

Polymerase (Applied Biosystems), 0.1 µl 20 nM dNTP mix, 0.3 µl of 50 ng/µl MseI primer, 0.05 µl of PstI primer, and 6.01 µl H₂O.

The amplified product from each sample was pooled and mixed thoroughly. 125 µl of the pooled product was purified with a MinElute Enzymatic Reaction Cleanup Kit (Qiagen), eluted in 15 µl, and run on a 1.5% agarose gel. DNA 200 bp to 800 bp was excised and purified with the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). The library was diluted to 10 nM and sequenced on the HiSeq 4000 (1 × 100 bp) (University of Oregon, Oregon).

A total of 281,733,815 reads were obtained, with an average of 11,269,352.6 reads *per* individual. The sample with the highest number of reads (14,228,772) was used to generate the contig assembly using custom perl scripts. The reads for the reference were aligned back to the newly made clusters using BWA v0.6.1 (Li and Durbin 2009), so repetitive and highly homologous regions could be removed, a maximum number of 4 haplotypes *per* cluster was set. After FastQC quality control, a total of 14,047,926 reads

Table 1 Filtering parameters, number of variants and quality metrics, and number of transitions and transversions obtained after applying three genotype quality filtering levels: relaxed, standard and stringent

	Relaxed	Standard	Stringent
Filtering parameters			
Call rate (%)	75	83	90
Minimum depth (x)	6	10	15
Minimum genotype quality	10	13	20
Variants and quality			
Variants retained	194,750	135,851	74,052
Average coverage (x)	65	85	127
Average genotype quality	207	273	417
Transitions			
A → G	123,010	85,697	46,959
C → T	50,974	35,014	19,216
Transversions			
G → T	72,036	50,683	27,743
A → C	76,334	52,690	28,195
A → T	24,371	16,901	8952
A → G	17,907	12,306	6591
A → T	20,194	13,810	7335
C → G	13,862	9673	5317

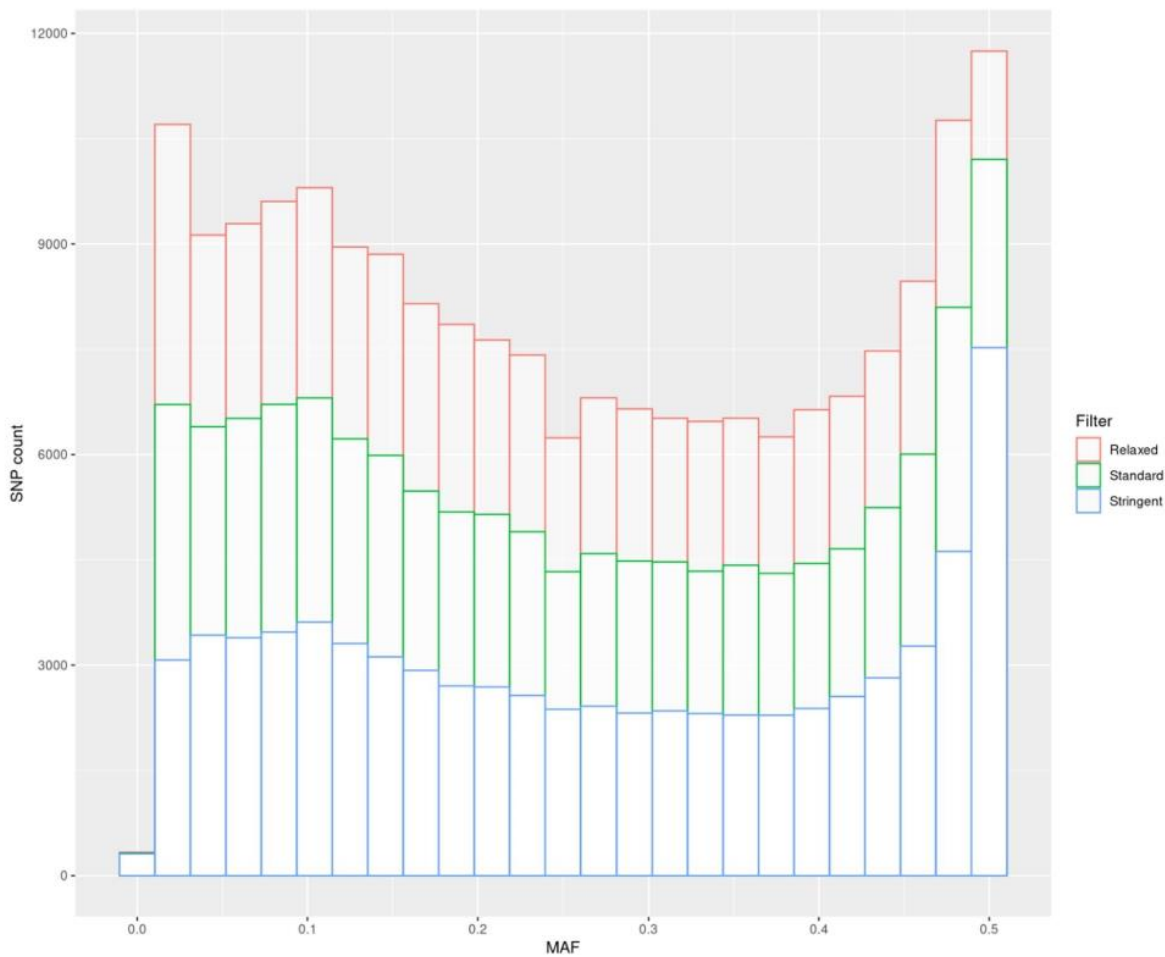


Fig. 1 Minor allele frequency (MAF) distribution according to three genotype quality filtering levels (relaxed, standard, and stringent)

remained for this sample. A total of 193,879 contigs were obtained. BOWTIE v1.1.1 (Langmead et al. 2009) was used for the alignment of samples to the reference clusters, with a coverage depth from $5\times$ to $1500\times$, and reaching an average alignment of 51%. SNP were called using three stringency levels using SAMTOOLS v0.1.16 (Li et al. 2009): relaxed, standard, and stringent, which varied in terms of minimum SNP call rate, sequencing depth, and genotype quality (Table 1). Other parameters used for SNP calling were: minimum FASTQ quality score = 20, minor allele frequency = 0.2, minimum distance free of other variants = 50. The total number of variants discovered was 374,540, and the numbers of variants after applying each of the three filters are shown in Table 1, along with average coverage and genotype quality and number of transitions and transversions. Figure 1 shows the minor allele frequency (MAF) distribution for the three genotype quality filtering levels.

Specific Tajima D values were calculated to assess the allele distribution and test neutrality of variants (Tajima 1989). Tajima D values ranged from -1.87 to 3.26 with an average of 0.96 . Relatedness between individuals was also estimated to provide informative statistics of kinship of sampled individuals (Supplementary Table 1).

This is a first study aimed at developing a genome-wide SNP panel in *A. baerii*. The markers presented will be a valuable resource for future population-level and quantitative genetic studies in this species.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01246-z>.

Acknowledgements Many thanks are due to Jessica Walsh and all the staff of Floragenex for their ample support during the development of the present data base and for all the technical details given for this publication. We are grateful to the Chief Executive Officer of Estuario del Plata, Economist Facundo Márquez, and the entire Estuario del Plata (Uruguay) staff for their ample support and kindness during this project. Many thanks are due to an anonymous reviewer whose suggestions helped to clarify this manuscript.

Author contributions Conceptualization: DV and CA; Methodology: DV, JMY, CA and AL; Formal analysis and investigation: JMY, TM, PC and AL; Writing—original draft preparation: AL, DV, JMY, TM and PC; Writing—review and editing: AL, DV, JMY, TM, PC; Funding acquisition: DV; Resources: DV; Supervision: DV.

Funding The work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación Project FMV_1_2017_1_135908.

Data availability Link to repository: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/776139>

Declarations

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

Ethical approval Research procedures involving animal experimentation complied with international principles on the use and care of laboratory animals and Uruguayan animal welfare regulations. The protocol was approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal CHEA of Uruguay (Authorization Number 24001 1-001997-19).

References

- Birstein VJ (1993) Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conserv Biol* 7:773–787. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1993.740773.x>
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Sokolov LI, Vasil'ev V (1989) *Acipenser ruthenus* LINNAEUS, 1758. In: Holcik J (ed) The freshwater fishes of Europe. AULA, Wiesbaden, pp 227–262
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3):585–595
- Truong HT, Ramos AM, Yalcin F, de Ruiter M, Van der Poel HJ, Huvenaars KH, Hogers RC, Van Enckevort LJ, Janssen A, Van Orsouw NJ (2012) Sequence-based genotyping for marker discovery and co-dominant scoring in germplasm and populations. *PLoS ONE* 7:e37565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037565>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 3:

a) *hsd17b1* es un gen clave para la diferenciación ovárica del esturión siberiano

Resumen

Este es el primer trabajo en el que se utilizan gónadas de esturión siberiano indiferenciadas y genéticamente sexadas para describir cambios de expresión en genes relacionados con la síntesis de esteroides y la diferenciación sexual femenina y masculina. Un factor identificado como relevante para la diferenciación ovárica fue el gen que codifica la enzima Hsd17b1 (*hsd17b1*), que convierte la estrona en estradiol-17 β . *hsd17b1* se activó en gran medida en las gónadas femeninas a los 2,5 meses de edad, alrededor del punto de inicio de la diferenciación sexual, precediendo a la activación de otros dos genes implicados en la producción de estrógenos (*cyp19a1* y *foxl2*). A su vez la *hsd17b1* estuvo reprimida fuertemente en los machos. Respecto del *foxl2*, en el esturión siberiano se encuentran dos parálogos conocidos como *foxl2* y *foxl2l* pero sólo el *foxl2* parece estar asociado a la diferenciación ovárica. En cuanto a la vía masculina, no se hallaron ni andrógenos 11-oxigenados ni genes masculinos clásicos (*amh*, *dmrt1*, *sox9* y *dhh*) implicados en la diferenciación sexual masculina, lo que deja abierta la pregunta de qué genes participan en el desarrollo temprano de la gónada masculina en este pez antiguo. En conjunto, estos resultados indican una dependencia estrogénica de la diferenciación sexual femenina y una independencia androgénica 11-oxigenada de la diferenciación sexual masculina. Este trabajo se presenta más abajo en formato de artículo publicado.

RESEARCH ARTICLE

hsd17b1 is a key gene for ovarian differentiation of the Siberian sturgeon

André Lasalle¹  | Germán Benech-Correa¹  | Frédéric G. Brunet²  |
Denise Vizziano-Cantonnet¹ ¹Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay²Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR5242, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Claude Bernard, Lyon, France**Correspondence**Denise Vizziano-Cantonnet, Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.
Email: vizziano@gmail.com**Funding information**

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Grant/Award Number: C225-348; Agencia Nacional de Investigación e Innovación Project, Grant/Award Number: FMV_1_2017_1_135908

Abstract

This is the first work using gonads from undifferentiated, genetically-sexed Siberian sturgeon describing expression changes in genes related to steroid synthesis and female and male sex differentiation. One factor identified as relevant for ovarian differentiation was the gene coding for the enzyme Hsd17b1, which converts estrone into estradiol-17 β . *hsd17b1* was highly activated in female gonads at 2.5 months of age, around the onset of sex differentiation, preceding activation of two other genes involved in estrogen production (*cyp19a1* and *foxl2*). *hsd17b1* was also strongly repressed in males. Two known *foxl2* paralogs are found in Siberian sturgeon—*foxl2* and *foxl2l*—but only *foxl2* appeared to be associated with ovarian differentiation. With regard to the male pathway, neither 11-oxygenated androgens nor classic male genes (*amh*, *dmt1*, *sox9*, and *dhh*) were found to be involved in male sex differentiation, leaving open the question of which genes participate in early male gonad development in this ancient fish. Taken together, these results indicate an estrogen-dependence of female sex differentiation and 11-oxygenated androgen-independence of male sex differentiation.

KEYWORDS*Acipenser baerii*, gene expression, gonads, sex differentiation, Siberian sturgeon

1 | INTRODUCTION

Sex differentiation is a key step in the reproductive biology of vertebrates, including fish. Since Yamamoto (1969) proposed in 1969 that the major steroids produced by the female and male gonads (estrogens and androgens) were the natural inducers of sexual differentiation in fish, many efforts have been made to confirm this generalization.

Approaches have involved gonadal morphology, immunohistology, and sex-steroid biochemistry; experimental sex inversion with estrogens, androgens, and steroidogenic enzyme inhibitors; and more recent techniques based on molecular biology, functional genomics, and gain- and loss-of-function analyses focusing on gonadal genes (Baroiller et al., 1999; Devlin & Nagahama, 2002; Guiguen et al., 2010; Nagahama et al., 2021; Nakamura et al., 1998; Piferrer &

Guiguen, 2008; Piferrer, 2001; Strüssmann, 2002). Findings suggest that while estrogens generally drive the very early female pathway, androgens are not universal endogenous regulators of sexual differentiation in fish.

Research into the molecular mechanisms of sex differentiation in fish has been limited due to a lack of sex markers for most of over 30,000 extant fish species (Nelson et al., 2016), making it difficult to distinguish genetic sex before the gonads are differentiated. For a few teleost species, there are available genetic sex markers and/or monosex populations, which correspond to offspring that are all-genetic males (100% XY) or all-genetic females (100% XX). Existing information on the most important genes driving female and male sex differentiation comes from these models. Genes confirmed as relevant for female gonadal differentiation include: the enzyme cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a (*cyp19a1a*);

the transcription factors *forkhead box L2* (*foxl2*), *forkhead box L3* (*foxl3*), *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1* (*nrOb1*), also known as *dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1* (*dax1*) and *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1* (*nr5A1*), also known as *steroidogenic factor 1* (*sf1*); and the protein *folliculin* (*fst*) (Nagahama et al., 2021). In general, these genes seem to be important in fish in which female gonadal differentiation is dependent on estrogens. More recently, a gene related to estrogen synthesis, *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1* (*hsd17b1*), which codes for the enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, has been considered as a key factor in sex determination in teleost fish (Koyama et al., 2019).

Other studies have shown that aromatase (*cyp19a1*)—the key enzyme for estrogen production—is not expressed before sex differentiation in some fish (Brown et al., 2022; Imarazene et al., 2021; Nakamura et al., 2009; Zhou et al., 2016), indicating that some species may have an estrogen-independent molecular sex-differentiation pathway. In fact, in an estrogen-insensitive model using zebrafish (*Danio rerio*) (Maack & Segner, 2004), a *wingless-type MMTV integration site family, member 4* (*wnt4*) deletion study showed the first functional evidence that, as in mammals, Wnt/ β -catenin signaling is a female differentiation-promoting pathway that regulates gonadal differentiation (Sreenivasan et al., 2014). This suggests that in fish with estrogen-independent sex differentiation, the canonical *r-spondin 1* (*Rspo1*)/Wnt4/ β -catenin (*ctnnb1*) pathway can control ovarian development.

The coexistence of two sex-differentiation pathways—one estrogen-dependent and another estrogen-independent—cannot be excluded in basal fish such as sturgeons in which a steroid-dependent path has not been confirmed.

In fish, 11-oxygenated androgens, rather than testosterone, are the key steroids proposed to control male differentiation (Baroiller et al., 1999; Borg, 1994; Piferrer et al., 1993). In some species, *cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1* (*cyp11c*), the key enzyme for 11-oxygenated androgen synthesis, is well-expressed in undifferentiated male gonads in monosex genetic populations (all XY) of trout (Vizziano et al., 2007), and 11-ketotestosterone (one of the major androgens in fish) is produced in the gonads of future males before sex differentiation in *Odontesthes bonariensis* (Blasco et al., 2013; Hattori et al., 2009), indicating the potential participation of androgens in male gonadal differentiation. However, in other species, androgens do not seem drive the male program, as *cyp11c* expression is not observed at the mRNA or protein levels during stages in which the male gonads remain undifferentiated (Ijiri et al., 2008; Nakamura et al., 1998). In Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869), *cyp11c* has been detected in undifferentiated gonads (Di Landro Francis, 2019), but the lack of known sex markers at the time of that study precluded any conclusion about its participation in the male program.

In addition to androgens, various transcription factors (doublesex and mab-3 related transcription factor 1 or *Dmrt1*; SRY-box transcription factor 9 or *Sox9*; *Sf1*; and *Dax1*), growth factors and their receptors (anti-Müllerian hormone or *Amh*, anti-Müllerian

hormone receptor type 2 or *Amhr2*, and gonadal somatic cell-derived factor or *Gsdf*), as well as signaling molecules such as Desert Hedgehog (*Dhh*), have been proposed as male program factors during molecular differentiation (Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008; Qi et al., 2021). Gain- and loss-of-function studies have confirmed that the genes coding for *dmrt1*, *amh*, *amhr2*, *gsdf*, and *sox9* are involved in testicular differentiation in teleosts (Nagahama et al., 2021).

Excitingly, a genetic sex marker in sturgeons was published recently (Kuhl et al., 2021), allowing us to study the undifferentiated gonads of genetically-sexed fish at the molecular level for the first time.

Morphological studies of gonadal tissue have suggested that the Siberian sturgeon is sex-differentiated at around 6.7 months of age in Poland (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013) and 8 months in Uruguay (Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). These works classified the first signs of gonadal sex differentiation as visible nests of oogonia, which are extensions of the germinal epithelium, called "sex cords" (Grier et al., 2016). The formation of the gonadal ridge occurs around the first month of life (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013). However, the onset of gonadal sex differentiation at the molecular level has not yet been clearly defined for sturgeons. For the present work, we defined the gonadally-undifferentiated period as beginning upon gonad formation, around 30 days post fecundation, and ending at 6 months of age (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018).

Multiple efforts have been made to identify the genes involved in gonadal differentiation in sturgeons (Berbejillo et al., 2012, 2013; Degani et al., 2019, 2022; Du et al., 2020; Fajkowska et al., 2019; Hale et al., 2010; Klopp et al., 2020; Lasalle et al., 2021; Okada et al., 2017; Vidotto et al., 2013; Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018; Wang et al., 2019; Wuertz et al., 2018; Zhang et al., 2022). However, all of these works were performed using genetically-unsexed fish.

Our group initially studied the gonads of Siberian sturgeon using a previous transcriptome, before any genetic sex marker was available, with results suggesting *cyp19a1* and *foxl2* as female sex markers. We used these findings to propose a set of feminine genes (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018): *hsd17b1*, *iroquois homeobox 3* (*irx3*), *iroquois homeobox 5* (*irx5*), *LIM homeobox 2* (*lhx2*), along with the previously-mentioned *cyp19a1* and *foxl2*. Potential sex steroid production was then assessed by analyzing expression of steroidogenic-related genes such as: *steroidogenic acute regulatory protein* (*star*); *cytochrome P450, family 11, subfamily A, member 1* (*cyp11a1*); *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3* (*hsd3b1*); *cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1* (*cyp17a1*); and *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3* (*hsd17b3*). In addition to steroid-producing genes, we assessed expression of other factors described in the literature as essential for female (*fst*, *rspo1*, *wnt4*, and β -catenin) and male (*amh*, *dmrt1*, *sox9*,

and *dhh*) gonadal development in fish (Nagahama et al., 2021; Piferrer & Guiguen, 2008). Two groups of undifferentiated but genetically-sexed fish were studied. In the first group of animals (which included fish at 3.5, 5, and 6 months of age), gonadal gene expression was analyzed to determine which of the above-mentioned genes were sexually dimorphic. In the second group of fish, the genes identified during the first step were studied during early windows of gonadal development (2.5, 3, 3.5, and 4 months) with the aim of identifying the onset of molecular sexual differentiation.

2 | MATERIALS AND METHODS

Research procedures involving animal experimentation complied with international principles on the use and care of laboratory animals and Uruguayan animal welfare regulations (Comisión Honoraria de Experimentación Animal: CHEA). The protocol was approved by the "Comisión de Etica en el Uso de Animales" of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal CHEA of Uruguay (authorization number 240011-002227-16).

2.1 | Animals and sampling

All Siberian sturgeon were provided by Estuario del Plata fish farm and reared at natural temperatures (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). Fish were transported to the aquaculture facilities at the Facultad de Ciencias (Universidad de la República Oriental del Uruguay). The gonads of a first group of undifferentiated fish at 3.5, 5, and 6 months of age (Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018) were sampled in our laboratory at the Facultad de Ciencias. A second group of 2-month-old fish was also obtained, but the gonads could not be extracted until 2.5 months, as the gonad is tiny and difficult to remove even under binocular loupe before this age. The second group included 2.5, 3, 3.5 and 4 months of age fish. All fish were sexed using *AIWSex2* markers (Kuhl et al., 2021). The characteristics of the fish sampled are shown in Table 1 (first group) and Table 2 (second group).

Sampling was performed under sterile conditions; gonads were extracted and conserved in liquid nitrogen (N_2) to prevent degradation. After sampling, tissues were stored at -80°C until RNA extraction. The caudal fin was sampled and conserved in ethanol 95:5 v:v for later DNA extraction.

TABLE 1 Fish characteristics of the first group by age.

Age (months)	<i>n</i>	Average length (cm) $\pm$ SD	Average weight (g) $\pm$ SD
3.5	18	15.54 $\pm$ 0.95	13.89 $\pm$ 2.58
5	19	20.34 $\pm$ 2.55	19.4 $\pm$ 7.48
6	13	21.67 $\pm$ 2.77	21.12 $\pm$ 6.53

Abbreviation: SD, standard deviation.

TABLE 2 Fish characteristics of the second group by age.

Age (months)	<i>n</i>	Average length (cm) $\pm$ SD	Average weight (g) $\pm$ SD
2.5	15	11.24 $\pm$ 1.06	4.33 $\pm$ 1.04
3	16	12.11 $\pm$ 1.55	5.82 $\pm$ 1.78
3.5	15	14.83 $\pm$ 2.20	9.78 $\pm$ 3.56
4	15	17.23 $\pm$ 1.30	12.92 $\pm$ 3.08

Abbreviation: SD, standard deviation.

2.2 | Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted using a protocol modified from Miller et al. (1988). A total of 20 mg of caudal fin was submerged in 500 μL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM NaCl_2 , pH 8) with 3 μL of proteinase K (20 mg/mL) and incubated at 55°C for 2 h with agitation. The lysate was centrifuged for 20 min at 16,162g. After digestion was complete, 300 μL of 5 M NaCl_2 were added to 500 μL of supernatant in a new microtube, followed by centrifugation at 16,162g for 20 min.

The precipitated protein pellet was left at the bottom of the tube and 500–600 μL of supernatant containing the genomic DNA (gDNA) was transferred to another microtube. One volume of cold isopropyl alcohol was added, and tubes were inverted softly several times to precipitate the gDNA, followed by centrifugation at 16,162g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with ethanol 70:30 v:v, then dried in a stove at 50°C . The gDNA pellet was resuspended in 100 μL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH 8) and conserved at -20°C until use.

2.3 | Qualitative polymerase chain reaction (PCR) for sexing

The *AIWSex2* primers published by Kuhl et al. (2021) were used to sex the fish. gDNA samples were amplified by qualitative PCR and validated by inspection on 2% agarose gel. Each reaction contained 1.25 μL of 10 μM of forward and reverse primers, 20 ng of gDNA, 0.125 μL of DreamTaq polymerase (Thermo Fisher Scientific), 2.5 μL of 10 $\times$ DreamTaq buffer, 2.5 μL of 2 mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific), and water, for 25 μL of total volume. The PCR program was: 95°C for 3 min, 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 45 s, and 72°C for 8 min.

2.4 | RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated using the Monarch Total RNA Miniprep kit following the manufacturer's instructions from New England BioLabs Inc. Next, the samples were treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen), and gDNA elimination was checked by PCR using 18S primers. cDNA was synthesized using 1 μg total RNA in a 20 μL

reaction. RNA was denatured at 65°C for 5 min with 200 ng random primers and 0.5 mM dNTP, then chilled. According to the manufacturer's instructions, reverse transcription was performed using M-MLV RT (Invitrogen) at 37°C for 50 min. Subsequently, the cDNA samples obtained were used for gene expression analysis via qPCR.

2.5 | Quantitative PCR (qPCR)

Primers for qPCR analysis were designed with the specific gene sequence obtained in the transcriptome study (Klopp et al., 2020) and validated by melting curve analysis (qPCR), agarose gel electrophoresis, and sequencing. The primers used are shown in Table 3. The sequences are shown in Supporting Information S1: Additional File 1. The identities of some of these sequences were previously validated using phylogenetic approaches (*amh*, *dmrt1*, *sox9*, and *cyp17a1*, Berbejillo et al., 2012; *cyp19a1*, Lasalle Gerla, 2016). The other sequences were obtained from our gonadal transcriptome database (Klopp et al., 2020; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018) and validated with BLASTp at the NCBI site (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

cyp19a1 and *hsd17b1* are clearly identified and characterized in the Siberian sturgeon (Supporting Information S2: Additional File 2). The Siberian sturgeon gonadal transcriptome database (Klopp et al., 2020; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018) was queried for the protein corresponding to the *Oncorhynchus mykiss* Foxl2 ortholog (trout, NP_001117957.1) and *O. mykiss* Foxl2 diverged paralog (AAS87039.1), producing two contigs related to foxl2. These contigs were analyzed phylogenetically to investigate their identity (see Results). *gsdf* and *amh-r* were searched in the Siberian sturgeon transcriptome databases (Klopp et al., 2020). These sequences are under study to determine their identity as they were not shown to be homologous to those of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) in an initial analysis of the protein performed at NCBI.

Real-time PCR experiments were performed in 96-well plates using 12 µL total volume reactions, and run on an Applied Biosystems instrument (ABI 7500) equipment. Each reaction contained 200 nM forward and reverse primers, Power Up SYBR Green qPCR Master Mix, 10 ng of cDNA for target genes, and 3.3 ng of cDNA for the housekeeping gene. The thermal cycling protocol was: a holding stage at 50°C for 2 min then 95°C for another 2 min; 40 cycles at

TABLE 3 Primer set used for gene expression using real-time polymerase chain reaction (PCR) and for sexing fish with end-point PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product (bp)	Primer efficiency
<i>amh</i>	5' CTTCCACCTGACACAGGGAC 3'	5' TCGGTTTCTGTCTCTGCCC 3'	146	96
<i>dmrt1</i>	5' CCAATGGAAGGAGGCTGAA 3'	5' GCGTATAATACAAAGACACAGC 3'	97	98
<i>sox9</i>	5' TTGCTCAGATCCGTCTTCAG 3'	5' CACTCGGAAACTTTGGAGA 3'	172	99
<i>dhh</i>	5' AATCGAGCACCACAGTTTG 3'	5' CCACTGTGTAGAGCAACC 3'	177	96
<i>cyp11c</i>	5' CTGCTTGATCCTCTGGGTC 3'	5' CATCTCCGTCTCTGCAATCC 3'	174	107
<i>cyp19a1</i>	5' GTCCAGCTTCAGACAGGATG 3'	5' AGATGGTGTCTGCAATGTT 3'	164	101
<i>foxl2</i>	5' GAGGCCTTTCAGACCCCTCC 3'	5' TGGGCTGACGTGCCACTT 3'	189	99
<i>hsd17b1</i>	5' GAGAAGAAGGTGGACATTCTAGT 3'	5' ACCCTCCACTGCAAATTTAC 3'	250	106
<i>irx3</i>	5' CTTGTACAATTGGTTACACG 3'	5' CCTCAAACCAACTGAAGCC 3'	320	86
<i>irx5</i>	5' GCATCTCCTCGTCACAAATG 3'	5' TGTGCAAAATGCATCACTCA 3'	80	100
<i>lhx2</i>	5' CGAAACGAATATGCCCTCTA 3'	5' TTCACAACACTTCAAACAGC 3'	132	83
<i>wnt4</i>	5' AGTGGATGTGGAACGAATTG 3'	5' ACTCCGATGCATCTGTACG 3'	158	105
<i>Fst</i>	5' CCTGTATCAGTGCTCCAGTT 3'	5' TGTGTAGCCAGCAATAACC 3'	152	91
<i>ctnnb1</i>	5' CATCTTCAAGTCGGGAGGTA 3'	5' CTTTGTAGACCACCAGCAA 3'	153	103
<i>rspo1</i>	5' TGGGTTGAATGTGTCAGAAC 3'	5' ATTGGAGTAGTCCCTCCAC 3'	151	105
<i>star</i>	5' GATTGAAGAGAAGCCCTACAGT 3'	5' TCTAGCTGAACACCTTGCC 3'	182	98
<i>hsd3b</i>	5' AAGACCAAGTTCCAAGCTGAA 3'	5' AACTGGGTTCAACACAC 3'	207	92
<i>hsd17b3</i>	5' TTACTTCTTGCTGGCAGTGA 3'	5' AAGAAAGACCGAGACAGGG 3'	181	102
<i>cyp17a1</i>	5' TCACACTCCAGTATTGGTG 3'	5' CCATTCCTTTTCATCGTGATG 3'	91	108
<i>foxl2l</i>	5' GAAACCCTGCTTGAATTATTCGGATC 3'	5' ACGGGCTAGACTGTCCAC 3'	106	93
<i>cyp11a1</i>	5' CAGTTGCTGTGAGCTTGCAAAGGTAT 3'	5' GCATCTCAACCTCTGCAATCCT 3'	245	100
18S	5' GAGGTGAAATCTTGACCGG 3'	5' GGTGCCCTCCGTCAATTCC 3'	260	101
<i>AlIWsex2</i>	5' TGATCAACCTCTTCAGCAATGTC 3'	5' TGAGAGCCACTGTACTAACACA 3'	108	No qPCR

95°C for 15 s then 60°C for 1 min; and finally the melting curve stage, at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 95°C for 15 s. Validation of the qPCR experiments was performed by checking the melting curves, melting temperatures of the samples, and negative controls. A standard curve was developed for each gene assay. Primer efficiencies are shown in Table 3.

Real-time PCR efficiencies (E) and starting quantity (SQ) for the reactions were calculated using the formulas: $E = [1^{(-1/\text{slope})}]$ and $SQ = [10^{((Ct - \text{intercept})/\text{slope})}] - 1$ (Baron et al., 2005). Relative gene expression was measured by dividing the SQ of the target gene by the SQ of the reference gene (18S), which was validated for these gonadal stages in previous works (Berbejillo et al., 2012; Vizziano-Cantonnet et al., 2016).

2.6 | Database search and alignments

We searched the Ensembl release 109-Feb 2023 (Cunningham et al., 2022) for orthologs of the translated Siberian sturgeon sequences (LOC101069066 and LOC102347837; Supporting Information S1: Additional File 1). These two sequences can be aligned with *foxl2* and *foxl2-like* sequences, retrieved from GeneTree ENSGT00940000162075. Using BLASTp (Camacho et al., 2023) from the NCBI database (Sayers et al., 2022), we also searched non-teleost Actinopterygii fish and retrieved additional sequences using the closely related sterlet, Amur sturgeon, and Mississippi paddlefish species for queries. The Ensembl protein and gene identifications (ID), as well as the vernacular species names, are shown in Supporting Information S3: Additional File 3. These latter sequences and those of the Siberian sturgeon were added to the Ensembl alignment. Incomplete or very divergent sequences (e.g., those for *Ciona intestinalis* and *Ciona savignyi*) were removed. A few species from distant taxonomic groups were sampled before beginning the phylogenetic analysis by maximum likelihood, using PhyML (Guindon et al., 2010; Lemoine et al., 2018). The PHYLP tree was then simplified and colored using FigTree v1.4.4 and refined with Inkscape (<https://inkscape.org>).

2.7 | Statistical analysis

Normality of data and homogeneity of variance assumptions were evaluated. For each developmental stage (3.5, 5, and 6 months of age), female versus male groups were compared using Student's t -tests when the assumptions of normality and homogeneity of variance were not rejected (Sokal & Rohlf, 1995) or Mann–Whitney tests when those assumptions were rejected.

3 | RESULTS

3.1 | Fish sexing

Siberian sturgeon aged 2.5–6 months of age were genetically sexed. The total numbers of fish, as well as males and females identified per

month in the two groups, are shown in Tables 4 and 5. The sex ratio did not deviate significantly from 50:50 (chi-square) (Tables 4 and 5). Sexed fish were used to study the temporal quantitative expression of genes selected for their potential to drive sex differentiation in the species.

3.2 | Phylogenetic characterization of gonadal *foxl2* in Siberian sturgeon

The two sequences obtained from the Siberian sturgeon gonadal transcriptome database belong to two monophyletic groups of genes, *foxl2* and *forkhead box L2-like (foxl2l)* (zgc:194189 onto the Ensembl Tree). The phylogenetic tree resulting from maximum likelihood analysis, shown in Figure 1a, favors the hypothesis that these two paralogs originated from a large genomic duplication, likely one of the two whole-genome duplications at the origin of vertebrates (Redmond et al., 2023; Simakov et al., 2020). Arguments in favor of this idea are: (1) Only one copy of these paralogs is found in the two *Ciona* species (see Ensembl GeneTree ENSGT00940000162075); (2) orthologs for each of these two genes are found in both the Chondrosteian chimera elephant shark (*Callorhynchus milii*) and the coelacanth (*Latimeria chalumnae*), which is a Sarcopterygian; and (3) using PhyloView in Genomic v109.1 (Nguyen et al., 2022), as shown in Figure 1b, two genes (*spsb4a* and *clstn2*) lie in head-to-head orientation a few genes away from *foxl2-like*, with their respective paralogs (*spsb1* and *clstn1*) on either side of *foxl2*, consistent with a common origin by large-scale duplication (Figure 1b).

3.3 | Expression profiles of steroid-related genes in the first group

The quantitative expression levels of genes that code for steroid-synthesis enzymes involved in estrogen and 11-oxygenated androgen production (*cyp11a1*, *hsd3b1*, *cyp17a1*, *hsd17b3*, *cyp19a1*, *hsd17b1*, and *cyp11c*), as well as a key gene for steroid production (*star*), are shown in Figure 2.

TABLE 4 Sex ratio observed by polymerase chain reaction sexing the first group using the AllWSex2 primers (Kuhl et al., 2021) and expected 1:1 sex ratio.

Age (months)	n	Female:Male ratio observed	Sex ratio expected	Significant differences regarding the expected sex ratio
3.5	18	10 F:8 M	1:1	No (p -value = 0.81)
5	19	12 F:7 M	1:1	No (p -value = 0.36)
6	13	7 F:6 M	1:1	No (p -value = 1)

Note: Deviation from the expected ratio was evaluated using the Chi-square test (Monte Carlo method).

TABLE 5 Sex ratio observed by polymerase chain reaction sexing using the AIWSex2 primers (Kuhl et al., 2021) and expected 1:1 sex ratio.

Age (months)	n	Female:Male ratio observed	Sex ratio expected	Significant differences regarding the expected sex ratio
2.5	15	6 F:9 M	1:1	No (p -value = 0.6)
3	16	8 F:8 M	1:1	No (p -value = 1)
3.5	15	7 F:8 M	1:1	No (p -value = 1)
4	15	8 F:7 M	1:1	No (p -value = 1)

Note: Deviation from the expected ratio was evaluated using the Chi-square test (Monte Carlo method).

At 3.5 months of age, most genes involved in steroid synthesis did not exhibit a significant difference in expression by sex (*cyp11a1*, *hsd3b1*, *cyp17a1*, and *hsd17b3* and *star*), nor did the gene coding for the enzyme Cyp11c, which is involved in 11-oxygenated androgen synthesis. Only genes related to estrogen production were sexually dimorphic, with significantly higher levels in future female gonads at 3.5 months of age for two genes (*cyp19a1*, $p < 0.038$; *hsd17b1* $p < 0.002$). At 5 and 6 months of age, *cyp19a1* lost its sexual dimorphism, while *hsd17b1* remained at higher levels in future female versus male gonads (*hsd17b1*, 5 months $p < 0.0059$; 6 months $p < 0.01$). It is interesting to note that for one gene (*hsd17b1*), quantitative expression assayed by qPCR was undetectable or showed very low expression in gonads of most future males at the stages studied (3.5-, 5-, and 6-month-old fish).

3.4 | Expression profiles of female sex markers in the first group

The quantitative expression levels of transcription factor genes thought to be involved in regulating future female gonads (*foxl2*, *foxl2l*, *irx3*, *irx5*, and *lhx2*), the female gene *fst*, and genes associated with the canonical pathway (*rspo1-wnt4-bcat*) are shown in Figure 3.

Among the female genes studied, only *foxl2* was sex-biased in the Siberian sturgeon during all periods studied, with significantly higher levels in future female gonads (3.5 months of age, $p < 0.003$; 5 months, $p < 0.02$; 6 months, $p < 0.01$) (Figure 3). This gene showed the same trends as observed for *hsd17b1* (Figure 2).

A second gene, *irx3*, was also sex-biased but only at 5 months of age, with higher levels in future ovaries ($p < 0.003$).

3.5 | Expression profiles of male sex markers in the first group

The quantitative expression of genes selected as potential markers of the male program (*amh*, *dmrt1*, *sox9*, and *dhh*) are shown in Figure 4.

None of these genes were overexpressed in the gonads of the undifferentiated male Siberian sturgeon during the period studied.

3.6 | Expression profiles of *cyp19a1*, *foxl2*, and *hsd17b1* in the second group

At 2.5 months of age, only *hsd17b1* showed a sexually dimorphic expression pattern, with higher levels in females ($p < 0.001$) (Figure 5). Expression remained sex-biased throughout the molecular differentiation window studied at 3 ($p < 0.01$), 3.5 ($p < 0.05$), and 4 ($p < 0.01$) months of age. On the other hand, *foxl2* and *cyp19a1* were activated in females for the first time at 3 months of age ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) and remained sexually dimorphic at 3.5 ($p < 0.01$, both genes) and 4 ($p < 0.01$, both genes) months of age (Figure 5).

3.7 | Schematic representation of the onset of gonadal estrogen synthesis

The above results allow us to propose a potential estrogen production scheme in the gonads of genetically-sexed fish around the onset of sex differentiation and during early gonadal differentiation. Figure 6a represents the estrogen production capacity of the gonads of future females around 2.5 months of age, near the onset of sexual differentiation. We propose that the highly sex-biased activation of *hsd17b1* in the female gonads induces the conversion of estrone to estradiol-17 β , with subsequent specific activation of *foxl2* and *cyp19a1* at 3 months (Figure 6b, early sex differentiation). Figure 6c represents the capacity of future testes to produce estrogens. In males, low gonadal expression of *cyp19a1* and *foxl2* was observed in qPCR analyses, along with undetectable or very low *hsd17b1* expression. These results indicate a low capacity for estrogen production in males during the sex-differentiation period.

4 | DISCUSSION

Based on the present results, we can confidently propose key sex differentiation genes in Siberian sturgeon for the first time based on sex-specific activation.

Typically, once the major sex-determinant gene is activated, we would expect a series of other genes to be expressed in a generally sexually dimorphic manner, leading to either female or male gonad development. Findings published for teleost fish show that the earliest genes expressed during ovarian development are *cyp19a1* and *foxl2* (Baroiller et al., 1999; Guiguen et al., 2010; Piferrer et al., 1994; Vizziano et al., 2007), including in teleosts using a ZZ/ZW sex-determination system (turbot, *Scophthalmus maximus*, Martinez et al., 2021; Robledo et al., 2015). In contrast, we found that *hsd17b1* is activated several days before *cyp19a1* and *foxl2* during ovarian differentiation in Siberian sturgeon, in a sexually dimorphic pattern. It

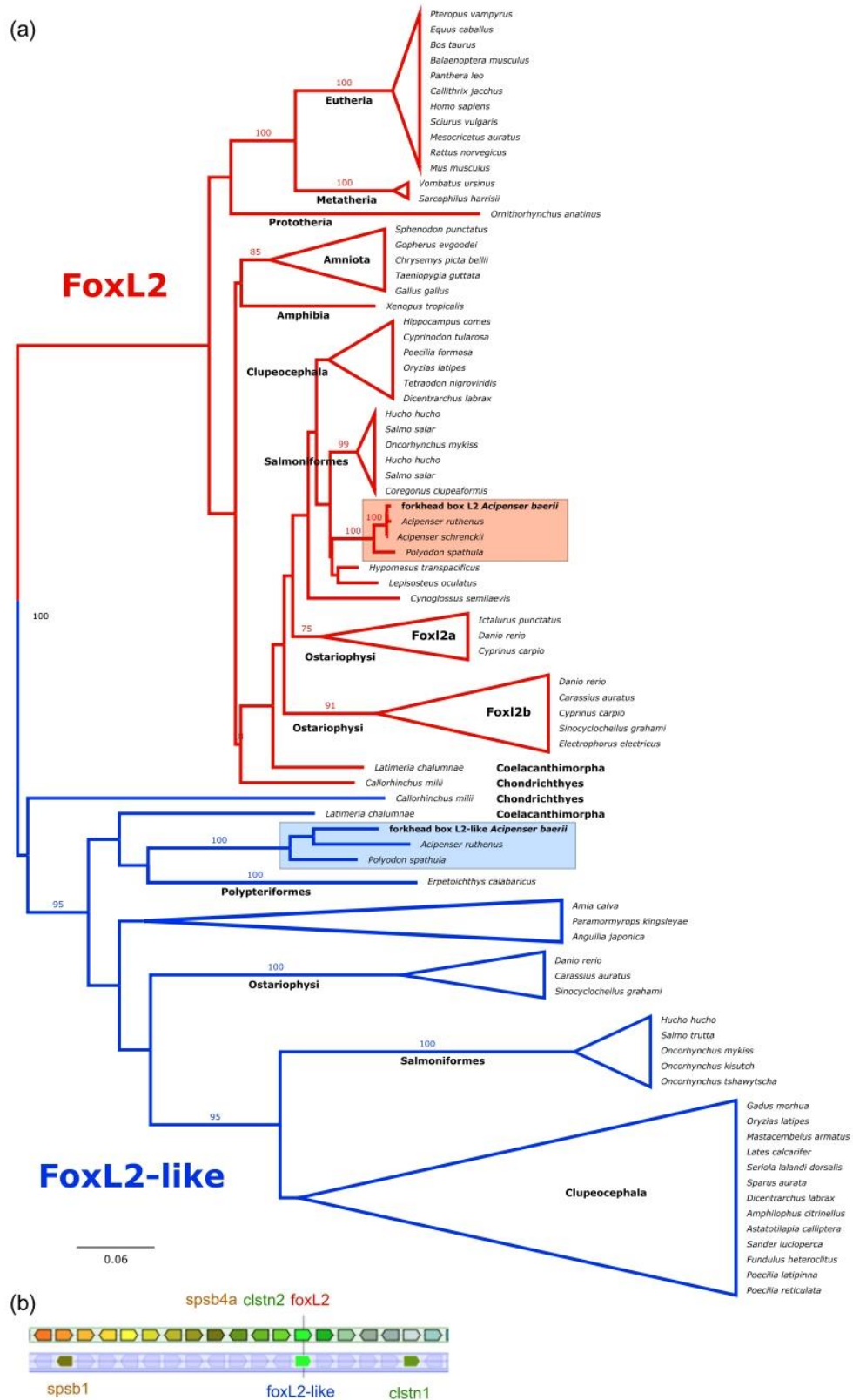


FIGURE 1 (See caption on next page).

has previously been shown that *hsd17b1* is also expressed before *cyp19a1* in *Seriola* species, but the expression was not sexually dimorphic in this teleost fish (Koyama et al., 2019). Here, we demonstrate for the first time in fish that the earliest sexually dimorphic gene activated during ovarian development is *hsd17b1*. The strong activation of *hsd17b1* in the gonads of genetically sexed Siberian sturgeon females at 2.5 months of age indicates that the onset of sexual differentiation occurs between the formation of the gonad ridge at around 1 month of age (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013) and 2.5 months (present work).

In terms of the sex differentiation mechanism underlying the onset of this process, we observed that at 2.5 months, *cyp19a1* is already expressed in female and male gonads but not in a sexually dimorphic pattern, indicating a potential role in estrogen (estrone and estradiol) production in male and female gonads. The strong activation of *hsd17b1* in the gonads of future females at 2.5 months of age would allow for conversion of estrone to estradiol-17 β specifically in females, producing an estrogen-rich environment. In contrast, strong repression of *hsd17b1* was observed in the male gonad at the same stage. We propose that there is an imbalance towards increased estrogen production in the female gonad based on Hsd17b1-mediated conversion of estrone to estradiol-17 β at this stage (see Figure 6a). The literature indicates that these conditions, in fact, lead to development of female gonads (Guiguen et al., 2010; Piferrer, 2011). In addition, *hsd17b1* is consistently repressed in male gonads (see Figure 6c) throughout the period during which the gonads remain undifferentiated. This result strongly supports the idea that this gene likely plays a critical role in initiating the sexual differentiation of Siberian sturgeon as in the ZZ/ZW *Seriola* species (Koyama et al., 2019). Later, at 3 months of age, the elevated estrogen production in future female Siberian sturgeon would in turn enhance *foxl2* expression, which is known to be stimulated by estradiol-17 β (Baron et al., 2004; Vizziano-Cantonnet et al., 2008). In fact, in vivo experiments, performed in mixed populations of Siberian sturgeon before sex markers were available, showed that estradiol-17 β (5 μ g/g of fish) significantly stimulates *foxl2* in all fish at 2.5 and 3 months of age, measured 12 h after treatment (Lasalle & Vizziano, unpublished data). *foxl2* can, in turn, regulate *cyp19a1*, as has been shown in teleost fish (Wang et al., 2007). Therefore, there seems to be a positive regulatory loop between *foxl2* and *cyp19a1* that enhances estrogen production, as has been proposed for teleost fish (Guiguen et al., 2010) (see Figure 6b). It is not possible to conclude based on our work that *foxl2* is expressed upstream of *cyp19a1* as proposed in teleost fish (Guiguen et al., 2010). However, the similar expression patterns of *foxl2* and *hsd17b1* raise the question of whether *foxl2* might not regulate *hsd17b1*. In fact, a recent study

revealed that FOX proteins in the human genome, including FOXL2, stimulate tumor suppressor TP53, acting as upstream regulators of this protein (Choi et al., 2022). Moreover, in porcine granulosa, TP53 positively regulates transcription and translation of *Hsd17b1* (Yuan et al., 2020).

In addition to these female factors, we searched for the gene coding for transcription factor *foxl3*, which is highly activated during sexual differentiation in female teleosts (Baron et al., 2005; Vizziano et al., 2007) and critical for male germ cell differentiation (Wu et al., 2019). However, no *foxl3* ortholog is found in the Siberian sturgeon gonadal transcriptome (Klopp et al., 2020). Searching for *foxl3*, we found a paralog of *foxl2* called *foxl2l*, but there was no detectable sex-biased expression at any of the gonadal stages explored. This result indicates that the gene does not seem to actively participate in differentiation or maintenance of the female pathway during these periods.

fst is another candidate gene that remains poorly studied in the context of fish sexual differentiation. However, the gene has been found to be expressed in female trout before hatching (Baron et al., 2005; Nicol et al., 2013; Vizziano et al., 2007) and colocalized in the same cells that express *cyp19a1a* (Nicol et al., 2013). This finding, along with the fact that *fst* is regulated by estrogens (Vizziano-Cantonnet et al., 2008), made the gene a candidate of interest in sturgeon sexual differentiation. However, it was not found to be sexually dimorphic in Siberian sturgeon.

The Rspo1/Wnt4/ β -catenin pathway involved in mammalian ovarian morphogenesis is estrogen-independent (Cutting et al., 2013). This pathway has also been reported in some fish, including zebrafish (Sreenivasan et al., 2014). Furthermore, the medaka (*Oryzias latipes*), another fish with an estrogen-independent sex differentiation pathway, has been shown to have female-biased gonadal expression of *rspo1* (Nagahama et al., 2021) and *rspo1*-transgenic XY males have been observed to undergo ovarian differentiation, attributable to *rspo1*, *wnt4b*, and β -catenin overexpression (Zhou et al., 2016). In Siberian sturgeon, the lack of female-biased expression of *rspo1*, *wnt4*, or β -catenin expression is coherent with the estrogen-dependent sex differentiation observed in the present work.

Taken together, the results support the idea that estrogens emerged as endogenous inducers of sexual differentiation in basal fish such as sturgeons and have continued to serve that purpose in several teleost fish species.

Among the nonclassical female genes in fish, we studied *lhx2*, *irx3*, and *irx5*. Those genes have been found to play essential roles in ovarian formation and differentiation among mammals (Birk et al., 2000; Kim et al., 2011). These genes help to create the appropriate intragonadal milieu and coordinate interactions between

FIGURE 1 The two paralogous Siberian sturgeon sequences: *foxl2_Acipenser_baerii* (*foxl2*) and *foxl2l_Acipenser_baerii* (*foxl2l*). (a) Simplified representation of a phylogenetic tree resulting from a maximum likelihood analysis (PhyML). Bootstrap values from 100 repeats are shown when relevant (equal to or over 75). (b) Screenshot of the synteny of *Foxl2* and *Foxl2l*-like in the green spotted puffer (*Tetraodon nigroviridis*), as shown in Genomicus v109.1 (Nguyen et al., 2022). The Ensembl protein and gene identification (ID) and the vernacular species name are shown in Supporting Information S3: Additional File 3.

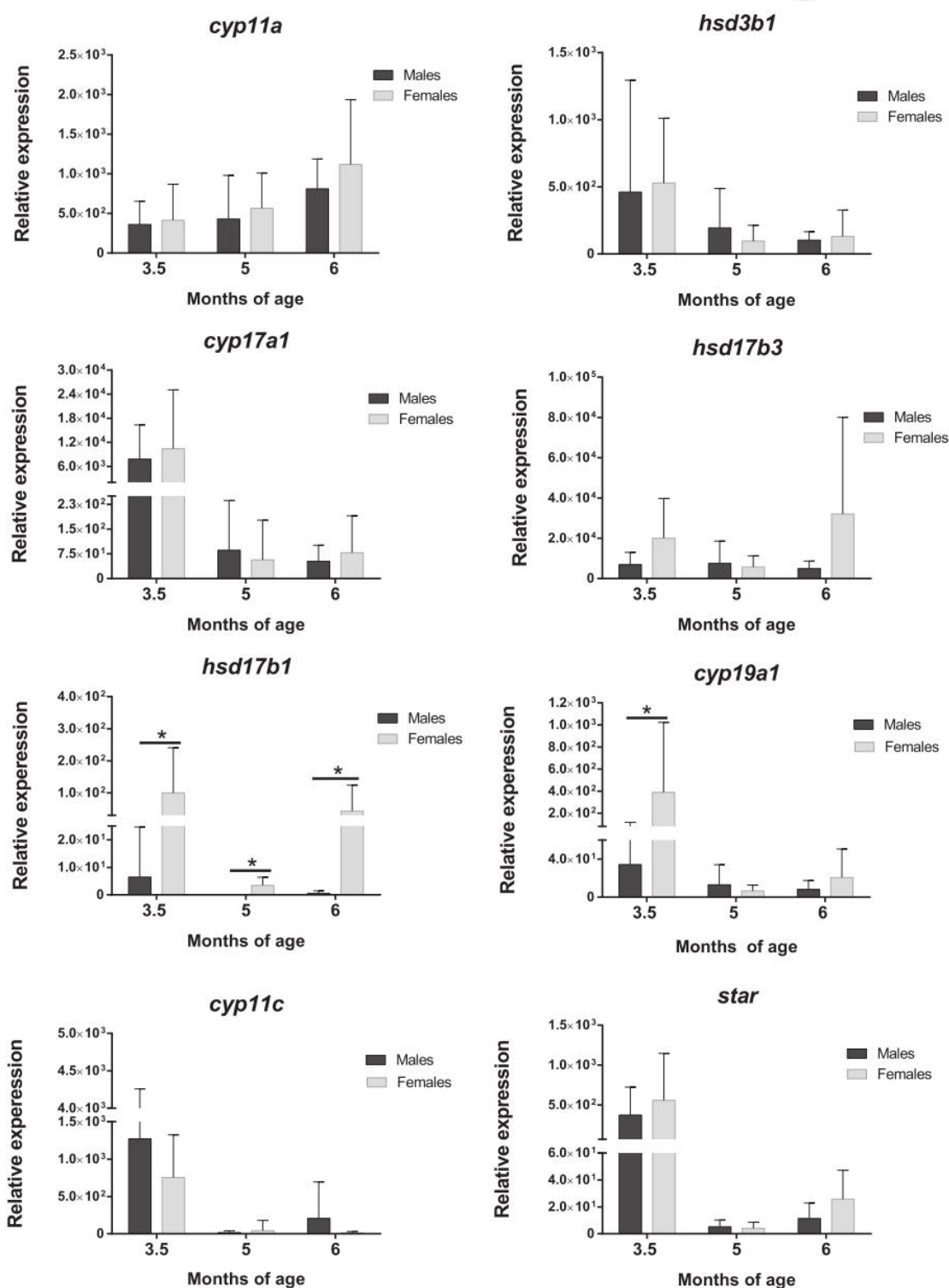


FIGURE 2 Relative expression levels of steroidogenic genes (*cyp11a*, *hsd3b1*, *cyp17a1*, *hsd17b3*, *hsd17b1*, *cyp19a1*, *cyp11c*, and *star*) in males and females at 3.5, 5, and 6 months of age. Significant differences between sexes are identified with the symbol *.

somatic and germ cells (Kim et al., 2011). In rainbow trout, *irx3* exhibits female-specific expression before the gonads are differentiated (Cavileer et al., 2009). *irx5*, in turn, has been found to be female-specific for some species (*Julidochromis ornatus*) and male-specific for

others (*Eretmodus cyanostictus*) (Böhne et al., 2014). In the present work, sex-biased *irx3* expression was observed only in the late sex-differentiation period, while *irx5* and *lhx2* were not sexually dimorphic as expected. This result does not confirm previous results

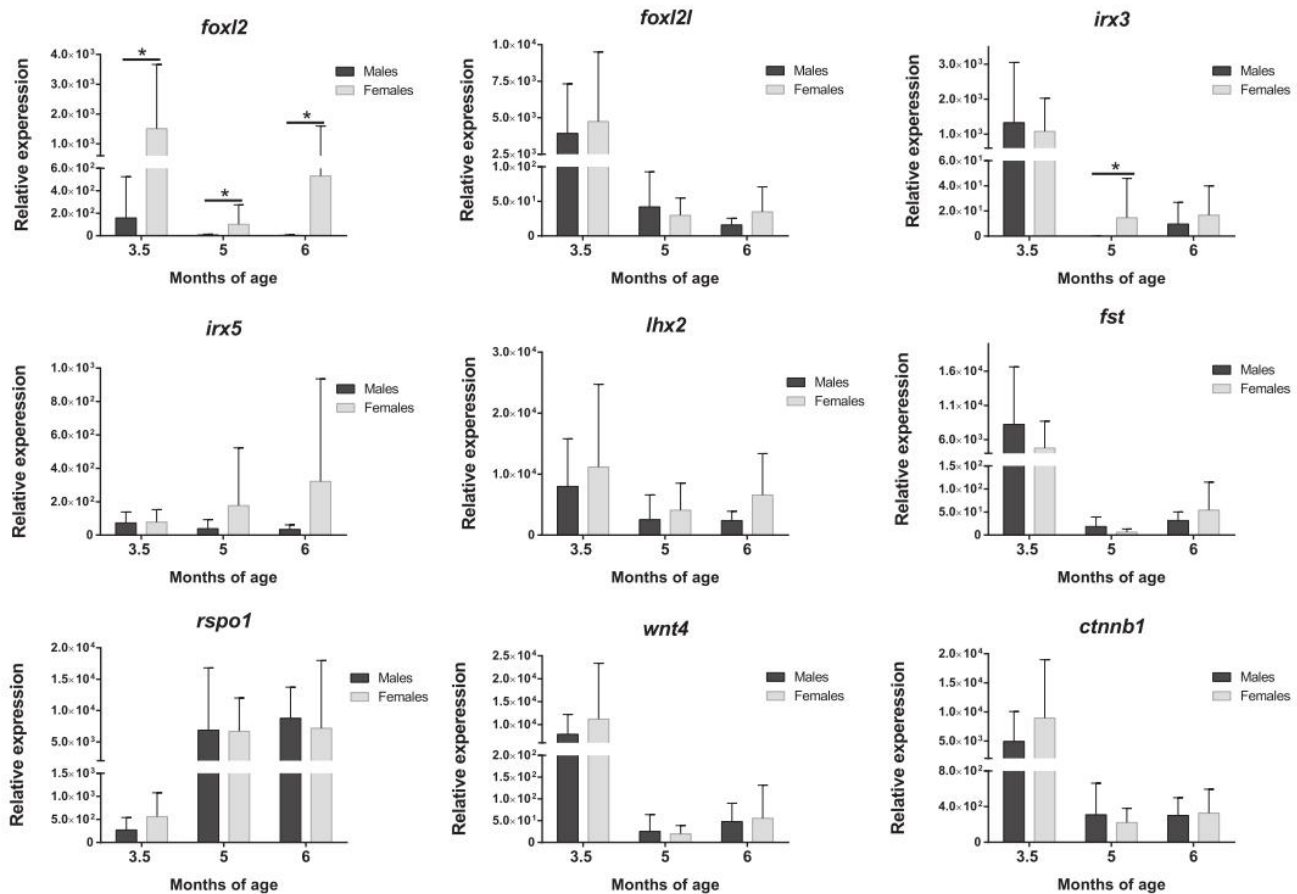


FIGURE 3 Relative expression levels of genes involved in female sex differentiation (*foxl2*, *foxl2l*, *fst*, *irx3*, *irx5*, *lhx2*, *rspo1*, *wnt4*, *cttnb1*) in males and females at 3.5, 5, and 6 months of age. Significant differences between sexes are identified with the symbol *.

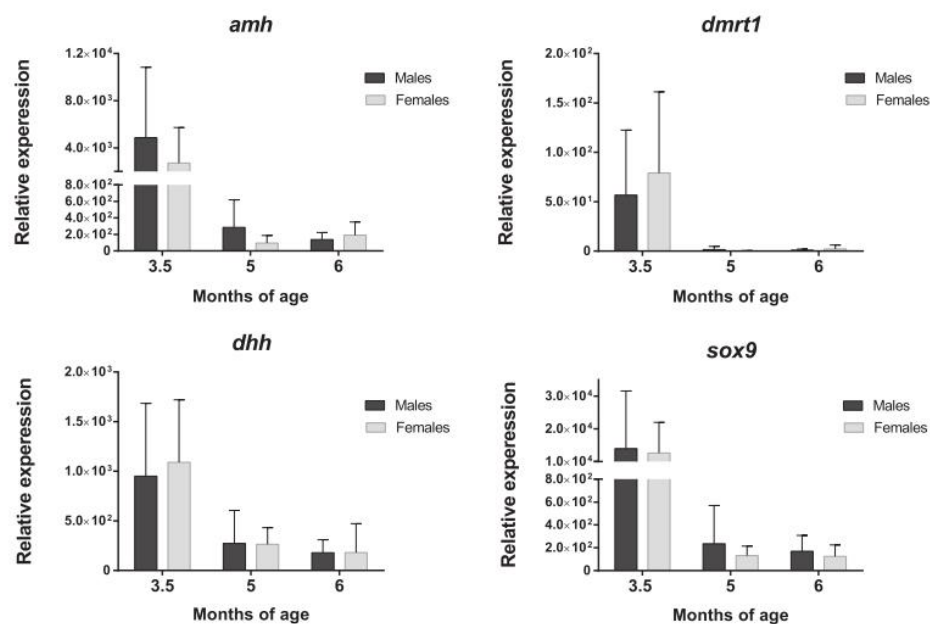


FIGURE 4 Relative expression levels of genes involved in male sex differentiation (*amh*, *dmrt1*, *dhh*, *sox9*) in males and females at 3.5, 5, and 6 months of age. Significant differences between sexes are identified with the symbol *.

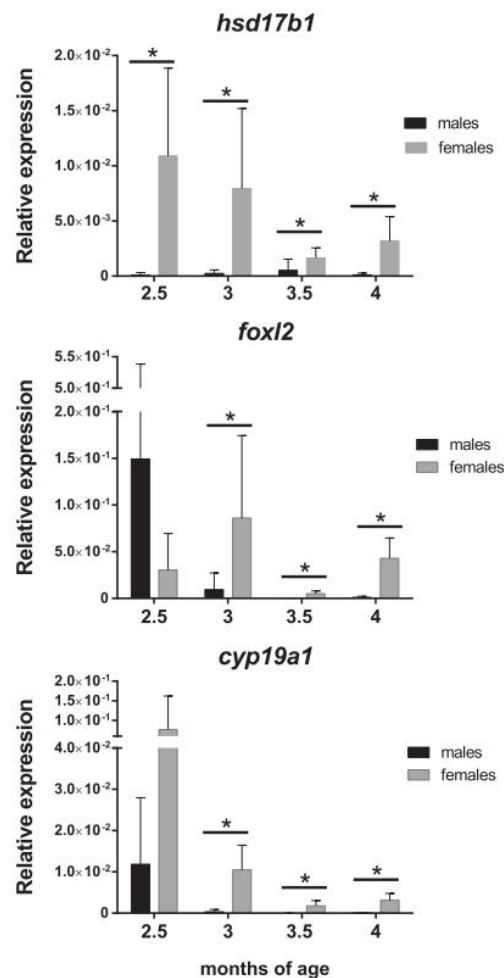
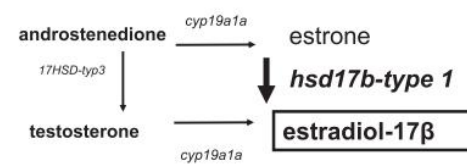


FIGURE 5 Relative expression levels of genes involved in ovarian differentiation (*hsd17b1*, *cyp19a1*, and *foxl2*) in males and females at 2.5, 3, 3.5, and 4 months of age. Significant differences between sexes are identified with the symbol *.

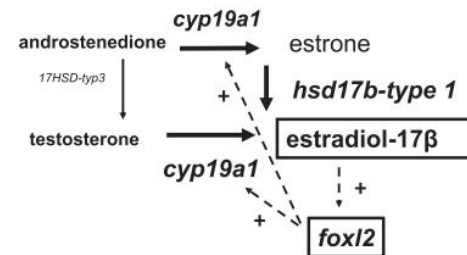
obtained in the absence of sex markers; the discrepancy may be due to different stages of gonadal development (Lasalle et al., 2021; Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018).

Based on our findings, promotion of the male pathway in the Siberian sturgeon does not seem to depend on differential production of 11-oxygenated androgens, since *star*, *cyp11a1*, *hsd3b1*, *cyp17a1*, *hsd17b3*, and *cyp11c* were not sexually dimorphic, confirming the previous work based on transcriptome analysis (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). It has been proposed that fish with temperature-dependent sexual differentiation may depend on endogenous androgens for masculinization (Kitano, 2018), upregulating *cyp11c* expression in genetic males exposed to masculinizing temperatures (D'Cotta et al., 2001) and increasing 11-ketotestosterone production (Fernandino et al., 2012). Our results show that *cyp11c* is not upregulated in males, indicating that androgens are not involved in male differentiation among Siberian sturgeon. The relationship between thermal dependence for sex

(a) Female near the onset of sex differentiation



(b) Female at early sex differentiation



(c) Male at the onset and early sex differentiation

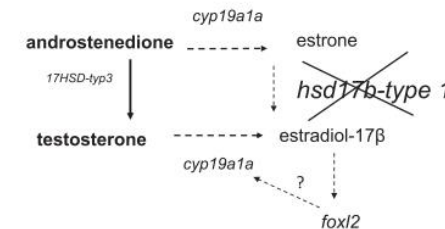


FIGURE 6 (a) Schematic representation of the potential gonadal estrogen synthesis pathway around the onset of sex differentiation in female Siberian sturgeon at 2.5 months of age. (b) Schematic representation of the potential gonadal estrogen synthesis pathway during early sex differentiation in female Siberian sturgeon at 3.5 months. (c) Schematic representation of the potential gonadal estrogen synthesis pathway at the onset and early stage of sex differentiation in male Siberian sturgeon at 2.5 and 3.5 months.

differentiation and the presence of endogenous androgens as drivers of the male gonadal program remains unclear.

In addition to the potential of the early gonads to produce 11-oxygenated androgens, we explored gonadal gene expression of highly-conserved testicular genes in metazoans, such as *dmrt1*, and genes present in vertebrate male differentiation pathways, such as *sox9*, *amh*, and *dhh*.

The *Dmrt* (doublesex and mab-3 related transcription factor) gene family was first discovered in classical invertebrate animal models (*mab-3* in *Caenorhabditis elegans* and *Doublesex* in *Drosophila melanogaster*) and then extensively reported throughout the entire animal kingdom (Picard et al., 2021). In fish, *dmrt1* has been found to be expressed in the primordial gonads at the time of sex determination as well as in the adult testes (Herpin & Schartl, 2011), and the Y-linked *Dmrt1* paralog called DM-Y is the major male determinant in medaka (Matsuda et al., 2002). With regard to Siberian sturgeon, the present results do not show a sex-biased expression of *dmrt1* in primordial gonads during the molecular sex-differentiation period,

which is consistent with previous results from transcriptome studies (Vizziano-Cantonnet, Lasalle, et al., 2018). These results are still surprising, as they do not confirm the findings described in teleost fish, where *dmrt1* is clearly sexually dimorphic with strong activation in the undifferentiated gonads of future males (Herpin & Scharl, 2011; Marchand et al., 2000; Piferrer & Guiguen, 2008).

SOX9 is a highly-conserved gene involved in testis formation in vertebrates (Bowles et al., 2000). Several lines of evidence have indicated that SOX9 is necessary and sufficient to induce male sex determination in mammals (Bowles & Koopman, 2001). In fish, as a result of the teleost-specific genome duplication, two copies of *sox9* have been found in teleost fish: *sox9a* and *sox9b*. These copies are not clearly sex dimorphic during the sex-differentiation window in trout (Vizziano et al., 2007) or medaka (Nakamura et al., 2008). In addition, *sox9b* knockout in medaka does not change gonadal phenotype at the day of hatching but does regulate the germ cell. Thus, unlike in mammals, *sox9b* is not involved in sex determination/differentiation in teleost fish (Nakamura et al., 2012). The absence of *sox9* sexual dimorphism in Siberian sturgeon during the sex-differentiation window (present study) and at immature stages (Berbejillo et al., 2012) argues against a functional role for this gene in testis differentiation in this ancient fish.

AMH is a well-conserved member of the transforming growth factor-beta (TGF- β) hormone family. The *amh* gene arose *de novo* in gnathostomes and is conserved in fish and tetrapods (Zheng et al., 2018). In mammals, it is required for the inhibition of Müllerian ducts (Josso, 1973). A primary role for AMH pathways in germ cell proliferation and sex determination became evident in studies of AMH and AMH receptor (*amh-R*) mutants in teleost species (Eshel et al., 2011; Hattori et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Kikuchi & Hamaguchi, 2013; Lin et al., 2017; Liu et al., 2022; Morinaga et al., 2007; Mullen et al., 2019; Song et al., 2021; Yamaguchi & Kitano, 2023; Yan et al., 2019; Zhang et al., 2020). Y-linked *amh* paralog called *amh-Y* is the major male determinant in pejerrey (*Odontesthes hatcheri*; Hattori et al., 2012). In teleost fish, autosomal *amh* usually shows sex-biased expression during the sex-differentiation period (Fernandino et al., 2008; Rodríguez-Mari et al., 2005; Vizziano et al., 2007; Yoshinaga et al., 2004). Sturgeons are early-evolved ray-finned fish with Müllerian ducts, but these structures do not regress completely in males as is the case in mammals (Wrobel, 2003). In the present work, *amh* expression was not sexually dimorphic in gonads at the critical stages of sex differentiation, suggesting that it does not exert a primary role in sex determination and differentiation or partial gonad duct regression.

The desert hedgehog (DHH) protein is part of a signaling system discovered in *Drosophila* that controls segmentation and is essential for organogenesis and gonadal development (Dilower et al., 2023). In fish, *dhh* has been studied in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and found to be mainly expressed in male germ cells. Furthermore, its relative expression is significantly higher in the male than the female gonads (Qi et al., 2021), suggesting participation in testis development. In the present work, we did not observe sexually dimorphic *dhh* gonadal expression during the critical sexual-differentiation period of Siberian sturgeon (3.5–6 months).

The absence of a known upregulated masculine gene in the male Siberian sturgeon gonadal tissue during the critical sex-differentiation period leaves open the question of how the male sex program is controlled during early gonadal development.

5 | CONCLUSION

Our results are consistent with the view that *hsd17b1* is a key sex determination/differentiation gene that may control early ovarian differentiation in Siberian sturgeon, acting in cooperation with *cyp19a1* and *foxl2*. The present findings indicate estrogen dependence for female sex differentiation but a 11-oxygenated androgen-independent male sex differentiation pathway. Surprisingly, the well-conserved testicular genes in metazoan and vertebrates (*dmrt1*, *sox9*, *amh*, and *dhh*) do not appear to play a major role in male gonadal differentiation in this ancient fish. The question of how male gonadal differentiation is regulated remains to be resolved.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

André Lasalle: Investigation; Methodology; Validation; Writing—original Draft; Visualization; Writing—review & Editing. **Germán Benech-Correa:** Investigation; methodology; validation. **Frédéric G Brunet:** Investigation; writing—original draft; validation; methodology. **Denise Vizziano-Cantonnet:** Investigation; funding acquisition; writing—original draft; project administration; supervision; methodology; writing—review & editing.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Chief Executive Officer of Estuario del Plata, Facundo Márquez, and the entire Estuario del Plata (Uruguay) staff for their ample support and kindness during this project. Special thanks are due to an anonymous referee whose recommendations helped improve the quality of this manuscript. Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República Oriental del Uruguay, Grant number C225-348 and Agencia Nacional de Investigación e Innovación Project FMV_1_2017_1_135908.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article. All data is available within this article.

ORCID

André Lasalle  <https://orcid.org/0000-0001-5420-5149>

Germán Benech-Correa  <https://orcid.org/0009-0007-6438-9931>

Frédéric G. Brunet  <https://orcid.org/0000-0001-5145-8925>

Denise Vizziano-Cantonnet  <http://orcid.org/0000-0001-7529-7556>

REFERENCES

- Baroiller, J. F., Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(6–7), 910–931. <https://doi.org/10.1007/s000180050344>
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., & Veitia, R. A. (2004). An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(3), 705–715. <https://doi.org/10.1677/jme.1.0156>
- Baron, D., Houlgatte, R., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2005). Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 73(5), 959–966. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041830>
- Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedo, G., Brunet, F., Volff, J. N., & Vizziano-Cantonnet, D. (2012). Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction and Development*, 79(8), 504–516. <https://doi.org/10.1002/mrd.22053>
- Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedó, G., & Vizziano-Cantonnet, D. (2013). Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(1), 91–94. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9666-5>
- Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Porter, F. D., & Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909–913. <https://doi.org/10.1038/35002622>
- Blasco, M., Somoza, G. M., & Vizziano-Cantonnet, D. (2013). Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odon-testhes bonariensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(1), 71–74. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9651-z>
- Böhne, A., Sengstag, T., & Salzburger, W. (2014). Comparative transcriptomics in East African cichlids reveals sex- and species-specific expression and new candidates for sex differentiation in fishes. *Genome Biology and Evolution*, 6(9), 2567–2585. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu200>
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109(3), 219–245. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)00063-G](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)00063-G)
- Bowles, J., & Koopman, P. (2001). New clues to the puzzle of mammalian sex determination. *Genome Biology*, 2(9), reviews1025.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-9-reviews1025>
- Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental Biology*, 227(2), 239–255. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9883>
- Brown, M. S., Evans, B. S., & Afonso, L. O. B. (2022). Developmental changes in gene expression and gonad morphology during sex differentiation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 823, 146393. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146393>
- Camacho, C., Boratyn, G. M., Joukov, V., Vera Alvarez, R., & Madden, T. L. (2023). ElasticBLAST: Accelerating sequence search via cloud computing. *BMC Bioinformatics*, 24(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05245-9>
- Cavileer, T., Hunter, S., Okutsu, T., Yoshizaki, G., & Nagler, J. J. (2009). Identification of novel genes associated with molecular sex differentiation in the embryonic gonads of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sexual Development*, 3(4), 214–224. <https://doi.org/10.1159/000228722>
- Choi, Y., Luo, Y., Lee, S., Jin, H., Yoon, H. J., Hahn, Y., Bae, J., & Lee, H. H. (2022). FOXL2 and FOXA1 cooperatively assemble on the TP53 promoter in alternative dimer configurations. *Nucleic Acids Research*, 50(15), 8929–8946. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac673>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Cutting, A., Chue, J., & Smith, C. A. (2013). Just how conserved is vertebrate sex determination. *Developmental Dynamics*, 242(4), 380–387. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23944>
- D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., & Baroiller, J. F. (2001). Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*, 290(6), 574–585. <https://doi.org/10.1002/jez.1108>
- Degani, G., Hurvitz, A., Eliraz, Y., & Meerson, A. (2019). Sex-related gonadal gene expression differences in the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in stable aquaculture conditions. *Animal Reproduction Science*, 200, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.013>
- Degani, G., Nevo Sarel, M., Hajouj, A., Hurvitz, A., Veksler-Lublinsky, I., & Meerson, A. (2022). Whole-genome inter-sex variation in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9469. <https://doi.org/10.3390/ijms23169469>
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Di Landro Francis, S. (2019). Caracterización de los patrones de expresión de *foxl3* y su regulación por andrógenos durante el periodo de diferenciación del sexo en el esturión siberiano *Acipenser baerii* (Master's Thesis). Udelar FC. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/26669>
- Dilower, I., Niloy, A. J., Kumar, V., Kothari, A., Lee, E. B., & Rumi, M. A. K. (2023). Hedgehog signaling in gonadal development and function. *Cells*, 12(3), 358. <https://doi.org/10.3390/cells12030358>
- Du, K., Stöck, M., Kneitz, S., Klopp, C., Wolterling, J. M., Adolphi, M. C., Feron, R., Prokopov, D., Makunin, A., Kichigin, I., Schmidt, C., Fischer, P., Kuhl, H., Wuertz, S., Gessner, J., Kloas, W., Cabau, C., Iampietro, C., Parrinello, H., ... Scharlt, M. (2020). The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. *Nature Ecology & Evolution*, 4(6), 841–852. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1166-x>
- Eshel, O., Shirak, A., Weller, J. I., Slossman, T., Hulata, G., Cnaani, A., & Ron, M. (2011). Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Fine-mapping of a sex-determining locus. *Animal Genetics*, 42(2), 222–224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02128.x>
- Fajkowska, M., Glowacka, D. K., Adamek-Urbańska, D., Ostaszewska, T., Krajnik, K. A., & Rzepkowska, M. (2019). Sex-related gene expression profiles in various tissues of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Aquaculture*, 500, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.066>
- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Kimura, H., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2008). Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3192–3199. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21731>
- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Kishii, A., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2012). The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology*, 153(12), 6003–6011. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1517>
- Grier, H. J., Uribe, M. C., Lo Nostro, F. L., Mims, S. D., & Parenti, L. R. (2016). Conserved form and function of the germinal epithelium through 500 million years of vertebrate evolution. *Journal of*

- Morphology, 277(8), 1014–1044. <https://doi.org/10.1002/jmor.20554>
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hale, M. C., Jackson, J. R., & Dewoody, J. A. (2010). Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica*, 138(7), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9455-y>
- Hattori, R. S., Fernandino, J. I., Kishii, A., Kimura, H., Kinno, T., Oura, M., Somoza, G. M., Yokota, M., Strüssmann, C. A., & Watanabe, S. (2009). Cortisol-induced masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination. *PLoS One*, 4(8), e6548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006548>
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., & Strüssmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2955–2959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018392109>
- Herpin, A., & Scharl, M. (2011). *Dmrt1* genes at the crossroads: A widespread and central class of sexual development factors in fish. *The FEBS journal*, 278(7), 1010–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08030.x>
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2), 333–341. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>
- Imarazene, B., Beille, S., Jouanno, E., Branthonne, A., Themes, V., Thomas, M., Herpin, A., Rétaux, S., & Guiguen, Y. (2021). Primordial germ cell migration and histological and molecular characterization of gonadal differentiation in pachón cavefish *Astyanax mexicanus*. *Sexual Development*, 14(1–6), 80–98. <https://doi.org/10.1159/000513378>
- Josso, N. (1973). In vitro synthesis of mullerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinology*, 93(4), 829–834. <https://doi.org/10.1210/endo-93-4-829>
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), e1002798. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798>
- Kikuchi, K., & Hamaguchi, S. (2013). Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242(4), 339–353. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23927>
- Kim, B., Kim, Y., Cooke, P. S., Rüther, U., & Jorgensen, J. S. (2011). The fused toes locus is essential for somatic-germ cell interactions that foster germ cell maturation in developing gonads in mice. *Biology of Reproduction*, 84(5), 1024–1032. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088559>
- Kitano, T. (2018). Endocrine and environmental control of sex differentiation in gonochoristic fish. In K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, & M. Kondo, (Eds), *Reproductive developmental strategies: Diversity and commonality in animals* (pp. 307–319). Springer. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56609-0_15
- Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., & Vizziano-Cantonnet, D. (2020). RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon. *Data in Brief*, 31, 105741. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105741>
- Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., Kuruma, Y., Mizuno, N., Suzuki, M., Okada, Y., Ieda, R., Uchino, T., Tasumi, S., Hosoya, S., Uno, S., Koyama, J., Toyoda, A., Kikuchi, K., & Sakamoto, T. (2019). A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes. *Current Biology*, 29(11), 1901–1909. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.069>
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E. S., Ciopac, M., Gessner, J., Holostenco, D., Kleiner, W., Kohlmann, K., Lamatsch, D. K., Prokopov, D., Bestin, A., Bonpunt, E., Debeuf, B., Haffray, P., ... Stöck, M. (2021). A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 376(1832), 20200089. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089>
- Lasalle, A., Norbis, W., & Vizziano-Cantonnet, D. (2021). Sex identification of morphologically-undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns. *Journal of Applied Ichthyology*, 37(6), 835–846. <https://doi.org/10.1111/jai.14268>
- Lasalle Gerla, A. E. (2016). *Caracterización y estudio de la expresión de la aromatasa en gónadas durante el desarrollo del esturión siberiano Acipenser baeri* (Bachelor in Science Thesis). UdelaR, FC. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8417>
- Lemoine, F., Domelevo Entfellner, J. B., Wilkinson, E., Correia, D., Dávila Felipe, M., De Oliveira, T., & Gascuel, O. (2018). Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature*, 556, 452–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>
- Lin, Q., Mei, J., Li, Z., Zhang, X., Zhou, L., & Gui, J. F. (2017). Distinct and cooperative roles of *amh* and *dmrt1* in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish. *Genetics*, 207(3), 1007–1022. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300274>
- Liu, X., Dai, S., Wu, J., Wei, X., Zhou, X., Chen, M., Tan, D., Pu, D., Li, M., & Wang, D. (2022). Roles of anti-Müllerian hormone and its duplicates in sex determination and germ cell proliferation of Nile tilapia. *Genetics*, 220(3), iyab237. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab237>
- Maack, G., & Segner, H. (2004). Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 139(1–3), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.004>
- Marchand, O., Govoroun, M., D'Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J. J., Bernot, A., Laudet, V., & Guiguen, Y. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1493(1–2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00186-X)
- Martínez, P., Robledo, D., Taboada, X., Blanco, A., Moser, M., Maroso, F., Hermida, M., Gómez-Tato, A., Álvarez-Blázquez, B., Cabaleiro, S., Piferrer, F., Bouza, C., Lien, S., & Viñas, A. M. (2021). A genome-wide association study, supported by a new chromosome-level genome assembly, suggests *sox2* as a main driver of the undifferentiated ZZ/ZW sex determination of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genomics*, 113(4), 1705–1718. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.007>
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>

- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., & Kondoh, H. (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9691–9696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611379104>
- Mullen, R. D., Ontiveros, A. E., Moses, M. M., & Behringer, R. R. (2019). AMH and AMHR2 mutations: A spectrum of reproductive phenotypes across vertebrate species. *Developmental Biology*, 455(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.07.006>
- Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., & Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological Reviews*, 101(3), 1237–1308. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2019>
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., & Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M)
- Nakamura, S., Aoki, Y., Saito, D., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., & Tanaka, M. (2008). *Sox9b/sox9a2*-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Molecular Reproduction and Development*, 75(3), 472–476. <https://doi.org/10.1002/mrd.20764>
- Nakamura, S., Kurokawa, H., Asakawa, S., Shimizu, N., & Tanaka, M. (2009). Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: Germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing theca cells. *Developmental Dynamics*, 238(10), 2652–2657. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22068>
- Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Toyoda, A., Taniguchi, Y., & Tanaka, M. (2012). Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS One*, 7(1), e29982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029982>
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the world*. John Wiley & Sons.
- Nguyen, N. T. T., Vincens, P., Dufayard, J. F., Roest Crollius, H., & Louis, A. (2022). Genomicus in 2022: Comparative tools for thousands of genomes and reconstructed ancestors. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1025–D1031. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1091>
- Nicol, B., Yano, A., Jouanno, E., Guérin, A., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2013). *Follistatin* is an early player in rainbow trout ovarian differentiation and is both colocalized with *aromatase* and regulated by the *wnt* pathway. *Sexual Development*, 7(5), 267–276. <https://doi.org/10.1159/000350687>
- Okada, H., Hagihara, S., Yamashita, K., Ijiri, S., & Adachi, S. (2017). Expression pattern of *foxl2* and *dmrt1* in gonad of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* in relation to sex differentiation. *Aquaculture*, 479, 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.020>
- Picard, M. A. L., Vicoso, B., Bertrand, S., & Escriva, H. (2021). Diversity of modes of reproduction and sex determination systems in invertebrates, and the putative contribution of genetic conflict. *Genes*, 12(8), 1136. <https://doi.org/10.3390/genes12081136>
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1–4), 229–281. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Piferrer, F. (2011). Endocrine control of sex differentiation in fish. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, 2, 1490–1499. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00162-3>
- Piferrer, F., Baker, I. J., & Donaldson, E. M. (1993). Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology*, 91(1), 59–65. <https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1104>
- Piferrer, F., & Guiguen, Y. (2008). Fish gonadogenesis. part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 35–55. <https://doi.org/10.1080/10641260802324644>
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I. I., Devlin, R. H., & Donaldson, E. M. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *Journal of Experimental Zoology*, 270(3), 255–262. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700304>
- Qi, Q., Dong, Z., Zhang, N., Wang, L., Shao, C., & Xu, W. (2021). Cloning, expression and functional analysis of the desert hedgehog (*dhh*) gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Gene Expression Patterns*, 39, 119163. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2020.119163>
- Redmond, A. K., Casey, D., Gundappa, M. K., Macqueen, D. J., & McLysaght, A. (2023). Independent rediploidization masks shared whole genome duplication in the sturgeon-paddlefish ancestor. *Nature Communications*, 14(1), 2879. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38714-z>
- Robledo, D., Ribas, L., Cal, R., Sánchez, L., Piferrer, F., Martínez, P., & Viñas, A. (2015). Gene expression analysis at the onset of sex differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, 16(1), 973. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2142-8>
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y. L., Bremiller, R. A., Wilson, C., Cañestro, C., & Postlethwait, J. H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 5(5), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.02.008>
- Rzepkowska, M., & Ostaszewska, T. (2013). Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, 6(2), 75–88. <https://doi.org/10.1111/raq.12027>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of The National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Simakov, O., Marlétaz, F., Yue, J. X., O'connell, B., Jenkins, J., Brandt, A., Calef, R., Tung, C. H., Huang, T. K., Schmutz, J., Satoh, N., Yu, J. K., Putnam, N. H., Green, R. E., & Rokhsar, D. S. (2020). Deeply conserved synteny resolves early events in vertebrate evolution. *Nature Ecology & Evolution*, 4, 820–830. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1156-z>
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman.
- Song, W., Xie, Y., Sun, M., Li, X., Fitzpatrick, C. K., Vaux, F., O'Malley, K. G., Zhang, Q., Qi, J., & He, Y. (2021). A duplicated *amh* is the master sex-determining gene for *Sebastes rockfish* in the Northwest Pacific. *Open Biology*, 11(7), 210063. <https://doi.org/10.1098/rsob.210063>
- Sreenivasan, R., Jiang, J., Wang, X., Bártfai, R., Kwan, H. Y., Christoffels, A., & Orbán, L. (2014). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 90(2), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110874>
- Strüssmann, C. A. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 13–29. <https://doi.org/10.1023/A:1023343023556>
- Vidotto, M., Grapputo, A., Boscari, E., Barbisan, F., Coppe, A., Grandi, G., Kumar, A., & Congiu, L. (2013). Transcriptome sequencing and de

- novo annotation of the critically endangered Adriatic sturgeon. *BMC Genomics*, 14, 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-407>
- Vizziano-Cantonnet, D., Baron, D., Mahé, S., Cauty, C., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2008). Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5), 277–288. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0039>
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., & Lasalle, A. (2018). Sex determination and differentiation of the Siberian sturgeon. In P. Williot, G. Nonnotte, D. Vizziano-Cantonnet, & M. Chebanov (Eds.), *The Siberian sturgeon (Acipenser baeri, Brandt, 1869) Volume 1-Biology* (pp. 93–113). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61664-3_6
- Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., & Genthon, C. (2018). De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and Comparative Endocrinology*, 268, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.007>
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 83(1), 19–36. <https://doi.org/10.1002/mrd.22589>
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., & Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 236(8), 2198–2206. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21212>
- Wang, D. S., Kobayashi, T., Zhou, L. Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., & Nagahama, Y. (2007). Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Molecular Endocrinology*, 21(3), 712–725. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0248>
- Wang, W., Zhu, H., Dong, Y., Dong, T., Tian, Z., & Hu, H. (2019). Identification and dimorphic expression of sex-related genes during gonadal differentiation in sterlet *Acipenser ruthenus*, a primitive fish species. *Aquaculture*, 500, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.001>
- Wrobel, K. H. (2003). The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: The müllerian duct. *Anatomy and Embryology*, 206(4), 255–271. <https://doi.org/10.1007/s00429-002-0287-0>
- Wu, G. C., Jeng, S. R., Pan, Y. T., Li, H. W., Ku, W. L., Lin, C. J., & Chang, C. F. (2019). The germline-specific expression of *Foxl3a* and its paralogous *Foxl3b* are associated with male gonadal differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology*, 277, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.03.008>
- Wuertz, S., Güralp, H., Pšenička, M., & Chebanov, M. (2018). Sex determination in sturgeon. In H. P. Wang, F. Piferrer, S. L. Chen & Z. G. Shen, (Eds.), *Sex control in aquaculture* (pp. 645–668). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch33>
- Yamaguchi, T., & Kitano, T. (2023). Amh/Amhr2 signaling causes masculinization by inhibiting estrogen synthesis during gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2480. <https://doi.org/10.3390/ijms24032480>
- Yamamoto, T.-O. (1969). Sex differentiation. *Fish physiology*, 3(3), 117–175. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60113-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60113-2)
- Yan, Y. L., Batzel, P., Titus, T., Sydes, J., Desvignes, T., BreMiller, R., Draper, B., & Postlethwait, J. H. (2019). A hormone that lost its receptor: Anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish gonad development and sex determination. *Genetics*, 213(2), 529–553. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302365>
- Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S., & Kitano, T. (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(2), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.162>
- Yuan, X., Zhou, X., Qiao, X., Wu, Q., Yao, Z., Jiang, Y., Zhang, H., Zhang, Z., Wang, X., & Li, J. (2020). FoxA2 and p53 regulate the transcription of *HSD17B1* in ovarian granulosa cells of pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(1), 74–82. <https://doi.org/10.1111/rda.13850>
- Zhang, X., Li, G., Zhou, J., Lv, M., Li, L., & Chen, J. (2022). Full-length gonad transcriptome analysis of Amur sturgeon *Dmrt* family genes: Identification, characterization, and expression patterns during gonadal differentiation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(4), 839–852. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01087-z>
- Zhang, Z., Zhu, B., Chen, W., & Ge, W. (2020). Anti-Müllerian hormone (*Amh/amh*) plays dual roles in maintaining gonadal homeostasis and gametogenesis in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 517, 110963. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110963>
- Zheng, S., Long, J., Liu, Z., Tao, W., & Wang, D. (2018). Identification and evolution of TGF- β signaling pathway members in twenty-four animal species and expression in Tilapia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1154. <https://doi.org/10.3390/ijms19041154>
- Zhou, L., Charkraborty, T., Zhou, Q., Mohapatra, S., Nagahama, Y., & Zhang, Y. (2016). *Rspo1*-activated signalling molecules are sufficient to induce ovarian differentiation in XY medaka (*Oryzias latipes*). *Scientific Reports*, 6, 19543. <https://doi.org/10.1038/srep19543>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Lasalle, A., Benech-Correa, G., Brunet, F. G., & Vizziano-Cantonnet, D. (2024). *hsd17b1* is a key gene for ovarian differentiation of the Siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 91, e23729. <https://doi.org/10.1002/mrd.23729>

Capítulo 3:

b) Regulación de los principales genes femeninos por esteroides sexuales

Introducción

Ante los antecedentes ya mencionados y los resultados obtenidos y discutidos en el artículo publicado como parte del capítulo 3a, planteamos evaluar mediante la administración de tratamientos con hormonas esteroideas gonadales cómo estas pueden estar regulando a los principales genes femeninos (*hsd17b1*; *foxl2* y *cyp19a1*). Se ha observado en diferentes especies de teleósteos donde los estrógenos son claves en la diferenciación del sexo, que estos son capaces de regular en un bucle de regulación positiva a los genes involucrados en la producción de estrógenos y llevando a la diferenciación ovárica (Baron et al., 2005; Guiguen et al., 2010). Los andrógenos en ciertos teleósteos también son claves y actúan reprimiendo la vía femenina y estimulando la masculina un ejemplo es *Paralichthys olivaceus* (lenguado japonés) (Yang et al., 2020), esto sucede cuando juegan un papel importante en la diferenciación masculina. Otros ejemplos también muy estudiados son el medaka y el zebrafish donde tratamientos con andrógenos en hembras genéticas llevan a la producción machos fenotípicos con testículos funcionales (Hagino et al., 2001; Örn et al., 2003). Nuestro estudio anterior, sumado a estas experimentales con estrógenos y andrógenos exógenos aquí presentadas son claves para confirmar que el esturión siberiano tiene una íntima regulación de la diferenciación sexual ligada a las hormonas esteroideas femeninas, y que los andrógenos no estarían involucrados en la diferenciación del sexo al menos durante la etapa temprana de diferenciación molecular.

Materiales y métodos.

Animales experimentales

Los ejemplares de 2,5 meses de edad de esturión siberiano utilizados fueron proporcionados por la empresa Estuario del Plata, y mantenidos en el Laboratorio de Experimentación Animal de peces de producción (LEA) de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República Oriental del Uruguay) hasta realizados los tratamientos a los 4 meses de edad cuando se muestrearon. Durante el período que los peces estuvieron en las instalaciones de Facultad de Ciencias, fueron alimentados diariamente al 2% del peso corporal.

Químicos

Para los tratamientos hormonales se utilizaron estradiol-17 β ((17 β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) y 11 β - hidroxandrostenediona (4-Androsten-11 β -ol-3,17-dione) de la empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). En todos los casos los tratamientos se administraron en forma intraperitoneal.

Sexado

El sexado de los animales se realizó utilizando ADN genómico extraído de una porción de aleta, y mediante la una PCR en tiempo final utilizando los cebadores de que amplifican el marcador genético del sexo publicado por Kuhl et al. (2021). El procedimiento detallado de la extracción de ADN y condiciones de PCR fue mencionado en materiales y métodos del artículo publicado como parte de este capítulo (Lasalle et al., 2024; Capítulo 3a)

Tratamientos en poblaciones mixtas

Se realizaron dos tratamientos, el primero a los 2,5 meses de edad donde se inyectó una única vez a nivel intraperitoneal a 5 individuos con estradiol-17 β (E2) en suero salino con 3% de etanol, en una dosis de 5 μ g E2 gramo/peso corporal. El tratamiento tuvo un total de 6 horas de duración al sacrificio. Otros cinco individuos fueron el grupo control y se les administró de la misma forma solución salina (0,15 M NaCl₂), con etanol 3%. La segunda experimental en poblaciones mixtas se realizó de la misma forma, esta vez contando con seis individuos tratados vs seis control, todos de 3 meses de edad. La dosis fue la misma que la mencionada previamente (5 μ g E2 gramo/peso corporal o g/p.c.), el control salino se preparó de igual forma, y el tratamiento tuvo un período total de 12 horas al sacrificio.

Tratamientos en animales sexados

Se realizaron dos tratamientos agudos utilizando E2 y 11 β - hidroxandrostenediona (11 β - And) administradas de manera intraperitoneal. Se sexaron los esturiones a los 4 meses de edad y se seleccionaron 24 hembras, y 24 machos. 12 hembras y 12 machos fueron utilizados para el tratamiento con estrógenos (grupos 6 hembras control; 6 hembras tratadas; 6 machos control; 6 machos tratados). El mismo procedimiento de separación por grupos se realizó para tratar a los animales con andrógenos.

Al grupo control, se le administró una única inyección conteniendo solución salina con etanol 3%, mientras que a los individuos tratados se les administró una única inyección de estradiol-17 β con etanol 3%. El tratamiento para el grupo tratado fue con una dosis fue de 5 μ g g/p.c. de E2 en solución salina con 3% de etanol, y 6 horas de duración al sacrificio. En el caso del tratamiento con 11 β -androstenediona la dosis utilizada fue 10 μ g/g p.c. en solución salina con etanol 3% y con una duración total de 12 horas al sacrificio. El grupo control para andrógenos llevo la misma preparación

que la mencionada para el control de estrógenos. Luego de los tiempos mencionados post inyección se realizaron los muestreos de gónadas de los animales. Las dosis fueron seleccionadas a partir de una amplia búsqueda bibliográfica y tomando como principales aquellos estudios previos generados sobre esturiones (Kwon & Adachi 2009; Omoto et al., 2002, Saber et al., 2019).

Muestreo de animales y qPCR

Una vez finalizados los tratamientos, se sacrificaron a los animales por deservicación, y se muestrearon las gónadas en condiciones de esterilidad. Los tejidos gonadales fueron conservados inmediatamente en nitrógeno líquido para conservar su integridad y evitar cualquier tipo de degradación hasta el momento de realizar la extracción de ARN para posterior retro transcripción y análisis de qPCR. Estos procedimientos mencionados (extracción de ARN; retrotranscripción y análisis de qPCR) se realizaron de exactamente la misma forma en que se definieron en el artículo Lasalle et al 2024 (Capítulo 3a).

Análisis estadísticos

Se evaluaron los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianza, cuando fueron normales y la varianza homogénea (Sokal & Rohlf, 1995), se compararon los grupos de machos y hembras utilizando el test de t de Student. En caso de que no se cumpliera que los datos fueran normales y homogéneos se compararon los resultados de los grupos mediante pruebas no paramétricas, en este caso, al tratarse de dos grupos se utilizó Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$, fueron tomados como indicadores de diferencias significativas en los niveles de expresión entre grupos comparados.

Resultados

Los resultados de expresión de genes surgidos de tratamientos estrogénicos (E2) en qPCR en poblaciones mixtas muestran una estimulación del *foxl2* (Student; p-valor < 0,05) tanto para tratamientos agudos de 6 horas a los 2,5 meses de edad como de 12 horas a los 3 meses de edad, ambos con la misma dosis de 5 µg E2 g/p.c.. Otros genes estudiados que fueron vinculados en un primer momento con la vía de diferenciación femenina (*hsd17b1*, *lhx2*, *irx3* e *irx5*) no fueron estimulados al ser estudiados con un tratamiento de 12 horas. Cabe destacar que para *cyp19a1a* se observó una estimulación a los 2,5 meses de edad (Student; p-valor < 0,05) que no se observó luego en el tratamiento de 3 meses (Figura 7.3 y 8.3).

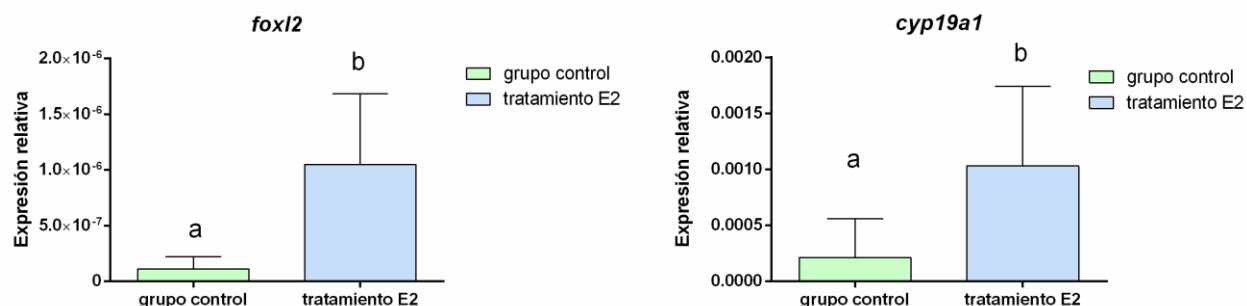


Figura 7.3. Promedio de expresión de cada gen ($\pm$ SD). Efecto del estradiol en una población sin sexar (mixta) de 2,5 meses de edad. Tratamiento agudo por 6h por inyección de 5 µg E2 g/p.c.. *foxl2* y *cyp19a1* resultan estimulados por el efecto del estradiol. Letras diferentes indican diferencias significativas de expresión entre grupos (*foxl2*, t-test = $p < 0,01$; *cyp19a1*, t-test = $p < 0,05$).

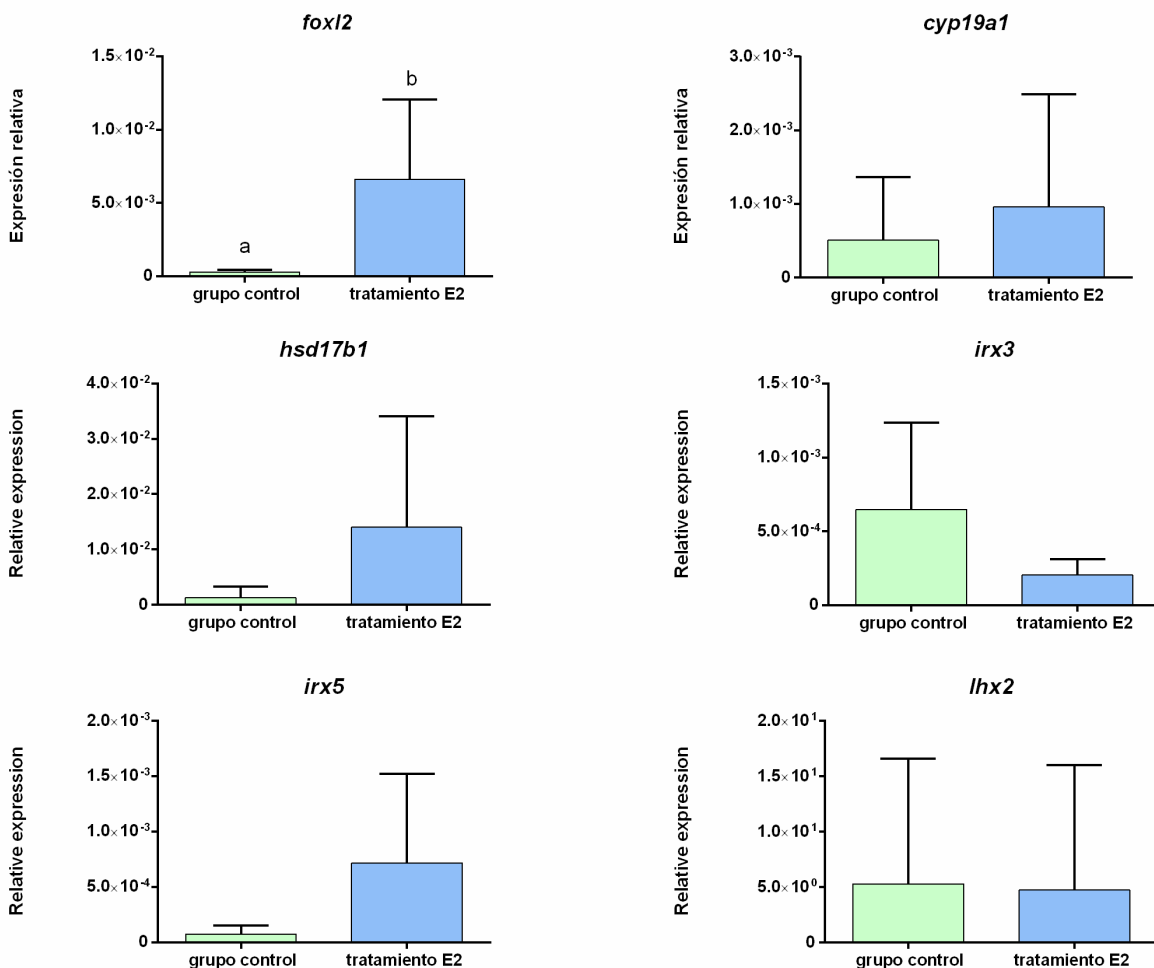


Figura 8.3. Promedio de expresión de cada gen ($\pm$ SD). Efecto del estradiol en una población sin sexar (mixta) de 3 meses de edad. Tratamiento agudo por 12h por inyección de 5 μ g E2 g/p.c.. *foxl2* es el único gen que resulta estimulado por el efecto del estradiol. Letras diferentes indican diferencias significativas de expresión entre grupos (*foxl2*, Mann-Whitney = $p < 0,05$).

En cuanto a las poblaciones sexadas donde se aplicaron tratamiento con E2 y 11 β - And, se observó la estimulación únicamente del gen *foxl2* en machos tratados con E2 (5 μ g E2 g/p.c.) (Mann-Whitney; p-valor < 0,05) respecto de los machos control. Ni la *hsd17b1* ni la *cyp19a1* mostraron cambios significativos en machos tratados. El mismo tratamiento sobre hembras no mostró cambios significativos en la expresión de ninguno de los tres genes (Figura 9.3).

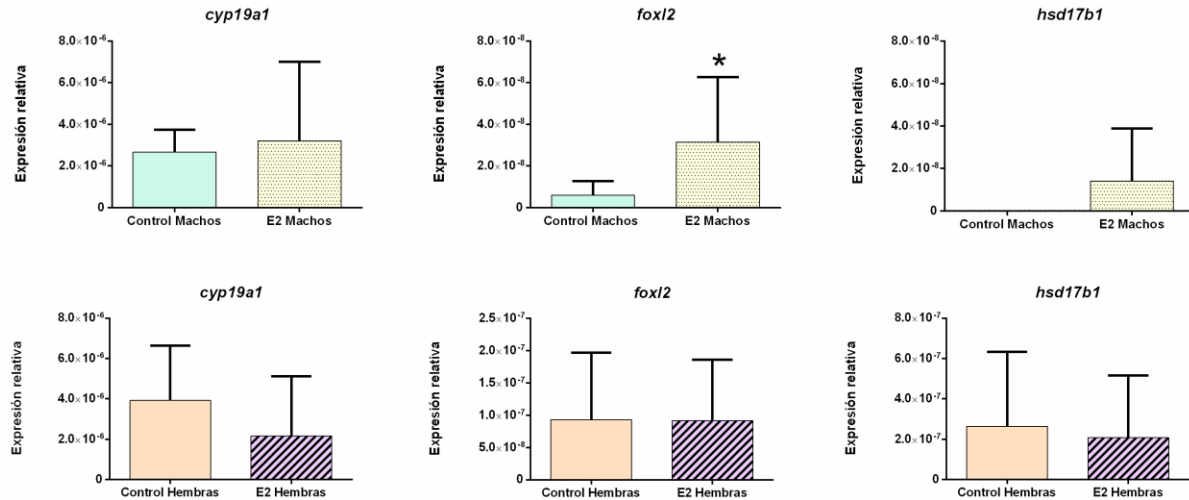


Figura 9.3. Promedio de expresión de cada gen ($\pm$ SD). Efecto del estradiol en machos y hembras de 4 meses de edad. Tratamiento agudo por 6h por inyección de 5 μ g E2 g/p.c.. *foxl2* en machos tratados es el único gen que resulta estimulado por el efecto del estradiol (se indican diferencias significativas entre grupos con un *; *foxl2*, Mann-Whitney= $p<0,05$).

La aplicación de 11 β -And (10 μ g g/p.c.), no tuvo ningún efecto sobre la regulación de los tres genes estudiados (*hsd17b1*, *foxl2*, *cyp19a1*) en machos como en hembras. De hecho, no se observaron cambios significativos en la expresión de los genes ensayados (Figura 10.3).

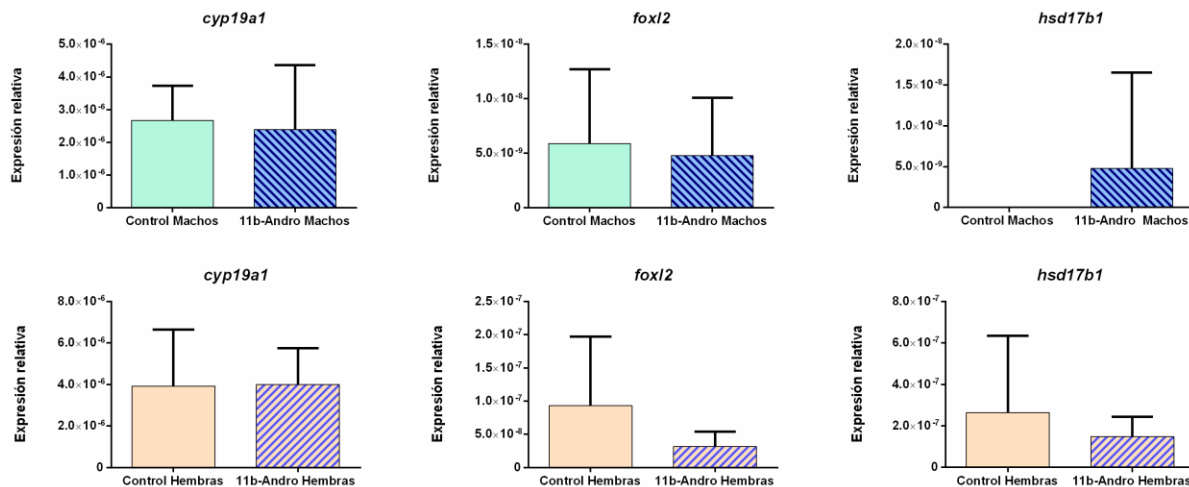


Figura 10.3. Promedio de expresión de cada gen ($\pm$ SD). Efecto de la 11 β -Androstenediona en machos y hembras de 4 meses de edad. Tratamiento agudo por 12hs por inyección de 10 μ g de 11 β -Androstenediona gramo/peso corporal. No existieron diferencias significativas entre grupos tratados y control ($p>0.05$ en todos los casos).

Discusión

La diferenciación del sexo del esturión siberiano parece estar marcada según lo indican los resultados de expresión génica por la vía de producción de estrógenos (Lasalle et al., 2024). Así mismo se ha observado que la vía de diferenciación masculina clásica no está activada mientras que la vía de diferenciación femenina si lo está desde un período muy temprano. Esto nos ha llevado a hipotetizar que la diferenciación gonadal se podría estar produciendo por la formación de un ambiente rico en estrógenos en la gónada primordial que llevará a que esta se desarrolle en un ovario, o por la falta de estrógenos en el ambiente gonadal primordial que llevará a la formación de un testículo. Es decir que, en estos peces basales, anteriores a los teleósteos a nivel evolutivo (Grande & Bemis 1996), los estrógenos ya actúan como los inductores de la diferenciación ovárica, así como planteó Yamamoto (1969) que sucede en la mayoría de los peces modernos, aunque no en todos. La acción de los estrógenos como se observa en esta sección es capaz de estimular al gen *foxl2* en machos tratados con estradiol, hay que recordar que *foxl2* es un gen clásico femenino vinculado a la regulación positiva de la producción de estrógenos. Esto indica la potencia de esta hormona para activar al menos parte de la vía femenina en individuos masculinos, y verifica su rol en la diferenciación ovárica. Esta regulación de la vía femenina y en particular del gen *foxl2* por estrógenos ya ha sido demostrada en teleósteos (Baron et al., 2005; Guiguen et al., 2010; Vizziano-Cantonnet et al., 2008), y esto muestra que este accionar a nivel molecular se mantiene desde los peces basales.

La expresión de genes relacionados con la diferenciación femenina, con la producción de estrógenos y la regulación del *foxl2* por E2 (Capítulos 1 y 3) permitieron evaluar correctamente (momento y dosis de E2 usadas) los efectos de los estrógenos en la transdiferenciación del sexo de la especie. Esto permitió demostrar fehacientemente que la diferenciación sexual de los esturiones depende de los estrógenos (Vizziano-Cantonnet et al., 2025). Por otra parte, el intento de

transdiferenciar hembras genotípicas a machos fenotípicos no tuvo éxito, es decir las hembras no se transdiferenciaron, manteniendo entonces el desarrollo de un ovario (Vizziano-Cantonnet et al., 2025). Esto concuerda con los resultados a nivel molecular del tratamiento con el andrógeno 11-oxigenado en hembras, que no mostró ningún cambio sobre los genes de la vía de diferenciación femenina, es decir no se reprimieron los genes femeninos, lo que hubiese sido esperado si la acción de las hormonas masculinas fuera necesaria para la activación de la vía de diferenciación testicular. Esto nos lleva a fortalecer la hipótesis de que la diferenciación de la gónada masculina se estaría produciendo por un ambiente gonadal libre de estrógenos y no por la acción de andrógenos en el futuro testículo. Más allá de esto, pueden existir otros genes masculinos que no tengan que ver con la producción de hormonas y que se activen tempranamente en el testículo marcando que este se está diferenciando.

Del Capítulo 1 y del presente capítulo (Capítulo. 3) se desprende la idea de que hay tres genes femeninos esenciales involucrados en los primeros pasos de la diferenciación sexual que llevan a la producción de estrógenos. Se constata junto a otros trabajos del laboratorio que la diferenciación sexual de la especie depende de los estrógenos, pero sería independiente de los andrógenos 11-oxigenados. Sin embargo, no se conoce que otros genes se activan durante el desarrollo temprano de la gónada femenina, ni cuáles son los genes que conducen a la gónada masculina temprana. Para investigar esto se desarrolló un estudio comparativo del transcriptoma gonadal de hembras y machos de 2,5 meses de edad sexados genéticamente que se presenta en el Capítulo 4.

Conclusiones del Capítulo 3.

Los resultados de este capítulo permiten proponer que la *hsd17b1* juega un papel central en la diferenciación sexual de los esturiones siberianos y posiblemente de los esturiones en general.

La activación de *hsd17b1* junto a *cyp19a1* y *foxl2*, que conforman un trío de genes involucrados en la producción de estrógenos, sumado a que tratamientos con E2 estimulan la expresión de *foxl2* (la vía femenina) en machos, y la transdiferenciación de machos genotípicos hacia hembras fenotípicas (Vizziano-Cantonnet et al., 2025) confirman el papel fundamental de los estrógenos en la diferenciación sexual de la especie.

La falta de acción de andrógenos 11-oxigenados en hembras tratadas durante la diferenciación molecular donde no hay represión de genes femeninos clásicos, y la incapacidad de llevar adelante la transdiferenciación de hembras genotípicas a machos fenotípicos nos permiten inferir que la diferenciación testicular se produce debido a un ambiente falto de estrógenos en la gonada primordial, y no por presencia de hormonas sexuales masculinas.

La pregunta es si la activación de estos tres genes relacionados con la producción de estrógenos (*cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*) es suficiente para llevar adelante un proceso tan complejo, o si existen otros grupos de genes aún no identificados que colaboren en la diferenciación gonadal en las etapas tempranas de desarrollo. Para resolver en parte esta interrogante se desarrollan estudios de transcriptómica en el Capítulo 4.

Capítulo 4:

Primeros estudios de la diferenciación del sexo en etapas tempranas del desarrollo, utilizando transcriptómica en individuos sexados genéticamente

Resumen

En los últimos años se ha avanzado en determinar cuáles son los principales factores moleculares que actúan en las vías de diferenciación femenina y masculina del esturión siberiano para dar lugar a la formación de un ovario o un testículo respectivamente. Sin embargo la falta de técnicas precisas para sexar a los animales durante los períodos de indiferenciación gonadal llevó a utilizar métodos de sexado indirecto para hacer inferencias sobre los genes actuantes en estos complejos procesos. En el año 2021 Kuhl y sus colegas, publicaron el primer marcador del sexo a nivel genético encontrado en el genoma femenino del esturión Sterlet y validado en el esturión Siberiano. Esta herramienta permitió a partir de ese momento trabajar con certeza en cuanto al sexo de animales en desarrollo temprano. En este trabajo entonces se utilizaron peces en etapas muy tempranas de desarrollo gonadal sexados genéticamente, y la técnica de transcriptómica para llevar adelante un estudio comparado de los genes expresados diferencialmente entre gónadas indiferenciadas de hembras y machos de 2,5 meses de edad. Los resultados mostraron que la vía femenina está definida por la sobre expresión descrita por un total de 62 contigos de los cuales 32 codifican para proteínas, mientras que la vía masculina se caracteriza por la sobre expresión de 57 contigos de los cuales 30 codifican para proteína. La vía femenina fue caracterizada por genes vinculados a la producción de estrógenos y otros vinculados a ellos. *hsd17b1*, *cyp19a1* y *foxl2*, genes vinculados directamente a la producción de estrógenos aparecen expresados diferencialmente, junto a ellos los factores de transcripción *egr-1*, *jun-b*, *c-fos*, quienes pueden ser estimulados por los

estrógenos y a su vez algunos de ellos (*jun-b*, y *jun-b* junto a *c-fos* actuando como dímero (AP-1) son capaces de regular la actividad de la aromatasas. Esto indica una potencial regulación positiva enriqueciendo el ambiente gonadal incipiente del futuro ovario elevando los niveles de estrógeno. Junto a estos aparecen también *ier-2* y *di-ras-2*. En conjunto este grupo parece tener un potencial de ser regulado por la acción de los estrógenos mencionados. El involucramiento de la mayoría de estos genes en los procesos de diferenciación y proliferación celular los coloca en una posición importante en el proceso de diferenciación gonadal. Además, se observa la activación del gen que codifica para el receptor a la tirotrópica (*trh-r*) y de serotonina *N* acetil transferasa (*aanat*), esto pone en juego de manera potencial a nuevas hormonas no tenidas en cuenta en la diferenciación ovárica hasta el momento, las hormonas tiroideas y la melatonina. En machos se describe la sobre expresión del gen *tbx1*, único de la lista ya descrito en peces y otros grupos en lo que refiere a la diferenciación testicular, y hasta el momento desconocido en la diferenciación temprana del esturión. El conjunto de resultados marca un proceso de diferenciación temprana iniciada en hembras antes que en machos y previa a los 2,5 meses de edad, pero lo más importante es luego de muchos años se rompe esquema hasta ahora descrito de un sistema de genes clásicos femeninos guiando la diferenciación femenina, y se suman nuevos factores muy relevantes, algunos con un fuerte apoyo bibliográfico y otros nunca descritos en procesos de diferenciación del sexo en lo que respecta la literatura de vertebrados. Yendo más allá se integra a un proceso hasta ahora dominado por los estrógenos, la potencial acción de las hormonas tiroideas y de la melatonina, algo sumamente novedoso para lo que refiere a la diferenciación ovárica en el grupo. Además, se aporta información contundente para iniciar el estudio más profundo de la vía de diferenciación masculina, la cual aún está muy poco abordada. La generación de este primer análisis de datos de un transcriptoma gonadal en esturiones siberianos sexados genéticamente en etapas tempranas de desarrollo deja una puerta abierta a la exploración de

los diferentes genes de cada vía, y debe ahondarse mediante la aplicación de pruebas funcionales futuras.

Introducción

El esturión siberiano es una de las especies más cultivadas a nivel de acuicultura para la producción de caviar, siendo Uruguay una potencia a nivel mundial en lo que refiere a la exportación de este producto de lujo en cuanto a su cantidad y calidad (Bronzi et al., 2019). A su vez es importante tener en cuenta que el esturión siberiano al igual que otros esturiones, una especie en peligro de extinción (Bemis et al., 1997). Conocer mejor el tipo de determinación sexual, la diferenciación del sexo y su control molecular es por lo tanto una tarea de fundamental importancia no sólo para comprender como manejar el sexo de la especie a nivel productivo, sino también por su inserción en la conservación de la especie y en estudios de la evolución de la determinación y diferenciación del sexo. Sin embargo, las características genéticas propias de la especie hacen que esta tarea sea compleja. El esturión siberiano cuenta con tres rondas completas de duplicación del genoma por lo que posee 256 cromosomas (son tetraploides) (Mugue & Barmintseva, 2018; Peng et al., 2007; Rajkov et al., 2014) y este es extremadamente grande, de 8,3 pg de ADN (4,2Gb) (Bytyutskyy et al., 2012; Klopp et al., 2020; Zhou et al., 2011), duplicando el tamaño por ejemplo del genoma de un pez diploide como puede ser *Danio rerio* (zebrafish) (Lamatsch et al., 2000). Esto ha dificultado su ensamblado que actualmente está en manos de un consorcio europeo, y aún no ha sido publicado, siendo este de fundamental importancia para los estudios genéticos en general y los de determinación sexual en particular. Otra característica que dificulta los estudios de determinación y diferenciación sexual es la presencia de un cariotipo homomórfico, es decir en donde no se distingue la presencia de cromosomas sexuales diferenciados morfológicamente (Fontana, 1994). A su vez no queda claro si presenta o no cromosomas sexuales lo suficientemente evolucionados como

para mostrar una diferenciación genética, o si presentan proto-cromosomas como se plantea en el takifugu (Kamiya et al., 2012).

La homomorfía cromosómica es una característica que comparten la enorme mayoría de especies de peces (Arkhipchuk, 1995; Scharl et al., 2016) estos aspectos dificultan el hallazgo de genes determinantes del sexo. Sin embargo, en los últimos 20 años y con el advenimiento de las metodologías ómicas y de edición génica se han podido identificar genes determinantes del sexo en peces teleósteos, sobre todo en aquellas especies que usan el sistema de determinación sexual XX/XY. De hecho, se han descubierto genes ligados al cromosoma Y de varias especies de peces, pero estos genes no se encuentran conservados en teleósteos incluso variando a veces dentro de un mismo género (Hattori et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Li et al., 2015; Matsuda et al., 2002; Myosho et al., 2012; Pan et al., 2019; Reichwald et al., 2015; Takehana et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; Yano et al., 2012). En lo que se refiere a especies de peces ZZ/ZW existe menos información sobre los genes determinantes del sexo que en los sistemas XX/XY. En el caso del lenguado chino, el *dmrt1* presente en los machos (ZZ) fue propuesto como gen determinante del sexo de la especie (Chen et al 2014). En un trabajo posterior la delección del *dmrt1* en un macho genético condujo a una gónada de estructura femenina (lamelas ovígeras) en cuyo interior se detuvo la espermatogénesis (Cui et al 2017). Sin embargo, no se observó la inversión del sexo como era esperado, de modo que el *dmrt1* es un factor importante para la estructuración testicular y la manutención de la espermatogénesis, pero no se trata del gen que determina el sexo. En otras especies del género *Seriola* poseen sistema ZZ/ZW se identificó un SNP en la enzima de la esteroidogénesis *hsd17b1* ligado al sexo femenino. Esta enzima es responsable de la producción de estrógenos en hembras como ya introdujimos en el Capítulo 3a. El SNP de la *hsd17b1* presente en la hembra permite la producción normal de estrógenos durante el desarrollo, mientras que el SNP presente en el macho genera una disrupción de la síntesis de la enzima y por lo tanto inhibe la producción de estrógenos

en los machos (Koyama et al., 2019). Este es el único caso de un gen ligado al sexo femenino, y por lo tanto al cromosoma W, descubierto hasta el momento en peces.

Los trabajos experimentales realizados hasta el presente apoyan la idea de que los esturiones presentan un cariotipo heterogamético femenino o sea ZZ/ZW (Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Omoto et al., 2005; Saber & Hallajian, 2014; Van Eenennaam et al., 1999; Van Eenennaam, 1997). A su vez las proporciones de sexo en cohortes observadas tanto en acuicultura como en la naturaleza que no se desvían de 1:1 (Lasalle et al., 2024, Capítulo 3a,b presente tesis; Sanfilippo et al., 2022) apoyan la idea de una determinación originada por la acción de un único factor genético (monofactorial). Esta idea se ha visto sostenida más recientemente por el descubrimiento de un marcador del sexo femenino en todos los esturiones ensayados del género *Acipenser* (Kuhl et al., 2021). Nuestra hipótesis es que los esturiones usan el sistema de determinación sexual de tipo ZZ/ZW y que existe un gen determinante femenino que se expresa muy tempranamente en el desarrollo gonadal de esturiones, como ocurre con la mayoría de los genes determinantes masculinos. Si bien la *hsd17b1* es considerada como gen determinante del sexo femenino en *Seriola* en el caso del esturión siberiano existe una activación muy temprana en las hembras, junto a una fuerte represión en machos (Lasalle et al 2024, Capítulo 3a) cuya regulación no es conocida aún. No podemos sostener la idea de que se trate del gen maestro que controla la determinación porque se encuentra tanto en el genoma femenino como en el masculino, no habiendo un cromosoma sexual al cual esté ligada, pero pensamos que puede estar controlada sea por el gen determinante del sexo, sea por ARNs no codificantes, con la capacidad de actuar como reguladores de la transcripción del gen. Nuestra hipótesis es que ese gen determinante sexual no ha sido identificado ni en esturiones, ni en otros peces, y esto se sustenta por la baja conservación de los genes determinantes del sexo en peces y por la ausencia de identificación de genes ligados al sexo en peces ZZ/ZW.

Para verificar nuestra hipótesis utilizaremos la transcriptómica, enfocada en el período más temprano conocido hasta el momento de la ventana de diferenciación molecular del sexo (2,5 meses de edad) (Lasalle et al., 2024 (presente tesis Capítulo 3a)) y en animales sexados genéticamente. Así, se buscará identificar que genes se vinculan con la vía de diferenciación del sexo femenino, y definir si dentro de los genes encontrados puede haber un candidato concreto a actuar como un gen determinante del sexo. Los genes de la vía masculina son un sub-producto de este trabajo y no serán analizados en profundidad en esta Tesis.

Materiales y métodos.

Animales experimentales

Los animales experimentales fueron provistos por la planta de acuicultura Estuario del Plata, ubicada en San Gregorio de Polanco, Departamento de Tacuarembó, Uruguay.

Los individuos de dos meses de edad fueron trasladados a las instalaciones del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, donde fueron mantenidos durante dos semanas, en un tanque de 500 l con un recambio de 50% de agua y alimentación al 2% del peso corporal diarios. Los peces fueron mantenidos con el fotoperíodo y la variación de temperatura natural siendo el rango de temperatura del período de entre 15 y 20 °C. Al cumplir los 2,5 meses de vida fueron sacrificados siguiendo el protocolo avalado por la Comisión Honoraria para la Experimentación Animal (CHEA expediente n°240012-000023-22) para continuar con los siguientes pasos experimentales.

Sexado de peces

Previo al sacrificio y durante las dos semanas de aclimatación, se realizó el sexado de peces. Para ello se utilizó la técnica de PCR en tiempo final y se amplificó el marcador genético del sexo

publicado por Kuhl et al. (2021). El primer paso fue realizar la extracción de ADN genómico (ADNg), y luego se realizó la PCR en tiempo final. Para ello se siguieron los protocolos de extracción de ADNg y PCR publicadas por Lasalle et al. (2024). Se seleccionaron 18 machos y 18 hembras para realizar la posterior extracción de ARN.

Extracción de ARN para NGS de hermanos de la misma cohorte

Debido a que se precisa un ARN de excelente calidad con un RIN > 7, se procedió a hacer la extracción inmediatamente luego de obtener la gónada de cada pez. Realizar el procedimiento de esta manera genera los mejores resultados de calidad e integridad del ARN. Para realizar la extracción se utilizó el kit comercial “Monarch ARN miniprep” de la empresa New England Biolabs, y se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

Validación del estadio molecular de los peces y de la expresión de algunos genes del transcriptoma gonadal

Previamente a enviar las muestras a su secuenciado de transcriptoma, se confirmó que el proceso de diferenciación molecular del sexo ya estuviese iniciado, esto se realizó evaluando la expresión del gen *hsd17b1* que es el gen marcador del sexo de la vía femenina más temprano identificado hasta el momento (Lasalle et al., 2024, Capítulo 3a de esta Tesis). Para los estudios de expresión se extrajo el ARN de 10 muestras, en las cuales se aplicó el protocolo de limpieza de ADNg contaminante, se realizó luego la retrotranscripción, y el estudio de expresión de la *hsd17b1* por qPCR (Lasalle et al., 2024, Capítulo 3a). Con ello se verificó la clara activación de la *hsd17b1* en las hembras a través de estudios estadísticos iguales a los ya descriptos en Lasalle et al. (2024 - Capítulo 3a). Una vez confirmada a nivel estadístico la activación de la *hsd17b1* en hembras se

procedió a extraer el ARN de 8 machos y 8 hembras de la misma cohorte para realizar el estudio de secuenciado masivo.

Luego de obtenido y analizado el transcriptoma, se eligieron algunos genes claves para los que se realizaron corridas de qPCR con el fin de verificar si había coincidencia entre las dos metodologías en lo referente a los niveles de expresión y su significancia estadística.

Análisis estadístico de qPCR

El análisis estadístico de los resultados de qPCR fue evaluado igual que se realizó en Lasalle et al., 2024 (ver Capítulo 3a) primero analizando la normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Test de Levene para media y mediana) de los datos expresión. Cuando los datos resultaron normales y homogéneos se analizó la existencia de diferencias significativas entre grupos con el test de Student (T-test). En caso de que el supuesto de normalidad no se cumpliera se evaluó la homogeneidad de varianza de medianas, cuando resultó homogénea se realizó igualmente un test de Student, en el caso de resultar una varianza no homogénea (Levene p-valor < 0,05) se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. En cualquiera de los dos casos (Test de Student o Test de Mann Whitney) un p-valor < 0,05 indicó diferencias significativas entre grupos. Previo a realizar la comparación en busca de diferencias significativas se aplicó sobre cada grupo el test de Grubbs que permite identificar si existen datos que sean outliers y en caso de que existieran se eliminaron.

Integridad del ARN y selección de individuos para ser secuenciados

La integridad y calidad del ARN de estas 16 muestras fue evaluada por bioanalyzer Agilent 2100, lo que permitió seleccionar el ARN de 6 gónadas femeninas y 6 gónadas masculinas para realizar su secuenciado. Este número de individuos de cada grupo experimental (machos y hembras)

es el requisito para tener un nivel estadístico robusto en lo que refiere a los resultados generados en un transcriptoma (Klopp, comunicación personal).

Las integridades obtenidas para las muestras de ARN de machos y hembras fueron extremadamente buenas, mostrando la efectividad de realizar la extracción de ARN directamente desde el tejido fresco, es decir inmediatamente se muestrea el tejido. En todos los casos se obtuvieron valores de RIN > 8, indicando su alta integridad (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Valores de RIN (Integridad de ARN) obtenidos del análisis de Bionalyzer realizados en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y en la empresa MacroGen previo a realizar el secuenciado de transcriptoma. El RIN se mide en un rango de 0 a 10. Un valor de RIN mayor de 7 se considera con una integridad apta para NGS. Un RIN mayor a 8 se considera con una excelente integridad de ARN.

Nombre de muestra	Valor RIN IIBCE	Valor RIN MacroGen
2139 Hembra	9.2	9.3
2140 Hembra	9.5	9.3
2141 Hembra	9.3	9.6
2142 Hembra	9.4	9.2
2143 Hembra	9.4	9.4
2145 Hembra	9.4	9.3
2148 Macho	9.1	9.2
2149 Macho	8.7	8.7
2150 Macho	8.6	8.8
2151 Macho	9.0	9.3
2153 Macho	8.9	8.8
2175 Macho	8.7	8.6

Secuenciado

Las muestras de ARN de alta calidad de 6 machos y 6 hembras de alta calidad (Tabla 1.4) fueron enviadas a Macrogen Corea, donde se verificó nuevamente su calidad, y luego se realizó el armado de librerías para el secuenciado del transcriptoma. Las librerías se realizaron mediante el uso del kit Illumina TruSeq stranded Total RNA library + Ribo-zero, y se realizó el secuenciado en un equipo NovaSeq6000, el cual genera lecturas de un largo de 100 pb de extremos pareados. Para este equipo en particular la salida total es de 40 millones lecturas por muestra secuenciada.

Ensamblado del transcriptoma

Los datos brutos del secuenciado fueron ensamblados por el Ing. Christophe Klopp (INRA de Toulouse, Francia) utilizando como referencia la base del transcriptoma gonadal publicado por el Laboratorio (Kopp et al., 2020; Vizziano Cantonnet et al., 2018). Para ello se utilizó el mismo procedimiento publicado en Klopp et al. (2020). A cada contig ensamblado se le asigna un código propio nombrado como “GICD” y un número de identificación.

Análisis bioinformático

Los análisis bioinformáticos se realizaron mediante el uso de Rstudio (versión 4.3.1), y mediante su software asociado “Bioconductor” en su versión 3.18 y los diferentes paquetes que lo componen. Para realizar los análisis de expresión diferencial de genes en particular se utilizó el paquete “edgeR”. De esta forma se realizó la comparación de análisis diferencial de genes entre muestras de machos y hembras de 2,5 meses de edad. Se consideraron como significativos aquellos contigos que mostraron un False Discovery Rate (FDR) $< 0,05$.

Se realizó además el análisis de “Gene Ontology” utilizando el paquete de Bioconductor “TopGo”. Este análisis fue llevado adelante utilizando los resultados obtenidos del análisis de

expresión diferencial de genes mencionado previamente. De esta manera se toman para el análisis los genes sobre regulados tanto para hembras como para machos y por lo tanto que mostraron un False Discovery Rate (FDR) $< 0,05$. De este análisis se evaluaron las rutas vinculadas con Procesos Biológicos (Biological Process, BP), Componentes celulares (Cellular Components, CC), y Funciones Moleculares (Molecular Function, MF). Se conservaron aquellas vías significativas, es decir que mostraron un resultado estadístico de Test de Fisher con un p-valor ajustado $< 0,05$ (ver MS4.3).

Anotación de contigos

Una vez realizado el análisis y obtenidos los contigos diferencialmente expresados en machos y hembras, se realizó la anotación de estos verificando su identidad mediante BLAST (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se estudiaron los contigos, y se seleccionaron los que contaron con un marco de lectura abierto (ORF) que codificase para una proteína funcional. Para obtener el ORF se usó la herramienta “expasy translate” (<https://web.expasy.org/translate/>) para realizar la traducción de secuencia nucleotídica a aminoacídica y localizar el marco de lectura correcto para cada uno. Para los contigos seleccionados se estudió su identidad a través de blastn para la secuencia nucleotídica y blastp para la secuencia aminoacídica en la base de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cg>).

Una vez obtenida la identidad de los contigos codificantes para una proteína se realizó una revisión bibliográfica para comprender cómo podrían estar involucrados y cuál podría ser su accionar en la diferenciación gonadal femenina o masculina dependiendo del gen.

Resultados

Estudios de expresión diferencial

Se obtuvieron un total de 91581 secuencias de las cuales sólo se observaron 62 contigos activados en forma diferencial en las hembras y 57 en los machos luego de la comparación de las muestras de gónadas de futuros 6 machos contra las muestras de gónadas de futuras 6 hembras - ambos sexados genéticamente - aplicando el análisis de expresión diferencial mediante el paquete edgeR. Es interesante destacar que el 99,87% de los contigos presentaron iguales niveles de expresión en los machos y las hembras, y sólo el 0,07% (n=62) de los contigos se vieron activados en las hembras y el 0,06% (n=57) en los machos (Figura 1.4).

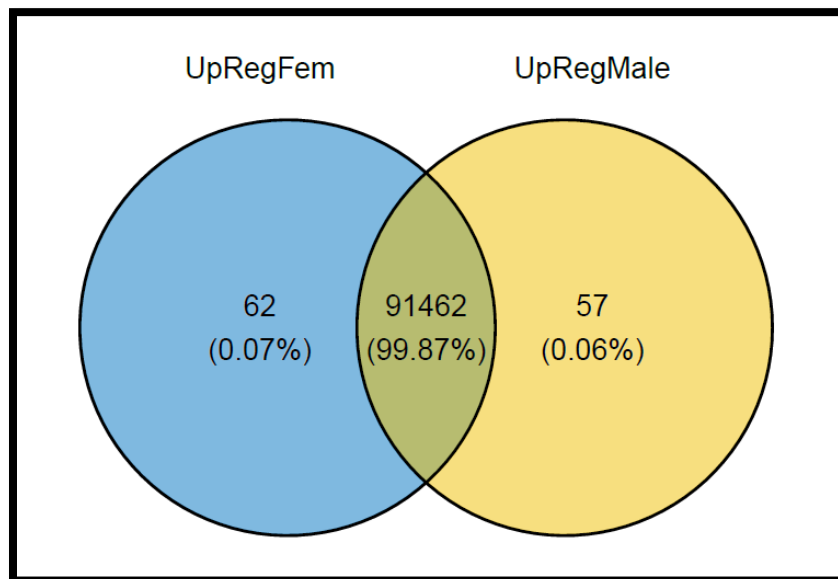


Figura 1.4. Diagrama de Venn obtenido de la comparación de expresión diferencial de genes entre hembras y machos de 2,5 meses de edad. UpRegFem (azul) representa la cantidad de contigos sobre expresados en hembras (62); UpRegMale representa la cantidad de genes sobre expresados en machos. La intersección de grupos representa la cantidad de contigos no significativos en la comparación.

Búsqueda de contigos con marcos de lectura

Del total de 62 contigos sobre expresados femeninos (Material Suplementario MS4.1), solamente 32 cuentan con un marco de lectura que codifica para una proteína (Tabla 2.4), de igual

manera del total de contigos sobre expresados en machos (n=57, Material Suplementario MS4.2) solo 29 cuentan con un marco de lectura que codifica para una proteína (Tabla 3.4).

Tabla 2.4. Contigos femeninos diferencialmente expresados (DE) que codifican para una proteína.

Código NCBI	Gen "Symbol"	Log ₂ FC	logCPM	FDR	Id Blastn	ORF / Id Blastp
GICD01088227.1	<i>hsd17b1</i>	3,110912	0,695855	2,18E-11	hsd17b1	SI / hsd17b1
GICD01082292.1	<i>chrna7</i>	2,181414	0,300276	9,16E-09	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 like	SI / neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 like
GICD01027714.1	<i>ier2</i>	1,514963	3,580543	4,24E-07	immediate early response gene 2 protein-like	SI / immediate early response gene 2 protein-like
GICD01064951.1	<i>diras2</i>	2,405916	3,375973	8,92E-07	GTP-binding protein Di-Ras2	SI / GTP-binding protein Di-Ras2
GICD01077530.1	<i>c-fos</i>	3,013134	3,372265	8,92E-07	Protein c-Fos like	SI / proto-oncogene c- Fos-like
GICD01090265.1	<i>cyp19a1a</i>	1,958954	1,182458	9,17E-07	aromatase (<i>cyp19a1</i>)	SI / Aromatase (<i>cyp19a1</i>)
GICD01087373.1	<i>trhr</i>	1,765854	2,896552	2,1E-06	thyrotropin-releasing hormone receptor-like	SI / Thyrotropin- releasing hormone receptor
GICD01023208.1	<i>foxl2</i>	2,635137	0,455554	1,57E-05	forkhead box protein L2, (<i>foxl2</i>)	SI / forkhead box protein L2 (<i>foxl2</i>)
GICD01059572.1	<i>jun-b</i>	1,821218	3,827602	0,000213	transcription factor JunB-like	SI / transcription factor JunB isoform X1
GICD01087320.1	<i>tmem271</i>	1,38849	0,997371	0,006129	transmembrane protein 271-like mRNA	SI / transmembrane protein 271-like mRNA
GICD01032392.1	<i>tonsl</i>	1,37497	1,343623	0,006423	tonsoku-like protein, mRNA	SI / Tonsoku-like protein
GICD01084445.1	<i>egr1</i>	1,144446	5,036742	0,007341	early growth response protein 1-like	SI / early growth response protein 1-like
GICD01059511.1	<i>ier2</i>	1,449407	0,104438	0,007341	immediate early response gene 2 protein-like	SI / immediate early response gene 2 protein-like
GICD01007426.1	<i>mhc class I antigen</i>	4,642036	1,464267	0,009067	MHC class 1 alpha antigen	SI / MHC class I alpha antigen
GICD01089620.1	<i>aanat</i>	3,078826	1,685651	0,009078	serotonin N- acetyltransferase-like	SI / serotonin N- acetyltransferase-like
GICD01078088.1	<i>c-fos</i>	2,15909	0,774713	0,014769	protein c-Fos-like, mRNA	SI / proto-oncogene c- Fos-like isoform X1
GICD01009598.1	?	0,955002	5,456288	0,01866	Uncharacterized protein, mRNA	SI / uncharacterized protein LOC131735831

GICD01009655.1	<i>h2 k1</i>	8,197664	0,035446	0,021374	MHC class I chain (Acsi-UBA)	SI / H-2 class I histocompatibility antigen
GICD01001726.1	<i>h4c7</i>	1,067252	9,102207	0,021872	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 32	SI / histone H4-like
GICD01000328.1	?	1,174873	7,749682	0,025759	histone H2A, mRNA	SI / uncharacterized protein LOC121514829
GICD01066315.1	<i>h4c7</i>	0,929594	7,595763	0,030163	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 55	SI / histone H4-like
GICD01015861.1	<i>asrgl1</i>	1,330658	0,47322	0,032135	L-asparaginase-like, mRNA	SI / L-asparaginase-like
GICD01010688.1	?	1,528112	2,56403	0,033206	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 51	SI / hypothetical protein EOD39_19946
GICD01073114.1	<i>h2ac11</i>	1,35344	4,12034	0,038297	histone H2A, mRNA	SI / H2A protein
GICD01030746.1	<i>h2ac</i>	0,808082	8,296956	0,04469	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 20	SI / histone H2A-like
GICD01066742.1	<i>mpst</i>	0,851523	2,603493	0,046754	mercaptopyruvate sulfurtransferase (mpst), mRNA	SI / 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
GICD01059541.1	<i>rnf227</i>	0,92957	2,729705	0,046754	RING finger protein 227-like, mRNA	SI / RING finger protein 227
GICD01080907.1	<i>h2ac</i>	1,153934	8,88404	0,046754	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 32	SI / histone H2A
GICD01089733.1	<i>h2b-3</i>	1,210297	7,82232	0,046754	<i>Acipenser ruthenus</i> genome assembly, chromosome: 56	SI / histone H2B 3-like
GICD01074858.1	<i>gsr</i>	0,84345	7,793524	0,047584	small ribosomal subunit protein eS26, mRNA	SI / glutathione reductase, mitochondrial
GICD01056685.1	<i>bud13</i>	1,021163	0,853664	0,047584	BUD13 homolog, mRNA	SI / BUD13-like protein isoform X2
GICD01048597.1	<i>ccl25</i>	1,112064	3,51511	0,047584	C-C motif chemokine 25-like, transcript variant X2	SI / C-C motif chemokine 25-like

Tabla 3.4. Contigos masculinos diferencialmente expresados (DE) que codifican para una proteína.

Código NCBI	Gen "Symbol"	Log ₂ FC	logCPM	FDR	Id Blastn	ORF / Id Blastp
GICD01008409.1_1-1800	<i>tbx1</i>	-1,529236	1,98446	1,38E-07	T-boxtranscription factor TBX1-like (Tbx1)	SI / TBX1 factor

GICD01083699.1	<i>plin1</i>	-2,017803	-0,53210	3,59E-06	Perilipin 1 like, transcript variant 2	SI / perilipin-1 isoform X1
GICD01068934.1	<i>nrxn3</i>	-1,77461	1,05826	4,69E-05	Neurexin 3, variant X39	SI / neurexin-3 isoform X32
GICD01019619.1	<i>chs2</i>	-3,25223	-1,33629	1,05E-03	chitin synthase Chs-2 like	SI / chitin synthase Chs-2 like
GICD01043896.1	<i>nrxn3</i>	-1,66058	0,63191	1,21E-03	neurexin-3, transcript variant X41, mRNA	SI / neurexin-3 isoform X19
GICD01031214.1	<i>tbx1</i>	-1,02732	2,19672	2,78E-03	T-box transcription factor TBX1, transcript variant X3, mRNA	SI / T-box transcription factor TBX1-like isoform X3
GICD01070285.1	?	-3,11816	1,99767	3,62E-03	Acipenser ruthenus genome assembly, chromosome: 6	SI / hypothetical protein EGW08_016480
GICD01023139.1	<i>adgre3</i>	-2,03930	-1,19883	4,18E-03	Acipenser ruthenus genome assembly, chromosome: 34	SI / adhesion G protein-coupled receptor E3-like
GICD01015214.1	<i>cpa1</i>	-4,51383	4,71896	4,86E-03	carboxypeptidase A1-like, mRNA	SI / carboxypeptidase A1-like
GICD01009223.1	<i>slc9a3</i>	-2,98530	-1,23609	5,17E-03	sodium/hydrogen exchanger 3-like, transcript variant X2, mRNA	SI / sodium/hydrogen exchanger 3-like isoform X2
GICD01054640.1	<i>he1.2</i>	-3,23404	6,50686	5,17E-03	hatching enzyme 1.2-like (LOC117432280), mRNA	SI / hatching enzyme 1.2-like
GICD01062130.1	<i>fgg</i>	-8,39114	-0,86755	5,82E-03	fibrinogen gamma chain (fgg), mRNA	SI / Fibrinogen gamma chain
GICD01008640.1	<i>cel</i>	-5,10286	4,77801	5,82E-03	bile salt-activated lipase-like, mRNA	SI / bile salt- activated lipase- like
GICD01034190.1	?	-3,87229	2,96323	5,82E-03	Acipenser ruthenus genome assembly, chromosome: 39	SI / hypothetical protein AOXY_G3965
GICD01068604.1	<i>slc10a1</i>	-1,24324	0,40289	5,95E-03	solute carrier family 10 member 1 (slc10a1), transcript variant X2, mRNA	SI / hepatic sodium/bile acid cotransporter

GICD01059159.1	<i>dfp3</i>	-2,746514	-0,81136	6,35E-03	putative defense protein 3, mRNA	SI / putative defense protein 3
GICD01086977.1	<i>prss3</i>	-6,548083	6,91982	6,41E-03	trypsin-3-like, mRNA	SI / trypsin-3-like
GICD01071611.1	<i>ky</i>	-1,276433	1,36109	7,71E-03	kyphoscoliosis peptidase, mRNA	SI / Kyphoscoliosis peptidase
GICD01022527.1	<i>cpa1</i>	-4,91630	2,90762	1,49E-02	carboxypeptidase A1-like, transcript variant X2, mRNA	SI / carboxypeptidase A1-like isoform X1
GICD01065547.1	<i>mmp9</i>	-2,40263	4,32353	1,49E-02	matrix metalloproteinase -9-like, mRNA	SI / matrix metalloproteinase -9-like
GICD01006691.1	<i>casr</i>	-3,30382	-1,86074	1,68E-02	extracellular calcium-sensing receptor-like, mRNA	SI / extracellular calcium-sensing receptor-like
GICD01000206.1	<i>prss1</i>	-4,67645	3,00122	1,69E-02	serine protease 1-like, mRNA	SI / serine protease 1-like
GICD01030534.1	?	-2,12539	1,00018	1,69E-02	Acipenser ruthenus genome assembly, chromosome: 42	SI / hypothetical protein HHUSO_G4208
GICD01077289.1	<i>rhag</i>	-1,51865	1,54606	1,69E-02	ammonium transporter Rh type A-like, mRNA	SI / ammonium transporter Rh type A-like [Huso huso]
GICD01069196.1	<i>Pnliprp1</i>	-3,77229	3,91363	1,94E-02	inactive pancreatic lipase-related protein 1-like, mRNA	SI / inactive pancreatic lipase-related protein 1-like
GICD01057816.1	<i>cyp1a1</i>	-1,68617	3,61069	4,51E-02	cytochrome P450 1A1, mRNA	SI / cytochrome P450 1A1
GICD01034736.1	<i>cel</i>	-4,22954	1,73639	4,68E-02	bile salt-activated lipase-like (LOC117396792), mRNA	SI / bile-salt activated lipase
GICD01083671.1	<i>il6st</i>	-1,70025	1,41466	4,73E-02	interleukin-6 receptor subunit beta-like, transcript variant X3, mRNA	SI / interleukin-6 receptor subunit beta-like
GICD01021264.1	<i>zfn252p</i>	-1,17407	0,44895	4,77E-02	Acipenser ruthenus genome assembly, chromosome: 40	SI / zinc finger protein 252-like isoform X2

Al observar la lista de genes sobre expresados en hembras (Tabla 2.4) que cuentan con un ORF codificante para una proteína, vemos que en los primeros ocho genes ordenados de menor a mayor FDR o sea desde el más significativo al menos significativo, el primero de la lista, es la *hsd17b1* (FDR = $2,18E^{-11}$) con un factor de cambio (o “fold change” en inglés) expresado en logaritmo en base 2 (Log_2FC) de 3,11. Esto quiere decir que la expresión encontrada en las hembras es 8,6 veces mayor que la encontrada en los machos. En el puesto 6 de esta lista se encuentra la *cyp19a1a* (FDR= $9,17E^{-07}$; $\text{Log}_2\text{FC}=1,96$) y en el 8 se encuentra *foxl2* (FDR= $1,57E^{-05}$; $\text{Log}_2\text{FC}=2,63$). Esto muestra que los genes relacionados con la producción de estrógenos que se habían detectado previamente como genes femeninos (Lasalle et al. 2024, Capítulo 3a) se encuentran en los primeros lugares a nivel de significancia estadística, en la lista de genes activados de las gónadas femeninas validando este transcriptoma gonadal y permitiendo considerar como válidos al resto de los genes activados en los futuros ovarios de animales completamente indiferenciados de 2,5 meses de edad.

Respecto de los genes femeninos para el esturión siberiano aparecen entre la *hsd17b1* (puesto 1) y la *cyp19a1* (puesto 6) diversos genes novedosos relacionados entonces con la vía femenina de esta especie, como: el *chrna7* (del inglés *neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 like*), la *ier2* (del inglés: *immediate early response gene 2 protein-like*), el *diras2* (del inglés: *GTP-binding protein Di-Ras2*) y los factores de transcripción *c-fos* (del inglés: *proto-oncogene c-Fos-like*) (Tabla 2.4). Entre la *cyp19a1* (puesto 6) y el *foxl2* (puesto 8), se encuentra el receptor para la hormona liberadora de tirotropina (*trh-r*). Por debajo del *foxl2*, se observan genes como el factor de transcripción *jun-b* (del inglés: *JunB proto-oncogene*) (puesto 9), el factor de transcripción *egr1* (del inglés, *early growth response 1*) (puesto 12), una segunda forma de *ier2* (puesto 13), la *aanat* que codifica para la enzima *serotonin N-acetyltransferasa*, clave en la vía de producción de melatonina (puesto 15), y una segunda forma de *c-fos* (puesto 16) (Tabla 2.4). Por el lado de los machos, lo más

destacado entre esos 30 genes que codifican para proteínas, es que en el primer lugar del análisis de expresión diferencial aparece activado el gen *tbx1* (del inglés, *T-Box transcription factor 1*). Además, se observan a *plin 1* (del inglés, *perilipin-1 isoform X1*), dos formas de *nrxn3* (del inglés, la *neurexin-3 isoform X32*) la *chs2* (del inglés, *chitin synthase*) y otra variante del *tbx1* (del inglés, T-box transcription factor TBX1-like isoform X3) (Tabla 3.4).

Representación de los resultados obtenidos del estudio de expresión diferencial mediante un diagrama de volcán

La representación de resultados en un diagrama de volcán nos permite visualizar de mejor manera los genes activados significativamente ($p < 0.05$). En verde se observan los genes activados en hembras, en rojo los activados en machos y en gris los que se encuentran en igual nivel de expresión en machos y hembras (Figura 2.4). Esta forma de representación gráfica de los resultados muestra claramente que los genes que estaban en los primeros lugares del análisis de expresión diferencial son los que se destacan como más altos en el eje de las ordenadas, para cada grupo experimental (hembras en verde, machos en rojo). Se señalan en particular en el gráfico mediante un círculo, *hsd17b1* en las hembras y *tbx1* en los machos por ser cada uno el gen con expresión diferencial más significativa en cada grupo.

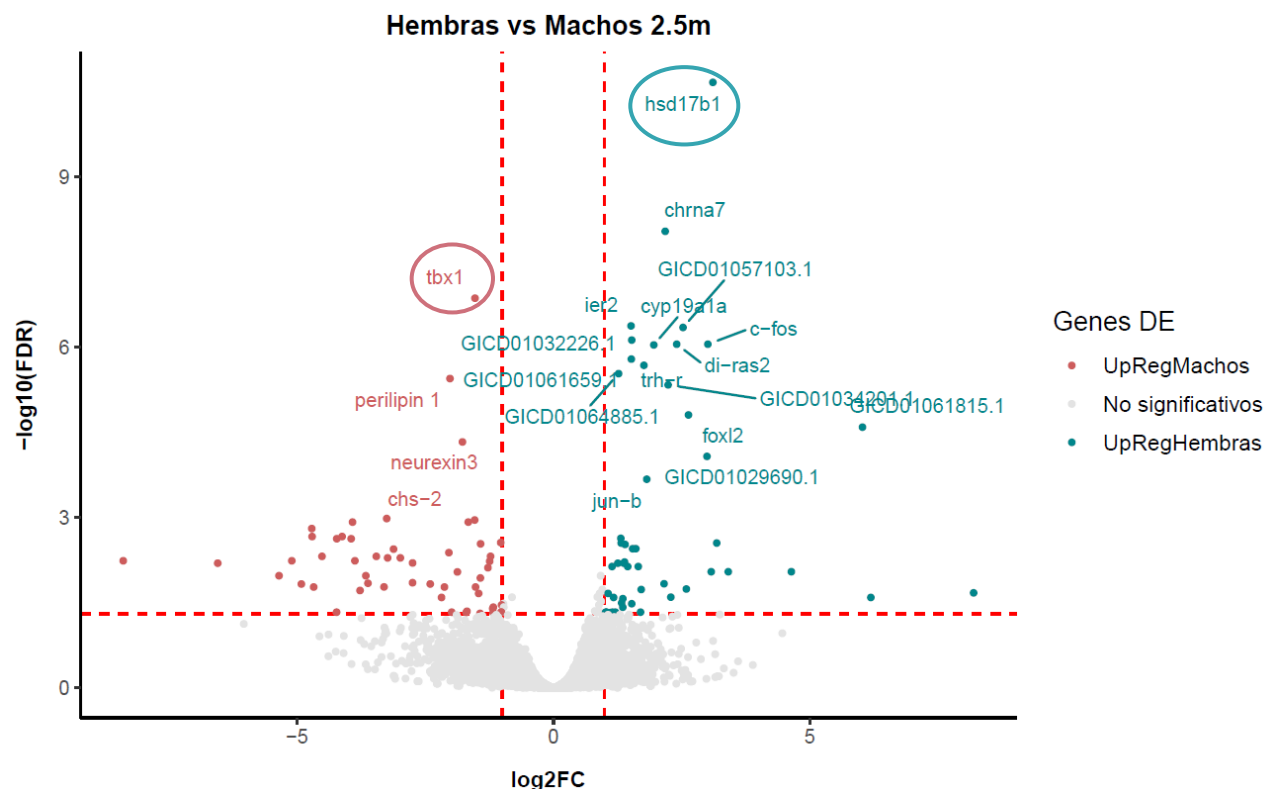


Figura 2.4. Diagrama de volcán del análisis diferencial de genes obtenidos de la comparación hembras vs machos a los 2,5 meses de edad. En gris genes no significativos ($FDR > 0,05$ y $\text{Log}_2FC < 1$). En amarillo genes sobre expresados en hembras con $\text{Log}_2FC > 1$ y $FDR < 0,05$ y en verde genes sobre expresados en machos con $\text{Log}_2FC > 1$ y $FDR < 0,05$. Los primeros 20 genes sobre expresados y ordenados de menor a mayor FDR se identificaron con su nombre en caso de codificar una proteína o con el GICD correspondiente.

Representación de los resultados obtenidos del estudio de expresión diferencial mediante un heatmap

El heatmap graficado en la Figura 3.4 permite ver para cada una de las muestras el nivel de expresión para los 20 primeros contigos más significativos del global de contigos de machos y hembras. Esta forma de representación gráfica establece grupos o clusters de contigos que presentan expresiones similares. Algunos contigos codifican para proteínas y otros corresponden a secuencias de ARN no codificante como iremos detallando. Dado que se seleccionaron los primeros 20 contigos más significativamente diferentes entre machos y hembras el heatmap se resolvió con una separación por un lado las muestras de machos y por otro las muestras de hembras como puede verse en la parte

superior del eje X (Figura 3.4), indicando en el global del patrón de expresión de todos los genes la cohesión de cada uno de los sexos.

A su vez se observan agrupamientos basados en la similaridad de los patrones de expresión, que se pueden visualizar a la izquierda, en el eje de las Y para los distintos genes y contigos (ARN no codificante). Así en el eje de las ordenadas se observan cuatro grandes grupos (Figura 3.4). En el primer grupo (Grupo 1 o G1) se observa una activación (marcada en naranja oscuro) en las muestras de hembras, de los genes *jun-b*, *ier2*, *c-fos*, *di-ras2*, *trh-r*, codificantes para proteínas. En este grupo se encuentran activados además una serie de contigos de ARN no codificante pero cuya secuencia tiene una identidad significativa con una parte de la secuencia nucleotídica de genes observados en el estudio realizado por Blastn en NCBI (Tabla MS 4.1). Ellos son el GICD01032226.1, que codifica para una parte del *trh-r* (*thyrotropin-releasing hormone receptor-like*); el GICD01061659.1 que no tiene homología con ningún gen reportado en NCBI; el GICD01057103.1 que tiene homología con una parte de la *di-ras2* (*GTP-binding protein Di-Ras2*) y el GICD01064885.1 que tiene homología con una parte de la *trh-r* (*thyrotropin-releasing hormone receptor-like*). En resumen, estos contigos están expresando una activación de partes de los genes *di-ras2* y *trh-r*, que más arriba vimos que son genes que codifican para proteínas y están activados en hembras.

En un segundo grupo (Grupo 2 o G2) se encuentran tanto genes masculinos (*tbx1*, *nrxn3*) sobre expresados en las muestras de futuros testículos, así como genes y contigos activados en las muestras de las hembras. Algunos de ellos son los ya conocidos genes femeninos (*hsd17b1*, *cyp19a1a*, *foxl2*) que se ven activados junto al *nAchR* (o *chrna7*) y a un contigo (GICD01034201.1) que se identifica con una parte no codificante del gen *jun-b*. Cabe recordar que el gen de la proteína jun-B se encuentra en el Grupo 1 y activado en las hembras.

Un tercer grupo (Grupo 3 o G3) está constituido por dos genes masculinos *plin1* (*perilipin19*) y *chs2* (*chitin synthase Chs-2 like*) que se activan en las muestras de futuros testículos.

En el Grupo 4 (G4) se observan dos contigos no codificantes para proteínas pero que tienen homología de secuencia con una parte de la secuencia nucleotídica del gen *asap2* o *Arf GAP with NH3 domain ANK repeat and pH domain containing protein like 2* (contigo GICD01061815.1) y con la secuencia de *di-ras2* o GTP-binding protein Di-Ras2 (contigo GICD01029690.1) (Tabla MS 4.1). Es de destacar que la *di-ras2* es un gen que se encuentra expresado en futuras gónadas femeninas (ver Grupo 1).

Otra cosa que interesa resaltar es que los genes activados en hembras que participan en la producción de estrógenos (*hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*) se agrupan en un único clúster (Grupo 2) y se separan claramente del Grupo 1 donde se encuentran otros factores de transcripción y receptores femeninos (*jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2* y *trh-r*).

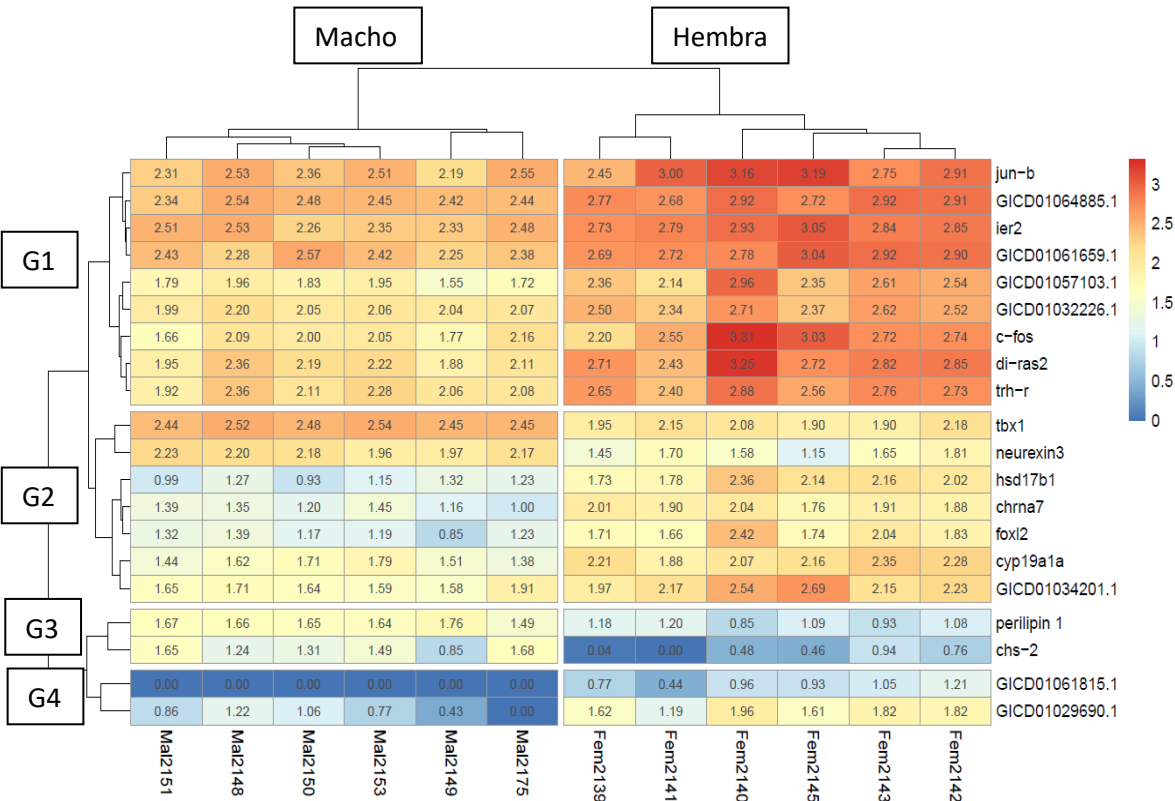


Figura 3.4. Heatmap representando los 20 genes diferencialmente expresados. Los colores indican el nivel de expresión (Log₂FC) con su valor indicado en cada caso. A la derecha en el eje de las Y se observan los genes estudiados, y en el eje de las X las muestras que representan machos (Mal) y hembras (Fem).

La comparación estadística de los genes y contigos de expresión femenina del Grupo 1 (*hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*, *chrna7*, GICD01034201.1) con los femeninos del Grupo 2 (*jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2*, *trh-r*, GICD01064885.1, GICD01061659.1, GICD01057103.1, GICD01032226.1) mostró que existen diferencias significativas de expresión entre los dos grupos (Shapiro Wilks pvalor = 0,09; Levene p-valor = 0,02; Mann Whitney p-valor = 0,005), observándose una mayor expresión en el Grupo 1.

Esta forma de expresión confirma la presencia temprana de genes femeninos y genes masculinos activados en gónadas completamente indiferenciadas de la especie, más allá de los tres genes clásicos que habíamos identificado previamente en el Capítulo 3a (Lasalle et al., 2024).

Validación de tendencias de algunos genes por qPCR

Algunos de los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma fueron evaluados por qPCR. La expresión de *hsd17b1*, *foxl2* y *cyp19a1* mostró los mismos resultados que indicó nuestro transcriptoma, siendo los tres genes activados en las gónadas de futuras hembras a los 2,5 meses de edad. *hsd17b1* (T-test p-valor = 0,0013), *foxl2* (Mann Whitney Test p-valor = 0,0052) y *cyp19a1* (T-test p-valor = 0,029) al igual que lo mostró el transcriptoma. *jun-b* no mostró diferencias significativas entre machos y hembras (T-test p-valor = 0,30) resultado distinto a lo que mostró el transcriptoma y que se discute más adelante. La expresión *tbx1 variante 3* también fue evaluada y mostró diferencias significativas con una sobreexpresión masculina (Shapiro-Wilk p-valor = 0,023; Levene para mediana p-valor = 0,028, Mann Whitney p-valor = 0,021). (Figura 4.4). (Figura 4.4). Los resultados estadísticos detallados se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultados de los test estadísticos aplicados a los grupos evaluados por qPCR.

Gen	Grubbs (Outliers)	Normalidad (Shapiro-Wilk)	Homogeneidad de varianza (Levene)	Student / Mann Whitney	Diferencias significativas entre machos y hembras
<i>hsd17b1</i>	Sin outliers (p-valor > 0,05)	No normal (p-valor = 0,0021)	Homogénea (p-valor de Levene = 0,07)	T-test (p-valor = 0,0013)	Si
<i>foxl2</i>	Sin outliers (p-valor > 0,05)	No normal (p-valor = 0,0035)	No homogénea (p-valor = 0,0005)	Mann Whitney Test (p-valor = 0,0052)	Si
<i>cyp19a1</i>	Un outlier (p-valor < 0,05)	No normal (p-valor=0,02)	Homogénea (p-valor = 0,053)	T-test (p-valor = 0,029)	Si
<i>jun-b</i>	Un outlier (p-valor < 0,05)	No normal (p-valor = 0,0033)	Homogénea (p-valor = 0,12)	T-test (p-valor = 0,30)	No
<i>tbx1 variante 3</i>	Sin outliers (p-valor > 0,05)	No normal (p-valor = 0,023)	No homogénea p-valor = 0,028	Mann Whitney Test (p-valor = 0,021)	Si

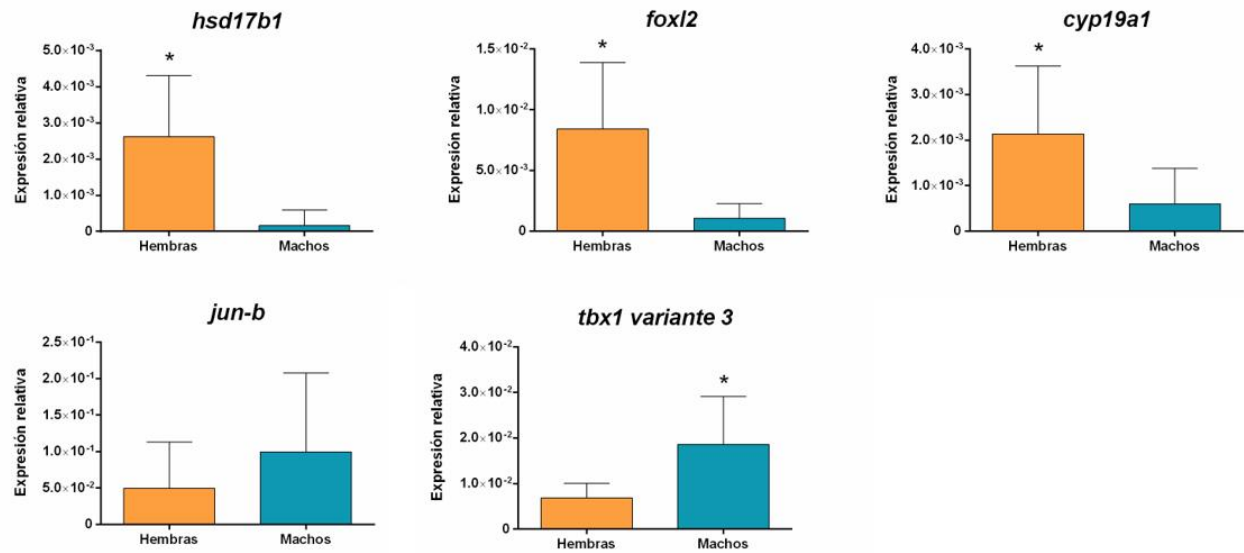


Figura 4.4. Niveles de expresión de hembras y machos de 2,5 meses de edad evaluados por qPCR. Las muestras provienen de la misma cohorte que la utilizada para el estudio de transcriptómica. Se evaluaron 6 genes para validar los resultados; cuatro femeninos (*hsd17b1*, *foxl2*, *cyp19a1*, *jun-b*) y el masculino (*tbx1* variante 3). El * indica diferencias significativas entre grupos (p-valor < 0,05 para el test de Student o test de Mann Whitney según se haya aplicado en cada caso)

Gene Ontology

El análisis de Gene Ontology realizado sobre la totalidad de genes sobre expresados en machos y en hembras dio como resultado una mayor cantidad de procesos biológicos (BP) enriquecidos en ambos casos en comparación con los componentes celulares (CC) y las funciones moleculares (MF). En total las hembras tuvieron 186 términos GO relacionados con diferentes procesos biológicos que resultaron significativamente enriquecidos ($p\text{-valor} < 0,05$) mientras que los términos GO enriquecidos significativamente ($p\text{-valor} < 0,05$) en machos fueron 256. En el caso de los términos GO asociados con componentes celulares únicamente 3 términos resultaron significativamente enriquecidos para las hembras y 7 para los machos ($p\text{-valor} < 0,05$), y en cuanto a las funciones moleculares hubo un total de 6 términos GO significativamente enriquecidos en hembras y 23 en machos ($p\text{-valor} < 0,05$) (MS 4.3 y 4.4). Para las hembras algunos de los términos GO que se observan refieren a procesos biológicos relacionados directamente con: “secreción hormonal”, “producción de estrógenos” y “producción de testosterona”, “secreción de FSH y LH”, y también “respuesta a la secreción de FSH”, “determinación del sexo en hembras” y “determinación del sexo de células somáticas femeninas” entre otros. Entre los GO de componentes celulares aparecen como destacados el “complejo AP-1” como factor de transcripción y “complejos de unión proteína-ADN”. Finalmente, en la categoría función molecular encontramos varios GO vinculados con la actividad de “transcripción de genes”. En machos sin embargo los términos GO no tienen una vinculación tan directa como se percibe en hembras con lo que se espera de un proceso de diferenciación del sexo, y lo más relevante que se encuentra son términos GO de procesos biológicos generales relacionados con “procesos de producción de hormonas”, “regulación de niveles hormonales”, “procesos de producción de esteroides”, y varios GO asociados a la “producción y respuesta al ácido retinoico”. Los primeros 20 términos GO enriquecidos significativamente de

hembras y machos para cada categoría se seleccionaron y se pueden ver en las gráficas de términos GO (Figura 5.4 y 6.4)

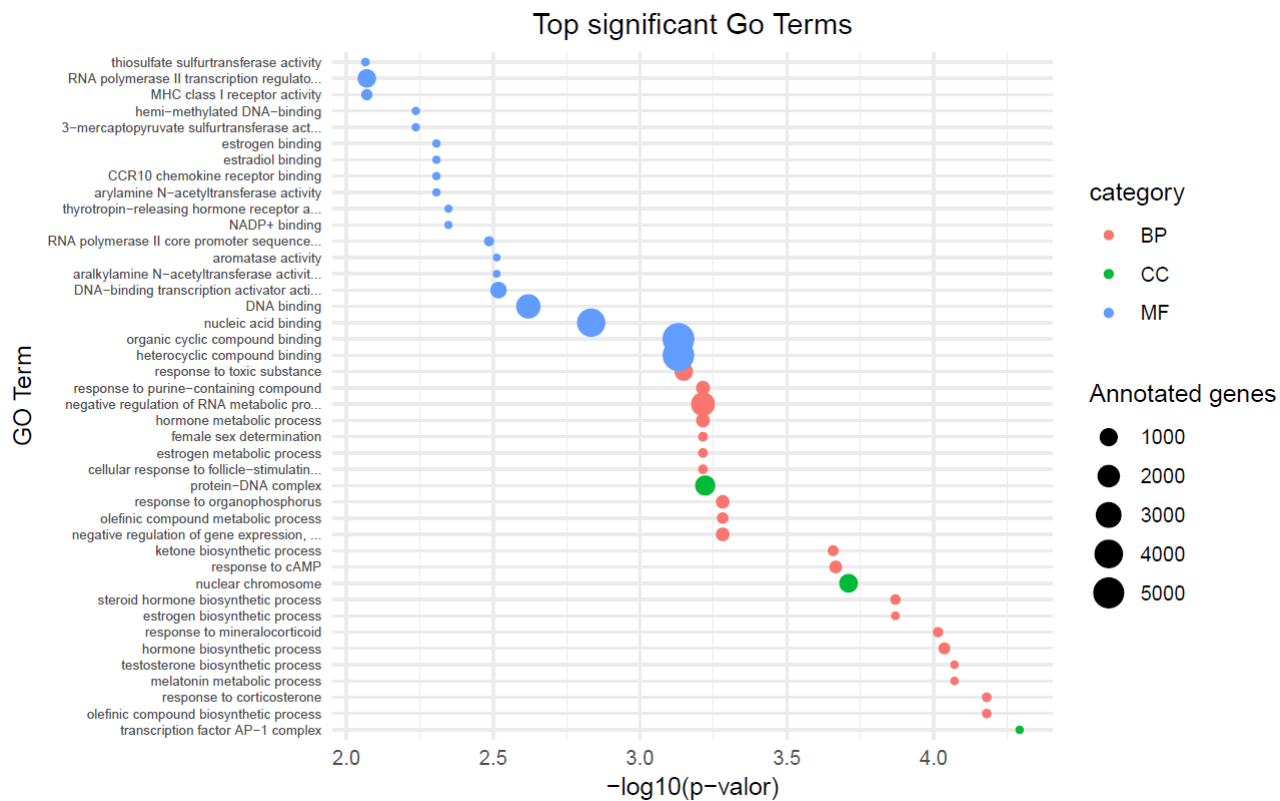


Figura 5.4. Resultados de términos GO significativos en hembras. Se observan términos GO relacionados con Procesos Biológicos (BP (rosa)), Componentes Celulares (CC (verde)), y Función Molecular (MF (celeste)).

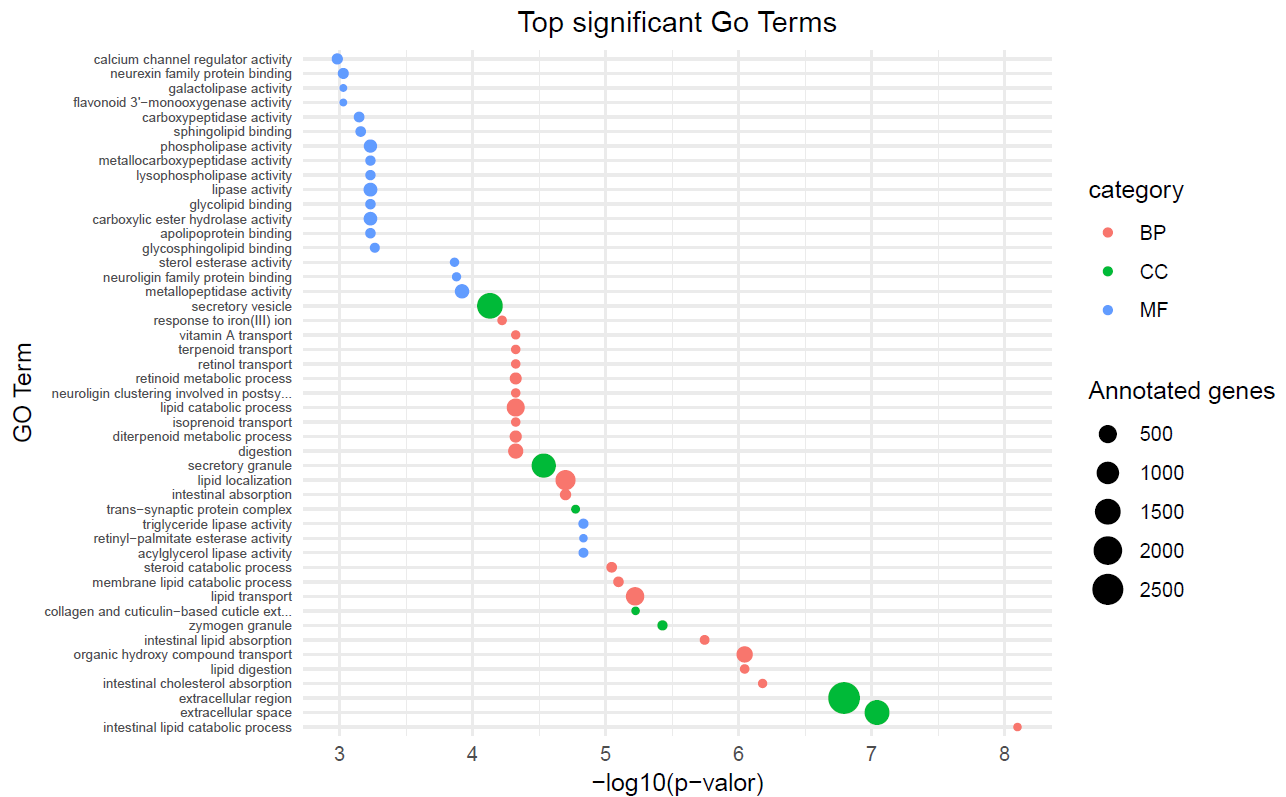


Figura 6.4. Resultados de términos GO significativos en machos. Se observan términos GO relacionados con Procesos Biológicos (BP (rosa)), Componentes Celulares (CC (verde)), y Función Molecular (MF(celeste)).

Para ambos análisis gráficos (Figura 5.4 y 6.4) se observa que, en el estadio de desarrollo evaluado, los términos relacionados con Procesos Biológicos y Componentes Celulares son los más enriquecidos apareciendo finalmente las Funciones Moleculares.

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo son los primeros realizados a partir de la técnica de transcriptómica en gónadas de individuos de esturiones sexados de 2,5 meses de edad que se encuentran completamente indiferenciados y en el inicio de la diferenciación molecular del sexo (Vizziano-Cantonnet et al., 2016; Lasalle et al., 2024). Esta aproximación permite observar la complejidad del proceso en un momento puntual y muy temprano del desarrollo gonadal en lo que se refiere a la expresión de los genes que lo conducen y amplía la visión previa que teníamos de esta etapa (Lasalle et al., 2021, 2024, Capítulo 3a,b). La comparación entre hembras y machos mediante el estudio de expresión diferencial muestra que el 99,87% del total de los contigos ensamblados tienen una expresión similar en los dos sexos. Esto posiblemente implique que buena parte de estos genes sean esenciales para sostener la sobrevivencia y la multiplicación celular de la gónada como ocurre en mamíferos (Brennan & Capel, 2004). El hecho de que solamente el 0,07% de los genes estén activados en gónadas de futuras hembras y el 0,06% en gónadas de futuros machos, estaría indicando que a los 2,5 meses de edad los esturiones se encuentran en el inicio del período de diferenciación molecular del sexo a nivel gonadal y que solo un pequeño grupo de genes se encuentran activados.

Validación del transcriptoma gonadal de animales de 2,5 meses de edad

El hecho de que los genes previamente confirmados como genes femeninos usando animales sexados genéticamente (*cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*, Lasalle et al., 2024) se hayan posicionado en este transcriptoma entre los primeros ocho genes de mayor significancia estadística luego del análisis de expresión diferencial valida este transcriptoma gonadal. A ello se suma que la qPCR aplicada en gónadas de individuos hermanos de los usados para realizar el transcriptoma mostró una activación de tres genes claves de la producción de estrógenos como lo son la *cyp19a1*, el *foxl2* y la *hsd17b1*.

Es de destacar que la qPCR tiene mucho mayor cantidad de pasos técnicos que inducen variabilidad en los resultados respecto de las técnicas de secuenciado masivo. Tanto los resultados del transcriptoma como los de la qPCR de este trabajo avalan los resultados previos que se obtuvieron primero sin marcador del sexo (Vizziano-Cantonnet et al., 2018, Lasalle et al., 2021) y luego con marcador del sexo (Lasalle et al., 2024, Capítulo 3a,b). A su vez se presentan en esta tesis resultados aún no publicados que demuestran claramente que los estrógenos regulan específicamente y en todas las circunstancias experimentales al *foxl2* en esturiones (Capítulo 3b). Este es un gen clave en las distintas etapas del desarrollo ovárico de los vertebrados (Bertho et al., 2016; Brennan & Capel 2004; Nagahama et al 2021) y en particular en la diferenciación sexual de peces (Piferrer & Guiguen 2008; Yamamoto & Luckenbach 2023). A su vez la importancia fundamental de los estrógenos, en particular del estradiol-17 β fue confirmada recientemente en esturiones usando tratamientos de largo plazo que indujeron la transdiferenciación de machos genéticos hacia hembras fenotípicas (Vizziano-Cantonnet et al., 2025). Esto marca claramente que el esturión al igual que la enorme mayoría de los teleósteos se diferencia la gónada femenina mediada por estrógenos, apoyando el postulado de Yamamoto (1969).

Teniendo en cuenta este análisis y en base los tres genes fundamentales de la producción de estrógenos (*cyp19a1*, *foxl2*, *hsd17b1*) podemos inferir que los demás genes activados en hembras y machos juegan un papel importante en el desarrollo temprano.

Análisis de los nuevos participantes potenciales en la diferenciación sexual de esturiones

Durante el análisis de este transcriptoma gonadal han surgido nuevos genes activados en el período temprano de diferenciación molecular del sexo. El heatmap realizado muestra cuatro grupos o clusters de secuencias conformados según su similaridad de expresión. El nivel similar de expresión dentro de cada grupo nos hace hipotetizar que por lo menos en algunos grupos puede

existir un accionar conjunto de los genes, como lo hacen por ejemplo los genes de involucrados en la producción y regulación de estrógenos (*hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*) que se agrupan en un solo clúster (Grupo 2). En el Grupo 1 se encuentra otro conjunto de genes sobre-expresados en las gónadas femeninas como *jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2*, *trh-r* que posiblemente estén regulando algunas funciones comunes entre sí. Analizaremos esta posibilidad más adelante en la discusión.

Una de las preguntas que surge es quién regula los genes dentro de un grupo para que los niveles de expresión se mantengan parejos. Se trata del azar o existe un control común para cada uno de estos grupos. Analizaremos ahora una posible regulación del Grupo 1 por parte de los estrógenos producidos por el Grupo 2. En el Grupo 1 existen por lo menos dos genes de respuesta inmediata (*c-fos* y *jun-b*) que forman parte de la familia de los llamados protooncogenes que son estimulados por los estrógenos (Webb et al., 1993; Fujimoto et al., 1996). A su vez los genes de respuesta inmediata se expresan y son regulados por los esteroides sexuales en diferentes tejidos reproductivos (Murphy et al., 1987; Fink et al., 1988) y se consideran excelentes marcadores de la acción e interacción de los esteroides debido a que reaccionan tempranamente en todos los tejidos que poseen receptores de hormonas esteroideas y muchos de ellos regulan a su vez genes más tardíos (Landers & Spelsberg, 1992; Spelsberg et al., 1992). Sin embargo, en la literatura no se reporta que los estrógenos regulen al gen de respuesta inmediata (*ier2*) observado en este grupo. Es de destacar que los diferentes tipos de ER conocidos se encuentran expresados y presentes en las etapas tempranas del desarrollo gonadal del esturión siberiano ya a los 2,5 meses de edad (Vizziano-Cantonnet et al., 2018; Klopp et al., 2020).

Respecto del *di-ras2* si bien en la literatura no se encuentran evidencias de una regulación de este supresor de tumores por parte de los estrógenos, se ha visto que en la señalización que controla el crecimiento y la supervivencia celular, donde intervienen el AMPc, la proteína quinasa A (PKA) y la fosfatidil inositol 3 quinasa PI3K, existe una conexión entre la vía que activa la PI3K por parte

de los estrógenos y sus receptores y la vía de los receptores de proteína G. De hecho, existe una unión física entre el RAS, el receptor de estrógenos y la AMPc-PKA. Esto da sostén a la hipótesis de una relación, tal vez indirecta, entre el *di-ras2* y los estrógenos (Malaney & Daly, 2001).

El último gen de este Grupo 1 del heatmap, es el receptor para la hormona liberadora de tirotropina (*trh-r*). Se sabe desde hace muchos años que los estrógenos estimulan el número de sitios de unión de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en la hipófisis (De Lean et al., 1977); que el número de receptores de membrana para la TRH en células mamotrópicas derivadas de tumores es aumentado por los estrógenos (Gershengorn et al., 1979); y que el estradiol-17 β activa los receptores de TRH de las células de la hipófisis a nivel del ARN mensajero aumentando la tasa de transcripción (Kimura et al., 1994). Partiendo de esta información, es muy posible que los receptores a la TRH (*trh-r*) que hemos encontrado activados en los ovarios sean sensibles a los estrógenos.

En resumen, se ha visto que los integrantes del Grupo 1 están directamente controlados por estrógenos en otros tejidos o situaciones experimentales y en algún caso relacionados en forma indirecta (i.e. *di-ras2*) lo cual nos permite emitir la hipótesis de que el Grupo 1 está regulado en parte por los estrógenos producidos por el Grupo 2. Esto deberá ser demostrado en forma experimental.

Otra cosa interesante es que el Grupo 1 de genes (*jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2*, *thrh*) presenta una expresión significativamente mayor que el Grupo 2 (*hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*, *chrna7*). Como estamos viendo una foto de un momento del desarrollo no sabemos si estos genes han sido estimulados por una producción de estrógenos previa a los 2,5 meses, o si simplemente están reaccionando frente a la producción de estrógenos promovida por los genes del Grupo 2 en este mismo momento. Posiblemente, todo este grupo de genes responden rápido y muy bien frente a los estrógenos a nivel gonadal.

Posibles funciones de los genes del Grupo 1 (*jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2*, *thrh*)

Analizaremos estos genes para intentar comprender su función en otros tejidos o en las propias gónadas de vertebrados.

jun-b y *c-fos*

Como ya mencionamos, entre los genes femeninos nuevos que encontramos, aparecen como relevantes los protooncogenes *jun-b* y *c-fos*, que son los que han sido mejor caracterizados como genes de respuesta inmediata (Healy et al. 2013; O'Donnell et al., 2012). Su activación puede ser inducida en forma rápida y temporal por una variedad de estímulos que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, promotores de tumores e incluso la radiación ultravioleta (Healy et al. 2013). FOS juega un papel central en eventos celulares que incluyen la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (O'Donnell et al., 2012; Van der Burg et al., 1989). Ellos responden a los estrógenos como analizamos más arriba, pero hasta el momento no han sido asociados nunca con procesos de diferenciación del sexo a nivel de gónada.

A su vez es conocido que los genes de estas familias, además de las acciones que pueden realizar en forma individual, actúan formando dímeros (*Jun-Jun*; *Jun-Fos*) generando un complejo AP-1 (del inglés, *activator protein 1*) que actúa posteriormente regulando la transcripción y expresión de diferentes factores (Ryseck & Bravo 1991), entre ellos se ha demostrado que tiene capacidad de activar la expresión del gen *aromatasa* actuando directamente sobre el promotor (Bulun et al., 2009), esta misma acción se ha demostrado para el *jun-b* específicamente actuando también sobre uno de los promotores de la *cyp19a1* (Chen et al 2011), y por lo tanto aparecen nuevos circuitos por los cuales estos genes se involucran indirectamente con la regulación de la formación de estrógenos. Es especialmente interesante que algunas de las acciones más relevantes que se han encontrado para este complejo sean la acción sobre la proliferación y diferenciación celular (Angel

& Karin 1991, Wagner 2002, Eckert et al., 2013), pero también se ha observado que los genes de la familia *Fos* y *Jun* tiene la capacidad de actuar cada uno en forma independiente sobre estos mismos procesos (Schlingensiepen al., 1993, Meixner et al., 2010, Van der Burg et al., 1989).

c-Fos en particular, ya ha sido relacionado con procesos de formación y estructuración del ovario en algunas especies como por ejemplo en *Drosophila* donde tiene acción tanto sobre células somáticas como sobre las germinales (Klein et al., 2016). Por otra parte, los genes de la familia *Jun* también se han relacionado con procesos de diferenciación del sexo, aunque hasta el momento ningún gen de la familia *Jun* ha sido mencionado en la literatura de peces en asociación con la diferenciación gonadal, y por lo tanto tampoco en la ovárica. Más allá de esto, un resultado notable encontrado, es justamente la acción fundamental del gen *Jun* en el proceso de diferenciación del sexo en pollos. La interferencia sobre este gen mediante herramientas de biología molecular en organismos ZW en el período de diferenciación del sexo, inhibe la vía femenina y lleva a la aparición de características morfológicas masculinas en la gónada embrionaria. Bajo la acción del silenciamiento de este gen, se sobre expresan los genes masculinos clásicos *Dmrt1* y *Sox9*, y reprimen los genes femeninos clásicos *Foxl2*, *Cyp19a1* y *Esr1*, y además, se observa un marcado descenso de los niveles de estrógenos, activándose claramente el desarrollo masculino ante la falta de expresión de *Jun*. A su vez, la transgénesis del gen *Jun* en un individuo ZZ, mostró la formación de características femeninas (Zhang et al., 2021). Todo esto indica el enorme potencial de los genes vinculados a las familias de genes *Jun* y *Fos*, y muestra que más allá de que el conocimiento general que se tiene de ellos aún es relativamente pobre y casi nulo en peces, los antecedentes que cita la bibliografía son muy contundentes y marcan su importancia en el desarrollo ovárico. Esto es un punto muy importante para proponer como fundamental un estudio en detalle de los genes *jun-b* y *c-fos* que podrían actuar como un eslabón clave en la cadena de la diferenciación del sexo femenino

del esturión siberiano, ya sea en formas individuales o en conjunto actuando mediante la formación de AP-1.

Immediate early response gene 2 (ier2)

El *gen de respuesta temprana inmediata 2* codifica para una proteína de unión al ADN que parece actuar como factor de transcripción (Takaya et al., 2009). Entre sus acciones, regula la angiogénesis promueve la motilidad celular (Wu et al., 2015) y las metástasis en algunos tipos de cáncer (Neeb et al., 2011; Xu et al., 2020). No se reporta en la literatura una relación con el desarrollo gonadal, la diferenciación sexual ni relación con los estrógenos. Tratándose de un gen de respuesta inmediata como lo son *jun-b* y *c-fos* no se descarta su participación en los procesos conducidos por los estrógenos en forma temprana en la gónada del esturión siberiano.

di-ras 2

El *di-ras 2* es un miembro de la familia de proteínas similares a Ras de unión a GTP (DIRAS) que pueden funcionar como supresores tumorales en diversos tipos de cáncer siendo la pérdida o disminución de su expresión crítica para el desarrollo del cáncer (Xue et al., 2022). Experimentos *in vitro* confirmaron que la sobreexpresión de DIRAS2 reducía el crecimiento de células de cáncer de ovario (Sutton et al., 2018) y que funciona como gen supresor de ciertos tumores inhibiendo la señalización Wnt/ β -catenina. La vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina desencadena la expresión de genes que participan en la proliferación celular, diferenciación y mantenimiento de células (Shipitsin et al., 2007; Xu et al., 2020). Por lo tanto, este gen parece actuar por lo menos en los casos de cáncer como un inhibidor de la proliferación celular. Este gen nunca ha sido reportado en relación con el control de la diferenciación sexual en animales, sin embargo vemos que existe una relación e interacción con genes de la vía *Wnt* que son importantes en la diferenciación del sexo

gonadal sobre todo en mamíferos. Nuestra hipótesis es que *di-ras 2* controla la proliferación de algún tipo celular particular para contener la estimulación estrógeno-dependiente generada por ejemplo por factores como jun-b y c-fos.

trh-r

Continuando con el análisis del Grupo 1 de genes, nuestro transcriptoma ha mostrado la activación del *trh-r* (el receptor de la hormona liberadora de tirotropina) en las gónadas femeninas. Esto sería coherente con los conocimientos previos en peces y anfibios en los cuales se ha visto un papel importante del eje tiroideo sobre la diferenciación gonadal. Por ejemplo, en larvas de *Xenopus laevis* la inhibición crónica de TSHs lleva a la feminización, mostrando que para esta especie tienen un rol en la diferenciación masculina (Goleman et al., 2002; Hayes, 1997). Además, en la mayoría de los peces donde se han realizado estudios con hormonas tiroideas relacionados con la diferenciación del sexo, estas parecen estar asociadas con el desarrollo del sexo masculino (Tovo-Neto et al., 2018).

En zebrafish se demostró que la administración de hormonas tiroideas durante la diferenciación activa la expresión de genes claves de la vía masculina como la *amh* y de los receptores de andrógenos mientras que a su vez inhibe la *cyp19a1a* y la expresión de los receptores de estrógenos, llevando la vía hacia la masculinización (Sharma et al., 2016). En medaka (*Oryzias latipes*), se ha demostrado la sobre expresión de los genes vinculados activación del eje tiroideo en machos durante la diferenciación del sexo, y sumado a esto, tratamientos con T3 (Triiodothyronine; 3, 5, 3'-L-triiodothyronine) inducen la masculinización de hembras genéticas, y tratamientos con calor también inducen la masculinización activando el eje tiroideo y mediando la producción de T3 y la sobre expresión de los genes relacionados. Por último, al inhibir en forma farmacológica las vías de producción de hormonas tiroideas, el porcentaje de reversión de hembras hacia machos en

experimentales de tratamientos con temperatura desciende significativamente respecto al control, demostrando definitivamente el potente papel que juegan las hormonas tiroideas en la diferenciación (Castañeda-Cortés et al., 2023). En la anguila *Monopterus albus* los tratamientos con inyecciones de Trh llevan a la estimulación de la producción de andrógenos 11-oxygenados, de forma que esto también muestra su efecto de activación de la vía masculina (Feng et al., 2022). De esta forma pensamos que la sobreexpresión de *trh-r* en ovarios podría estar relacionada con las hormonas tiroideas y su acción temprana sobre la gónada, pero resulta novedoso su involucramiento en etapas de diferenciación gonadal femenina.

Normalmente, el eje regulatorio ocurre entre el hipotálamo que produce la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que estimula la producción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) por parte de las células de la hipófisis que contienen receptores a la TRH (TRH-R). La TSH a su vez estimula la tiroides (Fröhlich & Wahl, 2019; Schally, 1978; Sower et al., 2009). De modo que habría dos formas en las cuales las gónadas femeninas del esturión siberiano puedan tener relación con las hormonas del eje tiroideo: a) a través de una producción local gonadal de la hormona liberadora de tirotropina que interactuase con los receptores presentes en la propia gónada como ha sido reportado en testículos y ovarios de varios grupos incluidos los peces, donde existe la presencia de *Trh-r* y *Trh* (Feng et al., 2022; Fukusumi et al 1995; Rao et al., 1997; Satoh et al., 1994); b) a través de una acción directa vía sanguínea de la hormona hipotalámica (TRH). Con el fin de comprender si las gónadas de esturión son capaces de expresar la *trh* investigamos nuestros transcriptomas tisular y gonadal (Klopp et al., 2020 a, b) para confirmar que la *trh* se encuentra muy expresada en el cerebro del esturión como esperado, pero no en las gónadas indiferenciadas ni ya diferenciadas e inmaduras de machos y hembras. Queda planteada la pregunta de si hay una *trh* circulante proveniente del sistema nervioso central con la capacidad de actuar sobre los *trh-r* de las gónadas de 2,5 meses al inicio de la diferenciación sexual. Es de destacar que hasta los 18 meses de

edad no existe expresión génica de *trh* en gónadas de machos y hembras del esturión siberiano (Vizziano-Cantonnet et al., 2018; Klopp et al., 2020 a, b).

En cuanto al efecto de la TRH, ella actúa sobre los tirotrofos de la hipófisis, pero no regula el número de estos tipos celulares, sino que es absolutamente necesaria para la síntesis de TSH (Nikrodhanond et al., 2005). A su vez la TSH se encuentra expresada en hipófisis de los esturiones siberianos, pero no en las gónadas de individuos indiferenciados ni en inmaduros (Vizziano-Cantonnet et al 2018; Klopp et al 2020 a, b). Por lo tanto, no queda claro que en el contexto de la gónada femenina en diferenciación del esturión siberiano estemos frente a una regulación de una producción local de TSH, sino tal vez de la producción de otra hormona que no sea la TSH y cuyo efecto esté canalizado a través de los receptores a la TRH a nivel local.

En resumen, en este Grupo 1 se identifican relacionados con: la proliferación y diferenciación celular (*jun-b*, *c-fos*), la promoción de metástasis (*ier2*) en algunos tipos de cáncer; la supresión tumoral en algunos tipos de cancer (*di-ras 2*). Ellos parecen estar asociados a la proliferación celular por efecto de los estrógenos y al control de esta proliferación por factores anti-proliferativos. Esto resulta importante pensando en que el proceso de diferenciación del sexo está fuertemente vinculado con la diferenciación de diferentes tipos celulares y su proliferación, sobre todo en la diferenciación temprana del ovario en peces (Baroiller et al., 2009). Por último, tenemos a la *trh-r*, asociada a la vía de producción de hormonas tiroideas y como ya hemos visto estas están íntimamente ligadas a procesos de diferenciación del sexo jugando un rol muy importante.

Genes que se encuentran fuera del heatmap

Ahora se analizarán los genes que se encuentran fuera del heatmap (Figura 3.4) pero dentro de los activados en las hembras (Tabla 2.4). En particular hemos elegido el *early growth response*

gene 1 (egr-1) y la *serotonina N acetil transferasa (aanat)* que ocupan los puestos 12 y 15 de la Tabla 2.4, respectivamente.

early growth response gene 1

El *egr-1* es otro miembro de la familia de genes tempranos inmediatos que codifica para una fosfoproteína nuclear, también conocida como Krox24 (Kukushkin et al., 2005). Este gen tiene dominios de unión al ADN y de no unión al ADN (Bahrami et al., 2016), tiene la capacidad de actuar como un factor de transcripción (Gashler & Sukhatme 1995; Pagel & Deindl 2011) y participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en respuesta a señales como factores mitógenos, factores de crecimiento y estímulos de estrés (Bae et al., 2002; Gashler & Sukhatme 1995; Liu et al., 2001). Además, se ha encontrado expresado en células somáticas de testículos y ovarios y se ha confirmado que es estimulado por la acción de los estrógenos (Kim et al., 2014; Kim et al., 2018) además de vincularse con procesos de diferenciación y proliferación celular (Punetha et al., 2021; Xu et al., 2022), posicionándolo como un gen que puede cumplir un papel importante en la diferenciación gonadal. Un punto adicional que resulta interesante es por ejemplo que en el pez *Acanthopagrus latus*, que tiene una gónada intersexo (ovo-testis) hasta el momento de la reproducción cuando la gónada se transdiferencia a ovario completo o testículo completo, el gen *egr-1* se sobre expresa en la pituitaria de hembras en comparación con la pituitaria de peces durante su estadio de ovo-testis (Zhang et al., 2024). Otros estudios recientes en mamíferos muestran que *egr-1* es un factor de transcripción dependiente del ciclo estral y su sobreexpresión induce cambios específicos en la plasticidad cerebral y conductual específica de la hembra (Rocks et al., 2023). La relación indicada obviamente no es directa con la diferenciación ovárica, pero si muestra que *egr-1* al menos mantiene un componente femenino a nivel de diferenciación femenina del sistema nervioso central.

serotonina N acetil transferasa

Otro resultado interesante es la sobre expresión del gen codificante para una enzima clave en la vía producción de la hormona melatonina (*serotonina N acetil transferasa*) junto con el enriquecimiento del término GO del proceso metabólico de la melatonina. La melatonina se encuentra producida principalmente en la glándula pineal y relacionada con procesos reproductivos, pero también se ha demostrado que puede producirse tanto en testículos como en ovarios (Itoh et al., 1999; Tijmes et al., 1996). Estudios realizados en carpas (*Cyprinus carpio*), muestran que la transdiferenciación de hembras genéticas a machos fenotípicos realizada en un período temprano de la diferenciación molecular del sexo, mediante el uso de inhibidores de aromatasa, se asocia con un descenso de la concentración de estradiol en sangre, en conjunto con un descenso de los niveles de melatonina (Singh & Singh, 2013). Este estudio en particular permite hipotetizar que la melatonina y los estrógenos podrían actuar en conjunto para llevar adelante la diferenciación ovárica en algunas especies de peces. Además de esto algunos estudios indican que en peces la melatonina podría estar relacionada con la maduración ovocitaria (Takahashi et al., 2021), aunque estos resultados son recientes y poco más se sabe de ello. Esto posiciona a la melatonina como una nueva hormona que tiene potencial de estar involucrada en el proceso de diferenciación del sexo del esturión.

Resumiendo, el conjunto de resultados en esta etapa del desarrollo gonadal indica a los estrógenos como reguladores de la proliferación y diferenciación celular a través de genes de respuesta rápida que pueden conducir a la regulación de una red génica posterior, y surgen dos tipos nuevos de hormonas que pueden estar actuando tempranamente como lo son la melatonina y la trh en combinación directa o indirecta con los estrógenos.

De esta manera se intenta comenzar a caracterizar en forma más detallada algunos de los posibles pasos iniciales que se dan en el proceso de diferenciación del sexo femenino en peces

basales, incorporando genes al armado de un camino hipotético que planteamos como una potencial vía pero que aún está poco definida (Figura 7.4). Los genes femeninos mencionados anteriormente son los que la bibliografía vincula con la diferenciación o procesos relacionados con la formación ovárica, sin embargo, el resto de los genes encontrados también pueden vincularse a este proceso y deben ser estudiados en futuros trabajos.

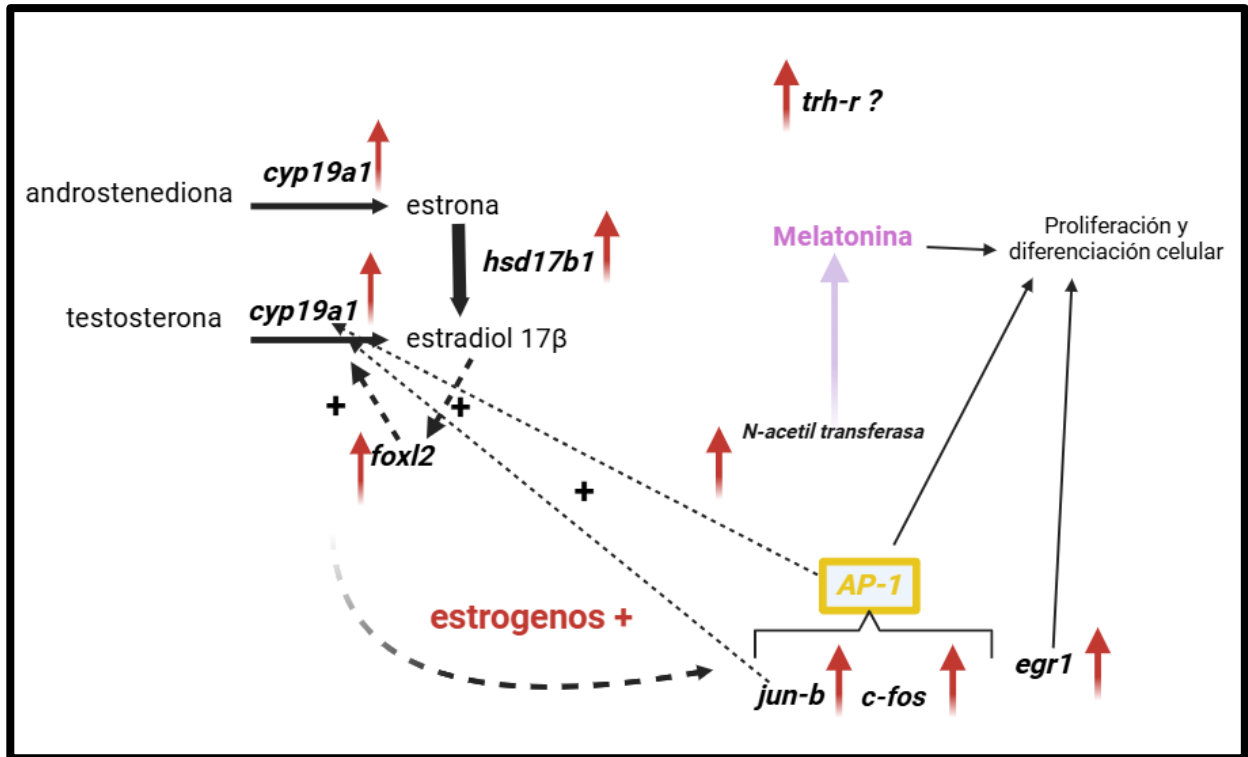


Figura 7.4. Potencial regulación de la vía de diferenciación femenina a los 2,5 meses de edad. Flechas rojas indican sobre regulación del gen. Flechas punteadas indican estimulación positiva. Flecha violeta indica potencial producción de la hormona melatonina. Flechas negras finas indican la potencial acción de los genes *jun-b*, *c-fos*, *egr1* y la hormona melatonina en procesos de diferenciación y proliferación celular.

En definitiva, postulamos un inicio de la diferenciación ovárica marcada por la acción de un gen determinante (el cual desconocemos) que llevará a la activación de *hsd17b1* y luego a de los otros genes vinculados a la vía de producción de estrógenos (*cyp19a1* y *foxl2*). Los estrógenos tienen la capacidad ya definida en diferentes grupos, de estimular varios de los genes antes vistos; *jun-B*, *c-fos* y *egr1* (vinculados con la proliferación, diferenciación celular, transcripción de genes, e incluso

procesos de diferenciación sexo específica a nivel de SNC). *jun-b* y *c-fos* pueden actuar juntos formando el factor de transcripción AP-1, que tiene capacidad de activar la aromatasa, esta misma función se ha demostrado que la puede cumplir *jun-b* actuando en forma individual, por lo que hay varias vías que aparecen como capaces de regular positivamente la producción de estrógenos en este ambiente gonadal incipiente y generar un bucle de retroalimentación positivo, aumentando rápidamente los niveles estrogénicos en el medio gonadal ovárico. La potencial producción de hormonas melatonina y tiroideas también pueden resultar importantes en la diferenciación, la melatonina se ha visto vinculada a también a la proliferación, diferenciación celular y maduración ovocitaria, además de procesos reproductivos, por lo que no parece extraño que pueda cumplir un papel en la diferenciación sexual femenina. Las hormonas tiroideas por otra parte resultan una incógnita ya que los antecedentes las marcan involucradas en la diferenciación testicular y no en la ovárica, sin embargo, para especies basales no hay datos y podrían estar funcionando en forma diferente a lo observado en teleósteos y otros grupos.

Otro punto importante que puede estar vinculado a la regulación de la diferenciación gonadal en esta especie es la participación de ARNs no codificantes. A partir del estudio de expresión diferencial encontramos contigos sobre expresados en hembras y machos que no codifican para proteínas sin embargo se necesita de un genoma de referencia para poder evaluar con certeza si se tratan de ARN no codificantes, por lo tanto, es una tarea que por el momento queda pendiente. Igualmente, cabe destacar que se ha demostrado en peces que los ARN no codificantes pueden actuar directamente sobre las histonas en el ADNg, regulando y estimulando la transcripción o reprimiendo la misma, es decir mediante una acción epigenética (Piferrer, 2018). Esta es un área que habrá que explorar a futuro ya puede estar actuando para regular tanto la vía de diferenciación femenina como la masculina.

Primer avance sobre la diferenciación testicular

La vía temprana de diferenciación de machos es aún menos conocida. 29 son los genes que surgen como sobre expresados y codificantes para una proteína. En esta sección únicamente se nombran y discuten brevemente los dos genes diferencialmente expresados en machos, para los cuales se ha encontrado en la bibliografía una función asociada específicamente a la diferenciación gonadal.

tbx1

De ellos, la bibliografía recoge únicamente uno con un antecedente que lo vincula al proceso de diferenciación gonadal, y específicamente a la testicular. Lo relevante es que ese gen en particular es *tbx1*, y aparece primero en la lista masculina de genes diferencialmente expresados siendo el más significativo. Esta es la primera vez que se vincula a este gen con la diferenciación masculina del esturión, y en peces en general solo ha sido vinculado con diferenciación testicular en truchas (Yano et al., 2011). Actualmente este es el gen masculino sobre expresado más tempranamente en la diferenciación testicular del esturión siberiano, y es posiblemente el que inicie la diferenciación de esta vía en particular.

tbx1, es miembro de la familia de factores de transcripción T-box que se involucra en la embriogénesis y organogénesis, pero más allá de ese importante rol, tanto Liu et al. (2008) como Yano et al. (2011) demostraron que en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) existen dos parálogos del gen *tbx1*, de los cuales uno de ellos (*tbx1a*) está restringido a la gónada, y sobre expresado en el testículo durante el período de diferenciación del sexo. En otros grupos, por ejemplo, la tortuga de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*) (Wan et al., 2024) y en la salamandra china gigante *Andrias davidianus*, se mostró que *tbx1* también es importante en la diferenciación testicular (Hu et al., 2019, Yang et al., 2024). En esta última especie, el gen se encuentra sobre expresado en

testículos de machos, pero además tiene la capacidad de regular genes involucrados en el proceso de diferenciación gonadal, mostrando así su gran importancia. Los autores demuestran que el silenciamiento de *tbx1* lleva a la sobre regulación de genes femeninos vinculados con la diferenciación ovárica, como lo son *cyp19a1* y *foxl2*, mientras que genes masculinos clásicos (*amh*, *cyp26a*, *dmrt1*, y *wt1*) son reprimidos a nivel de expresión. Al agregar la proteína TBX1 (a una hembra) observaron un incremento significativo de la expresión del gen *amh* y una represión de los genes femeninos *cyp19a*, *foxl2* y *cyp26a*. Además de esto, tratamientos con temperatura y hormonas mostraron que en ovarios expuestos a altas temperaturas (masculinizantes), aumentó significativamente la expresión de *tbx1*. Por otra parte, al generar neo-hembras producidas a partir de machos tratados con estrógenos, estas mostraron una represión significativa del gen *tbx1* (Hu et al., 2019). Estos resultados dan pie para pensar en la importancia que puede tener este gen en la vía masculina de diferenciación del esturión siberiano, y confirma la importancia de realizar un estudio más profundo.

Otros genes masculinos sobre expresados en el actual trabajo son aún una incógnita y su estudio debe ser abordado más adelante ya que su expresión diferencial indica que pueden tener una acción directa en la diferenciación testicular, sin embargo, no existe bibliografía que respalde su acción de la gran mayoría de ellos en este proceso.

mmp9

Uno de los pocos genes que se ha identificado anteriormente es el que codifica para la producción de metaloproteinasas (*matrix metalloproteinase-9-like*), algo que ha sido publicado para el esturión siberiano en el artículo de Vizziano-Cantonnet et al. (2018). Las metaloproteinasas tienen una función importante vinculada a la degradación de diferentes componentes de la matriz extracelular y remodelación de tejido, además de actuar en las vías de señalización intercelular y de

células con la matriz extracelular (Page-McCaw et al., 2007). Es claro que este tipo de procesos son necesarios cuando se está diferenciando un testículo y por lo tanto se está formando una nueva arquitectura gonadal lo que conlleva grandes cambios estructurales. La acción directa de estas proteinasas en la formación testicular se ha observado directamente en la especie *Synbranchus marmoratus*. En esta especie parte de su población es protogínica, y es durante la reversión del sexo, donde se produce la degradación del ovario inicial para formar un testículo, que se ha demostrado la acción clave de estas metaloproteinasas (Mazzoni et al., 2018). Además, las metaloproteinasas se ven involucradas en los procesos migratorios de células germinales de vertebrados en general (Carver et al., 2023; Díez-Torre et al., 2013; Mazzoni & Quagio-Grassiotto 2021) y por lo tanto es otra pista de su importancia en la diferenciación del sexo. Estos antecedentes dan lugar a que su aparición en este proceso tenga un peso importante y deba tenerse en cuenta por lo tanto como un gen posiblemente clave en la diferenciación testicular, claro está que habrá que definir con mayor precisión cual puede ser su accionar para el *Acipenser baerii*. También es cierto que los procesos mencionados en los que participan las metaloproteinasas son esenciales en ambos sexos y no únicamente en machos, por esto la sobre expresión masculina de esta metaloproteinasa en particular es interesante, ya que puede tener una acción específica en la formación del testículo.

Análisis de Gene Ontology por sexo

Un punto especialmente interesante es el análisis de resultados de Gene Ontology, donde vemos que los términos GO que resultan significativos en hembras (Figura 5.4) están relacionados con procesos de determinación y diferenciación del sexo, así como con procesos por ejemplo de producción de hormonas relacionadas directamente con la diferenciación y actividad gonadal, a diferencia de aquellos que aparecen como resultado del mismo análisis en machos (Figura 6.4). En hembras se encuentran muchos términos vinculados a los procesos de biosíntesis de hormonas

esteroideas, entre ellas testosterona y estradiol, directamente involucradas en la diferenciación ovárica en esturión siberiano como viene siendo demostrado desde hace varios años (Vizziano-Cantonnet et al., 2018, Lasalle et al., 2021, 2024), y con un accionar sobre genes mencionados anteriormente como *egr1*, *jun-b* y *c-fos*. Junto con ellos aparecen otros términos vinculados, como los de respuesta a hormonas esteroideas, respuesta a la FSH (hormona folículo estimulante) y la regulación de la secreción de LH (hormona luteinizante). También aparecen términos vinculados con la síntesis y regulación de progesterona, así como a la síntesis de esteroides C21 en general. El término GO de diferenciación de células de la granulosa también es uno de los enriquecidos y el que refiere a la determinación del sexo de células somáticas femeninas. Los GO anteriormente mencionados corresponden a la categoría Procesos Biológicos en hembras, pero cabe destacar que en las categorías Componentes Celulares y Función Molecular, también se encuentran términos interesantes, entre ellos el de “complejos proteína-ADN” y el “complejo factor de transcripción AP-1” mencionado previamente debido a su conformación mediada por las proteínas codificadas por los genes *Jun* y *Fos*, sobre expresadas en este trabajo, vale la pena recordar que este complejo tiene la capacidad de actuar como un factor de transcripción y entre las cualidades más importantes la capacidad de activar la aromatasa actuando directamente sobre el promotor del gen. De allí que podría estar cumpliendo un papel clave en la regulación de la producción de estrógenos en el ovario en formación un elemento que proponemos como la clave de la diferenciación sexual en el esturión siberiano.

En machos el panorama es muy distinto los únicos términos que encontramos y que podemos relacionar directamente con procesos de la diferenciación del sexo refieren a términos GO de proceso de síntesis de hormonas en general y otros vinculados a la producción de ácido retinoico y vitamina A, ambos bien conocidos y vinculados a diferentes procesos de la formación testicular y desarrollo de células germinales en vertebrados (Adolfi et al., 2016, Medina et al., 2019, Schleif et

al., 2022). Esto parecería estar indicando que la diferenciación femenina está más activa en etapas tempranas del desarrollo mientras que la masculina no tiene aún una actividad muy fuerte.

En conjunto los resultados expuestos marcan que el proceso de diferenciación del sexo femenino del siberiano ya ha iniciado de forma marcada a los 2,5 meses de edad, estimulado por los genes vinculados a la producción de estrógenos. Nuevamente se confirma que al igual que en teleósteos los estrógenos son los esteroides sexuales que actúan mediando la diferenciación ovárica, y que este proceso surge al menos desde los actinopterigios basales.

Este trabajo pone en juego una nueva lista de genes con acción diferencial en gónadas femeninas y masculinas durante el período de diferenciación molecular del sexo del esturión siberiano, muchos de ellos nunca antes mencionados y otros ni siquiera identificados en gónadas de peces. Además, establece en base a la bibliografía de diferentes grupos de vertebrados, el potencial de algunos de ellos como *jun-b*, *c-fos*, *egr-1*, como factores de transcripción muy relevantes para este proceso. Sumado a ellos se encuentra el accionar de hormonas tiroideas y de la melatonina, ya que los genes intermediarios en su producción se encuentran activados. Ambas hormonas tienen acciones demostradas en procesos que se vinculan directamente con la diferenciación del sexo, el caso de las hormonas tiroideas es especialmente claro con una acción fundamental en diferentes grupos, y resulta interesante que, a diferencia de lo descrito hasta el momento, en nuestro modelo la sobreexpresión del gen relacionado con este eje de producción de hormonas tiroideas (*trh-r*) aparece relacionado con la gónada femenina y no con la diferenciación testicular. Estas dos hormonas hasta el momento no eran tenidas en cuenta como parte relevante del proceso de diferenciación femenina, donde solo se tenían en cuenta a los esteroides sexuales como las hormonas relevantes para el esturión siberiano, por lo tanto, sumamos aquí una mirada más amplia en lo que refiere al involucramiento de hormonas en este mecanismo complejo.

Queda claro también, que la diferenciación del sexo en el esturión siberiano debe comenzar en etapas previas a los 2,5 meses de edad, y que la información obtenida de la expresión diferencial de genes sumado a los GO relacionados a estos, indican que la diferenciación femenina estaría comenzando antes que la masculina, estimulada por una fuerte producción de hormonas esteroideas, mientras que el proceso de diferenciación masculino con un inicio más lento estaría vinculado a la activación de la expresión del gen *tbx1*.

El estudio actual no permitió identificar en forma concreta al gen determinante del sexo, sin embargo, a partir los resultados obtenidos sumados a los anteriormente descritos en capítulo 3a de la presente tesis y publicados en Lasalle et al. (2024), *hsd17b1* sigue siendo una de las principales pistas para llegar a dilucidar quien es el gen maestro determinante. Entender quien está involucrado en su regulación podría ser clave para identificar al gen maestro de la determinación del sexo en esturión. Los futuros estudios deberán cubrir pruebas funcionales, para poder concluir sobre esta problemática, la delección génica por CRISPR es una técnica clave que se está poniendo a punto actualmente para este objetivo. Más allá de eso, el trabajo realizado en este capítulo rompe el esquema de genes clásicos planteado hasta el momento, y aporta una cantidad de nueva información en donde destacan los genes codificantes para proteínas con potencial acción directa en la diferenciación gonadal del esturión, cuyo rol específico en muchas ocasiones no se comprende y en otras ni siquiera aparecen citados en la bibliografía de vertebrados. Esto, en resumen, abre nuevas puertas para estudios que logren definir en detalle su participación en este proceso y así afinar a nivel molecular la vía de acción que lleva a la diferenciación sexual del esturión siberiano.

Conclusiones del capítulo 4

Los resultados de este capítulo aportan un panorama global de los genes que accionan en las vías de diferenciación del sexo del esturión siberiano en etapas incipientes del proceso, haciendo foco especialmente en la vía femenina. El aporte fundamental es que la información está generada sobre un grupo de animales sexados genéticamente, lo que permite sin tener dudas sumar nuevos genes asociados a las vías de diferenciación tanto femenina como masculina del esturión siberiano y romper el esquema clásico de los genes involucrados en este proceso. En este capítulo se valida la acción de los estrógenos como principales actores de la diferenciación ovárica, y se postula que puede existir una regulación del grupo de genes femeninos (*jun-b*, *c-fos*, *egr-1*, *ier-2*, *di-ras2*) llevada adelante justamente por los estrógenos generando un sistema de acción conjunta que lleva a la diferenciación femenina en esta etapa temprana. Es claro que más allá de las hipótesis postuladas, estas regulaciones deben probarse por medio de experimentales en futuros trabajos. También se incorpora la posible acción de otras hormonas al proceso de diferenciación femenina. Esto es importante ya que hasta el momento la bibliografía general de peces indica únicamente a los esteroides sexuales como las hormonas actuantes tempranamente en la diferenciación femenina. Contadas publicaciones dan lugar a la acción de otras hormonas, aquí indicamos el rol potencial que puede cumplir la melatonina y la trh en este proceso además de otros genes que se vinculan a partir de este estudio a la diferenciación gonadal de peces y que no habían sido asociados previamente. Este análisis del transcriptoma realizado con individuos sexados en el inicio del período de diferenciación del sexo deja ver por primera vez que existe una actividad de expresión diferencial de una cantidad importante de genes desde etapas tempranas, y muestra por lo tanto la complejidad de este proceso desde un primer momento. También deja planteada la idea de que el proceso de diferenciación ovárica está mayormente establecido en este punto temporal, con una vía génica constituida, y esto es validado por la cantidad de GO asociados a procesos de diferenciación sexual

y a la producción de diferentes factores vinculados a la actividad de formación y maduración gonadal, mientras que la diferenciación masculina deja la impresión de empezar más tardíamente y estar a los 2,5 meses de edad en un período incipiente. Este trabajo abre muchas puertas, para investigar las regulaciones que se producen al interior de las vías indicadas, y el accionar puntual de todos los nuevos genes encontrados. Para ello será esencial desarrollar la capacidad de utilizar herramientas que permitan realizar pruebas funcionales como por ejemplo CRISPR. A su vez estos los resultados marcan la pauta de que debemos ir a estadíos aún más tempranos (desde el primer mes de edad -cuando se forma la gónada- hasta los dos meses) de desarrollo gonadal para entender el proceso desde un inicio e intentar encontrar al gen determinante del sexo que aún no logramos identificar.

Discusión general

Los procesos de determinación y diferenciación del sexo en peces son complejos y aún deben ser dilucidados. En los teleósteos, para los cuales se han estudiado un poco más en detalle, se encontró que los procesos no se conservan completamente, esto resulta lógico ya que este grupo cuenta con más de 32000 especies identificadas (Nelson et al., 2016), por lo que difícilmente los procesos puedan mantenerse iguales entre tanta diversidad. Esto se ve claramente reflejado en la cantidad de estrategias utilizadas por los peces modernos para determinar su sexo, y contrasta fuertemente por ejemplo con lo observado en mamíferos euterios donde únicamente la acción de un gen puntual determina el sexo del organismo desde el momento de la fecundación (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993; Sinclair et al., 1990). El proceso concreto de diferenciación sexual ha sido estudiado en muchas especies de teleósteos, y se ha demostrado que muchos de los genes involucrados en las vías femeninas y masculinas no se conservan entre especies, sin embargo, otros si lo hacen (Devlin & Nagahama, 2002; Yamamoto & Luckenbach, 2023). El esturión siberiano al igual que los teleósteos es un actinopterigio que se encuentra en una posición más basal a nivel filogenético, siendo un pez muy antiguo, considerado comúnmente como un fósil viviente (Grande & Bemis, 1996) e interesante para comprender procesos de determinación y diferenciación del sexo. Sus características de desarrollo lento y un proceso de diferenciación sexual largo, lo posicionan como un excelente modelo para la investigación básica de la diferenciación sexual a nivel molecular, pudiendo hacer un estudio pormenorizado de la modulación de la expresión de los genes que dan lugar a la diferenciación femenina o masculina. Para ello es necesario trabajar durante el período correcto de desarrollo de los animales y conociendo el sexo de estos de ser posible, sin embargo, hasta el 2021 y a pesar de varios intentos, no había sido posible encontrar un marcador del sexo que permitiera identificar machos y hembras durante los estadios más tempranos de desarrollo, es decir previo a la diferenciación morfológica gonadal (Keyvanshokoo & Gharaei, 2010; Khodaparast et

al., 2014; Wuertz et al., 2006). Por otra parte, los esturiones son peces de alto valor comercial debido a la producción de caviar, que, por ser los ovocitos en un estadio de maduración particular, también se ven ligados al proceso de formación y desarrollo del ovario. Este trabajo tiene un mayor enfoque en el entendimiento de los procesos de diferenciación y en la búsqueda de un posible marcador del sexo desde el punto de vista femenino, sin embargo, junto con la búsqueda y entendimiento de la acción de los genes vinculados a los procesos de diferenciación ovárica, también se indaga brevemente en los posibles genes responsables de la diferenciación testicular aún muy poco conocidos.

El capítulo 1 y 2 de esta tesis Doctoral abarcan una etapa temporal previa a la existencia de un marcador del sexo, y se basan justamente en el estudio de expresión de genes femeninos que en su conjunto puedan utilizarse como una herramienta de sexado, y en la búsqueda de un marcador genético del sexo con RAD-seq. Los capítulos 3 y 4 en cambio, se posicionan en una etapa posterior a la publicación del marcador genético del sexo (Kuhl et al., 2021), y se busca realizar una caracterización en profundidad de la vía de diferenciación femenina en el inicio del período de diferenciación molecular del sexo, inicialmente mediante una estrategia gen candidato y luego utilizando transcriptómica. A partir de ellos se aporta nueva información sobre los genes vinculados íntimamente con la diferenciación ovárica y la expresión de estos durante el período de diferenciación molecular del sexo, identificando y describiendo con mayor claridad no solo a los genes participantes, sino a la fuerte acción de los esteroides sexuales y hormonas potencialmente involucradas. Por primera vez se marca con relativa claridad el momento de inicio del proceso de diferenciación sexual mediado por un gen en particular, trabajando con animales sexados genéticamente y técnicas de secuenciación masiva, y se identifican nuevos genes nunca antes vinculados con el proceso de diferenciación del sexo en peces en etapas muy tempranas.

Para los esturiones en general no hay demasiado conocimiento en cuanto a los procesos de diferenciación sexual, los estudios son recientes, comenzando en los últimos 20 años. En la especie *Acipenser baerii* en particular, el trabajo de Vizziano-Cantonnet et al. (2016) marca un punto crucial, ya que es la primera aproximación a la identificación del período de diferenciación a nivel morfológico de la gónada, e indica que ese hito se produce claramente a los 8 meses de edad en Uruguay, aunque el trabajo publicado más recientemente marca que un par de meses antes ya hay señales de diferenciación morfológica incipiente (Vizziano-Cantonnet et al., 2025), y estudios realizados en otras regiones indican que pueden ver señales de diferenciación morfológica también desde los 6 meses de edad (Rzepkowska et al., 2013). Este punto junto con la identificación de la ventana de diferenciación molecular del sexo entre los 3 y los 6 meses de edad son los que permitieron dar inicialmente un marco real en el cual posicionarse para el momento de realizar estudios enfocados a la diferenciación del sexo. La mayoría de los trabajos realizados previamente utilizando transcriptómica con el objetivo de identificar genes que se expresan diferencialmente entre hembras y machos y vincularlos con este tipo de procesos fueron erróneamente planteados, ya que los autores se ubican fuera del período de diferenciación sexual, cuando la gónada ya se diferenció, o muy sobre el final del período de diferenciación morfológico del sexo (Chen et al., 2016; Hagihara et al., 2014). Otro punto importante es que cuando se realizaron no había aún un marcador genético del sexo. El enfoque realizado en el período correcto vinculado con la diferenciación molecular del sexo mostró que allí hay una gran cantidad de genes que se están expresando para llevar adelante la diferenciación gonadal (Vizziano-Cantonnet et al., 2018). Los primeros trabajos de transcriptómica abarcando este período particular mostraron la expresión de genes clásicos como *cyp19a1a*, *foxl2*. Estos genes se encuentran muy conservados en la vía de diferenciación femenina de teleósteos e involucrados con la producción de estrógenos. El transcriptoma inicial en individuos no sexados aportó genes potenciales vinculados con la

diferenciación femenina y se seleccionaron 6 (*cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5*, *lhx2*). Muchos de estos genes no son conocidos en peces en los que respecta a la diferenciación del sexo, sin embargo, en la literatura los marca como importantes para este proceso de formación ovárica en diferentes especies (Kim 2010; Singh et al., 2022; Vizziano-Cantonnet et al., 2018). El estudio del patrón conjunto de expresión nos permitió no solo mostrar que existe una evolución en cuanto a la expresión del grupo de genes en cuestión durante el desarrollo de la diferenciación de la gónada, (Lasalle et al., 2021) y que en esta cohorte existe una sobre expresión de estos genes en un grupo de potenciales hembras, sino que además basados en un potente análisis estadístico se generó una metodología para realizar un sexado de esturiones en períodos tempranos de desarrollo en base a la expresión de este grupo de 6 genes. A partir de ese momento además se posicionaron definitivamente en un puesto de privilegio a los genes productores de estrógenos *cyp19a1*, *foxl2* y *hsd17b1* como los líderes en la puesta en marcha de la diferenciación ovárica.

Este método de sexado no es el más sencillo ni económico y por eso se buscó encontrar un marcador genético del sexo mediante RAD-seq, ya que las metodologías clásicas de genética para buscar un marcador del sexo no habían mostrado resultados hasta ese momento (Keyvanshokoo & Gharaei, 2010; Khodaparast et al., 2014; Wuertz et al., 2006). De los 74000 marcadores obtenidos por RAD-seq, 25 mostraron una muy buena asociación con el sexo femenino en forma heterocigota y homocigota en los machos. Los estudios de ginogénesis y las diferentes proporciones que se observan en la naturaleza señalan que el sistema de determinación del sexo sería del tipo ZZ/ZW (Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Omoto et al., 2005; Saber & Hallajian, 2014; Van Eenennaam et al., 1999) y por eso se analizaron los marcadores que mostraron ese patrón en forma significativa. Lamentablemente no se obtuvo un marcador del sexo con esta estrategia, así como tampoco lo pudo hacer Du et al. (2020) con una estrategia similar en otra especie de esturión (Sterlet). El esturión siberiano es una especie tetraploide con aproximadamente 256 cromosomas y un genoma

extremadamente grande (Bytyutskyy et al., 2012; Fontana, 1994, Zhou et al., 2011), esto hace que existan muchísimos marcadores del tipo SNP que más allá de que no se reflejen como significativos aparecen en las secuencias con más o menos frecuencia creando un gran problema al momento de generar las HRM, ya que no se pueden generar curvas estables. Es posible que un aumento importante del número de muestras utilizadas pudiera llevar a mejores resultados, sin embargo, y mencionando nuevamente el tamaño y complejidad del genoma del siberiano, esto no sería seguro.

Kuhl et al. (2021) plantearon otra estrategia, realizaron el ensamblado completo del genoma del Sterlet macho y hembra, y mediante su comparación descubrieron una zona que se encuentra únicamente en el genoma femenino, pudiendo encontrar así un marcador genético del sexo. Esto además es un punto fuerte que apoya la teoría que plantea que los esturiones tienen un sistema de determinación del tipo ZZ/ZW. Con la posibilidad de sexar mediante el marcador publicado por Kuhl et al. (2021), se ahondó en la evaluación de genes involucrados en la diferenciación sexual, y se encontró que los genes clásicos vinculados a este proceso en teleósteos, independientemente de su sistema de determinación sexual, también son parte de los más relevantes en esturiones. Los genes *cyp19a1a* y *foxl2*, se activan temprano en la ventana temporal de diferenciación molecular. Sin embargo, el primero en hacerlo, ya desde los 2,5 meses de edad, es la *hsd17b1*, lo que indica que el inicio de la diferenciación comenzaría por lo menos a los 2,5 meses de edad sino antes, y que la *hsd17b1* es el gen que estaría iniciando este proceso. Sin embargo, queda como una incógnita saber cuál gen podría estar actuando como el gen determinante del sexo ya que *hsd17b1* más allá de mostrar una gran represión en machos se expresa en ambos sexos. En el grupo *Seriola spp.* *hsd17b1*, es el gen determinante del sexo, actuando de esta manera debido a un SNP en la secuencia de los machos de esta especie. Este SNP genera que la producción de estrógenos sea diferencial en hembras y machos, en donde los machos no producen el esteroide sexual debido a que el SNP en su secuencia lo inhibe. Nosotros creemos que *hsd17b1* en esturión es uno de los primeros genes de la vía de

diferenciación y que probablemente sea regulado por el gen determinante del sexo que se debe activar entre el primer mes y los dos 2,5 meses de edad.

Este grupo de genes además está vinculado directamente a la producción de estrógenos, lo que marca y constata directamente como estos esteroides sexuales se involucran directamente en la diferenciación ovárica del esturión, de la misma forma que lo hacen para teleósteos, y por eso han sido posicionados comúnmente como los controladores universales de la diferenciación gonadal femenina en peces, aunque algunos peces escapan a esta regla. Esto, sumado a que los tratamientos realizados con estrógenos exógenos sobre regulan al gen *foxl2* así como sucede en otros peces (Guiguen et al., 2010), y que se puede producir la transdiferenciación del sexo fenotípico mediante la aplicación de tratamientos con estrógenos durante el período de diferenciación molecular del sexo (Vizziano Cantonnet et al., 2025); indica que los esturiones determinan su sexo por la acción de un gen femenino (el cual deberá aun ser confirmado) ligado al cromosoma W y de allí en adelante la acción de los genes esteroidogénicos toman un papel preponderante, generando un ambiente cargado de estrógenos en la gónada primordial de futuras hembras, en forma diferencial a lo que sucede en machos. De allí que *hsd17b1* surge como un gen fundamental, ya que es el primer gen observado como sexo dimórfico desde los 2,5 meses de edad, pero, además, porque está directamente involucrado en la producción de estrógeno mediante la conversión de estrona en estradiol. Será esencial para dejar en claro cuál es su papel en el proceso de la diferenciación del sexo realizar experimentales de delección génica sobre este gen. Sin embargo, se desprende de esta sección, que la diferenciación femenina mediada por estrógenos es un proceso antiguo que surge desde antes de la aparición de los teleósteos.

Por otra parte, también se demostró, que a diferencia de algunos teleósteos que utilizan la vía canónica *rspo1-wnt4-ctnnb1* para su proceso de diferenciación (Kawahara & Yamashita, 2000; Zhou et al., 2016), vía que también tiene gran importancia en mamíferos, en los esturiones no tiene

relevancia alguna en este proceso puntual, no habiendo ningún tipo de expresión sexo dimórfica de ninguno de estos genes. La vía de diferenciación masculina es aún una verdadera incógnita, no se han encontrado ninguno de los genes más clásicos de la diferenciación testicular, ni siquiera aquellos que evolutivamente se mantienen desde los organismos más primitivos, como genes de la familia *dmrt*, siendo el más importante *dmrt1*, o de la familia *sox* (*sox9*), y tampoco resultó sexo dimórfico el gen clásico masculino *amh*. Se evaluaron todos estos genes masculinos para tener un panorama completo de cuales podrían estar accionando en la diferenciación a lo largo de todo el período de diferenciación, además de *dhh* y del gen *cyp11c* que codifica para la enzima encargada de la formación de andrógenos 11 oxigenados (Lasalle et al., 2024). Este último gen mencionado es particularmente importante ya que en teleósteos se ha visto que los andrógenos 11 oxigenados son aquellos que suelen tener un efecto biológico importante y estar implicados en la diferenciación sexual masculina, tal como sucede por ejemplo en tilapia (Kobayashi et al., 2008). Ninguno de los genes mostró expresión sexo dimórfica a lo largo del período ventana de la diferenciación molecular del sexo. A raíz de este trabajo se plantea entonces que podría generarse la diferenciación masculina al encontrarse un ambiente gonadal incipiente sin estrógenos, y esa falta de esteroides sexuales femeninos es lo que llevaría a que posteriormente se desencadene la diferenciación masculina.

Los resultados del primer estudio de transcriptómica en el inicio de la diferenciación y en individuos genéticamente sexados, validan sólidamente a los genes *hsd17b1*, *foxl2* y *cyp19a1* como indispensables en la formación inicial del ovario, pero también suma nuevos genes que hasta el momento nunca habían sido vinculados a este proceso. En este punto cabe destacar que estamos viendo en el transcriptoma la activación de los tres genes activados (*hsd17b1*, *foxl2* y *cyp19a1*) a los 2,5 meses a diferencia del trabajo analizado en el capítulo 3a donde a los 2,5 meses solo encontramos la activación del gen *hsd17b1*, pero a los 3 meses encontramos la activación de los tres genes. Nuestra experiencia ha demostrado que siendo un pez de desarrollo lento y con un período de

diferenciación molecular largo, este suele atrasarse o adelantarse según la cohorte estudiada. Por lo que observamos, podríamos estar viendo que la cohorte de transcriptómica a los 2,5 meses está un poco más adelantada en su diferenciación molecular teniendo un patrón similar al que se observa en la cohorte del capítulo 3a, a los 3 meses de edad. La expresión diferencial de estos los genes *hsd17b1*, *foxl2* y *cyp19a1*, marca con solidez que el transcriptoma está relevando correctamente la vía femenina. *jun-b* y *c-fos* son dos de los genes nuevos que aparecen en este proceso, ambos son factores de transcripción y actúan juntos para formar la proteína activadora 1 (AP-1) que es capaz de regular la transcripción de genes que se han visto involucrados en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis (Ryseck & Bravo, 1991; Angel & Karin, 1991; Wagner, 2002; Eckert et al., 2013), entre ellos la aromatasa, y por lo tanto actuar indirectamente en la regulación de la producción de estrógenos. Esta capacidad de regular la aromatasa actuando directamente sobre su promotor también la tiene *jun-b* actuando en forma individual (Chen et al., 2011). La estimulación de *jun-b*, *c-fos*, por acción de los estrógenos ya ha sido confirmada en diferentes grupos al igual que la de *egr-1*, los tres factores de transcripción. Sumado a estos hipotetizamos que otros de los genes femeninos que muestran niveles similares de expresión como los son *di-ras2* e *ier2* también podrían estar siendo regulados por estrógenos producidos por los genes clásicos ya mencionados, y por la acción de una regulación positiva que puede accionar tanto AP-1 como *jun-b*, hipótesis que deberá ser puesta a prueba a futuro.

La sobre expresión del receptor a la tirotropina no tiene una relación directa con los procesos de diferenciación ovárica al menos mencionada en la literatura, la acción de las hormonas tiroideas ha sido asociada principalmente a la diferenciación testicular y con un rol muy potente, esto hace que activación en la gónada femenina sea muy interesante y merece ser tomada en cuenta para su estudio en mayor profundidad. Hemos observado que no hay producción de *trh* gonadal según los datos de transcriptómica en la gónada del esturión durante las etapas de diferenciación, por lo que

cabe preguntarse si hormonas producidas en la hipófisis pueden estar teniendo un efecto directo sobre la gónada y regulando de esa forma la diferenciación gonadal actuando desde un inicio el eje hipotálamo - hipófisis – gónada, o si existe una producción local de trh que por el momento no encontramos. Por otra parte, el análisis nos ha mostrado también que hay una potencial producción e involucramiento de la melatonina en la diferenciación gonadal femenina, una hormona que tiene un involucramiento en diversos procesos reproductivos de diversos grupos, pero que no es comúnmente asociada con la diferenciación del sexo. En este caso la sobre expresión de una de las enzimas intermediarias claves en la producción de melatonina nos permite postular a esta enzima e hipotetizar su capacidad de incidir en la diferenciación ovárica. Así luego de este trabajo las hormonas esteroideas dejan de ser las únicas hormonas postuladas en estar directamente involucradas en el proceso de diferenciación gonadal femenina.

Por el lado del programa masculino se hallaron nuevos genes sobre expresados y vinculados con secuencias codificantes para proteínas en el período más temprano hasta ahora analizado del período de diferenciación molecular del sexo. Dentro del grupo de genes masculinos *tbx1* sobresale por ser el único de la lista vinculado previamente con la diferenciación gonadal de peces (Yano et al., 2011) y otras especies animales (Hu et al., 2019, Yang et al., 2024, Wan et al., 2024). Se ha demostrado en las especies anteriormente mencionadas su rol clave en la diferenciación de la gónada masculina mediante pruebas funcionales, donde la inhibición del gen en machos durante la diferenciación gonadal lleva a la activación de la vía femenina, y la inserción de la proteína en hembras en este período clave inhibe los genes femeninos. Este gen, siendo el más temprano conocido hasta el momento en la vía masculina del esturión siberiano se vuelve clave para definir y entender el proceso. Entre los genes masculinos también aparece *mmp9* que codifica para una metaloproteinasa, estas proteínas también son esenciales y como fue discutido en el capítulo 4, muy importantes en la diferenciación gonadal de teleósteos. Hay más genes que han sido vinculados con

la diferenciación masculina, sin embargo, su estudio será producto de siguientes trabajos, entre ellos trabajos de tesis de otros integrantes del laboratorio. En ambos grupos se encontraron también varias secuencias no codificantes para proteínas, es importante tenerlas en cuenta y también estudiarlas a futuro ya que muchos ARN no codificantes funcionan como reguladores transcripcionales mediando acciones epigenéticas. Para poder clasificar bien estas secuencias es necesario obtener el transcriptoma de la especie y por lo tanto estos análisis deberán esperar un tiempo. Uno de los últimos puntos más interesantes que deja este trabajo proviene del análisis de gene ontology, que indica, como se menciona en el la discusión de ese capítulo, que el proceso de diferenciación sexual comienza en forma marcada y más temprana en el sexo femenino, allí aparecen los términos GO que indican que las vías de determinación y diferenciación del sexo, así como la producción de diferentes tipos de hormonas relacionadas con la diferenciación y desarrollo gonadal en general, mientras que en los machos estas vías parecen estar mayormente inactivas. Teniendo en cuenta estos resultados globales parece evidente que la diferenciación del sexo está comenzando desde antes de los 2,5 meses de edad, y hay que encontrar las técnicas más indicadas para llegar a analizar estos estadios de desarrollo que implican varios desafíos técnicos a resolver.

Conclusión y perspectivas

En su global este estudio deja plasmado un enorme avance en cuanto a lo que refiere a los conocimientos sobre la diferenciación del sexo en el esturión siberiano, y proporciona las primeras pistas para seguir buscando el gen determinante del sexo.

El inicio de este proceso partió con apenas los primeros indicios de la caracterización del período de diferenciación molecular y morfológico a nivel gonadal. Durante esta tesis de doctorado se identificó al primer grupo de genes vinculados directamente a diferenciación femenina durante un período amplio de la diferenciación molecular del sexo (3 a 6 meses), y con ellos se desarrolló

una herramienta para realizar el sexado en una especie que no contaba con un marcador genético del sexo. Ese punto clave se trató con la técnica de RAD-seq y a pesar de las dificultades intrínsecas causadas por la complejidad del genoma del esturión, y que no se obtuvo un marcador genético, se generó la primera base de datos de SNPs ligados al sexo en esturiones, además de una amplia experiencia obtenida en HRM. A partir de 2021, y en adelante con el marcador genético del sexo se pudo comenzar a trabajar con individuos sexados, desde ese punto se logró profundizar muchísimo en el proceso de diferenciación del sexo abordándolo mediante diferentes técnicas, primero gen candidato y luego por transcriptómica. Se demostró que, desde las especies de actinopterigios más basales, lugar donde se posiciona el esturión siberiano, *Acipenser baerii*, los estrógenos son quienes dirigen el proceso de diferenciación femenino. Esto indica que a nivel evolutivo el surgimiento de los estrógenos como controladores de procesos asociados al desarrollo ovárico es previo a la aparición de los peces modernos, y que los principales genes vinculados a la diferenciación del ovario también se conservaron, siendo estos *cyp19a*, *hsd17b1* y *foxl2*. Además, esta tesis no solo demostró que la diferenciación molecular del sexo ya está activa en los esturiones a los 2,5 meses de edad, siendo este el punto temporal más temprano estudiado hasta el momento, y que por lo tanto este proceso está empezando antes, sino que también deja claro que el primer gen activado en el proceso de producción de estrógenos es *hsd17b1*. Esto posiciona a *hsd17b1* como un gen muy relevante, probablemente regulado por el gen determinante del sexo. De allí surgen nuevas perspectivas, la delección génica es una nueva frontera, una técnica a poner a punto para identificar si realmente *hsd17b1* es clave para la diferenciación del sexo, e identificar quien y como lo regula. Otra perspectiva será poner a punto la técnica de hibridación *in situ*, para la cual se comenzaron a hacer intentos, pero aún no se consiguieron los mejores resultados, esto será muy importante para poder llegar a ubicar a posibles genes candidatos a la determinación y diferenciación del sexo en estadios aún más tempranos y conocer su localización celular.

Por otra parte, el primer transcriptoma realizado en individuos genéticamente sexados y en el inicio del proceso de diferenciación deja nueva e importante información para comprender más a fondo las vías de diferenciación del sexo. Este trabajo es esencial ya que por primera vez se rompe la línea de genes de clásicos vinculados a la diferenciación y se proponen nuevos genes con un importante involucramiento que surgen para ambas vías, la femenina y la masculina, así como la potencial participación de otras hormonas por fuera de las esteroideas. Un estudio en detalle de estos genes desconocidos para los procesos de diferenciación en peces es necesario para conocer su peso en este proceso, pero los resultados resaltan por su novedad donde muchos de los genes encontrados no fueron identificados antes en lo que respecta a los de la vía femenina. En el caso de la vía masculina se encuentra el primer gen ya conocido en peces y otros grupos, y expresado diferencialmente en etapas tan tempranas de la diferenciación testicular de los esturiones. Todo esto deja las puertas abiertas y muchas expectativas para continuar dilucidando el funcionamiento de estos procesos es el esturión y otras especies basales. Para ello implementar en conjunto técnicas de secuenciación masiva junto con herramientas de biología molecular como CRISPR, que permitan identificar genes clave y realizar pruebas funcionales parece ser un buen camino para avanzar hacia este objetivo.

Bibliografía general

- Adolfi, M. C., Herpin, A., Regensburger, M., Sacquegno, J., Waxman, J. S., & Scharf, M. (2016). Retinoic acid and meiosis induction in adult versus embryonic gonads of medaka. *Scientific Reports*, 6(1), 34281.
- Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1072(2-3), 129-157.
- Arkhipchuk, V. (1995). Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. *Hydrobiological Journal*, 31(1), 55-65.
- Arlati, G., Poliakova, L., & Granata, A. (2001). Experiences over the ichthyo-faunal restocking of the autochthonous sturgeon cobice (*Acipenser naccarii*) in the Lombardia region waters.

Paper presented at the Proceeding of the 4th International Sturgeon Symposium, Oshkosh, Wisconsin USA.

- Bacalbasa-Dobrovici, N. (1991). Statut des differentes especes d 'esturgeons dans le Danube Roumain: Problemes lies a leur maintenance [Status of different sturgeon species in the Romanian Danube: Problems associated with their protection]. *Paper presented at the Acipenser, Actes du premier colloque international sur l 'esturgeon*, Cemagref Publ., Bordeaux.
- Bacalbaşa-Dobrovici, N. (1997). Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its delta. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 201-207.
- Bae, M.-H., Jeong, C.-H., Kim, S.-H., Bae, M.-K., Jeong, J.-W., Ahn, M.-Y., . . . Kim, K.-R. (2002). Regulation of Egr-1 by association with the proteasome component C8. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1592(2), 163-167.
- Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological Regulation*, 62, 37-49.
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(6-7), 910-931.
- Baroiller, J. F., D'Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3(2-3), 118-135.
- Baroiller, J.-F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 153(1), 30-38.
- Baron, D., Houllgate, R., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2005). Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 73(5), 959-966.
- Baron, D., Batista, F., Chaffaux, S., Cocquet, J., Cotinot, C., Crihiu, E., . . . Pailhoux, E. (2005). *Foxl2* gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3), 377-382.
- Bemis, W. E., Findeis, E. K., & Grande, L. (1997). An overview of Acipenseriformes. In *Sturgeon biodiversity and conservation* (pp. 25-71): Springer.
- Bemis, W. E., & Kynard, B. (1997). Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 167-183.
- Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedo, G., Brunet, F., Volff, J. N., & Vizziano-Cantonnet, D. (2012). Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction and Development*, 79(8), 504-516.
- Billard, R., & Lecointre, G. (2000). Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4), 355-392.
- Blasco, M., Somoza, G. M., & Vizziano-Cantonnet, D. (2013). Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiology Biochemistry*, 39(1), 71-74.
- Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews: Genetics*, 5(7), 509-521.
- Brennan, J., Tilmann, C., & Capel, B. (2003). Pdgfr- α mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes and Development*, 17(6), 800-810.
- Bronzi, P., Chebanov, M., Michaels, J. T., Wei, Q., Rosenthal, H., & Gessner, J. (2019). Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(1), 257-266.

- Brown, M. S., Evans, B. S., & Afonso, L. O. B. (2022). Developmental changes in gene expression and gonad morphology during sex differentiation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 823, 146393.
- Bull, J. (1980). Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology*, 3-21.
- Bulun, S. E., Lin, Z., Zhao, H., Lu, M., Amin, S., Reierstad, S., & Chen, D. (2009). Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155(1), 121-131.
- Bytyutskyy, D., Srp, J., & Flajšhans, M. (2012). Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(5), 704-708.
- Capel, B. (2006). *R-spondin1* tips the balance in sex determination. *Nature genetics*, 38(11), 1233-1234.
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*, 18(11), 675-689.
- Carver, J. J., & Zhu, Y. (2023). Metzincin metalloproteases in PGC migration and gonadal sex conversion. *General and Comparative Endocrinology*, 330, 114137.
- Castañeda-Cortés, D. C., Rosa, I. F., Boan, A. F., Marrone, D., Pagliaro, N., Oliveira, M. A., . . . Tavares-Júnior, J. (2023). Thyroid axis participates in high-temperature-induced male sex reversal through its activation by the stress response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(9), 253.
- Chassot, A.-A., Gillot, I., & Chaboissier, M.-C. (2014). *R-spondin1*, *WNT4*, and the *CTNNB1* signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction*, 148(6), R97-110.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., . . . Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of β -catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Human molecular genetics*, 17(9), 1264-1277.
- Chebanov, M., & Williot, P. (2018). An assessment of the characteristics of world production of Siberian sturgeon destined to human consumption. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii*, Brandt, 1869) *Volume 2-Farming* (pp. 217-286): Springer.
- Chen, X., Wei, Q., Yang, D., & Zhu, Y. (2006). Observations on the formation and development of the primary germinal tissue of cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 358.
- Chen, Y., Xia, Y., Shao, C., Han, L., Chen, X., Yu, M., & Sha, Z. (2016). Discovery and identification of candidate sex-related genes based on transcriptome sequencing of Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*) gonads. *Physiological Genomics, physiolgenomics*. 00113.02015.
- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., & Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, 104(6), 875-889.
- Congiu, L., Gessner, J., & Ludwig, A. (2023). IUCN Red List reassessment reveals further decline of sturgeons and paddlefishes. *Oryx*, 57(1), 9-10.
- Conover, D. O., & Heins, S. W. (1987). The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae). *Copeia*, 732-743.
- Cui, Z., Liu, Y., Wang, W., Wang, Q., Zhang, N., Lin, F., . . . Li, Y. (2017). Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 7, 42213.
- Daskin, J. H., & Tilman, A. R. (2022). Alternative restocking strategy could reverse declines of a critically endangered sturgeon. *Environmental Conservation*, 49(1), 53-58.

- Deeming, D. C., & Ferguson, M. W. (1989). The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodilians: a hypothesis. *American Zoologist*, 29(3), 973-985.
- De Lean, A., Ferland, L., Drouin, J., Kelly, P. A., & Labrie, F. (1977). Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology*, 100(6), 1496-1504.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191-364.
- Díez-Torre, A., Díaz-Núñez, M., Eguizábal, C., Silván, U., & Aréchaga, J. (2013). Evidence for a role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primordial germ cell migration. *Andrology*, 1(5), 779-786.
- Eckert, R. L., Adhikary, G., Young, C. A., Jans, R., Crish, J. F., Xu, W., & Rorke, E. A. (2013). AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer. *Journal of skin cancer*, 2013(1), 537028.
- Eggers, S., Ohnesorg, T., & Sinclair, A. (2014). Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(11), 673-683.
- Fink, K. L., Wieben, E. D., Woloschak, G. E., & Spelsberg, T. C. (1988). Rapid regulation of c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(6), 1796-1800.
- Flynn, S., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D., & Benfey, T. (2006). Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, 253(1), 721-727.
- Fontana, F. (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37(5), 888-892.
- Fopp-Bayat, D. (2010). Induction of diploid gynogenesis in Wels catfish (*Silurus glanis*) using UV-irradiated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 313(1), 24-27.
- Fröhlich, E., & Wahl, R. (2019). The forgotten effects of thyrotropin-releasing hormone: Metabolic functions and medical applications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52, 29-43.
- Fujimoto, J., Hori, M., Ichigo, S., Morishita, S., & Tamaya, T. (1996). Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-jun* via activation of protein kinase C in an endometrial cancer cell line and fibroblasts derived from human uterine endometrium. *Gynecological Endocrinology*, 10(2), 109-118.
- Fukusumi, S., Ogi, K., Onda, H., & Hinuma, S. (1995). Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat peripheral tissues. *Regulatory Peptides*, 57(2), 115-121.
- Gamble, T., & Zarkower, D. (2012). Sex determination. *Current Biology*, 22(8), R257-262.
- Gashler, A., & Sukhatme, V. P. (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 50, 191-224.
- Gershengorn, M. C., Marcus-Samuels, B. E., & Geras, E. (1979). Estrogens increase the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. *Endocrinology*, 105(1), 171-176.
- Goodfellow, P. N., & Lovell-Badge, R. (1993). SRY and sex determination in mammals. *Annual review of genetics*, 27(1), 71-92.
- Grande, L., & Bemis, W. E. (1996). Interrelationships of Acipenseriformes, with comments on Chondrostei". In *Interrelationships of Fishes*, Edited by: Stiassny, MLJ, Parenti, LR and Johnson, GD, 85-115.

- Grandi, G., & Chicca, M. (2008). Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei). *Journal of Morphology*, 269(10), 1238-1262.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C.-F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 352-366.
- Hagino, S. (2001). Effects of ethinylestradiol, diethylstilbestrol, 4-t-pentylphenol, 17 β -estradiol, methyltestosterone and flutamide on sex reversal in S-rR strain medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Science*, 8, 75-87.
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., . . . Strussmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2955-2959.
- Havelka, M., Kašpar, V., Hulák, M., & Flajšhans, M. (2011). Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. *Folia Zoologica*, 60(2), 93-103.
- Healy, S., Khan, P., & Davie, J. R. (2013). Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacology and Therapeutics*, 137(1), 64-77.
- Heublein, J., Kelly, J., Crocker, C., Klimley, A. P., & Lindley, S. (2009). Migration of green sturgeon, *Acipenser medirostris*, in the Sacramento River. *Environmental Biology of Fishes*, 84(3), 245-258.
- Holčík, J. (1989). General Introduction to Fishes: Acipenseriformes: Balogh Scientific Books.
- Hu, Q., Meng, Y., Wang, D., Tian, H., & Xiao, H. (2019). Characterization and function of the T-box 1 gene in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. *Genomics*, 111(6), 1351-1359.
- Imarazene, B., Beille, S., Jouanno, E., Branthonne, A., Thermes, V., Thomas, M., . . . Guiguen, Y. (2021). Primordial germ cell migration and histological and molecular characterization of gonadal differentiation in pachón cavefish *Astyanax mexicanus*. *Sexual Development*, 14(1-6), 80-98.
- Itoh, M. T., Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Amemiya, A., & Sumi, Y. (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 5(5), 402-408.
- IUCN. (2015). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. www.iucnredlist.org Downloaded on 03 December 2015. Retrieved from www.iucnredlist.org
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., . . . Hosoya, S. (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genetics*, 8(7), e1002798.
- Kawahara, T., & Yamashita, I. (2000). Estrogen-independent ovary formation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 17(1), 65-68.
- Keyvanshokoo, S., & Gharaei, A. (2010). A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research*, 41(9), e1-e7.
- Khodaparast, M., Keyvanshokoo, S., Pourkazemi, M., Hosseini, S., & Zolgharnein, H. (2014). Searching the genome of beluga (*Huso huso*) for sex markers based on targeted Bulk Segregant Analysis (BSA). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 12(2), 185-195.
- Kim, B. K. (2010). The role of the Fused toes locus containing Iroquois homeobox gene 3, 5, and 6 and Ftm, Fto, and Fts during ovary and testis development in mice. In: *Doctoral dissertation; University of Illinois at Urbana-Champaign*.

- Kim, H.-R., Kim, Y. S., Yoon, J. A., Lyu, S. W., Shin, H., Lim, H. J., . . . Song, H. (2014). Egr1 is rapidly and transiently induced by estrogen and bisphenol A via activation of nuclear estrogen receptor-dependent ERK1/2 pathway in the uterus. *Reproductive Toxicology*, 50, 60-67.
- Kim, H. R., Kim, Y. S., Yoon, J. A., Yang, S. C., Park, M., Seol, D. W., . . . Lee, D. R. (2018). Estrogen induces EGR1 to fine-tune its actions on uterine epithelium by controlling PR signaling for successful embryo implantation. *The FASEB Journal*, 32(3), 1184-1195.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., . . . Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biology*, 4(6), e187.
- Kimura, N., Arai, K., Sahara, Y., Suzuki, H., & Kimura, N. (1994). Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology*, 134(1), 432-440.
- Kitano, J., Ansai, S., Takehana, Y., & Yamamoto, Y. (2024). Diversity and Convergence of Sex-Determination Mechanisms in Teleost Fish. *Annual Review of Animal Biosciences*, 12(1), 233-259.
- Kitano, T. (2018). Endocrine and environmental control of sex differentiation in gonochoristic fish. *In Reproductive developmental strategies: The continuity of life (pp. 307-319)*.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., & Abe, S.-I. (2000). Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56(1), 1-5.
- Klein, J. D., Qu, C., Yang, X., Fan, Y., Tang, C., & Peng, J. C. (2016). c-Fos repression by Piwi regulates Drosophila ovarian germline formation and tissue morphogenesis. *PLoS Genetics*, 12(9), e1006281.
- Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., & Vizziano-Cantonnet, D. (2020). RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon. *Data in Brief*, 105741.
- Kobayashi, M., Aida, K., & Stacey, N. E. (1991). Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. *Zoological Science*, 389-393.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(1), 297-306.
- Koopman, P. (1999). Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(6-7), 839-856.
- Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., . . . Okada, Y. (2019). A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes. *Current biology*, 29(11), 1901-1909.
- Krüger, A., & Pudenz, S. (2002). Chlorinated hydrocarbon pollution in caviar samples. *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology*, 87(5-6), 637-644.
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., . . . Stöck, M. (2021). A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Journal of Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200089.

- Kukushkin, A. N., Svetlikova, S. B., & Pospelov, V. A. (2005). Transcriptional activation of immediate-early genes c-fos, c-jun, and Egr-1 in response to anisomycin treatment of cells transformed by the E1A and cHa-ras oncogenes. *Molecular Biology*, 39, 69-76.
- Kwon, O. N., & Adachi, S. (2009). Effects of oral-administered 17 α -methyltestosterone and estradiol-17 β for sex reversal of hybrid sturgeon, bester juvenile. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(6), 585-590.
- Kynard, B. (1997). Life history, latitudinal patterns, and status of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 319-334.
- Lamatsch, D., Steinlein, C., Schmid, M., & Scharl, M. (2000). Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 39(2), 91-95.
- Landers, J. P., & Spelsberg, T. C. (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2(1), 19-63.
- Lang, J. W., & Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 28-44.
- Lasalle, A., Benech-Correa, G., Brunet, F. G., & Vizziano-Cantonnet, D. (2024). *hsd17b1* is a key gene for ovarian differentiation of the Siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 91(1), e23729.
- Lasalle, A., Cáceres, P., Montenegro, T., Araneda, C., Yáñez, J., & Vizziano-Cantonnet, D. (2021). Development of a dense SNP panel for the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using high-depth RAD-seq. *Conservation Genetics Resources*, 1-3.
- Lasalle, A., Norbis, W., & Vizziano-Cantonnet, D. (2021). Sex identification of morphologically-undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns. *Journal of Applied Ichthyology*, 37(6), 835-846.
- Li, M., Sun, Y., Zhao, J., Shi, H., Zeng, S., Ye, K., . . . Tao, W. (2015). A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genetics*, 11(11), e1005678.
- Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., & Orban, L. (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish. *PloS One*, 7(4), e34397-e34397.
- Liu, J., Grogan, L., Nau, M. M., Allegra, C. J., Chu, E., & Wright, J. J. (2001). Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1. *International Journal of Oncology*, 18(4), 863-870.
- Malaney, S., & Daly, R. J. (2001). The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6, 101-113.
- Marshall Graves, J. A. (2013). How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Developmental Dynamics*, 242(4), 354-359.
- Matsuda, M. (2018). Genetic Control of Sex Determination and Differentiation in Fish. In K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, & M. Kondo (Eds.), *Reproductive and Developmental Strategies: The continuity of life* (pp. 289-306). Tokyo: Springer Japan.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., . . . Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559-563.
- Mazzoni, T. S., Lo Nostro, F. L., Antoneli, F. N., & Quagio-Grassiotto, I. (2018). Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential

- hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). *Cells*, 7(5), 34.
- Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2021). Presence of the matrix metalloproteinases during the migration of the primordial germ cells in zebrafish gonadal ridge. *Cell and Tissue Research*, 383, 707-722.
- McDowall, R. (1992). Diadromy: origins and definitions of terminology. *Copeia*, 248-251.
- McDowall, R. M. (1988). Diadromy in fishes: migrations between freshwater and marine environments. *Bioscience*, 39(8), 565-567.
- McEnroe, M., & Cech Jr, J. J. (1987). Osmoregulation in white sturgeon: life history aspects. *Paper presented at the American Fisheries Society Symposium*.
- Medina, P., Gómez, A., Zanuy, S., & Blázquez, M. (2019). Involvement of the retinoic acid signaling pathway in sex differentiation and pubertal development in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Heliyon*, 5(2).
- Meixner, A., Karreth, F., Kenner, L., Penninger, J. M., & Wagner, E. F. (2010). Jun and JunD-dependent functions in cell proliferation and stress response. *Cell Death and Differentiation*, 17(9), 1409-1419.
- Mindnich, R., Möller, G., & Adamski, J. (2004). The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218(1-2), 7-20.
- Moore, E. C., & Roberts, R. B. (2013). Polygenic sex determination. *Current biology*, 23(12), R510-R512.
- Mugue, N., & Barmintseva, A. (2018). Genetic variability in wild populations and farmed broodstocks of the Siberian Sturgeon in Russia. In P. Williot, G. Nonnotte, & M. Chebanov (Eds.), *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 - Farming* (pp. 347-369).
- Murphy, L. J., Murphy, L. C., & Friesen, H. G. (1987). Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology*, 120(5), 1882-1888.
- Myers, G. S. (1949). Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia*, 89-97.
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., . . . Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163-170.
- Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., & Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Journal of Physiological reviews*, 101(3), 1237-1308.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., & Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362-372.
- Neeb, A., Wallbaum, S., Novac, N., Dukovic-Schulze, S., Scholl, I., Schreiber, C., . . . Sleeman, J. P. (2012). The immediate early gene *Ier2* promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. *Oncogene*, 31(33), 3796-3806.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*, John Wiley & Sons.
- Nicol, B., Estermann, M. A., Yao, H. H. C., & Mellouk, N. (2022). Becoming female: ovarian differentiation from an evolutionary perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 944776.
- O'Donnell, A., Odrowaz, Z., & Sharrocks, A. D. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 58-66.

- Ogawa, S., Akiyoshi, M., Higuchi, M., Nakamura, M., & Hirai, T. (2008). Post-sex differentiatinal sex reversal in the female common carp (*Cyprinus carpio*). *Cybium*, 32(2), 102-103.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Mitsushashi, E., Yoshitomi, K., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2002). Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries science*, 68(5), 1047-1054.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., & Yamauchi, K. (2005). Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female $\times$ *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*, 245(1), 39-47.
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T. H., Norrgren, L., & Petersen, G. I. (2003). Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65(4), 397-411.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 221-233.
- Pagel, J.-I., & Deindl, E. (2011). Early growth response 1—a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades.
- Palaiokostas, C., Bekaert, M., Taggart, J. B., Gharbi, K., McAndrew, B. J., Chatain, B., . . . Vandeputte, M. (2015). A new SNP-based vision of the genetics of sex determination in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 68.
- Pan, Q., Feron, R., Yano, A., Guyomard, R., Jouanno, E., Vigouroux, E., . . . Concordet, J.-P. (2019). Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation. *PLoS Genetics*, 15(8), e1008013.
- Paragamian, V. L., & Kruse, G. (2001). Kootenai River white sturgeon spawning migration behavior and a predictive model. *North American Journal of Fisheries Management*, 21(1), 10-21.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., . . . Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, 38(11), 1304-1309.
- Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wei, Q., & He, S. (2007). Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 854-862.
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16-34.
- Picard, M. A. L., Vicoso, B., Bertrand, S., & Escriva, H. (2021). Diversity of modes of reproduction and sex determination systems in invertebrates, and the putative contribution of genetic conflict. *Genes*, 12(8), 1136.
- Piferrer, F. (2018). Epigenetics of sex determination and differentiation in fish. *Sex Control in Aquaculture*, 65-83.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1), 229-281.
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., & González, A. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2), 102-110.
- Piferrer, F., & Guiguen, Y. (2008). Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 35-55.
- Pinto, B. J., Nielsen, S. V., Sullivan, K. A., Behere, A., Keating, S. E., van Schingen-Khan, M., . . . Wilson, M. A. (2024). It's a trap?! Escape from an ancient, ancestral sex chromosome system and implication of Foxl2 as the putative primary sex-determining gene in a lizard (*Anguimorpha*; *Shinisauridae*). *Evolution*, 78(2), 355-363.

- Punetha, M., Kumar, S., Paul, A., Jose, B., Bharati, J., Sonwane, A., . . . Sarkar, M. (2021). Deciphering the functional role of EGR1 in Prostaglandin F2 alpha induced luteal regression applying CRISPR in corpus luteum of buffalo. *Biological Research*, 54.
- Quiros, R., & Vidal, J. (2000). Cyclic behaviour of potamodromous fish in large rivers. *Management and Ecology of River Fisheries*, 71-86.
- Rajkov, J., Shao, Z., & Berrebi, P. (2014). Evolution of polyploidy and functional diploidization in sturgeons: microsatellite analysis in 10 sturgeon species. *Journal of Heredity*, 105(4), 521-531.
- Rao, J. N., Debeljuk, L., Bartke, A., Gao, Y.-P., Wilber, J. F., & Feng, P. (1997). The Detection of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) and TRH Receptor Gene Expression in Siberian Hamster Testes. *Peptides*, 18(8), 1217-1222.
- Redding, J. M., Fitzpatrick, M. S., Feist, G., & Schreck, C. B. (1987). Sex reversal by estradiol-17 β and androgens in pacific salmon. In *Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (p. 136). Memorial University of Newfoundland.
- Reddon, A. R., & Hurd, P. L. (2013). Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology*, 116(3), 139-143.
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., . . . Bens, M. (2015). Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell*, 163(6), 1527-1538.
- Rice, W. R. (1986). On the instability of polygenic sex determination: the effect of sex-specific selection. *Evolution*, 40(3), 633-639.
- Rocks, D., Purisic, E., Gallo, E. F., Greally, J. M., Suzuki, M., & Kundakovic, M. (2023). Egr1 is a sex-specific regulator of neuronal chromatin, synaptic plasticity, and behaviour. *bioRxiv*.
- Roberts, N. B., Juntti, S. A., Coyle, K. P., Dumont, B. L., Stanley, M. K., Ryan, A. Q., . . . Roberts, R. B. (2016). Polygenic sex determination in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genomics*, 17, 1-13.
- Ruban, G. I. (2018). Geographical Distribution, Ecological and Biological Characteristics of the Siberian Sturgeon Species. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology* (pp. 3-28): Springer.
- Rubin, D. A. (1985). Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 233-235.
- Ryseck, R.-P., & Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*, 6(4), 533-542.
- Rzepakowska, M., & Ostaszewska, T. (2013). Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, 6(2), 75-88.
- Saber, M.H., Baradaran, S., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., Jalilpour, J., Nowruz Fashkhami, M., & Falahatkar, B. (2019). Masculinization of the gynogenetic juvenile ship sturgeon (*Acipenser nudiiventris* Lovetsky, 1828) using 17 α -methyl testosterone. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(4), 843-849.
- Saber, M. H., & Hallajian, A. (2014). Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture international*, 22(1), 273-279.
- Sanfilippo, G. E., Riedy, J. J., Larson, D. L., & Scribner, K. T. (2022). Multi-year evidence of unbiased sex ratios in hatchery and wild-reared age-0 lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 48(5), 1306-1313.

- Schally, A. V. (1978). Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland: its implications for the control of reproductive processes. *Science*, 202(4363), 18-28.
- Schartl, M., Schmid, M., & Nanda, I. J. C. (2016). Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma*, 125, 553-571.
- Schartl, M., Georges, A., & Graves, J. A. M. (2023). Polygenic sex determination in vertebrates—is there any such thing? *Trends in Genetics*, 39(4), 242-250.
- Schleif, M. C., Havel, S. L., & Griswold, M. D. (2022). Function of retinoic acid in development of male and female gametes. *Nutrients*, 14(6), 1293.
- Schlingensiepen, K. H., Schlingensiepen, R., Kunst, M., Klinger, I., Gerdes, W., Seifert, W., & Brysch, W. (1993). Opposite functions of jun-B and c-jun in growth regulation and neuronal differentiation. *Developmental genetics*, 14(4), 305-312.
- Shapiro, D. Y. (1979). Social behavior, group structure, and the control of sex reversal in hermaphroditic fish. In *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 10, pp. 43-102).
- Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., . . . Hu, M. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 11(3), 259-273.
- Siegfried, K. R. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *Journal of Fish Biology*, 76(8), 1879-1902.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., . . . 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(6281), 240-244.
- Singh, A. K., & Singh, R. (2013). In vivo response of melatonin, gonadal activity and biochemical changes during CYP19 inhibited sex reversal in common carp *Cyprinus carpio* (L). *Animal Reproduction Science*, 136(4), 317-325.
- Singh, N., Singh, D., Bhide, A., Sharma, R., Sahoo, S., Jolly, M. K., & Modi, D. (2022). Lhx2 in germ cells suppresses endothelial cell migration in the developing ovary. *Experimental Cell Research*, 415(1), 113108.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., & Sinclair, A. H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261), 267-271.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. In: WH Freeman, New York New York, USA.
- Sower, S. A., Freamat, M., & Kavanaugh, S. I. (2009). The origins of the vertebrate hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) and hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), 20-29.
- Spelsberg, T. C., Fink, K., Rories, C., Lau, C. K., Davis, K., Bunn, W. D., . . . Subramaniam, M. (1991). Role of proto-oncogenes as regulatory genes in the steroid action pathway. *The New Biology of Steroid Hormones*, 203-212.
- Sreenivasan, R., Jiang, J., Wang, X., Bartfai, R., Kwan, H. Y., Christoffels, A., & Orban, L. (2014). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 90(2), 45.
- Sutton, M. N., Yang, H., Huang, G. Y., Fu, C., Pontikos, M., Wang, Y., . . . Liu, J. (2018). RAS-related GTPases DIRAS1 and DIRAS2 induce autophagic cancer cell death and are required for autophagy in murine ovarian cancer cells. *Autophagy*, 14(4), 637-653.
- Takahashi, T., & Ogiwara, K. (2021). Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of the current status. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 254, 110907.

- Takaya, T., Kasatani, K., Noguchi, S., & Nikawa, J.-i. (2009). Functional Analyses of Immediate Early Gene ETR101 Expressed in Yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(7), 1653-1660.
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin, I. T., . . . Naruse, K. (2014). Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications*, 5, 4157.
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., . . . Inoue, A. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1278-1291.
- Tovo-Neto, A., da Silva Rodrigues, M., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2018). Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 230-236.
- Tijmes, M., Pedraza, R., & Valladares, L. (1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*, 61(2), 65-68.
- Tveteras, R. (2016). Global Aquaculture. Retrieved from <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/topic/ragnar-tveteras/>
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405-409.
- Van der Burg, B., van Selm-Miltenburg, A. J. P., de Laat, S. W., & van Zoelen, E. J. J. (1989). Direct effects of estrogen on *c-fos* and *c-myc* protooncogene expression and cellular proliferation in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 64(2), 223-228.
- Van Eenennaam, A., Van Eenennaam, J., Medrano, J., & Doroshov, S. (1999). Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, 90(1), 231-233.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., & Chatain, B. (2007). A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics*, 176(2), 1049-1057.
- Vecsei, P., & Peterson, D. (2004). Sturgeon ecomorphology: a descriptive approach. In *Sturgeons and paddlefish of North America* (pp. 103-133).
- Vizziano-Cantonnet, D., Baron, D., Mahe, S., Cauty, C., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2008). Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5), 277-288.
- Vizziano-Cantonnet, D., Benech-Correa, G., & Lasalle, A. (2025). Estradiol-17 β but not 11 β -hydroxyandrostenedione induces sex transdifferentiation in Siberian sturgeon. *Aquaculture*, 741735.
- Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., & Genthon, C. (2018). De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and Comparative Endocrinology*, 268, 96-109.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 19-36.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., & Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 236(8), 2198-2206.
- Volff, J. N., & Scharl, M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica*, 111(1-3), 101-110.

- Wagner, E. F. (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(suppl 2), ii40-ii42.
- Wan, G., Zhang, H., Wang, P., Qin, Q., Zhou, X., Xiong, G., . . . Hu, Y. (2024). Gonadal Transcriptome Analysis Reveals that SOX17 and CYP26A1 are Involved in Sex Differentiation in the Chinese Soft-Shelled Turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Biochemical Genetics*, 1-21.
- Webb, D. K., Moulton, B. C., & Khan, S. A. (1993). Estrogen induces expression of *c-jun* and *jun-B* protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology*, 133(1), 20-28.
- Wei, Q., Ke, F. e., Zhang, J., Zhuang, P., Luo, J., Zhou, R., & Yang, W. (1997). Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 241-255.
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87(1), 1-28.
- Williot, P., & Chebanov, M. (2018). Controlled Reproduction of Farmed Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* Brandt. In P. Williot, G. Nonnotte, & M. Chebanov (Eds.), *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 - Farming* (pp. 13-47). Cham: Springer International Publishing.
- Williot, P., Rouault, T., Brun, R., Pelard, M., & Mercier, D. (2002). Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology*, 87(5), 515-524.
- Wirgin, I. I., Stabile, J. E., & Waldman, J. R. (1997). Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 385-398.
- Wu, W., Zhang, X., Lv, H., Liao, Y., Zhang, W., Cheng, H., . . . Zhang, Y. (2015). Identification of immediate early response protein 2 as a regulator of angiogenesis through the modulation of endothelial cell motility and adhesion. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 1104-1110.
- Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., . . . Zane, L. (2006). Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*, 258(1), 685-688.
- Xu, X., Zhang, M., Xu, F., & Jiang, S. (2020). Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular Cancer*, 19(1), 165.
- Xu, X., Zhou, W., Chen, Y., Wu, K., Wang, H., Zhang, J., . . . Shen, W. (2020). Immediate early response protein 2 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulating the activity of Rho GTPases. *Neoplasma*, 67(3), 614-622.
- Xu, Y., Wang, S., Cao, X., Yuan, Z., Getachew, T., Mwacharo, J. M., . . . Sun, W. (2022). The effect of EGR1 on the proliferation of dermal papilla cells. *Genes*, 13(7), 1242.
- Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., & Kitano, T. (2007). Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(4), 935-940.
- Yamamoto, T.-O. (1969). Sex differentiation. *Fish physiology*, 3(3), 117-175.
- Yamamoto, Y., & Luckenbach, J. A. (2023). Sex determination and gonadal sex differentiation.
- Yamamoto, Y., Zhang, Y., Sarida, M., Hattori, R. S., & Strüssmann, C. A. (2014). Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PloS One*, 9(7), e102574.
- Yang, S., Tang, X., Yan, F., Yang, H., Xu, L., Jian, Z., . . . Wang, Q. (2024). A time-course transcriptome analysis revealing the potential molecular mechanism of early gonadal

differentiation in the Chinese giant salamander. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 50, 101200.

- Yang, Y., Liu, Q., Xiao, Y., Xu, S., Wang, X., Yang, J., . . . Li, J. (2020). Effects of environmental stress (sex steroids and heat) during sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): insight from germ cell proliferation and gsdf-amh-cyp19a1a expression. *Aquaculture*, 515, 734536.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., . . . Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423-1428.
- Yano, A., Nicol, B., Guerin, A., & Guiguen, Y. (2011). The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(3), 172-180.
- Yao, H. H.-C., Whoriskey, W., & Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes and Development*, 16(11), 1433-1440.
- Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N., & Ito, M. (2010). Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development*, 137(15), 2519-2526.
- Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S., & Kitano, T. (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(2), 508-513.
- Zhang, J., Yang, J., Ma, Z., Pu, H., Zhang, T., Guo, J., . . . Liang, Z. (2024). Molecular and cellular regulation on sexual fate and gonadal development in hermaphrodite yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture Reports*, 34, 101913.
- Zhang, M., Xu, P., Sun, X., Zhang, C., Shi, X., Li, J., . . . Chen, G. (2021). JUN promotes chicken female differentiation by inhibiting Smad2. *Cytotechnology*, 73, 101-113.
- Zhou, H., Fujimoto, T., Adachi, S., Yamaha, E., & Arai, K. (2011). Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of *Acipenseriformes*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 484-491.
- Zhou, L., Chakraborty, T., Zhou, Q., Mohapatra, S., Nagahama, Y., & Zhang, Y. (2016). Rspo1-activated signalling molecules are sufficient to induce ovarian differentiation in XY medaka (*Oryzias latipes*). *Scientific Reports*, 6, 19543.

