

DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL SEXO EN TORTUGAS: TSD Y GSD

Txema López, 2006

La determinación del sexo por temperatura (TSD, por sus siglas en inglés) es un fenómeno bastante común tanto en vertebrados como en invertebrados. Sin embargo, es en los reptiles donde más se ha estudiado y por tanto, de donde más información interesante y conclusiones podemos sacar. En este artículo veremos por qué a ciertos seres vivos les puede interesar, o no, dejar a las circunstancias climatológicas influir en algo tan importante para la supervivencia de su especie, como es el ratio machos/hembras.

GSD: determinación genética del sexo.

Todas las especies animales y vegetales tienen un número de cromosomas constante y determinado, que constituyen su **cariotipo**: la forma, cantidad y tamaño de los cromosomas. Aunque la diferencia entre un individuo y otro es la información especificada en los genes de estos cromosomas.

En muchos organismos, uno de los pares de los cromosomas homólogos es distinto al resto, realizando la determinación genética del individuo. A estos cromosomas se les llama **cromosomas sexuales** o **heterocromosomas**, porque determina el sexo por la proporción de los dos cromosomas homólogos.

- **Sistema de determinación XY:** es propio del hombre y muchos otros animales. Las hembras, siendo **XX**, darán gametos iguales con cromosoma **X**, **sexo homogamético** y los machos, siendo **XY**, darán dos tipos de gametos, uno con el cromosoma **X** y otro con el cromosoma **Y**. La probabilidad de que en la fecundación, al unirse los gametos, resulte una combinación **XX** (hembra) o **XY** (macho) es del 50%.

- **Sistema de determinación ZW:** en otras especies (mariposas, p.ej.) ocurre lo contrario, el sexo masculino es homogamético (ZZ) y el femenino heterogamético (ZW).

- **Sistema de determinación XO:** otras especies (peces, insectos, anfibios) que no tienen el cromosoma Y, determinándose el sexo por el número de cromosomas X, macho XO y hembra XX.

- **Sistema H:** cromosomas sexuales homomórficos, existen cromosomas sexuales, pero no son de diferente naturaleza.

No obstante, en otros muchos organismos, estos cromosomas sexuales diferenciados, no existen. La mayoría de tortugas y cocodrilos presentan cariotipos que muestran esta ausencia, mientras que, sin salir de la familia de los reptiles, serpientes y lagartos si presentan estos cromosomas.

Para el sistema XY, en la meiosis femenina, cada óvulo recibe un cromosoma X. En la meiosis masculina, cada espermatozoide puede recibir un cromosoma X o un cromosoma Y. Si un espermatozoide que lleva un cromosoma X fecunda al óvulo, el cigoto dará lugar a una hembra (XX); si un espermatozoide que lleva un

cromosoma Y fecunda al óvulo, el cigoto dará lugar a un macho (XY). No obstante, esto no es lo habitual en las tortugas, aunque sí lo que todos conocemos porque es aplicable a los humanos y a todos los mamíferos. La probabilidad genética siguiendo las leyes de distribución mendeliana de obtener machos o hembras es de un 50%.

En tortugas, tan solo *Acantochelys* (*Chelidae*), *Staurotypus* (*Staurotypidae*), y *Siebenrockiella* (*Bataguridae*), siguen este patrón XY (Janzen y Paukstits, 1991a). Un estudio reciente también coloca en este grupo a *Chelodina longicollis* (Ezaz y Valenzuela, 2006), por la presencia de un par de microcromosomas XY. Es posible que otras especies con GSD también los posean y no hayan sido detectados. Otras tortugas con GSD que siguen otros sistemas citados son *Emydura* y *Chelodina* (*Chelydidae*) (Janzen y Paukstits, 1991^a), *Apalone* (Janzen y Paukstits, 1991^a) y *Pelodiscus* (Choo y Chou, 1992) (*Trionichyidae*), *Claudius* (*Staurotypidae*) (Vogt y Flores Vilella, 1992), *Calemys* (Janzen y Paukstits, 1991^a) (*Emydinae*), regidos por el sistema H y *Kachuga* (*Bataguridae*) (Janzen y Paukstits, 1991^a), regido por el sistema ZW.



Kachuga smithii (Marcelo López).

La determinación del sexo en los vertebrados está regida por una serie de mecanismos genéticos y ambientales. Los taxones más estudiados, los pájaros y los mamíferos, responden a los sistemas XX/XY y ZZ/ZW mencionados con anterioridad. Los reptiles muestran una diversidad mucho mayor, mostrando la determinación genética del sexo (GSD) con ambos sistemas XY y ZW (con y sin cromosomas heteromórficos) y la determinación del sexo por temperatura (TSD). La detección del sexo heterogamético es realmente muy difícil en especies que no presentan cromosomas sexuales diferenciados, como ocurre con muchas especies de anfibios, peces, e incluso algunas de lagartos y serpientes, además de casi todas

las especies de tortugas. Los cromosomas sexuales heteromórficos son muy raros en ellas. De las 254 especies conocidas de tortugas, solamente 155 están cariotipadas, lo cual representa sólo un 61% del total. De estas, sólo 4 presentan macrocromosomas heteromórficos (siendo el estudio realizado para *Acantochelys radiolata* bastante discutible, puesto que sólo se realizó para un macho) y una, microcromosomas, la *Chelodina longicollis*. (Ezaz y Valenzuela, 2006). La diferenciación de los cromosomas sexuales parece seguir la regla de que el miembro heterogamético del par se degenera (Charlesworth, 1996). Un aspecto interesante de los cromosomas sexuales de las tortugas, es que, a diferencia de otros vertebrados, el cromosoma Y no es siempre el cromosoma sexual más diferenciado (Olmo, 1986). Por ejemplo en *Staurotypus*, el cromosoma X sufre diferenciación a partir del par del parental, mientras que el Y parece no sufrir modificación alguna (Sites et al. 1979).



Starotypus salvinii (Marcelo López).

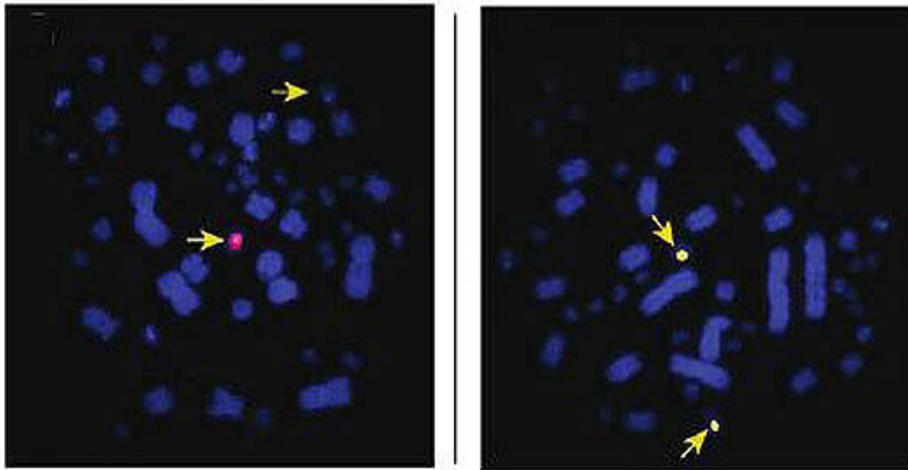
El caso de la *Chelodina longicollis* es particularmente excepcional en el mundo de las tortugas, por lo que un comentario más extenso del estudio de Ezaz y Valenzuela resulta de particular interés. La incubación de huevos de esta especie en un rango tanto constante como fluctuante demostró que esta especie australiana muestra determinación genética del sexo. Un estudio de cariotipación realizado por Bull y Legler (Bull y Legler, 1978) no encontró cromosomas sexuales heteromórficos, lo cual la englobaba en el sistema H del que hablábamos al principio. No obstante, el uso de técnicas modernas, como la *hibridación comparativa genómica* (CGH) ha revelado la existencia de cromosomas crípticos en diversas especies de reptiles con un supuesto sistema H.

Un estudio reciente realizado para el lagarto australiano *Pogona vitticeps* (Viets et al, 1994, Harlow 2001), demuestra que el anterior estudio de cariotipación que colocaba a esta especie en el sistema H (Witten 1983) no es correcto. Ezaz et al. (Ezaz et al. 2005) han desvelado la existencia de cromosomas sexuales crípticos en esta especie, de difícil descubrimiento. Son crípticos en el sentido de que no son visibles por medio de las técnicas microscópicas tradicionales, sino que necesitan hacer uso de la mencionada CGH. Este estudio ha descubierto que las hembras de *Pogona* son heterogámicas (sistema ZW).



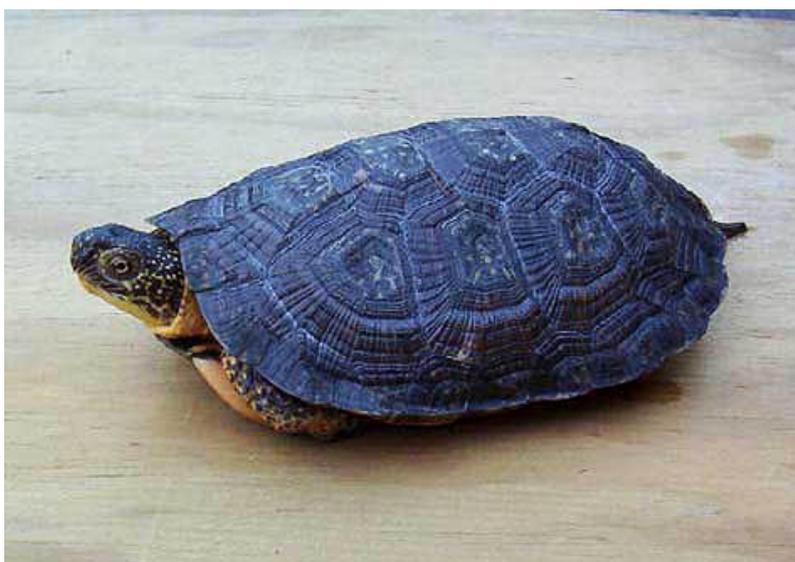
Chelodina sp. (Marcelo López).

El cariotipo de *Chelodina longicollis* es $2n=54$, con 12 pares designados como macrocromosomas y 15 como microcromosomas. La diferencia entre los cromosomas X e Y es bastante sutil, lo cual demuestra que se encuentran en un estadio de diferenciación muy primitivo, y que no ha transcurrido un tiempo suficiente para la que los cromosomas protosexuales hayan sufrido una diferenciación a gran escala. Esto nos lleva a la conclusión, que luego analizaremos con más profundidad, de que la TSD es el mecanismo de diferenciación sexual ancestral en las tortugas, mientras que la GSD es una evolución más reciente, además de que la GSD ha evolucionado varias veces en las tortugas de manera independiente, y al menos en 5 ocasiones, (Janzen & Krtež, 2004), dado lo primitivo de la diferenciación en *Chelodina longicollis*. No obstante, el sistema homomórfico H parece ser también estable, dado el uso antiquísimo que hacen de él algunas serpientes y anfibios. En cualquier caso, es posible que el estudio del cariotipo de otras especies supuestamente poseedoras de cromosomas sexuales homomórficos nos de un resultado similar.



(Cromosomas de ***Chelodina longicollis***, izquierda macho, derecha hembra. Las flechas marcan los cromosomas X e Y). Foto: Ezaz, T., Valenzuela, N. "An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination". *Chromosome Research* (2006) 14:139-150.

El hecho de que la GSD sea una evolución reciente implica que la diferencia entre TSD y GSD no es tan profunda como parece. En un único género como *Clemmys*, la tortuga moteada (*Clemmys guttata*) pertenece al grupo TSD mientras que la tortuga de madera (*Clemmys insculpta*) pertenece al grupo GSD. LA cosa se puede complicar mucho más. Aunque lo describiremos posteriormente, hay varios patrones TSD (Ia y II se dan en tortugas), y en un mismo género (*Kinosternidae*), se pueden dar los dos patrones TSD y el GSD. *Kinosternon integrum* pertenece a TSD Ia, por ejemplo, *Sternotherus minor* a TSD II, y *Kinosternon bauri* se rige por GSD y TSD. En el caso de la tortuga aligador (*Macrochelys temminckii*) parece incluso que no hay una temperatura a la que se desarrollen machos para todos los huevos de una puesta. Este fenómeno sugiere la posibilidad de que siempre, al menos un tercio de los huevos están destinados a ser hembras independientemente de la temperatura.



© 2003 James H. Harding Híbrido de *Clemmys insculpta* (GSD) x *Emydoidea blandingii* (TSD).

En cualquier caso, la ausencia de cromosomas heteromórficos no implica necesariamente que la especie use TSD. De hecho, como comentábamos antes, hay TSDs mal asignadas por el mero hecho de confundir diferenciación y determinación sexual. Circunstancias como la mortalidad embrionaria diferencial y reabsorción, y la reversión de sexo inducida por temperatura pueden confundirse con TSD. Aunque no abundaremos en estos mecanismos. (Valenzuela et Al. 2003). Para saber si estamos ante TSD o GSD, podemos seguir el protocolo del gráfico I.

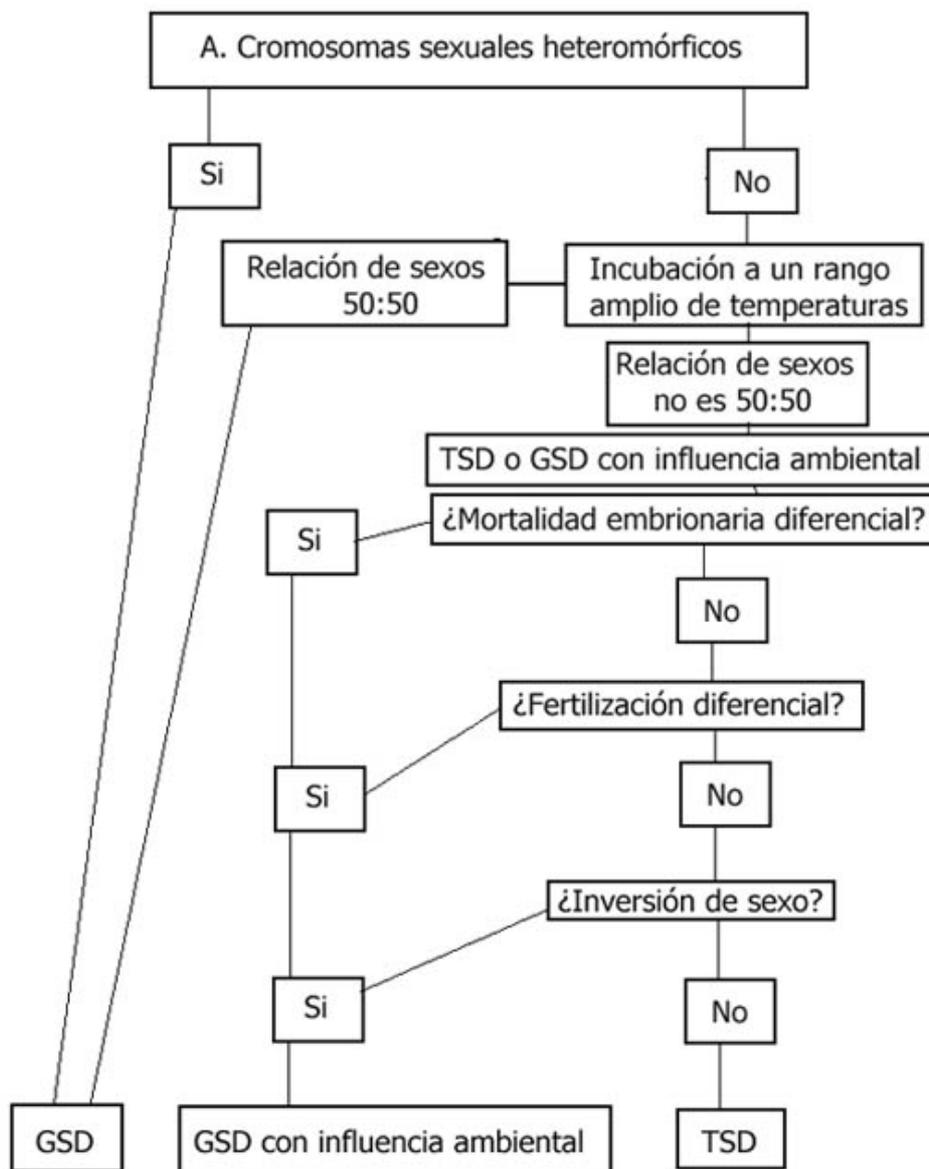


Gráfico 1. Protocolo de Identificación de GSD-TSD, adaptado de Valenzuela, Nicole, Dean C. Adams, and Frederic J. Janzen. "Pattern Does Not Equal Process: Exactly When is Sex Environmentally Determined?" *The American Naturalist* 161.4 (2003).

Gráfico adaptado de **TSD Basics, Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles.**

TSD: determinación del sexo por temperatura.

A mediados de los años 60 se realizó un descubrimiento realmente curioso. Para una amplia variedad de reptiles, la temperatura de incubación no sólo influía en el ratio de desarrollo embrionario, sino que además determinaba su sexo. Esto es lo que se ha llamado "Determinación del Sexo por Temperatura" más conocido por sus siglas en inglés, TSD.

No todos los reptiles se rigen por el mismo patrón. Existen 3 patrones de TSD perfectamente estudiados:

Patrón Ia : Lo muestran los podocnémidos, las tortugas marinas, la mayoría de los emídidos, las tortugas terrestres y algunos batagúridos. Si la temperatura del huevo permanece por debajo de cierta temperatura durante un periodo determinado de tiempo, en el que el embrión está desarrollando sus órganos sexuales, la futura tortuga será macho. Por encima de esta "Temperatura pivotal", será hembra. Los huevos incubados en un rango cercano a esta temperatura pivotal darán lugar a una mezcla de machos y hembras, e incluso puede ser que individuos que presenten características de ambos sexos, aunque esta última posibilidad es muy extraña. Este patrón solo se da en tortugas.

Patrón Ib: Típico de algunos cocodrílidos, los huevos incubados a una temperatura superior a la pivotal dan lugar a machos. Ninguna tortuga presenta esta variedad de TSD.

Patrón II: Lo muestran las tortugas mordedoras (*Chelydra*) , pelomedúsidos, algunos kinostérnidos y el batagúrido *Melanochelys trijuga*. También lo presentan algunos lagartos y cocodrílidos. En este tipo de TSD hay dos temperaturas pivotaes. Las hembras se producen por debajo de la primera y por encima de la segunda, es decir, sólo se producen machos en un intervalo determinado de temperatura. Sin embargo, a todos los efectos, equivale a usar el patrón Ia, puesto que es muy extraño que las hembras pongan huevos donde se den las condiciones para obtener hembras de baja temperatura.

Tabla 1.

Mecanismo de determinación sexual	Especies de tortugas (Familia, genero, o especie)
TSD- Patrón I	Bataguridae (algunas) Carettochelyidae, Cheloniidae, Dermochelyidae, Emydidae, Testudinidae
TSD- Patrón II	Pelomedusidae, Kinosternidae, <i>Macrolemys temminckii</i> , Bataguridae (algunas)
GSD	<i>Platemys</i> , <i>Staurotypus</i> , <i>Siebenrockiella</i> , <i>Kachuga smithii</i> , Chelidae

Tabla Adaptada de **Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles.**

En cualquier caso, la TSD se puede englobar en un fenómeno más global, la ESD, la determinación ambiental del sexo. En algunas tortugas, no sólo la temperatura determina el sexo, sino que la humedad también influye. Se han realizado experimentos en los cuales, manteniendo a la misma temperatura inferior a la pivotal unos huevos de *Chrisemys picta*, pero con diferente nivel de humedad, los

huevos incubados con humedad alta han dado lugar sólo a machos, como cabía esperar, y los que han soportado condiciones más secas, un número elevado e inesperado de hembras.

La temperatura pivotal de las especies del patrón Ia varía de especie a especie. Se dan valores desde los 27,5°C de *Chrisemys picta* a los 32,5-34°C de la *Podocnemys expansa*. La *Gopherus polyphemus* oscila entre los 29 y 32°C y la *Testudo hermanni* sobre los 31,5 °C. Para la mayoría de emídidos, la temperatura pivotal oscila entre los 28 y 30°C.

En el caso de los animales que presentan patrón II, el límite inferior está casi siempre por debajo de 27°C. Se alcanza por debajo de los 22°C en poblaciones norteñas de *Chelydra serpentina*, pero pueden ser tan altas como los 29°C de la *Pelomedusa subrufa*. Los rangos superiores se sitúan entre los 25,5°C de la *Kinosternon leucostomum* y los 32,1 de la *Pelomedusa subrufa*.



Chelydra serpentina (Aída Rodríguez).

La temperatura pivotal parece tener una gran influencia sobre el lugar que elige la tortuga para poner sus huevos. Por ese mismo razonamiento, es lógico pensar que las tortugas han evolucionado para tener una temperatura pivotal acorde a los lugares disponibles para hacer las puestas. La *Podocnemys expansa*, que tiene la mayor temperatura pivotal conocida, elige lugares situados en los bancos de arena de los ríos, donde la temperatura puede ser realmente elevada. Esto hace mayores las opciones de las crías de desarrollarse muy rápido para poder escapar de las crecidas, que anegarían el nido, y no cabe duda de que una temperatura pivotal tan alta se debe a esta adaptación especial al medio.

Otro factor a tener en cuenta es la posición del huevo en el nido. Los animales que se hayan desarrollado en la parte superior, y por tanto más cálida, del nido, serán en su mayoría hembras. Los que hayan nacido de un huevo incubado en la parte inferior, serán machos.

Se dan casos curiosos, como la influencia en la temperatura general de los nidos por los propios huevos, lo que se ha dado en llamar "calentamiento metabólico". Es un fenómeno observado en nidos de *Chelonia Mydas*, donde este calor es capaz de elevar la temperatura en 2,5 °C y dar lugar a un 30% de hembras más. (Broderick, Godley, & Hays, 2001).

Otro fenómeno que se observa es que, en especies como *Terrapene carolina*, que tienen un amplísimo rango de distribución, desde Canadá a México, y por tanto medran en un intervalo de temperaturas extenso, no se da un fenómeno de desviación del ratio sexual, cuando todo haría pensar que en el sur deberían existir más hembras por el mero hecho de hacer más calor. (Bull, Vogt, & McCoy, 1982). De hecho, estudios realizados en poblaciones de *Crysemys picta* han demostrado que el calentamiento que está sufriendo la tierra, de momento no ha provocado cambios en los ratios sexuales de los nidos (Janzen 1994), pero hay un peligro real de que esto no sea así para siempre. Una de las teorías para explicar el fin de los dinosaurios es el rápido cambio climático que se produjo en cierta época, y que los dinosaurios usaban TSD. (Standora & Spotila, 1985).

No sabemos exactamente cómo trabaja la TSD. No tenemos una idea real del proceso molecular que tiene lugar (Standora and Spotila, 1985). Sólo parece ser importante la temperatura a la que esté sometido el huevo durante el primer sexto de la incubación. (Janzen, 1991). No tiene incluso por qué ser constante. Se debe mantener por encima de la temperatura pivotal más de 4 horas como mínimo para obtener hembras según estudios realizados. Además, se ha demostrado que en la naturaleza suelen haber nidos que producen un único tipo de crías, machos o hembras. Las hembras intentan que no se produzcan mezclas de sexos en los nidos, sino se preocupan de buscar lugares donde hacer nidos "de machos" y nidos "de hembras".

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el porqué de la TSD, entre ellos la influencia del antígeno **H-Y** en las gónadas, el cambio de sexo de machos a hembras (o a la inversa), por acción de la temperatura, y el control influenciado por temperatura de secuencias de ADN determinantes del sexo. (Standora & Spotila, 1985). La hipótesis del antígeno H-Y fue uno de los primeros mecanismos propuestos para la TSD. Se creyó que el antígeno H-Y era determinante de la diferenciación sexual, tras ser detectado en el sexo heterogamético de un número de animales heterogaméticos, en su mayoría homeotermos. Sin embargo, en estudios posteriores se encontraron inconsistencias entre especies con TSD cuando eran probadas para TSD. En cualquier caso, antígeno H-Y se ha revelado como el factor determinante del sexo en los mamíferos (Janzen, 1991). Más recientemente los investigadores se han centrado en el papel que representan los esteroides en la diferenciación de las gónadas y particularmente, los papeles de la aromatasa y los estrógenos (Pieau et al, 1995).

La regulación por hormonas esteroides se han revelado como un prometedor mecanismo para la TSD. La intervención de la aromatasa se ha apuntado como un factor crítico en la conversión de andrógenos, como la testosterona, en estrógenos (Janzen, 1991; Pieau et al, 1995). Cuando se colocan estrógenos sobre la cáscara del huevo, o se inyectan en él, en especies que presentan TSD, se da un proceso de feminización en la mayoría de los casos, incluso a temperaturas productoras de machos. (Janzen, 1991; Pieau et al, 1995). Por otro lado, la aplicación de inhibidores de la aromatasa sobre huevos de *Emys orbicularis* dio como resultado la masculinización de los embriones. El nivel de estrógenos influye directamente en el proceso de diferenciación de las gónadas en especies con TSD. Un elevado nivel se relaciona con el desarrollo de los ovarios y un nivel bajo, con el de los testículos. Parece ser que el papel de los andrógenos es más discreto (Pieau et al, 1995). Para

que este mecanismo sea correcto, debe haber un mecanismo para la regulación termoselectiva de la transcripción del gen de la aromatasa. El método más plausible es que la temperatura afecte la transcripción del gen de la aromatasa a través de otro factor como el AMP cíclico (Pieau et al, 1995).

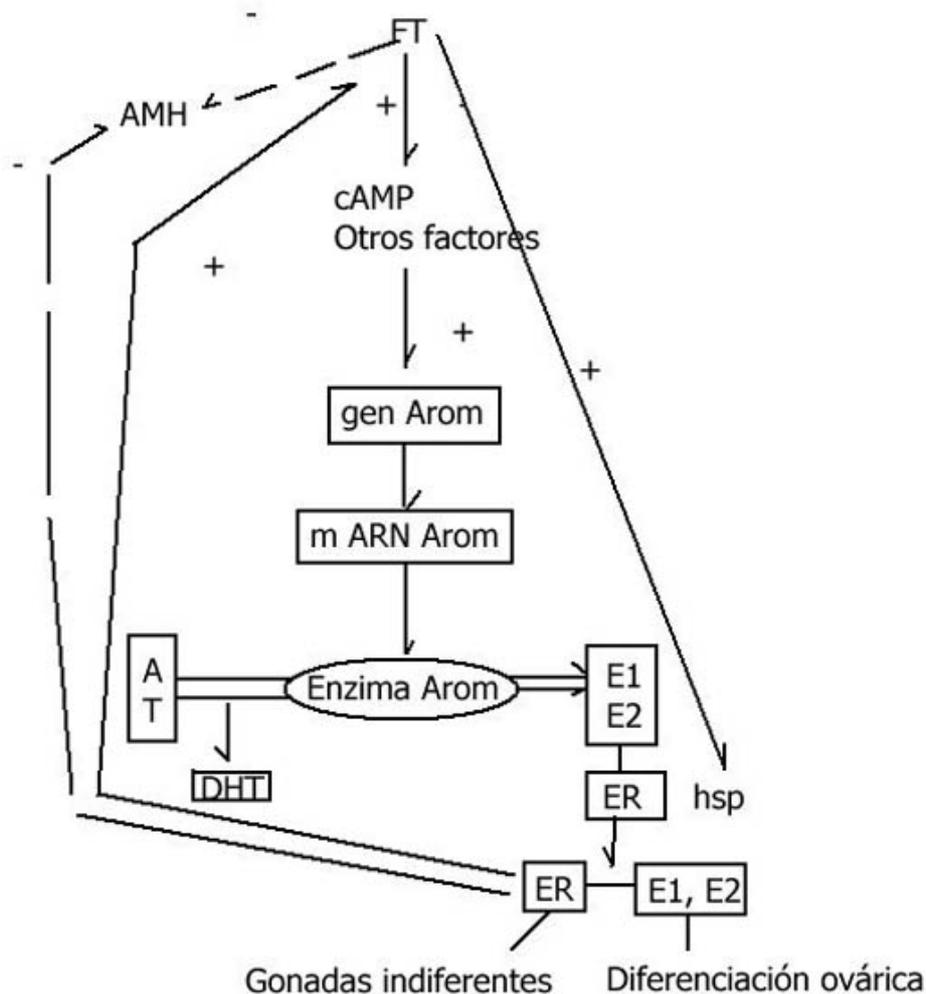


Gráfico 2. Posible mecanismo molecular para TSD a temperatura de producción de hembras. Adaptada de Pieau, C., M. Girondot, G. Desvages, M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, and P. Zaborski. "Temperature Variation and Sex Determination in Reptilia. *Experimental Medicine* 13 (1995): 516-523. *Ecologie Systematique Evolution*.

Gráfico adaptado de **Pieau et al, (1995)** y Kyle Kinsell, ***Mechanisms of TSD, Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles.***

- FT= Temperatura de producción de hembras
- AMH= hormona anti-Mülleriana
- A= androstenediona
- E1= estrona
- E2= estradiol-17β
- ER= receptor de estrógeno
- T= testosterona
- DHT= dihidrotestosterona
- hsp= proteína dependiente del calor

La TSD parece un modo de dejar a la naturaleza decidir los ratios sexuales de las poblaciones de tortugas, pero hemos visto que existe una elección evolutiva para no permitir que esto ocurra, la GSD de la que antes hablábamos. Alguna ventaja debe tener la TSD para ser la más generalizada. Sin embargo, la ciencia no es capaz de dar con esa ventaja con exactitud. Sin embargo, se manejan varias hipótesis:

La temperatura no solo influye en el sexo del embrión, sino que también lo hace en su crecimiento. Se sabe que el sexo que más rápido crece también se hace más grande. Ewert y Nelson han certificado que, en la mayoría de tortugas de patrón Ia, las hembras suelen ser más grandes que los machos. Debe haber alguna clase de ventaja en que los animales que tienen que ser más grandes en su edad adulta nazcan de huevos incubados a una temperatura mayor. Una hembra cuanto más grande sea, más huevos pondrá, asegurando así el futuro de la especie. Sin embargo, esta explicación no es buena para *Gopherus agassizii* o para *Malacochersus tornieri*. Los machos crecen con mayor rapidez, siendo incubados a menor temperatura.



Malacochersus tornieri. El crecimiento de los machos es más rápido que el de las hembras, pese a ser incubado a menor temperatura (Antonio Alcalá-Zamora).

Otra explicación posible apunta a los ratios sexuales. Como antes decíamos, con GSD los machos y las hembras deben aparecer más o menos en el mismo número. Sin embargo, TSD tiende a producir más hembras. Un macho puede fertilizar a muchas hembras, con lo que un número elevado de éstos no es justificable. En el caso de la *Pelomedusa subrufa*, de patrón II, el rango de temperaturas donde se producen machos es de tan sólo 3,1 °C.

Por otro lado, se argumenta que tortugas incubadas a diferentes temperaturas tienen mayores posibilidades de sobrevivir a sus depredadores. Un estudio llevado a cabo con neonatos de *Chelydra serpentina* demostró que la descendencia

obtenida a una temperatura intermedia, la que produce mezcla de machos y hembras, tenía más propensión a correr. Las crías incubadas a una temperatura muy superior o inferior a la pivotal, tendían a quedarse quietas. Por tanto, los neonatos incubados a una temperatura cercana a la pivotal tenían mayores posibilidades de ser devorados antes de un año. (Janzen, 1995). Este estudio se ha realizado con una única especie y sería interesante abundar ello.

Todo lo que aquí se expone demuestra lo poco que sabemos en realidad sobre la TSD y no pretende más que exponer, al nivel de un simple aficionado, lo que ocurre en realidad, y las implicaciones que tiene, durante el proceso de incubación de los huevos de nuestras tortugas. Tenemos que dejar a investigadores como Pieau, Janzen, Girondot, Valenzuela y otros como ellos que den con los mecanismos y las razones del por qué de la TSD.

BIBLIOGRAFÍA

Broderick, Annette C., Brendan J. Godley, and Graeme C. Hays. "Metabolic Heating and the Prediction of Sex Ratios for Green Turtles (*Chelonia mydas*)." *Physiological and Biochemical Zoology* 74 (2001): 161-170.

Bull, J. J. "Sex Determination in Reptiles." *The Quarterly Review of Biology* 55 (1980): 3-21.

Bull, J. J. "Sex Ratio and Nest Temperature in Turtles: Comparing Field and Laboratory Data." *Ecology* 66 (1985): 1115-1122.

Bull, J. J., R. C. Vogt, and C. J. McCoy. "Sex Determining Temperatures in Turtles: A Geographic Comparison." *Evolution* 36 (1982): 326-332.

Ewert, Michael A., Ronnie E. Hatcher, and J. Michael Goode. "Sex Determination and Ontology in *Malacochersus tornieri*, the Pancake Tortoise." *Journal of Herpetology* 38 (2004): 291-295.

Ezaz, T., Valenzuela, N. "An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination". *Chromosome Research* (2006) 14:139-150.

Girondot, Marc, Helene Fouillet, and Claude Pieau. "Feminizing Turtle Embryos as a Conservation Tool." *Conservation Biology* 12 (1998): 353-362.

Janzen, F. J. "Climate Change and Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994): 7487-7490.

Janzen, Frederic J. "Experimental Evidence for the Evolutionary Significance of Temperature-Dependent Sex Determination." *Evolution* 49 (1995): 864-873.

Janzen, Frederic J. "Vegetational Cover Predicts the Sex Ratio of Hatchling Turtles in Natural Nests." *Ecology* 75 (1994): 1593-1599.

Janzen, F. J. and G. L. Paukstis. "A Preliminary Test of the Adaptive Significance of Environmental Sex Determination in Reptiles." *Evolution* 45 (1991): 435-440.

Janzen, F. J. and G. L. Paukstis. "Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Designs." *The Quarterly Review of Biology* 66 (1991): 149-179.

Janzen, F.J. & J.G. Krenz. "Which was first, TSD or GSD?." *Temperature dependent sex determination in vertebrates* (N. Valenzuela & V.A. Lance, eds) Smithsonian Institution, 2004.

Kinsell, k. "Temperature-Dependent Sex determination in Turtles". Davidson University, 2003.

Madge, David. "Temperature and Sex Determination in Reptiles With Reference to Chelonians." *Testudo* 2.3 (1985): 18 pars.

Orenstein, Ronald. *Turtles, Tortoises & Terrapins, Survivors in Armor*. Firefly Books, Canada, 2001.

Pieau, C., M. Girondot, G. Desvages, M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, and P. Zaborski. "Temperature Variation and Sex Determination in Reptilia". *Experimental Medecine* 13 (1995): 516-523. *Ecologie Systematique Evolution*.

Shine, R. "Letters to TREE". *Tree*.14-9 (1999) p.360.

Spencer, R.J., Thompson, M.B. "The significance of predion in nest site selection of turtles: an experimental consideration of macro- and microhabitat preferences". *Oikos* 102 (2003): 592-600.

Standora, E. A. and J.R. Spotila. "Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles." *Copeia* 3 (1985): 711-722.

"Temperature-Dependent Sex Determination." *Turtles of the World*. 2003. *Expert Center for Taxonomic Identification*.

Valenzuela, Nicole, Dean C. Adams, and Frederic J. Janzen. "Pattern Does Not Equal Process: Exactly When is Sex Environmentally Determined?" *The American Naturalist* 161.4 (2003).