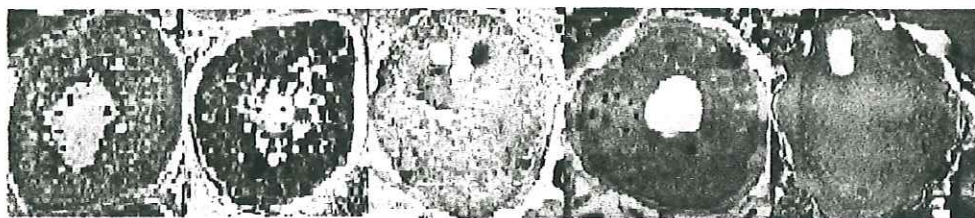


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**ESTANDARIZACION DE UNA TECNICA PARA LA ESTIMACION
DE LA MADUREZ SEXUAL EN HEMBRAS DEL LENGUADO DE
CALIFORNIA *Paralichthys californicus* (AYRES)
(PISCES: PARALICHTHYDAE)**



TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANÓLOGO

PRESENTA

CECILIA CHAPA BALCORTA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, DICIEMBRE DE 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA MADUREZ
SEXUAL EN HEMBRAS DEL LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus*
(AYRES) (PISCES: PARALICHTHYDAE)

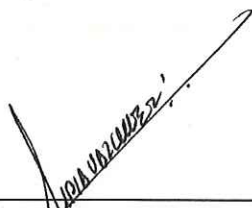
TESIS DE LICENCIATURA
QUE PRESENTA

CECILIA CHAPA BALCORTA

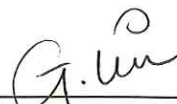
APROBADA POR:



M. en C. BENJAMÍN BARÓN SEVILLA
Director de Tesis



M. en C. OLIVIA M. TAPIA VÁZQUEZ
Sinodal



OC. GUILLERMINA CHI BARRAGÁN
Sinodal

RESUMEN

El lenguado de California *Paralichthys californicus* (Ayres) es un pez de importancia comercial que tiene gran demanda internacional por la textura y sabor de su carne. Durante los últimos años, su abundancia ha fluctuado y tiende a disminuir. Se distribuye desde el río Quillayute en la Columbia Británica, Canadá hasta Bahía Magdalena Baja California, México. Al igual que otras especies de peces, el lenguado de California no se reproduce en cautiverio aún cuando los ovocitos llegan a su madurez, posiblemente por la ausencia o modificación de algún factor ambiental que actúa como una señal para los organismos, entonces se inhibe la maduración final, la liberación de feromonas, el cortejo y consecuentemente el desove. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una técnica de muestreo de ovocitos intraováricos para estimar la madurez sexual de las hembras de *Paralichthys californicus*, para ello se recolectaron 66 hembras y se calculó el índice gonadosomático (IG) cuyo promedio fue 2.861 con una desviación estándar de 2.8. Se realizó una descripción macroscópica y microscópica del ovario y se efectuaron muestreos intraováricos de ovocitos. A diferencia de otros grupos de teleósteos, en el lenguado de California el ovario se proyecta en dirección posterior a partir del poro genital y el conducto ovárico se encuentra en diferentes posiciones a lo largo de la gónada. En los ovarios inmaduros solo existieron ovocitos menores a 408 μm y se observó un gradiente de madurez que se incrementa de la periferia hacia el conducto ovárico. Existe una mayor cantidad de ovocitos maduros en la parte anterior de las gónadas maduras y transversalmente se encuentran repartidos en forma aleatoria. Las frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros observados en las distintas secciones del ovario tienen una distribución bimodal que coincidió con la distribución de los ovocitos extraídos con el catéter y que en forma conjunta con los resultados del análisis histológico se estableció el criterio para clasificar a las hembras como maduras o inmaduras. Los resultados de este trabajo indican que cuando se analiza el estado de madurez sexual de una hembra de *P. californicus* una proporción de ovocitos maduros ($>500 \mu\text{m}$) de 30% o mayor indican que el organismo está listo para ser inducido al desove mediante una estimulación hormonal.

DEDICATORIA

A Dios, que me dió la vida y un sueño por alcanzar.

A mis papás Rosa Elena Balcorta y Eleazar Chapa Ramos, son los cimientos de mi vida, y mi fuerza interior. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí, me han dado su cariño y apoyo en todos los sentidos, es mi turno de forjar el camino.

A mis hermanas Gabriela y Wendy Celeste, el chiste es encontrar tu sueño de ahí en adelante solo hay que seguirlo, el camino no es fácil y los golpes duelen bastante, pero vale la pena.

Ragi, eres mi presente y mi futuro. Llegaste a mi vida para llenarla de amor, felicidad y plenitud. Gracias por ayudarme a encontrarme a mí misma.

Ni atrás, ni adelante.... juntos de la mano por siempre.

Mar... por ti estoy aquí, eres mi motivo y mi razón.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis M. en C. Benjamín Barón Sevilla por todo el apoyo, la confianza y la paciencia que me brindó para poder salir adelante, mejor director no puede existir.

A mis sinodales, la M. en C. Olivia M. Tapia-Vázquez y a la Oc. Guillermina Chi Barragán gracias por su comprensión y apoyo y una disculpa por todas las prisas.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) ya que todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura.

Al Dr. Fernando Bukle por todo su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Al personal del laboratorio de Patología de moluscos bivalvos dirigido por el Dr. Jorge Cáceres por que siempre que necesite su ayuda allí estuvieron. Quiero agradecer especialmente a Rebeca Vázquez pues fue una ayuda fundamental en la elaboración de los cortes histológicos de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California que fue mi casa por 5 años y gracias a ella logré alcanzar mis metas y concebir otras nuevas.

A todas las personas que laboran en el Mercado de Mariscos (Mercado Negro) de esta ciudad por donar las muestras utilizadas en el presente estudio. A las personas que trabajan en la pesca deportiva gracias por los intentos para encontrar organismos vivos.

A mi familia, gracias por todo el cariño y por siempre creer en mi y estar conmigo en las buenas y las malas.

A Surgencia, que fue una parte importante en mi vida y en mi formación profesional, gracias por todo equipo!

Por todo su apoyo y cariño a todas las personas que conforman las Joyerías de Los Castillo: Señora Margarita Mcfarland, Margarita Sánchez, Dr. Mario Sánchez, a la señora Katy, Claudia, Angélica, Ramona, Ángel, Keyla, Mary, Ariana y Brenda.

A Tania, eres la mejor amiga que he tenido en toda mi vida.

A Alcira Portillo, Tania Camiro, Claudia Moreno, Edgar Saldaña, Steephen, Iris, Paty Cambero, Jessy Montañó, Dania, Cecy y Arturo Cerón, Canek Villanueva, Betty Guatanave, Corpus Zetina, Miguel Torres, Graciela Guerra, Ana María Iñiguez, Jesús Villavicencio, Darla, Jessy, Gisela Escalante y mis compañeros de generación, todo el personal y estudiantes del Departamento de Acuicultura, los chicos del almacén y todas aquellas personas que me brindaron su cariño, amistad y apoyo, siempre estarán en mi recuerdo.

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Muestreo de las hembras del lenguado	8
Conservación de los ovocitos	9
Descripción macroscópica del ovario	10
Descripción microscópica del ovario	11
RESULTADOS	20
Efecto de la solución conservadora en el diámetro de los ovocitos	22
Descripción macroscópica del ovario	24
Descripción microscópica del ovario	28
Análisis de frecuencias de los ovocitos	30
Descripción de la distribución transversal de los ovocitos por grados de desarrollo	35
Análisis de ovocitos intraováricos	43
Escala propuesta para la interpretación del análisis de ovocitos intraováricos	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	56
LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
I	Comparación del índice gonadosomático de <i>Paralichthys californicus</i> calculado con tres métodos contrastados con una prueba de Mann-Whitney.	21
II	Pruebas de correlación de Spearman para las distintas medidas de las gónadas de <i>Paralichthys californicus</i> .	22
III	Efecto de la solución de Formol al 1% y tres distintas concentraciones de NaCl sobre el diámetro de los ovocitos (μm) de <i>Paralichthys californicus</i> . Prueba de Wilcoxon	23
IV	Efecto de la solución de Formol al 1% y dos distintas concentraciones de NaCl sobre el diámetro de los ovocitos (μm) de <i>Paralichthys californicus</i> . Prueba de Wilcoxon	23
V	Valores de peso seco unitario promedio de los ovocitos de <i>P. californicus</i> por intervalos de tallas calculados a partir de la regresión lineal.	28
VI	Pruebas de independencia resultantes de la tabla de contingencia utilizada en la comparación de las frecuencias de ovocitos de tres ovarios maduros de <i>Paralichthys californicus</i> . El color azul indica la hipótesis que fue aceptada.	31
VII	Pruebas de independencia resultantes de la tabla de contingencia utilizada en la comparación de las frecuencias ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> entre un ovario maduro más avanzado y uno inmaduro. El color azul indica la hipótesis que fue aceptada.	32
VIII	Escala propuesta para la interpretación de los análisis de ovocitos intraováricos de <i>Paralichthys californicus</i> .	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Longitudes medidas en cada gónada de <i>Paralichthys californicus</i> . LTG, longitud total de la gónada; PPI, longitud de la rama posterior izquierda; PPD, Longitud de la rama posterior derecha; HPS, altura máxima del ovario.	10
2	Esquema de los tamices utilizados para separar los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> en diferentes intervalos de diámetro. 1, cople de PVC de 8.89 cm (3.5"); 2, tubo de PVC de 7.62 cm (3"); 3, malla para separar los ovocitos (132 μ m - 761 μ m).	12
3	A. Tamices ensamblados verticalmente de mayor (parte superior) a menor apertura de malla (parte inferior). B. Tubo en el que se introdujo la columna de tamices para realizar la separación.	13
4	Cámara utilizada para el conteo de los ovocitos. La cámara está formada por una sección de jeringa de polietileno adherida a un portaobjetos. P, portaobjetos utilizado para tapar la cámara con ovocitos y llena con la solución conservadora.	13
5	Secciones muestreadas para el estudio de la distribución de las frecuencias de ovocitos por diámetro en ovarios de <i>Paralichthys californicus</i> .	15
6	Secciones donde se obtuvieron los cortes histológicos en el ovario inmaduro de <i>Paralichthys californicus</i> .	17
7	Recolección de muestras intraováricas de <i>Paralichthys californicus</i> . A. máxima profundidad a la que se puede introducir el catéter (señalada con una flecha). B. Detalle de la región anal, con el catéter introducido en el poro genital. Ape, Aleta pectoral; Ap, Aleta pélvica; Gn, poro genital; C, Catéter.	19
8	Índice gonadosomático de las hembras de <i>Paralichthys californicus</i> calculado restando el equivalente de la masa que representan las vísceras.	21
9	Relación de las diferentes medidas de la longitud del ovario de <i>Paralichthys californicus</i> con respecto a la longitud total de la gónada (LTG). ■ Rama posterior derecha (PPD); ● Altura máxima del ovario (HPS); ▲ Rama posterior izquierda (PPI). Las líneas sólidas y las ecuaciones indican la regresión lineal de cada medida según su color.	22
10	Disección de la cavidad abdominal de <i>Paralichthys californicus</i> . A. Ubicación del ovario. B. Remoción de la rama izquierda para evidenciar el acomodo del ovario con respecto a la osamenta. Aa, aleta anal; E, estómago; Eh, espinas hemales; Ei, espina interhemal; G, ovario; Gp, poro genital; Hp, hepatopáncreas; Op, opérculo; R, riñón; Rd, rama derecha; Ri, rama izquierda.	26

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
11	Ubicación del conducto ovárico en cada rama del ovario de <i>Paralichthys californicus</i> . B1, sección del conducto que se dirige hacia las prominencias; B2, sección donde el conducto ovárico se ubica en el extremo exterior de cada rama; B3, Sección donde el conducto ovárico se observa en el centro del ovario.	27
12	Diagrama de los cortes transversales del ovario de <i>Paralichthys californicus</i> en donde se aprecia la posición del conducto ovárico. A, conducto ovárico en la región que va desde el extremo anterior del ovario hasta después de las prominencias; B, conducto ovárico del final de las prominencias al extremo posterior del ovario.	27
13	Relación entre el diámetro y la raíz cuadrada del peso seco unitario (PSU) de los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> . • Observaciones; ...Intervalo de confianza; ...Intervalo de predicción.	29
14	Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> rama izquierda (IG = 4.48). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.	32
15	Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> rama derecha (IG=4.48). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.	33
16	Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> (IG=6.127). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.	33
17	Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros de la sección I de una gónada madura de <i>Paralichthys californicus</i> (IG=6.127).	34
18	Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de una gónada inmadura de <i>Paralichthys californicus</i> . (IG=1.686) La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.	34
19	Corte transversal de una gónada inmadura de <i>Paralichthys californicus</i> , Sección I (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovarico superficial (compuesto de tejido muscular y conectivo); PE, tejido germinativo; CO, conducto ovárico; Gc, gradiente de coloración.	36
20	Lamelas que conforman el ovario inmaduro de <i>Paralichthys californicus</i> . Sección II. (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina; PE, tejido germinativo; EE, tejido ovárico superficial.	36

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
21	Corte transversal de un ovario inmaduro de <i>Paralichthys californicus</i> . Sección III. (200x) tinción: hematoxilina-eosina; NV, ovocito no vitelado; PV, ovocito parcialmente vitelado; IS, vaso sanguíneo.	38
22	Corte transversal de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> . Sección III (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovárico superficial; NV, ovocitos no vitelados; V, ovocito vitelado; CO, Conducto ovárico.	38
23	Corte transversal de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> . Sección II. (50x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovárico superficial; NV, ovocitos no vitelados; PV, ovocito parcialmente vitelado; V, ovocito vitelado; GA, gota de aceite; N, núcleo; n, nucléolos.	40
24	Ovocito de <i>Paralichthys californicus</i> en la etapa de maduración final. Sección III. (200x) tinción: hematoxilina-eosina; GA, gota de aceite; Pvi, plaqueta vitelina; N, núcleo; n, nucléolos; ZR, zona radiata; FO, folículo preovulatorio.	40
25	Óvulos de <i>Paralichthys californicus</i> colectados en el conducto ovárico cerca del poro genital, deformados en su esfericidad por efecto del proceso histológico. (200x) tinción: hematoxilina-eosina. A, gota de Aceite; Vit, vitelo; CO, corion.	41
26	Corte transversal de un ovario maduro de <i>Paralichthys californicus</i> con un folículo postovulatorio. Sección V. (200x) tinción: hematoxilina-eosina. Fpo, folículo postovulatorio; NV, ovocito no vitelado; N, núcleo; n, nucléolo.	41
27	Escala de maduración y crecimiento de los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> .	42
28	Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> extraídos mediante muestreo intraovárico a 10.7 cm de profundidad. I error estándar.	44
29	Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> extraídos mediante muestreo intraovárico a 8 cm de profundidad. I error estándar.	44
30	Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de <i>Paralichthys californicus</i> extraídos mediante muestreo intraovárico a 4 cm de profundidad. I error estándar.	45

INTRODUCCIÓN

El lenguado de California *Paralichthys californicus* (Ayres) es un pez comercial que tiene gran demanda a nivel internacional por la textura y sabor de su carne. Sin embargo, durante los últimos años, la abundancia de este recurso ha fluctuado y tiende a disminuir por causa de la sobrepesca (Barsky, 1990). García-Franco *et al.* (1998) observaron en el estado de Baja California un decremento aproximado del 81% en la pesquería multiespecífica del lenguado entre 1991 y 1994. Esta tendencia poblacional, aumenta la necesidad de conocer la biología de estas especies, para desarrollar los métodos adecuados de cultivo ya sea con fines de repoblamiento o para la producción comercial que satisfaga las demandas sin que el recurso se vea en peligro de extinción y que con el tiempo sustituya los productos provenientes de la pesca.

P. californicus pertenece al orden Pleuronectiformes (Ahlstrom y Moser, 1975) y a la familia Paralichthyidae. Se distribuye desde el río Quillayute en la Columbia Británica, Canadá hasta Bahía Magdalena Baja California, México (Miller y Lea, 1972). Es un pez bentónico que habita en fondos arenosos y se distribuye verticalmente desde la superficie hasta profundidades de 91.5 m (Miller y Lea, 1972). Su cuerpo es aplanado y tiene los dos ojos en uno de sus lados (lado izquierdo en el 60% de los casos). Su color es café verdoso o negro con puntos oscuros en el lado superior del cuerpo (el que tiene los ojos), la región ventral es blanca y lisa. Las características principales que lo diferencian de otros lenguados son su boca larga, un maxilar que se extiende posteriormente más allá del ojo; su línea lateral que se extiende longitudinalmente a todo el cuerpo, formando un arco sobre la región de la aleta pectoral y posee menos de 77 radios en la aleta dorsal. *P. californicus* llega a medir hasta 1.5 m de longitud total (LT) y a pesar 32 Kg (Miller y Lea, 1972).

La alimentación de los adultos de *P. californicus* es principalmente a base de peces y calamar. Caddel *et al.* (1990) realizaron experimentos con esta especie en California E.U.A. y mencionan que su temporada de reproducción es de Abril a Julio cuando la fotofase aumenta.

Carrillo-Cortés (1994) realizó muestreos de *P. californicus* en la Bahía de Todos Santos, B.C. y encontró una proporción sexual hembra : macho de 1.54:1; Además encontró la mayor proporción de hembras durante Abril de 1992 y Marzo de 1993. También registró desoves durante Abril y Mayo por medio de muestreos del ictioplancton.

En la mayoría de las especies de peces, el desarrollo de los ovocitos comprende tres etapas: de proliferación, crecimiento y maduración. En la etapa de proliferación las células germinales se dividen mitóticamente ($2n$) produciendo gran número de ovocitos. En la etapa de crecimiento comienza la división meiótica, después de la profase I el proceso se detiene y comienza la vitelogénesis y el ovocito acumula sustancias nutritivas (vitelo). La molécula precursora de las reservas vitelinas es la vitelogenina (VTG), una glucolipofosfoproteína secretada por el hepatopáncreas; los hepatocitos son estimulados por los estrógenos secretados por el folículo ovárico en respuesta a las hormonas secretadas por la glándula pituitaria (Jobling, 1995). La VTG es transportada por la sangre hacia el ovario y por medio de pinocitosis entra a los ovocitos en desarrollo (estimulados por las hormonas gonadotrópicas, tiroideas y la insulina), ya dentro de los ovocitos es transformada y depositada como vitelo (Goetz, 1983; Jobling, 1995).

En la etapa de maduración, el núcleo migra a la periferia del ovocito y se reanuda el proceso meiótico, después la membrana nuclear se rompe y los cromosomas se mezclan con el citoplasma. (Balinsky, 1978; Evans, 1993; Goetz, 1983). Durante estos procesos, las gotas de aceite se unen en una sola, las plaquetas vitelinas coalescen, esto provoca que el ovocito tenga una apariencia translúcida; entonces expulsa el primer cuerpo polar y comienza a hidratarse (Evans, 1993; Goetz, 1983; Tucker, 1998).

La ovulación y el desove ocurren como respuesta a los estímulos externos, como el cortejo y la formación de parejas. Las feromonas liberadas por la hembra juegan un papel importante en este proceso, ya que estimulan la espermatogénesis en los machos y el comportamiento de cortejo. Éste último, a su vez, estimula a las hembras para que ocurra el desove y la fertilización de los ovocitos. (Jobling 1995).

El proceso de desove comienza cuando el folículo se separa del ovocito mediante la remoción de las microvellosidades del folículo en la zona radiata del ovocito. El folículo comienza a ser digerido por enzimas proteolíticas en una pequeña región para facilitar la salida del óvulo. Después el folículo libera prostaglandinas, estimulado por el efecto de las gonadotropinas producidas en la glándula pituitaria, entonces, el folículo se contrae por efecto de las prostaglandinas y el óvulo es liberado (Goetz, 1983; Tucker, 1998).

En los óvulos de los peces, existe una estructura celular en forma de canal llamada micrópilo, que es el único acceso hacia el interior del óvulo, su diámetro está diseñado para que solo un espermatozoide pueda cruzarlo. El óvulo fecundado reacciona a la entrada del espermatozoide, el micrópilo se cierra y la permeabilidad de la membrana del huevo cambia para proteger al embrión contra patógenos y lesiones. El óvulo fecundado termina su proceso meiótico y expulsa el segundo cuerpo polar para continuar con su desarrollo (Evans, 1993).

El lenguado de California es un desovador parcial, es decir, desova más de una vez durante la época de reproducción. En este tipo de reproducción el ovario se caracteriza por la presencia de ovocitos en diferentes estados de desarrollo (Jobling, 1995; Caddel *et al.*, 1990).

Algunas especies de peces no se reproducen en cautiverio aún cuando los ovocitos llegan a su madurez, posiblemente por la ausencia o modificación de algún factor ambiental que actúa como una señal para los organismos, entonces se inhibe la maduración final, la liberación de feromonas, el cortejo y consecuentemente el desove (Jobling, 1995).

Para *P. californicus*, el decremento de la fotofase y de la temperatura del agua actúan como factores exógenos que estimulan las primeras etapas de la ovogénesis, mientras que el incremento de la fotofase induce la maduración final y el desove (Caddel *et al.*, 1990; Jobling, 1995).

El lenguado de California no se reproduce espontáneamente en cautiverio a menos que se encuentre en estanques de gran volumen de agua. Caddel *et al.* (1990) experimentaron la reproducción en 1986 con hembras de *P. californicus*, colocándolas en un estanque de 20000 l a la intemperie y obtuvieron un promedio de 13 desoves por hembra con intervalos aproximados de 7 días.

Caddel *et al.* (1990), también lograron reproducir a *P. californicus* en estanques de menor volumen, combinando la estimulación de hormonas exógenas con una fotofase de aproximadamente 10.5 h y una temperatura máxima de 15 °C, características de la época de reproducción. Sin embargo, la aplicación de hormonas para inducir el desove de *P. californicus* en estanques de 3000 l, tuvo un éxito limitado, ya que la viabilidad de los ovocitos fue baja y en algunos existieron anormalidades.

La talla, estado nutricional y el manejo de los reproductores afectan la calidad de los ovocitos. Sin embargo, aún cuando estas condiciones sean las óptimas, si el momento del desove no es el adecuado, porque el organismo no esté maduro sexualmente, o si los ovocitos han sobremadurado, los gametos serán de mala calidad y por consecuencia tendrán un bajo índice de fecundación (Bromage *et al.* 1991). Para resolver este problema es necesario conocer el momento adecuado en que los organismos se encuentran en plena madurez sexual y los ovocitos están listos para ser expulsados de la gónada. La estimación del estadio de la madurez sexual adecuado es un requisito esencial en la selección de los reproductores dedicados a la inducción hormonal de un desove (Álvarez-Lajonchere *et al.*, 1983).

Love y Brooks (1990), realizaron un análisis de la madurez sexual en *P. californicus* muestreados en distintos puntos a lo largo de la costa del Pacífico, desde Ventura hasta Punta Dana, California y encontraron que la primera madurez (la edad o longitud total [LT] en que el 50% de los organismos llegan a la madurez sexual) en las hembras ocurre aproximadamente a los 4 años de edad (47 cm LT) y en los machos al primer año de edad (23 cm LT). En la Bahía de Todos Santos, B.C., Carrillo-Cortés (1994) estudió la talla de primera madurez de *P. californicus* mediante una modificación del índice de madurez sexual de Nikolski (1963), que consiste en la observación del ovario y otras características de la hembra y estimó con mayor precisión el intervalo de longitud en el que ocurre la primera madurez. Además encontró que la mayor proporción de organismos maduros ocurre en los meses de Septiembre, Octubre y Enero en la Bahía Todos Santos y en el estero de Punta Banda B.C. y que la longitud de los machos al llegar a la primera madurez es Mayor a la estimada por Love y Brooks (1990) y que las hembras maduran por primera vez cuando miden de 30 a 32 cm de longitud total. Buenfil-López (1990) estudió la madurez sexual de esta especie en el Estero de Punta Banda, B.C. y con base en la observación del color, tamaño y textura de los ovarios y de la facilidad con la que los gametos femeninos eran expulsados al aplicar presión en la región abdominal, encontró que el periodo de madurez ocurrió en los meses de Noviembre y Enero de 1985 y 1986 respectivamente.

Carrillo-Cortés (1994) utilizó el índice gonadosomático (IG) para estimar el grado de maduración, sin ningún análisis directo de los ovocitos. El índice gonadosomático, expresa la relación entre el tamaño del ovario, el tamaño corporal y grado de madurez de la hembra. Aún cuando el IG es frecuentemente utilizado, éste método es indirecto y no provee ninguna información sobre el estado de desarrollo de los ovocitos, que dé certeza de que los organismos destinados a la reproducción se encuentran listos para la administración de hormonas que induzcan el desove. Es importante enfatizar que éste método, así como el método de observación de las características físicas propuesto por Nikolski (1963) es de tipo invasivo, ya que para observar las características morfológicas del ovario es necesario sacrificar al organismo.

Shehadeh *et al.* (1973) desarrollaron una técnica para estimar la madurez sexual *in vivo* en *Mugil Cephalus*, mediante el análisis microscópico de una muestra extraída del ovario con un catéter. Al comparar la composición de los diámetros de los ovocitos con un análisis previo de distintas secciones el ovario encontraron que éste método es apropiado para dicha especie.

Álvarez-Lajonchere *et al.* (1983) aplicaron el método propuesto por Shehadeh *et al.* (1973) en *Mugil lisa*, *Mugil curema* y *Eugerres brasílianus* y encontraron que el muestreo *in vivo* de ovocitos es una herramienta precisa para estimar el grado de madurez en estas especies.

Si el muestreo *in vivo* es continuo, pueden ocurrir como consecuencia infecciones bacterianas que dañen el ovario, sin embargo estos problemas se pueden evitar, con una profilaxis adecuada de los utensilios de muestreo y estableciendo como máximo un muestreo semanal por un periodo de 60 días (Shehadeh *et al.*, 1973).

El muestreo *in vivo* de ovocitos intraováricos puede ser aplicado a cualquier especie mediante la estandarización del método, que consiste en comparar la proporción de ovocitos maduros con respecto a la proporción de ovocitos en otros estados de desarrollo y contrastarla con las proporciones características de una gónada en el estado de máxima madurez sexual. En este trabajo se pretende estandarizar una técnica para estimar el estado de madurez sexual *in vivo* de las hembras de *Paralichthys californicus*, condición necesaria para mejorar las técnicas de inducción hormonal de la reproducción.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estandarizar la técnica de muestreo de ovocitos intraováricos *in vivo* para la estimación de la madurez sexual en las hembras del lenguado de California *Paralichthys californicus* como auxiliar en la reproducción inducida con hormonas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudiar la estructura macroscópica del ovario.
- Caracterizar la distribución de los ovocitos en el ovario según su grado de madurez.
- Describir microscópicamente los diferentes estados de desarrollo de los ovocitos en relación con su diámetro.
- Definir un procedimiento para estimar la madurez sexual de los organismos, con base en la relación frecuencia-diámetro de los ovocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO DE LAS HEMBRAS DE LENGUADO

Las hembras de *Paralichthys californicus* se obtuvieron de la captura comercial de la costa occidental del estado de Baja California durante los meses de Enero a Julio. Fueron identificadas tomando en cuenta los criterios de Miller y Lea (1972). Se muestrearon 66 hembras a las cuales se les midió la masa corporal y de los ovarios (g), que fueron extraídos y colocados en una bolsa previamente etiquetada. Debido a las políticas de trabajo entre los comerciantes de las pescaderías, en la mayoría de las hembras muestreadas no fue posible obtener el peso sin vísceras. Solamente se contó con esta información para 12 organismos.

Para conocer si existía alguna relación entre la madurez, la masa de los peces y la masa del ovario y como auxiliar para seleccionar los ovarios que se utilizarían en posteriores análisis se calculó el índice gonadosomático (IG) de las 66 muestras en tres formas distintas, utilizando el peso de los 12 organismos sin vísceras de acuerdo con la siguiente relación (Nikolsky, 1963):

$$IG = \left[\frac{Po}{Pv} \right] \times 100$$

Donde:

Po = Peso del ovario.

Pv = peso del organismo sin vísceras.

También se calculó utilizando el peso de los organismos incluyendo las vísceras y restando al peso total de los organismos el porcentaje equivalente al peso promedio de las vísceras calculado para los 12 organismos. Para comparar las estimaciones del IG calculado con los tres métodos, se realizaron pruebas por rangos de Mann-Whitney (Zar, 1984).

Para saber si el crecimiento del ovario es proporcional en todas sus dimensiones, a cada ovario se le midió su longitud total (LTG) y las longitudes de las ramas posteriores (PPD y PPI) así como las longitudes de las dos prominencias anteriores (HPS) (figura 1). Las mediciones se compararon con un análisis de correlación de Spearman mediante el programa de cómputo Sigma Stat versión 2.0

CONSERVACIÓN DE LOS OVOCITOS

El análisis de los diámetros de los ovocitos requiere mucho tiempo, por lo tanto fue necesario preservar las muestras con alguna solución que ejerciera el menor efecto en el diámetro de los gametos. Shehadeh *et al.* (1973) preservaron los ovocitos con una solución de formaldehído al 1% y NaCl al 0.6%. Para conocer el efecto de la solución conservadora en los ovocitos de *P. californicus*, se realizaron ensayos de preservación con tres distintas concentraciones de NaCl (0.2, 0.4 y 0.6%). Se midió el diámetro de 10 ovocitos que se colocaron individualmente en microtubos de centrifuga con la solución preservadora de formaldehído al 1% y su correspondiente concentración de NaCl. Después de siete días se volvió a medir el diámetro de cada ovocito. Para saber si existieron diferencias significativas al conservar los ovocitos en alguna de las soluciones con diferentes concentraciones de sal, se aplicó una prueba por rangos de Wilcoxon con la ayuda del programa de cómputo Sigma Stat versión 2.0. Sólo la solución de formaldehído al 1% y NaCl al 0.2% alteró significativamente el diámetro de los ovocitos (ver resultados). Se repitió el procedimiento utilizando las dos soluciones de formaldehído al 1% con NaCl al 0.4 y 0.6% con un tamaño de muestra de 30 ovocitos.

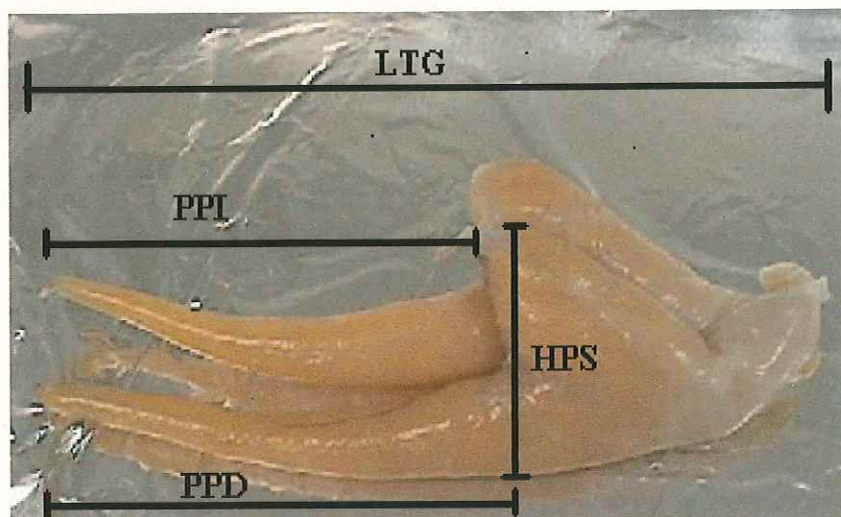


Figura 1. Longitudes medidas en cada gónada de *Paralichthys californicus*. LTG, longitud total de la gónada; PPI, longitud de la rama posterior izquierda; PPD, Longitud de la rama posterior derecha; HPS, altura máxima del ovario.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DEL OVARIO

Tomando en cuenta la observación de los 66 organismos disecados durante el muestreo, en el laboratorio se hizo la descripción macroscópica del ovario considerando la forma, la posición en la cavidad abdominal, color, textura del ovario y los criterios propuestos por Nikolsky (1963) que se refieren al tamaño de la gónada y la facilidad de observar los ovocitos a simple vista. Para ello se disecaron dos hembras que tenían menos de una hora de haber muerto. Primero se removieron los músculos que cubren la cavidad abdominal junto con el peritoneo. Para describir la posición del ovario se movieron y observaron de cerca los tejidos que dan soporte al ovario así como los órganos que lo rodean. Para conocer como se sostenía el ovario en la espina interhemal se removió de su lugar una de las ramas de la gónada. Finalmente para observar cualquier detalle por debajo del ovario, éste se removió de su lugar.

La posición y características generales del ovario se describieron por medio de fotografías y esquemas.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DEL OVARIO

Curva de Calibración

Para conocer la distribución longitudinal de los ovocitos según su diámetro se analizaron muestras de distintas secciones del ovario. Para estimar la cantidad de ovocitos en las muestras, se midió su peso unitario en base seca y para correlacionar el número de ovocitos con su peso en base seca se preparó una curva de calibración. Para ello se separaron los ovocitos por clase de tamaño con el uso de un aparato ultrasónico marca Branson modelo 875 colocado sobre una columna de tamices de 925, 761, 526, 408, 292, 184 y 132 μm de apertura de malla, hechos con tubos de PVC de 7.62 cm (3") y coples de 8.89 cm (3.5") (Figura 2).

Los tamices se ensamblaron secuencialmente formando una columna de mayor apertura de malla en la parte superior a menor apertura en el extremo inferior (Figura 3A), dentro de un tubo de ABS de 12.7 cm (5") sellado en su base por una pequeña lámina de PVC (Figura 3B); La columna se llenó con la solución conservadora (formaldehído 1% y NaCl 0.6%). Para evitar lesiones en los ovocitos más hidratados se utilizó el aparato ultrasónico en poder 1 por un minuto, entonces se removieron los ovocitos de los tamices de 761 y 526 μm .

Para disgregar el resto de los ovocitos y separarlos en los tamices, se repitió el procedimiento anterior hasta alcanzar la magnitud 5 del aparato ultrasónico. Después de remover los ovocitos separados se volvió a encender el aparato ultrasónico en el poder 5 hasta

que los ovocitos más pequeños se separaron del tejido ovárico. Se removieron los ovocitos de los tamices y se contaron en un microscopio estereoscópico.

Para evitar el movimiento de los ovocitos durante el conteo, éste se realizó dentro de una cámara cerrada. La cámara fue construida con una sección de una jeringa de polietileno adherida a un portaobjetos. Dentro de la cámara se colocaron los ovocitos, se llenó con la solución conservadora y se cerró con un portaobjetos eliminando las burbujas (Figura 4).

Los ovocitos que se contaron en cada intervalo de diámetro, fueron separados de la solución fijadora mediante filtración al vacío en papel filtro (Whatman # 1) con poros de aproximadamente 11 μm , se enjuagaron con formiato de amonio 0.03 mg/ml para eliminar las sales de la solución conservadora (Sorokin, 1973).

Los filtros con las muestras se colocaron en una estufa de convección a 45 °C por cinco días dentro de navecillas tapadas con papel aluminio para evitar cualquier contaminación. Este procedimiento se realizó por quintuplicado.



Figura 2. Esquema de los tamices utilizados para separar los ovocitos de *Paralichthys californicus* en diferentes intervalos de diámetro. 1, cople de PVC de 8.89 cm (3.5"); 2, tubo de PVC de 7.62 cm (3"); 3, malla para separar los ovocitos (132 μm - 761 μm).



Figura 3. A. Tamices ensamblados verticalmente de mayor (parte superior) a menor apertura de malla (parte inferior). B. Tubo en el que se introdujo la columna de tamices para realizar la separación.

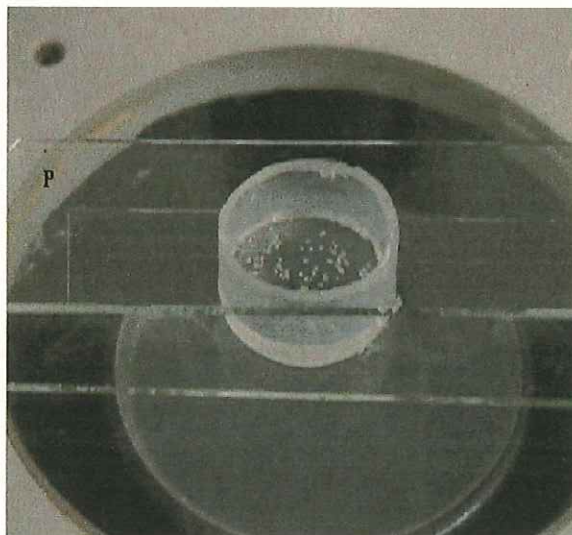


Figura 4. Cámara utilizada para el conteo de los ovocitos. La cámara está formada por una sección de jeringa de polietileno adherida a un portaobjetos. P, portaobjetos utilizado para tapar la cámara con ovocitos y llena con la solución conservadora.

Todos los pesos secos se midieron en una balanza analítica de precisión marca A&D modelo AC115V, con un límite de detección de peso de 0.00001 g. En todos los casos, tanto para la curva de calibración como durante el análisis de la distribución de frecuencias de los ovocitos, se utilizó sílica gel (previamente deshidratada a 200 °C y a temperatura ambiente) dentro del desecador y en la balanza analítica para evitar que la hidratación pudiera modificar los resultados. Para relacionar el peso y el diámetro de los ovocitos, se hizo un análisis de regresión lineal, a partir de los datos del peso seco unitario normalizados (transformación por medio de raíz cuadrada) utilizando el programa de cómputo Sigma Stat versión 2.0.

Análisis de la distribución de frecuencias de los ovocitos

Para conocer si existían diferencias entre el grado de madurez en diferentes secciones del ovario y definir un criterio de muestreo para el análisis *in vivo*, estableciendo cuál es la sección del ovario que representa con confiabilidad el estado de máxima madurez, se analizaron tres ovarios maduros y uno inmaduro que fueron seleccionados tomando en cuenta su índice gonadosomático y las características descritas por Nikolsky (1963) para las gónadas maduras (tamaño, peso y la observación de los ovocitos hidratados a través del tejido ovárico superficial) e inmaduras (tamaño reducido, los ovocitos no se distinguen a simple vista) además se tomaron en cuenta otras características como son el color y la textura del ovario.

Para la medición de la frecuencia de ovocitos de diferentes grados de desarrollo (con base en el diámetro), los ovarios se dividieron en 5 secciones (figura 5) siguiendo la metodología descrita por Shehadeh *et al.* (1973). Las muestras separadas en cada tamiz fueron tratadas de la misma forma descrita para la curva de calibración. Las muestras se

filtraron en mallas de 40 μm , ya que la gran cantidad de ovocitos de algunas secciones tapaban los filtros Whatman. Las muestras fueron enjuagadas con la solución de formiato de amonio (0.03 mg/ml). Con base en el peso seco de las muestras se estimó el número correspondiente de ovocitos utilizando la curva de calibración hecha previamente. Se contrastaron las frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros en las diferentes zonas de cada ovario maduro mediante una prueba de χ^2 para una tabla de contingencia de 4 x 5 x 6 (Apéndice) (Zar, 1984) utilizando el programa Microsoft Excel 97.

Para saber si existe una relación entre los ovarios maduros e inmaduros que explique si el diámetro de los ovocitos depende del estado de madurez sexual, se utilizó una prueba de χ^2 para una tabla de contingencia de 2 x 5 x 6 en la que contrastaron las distribuciones de frecuencias de los ovocitos de un ovario inmaduro y del ovario que tuvo un grado más avanzado de madurez sexual (IG = 6.127) (Tabla VII).

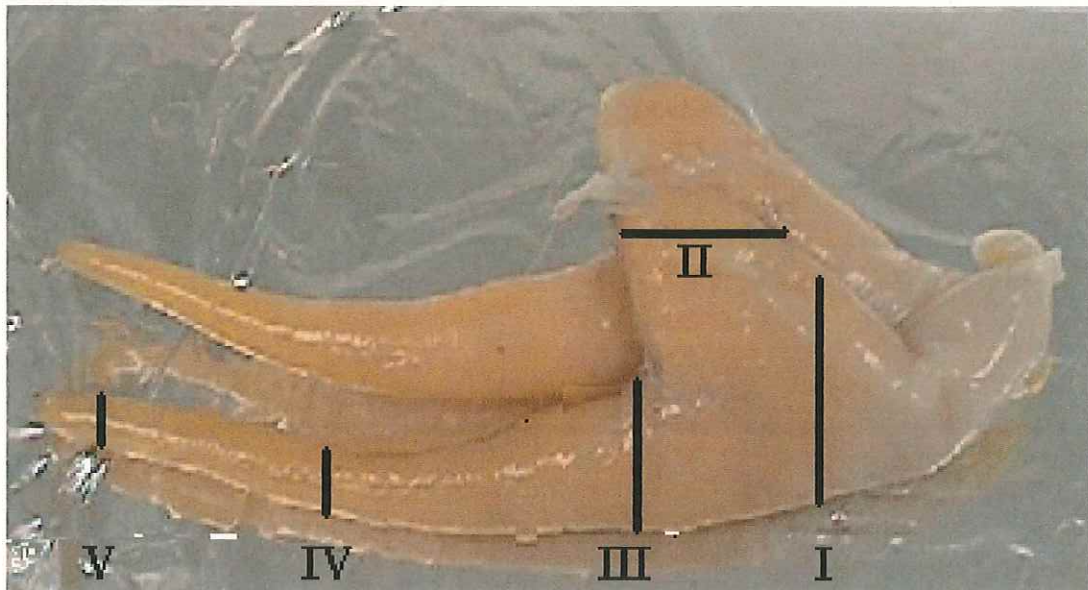


Figura 5. Secciones muestreadas para el estudio de la distribución de las frecuencias de ovocitos por diámetro en ovarios de *Paralichthys californicus*.

Descripción de la distribución transversal de los ovocitos por grados de desarrollo

Para conocer la disposición que tienen los ovocitos por grados de desarrollo a lo ancho del ovario y para correlacionar su diámetro con los diferentes grados de madurez, se analizaron diferentes secciones de los ovarios maduros e inmaduros con una técnica histológica estándar. Las muestras de tejido maduro se obtuvieron de dos ovarios de 20 y 22 cm de longitud total y de cada una de las secciones consideradas en la estimación de la frecuencia de ovocitos por intervalos de diámetro (Figura 5). El ovario inmaduro utilizado midió 5.5 cm de longitud total. La ubicación de la zonas analizada cambió con respecto a los ovarios maduros debido a las diferencias de tamaño (Figura 6). Las muestras de tejido ovárico se colocaron en la solución fijadora de Davidson por 24 h y después se transfirieron a una solución conservadora de Davidson (NOAA, 1983) (Apéndice), donde permanecieron aproximadamente dos días. Posteriormente se deshidrataron en soluciones alcohólicas de diferentes concentraciones (Apéndice).

Los tejidos deshidratados se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 5µm. Después se tiñeron con hematoxilina y eosina (Apéndice). También se realizaron cortes histológicos de óvulos que fueron encontrados en los conductos ováricos de la gónada madura, probablemente listos para ser desovados.

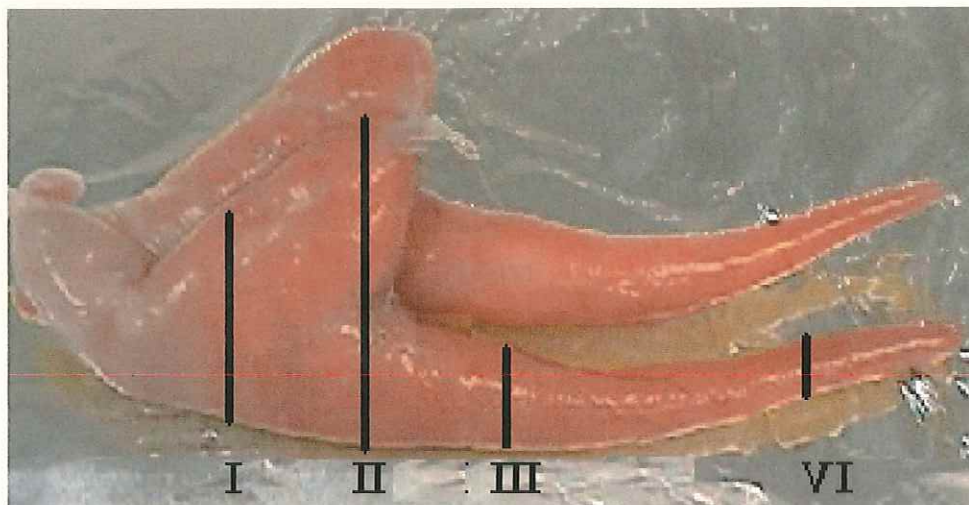


Figura 6. Secciones donde se obtuvieron los cortes histológicos en el ovario inmaduro de *Paralichthys californicus*.

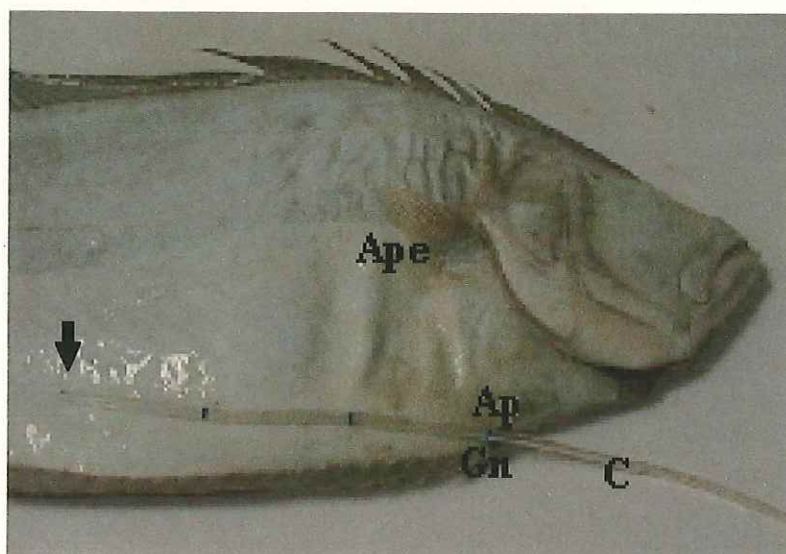
ANÁLISIS DE LOS OVOCITOS INTRAOVÁRICOS

Debido a la falta de organismos vivos mayores de 50 cm aptos para este estudio, los análisis se realizaron en organismos que tenían menos de una hora de muertos. Debido al largo tiempo que requieren los análisis de distribución de frecuencias de los ovocitos (aproximadamente 45 días por ovario), en uno de los ovarios analizados, primero se extrajeron muestras intraováricas de la hembra antes de la disección, utilizando la metodología de Shehadeh *et al.* (1973). La hembra utilizada midió 60 cm de longitud total y pesó 2100 g. Por el poro genital se introdujo un catéter de 1.63 y 3.25 mm de diámetro interior y exterior respectivamente (Figura 7) a 4, 8 y 10.7 cm medidas hacia el extremo posterior del organismo, y por succión se obtuvieron por triplicado muestras de los ovocitos y para medir su diámetro fueron colocadas en 10 ml de la solución conservadora (formaldehído

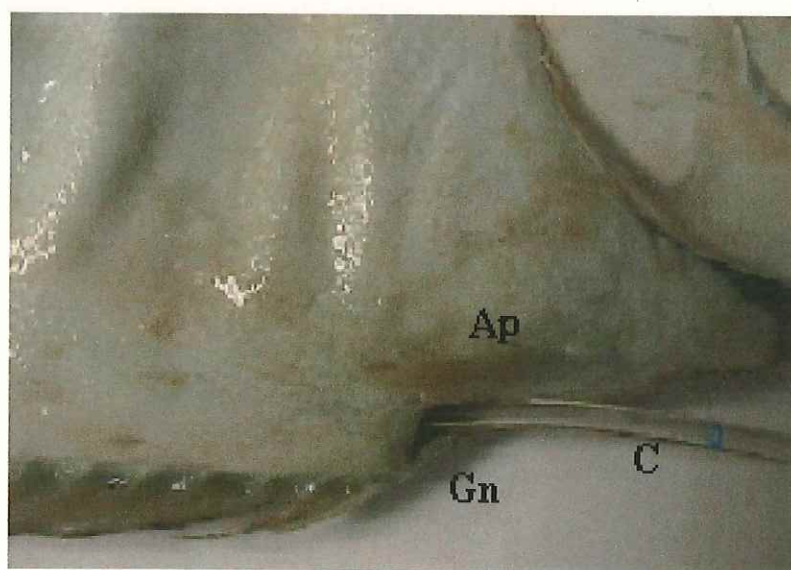
1% y NaCl 0.6%). La longitud máxima a la que entró el catéter fue aproximadamente el 16% de la longitud total del organismo.

Para analizar la composición de las muestras extraídas del ovario, los ovocitos maduros (hidratados y con una sola gota de aceite) se separaron de los ovocitos de menor grado de madurez y el resto de los tejidos del ovario que se colocaron en un vaso de precipitado de 25 ml con un solución conservadora y se separaron con el aparato ultrasónico. Posteriormente, se mezclaron todos los ovocitos de la muestra (incluyendo los maduros) y se tomó una alícuota de 1 ml. Todos los ovocitos mayores a 132 μm en el mililitro de muestra fueron contados y medidos en un microscopio estereoscópico.

Las frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros de las tres muestras tomadas con el catéter éstas se contrastaron con una tabla de contingencia de 3x6 (Zar, 1984). Después las frecuencias de los ovocitos extraídos se compararon con las frecuencias de los ovocitos observadas en las gónadas maduras. Con los resultados del análisis de los diámetros de los ovocitos y la descripción de la estructura gonadal se elaboró un procedimiento para estimar el estado de madurez sexual del lenguado de California *Paralichthys californicus*.



A



B

Figura 7. Recolección de muestras intraováricas de *Paralichthys californicus*. A. máxima profundidad a la que se puede introducir el catéter (señalada con una flecha). B. Detalle de la región anal, con el catéter introducido en el poro genital. Ape, Aleta pectoral; Ap, Aleta pélvica; Gn, poro genital; C, Catéter.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre las tres formas en que se calculó el índice gonadosomático (Tabla I), sin embargo, los resultados indican que el valor de p fue mayor entre el IG calculado incluyendo las vísceras y el calculado restándolas (Tabla I).

Se observó que no existe una relación lineal, entre la masa de los organismos y sus gónadas ya que en organismos mayores a 10 y hasta 20 kg sus índices gonadosomáticos son muy pequeños en comparación a otros peces de menor tamaño con altos valores del IG. El 95.2% de los organismos muestreados pesaron de 0.400 hasta 5 kg y tuvieron un IG de 0.065 a 6.50. El IG promedio es de 2.861 con una desviación estándar de 2.8.

Para el análisis de las frecuencias de ovocitos se seleccionaron las hembras con un IG de 6.127, 4.48, 4.48 y 1.686. Las primeras dos gónadas se observaron grandes, un poco blandas y de color anaranjado (Figura 5), mientras que la tercera era pequeña y dura con un color rojizo más homogéneo (Figura 6).

Las diferentes medidas de los ovarios tienen una fuerte correlación entre sí. A medida que aumenta la longitud total de la gónada (LTG), aumenta la altura (HPS) y la longitud de la ramas derecha (PPD) e izquierda (PPI) (Figura 9). Se observa que el ovario crece de forma proporcional en dirección longitudinal y ventrodorsal con una relación de 4.68:1 (Figura 9). En todos los ovarios la rama que coincidió con el lado que presentaba los ojos fue mayor que la otra. Se observó que las ramas derecha e izquierda tienen aproximadamente la misma tasa de crecimiento (Figura 9). Todas las variables se correlacionaron entre si positivamente (Tabla II). La mayor correlación fue la encontrada entre las dos ramas posteriores (izquierda y derecha) de cada ovario.

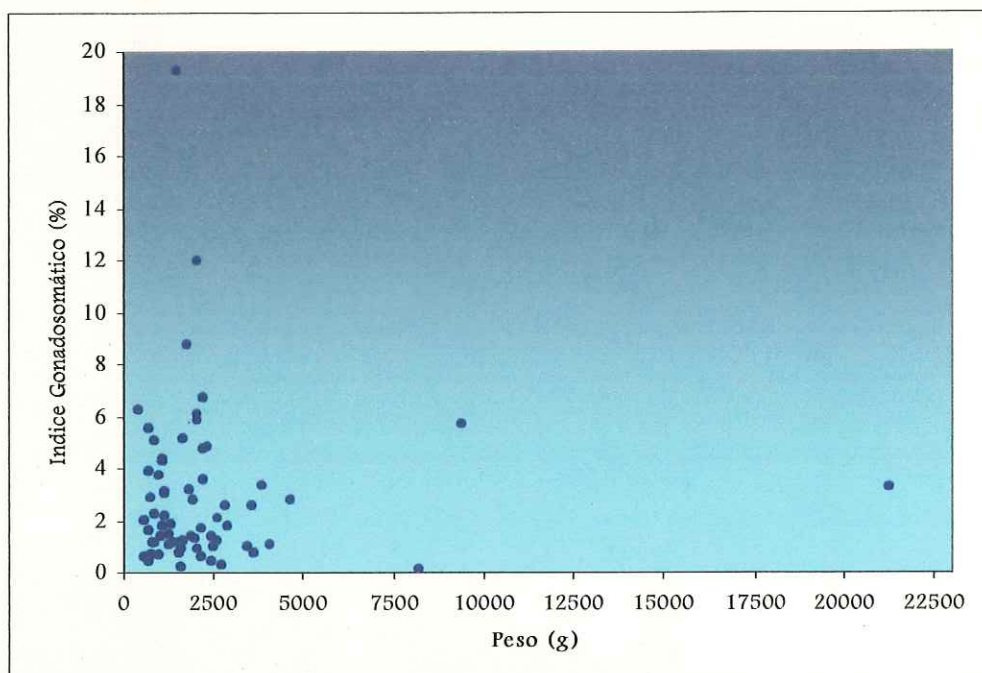


Figura 8. Índice gonadosomático de las hembras de *Paralichthys californicus* calculado restando el equivalente de la masa que representan las vísceras.

Tabla I. Comparación del índice gonadosomático de *Paralichthys californicus* calculado con tres métodos contrastados con una prueba de Mann-Whitney.

Par comparado	p
IG con vísceras – IG sin vísceras	0.200
IG con vísceras – IG sin la masa equivalente a las vísceras	0.755
IG sin vísceras – IG sin la masa equivalente a las vísceras	0.168

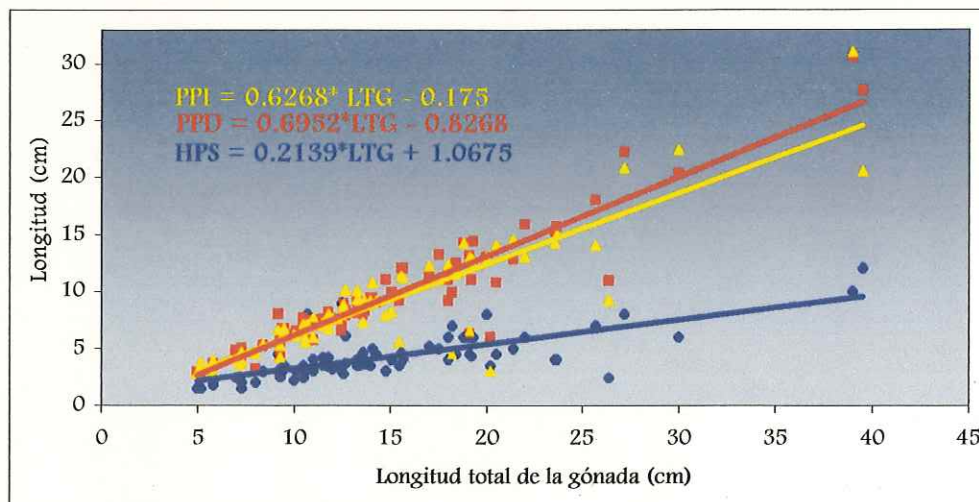


Figura 9. Relación de las diferentes medidas de la longitud del ovario de *Paralichthys californicus* con respecto a la longitud total de la gónada (LTG). ■ Rama posterior derecha (PPD); ● Altura máxima del ovario (HPS); ▲ Rama posterior izquierda (PPI). Las líneas sólidas y las ecuaciones indican la regresión lineal de cada medida según su color.

Tabla II. Pruebas de correlación de Spearman para las distintas medidas de las gónadas de *Paralichthys californicus*.

Par comparado	R	P
PPD-PPI	0.918	0
PPD-HPS	0.755	0
PPD-LTG	0.898	0
PPI-HPS	0.724	0
PPI-LTG	0.843	0
HPS-LTG	0.737	0

EFFECTO DE LA SOLUCIÓN CONSERVADORA EN EL DIÁMETRO DE LOS OVOCITOS

Las medidas de los diámetros de los ovocitos preservados en formol al 1% y NaCl al 0.2% cambiaron significativamente con respecto al diámetro medido en fresco (Tabla III). Las concentraciones de formol al 1% y NaCl al 0.6% y formol al 1% y NaCl al 0.4% no alteraron

significativamente el diámetro de los ovocitos, como lo demostró una comparación por medio de la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes. Para corroborar el resultado anterior, se midió una mayor cantidad de ovocitos preservados en la solución de formol al 1% y NaCl al 0.4% y 0.6% (solución conservadora) y se aplicó la misma prueba de comparación (Tabla IV). La solución de formol al 1% y NaCl al 0.6 % demostró ser la más adecuada ($p=0.861$) (Tabla IV) por lo tanto fue la solución utilizada en la preservación de todas las muestras.

Tabla III. Efecto de la solución de Formol al 1% y tres distintas concentraciones de NaCl sobre el diámetro de los ovocitos (μm) de *Paralichthys californicus*. Prueba de Wilcoxon.

No.	NaCl 0.2%		NaCl 0.4%		NaCl 0.6%	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
$\bar{X}$	443.2	501.8	423.7	444.6	446	461.3
n	7	7	7	7	7	7
W	28		3		3	
p	0.016		0.786		0.833	

$\bar{X}$ =diámetro promedio n=número de ovocitos W=constante de Wilcoxon calculada p=probabilidad

Tabla IV. Efecto de la solución de Formol al 1% y dos distintas concentraciones de NaCl sobre el diámetro de los ovocitos (μm) de *Paralichthys californicus*. Prueba de Wilcoxon.

No.	NaCl 0.4%		NaCl 0.6%	
	Antes	Después	Antes	Después
$\bar{X}$	372.1	348.6	446.4	449.1
n	30	30	29	29
W	~40		~11	
P	0.599		0.861	

$\bar{X}$ =diámetro promedio n=número de ovocitos W=constante de Wilcoxon calculada p=probabilidad

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DEL OVARIO

A diferencia de otros peces, que tienen el ovario en la región dorsal de la cavidad abdominal, siguiendo una trayectoria anteroposterior paralela al riñón, en el lenguado de California, el ovario está en la región ventral media posterior y se prolonga en dirección posteroanterior hacia el poro genital. Se encuentra aledaño en su parte anterior al estómago y al hepatopáncreas (Figura 10A). En todos los peces analizados ($n=66$) la rama del ovario que coincide con el lado superior del organismo (el que tiene los ojos) es mayor o igual a la longitud de la otra rama. Aunque se proyecta posteriormente mas allá de la cavidad abdominal, el ovario está en su totalidad aislado del tejido muscular por el peritoneo.

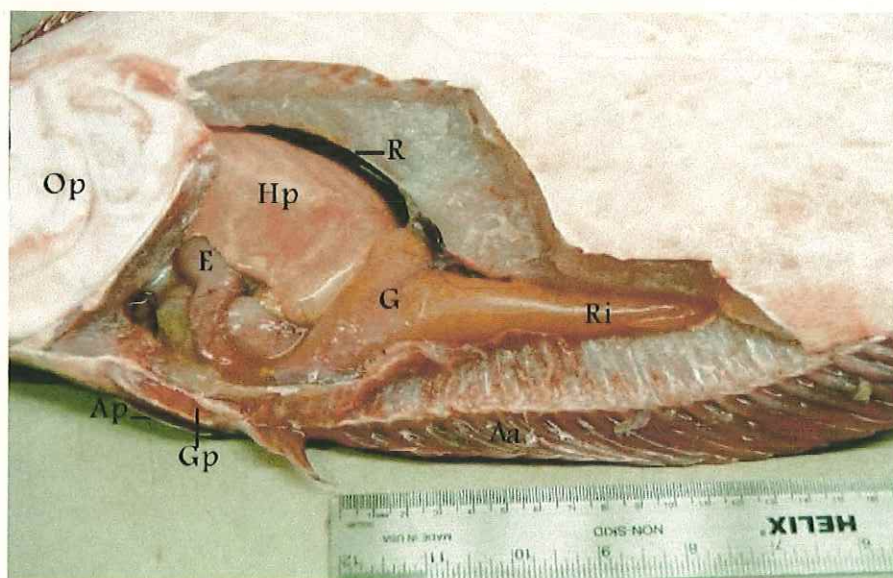
El ovario se encuentra sostenido en diversos lugares de la cavidad ovárica por tejido conectivo y ligamentos llamados mesovarios (Rojo, 1988). Además presenta un grueso ligamento que une la región media de la gónada con la zona posterior del riñón y por este lugar son irrigadas las dos ramas que conforman el ovario, cada una por una arteria que luego se ramifica a todo el órgano (Figuras 10B y 11B2).

La región anterior la gónada se divide internamente en dos secciones unidas por el conducto ovárico. Hacia la región posterior cada rama del ovario tiene una prominencia que se proyecta en dirección dorsal y disminuye abruptamente hasta desaparecer en la parte media, donde las ramas posteriores de la gónada se separan por una estructura ósea, la espina interhernal (Norman, 1966) (Figuras 10 y 11B3).

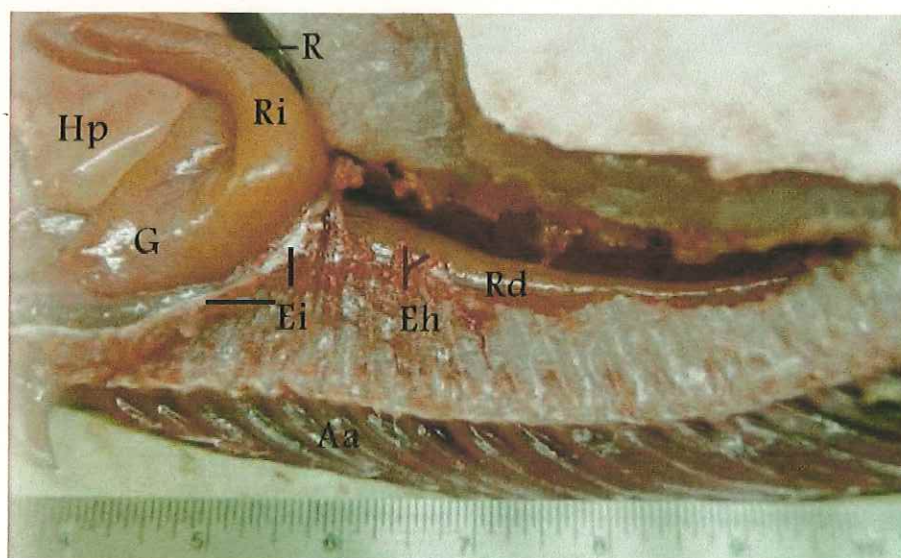
El conducto ovárico desemboca en la cloaca (orificio común para el desove y la excreción de heces fecales) que se encuentra en la parte anterior del pez, justo debajo de la aleta pélvica (Figuras 7 y 10A, Gn). A medida que el ovario madura, su tamaño aumenta y se desarrolla en relación con los demás órganos de la cavidad abdominal. Además del tamaño, el color del ovario varía con el grado de madurez. En organismos inmaduros, el ovario es rojizo y

paulatinamente el color rojo se transforma en anaranjado lechoso cuando la gónada está madura, entonces se pueden observar los ovocitos maduros como esferas translúcidas dentro de la gónada. En algunos ovarios maduros que tenían una consistencia flácida, se observó una aglomeración de óvulos en los conductos ováricos. La presencia de gran cantidad de óvulos en estos conductos probablemente indique que este organismo se encontraba en un momento cercano al desove.

Interiormente, el ovario tiene un conducto que se bifurca en cada rama, uno se dirige hacia el extremo de cada prominencia (Figura 11, B1) y otro que recorre el ovario a lo largo hasta el extremo posterior (Figura 11, B2 y B3). El conducto ovárico se encuentra en la orilla exterior de cada rama, desde el poro genital hasta después de las prominencias (Figuras 11,B2 y 12,A) y posteriormente se desvía hacia el centro a lo largo de cada rama y sigue en dirección posterior en esa posición a lo largo del resto de la gónada (Figuras 11, B3 y 12,B). Se observan arterias y venas en el exterior de la gónada que se van adelgazando a medida que se dirigen a la región posterior del ovario.



A



B

Figura 10. Disección de la cavidad abdominal de *Paralichthys californicus*. A. Ubicación del ovario. B. Remoción de la rama izquierda para evidenciar el acomodo del ovario con respecto a la osamenta. Aa, aleta anal; Ap, aleta pélvica; E, estómago; Eh, espinas hemales; Ei, espina interhemal; G, ovario; Gp, poro genital; Hp, Hepatopáncreas; Op, opérculo; R, rión; Rd, rama derecha; Ri, rama izquierda.

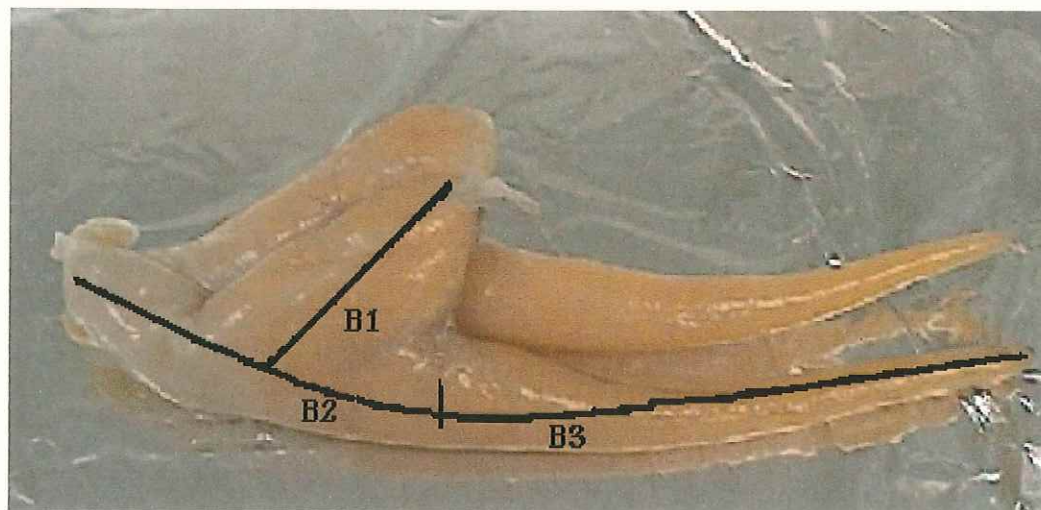


Figura 11. Ubicación del conducto ovárico en cada rama del ovario de *Paralichthys californicus*. B1, sección del conducto que se dirige hacia las prominencias; B2, sección donde el conducto ovárico se ubica en el extremo exterior de cada rama; B3, Sección donde el conducto ovárico se observa en el centro del ovario.

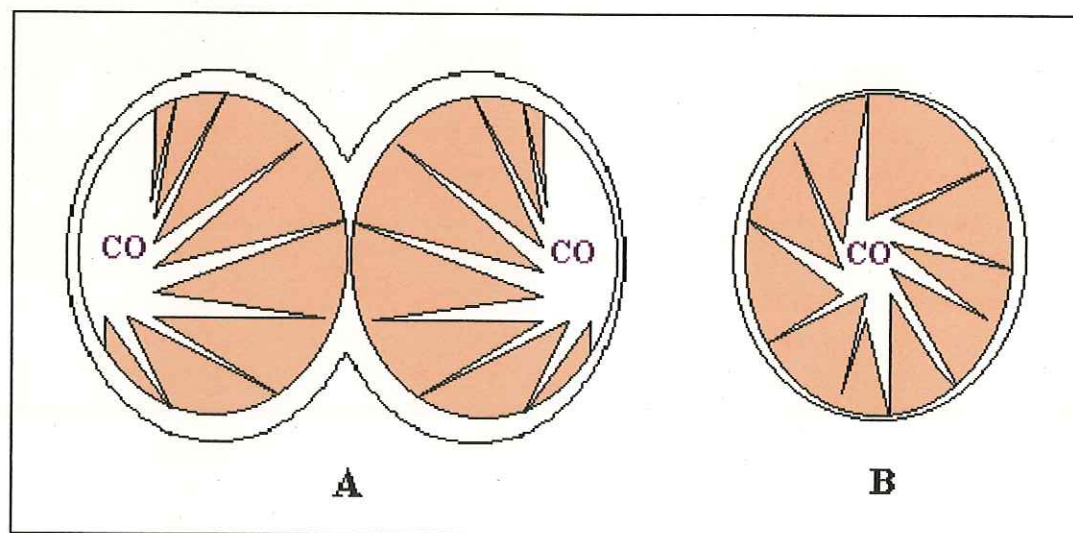


Figura 12. Diagrama de los cortes transversales del ovario de *Paralichthys californicus* en donde se aprecia la posición del conducto ovárico. A, conducto ovárico en la región que va desde el extremo anterior del ovario hasta después de las prominencias; B, conducto ovárico del final de las prominencias al extremo posterior del ovario.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DEL OVARIO

Curva de Calibración

El modelo lineal calculado (Figura 13) tuvo una R^2 de 0.789, aún cuando el modelo sólo explica el 79% de los datos, un análisis de varianza indicó que los pesos varían significativamente con respecto a los diámetros ($p < 0.001$). La ecuación de la curva de calibración fue :

$$PSU^{1/2} = 0.000207 * D + 0.00711$$

Donde:

$PSU^{1/2}$ = Raíz cuadrada del peso seco unitario

D = Diámetro de los ovocitos

Los pesos unitarios utilizados en el cálculo de las frecuencias de ovocitos se obtuvieron a partir de la ecuación de regresión para cada uno de los intervalos de diámetro medidos (Tabla V).

Tabla V. Valores de peso seco unitario promedio de los ovocitos de *P. californicus* por intervalos de tallas calculados a partir de la regresión lineal.

Intervalo de diámetro (μm)	Peso seco (μg)
132-184	0.0012
184-292	0.0020
292-408	0.0046
408-526	0.0084
526-761	0.0135
>761	0.0272

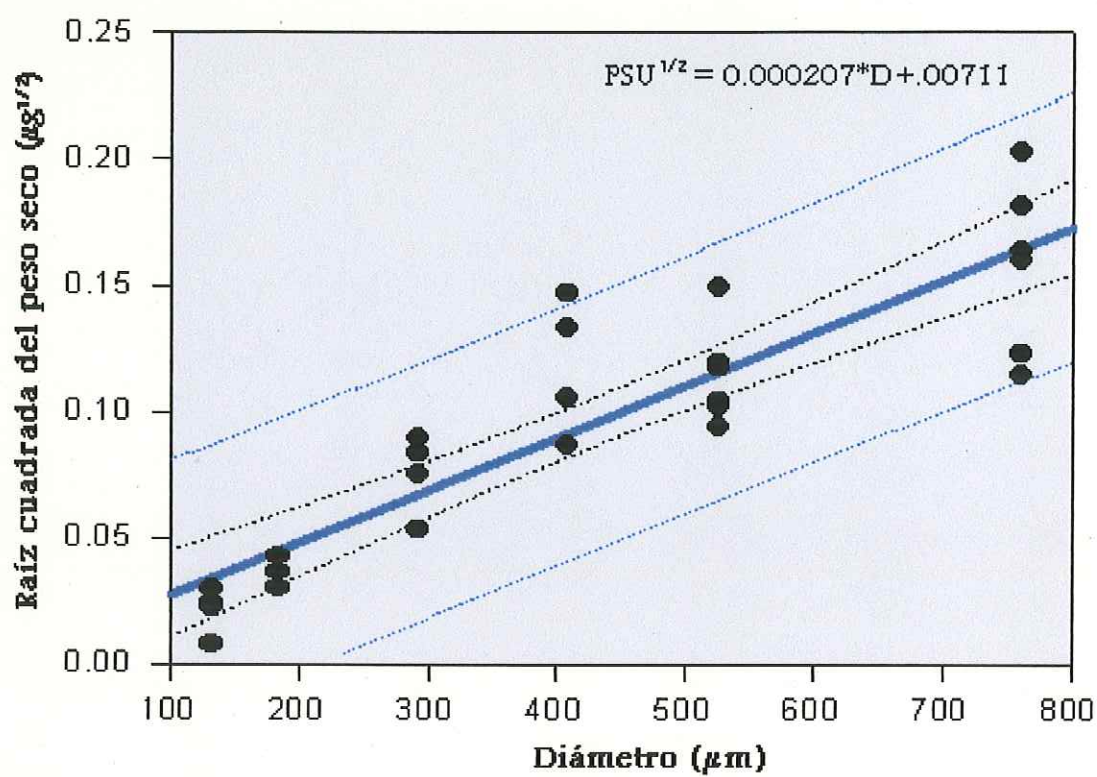


Figura 13. Relación entre el diámetro y la raíz cuadrada del peso seco unitario (PSU) de los ovocitos de *Paralichthys californicus*. • Observaciones ...Intervalo de confianza ... Intervalo de predicción.

Análisis de frecuencias de los ovocitos

En las gónadas maduras la composición por diámetros de los ovocitos entre las secciones I-IV tuvieron un diámetro promedio que fluctuó entre 300 y 400 μm mientras que en la sección V existió una marcada dominancia de las frecuencias de los ovocitos en el intervalo de 132 a 184 μm ya que el diámetro del 95% de los ovocitos de esta sección coinciden con el diámetro promedio (Figuras 14 y 16).

Los ovocitos de 526 μm estuvieron presentes en los ovarios maduros, sin embargo existió una marcada diferencia en su distribución. La sección I tuvo una distribución más amplia de frecuencias ya que existe la presencia de ovocitos en los seis intervalos de diámetro, de los cuales, una gran cantidad correspondió al intervalo de 526 a 761 μm . En los tres ovarios se encontraron ovocitos mayores a 761 μm al menos en las primeras dos secciones, éstos tuvieron una frecuencia igual o menor al 5%. Cabe mencionar que los ovocitos que se encuentran en estos dos intervalos de clase (526 – 761 y 762-925) tienen la misma apariencia, están hidratados, tienen una gota de aceite y son semitransparentes, la única diferencia es el diámetro, debido tal vez al grado de hidratación.

En todas las secciones de los tres ovarios maduros existió una distribución bimodal de los ovocitos por intervalos de diámetro. La sección I del ovario con un IG de 6.127 tuvo una mayor cantidad de ovocitos de diámetro igual o mayor a 526 μm (Figura 17).

En la gónada inmadura solamente se encontraron ovocitos de 132 a 408 μm en las secciones III a V (Figura 18). En la sección I se encontró una mejor distribución de los ovocitos en

comparación a las demás secciones. En las secciones I, II y V el 95% de los ovocitos midió entre 132 y 292 μm . Las secciones III y IV están compuestas casi en su totalidad por ovocitos de 132 μm .

Las pruebas de X^2 demostraron que el diámetro de los ovocitos varía entre las secciones estudiadas y entre las gonadas maduras e inmaduras y que el diámetro de los ovocitos sí depende del estado de madurez del ovario (Tabla VII).

Tabla VI. Pruebas de independencia resultantes de la tabla de contingencia utilizada en la comparación de las frecuencias de ovocitos de tres ovarios maduros de *Paralichthys californicus*. El color azul indica la hipótesis que fue aceptada.

Prueba	$X^2_{\text{observada}}$	ν	X^2_{critica}	P
H_0 : G, S y T son mutuamente independientes H_i : G, S y T no son mutuamente independientes	523014	78	99.617	<0.001
H_0 : T es independiente de G y S H_i : T no es independiente de G y S	880480	70	90.531	<0.001
H_0 : S es independiente de G y T H_i : S no es independiente de G y T	644853	58	76.778	<0.001
H_0 : G es independiente de S y T H_i : G es no independiente de S y T	756949	68	88.250	<0.001

Tabla VII. Pruebas de independencia resultantes de la tabla de contingencia utilizada en la comparación de las frecuencias ovocitos de *Paralichthys californicus* entre un ovario maduro más avanzado y uno inmaduro. El color azul indica la hipótesis que fue aceptada.

Prueba	$X^2_{\text{observada}}$	ν	X^2_{critica}	P
H_0 : G, S y T son mutuamente independientes H_i : G, S y T no son mutuamente independientes	1445266.5	49	66.339	<0.001
H_0 : T es independiente de G y S H_i : T no es independiente de G y S	16097723	45	61.656	<0.001
H_0 : S es independiente de G y T H_i : S no es independiente de G y T	824381	29	42.557	<0.001
H_0 : G es independiente de S y T H_i : G es no independiente de S y T	208925.3	44	60.481	<0.001

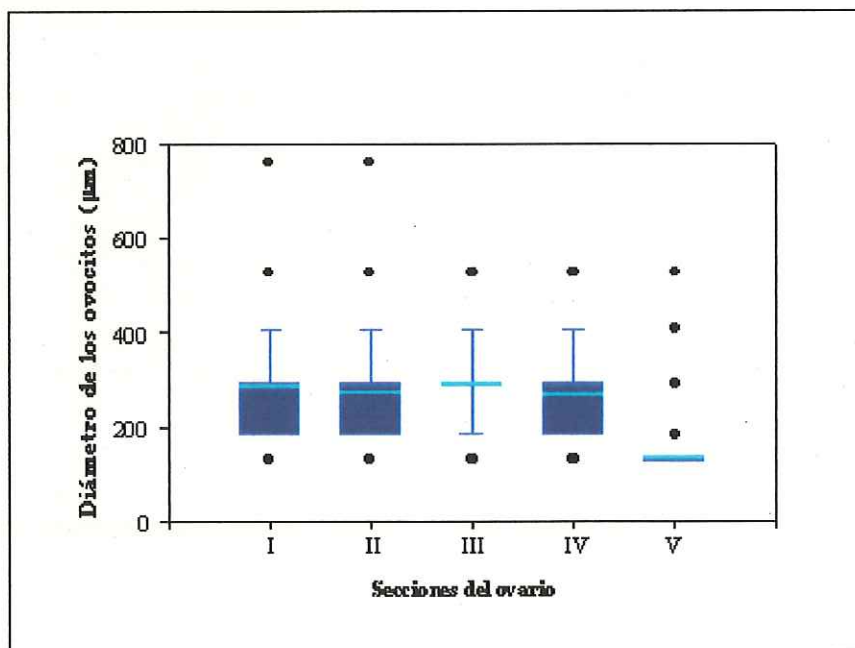


Figura 14. Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de *Paralichthys californicus* rama izquierda (IG = 4.48). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.

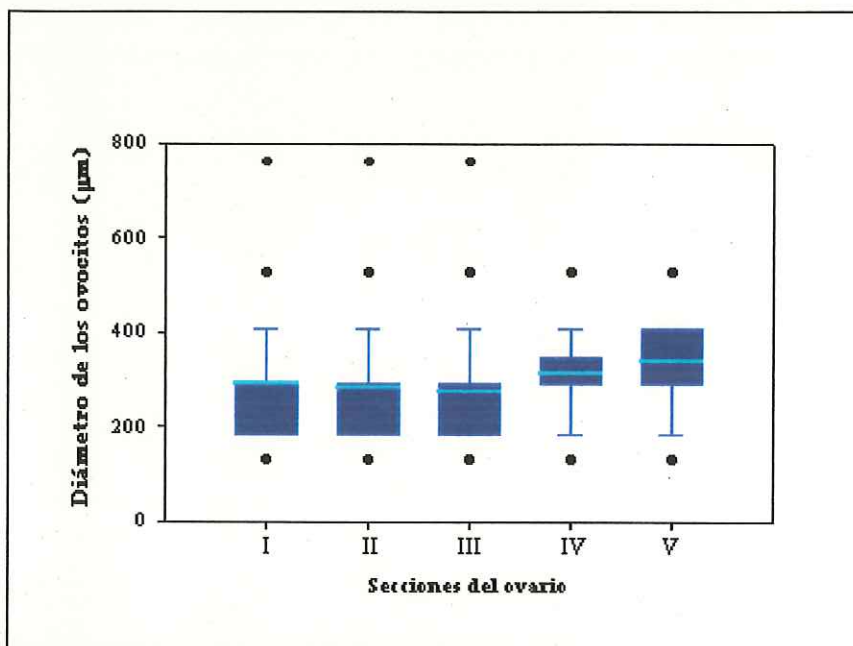


Figura 15. Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de *Paralichthys californicus* rama derecha (IG=4.48). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.

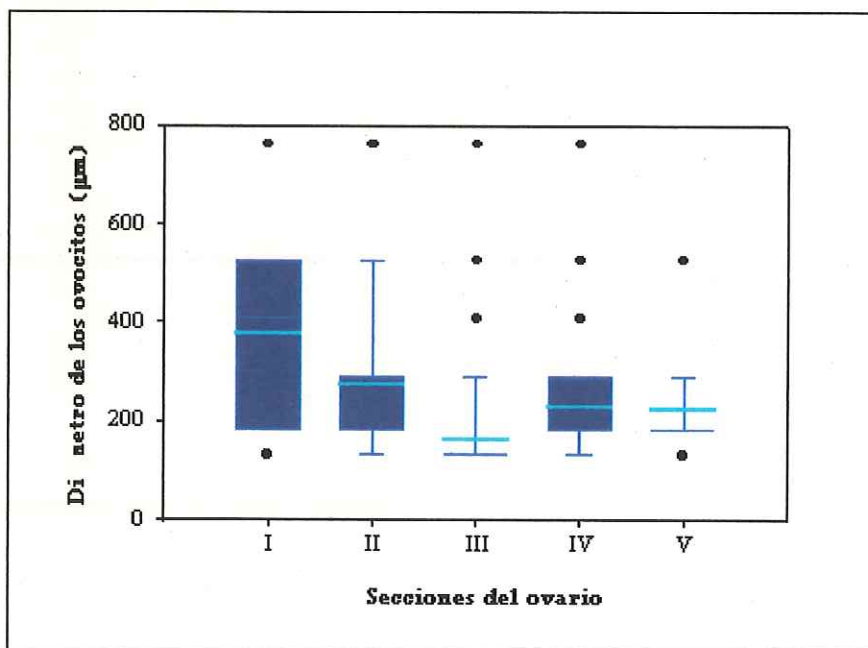


Figura 16. Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de un ovario maduro de *Paralichthys californicus* (IG=6.127). La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.

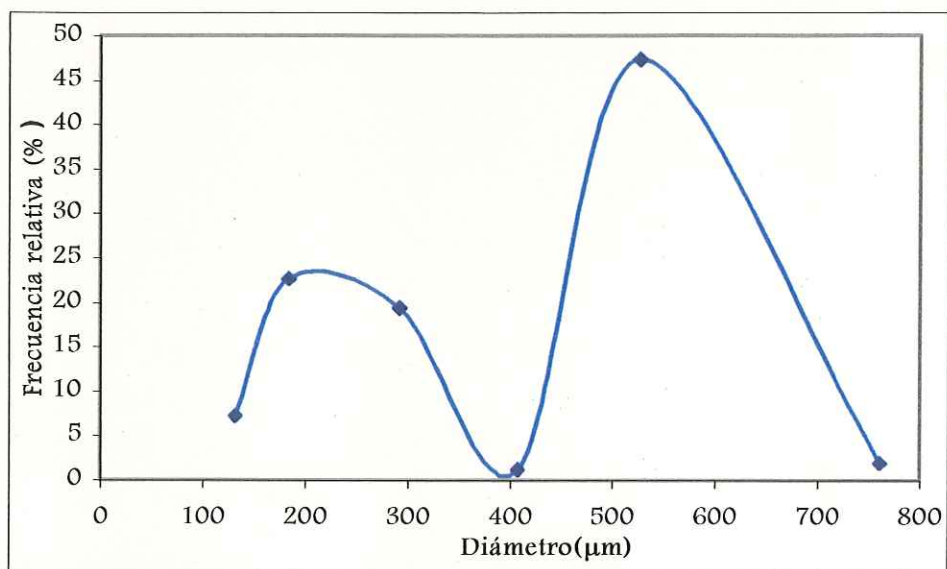


Figura 17. Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros de la sección I de una gónada madura de *Paralichthys californicus* (IG= 6.127).

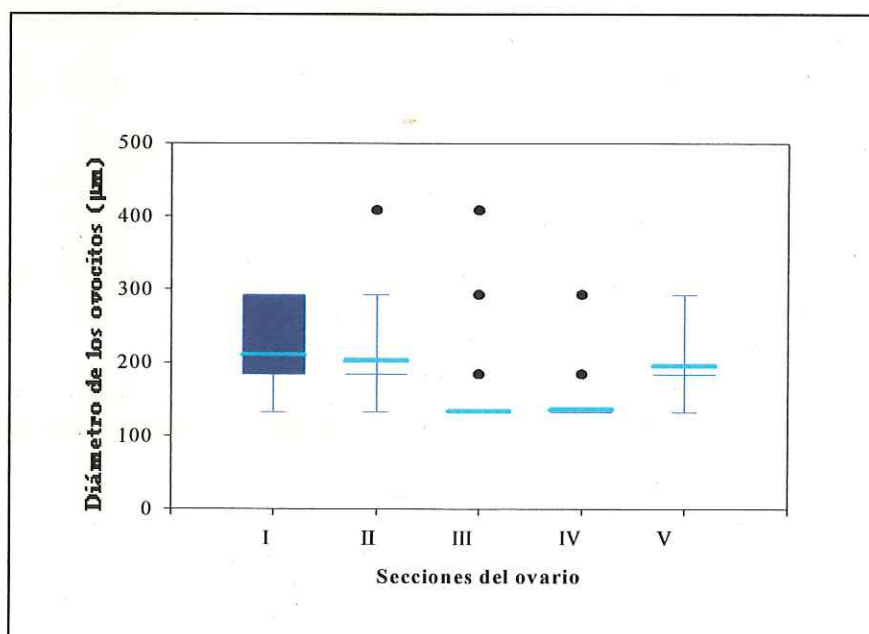


Figura 18. Distribución de frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros por secciones de una gónada inmadura de *Paralichthys californicus*. (IG= 1.686) La línea clara en cada sección indica el diámetro promedio.

Descripción de la distribución transversal de los ovocitos por grados de desarrollo

El ovario está cubierto por un delgado epitelio que se proyecta hacia el interior de la gónada formando lamelas que convergen en el conducto ovárico (Figuras 19 y 20). En la porción anterior de la gónada, estas lamelas son más largas en la porción anterior del ovario, donde el conducto ovárico se encuentra más cerca del epitelio ovárico (Figuras 11,B2 y 12A). En dirección posterior a las prominencias, el conducto ovárico se encuentra en el centro de la gónada, entonces las lamelas se disponen radialmente y son aproximadamente de igual tamaño. En cada una de las lamelas se encuentran racimos de ovocitos en distintos estados de madurez y por consecuencia de diferentes tamaños.

En las gónadas inmaduras se encontró que los ovocitos más desarrollados (estadios tempranos de la vitelogénesis) se localizaron en la parte central, en donde después se localizará el conducto ovárico. En los cortes histológicos se observa un gradiente de coloración que indica los diferentes grados de madurez, donde se observa que los ovocitos más pequeños se encuentran en la periferia del ovario y los menos inmaduros se encuentran en el centro (Figura 19). Este patrón de maduración se observó en todas las secciones, donde se encontraron ovocitos parcialmente vitelados. Sin embargo, éstos fueron más frecuentes en las secciones I a III.

Los ovocitos tuvieron un arreglo más compacto en los ovarios inmaduros que en los maduros y aquellos no vitelados o en etapas tempranas de la vitelogénesis se tiñen de color azul, mientras que los ovocitos maduros se tiñen de color rosa (Figura 21).

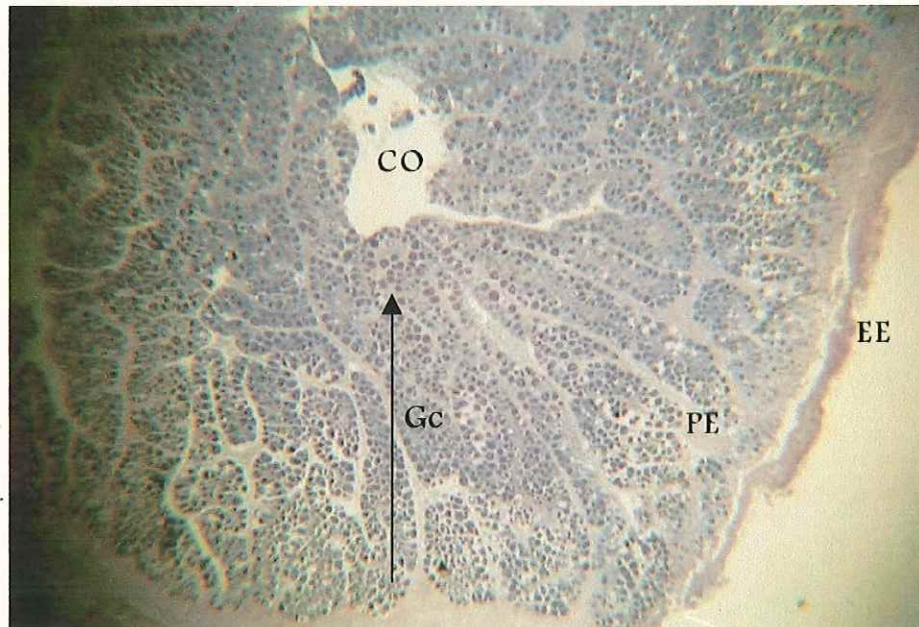


Figura 19. Corte transversal de una gónada inmadura de *Paralichthys californicus*, Sección I (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovarico superficial (compuesto de tejido muscular y conectivo); PE, tejido germinativo; CO, conducto ovárico; Gc, gradiente de coloración.

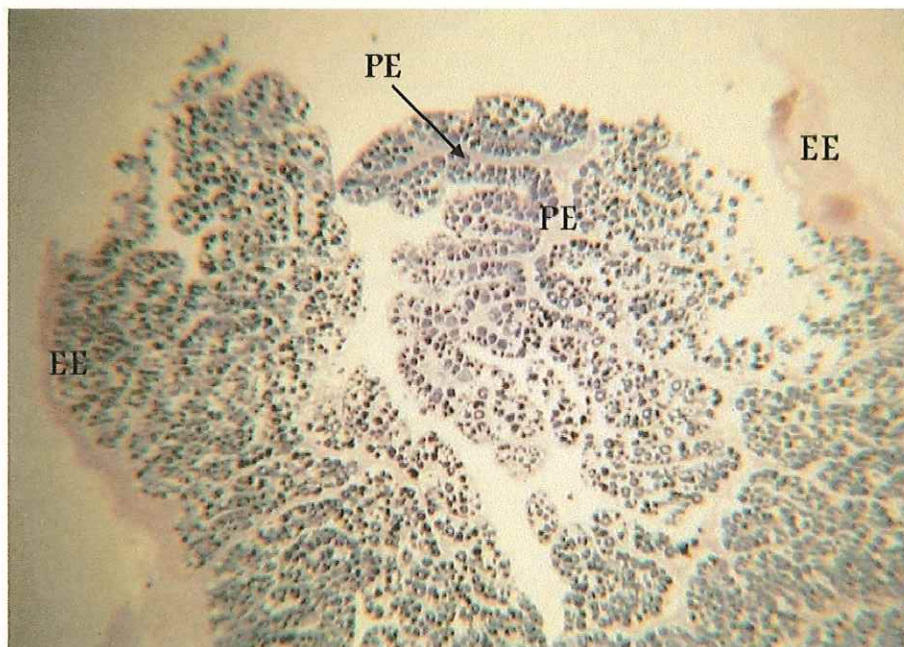


Figura 20. Lamelas que conforman el ovario inmaduro de *Paralichthys californicus*. Sección II. (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina; PE, tejido germinativo; EE, tejido ovárico superficial.

En el ovario maduro se encontraron ovocitos de todos los estadios de madurez (Figuras 22 y 23). Se observó una menor cantidad de ovocitos de diámetros intermedios con respecto a los otros diámetros (Figura 22 y 23). Existe gran cantidad de ovocitos que se encuentran en los primeros estadios de la vitelogénesis agrupados aleatoriamente e intercalados con otros que se encuentran en la etapa de maduración final. No se observó algún acomodo predeterminado o gradiente de madurez en los ovarios maduros con respecto al conducto ovárico (Figura 22).

Se observó una mayor cantidad de ovocitos maduros en el extremo anterior de la gónada. En el otro extremo, se observaron ovocitos vitelados, pero en la mayoría, la vesícula germinal no había migrado a la periferia, lo que significa que no habían iniciado su maduración final, sin embargo, se encontraron óvulos y folículos postovulatorios.

En las secciones I y II se observaron más ovocitos maduros o próximos a la madurez (Figura 22), con las plaquetas vitelinas grandes y en algunos el núcleo estaba en el centro, en tanto que en otros se encontraba en la periferia de la célula (Figura 23). También se encontraron ovocitos maduros en los que la membrana nuclear se desintegró y el contenido nuclear se mezcló con el citoplasma, estas características corresponden a los ovocitos que se encuentran en la fase de la maduración final (Balinsky, 1978; Goetz, 1983; Tucker, 1998).



Figura 21. Corte transversal de un ovario inmaduro de *Paralichthys californicus*. Sección III. (200x) tinción: hematoxilina-eosina; NV, ovocito no vitelado; PV, ovocito parcialmente vitelado; IS, vaso sanguíneo.

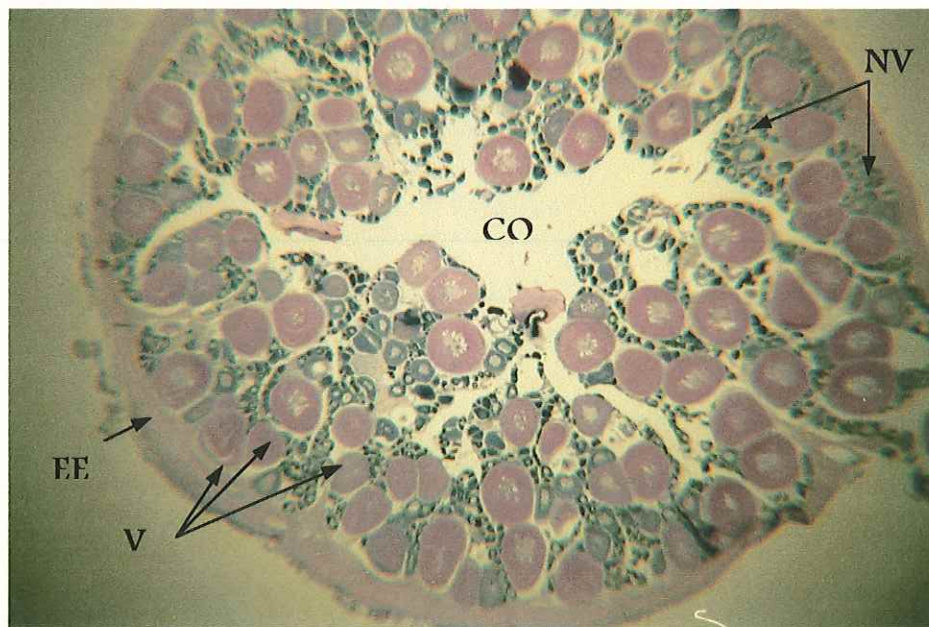


Figura 22. Corte transversal de un ovario maduro de *Paralichthys californicus*. Sección III (12.5x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovárico superficial; NV, ovocitos no vitelados; V, ovocito vitelado; CO, Conducto ovárico.

En un corte transversal del ovario maduro (Figura 22) se puede apreciar que los ovocitos crecen a partir del tejido germinativo que se extiende radialmente de la parte exterior de la gónada hacia el centro. También se encontraron óvulos en el conducto ovárico que presentaron una gran cantidad de vitelo que ya no se observa en forma de pequeñas plaquetas sino como una sola plaqueta uniforme y granular y con sólo una gota de aceite, no se observa la vesícula germinal como una estructura diferenciada del resto, ya que su membrana nuclear se desintegró y el contenido se mezcló con el citoplasma (Figura 25).

En los cortes de los ovarios maduros también se encontraron folículos postovulatorios (Figura 26), en la Figura 25 se pueden observar las diferencias en tamaño y espesor entre un folículo preovulatorio y un postovulatorio.

La figura 27 muestra la relación entre el grado de madurez de los ovocitos y su diámetro, Los ovocitos crecen de tamaño a medida que maduran. Los ovocitos maduros aumentan más de tres veces su diámetro en comparación con los ovocitos no vitelados. A partir de 526 μm se observa la migración del núcleo a la periferia y la ruptura de la membrana nuclear. En estos diámetros los ovocitos frescos son semitransparentes y es posible observar la gota de aceite.

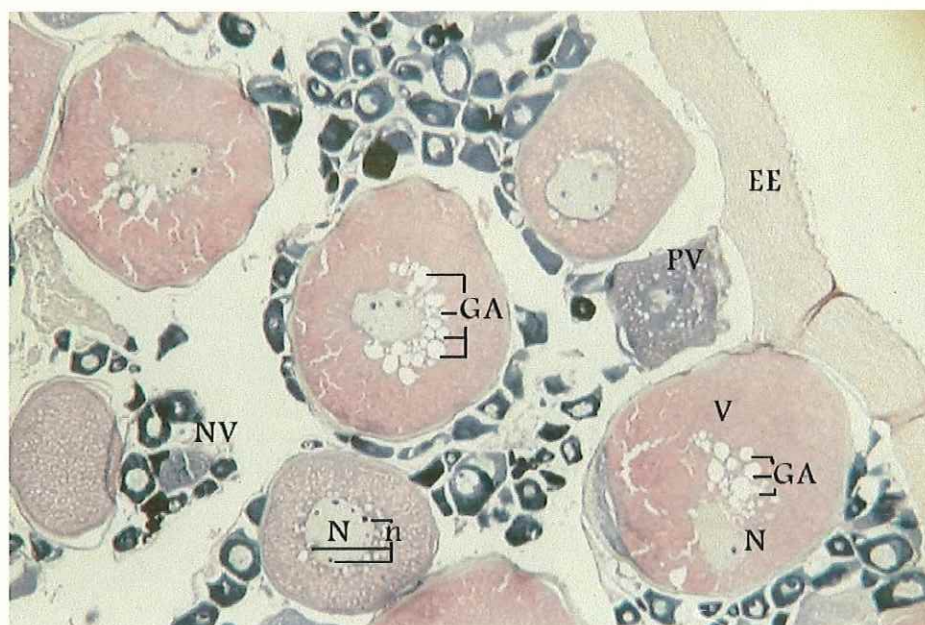


Figura 23. Corte transversal de un ovario maduro de *Paralichthys californicus*. Sección II. (50x) tinción: hematoxilina-eosina. EE, tejido ovárico superficial; NV, ovocitos no vitelados; PV, ovocito parcialmente vitelado; V, ovocito vitelado; GA, gota de aceite; N, núcleo; n, nucléolos.

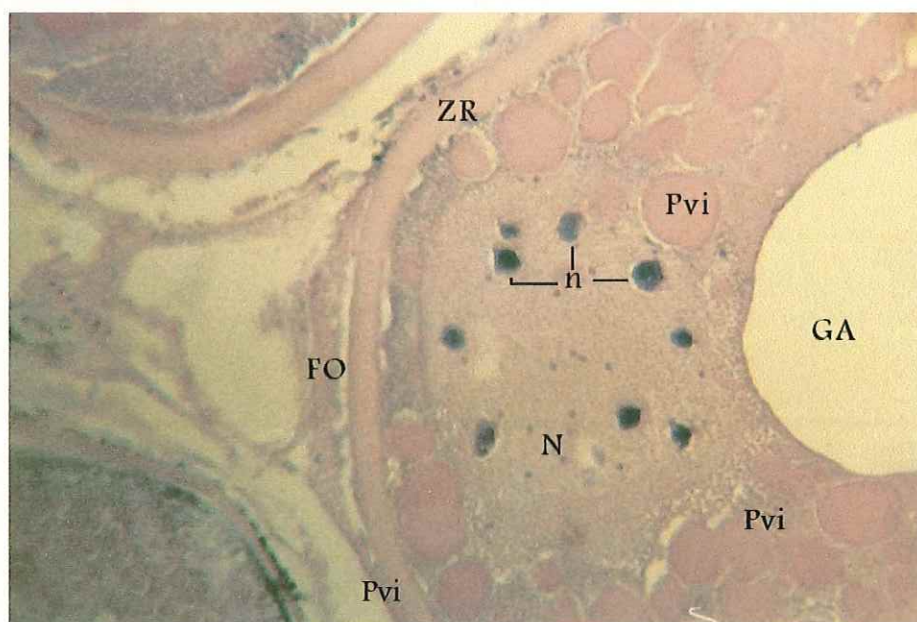


Figura 24. Ovocito de *Paralichthys californicus* en la etapa de maduración final. Sección III. (200x) tinción: hematoxilina-eosina; GA, gota de aceite; Pvi, plaqueta vitelina; N, núcleo; n, nucléolos; ZR, zona radiata; FO, folículo preovulatorio.

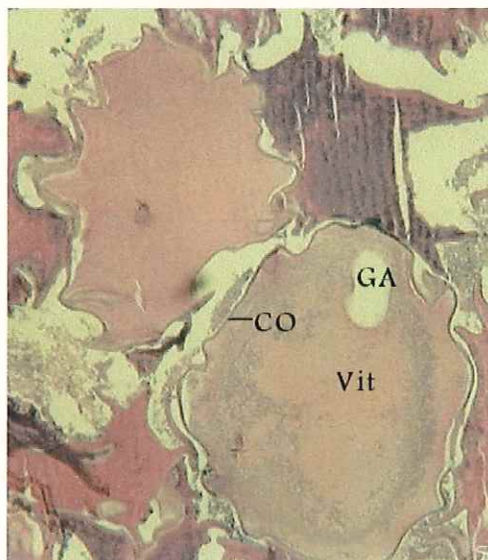


Figura 25. Óvulos de *Paralichthys californicus* colectados en el conducto ovárico cerca del poro genital, deformados en su esfericidad por efecto del proceso histológico. (200x) tinción: hematoxilina-eosina. A, gota de Aceite; Vit, vitelo; CO, corion.

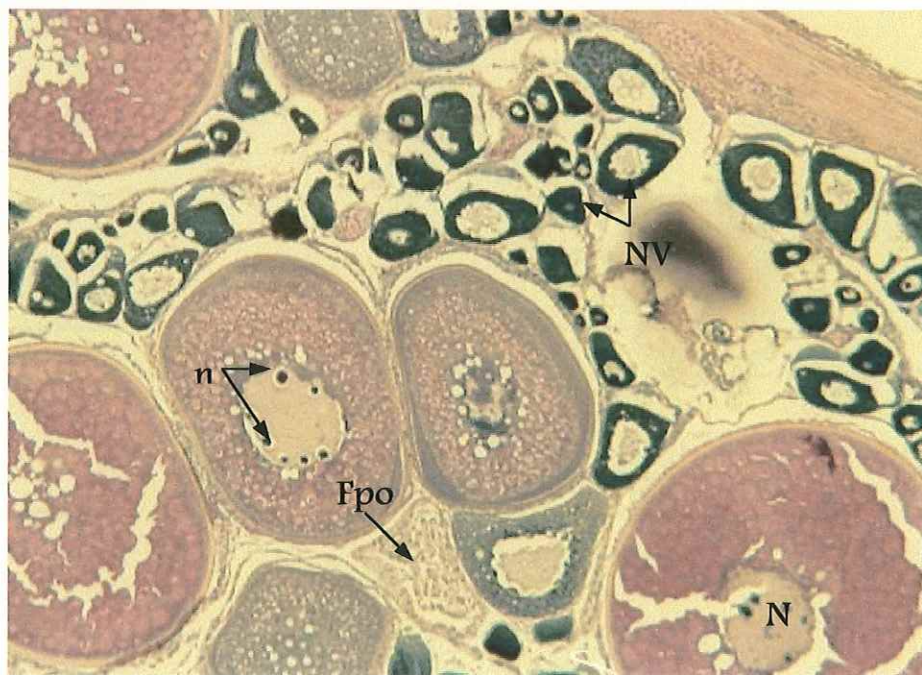


Figura 26. Corte transversal de un ovario maduro de *Paralichthys californicus* con un folículo postovulatorio. Sección V. (200x) tinción: hematoxilina-eosina. Fpo, folículo postovulatorio; NV, ovocito no vitelado; N, núcleo; n, nucléolo.

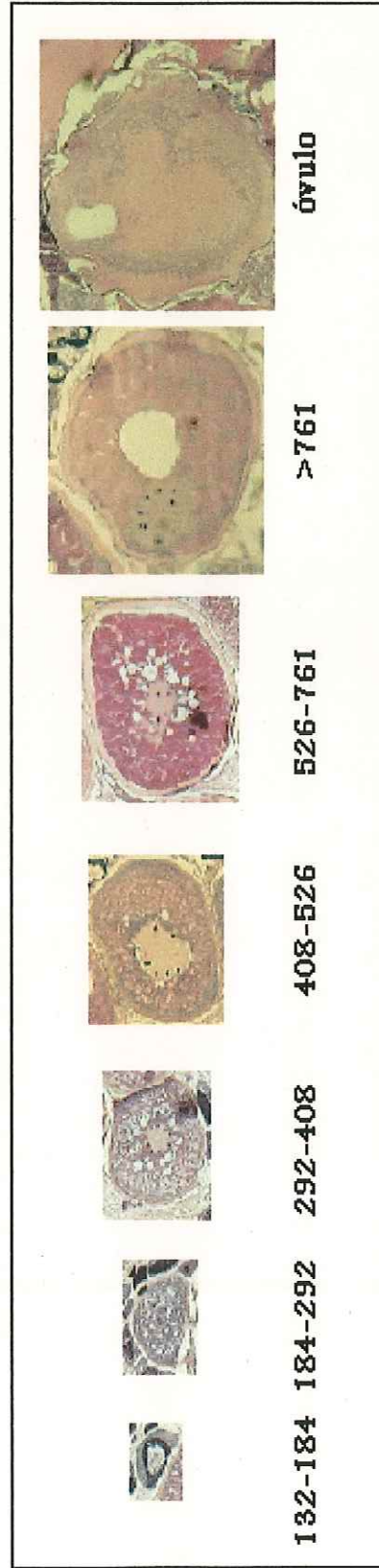


Figura 27. Escala de maduración y crecimiento de los ovocitos de *P. californicus* por intervalos de diámetro.

ANÁLISIS DE OVOCITOS INTRAOVÁRICOS

Al igual que en el análisis de las frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros que se realizó en la secciones de la gónada, los ovocitos extraídos con el catéter tuvieron una distribución bimodal (Figuras 28, 29 y 30). Las modas se ubicaron en los intervalos de diámetro de 184-292 μm (moda 1) y 526-761 μm (moda 2) en todas las muestras.

La mayor longitud a la que se logró introducir el catéter por el poro genital fue de 10.7 cm, aproximadamente entre las secciones I y III del ovario. Es posible que esto se deba al cambio en la posición del conducto ovárico cercano a la sección III. En esta profundidad, la moda 1 de la distribución de frecuencias de ovocitos fue menor a la moda 2. Se observó mayor abundancia de los ovocitos de diámetro igual o mayor a 526 μm . En las otras dos profundidades de donde se tomaron las muestras de los ovocitos, la moda 1 fue mayor a la moda 2.

Para conocer si existía alguna relación entre las distribuciones de frecuencias de los ovocitos por intervalos de diámetro de cada profundidad analizada se realizó un análisis con una tabla de contingencia de 3 x 6. Al comparar las frecuencias esperadas contra las observadas con una prueba de X^2 , resultó que la distribución de frecuencias de los ovocitos depende del lugar de donde se extrae la muestra ($P < 0.001$).

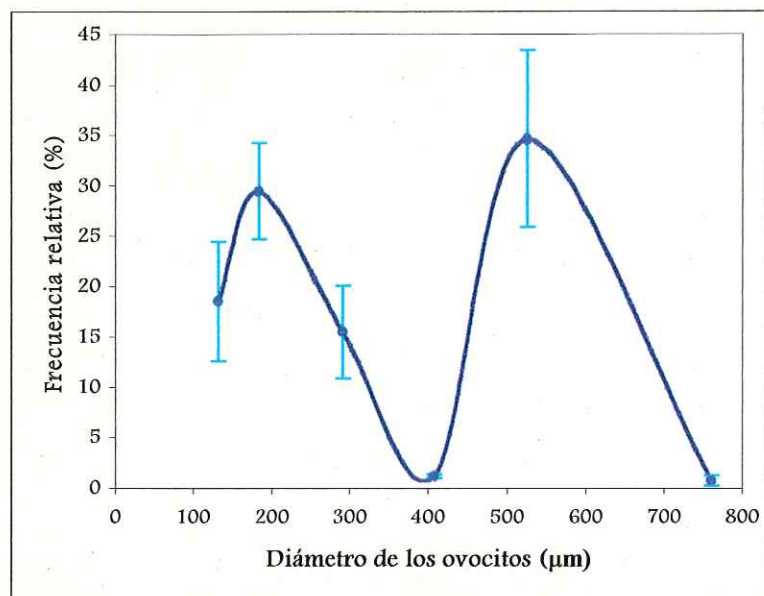


Figura 28. Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de *Paralichthys californicus* extraídos mediante muestreo intraovárico a 10.7 cm de profundidad. I error estándar.

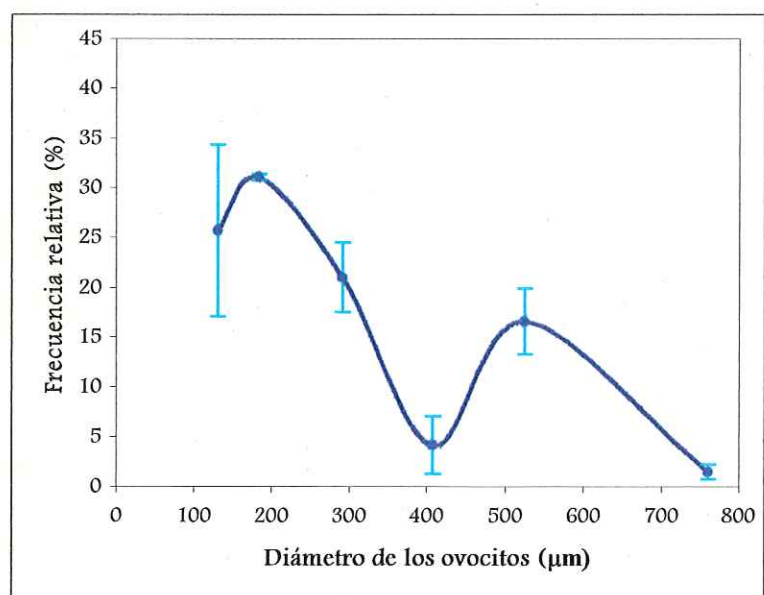


Figura 29. Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de *Paralichthys californicus* extraídos mediante muestreo intraovárico a 8 cm de profundidad. I error estándar.

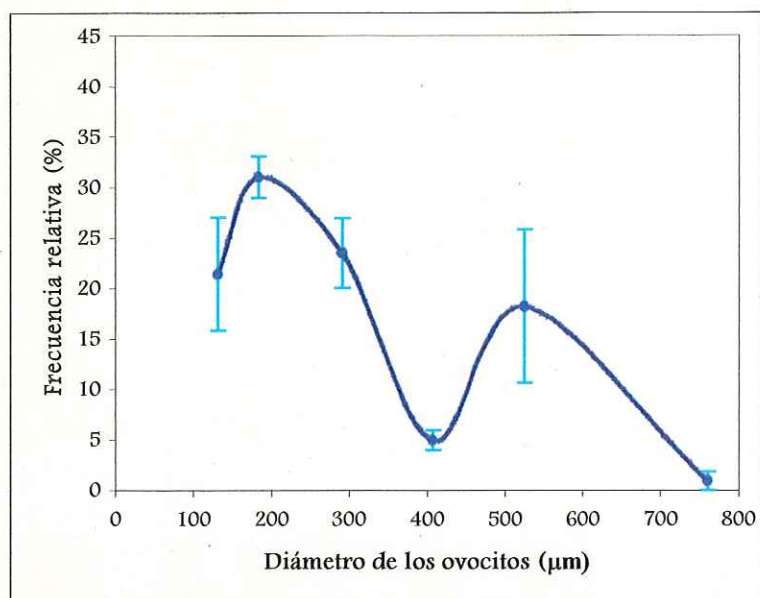


Figura 30. Frecuencia relativa por intervalos de diámetro de los ovocitos de *Paralichthys californicus* extraídos mediante muestreo intraovárico a 4 cm de profundidad. I error estándar.

ESCALA PROPUESTA PARA LA INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE OVOCITOS INTRAOVÁRICOS

Para estimar cual es la frecuencia de ovocitos por grados de madurez de un ovario maduro, se promediaron las frecuencias relativas de los análisis de ovocitos intraováricos y de la sección I del ovario que tuvo un estado de madurez más avanzado. Las frecuencias se agruparon en categorías por intervalos de diámetro (Tabla VII). La categoría de ovocitos inmaduros agrupa a los gametos que no han terminado la etapa de la vitelogénesis y van de 132 a 500 μm y la de los ovocitos maduros, que incluye a todos los gametos mayores de 500 μm e incluye a los ovocitos en la etapa de maduración final y a los ovocitos maduros. Para estimar el tiempo aproximado en el que se lleva a cabo la gametogénesis se tomaron en cuenta los resultados de los desoves de *P. californicus* estudiados por Caddel *et al.* (1990). La gametogénesis del lenguado de California toma aproximadamente de tres a cuatro meses.

Con base en los resultados, es posible establecer los criterios que fundamenten el análisis del estado de madurez sexual de *Paralichthys californicus* (Ayres). A continuación se describe la metodología recomendada:

- Para aumentar la probabilidad de obtener hembras maduras sexualmente, seleccione organismos mayores de 2 kg (que ya pasaron su edad de primera madurez).
- Anestesia a los organismos antes del análisis. Puede utilizar cualquiera de los dos compuestos siguientes (Stoskopf, 1993):
 - MS222 (Sulfonato de Tricainmetano). A una concentración de 1:10,000 (anestesia quirúrgica).
 - 2 Fenoxietanol a una concentración de 0.1- 0.5 ml/l.
- El catéter a utilizar deberá tener un diámetro interno de 1.625 mm y de 3.25 mm de diámetro externo, para que los ovocitos pasen libremente.

- Desinfecte el catéter con una solución comercial (Isodine) antes de introducirlo en el organismo. Enjuague el catéter en agua previamente esterilizada. En todos los casos utilice guantes para disminuir las posibilidades de contaminación.
- Introduzca el catéter por el poro genital aproximadamente 10 cm en dirección hacia la aleta caudal (Figura 7).
- Succione suavemente por el catéter y retírelo lentamente (puede ser con una perilla o jeringa).
- Coloque la muestra de ovocitos en un recipiente con 10 ml de la solución conservadora de formaldehído al 1% y NaCl al 0.6% en donde permanecerá hasta su análisis.
- Disgregue los ovocitos aglomerados con agujas de disección.
- Separe los ovocitos a través de un tamiz de 500 μ m (tamiz 1) y después separe el resto a través de un tamiz de 132 μ m (tamiz 2).
- Cuente los ovocitos remanentes en cada tamiz.
- Determine el porcentaje de ovocitos que representa cada porción.
- Compárelo con el siguiente criterio:

Tabla VIII. Escala propuesta para la interpretación de los análisis de ovocitos intraováricos de *Paralichthys californicus*.

132-500 μ m	>500 μ m	Estado de madurez del ovario	Acción recomendada
<70%	=>30%	Totalmente maduro	Realice la inducción hormonal
75-80%	20-25%	Ovario próximo a la maduración	Repita el análisis en un mes.
85-90%	10-15%	Ovario en maduración	Repita el análisis en 1.5-2 meses
95-100%	0-5%	Inmaduro	Repita el análisis en 2-2.5 meses

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron variables importantes para validar una técnica para estimar la madurez sexual de *Paralichthys californicus* *in vivo*. Se estudiaron el índice gonadosomático, el estado de madurez sexual (Nikolsky, 1963, Tucker 1998) y se analizó la estructura macro y microscópica de las gónadas.

El índice gonadosomático de *Paralichthys californicus* fue muy variable, ya que en este estudio se obtuvo a partir de organismos maduros e inmaduros de diferentes longitudes y masas (22 a 108 cm de longitud total y de 0.4 a 22 kg). Sin embargo el 95.2% de las muestras correspondió a organismos de 0.4 a 5 Kg. El IG promedio para las muestras obtenidas fue de 2.86 con una desviación estándar de 2.8. Se encontraron algunos valores del IG más altos que los reportados por Carrillo-Cortés (1994), ya que su muestreo se ubicó dentro del Estero de Punta Banda (zona somera) y en la Bahía de todos Santos a 5 y 10 m de profundidad y correspondió en su mayoría a organismos menores de 1 kg, principalmente juveniles y preadultos mientras que en este trabajo la mayoría de los organismos utilizados pesaron más de 1 kg. La presencia de organismos de estas tallas concuerda con lo informado por otros autores, ya que es conocido que *Paralichthys californicus* utiliza las bahías como zonas de crianza (Allen, 1990; Haaker, 1975; Kramer, 1990; Kramer 1991a; Kramer, 1991b) incluida la Bahía de Todos Santos (Ramírez-González, 1990). Además, Kramer (1991a) encontró que en la distribución del lenguado de California también existe una relación entre la longitud total de los organismos y la profundidad, los organismos mayores se encuentran a profundidades mayores, Carrillo-Cortés (1994) realizó sus muestreos en zonas someras esto contribuye al hecho de que haya encontrado principalmente organismos pequeños.

En este trabajo se analizaron organismos que provienen de la pesca comercial y que fueron capturados dentro de la Bahía de todos Santos a diferentes profundidades y en otros sitios de pesca como San Quintín, Eréndira, El Rosario y Bahía Magdalena, B.C. por lo que el tamaño de los organismos es mayor.

Aún cuando no existieron diferencias significativas entre el diámetro de los ovocitos que se preservaron en la solución de 1%-0.6% y 1%-0.4% de formaldehído y NaCl respectivamente, la significancia de la prueba de Wilcoxon fue mayor en el primer caso ($p = 0.861$) por lo que fue la concentración seleccionada para preservar las muestras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Shehadeh *et al.* (1973), que preservó ovocitos de hembras de *Mugil cephalus* con la misma solución. Álvarez-Lajonchere *et al.* (1983) también utilizaron esta solución en el análisis de ovocitos de *Mugil lisa*, *Mugil curema* y *Eugerres brasiliensis*.

Las características utilizadas por Nikolsky (1963) para estimar la madurez sexual y el análisis del IG, son útiles para conocer el estado de madurez sexual de los organismos y en particular fueron muy útiles en la selección de los ovarios analizados en este trabajo. Sin embargo estas dos técnicas son invasivas ya que es necesario disecar la cavidad abdominal para extraer el ovario, observar las características morfológicas y medir el peso de cada gónada por lo que estas técnicas no son convenientes cuando se desea monitorear el estado de la madurez sexual cuando los organismos se dedicarán a la reproducción controlada. Tucker (1998) menciona que el abultamiento del abdomen y su dureza al tacto, la papila urogenital turgente y rojiza son otras características utilizadas como criterios para estimar la madurez, Björnsson (1995) consideró sexualmente maduras a las hembras de lenguado del Pacífico (*Hippoglossus hippoglossus*) que presentaron el abdomen abultado. Sin embargo, todas estas técnicas no dan información sobre el estado de desarrollo de los gametos e incluso se puede sobreestimar el estado de madurez de los organismos. Álvarez-Lajonchere *et al.* (1983)

aseguran que la presencia de este tipo de signos puede deberse también a otras causas no relacionadas con la madurez de las gónadas y por lo tanto estos resultados pueden confundir a la persona que desea conocer el estado de madurez de las hembras que podrían ser destinadas a la inducción hormonal de un desove.

A diferencia de los métodos antes mencionados, la estimación de la madurez por medio del muestreo *in vivo* de ovocitos intraováricos da una certeza del estado fisiológico en que se encuentra el ovario (Shehadeh *et al.* 1973) ya que es posible conocer en que etapa o etapas de desarrollo se encuentra la mayoría de los ovocitos mediante un análisis directo. Por medio de la medición del diámetro de los gametos se puede realizar la evaluación del estado de madurez si tener que recurrir a las técnicas histológicas para cada organismo (Shehadeh, *et al.* 1973; Álvarez-Lajonchere, *et al.* 1983). El crecimiento de los ovocitos es una característica inherente al proceso de maduración, los que se encuentran en etapas tempranas de su desarrollo son de menor tamaño y conforme van madurando, su diámetro aumenta. Si se correlacionan las características físicas que indican el grado de madurez de los ovocitos con su tamaño, es posible utilizar su diámetro como un indicador de la madurez sexual del organismo.

Sin embargo, para poder sustituir el análisis histológico de los ovocitos con el análisis por diámetros es necesario correlacionar el estado de maduración de los ovocitos con su diámetro para conocer cuál es el diámetro adecuado que representa a un ovocito en la etapa de maduración final y así evitar problemas de fertilización y sobrevivencia de los huevos derivados de una inducción hormonal demasiado temprana. Caddel *et al.* (1990) realizaron monitoreos de la madurez de *P. californicus* mediante extracción de ovocitos intraováricos y aparentemente asumieron que los organismos estaban maduros por la sola presencia de ovocitos esféricos, de un diámetro mínimo promedio de 400 μm con el vitelo de color amarillento-anaranjado. Sin embargo el color amarillento no translúcido es característico de ovocitos cuyo núcleo aún no ha migrado a la periferia y es probable que ni siquiera hayan

terminado su proceso de vitelogénesis. En el presente trabajo los ovocitos correspondientes al intervalo de 408-526 μm aún no comenzaban su maduración final ya que no aparecieron ovocitos translúcidos.

Además de la estimación de la madurez, con esta técnica no invasiva también es posible hacer un monitoreo de la tasa de crecimiento de los ovocitos y del efecto que diferentes factores ambientales pueden tener en la ovogénesis. Tamaru *et al.* (1994) utilizaron esta técnica para estimar el efecto de la exposición de *M. cephalus* a tres distintas salinidades en el crecimiento de los ovocitos.

Las diferencias en la ubicación del ovario en la cavidad abdominal de *P. californicus* en comparación con otros grupos de teleósteos deben ser consideradas en las técnicas de evaluación *in vivo* para saber la dirección en que será introducido el catéter. En este caso debe ser hacia la parte posterior del organismo, ya que si el catéter es dirigido hacia la parte anterior como se hace generalmente, es posible que entre en el intestino del pez en vez de recorrer el conducto ovárico.

La anatomía del ovario es la que determina el grosor del catéter, y la profundidad máxima de muestreo. Shehadeh *et al.* (1976) tomaron las muestras *in vivo* a 6.5 cm a partir del poro genital y mencionan que en *Mugil cephalus* lo único que se debe evitar es muestrear en los extremos del ovario, es decir que las muestras son válidas si se toman en cualquier otra región. A diferencia de aquella especie, en *P. californicus* la forma del ovario sólo permite introducir el catéter hasta el lugar donde se encuentra la espina hemal que es aproximadamente un 15 % de la longitud total del organismo. En cualquiera de los casos el catéter debe introducirse despacio y cuidadosamente ya que si es forzado puede causar severos daños en el organismo. A diferencia de *M. Cephalus*, la sección II no es accesible por medio del catéter ya que no es posible controlar la dirección en la que penetra el catéter una vez

introducido en el ovario de un organismo vivo. Estas aparentes limitaciones en la introducción del catéter contribuyen a disminuir las posibilidades de cometer algún error en la extracción de una muestra de ovocitos de *P. californicus*.

El conducto ovárico cambia de posición a lo largo del ovario, aunque se observa con mayor claridad que en la parte anterior, se proyecta excéntricamente cerca del margen exterior de la gónada, en los peces inmaduros es muy estrecho y su diámetro se incrementa cuando los peces maduran, en algunos ovarios maduros se encontraron aglomeraciones de óvulos. Rojo (1988), Hoar, (1969) y Nagahama (1983) describen al conducto ovárico como una cavidad donde los óvulos se mantienen temporalmente hasta que son desovados. Es posible que en el lenguado de California en un tiempo previo al desove, la parte anterior del conducto ovárico tenga la función de ser un almacén para los óvulos. Esto puede ser una ventaja al momento del desove ya que los óvulos pueden ser expulsados con menos esfuerzo y con mayor rapidez.

Al igual que otros lenguados como *Hippoglossus hippoglossus* (Holmefjord, 1991; Lein, 1991) y *Liopsetta obscura* L. (Nagahama, 1983), *Paralichthys californicus* es un desovador parcial ya que además de presentar ovocitos en diferentes estados de desarrollo, desova más de una vez en cada temporada (Caddel, *et al.* 1990). La presencia de ovocitos en todos los estados de madurez en el ovario no necesariamente implica que el pez sea un desovador parcial, ya que en algunos peces los ovocitos menos desarrollados (no vitelados) o en los primeros estadios de la vitelogénesis permanecen en el ovario después del desove y se reabsorben gradualmente (Nikolsky, 1963). El análisis histológico de las gónadas reveló la presencia de folículos postovulatorios, estructuras caracterizadas por tener la capa de teca muy vascularizada y las células de la granulosa hipertrofiadas (Nagahama, 1983). Según Tapia-Vázquez *et al.* (1997) la presencia de estas estructuras indica que los organismos analizados ya habían desovado anteriormente en esta temporada.

Además de ser un desovador parcial, *P. californicus* desova en forma sincrónica por grupos, pues según Nagahama (1983) este tipo de reproducción se caracteriza por presentar al menos dos poblaciones de ovocitos de diferentes estados de desarrollo. En las secciones de las gónadas maduras se observó una distribución bimodal, con una moda en el intervalo de 292 a 408 μm y otro en el de 526 a 761 μm . Este arreglo corresponde a un proceso de maduración por generaciones u oleadas de ovocitos. Caddel *et al.* (1990) observaron que *P. californicus* desovó 13 veces con intervalos de 7 días.

Esta estrategia reproductiva tiene muchas ventajas adaptativas, según Nikolsky (1963) los desoves parciales pueden contribuir a preservar la especie en ambientes donde la sobrevivencia es baja. En las zonas templadas, la abundancia de alimento fluctúa durante el año como una consecuencia de las variaciones estacionales y donde las tormentas pueden acabar con una generación de huevos pelágicos, un desove parcial, solo representa la pérdida de una fracción del potencial reproductivo de la población. Además un desovador parcial posee mayor fecundidad con respecto a los desovadores totales que solo pueden producir el número de ovocitos que son capaces de almacenar en sus ovarios (Nikolsky, 1963).

Shehadeh *et al.* (1973) estimaron las frecuencias de ovocitos por intervalos de diámetros en *Mugil cephalus* y encontraron una distribución unimodal. *M. cephalus* es un desovador total o sincrónico, por lo que todos sus ovocitos maduran al mismo tiempo (Nagahama (1983). Álvarez-Lajonchere *et al.* (1983) también encontraron una distribución unimodal de frecuencias de los diámetros de los ovocitos en *M. lisa* y *M. curema*, no observaron diferencias significativas entre las secciones muestreadas de las gónadas de estas dos especies; ya que todas tuvieron una distribución unimodal. En los ovarios de *E. brasiliensis* encontraron ovocitos en distintos estadios de maduración, aquellos alojados en el centro del ovario y el canal ovárico tuvieron un diámetro mayor. Según las consideraciones de

Nagahama (1983) y Jobling (1995), es posible que este pez sea desovador parcial, ya sea asincrónico (presenta ovocitos en varios estados de desarrollo y desova muchas veces en una temporada reproductiva corta) o sincrónico por grupos (Nagahama, 1983)

También es necesario saber cuál es la frecuencia de ovocitos maduros con respecto a los demás ovocitos presentes en un ovario maduro para decidir con precisión el momento de la inducción hormonal (Álvarez-Lajonchere *et al.* 1983). Las frecuencias de ovocitos de distintos diámetros en el ovario de *P. californicus* varía entre las secciones del ovario estudiadas, lo que indica que este arreglo depende de cada sección, aún cuando en todos los cortes histológicos de los ovarios maduros se observaron ovocitos en las últimas fases de la maduración. Oda (1991) asegura que el diámetro de un huevo de *P. californicus* mide de 640 a 830 μm , Ahlstrom y Moser (1975) afirman que miden 900 μm . Sin embargo, la mejor forma de correlacionar el diámetro de los huevos y de los ovocitos con su estado de maduración es observando sus características por medio de cortes histológicos.

El criterio de interpretación del análisis *in vivo* que se propone en este trabajo se aplica solo para *P. californicus* ya que el diámetro de los ovocitos y las características anatómicas de los organismos varían entre especies. Los ovocitos de *Mugil lisa* y *Mugil curema* son aproximadamente de 600 μm de diámetro (Álvarez-Lajonchere, 1983) y en *Mugil cephalus* son de 550 a 650 μm (Shehadeh, 1973).

A diferencia de *M. cephalus* (Shehadeh, 1973), *M. lisa* y *M. curema* (Álvarez-Lajonchere, 1983) la distribución de frecuencias de ovocitos por intervalos de diámetro en *P. californicus* varía a lo largo del ovario por lo que la muestra de ovocitos se debe extraer de la sección I, ya que las muestras extraídas con el catéter fueron representativas del grado de madurez de las secciones donde fueron tomadas y tuvieron la misma tendencia bimodal, con cada moda en el mismo intervalo de diámetro. Este comportamiento coincidió con el análisis

histológico, donde se encontró una menor cantidad de ovocitos de diámetro intermedio. Por lo que la técnica del muestreo *in vivo* de los ovocitos sí puede ser utilizada para estimar el grado de madurez de *P. californicus*.

La tabla de interpretación del análisis *in vivo* contempla la separación de las frecuencias de ovocitos de diferentes diámetros fijando como criterio de decisión el término de la vitelogénesis, que ocurre cuando su diámetro es de 500 μm aproximadamente. Sin embargo la tabla considera solamente dos intervalos de diámetro, ya que esto permite que el método sea aplicado más fácil y rápidamente, pues en cuestión de tiempo es más conveniente analizar solo dos fracciones por hembra, para poder analizar una mayor cantidad de organismos y detectar el estado de madurez sexual de los organismos antes de que ocurra la sobremaduración, en caso de que sus ovarios se encuentren maduros y así aplicar la inducción hormonal a tiempo.

Las cuatro alternativas en que se dividió la interpretación del análisis *in vivo* facilitan el manejo de las muestras y el monitoreo de la madurez sexual. Las acciones sugeridas en cada uno de los casos se basaron en el tiempo aproximado que dura la ovogénesis en esta especie, de 3 a 4 meses de acuerdo con los resultados de Caddel *et al.* (1990) para hembras que desovaron al término de este periodo, contado a partir de los días en que la temperatura y la fotofase fueron más bajas.

CONCLUSIONES

El muestreo *in vivo* de ovocitos intraováricos es la mejor opción no invasiva para conocer la madurez sexual de las hembras del lenguado de California *Paralichthys californicus*.

Los ovocitos de *Paralichthys californicus* se distribuyen longitudinalmente con una mayor frecuencia de ovocitos maduros en la parte anterior del ovario.

En los ovarios inmaduros de *Paralichthys californicus* existe un gradiente transversal de madurez que se incrementa desde la periferia de la gónada hacia el conducto ovárico, este patrón desaparece al madurar el ovario.

En *Paralichthys californicus* la presencia de ovocitos de diámetro igual o mayor a 500 μm en una proporción mayor al 30% indica que el ovario esta completamente maduro.

La descripción histológica de los ovarios demostró que *Paralichthys californicus* es un desovador parcial.

RECOMENDACIONES

Como resultado de este trabajo, se propone complementar la información con otros estudios relacionados con el proceso de maduración sexual de las hembras de *Paralichthys californicus*, tomando como base la técnica de extracción de muestras intraováricas para describir la ovogénesis a lo largo del ciclo reproductivo.

También se recomienda experimentar la inducción hormonal tomando como base los criterios de madurez descritos en este trabajo para correlacionarlos con la viabilidad de los huevos y el desarrollo de las larvas de *Paralichthys californicus*.

LITERATURA CITADA

- Alhstrom, E. H. y H. G., Moser. (1975). Distributional atlas of fish larvae in the California current region: Flatfishes, 1955 through 1960: in CalCOFI atlas No. 23.
- Allen, M. J. (1990). The biological environment of the California halibut, *Paralichthys californicus*. Fish Bulletin. 174:7-15.
- Álvarez-Lajonchere, L., J. Berdayes-Arritola, J. Díaz-Bellido y O. Laiz-Averhoff. (1983). Método de muestreo *in vivo* de ovocitos intraováricos en las lisas *Mugil liza* y *M. Curema* (Pisces, Mugilidae) y en el Patao *Eugerres Brazilianus* (Pisces, Gerreidae). Revista Latinoamericana de Acuicultura. 18:27-37.
- Balinsky, B. I. (1978). Introducción a la Embriología. Omega. Barcelona, España.. 644 pp.
- Barsky, K. C. (1990). History of the commercial California halibut fishery. Fish Bulletin. 174:217-227.
- Björnsson, B. (1995). The growth and sexual maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large tanks for 3 years. Aquaculture. 138:281-290.
- Bromage, N., R. Shields, C Young, M. Bruce, N. Basavaraja, J. Dye, P. Smith, M. Gillespie, J. Gamble y K. Rana. (1991). Egg quality determinants in finfish with special reference to the timing of stripping and methods of fertilization in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Larvi91. Fish & Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society. Special Publication No.15. Gent. Bélgica. p.201-202.

Buenfil-López, J. L., (1990). Aspectos biológicos del lenguado de California *Paralichthys californicus* (Ayres) en la laguna costera "Estero de Punta Banda", Ensenada, Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. 45 pp.

Caddel, S. M., D. M. Gadomski y L. R. L. Abbott. (1990). Induced spawning of the California halibut, *Paralichthys californicus*, (Pisces: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. Fish Bulletin. 174:175-198.

Carrillo-Cortés, J. A. (1994). Estructura y características poblacionales del lenguado de California *Paralichthys californicus* (AYRES) en la Bahía de Todos Santos y el estero de Punta Banda durante los meses de Abril de 1992 a Marzo de 1993. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. 52 pp.

Evans, D. H. (1993). The Physiology of Fishes. CRC Press. E.U.A. 592 pp.

García-Franco, W., J. T. Silva-Ramírez, M. S. De la Rosa y J. A. Figueroa-Luna. (1998). Catálogo de Especies Marinas de Baja California. Dirección de Pesca. Secretaría de Desarrollo Económico del Estado de Baja California. Gobierno del estado de Baja California. 130 pp.

Goetz, F. W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. 117-169. En: Hoar, W. S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (Ed). Fish Physiology. Vol. IX: Behavior and Fertility Control. Academic Press. E.U.A. 483 pp.

Haaker, P. L. (1975). The biology of the California halibut *Paralichtys californicus* (Ayres) in Anaheim Bay. Department of fish and game. Fish Bulletin 165: 137-151pp.

Hoar, W. S. (1969). Reproduction. 1-71. En: Hoar, W. S., D.J. Randall (Ed.). Fish Physiology. Vol. III. Academic Press. E.U.A.

Holmefjord, I. (1991). Timing of stripping relative to spawning rhythms of individual females of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Larvi '91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Book of Abstracts. p. 203-204.

Jobling, M. (1995). Environmental Biology of Fishes. Chapman & Hall. Gran Bretaña. 455 pp.

Kramer, S. H. (1990). Distribution and abundance of juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, in shallow waters of San Diego county. Fish Bulletin 174: 99-125 pp.

Kramer, S. H. (1991a). Growth, mortality and movements of juvenile California halibut *Paralichthys californicus* in shallow coastal and bay habitats of San Diego county, California. Department Fish and Game, Fish Bulletin 89 (2): 195-207 pp.

Kramer, S. H. (1991b). The shallow-water flatfishes of San Diego County. CalCOFI Rep., vol 32.

Lein, I. (1991) Viability of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs exposed to seawater before fertilization. Larvi '91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Book of Abstracts. p. 205-206.

Love, S. M. y A. Brooks. (1990). Size and age at first maturity of the California halibut, *Paralichthys californicus*, in the southern California Bight. Fish Bulletin. 174: 167-74.

Miller, D. J. y R. N. Lea. (1972). Guide to the Coastal Marine Fishes of California. Department of Fish and Game. Fish Bulletin 157. 235 pp.

Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. 223-276. En: Hoar, W. S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (Ed.). Fish Physiology. Vol. IX: Endocrine Tissues and Hormones. Academic Press. E.U.A. 483 pp.

Nikolsky, G. V. (1963) The Ecology of Fishes. 6ª Ed. Academic Press Publication. Inc. Ltd. London. Londres Inglaterra, 325 pp.

NOAA. (1983). Technical Memorando. Histological techniques for marina bivalve mollusks. NMFS-F/NEC-25. US. Department of Comerse.

Norman, J. R. (1966). A Systematic Monograph of the Flatfishes (Heterosomata). Vol 1. Psettodidae, Bothidae, Pleuronectidae. Estados Unidos de América 459 pp.

Oda, D. (1991) Development of eggs and larvae of California halibut *Paralichthys californicus* and fantail sole *Xystreurys liolepis* (Pisces: Paralichthyidae). Fishery Bulletin, U.S. 89:387-402.

Ramírez-González, A. A. (1990). Distribución y abundancia de *Paralichthys californicus* y análisis de la ictiofauna de acompañamiento de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. 70 pp.

Rojo, A. L. 1988. Monografías, Instituto Español de Oceanografía: Diccionario Enciclopédico de Anatomía de Peces. No. 3. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 66 pp.

Shehadeh, Z. H., Ch. M. Kuo y K. K. Milisen. (1973). Validation of an *in vivo* method for monitoring ovarian development in the grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Journal of Fish Biology. 5:489-496.

Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University Press. New York, E.U.A.. 448 pp.

Stoskopf, M. K. (1993). Fish Medicine. W. B. Saunders Co.. México, D.F. 882 pp.

Tapia-Vázquez, O. M., J. J. Castro-González, M. I. Montes-Pérez y E. A. Inda Presichi. (1997) Curso teórico práctico Determinación de la madurez y fecundidad en especies de importancia comercial. SEMARNAP-UABC. Facultad de Ciencias-Centro regional de investigación pesquera. Univerdidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. 37 pp.

Tamaru, C. S., C. S. Lee, C. D. Kelley, G. Miyamoto y A. Moriwake. (1994). Oocyte growth in the striped mullet *Mugil cephalus* L. Maturing at different salinities. Journal of the World Aquaculture Society. 25(1): 109-114.

Tucker, J. W. (1998). Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. E.U.A. 750 pp

Zar, J. H. (1984). Biostatistical Análisis. 2ª Ed.. Prentice Hall. E.U.A. 718 pp.

APÉNDICE

Tabla I. Composición química de la solución fijadora de Davidson.

Sustancia	Volumen (ml)
Etanol (96%)	330
Formaldehído	220
Ácido acético glacial	115
Agua destilada	335

Tabla II. Técnica utilizada en la deshidratación de los tejidos para la preparación de cortes histológicos

Sustancia	Tiempo de Exposición
Etanol al 70%	½ hora
Etanol al 96% I	2 horas
Etanol al 96% II	2 horas
Etanol al 100% I	2 horas
Etanol al 100% II	2 horas
Etanol : Benceno 50:50	3 horas
Benceno I	2 horas
Benceno II	2 horas
Benceno-Parafina	2 horas
Parafina I	2 horas
Parafina II	2 horas

Tabla III. Soluciones utilizadas en la desparafinación de los tejidos para la preparación de cortes histológicos de las muestras de *P. californicus*

Sustancia	Tiempo de Exposición
Xileno I	10 minutos
Xileno II	5 minutos
Xileno III	5 minutos
Etanol 100% I	5 minutos
Etanol 100% II	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 10%	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Agua destilada	Hasta su tinción

Tabla IV. Sustancias utilizadas en el proceso de tinción con Hematoxilina – Eosina de las muestras de *P. californicus*.

Sustancia	Tiempo de Exposición
Agua destilada	2 minutos
Hematoxilina	30 minutos
Alcohol ácido	3 segundos
Agua potable	7 minutos
Agua amoniacal	5 segundos
Agua destilada	3 minutos
Alcohol 96 %	3 minutos
Eosina	15 minutos
Alcohol 96 %	25 segundos
Alcohol 96 %	3 minutos
Alcohol 100%	90 segundos
Alcohol 100 %	3 minutos
Alcohol:Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos

Tabla V. Frecuencias absolutas de cada ovario maduro.

Tamiz	Ovario 1					Ovario 2					Ovario 3				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1	129.49	319.76	632.96	0.00	0.00	8.51	9.06	0.00	0.00	0.00	208.17	218.09	174.25	87.29	0.00
2	573.31	793.05	404.60	147.18	520.73	709.66	549.27	365.63	199.34	799.10	4877.50	887.37	889.25	112.00	4169.24
3	2219.89	1652.50	13674.69	323.19	15604.49	2408.36	2111.06	1596.93	1526.82	2224.48	128.86	306.95	8814.23	237.96	133.68
4	6490.38	6101.19	40619.48	1186.90	5804.48	5898.49	6138.46	8260.67	6807.33	5761.39	2005.39	2233.16	1452.58	2501.11	7466.69
5	2980.28	5075.64	23079.07	141.60	4462.18	3398.99	3845.60	1682.68	3939.42	3056.84	2333.87	2606.92	1029.45	2639.06	41265.68
6	676.22	399.02	5538.67	76.91	762.02	946.03	1251.83	610.75	603.38	225285.83	750.95	1158.69	87282.91	1676.49	2453.20
Suma	13070	14341	83949	1875.8	27153.9	13370	13905	12517	13076	237128	10305	7411.18	99642.7	7253.9	55488

Tabla VI. Fórmulas utilizadas en el cálculo de la tabla de contingencia de tres dimensiones. (Zar, 1984)

Prueba	Hipótesis	χ^2 esperada	χ^2 observada	V
General	H ₀ : G, S y T son mutuamente independientes H ₁ : G, S y T no son mutuamente independientes	$(T_i S_j G_k) / N^2$	$\sum \sum \sum [(F_{ijk} - f_{ijk})^2 / f_{ijk}]$	$gts-t-s-g+2$
Parcial 1	H ₀ : T es independiente de G y S H ₁ : T no es independiente de G y S	$T_i(GS)_{ik} / N$	$\sum \sum [(F_{ik} - f_{ik})^2 / f_{ik}]$	$gts-sg-t+1$
Parcial 2	H ₀ : S es independiente de G y T H ₁ : S no es independiente de G y T	$S_j(GT)_{jk} / N$	$\sum \sum [(F_{jk} - f_{jk})^2 / f_{jk}]$	$gts-ts-g+1$
Parcial 3	H ₀ : G es independiente de S y T H ₁ : G es no independiente de S y T	$G_k(TS)_{kj} / N$	$\sum \sum [(F_{kj} - f_{kj})^2 / f_{kj}]$	$gts-tg-s+1$

G=Corrada

S=Sección

T=Tamiz

g=# de gónadas

s=# de secciones

t=# de tamices