

## **5. RESULTADOS.**

### **5.1. RECLUTAMIENTO DE ORGANISMOS.**

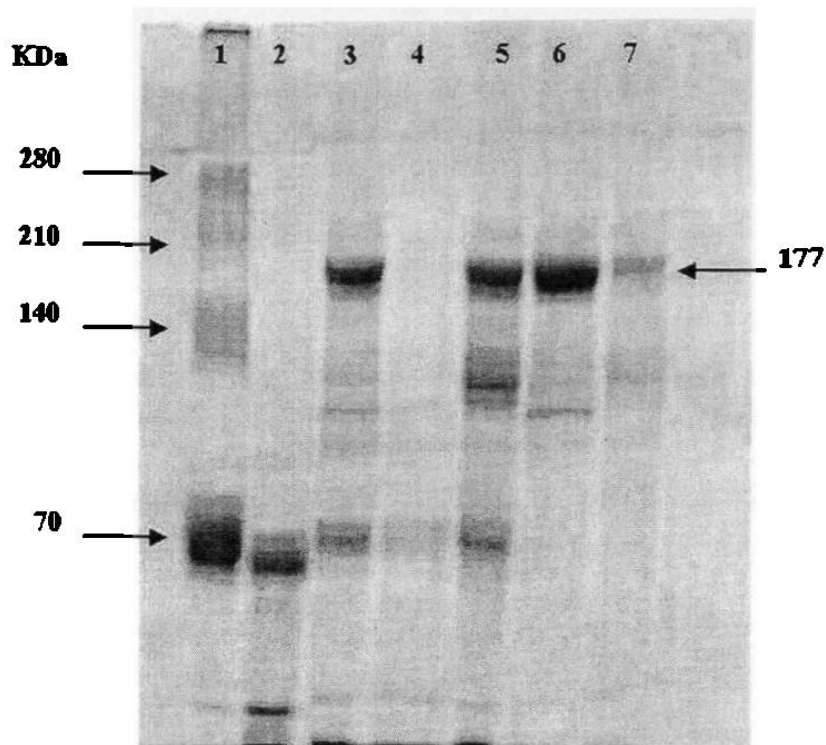
El reclutamiento de organismos en laboratorio permitió completar un lote de trabajo de 130 ejemplares de los cuales 90 organismos correspondieron a ejemplares adultos mayores y adultos jóvenes ( 3 años de edad crecidos en laboratorio) y 40 a ejemplares capturados entre 2000 y 2001, los cuales lograron adaptarse a las condiciones de manejo del laboratorio sin ningún problema de mortalidad.

### **5.2. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO.**

#### *5.2.1. Purificación de la Vitelogenina.*

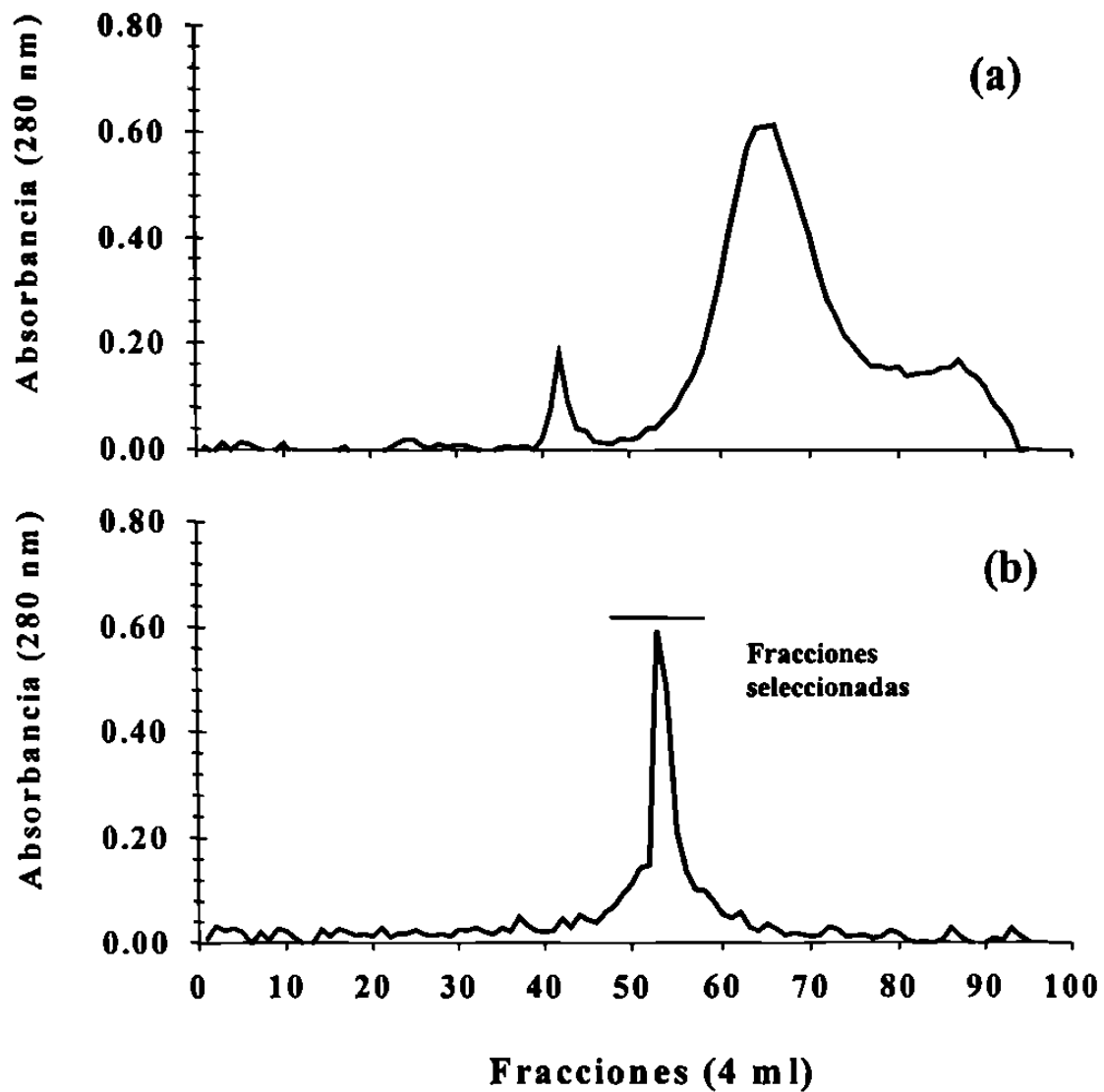
La revisión de las gónadas de los ejemplares tratados con  $17\beta$  estradiol para el proceso inducción y de purificación de la proteína reveló que se trataba de machos. El análisis de los geles SDS-PAGE de las muestras de plasma de los individuos tratados y no tratados indica que los ejemplares inyectados con la emulsión hormonal conteniendo  $17\beta$  estradiol presentan un patrón proteico diferente a los que recibieron la emulsión sin la hormona. Este patrón está caracterizado por la aparición de una banda de 177 KDa en los individuos tratados (Fig.1, carriles 3 y 5) y ausente en los no tratados (carriles 2 y 4). Esta misma banda proteica se mantuvo después del proceso de la precipitación selectiva de vitelogenina (carril 6) y de la filtración en Sepahrose 6B (carril 7) con lo cual se confirmó preliminarmente que se trataba de proteínas inducidas por el  $17\beta$  Estradiol.

Asimismo, se observaron cambios en el contenido de proteína de las muestras de plasma de ejemplares, registrándose diferencias en la concentración de proteína total a la cuarta semana de 39.09 mg/ml en los organismos control y de 53.01 mg/ml para los ejemplares tratados. El proceso de precipitación fue eficiente para eliminar gran cantidad de proteínas plasmáticas, de manera que cuando este procedimiento se aplico al mismo volumen de plasma se recuperaron 0.54 mg/ml en individuos del grupo control y 35.59 mg/ml en los tratados.

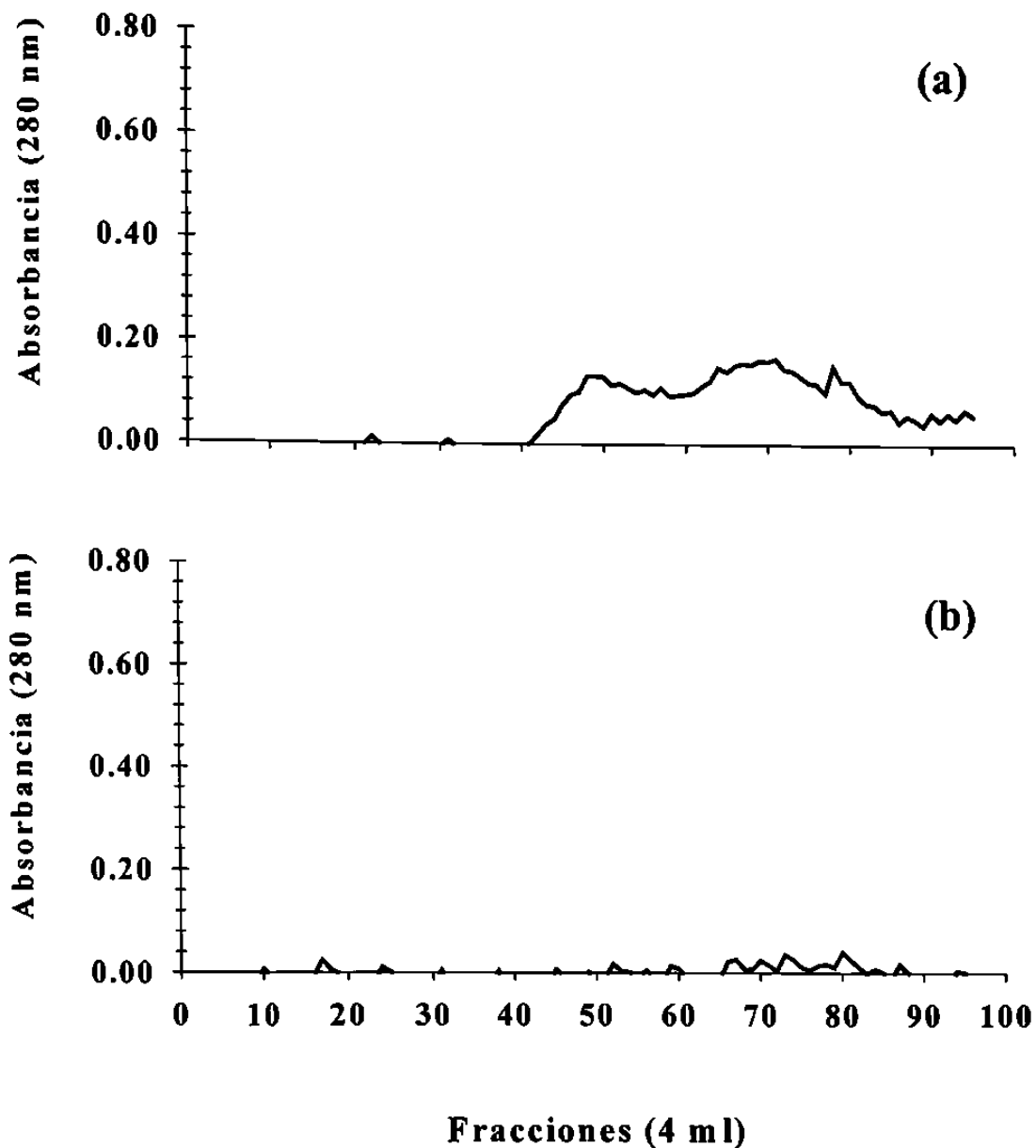


**Figura 1.** SDS-PAGE de plasma de ejemplares no tratados (2 y 4); tratados con estradiol (3 y 5), precipitado de VTG (6); fracción de Sepharosa 6B (7) y marcador de peso molecular Hemocianina (1).

Empleando la precipitación selectiva, previa a la purificación por cromatografía, se obtuvo un número más reducido de fracciones proteicas provenientes de las muestras tratadas con  $17\beta$  estradiol de acuerdo a la absorbancia a 280 nm registrada después de la filtración en Sepharosa 6B (Fig.2, a y b) e intercambio de iones en DEAE Sephacel (Fig. 4). De la misma forma cuando el procedimiento de precipitación se aplicó a plasma de organismos del grupo control, el contenido de proteínas del plasma disminuyó de manera significativa en las fracciones cromatográficas y no apareció ningún pico en los cromatogramas (Fig.3, a y b).

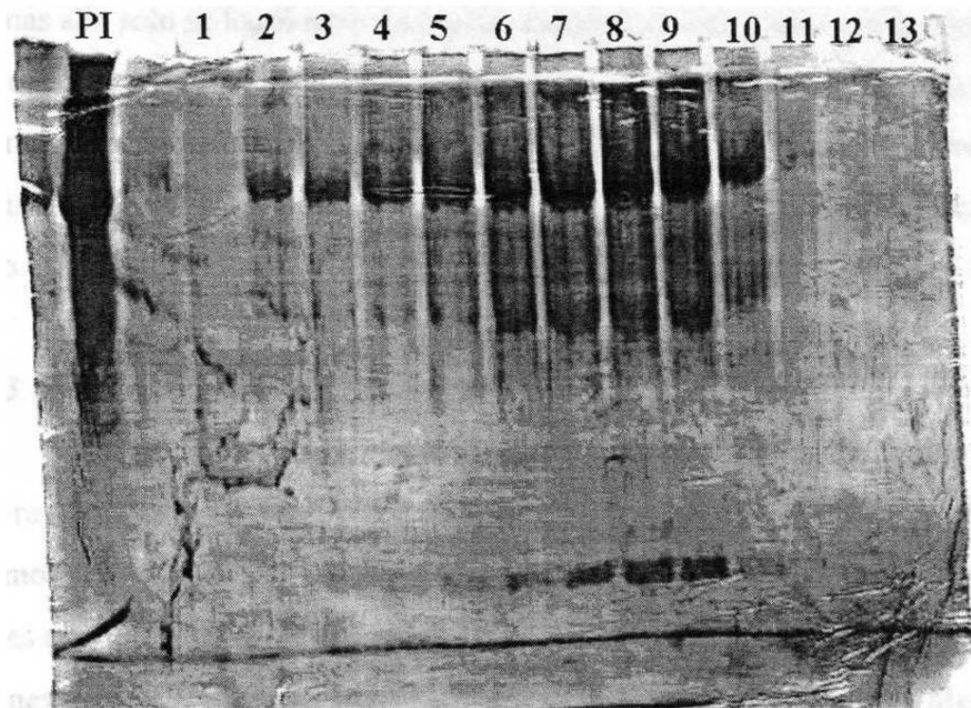
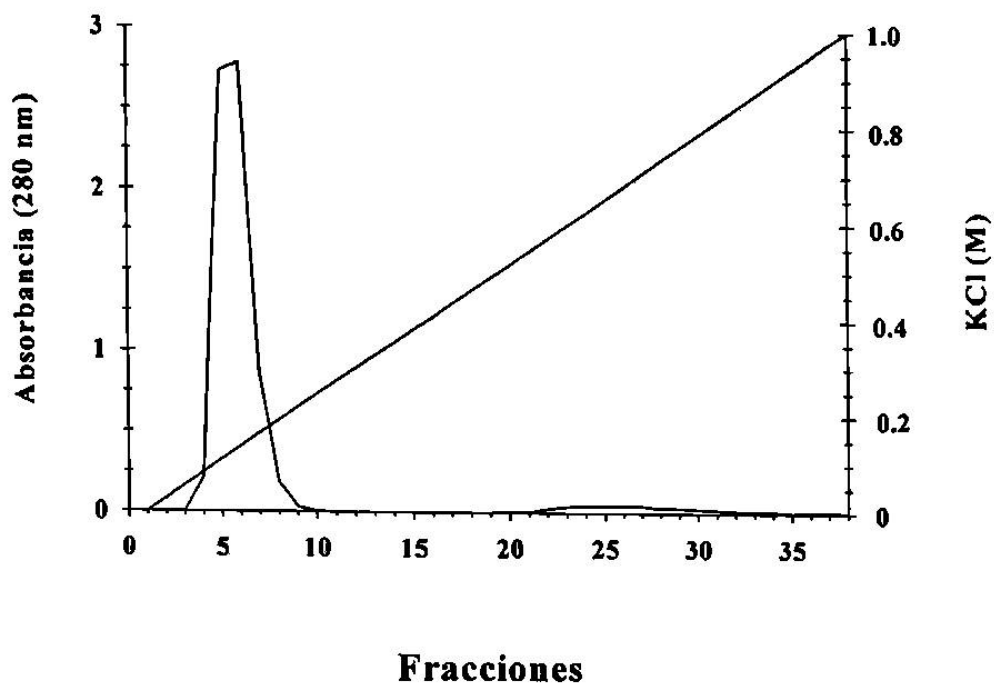


**Figura 2.** Perfil de las fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharosa 6B de plasma de macho de *A. tropicus* tratados con 17  $\beta$  Estradiol: sin precipitar (normal) **(a)**; y precipitado con EDTA-MgCl **(b)** eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF.



**Figura 3.** Perfil de las fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharose 6B de plasma de macho de *A. tropicus* (Control): sin precipitar (normal) **(a)**; y precipitado con EDTA-MgCl **(b)** eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF.

La VTG obtenida por el proceso de purificación mediante filtración en Sepharosa 6B se encontró entre las fracciones 50 a 54 y en DEAE Sephacel principalmente entre las fracciones 4 y 10. Adicionalmente el resultado de las electroforesis confirmó que durante los diferentes pasos de purificación la VTG; esta se conservó prácticamente sin degradarse y que las fracciones cromatográficas presentaban muy poca contaminación con otras proteínas plasmáticas.



**Figura 4.** Perfil y SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de Intercambio Ionico en DEAE-Sephacel de plasma de macho de *A. tropicus*: tratado con  $17 \beta$  estradiol y precipitado con EDTA-MgCl eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1 mM PMSF en un gradiente de 0 a 1 M de KCl. PI: Precipitado Inyectado; 1-13: Fracciones de 4 ml.

Las fracciones cromatográficas de intercambio de iones se consideraron como las de mejor calidad debido a que en estas se observó el menor grado de contaminación por otras proteínas y la más baja degradación de la banda correspondiente a la VTG. LA VTG recuperada en el buffer de elusión fue liofilizada, lo que permitió recuperar un total de 5.6 µg de VTG por cada mg de liofilizado.

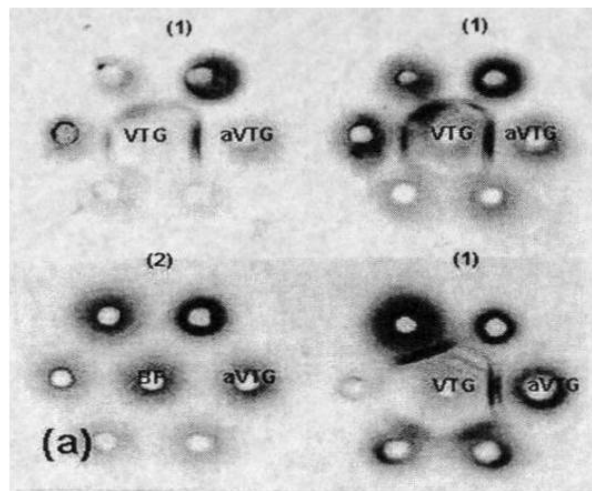
### *5.2.2. Selección y Antigenicidad de Anticuerpos.*

Las pruebas cruzadas preliminares empleando el anticuerpo y muestras de plasma de los ejemplares tratados y no tratados con estradiol indicaron que el anticuerpo reaccionó efectivamente contra aquellas que contenían el antígeno y de las cuales se aisló inicialmente (Fig. 5).

Los sueros de los tres conejos inmunizados reconocieron a la molécula de vitelogenina desde la segunda semana posterior a la inmunización, pero la actividad antigénica más alta solo se logró hasta la quinta semana. En este sentido como no se observaron cambios significativos en el título de anticuerpos a la octava semana, los conejos fueron sacrificados. En función del título antigénico observado de los tres ejemplares inmunizados, únicamente se empleó el antisuero del conejo que presentó el mayor título (1/16 en la quinta semana) para las pruebas subsecuentes .

### *5.2.3. Pruebas Cruzadas y Exámen Histológico .*

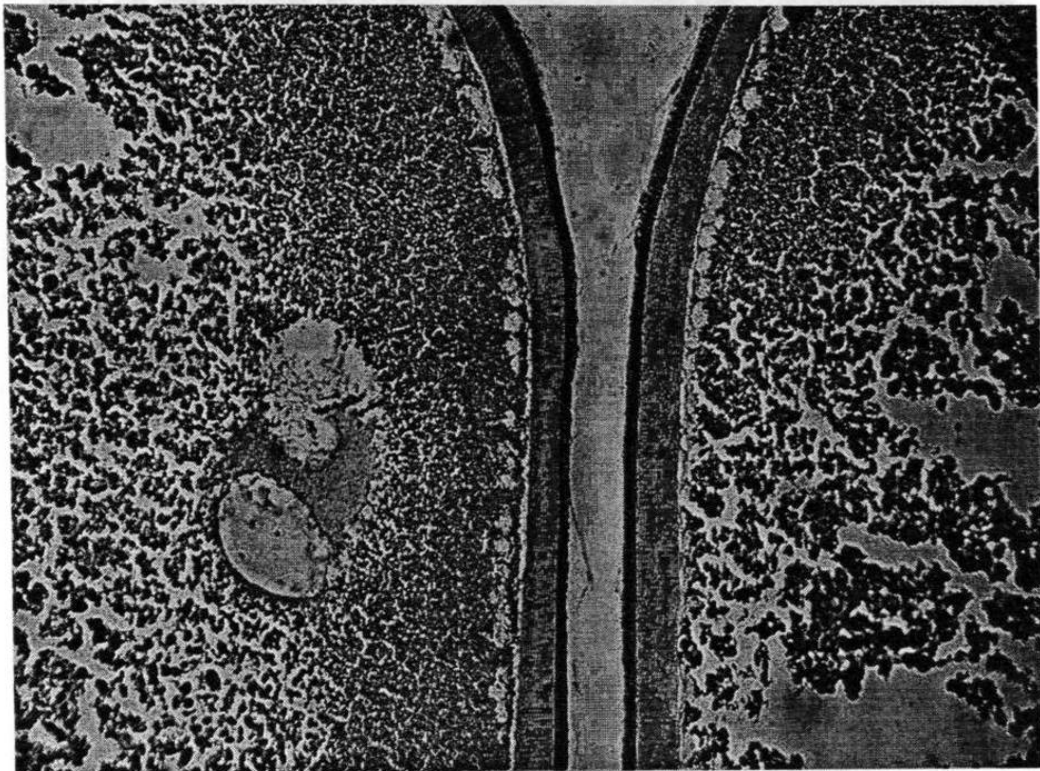
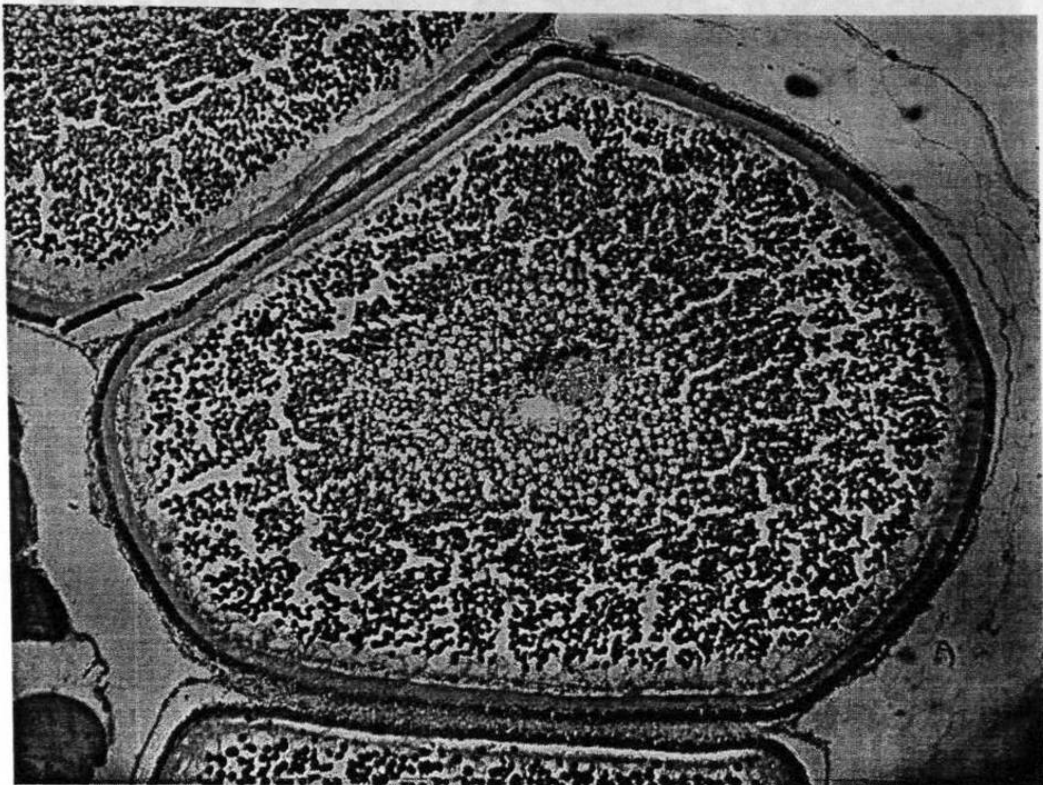
Los resultados de las pruebas cruzadas implementadas para el sexado preliminar de los organismos provenientes de la reserva de la biosfera “Pantanos de Centla” fueron consecuentes respecto a la presencia de la VTG. Observándose una reacción antígeno-anticuerpo negativa en los machos, mientras que en las hembras fue positiva. Mediante este método, se detectó la presencia de VTG en 7 ejemplares correspondientes a hembras de acuerdo con la revisión de la gónada en campo, mientras que en los 5 ejemplares restantes no hubo reacción y la revisión gonádica indicó que se trataba de machos. El exámen histológico posterior de estos ejemplares indicó que se encontraban en un estadio de madurez avanzado (Fig 6 y 7)



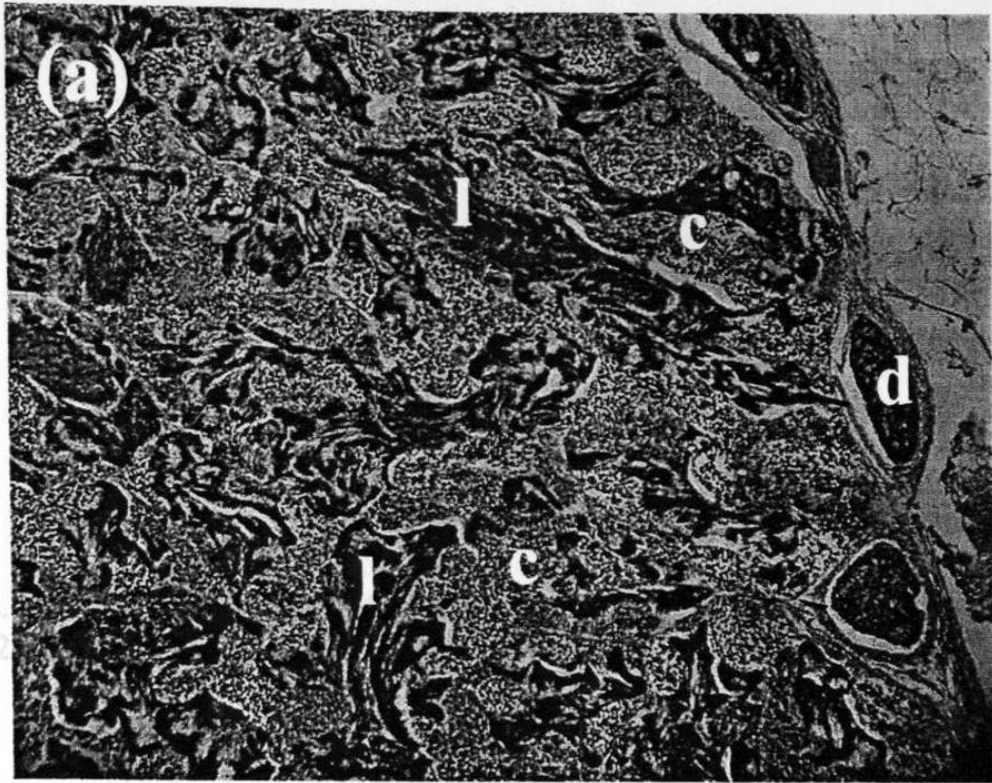
**Figura 5.** Pruebas cruzadas entre la VTG purificada y el suero anti-VTG obtenido en conejos, donde se muestran las líneas de precipitación de la reacción de reconocimiento del antígeno (1) y la ausencia de la misma en el testigo negativo(2). VTG: proteína purificada, anti-VTG: anticuerpo, BF: Buffer.

En el caso de los ejemplares mantenidos en cautiverio, la prueba efectuada en la segunda semana de mayo permitió establecer que de 120 ejemplares, el 48% (58) fueron positivos al suero anti-VTG mientras que el restante 52% (62) no presentaron reacción. Los resultados de la segunda prueba, realizada en el mes de junio fueron exactamente iguales a los obtenidos en mayo, con lo cual se inició la separación de los ejemplares y los preparativos del experimento # 1. Los geles resultantes indicaron que los ejemplares que presentaron la proteína, manifestaron una reacción de precipitación muy fuerte contra el anti-VTG, mientras que en los negativos no se observó ninguna (Fig. 8). La electroforesis de estas muestras de plasma confirmaron la presencia de la proteína en los individuos hembra, así mismo, el sacrificio de dos ejemplares macho y dos hembras permitieron constatar estos resultados.

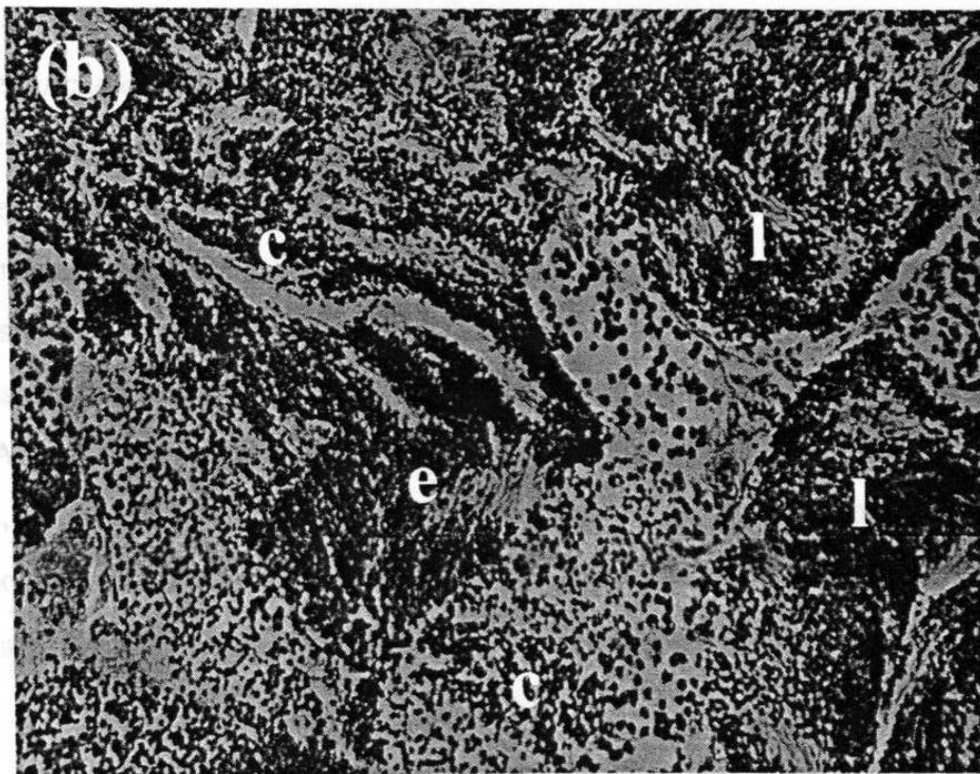




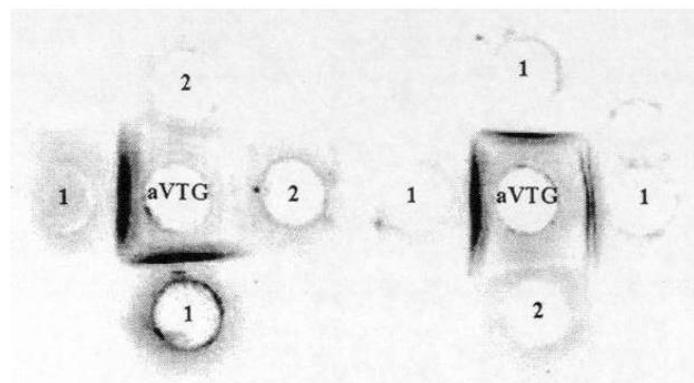
**Figura 6.** Ovocitos en estadios de vitelogénesis avanzada: con núcleo en posición central (a) y en fase de madurez final (FOM), con vesícula germinativa en posición periférica (b). Núcleo (n); ovoplasma (o); alvéolos corticales (ac); zona pelúcida (zp). H y E 100x.



2.4. Cuantificación de Vitelogenina Plasmática



**Figura 7.** Corte del testículo en estadio V de espermatogénesis, Madurez Funcional. Lóbulos seminíferos llenos de espermatozoides H y E, 100x.(a). Detalle de los lóbulos seminíferos H y E, 400x.(b). Lóbulos con espermatozoides (l); espermatocistos con espermátidas en diferentes estadios de desarrollo (c); conductos deferentes con masas de espermatozoides (d); espermatozoides (e).

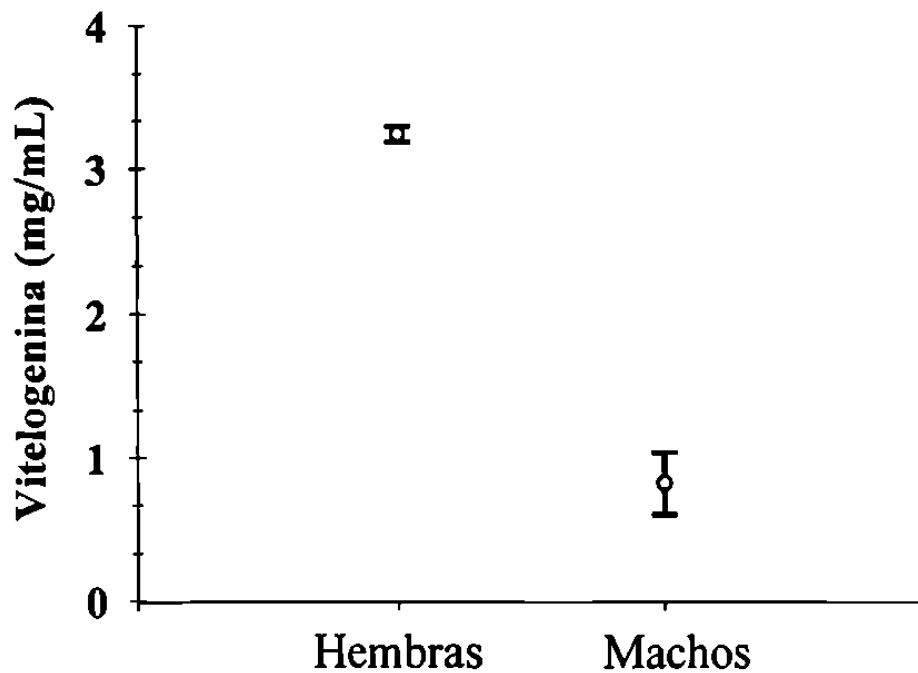


**Figura 8.** Reacción de precipitación de plasma de pejelagartos adultos; hembras (1) y machos (2) en presencia del suero anti-VTG.

#### *5.2.4. Cuantificación de Vitelogenina Plasmática.*

##### *Identificación de "Hembras" (falsos-positivos).*

La ausencia de desoves en algunos tratamientos en el experimento #1 al término del periodo de evaluación condujo al sacrificio de estos ejemplares. La revisión de las gónadas de estos organismos indicó que 6 de los 9 ejemplares catalogados como hembras en un inicio (positivos a la presencia de la VTG) realmente eran machos adultos maduros, listos para el desove de acuerdo con la revisión microscópica de muestras de esperma de los mismos. Al realizarse los primeros ensayos de cuantificación en función de los resultados obtenidos, se observó que estos ejemplares "hembras" falsos-positivos presentaban una concentración promedio de VTG de  $0.86 \pm 0.215$  mg/ml, la cual era inferior ( $KS P = 0.029$ ) a la de las hembras verdaderas con  $3.22 \pm 0.05$  mg/ml al inicio del experimento (Fig. 9).



**Figura 9.** Concentración plasmática de VTG (Media  $\pm$  SD) de ejemplares hembras y machos (“hembras” Falsos-positivos) de pejelagarto al inicio del experimento # 1.

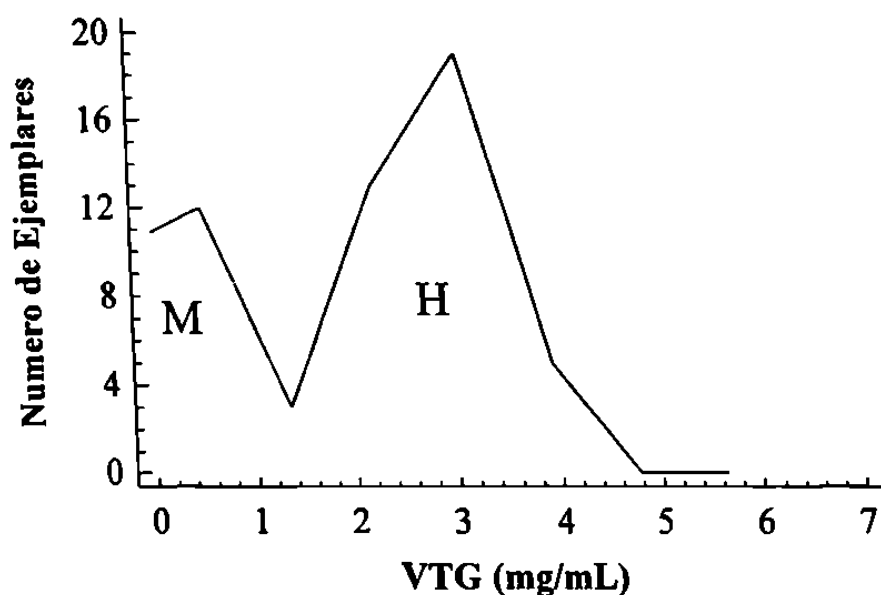
#### *Identificación del Sexo.*

El sexo de los ejemplares logró ser determinado con mayor éxito empleando la evaluación preliminar de los geles de cuantificación positivos para la VTG. De esta forma, aquellos que presentaron niveles inferiores a 1.3 mg/ml fueron catalogados como machos, mientras que los que presentaron valores superiores se consideraron hembras (Tabla 1).

Es necesario señalar que los ejemplares con valores superiores a 1.4 pero inferiores a 2.9 mg/ml se catalogaron arbitrariamente como posibles hembras en fase de vitelogénesis y aquellas superiores a 3.0 mg/ml como hembras maduras listas para el desove, en función de los resultados del experimento #1 (Fig. 10).

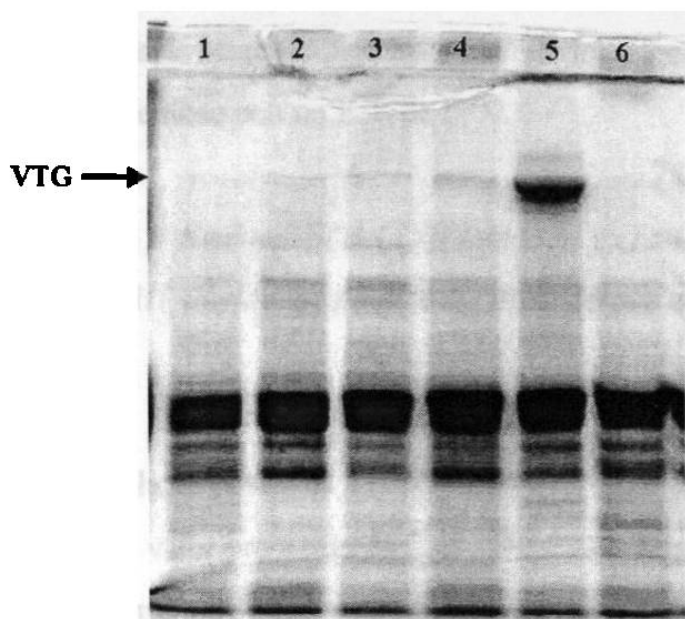
**Tabla 1.** Clasificación subjetiva del sexo de adultos de *A. tropicus* a partir del nivel de vitelogenina plasmática.

Nivel de VTG (mg/ml)	Categoría
Menor a 1.3	Machos
1.4 a 2.9	Hembras en Vitelogénesis
Mayor a 3.0	Hembras Maduras



**Figura 10.** Concentración plasmática de VTG de ejemplares de laboratorio de *A. tropicus* en la segunda semana del mes de julio (empleadas en la clasificación de sexos). M: Machos; H: hembras.

La electroforesis de las muestras del plasma de los ejemplares machos que reaccionaron con el suero anti-VTG confirmó la presencia de la misma banda de proteína correspondiente a la de las hembras (Fig. 11).



**Figura 11.** SDS-PAGE de plasma de ejemplares de *A. tropicus*: machos típicos (1 y 6); hembra típica (5) y machos con VTG (“hembras” falsos-positivos) (2,3,4).

Esta clasificación, posteriormente se consideró con cierto grado de subjetividad debido a que se obtuvo un desove en el mes de agosto de una hembra que en julio tenía un nivel de VTG de 1.26 mg/ml. De igual forma, se observó un macho participando en un desove en agosto cuando en julio tenía un nivel de VTG de 1.89 mg/ml. (Clasificado inicialmente como hembra en vitelogénesis).

Sin embargo, cabe hacer mención que los resultados relativos a los desoves programados a partir de esta clasificación resultaron exitosos en su mayoría empleando Ovaprim™. Dicha programación consistió en inducir inicialmente hembras con niveles altos de VTG en julio y subsecuentemente, en meses posteriores aquellas, con niveles inferiores. Con lo anterior se demostró que el valor empleado para separar a los machos ( $\leq 1.3$  mg/ml) fue efectivo, aún con las excepciones mencionadas.

### 5.3. INDUCCION AL DESOVE.

La revisión de las gónadas de los ejemplares sacrificados el 8 de julio del 2001 indicó que al inicio del experimento #1, las hembras se encontraban en un estadio avanzado de madurez gonádica, lo que vino a ser confirmado por el color verde olivo característico

de esta etapa de los huevos y un con un IGS de 0.153. En cuanto al los machos, la revisión microscópica de las muestras de semen indicó actividad de los espermatozoides, el testículo apareció con color blanco cremoso con un IGS de 0.07.

*5.3.1. Experimento 1. Evaluación del 17β estradiol y el análogo superactivo des-Gly<sup>10</sup>- (D- Ala<sup>6</sup>) LHRH ethylamide para inducir el desove en ejemplares de pejelagarto.*

El peso de los ejemplares positivos a la VTG utilizados en este bioensayo, fue de 1,373.0 a 3,716.0 gr. con un valor promedio de  $2,495.26 \pm 289.22$  gr. No se observaron diferencias significativas entre los pesos promedio entre tratamientos (KW,  $P= 0.84$ ) al inicio del experimento.

Considerando los resultados obtenidos sobre la aparición de los individuos “hembras” (falsos-positivos ) en este experimento, solo se obtuvieron datos del desove de dos hembras, presentándose por lo tanto solo la información descriptiva de los mismos y las comparaciones con las réplicas obtenidas de estas hembras.

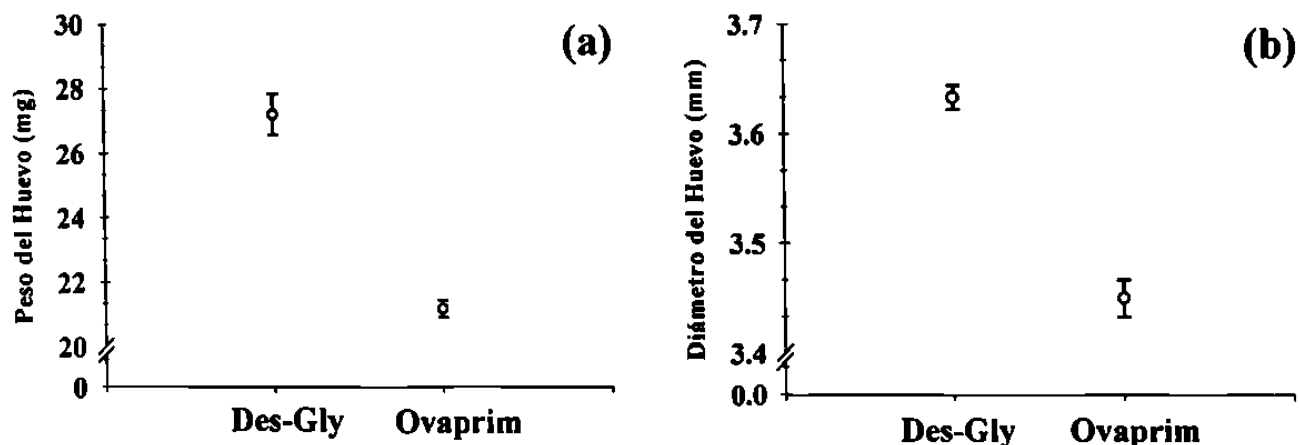
*Respuesta a la Inducción.*

El primer desove se presentó al siguiente día de iniciado el tratamiento en la hembra que fue inyectada con 35 µg/Kg Des-Gly<sup>10</sup> LHRHe (3,081 gr), mientras que la hembra del grupo control solo desovó cuando fue inyectada con 0.2 ml/Kg de Ovaprim hasta el día 16 (3,634 gr.). Por otro lado, la hembra tratada con estradiol no presentó signos de conducta reproductiva, ni se observó la expulsión de huevos al oprimir al región abdominal. El tiempo para iniciar el desove después de la inyección fue de 12 horas para Des-Gly, mientras que para Ovaprim fue de 15 hrs, en el caso de esta última se observaron algunos efectos negativos asociados a la manipulación manifestados con una disminución del apetito.

*Calidad de Huevos y Larvas*

El diámetro promedio de los huevos ( $3.63 \pm 0.02$  mm) obtenidos de la hembra que recibió el tratamiento Des-Gly fue superior (KS,  $P= 0.00$ ) con, respecto a aquellos de la

hembra inyectada con Ovaprim ( $3.42 \pm 0.02$  mm). Sin embargo, los de esta última presentaron mayor peso (KS,  $P= 0.00$ ) con  $33.2 \pm 0.83$  mg comparados con los de Des-Gly  $27.2 \pm 0.63$  (Fig. 12 a y b).

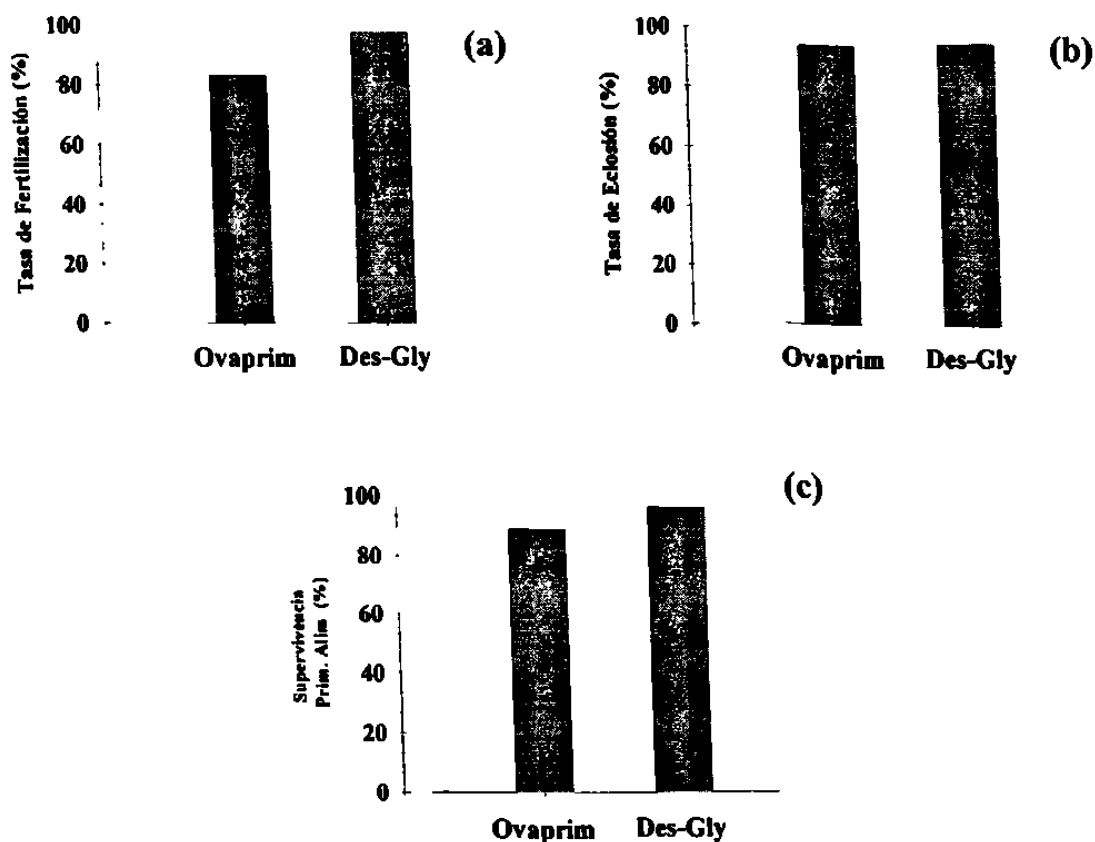


**Figura 12.** Biometría de huevos de *A. tropicus*: (a) peso y (b) diámetro de huevos obtenidos del experimento 1.

En cuanto a la tasa de fertilización, los huevos provenientes de la hembra inyectada con Des-Gly presentaron un valor superior con 97.5% (TC,  $P= 0.005$ ) en comparación con los producidos por la hembra inyectada con Ovaprim con 83 % (Fig. 13a). No se observaron diferencias significativas (TC,  $P=0.84$ ) en las tasas de eclosión entre los huevos obtenidos de la hembra inyectada con Des-Gly (94.4 %) y los de Ovaprim (93.30 %) (Fig 13b).

Las larvas recién eclosionadas obtenidas por la inducción con Ovaprim presentaron una mayor longitud (KS,  $P= 0.00$ ) con  $8.55 \pm 0.09$  mm respecto a las provenientes de la inducción con Des-Gly ( $8.32 \pm 0.07$  mm), pero con menos peso  $11.3 \pm 0.01$  mg (KS,  $P= 0.00$ ) respecto a Des-Gly con  $12.2 \pm 0.22$  mg.





**Figura 13.** Tasas de Fertilización (a), Eclosión (b) y Supervivencia a la Primera Alimentación (c) de *A. tropicus* durante el experimento 1.

Al inicio de la alimentación las larvas de Des-Gly resultaron superiores tanto en longitud (KS,  $P= 0.01$ ) como en peso (KS,  $P= 0.00$ ) con  $19.09 \pm 0.16$  mm y  $31.74 \pm 0.47$  mg, mientras que las de Ovaprim presentaron  $18.84 \pm 0.16$  mm y  $30.48 \pm 0.21$  mg respectivamente (Fig.14a y 14b).

#### *Cultivo de Larvas.*

Culminada la fase de cultivo larval, se observó que las larvas del tratamiento con Des-Gly fueron de talla y peso inferiores ( $38.15 \pm 0.27$  mm y  $222.7 \pm 0.43$  mg) (Prueba  $t$ ,  $P= 0.00$ ) a las provenientes de Ovaprim ( $35.54 \pm 0.42$  mm y  $157.74 \pm 0.33$  mg) (Fig. 14c y 14d). Sin embargo, un comportamiento opuesto se obtuvo en la supervivencia final, la cual

fue superior (TC,  $P= 0.00$ ) en el caso de Des-Gly con  $99.3 \pm 0.5 \%$  contra Ovaprim con  $85.62 \pm 2.61 \%$  (Fig. 14e).

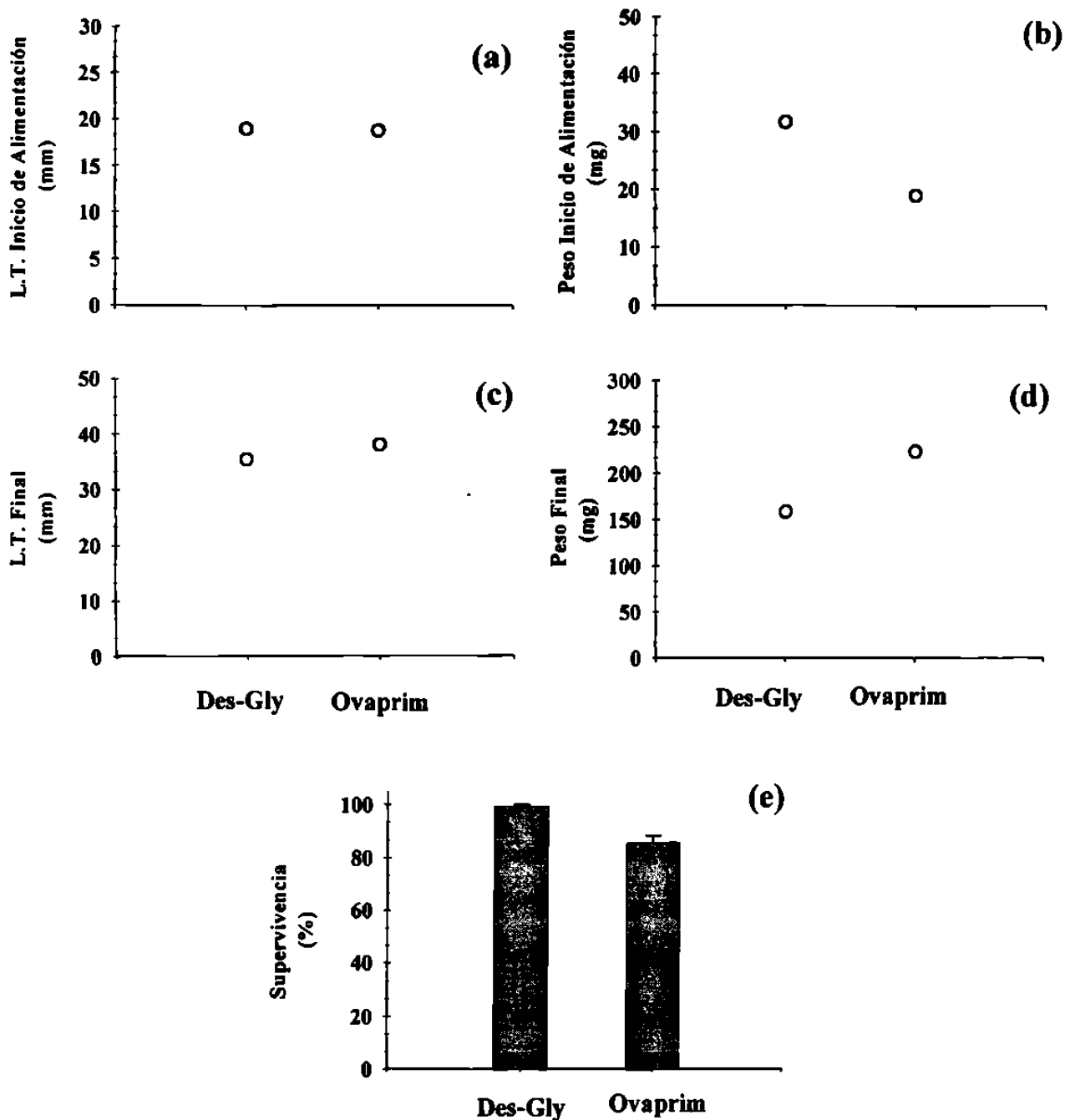


Figura 14. Longitud total y peso de larvas de pejelagarto de primera alimentación (a, b), al final de la larvicultura (c, d) y Supervivencia terminado el periodo de cultivo de 13 días (e).

### *5.3.2. Experimento 2. . Inducción al Desove de Pejelagarto mediante la inyección de los Análogos Superactivos des-Gly<sup>10</sup>- (D- Ala<sup>6</sup>) LHRH ethylamide y D-Ala<sup>6</sup> - LHRHa.*

Los ejemplares empleados en este bioensayo presentaron un peso promedio de  $1,072.2 \pm 3.87$  gr. para el caso de las hembras; mientras que en el caso de los machos, el peso promedio fue de  $700.17 \pm 18.93$  gr. No se observaron diferencias significativas en el peso de las hembras de los diferentes tratamientos (KW,  $P= 0.147$  CT=  $833.0 \pm 143.75$ ; Des-Gly=  $1262.77 \pm 252.98$  y D-Ala=  $813.3 \pm 11.92$  gr.) (Fig. 15a) ni en la concentración de vitelogenina de los mismos (KW,  $P= 0.587$ , CT=  $2.36 \pm 0.18$ ; Des-Gly=  $2.51 \pm 0.21$  y D-Ala=  $2.61 \pm 0.18$  mg/ml), (Fig. 15b).

#### *Respuesta a la Inducción.*

Los tratamientos se aplicaron por la tarde del 2 de Agosto del 2001 y los desoves iniciaron por la mañana, presentándose entre las 14 y 18 horas posteriores a la inyección. Los ejemplares que no desovaron correspondieron a una hembra del tratamiento con Des-Gly y una con D-Ala. Las observaciones de las gónadas después del sacrificio de estas hembras indicaron en el caso de Des-Gly huevos de color verde con un ligero tono café y muy frágiles al tacto; mientras que en el caso de la inyectada con D-Ala se observaron de apariencia normal. En el caso de las hembras inyectadas posteriormente y pertenecientes al grupo control, se obtuvo el desove de una de cada tratamiento aplicado (Des-Gly y D-Ala).

#### *Calidad de Huevos y Larvas.*

La evaluación inicial mediante el análisis de varianza de una vía indicó la existencia de diferencias ( $P= 0.00$ ) entre los tratamientos para las variables de diámetro (D-Ala =  $2.90 \pm 0.03$ ; Des-Gly  $2.95 \pm 0.04$  mm) y peso de los huevos (D-Ala =  $13.88 \pm 0.18$ ; Des-Gly =  $15.21 \pm 0.76$  mg) (Figs. 15c y 15d respectivamente). Sin embargo, dicha diferencia queda eliminada cuando en el análisis se emplea como cofactor el peso de la hembra (ANCOVA,  $P= 0.24$  y  $0.20$  respectivamente), observándose que en ambos casos esta variación se

explica por el efecto del peso de la hembra (ANCOVA,  $P= 0.00$  y  $0.02$ ) que afecta significativamente el peso y diámetro de los huevos producidos ( $r = 0.99$  y  $0.85$ ;  $P= 0.00$  y  $0.01$  respectivamente) (Fig. 16 a y b).

La tasa de fertilización (D-Ala =  $99.0 \pm 1$ ; Des-Gly =  $96.7 \pm 2.4$  %) (Fig. 15e) y de eclosión (D-Ala =  $84.15 \pm 3.85$ ; Des-Gly =  $82.83 \pm 2.89$  %) fueron similares para ambos tratamientos (TC,  $P= 0.17$  y  $0.99$  respectivamente) (Fig. 15f).

No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a talla de las larvas de primera alimentación (ANOVA/ANCOVA,  $P= 0.134$ ) con  $18.64 \pm 0.09$  y  $18.42 \pm 0.09$  mm para D-Ala y Des-Gly respectivamente (Fig. 17a). Por otro lado, en cuanto al peso de las mismas (D-Ala  $26.90 \pm 0.16$  mg; Des-Gly  $27.62 \pm 0.13$ ; Fig. 17b), se muestran diferencias (ANOVA,  $P= 0.001$ ), mismas que se eliminan cuando se emplea como cofactor el peso de la hembra (ANCOVA,  $P= 0.68$ ).

Transcurrida la larvicultura se observó que no existía diferencias en cuanto a la longitud (D-Ala =  $35.11 \pm 0.20$ ; Des-Gly =  $35.16 \pm 0.24$  mm; Fig. 17c) y peso (D-Ala =  $168.10 \pm 2.41$ ; Des-Gly =  $161.08 \pm 2.54$  mg; Fig. 17d) de las larvas de ambos tratamientos (ANCOVA,  $P= 0.20$  y  $0.40$  respectivamente), ni en la supervivencia (TC  $P= 0.503$ ), que fue de  $96.07 \pm 0.92$  y  $93.59 \pm 1.57$  % respectivamente para D-Ala y Des-Gly (Fig. 17e).

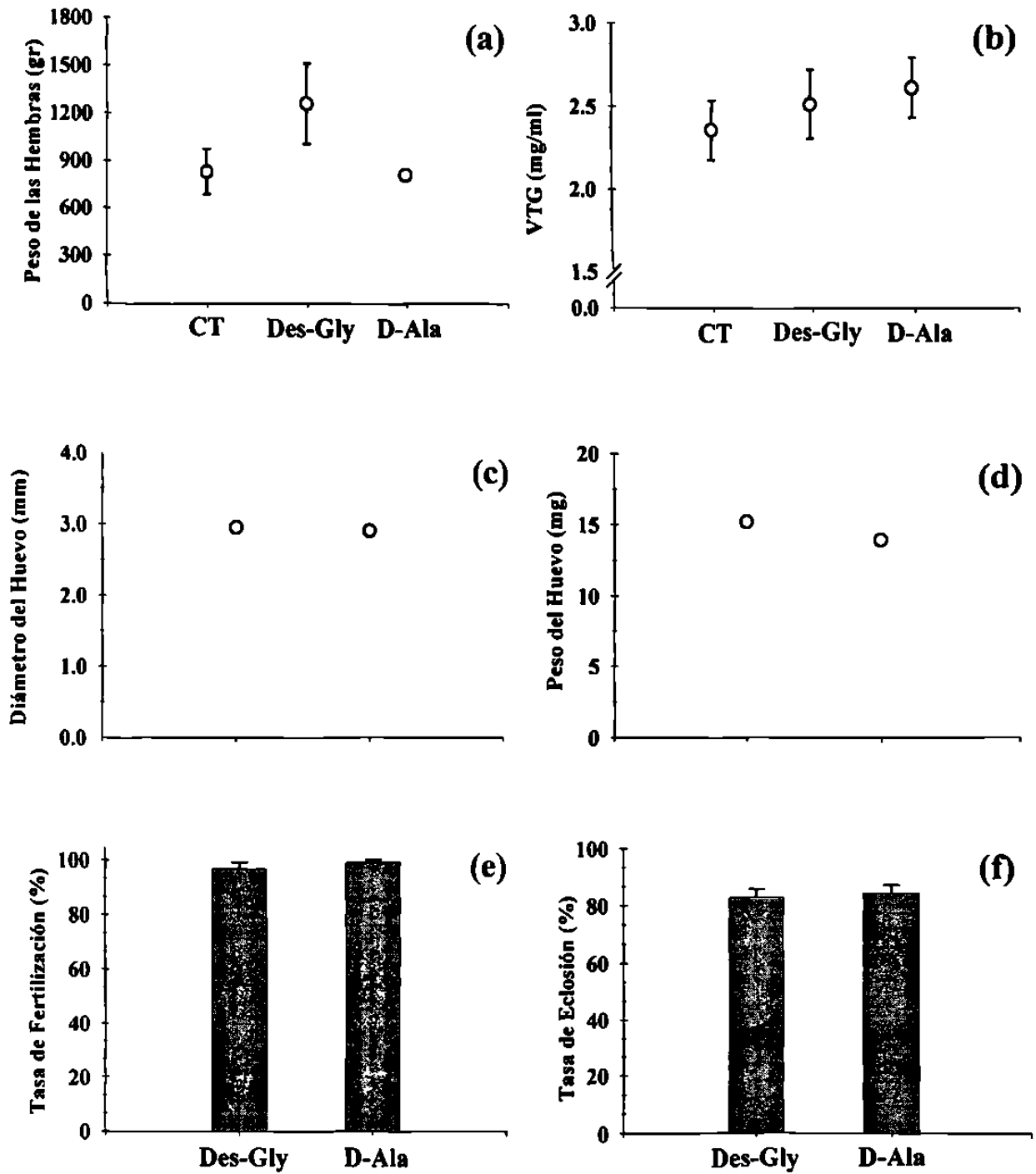


Figura 15. Peso promedio (a) y concentración de VTG (b) de hembras de pejelagarto empleadas en el experimento # 2; diámetro y peso de huevos (c y d) y tasas de fertilización (e) y eclosión (f) de los mismos (CT: Control; Des-Gly y D-Ala = 35 µg/Kg)

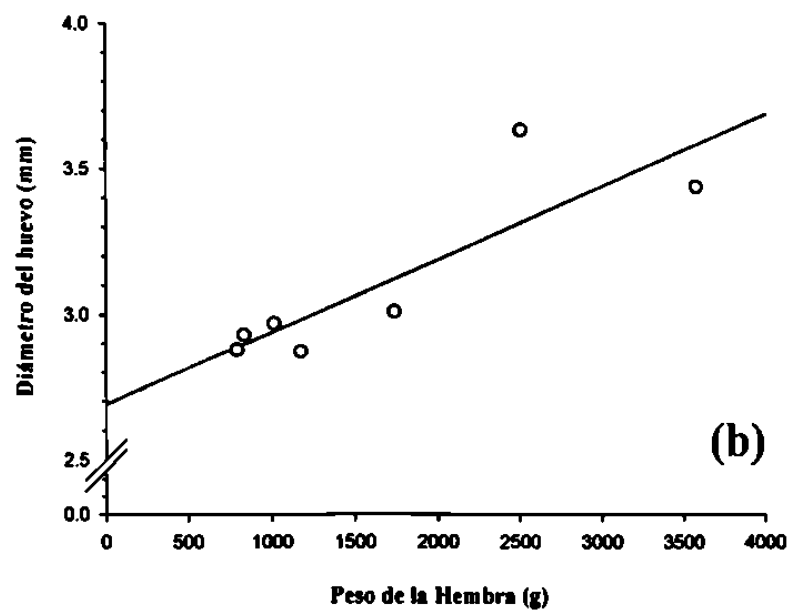
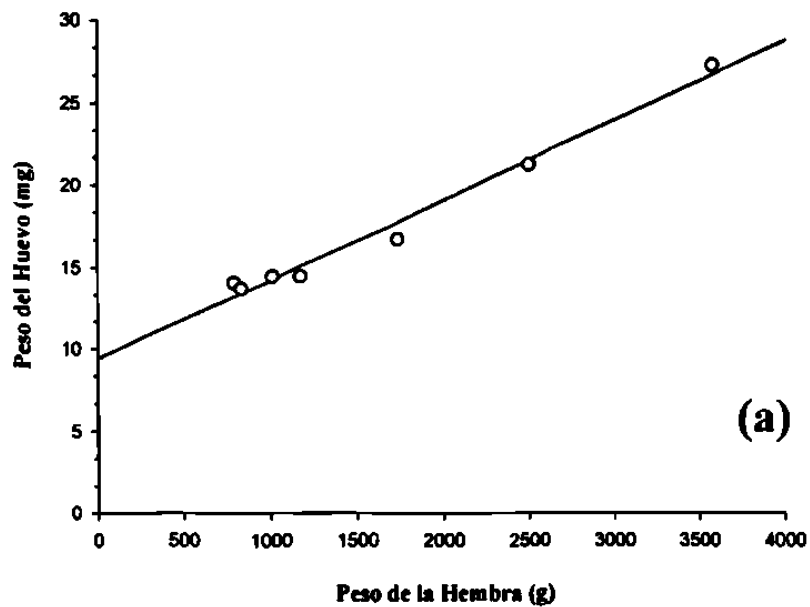


Figura 16. Regresión lineal simple entre el peso de las hembras y los pesos promedios de los huevos (a) ( $r = 0.99$ ,  $P = 0.00$ ); y peso de las hembras y diámetros promedio de los huevos producidos (b) ( $r = 0.85$ ,  $P = 0.01$ ).

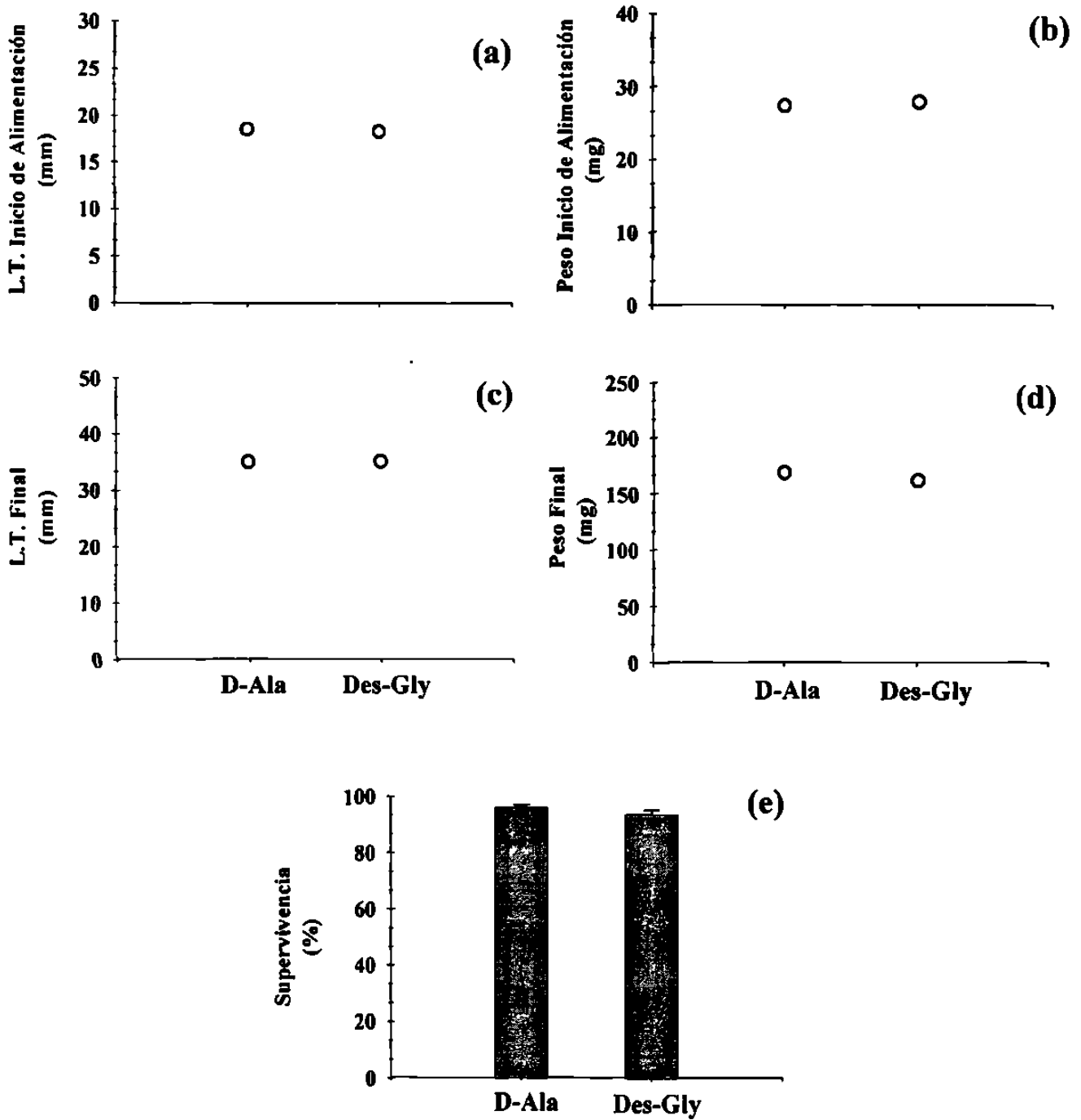


Figura 17. Longitud total y peso de larvas de pejelagarto de primera alimentación (a, b), al final de la larvicultura (c, d) y Supervivencia terminado el periodo de cultivo de 13 días (e), en el experimento #2

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que es posible identificar el sexo de ejemplares de pejelagarto, mediante una reacción inmunológica entre la VTG plasmática de *A. tropicus* y el suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada. Las pruebas cruzadas iniciales de los ejemplares de colecta silvestre y cultivados en laboratorio fueron consistentes con la observación directa y análisis histológico de las gónadas después de ser sacrificados. Aquellos que presentaron testículos produjeron reacción negativa y aquellos con ovarios fueron positivos hacia el anticuerpo obtenido para la VTG. Estas observaciones concuerdan con los reportes en *Oryzias latipes* (Hamazaki *et al.*, 1987); *Oreochromis niloticus* (Chan *et al.*, 1991); *Diodon holocanthus* (Fujita *et al.*, 1998); *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994); *Macrozoarces americanus*, *Cyclopterus lumpus*, *Gadus marhua* (Yao y Crim, 1996); *Mycteroperca microlepis*, *Ephinephelus striatus* y *E. Guttatus* (Heppell y Sullivan, 1999). En estas especies la VTG es producida por las hembras durante la vitelogénesis estando ausente en los machos.

Las pruebas de electroforesis y cromatografía indican que los machos de *A. tropicus* tienen la capacidad de sintetizar una proteína inducida por la administración de 17  $\beta$  estradiol, la cual responde inmológicamente con el suero anti-VTG, indicando la posible presencia de VTG. Esta proteína fue inducida y aislada del plasma de machos tratados con el esteroide como se ha realizado en otros teleosteos donde se ha observado que dicho estrógeno actúa sobre los hepatocitos desencadenando la síntesis de VTG (Khoo, 1979; de Vlaming *et al.*, 1980; Ng e Idler, 1983; Chan *et al.*, 1991; Matsubara y Sawano, 1995).

El hecho de que la inducción mediante estradiol en los machos de *A. tropicus* haya provocado la síntesis de VTG puede ser demostrada de diversas maneras. El suministro de estradiol a ejemplares machos de *A. tropicus* provocó un incremento de un 36% en el contenido total de proteínas del plasma comparado con el grupo de ejemplares



control. Un efecto similar se ha observado en machos de *Salmo gairdneri* (Flett y Leatherland, 1989) y *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994), donde se ha demostrado que la síntesis de VTG inducida por inyecciones de estradiol provoca el aumento del contenido total de proteínas del plasma de los ejemplares. Una gran proporción de estas proteínas de los machos de *A. tropicus* tratados fueron precipitables, por ser ricas en fósforo. En contraste, esto no fue observado en el plasma de los ejemplares control, siendo consistente con lo mencionado por Wiley *et al.*, (1979); de Vlaming *et al.*, (1980); Komatsu *et al.*, (1996) quienes indican que debido al alto contenido de fósforo de la VTG, es posible separarla de las proteínas plasmáticas por precipitación con EDTA-MgCl<sub>2</sub>.

La SDS-PAGE de plasma de pejelagartos machos inyectados con estradiol presenta una banda proteica distintiva correspondiente a 177 kDa que no se observa en los ejemplares que no lo recibieron. Esta banda corresponde a una posición relativa idéntica a la producida en el plasma de hembras de *A. tropicus* en estadios de madurez gonádica avanzados, lo cual coadyuva a garantizar que la proteína inducida por el esteroide suministrado es la VTG. Esto coincide con las observaciones de otros autores quienes señalan que al ser inducida la VTG en machos inyectados con estradiol, presenta un peso molecular equivalente al de la VTG que se produce en las hembras de forma natural mediante el proceso de maduración de gonádica (Waagboe y Sandnes, 1988; Carnevali y Belvedere, 1991; Mañanós *et al.*, 1994a, Matsubara *et al.*, 1994; Takemura y Teruya, 1997). El peso molecular de la VTG de pejelagarto calculado mediante SDS-PAGE es cercano al peso de la proteína mayoritaria inducida por estradiol identificada como vitelogenina en otras especies y calculado mediante esta misma técnica. En *Plectropomus leopardus* se ha identificado con 180 kDa (Takemura y Teruya, 1997); igualmente en *Dicentrarchus labrax* de 180 kDa (Mañanós *et al.*, 1994b); en *Verasper moseri* entre 160 -180 kDa (Matsubara *et al.*, 1999); mientras que en *Mycteroperca microlepis* de 183 kDa (Heppell y Sullivan, 1999). En estos estudios también se señala que el peso molecular generalmente es mucho mayor al obtenido debido a que el SDS-PAGE provoca la disociación de la VTG en subunidades de menor peso molecular (Chan *et al.*, 1991).

Las mismas características del SDS-PAGE de la proteína inducida por estradiol en machos de pejelagarto se presentan en el plasma de las hembras al inicio y durante la temporada de desove natural, lo cual coincide con los resultados observados en *Carassius auratus* (de Vlaming *et al.*, 1980), *Salmo trutta fario* y *S. salar* (Bail y Breton, 1981), *Acipenser transmontanus* (Linares-Casenave, 1993) y en *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1995) donde la detección de VTG en plasma coincide con el proceso de vitelogénesis que permite la acumulación de reservas en los ovocitos.

El plasma de ejemplares machos inyectados con estradiol y hembras maduras presenta una fuerte reacción antigénica en presencia del suero con anti-VTG, de la misma forma que los extractos de huevo de pejelagarto (Datos no mostrados). Esto indica que los anticuerpos producidos reconocen un producto o productos equivalentes de la VTG del plasma que se acumula en los ovocitos en desarrollo. Una respuesta similar ha sido observada en la sardina japonesa *Sardinops melanostictus*, donde los anticuerpos obtenidos a partir de la VTG purificada de ejemplares macho inyectados con estradiol producen reacción antigénica en presencia del plasma de los ejemplares inyectados con estradiol, de hembras maduras y homogenizados de huevo, siendo negativa cuando se emplea plasma de hembras inmaduras y de machos control (Matsubara *et al.*, 1994). Esto indica que la proteína inducida por el estradiol y aislada del plasma en *A. tropicus* presenta propiedades antigénicas similares a la proteína mayoritaria de los ovocitos, siendo por lo tanto esta última un derivado de la VTG plasmática. Esto ha sido reportado igualmente en el caso de *Oncorhynchus mykiss* (Tyler, 1993); *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994); *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994b); *Plectropomus leopardus* (Takemura y Teruya, 1997) y *Verasper moseri* (Matsubara y Koya, 1997).

Para la identificación de los sexos de aquellas especies que no presentan dimorfismo sexual se han propuesto varios métodos. Algunos de éstos métodos están relacionados con la extracción de muestras de gametos, lo que también permite obtener información sobre el estado de madurez gonadal (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2001). Para la extracción de gametos generalmente se emplea canulación, punción ovárica o cirugía

(Rodríguez, 1992; Lajonchere *et al.*, 2001). Estas técnicas pueden ser muy efectivas para la evaluación dependiendo de las condiciones anatómicas de cada especie. Sin embargo, también pueden ser traumáticas para el organismo, provocando estrés que se puede manifestar con consecuencias desfavorables en el desempeño reproductivo y la producción de gametos (Contreras *et al.*, 1998; Schreck *et al.*, 2001) o ser una vía posible de infecciones y enfermedades (Tucker, 1994). Debido a la dificultad de identificación del sexo en los lepisosteidos se han propuesto métodos como el reportado por Ferrara e Irwin (2001) basado en la revisión del número de conductos gonádicos; sin embargo, este procedimiento requiere el sacrificio de los ejemplares.

El único método ensayado hasta el momento en pejelagarto ha sido la canulación, sin embargo no se han logrado obtener muestras de gametos femeninos con facilidad debido a que existe un estrechamiento del oviducto que dificulta el paso de la cánula y provoca daños en este tejido, habiendo acceso aparentemente solo al momento de la ovulación (Páramo, com. pers. 2001), condición conocida como condrictina o gimnoaria (Rodríguez, 1992), que se ha documentado en peces del género *Epinephelus* (Tucker 1994). Esta situación ha impedido realizar una evaluación adecuada previa a esta etapa y en consecuencia la dificultad de la identificación del sexo en pejelagartos.

La VTG detectada en plasma de hembras en laboratorio al inicio de la temporada de desove mediante el anticuerpo, fue evidenciada por el SDS-PAGE de las mismas. Este método para identificar el sexo, está relacionado con la evaluación de uno de los componentes distintivos del plasma que incrementan su concentración o aparecen en circulación en las hembras de peces durante la temporada reproductiva y que generalmente están correlacionados con el estado de madurez de la gónada. Para el análisis de dichos componentes no se requiere emplear los métodos invasivos que se han descrito con anterioridad lo cual puede ser menos traumático para *A. tropicus*. Dentro de estos componentes se pueden mencionar además de la concentración de VTG (Le Bail y Breton, 1981; Mañanós *et al.*, 1994a; Matsubara *et al.*, 1994, 1995; Takemura y Oka, 1998; Fujita *et al.*, 1998; Heppell y Sullivan, 1999); la de esteroides (Chiba *et al.*, 1994; Matsubara *et al.*, 1995; Taranger *et al.*, 1998); Calcio (Nagler *et al.*, 1987; Linares-

Casenave, 1990; Doroshov, *et al.*, 1997; Björnsson *et al.*, 1998); Fósforo ligado a proteínas álcali-lábiles o ALPP (Craig y Hervey, 1984; Nagler *et al.*, 1987); Proteínas específicas del suero de hembras o FSSPs (Takemura *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1998) o proteínas del moco (Chang *et al.*, 1996).

La aparición de los ejemplares falsos-positivos (machos con reacción del plasma en presencia de anti-VTG) condujo a la revisión y repetición de las pruebas cruzadas. Sin embargo, la revisión de las gónadas constató la presencia de testículos en algunos ejemplares que reaccionaron positivamente al suero anti-VTG. La presencia de falsos positivos resultó inusual debido a que fueron pocos ejemplares los que presentaron esta condición comparados con el número de machos que respondieron como negativos a la prueba. Las posibles causas de este resultado pueden abordarse desde varios puntos de vista. Una primera opción es que los anticuerpos obtenidos reconozcan alguna proteína plasmática que no haya sido completamente separada durante el proceso de purificación. De ser el caso de nuestro muestreo, se esperaría que todos los ejemplares resultaran falsos positivos. También es posible que la proteína inducida con estradiol en machos no sea VTG; sin embargo, los argumentos previos apoyan el planteamiento de que efectivamente corresponde a VTG. Otras proteínas que son inducidas por la administración de estradiol son la proteína de la envoltura vitelina (VEP) y la proteína de la zona radiada (PEII). Estas proteínas de forma normal no se encuentran presentes en machos y aparecen durante la maduración gonádica de las hembras junto con la VTG (Matsubara *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000).

En otro contexto, los ejemplares machos detectados como falsos-positivos pudieron estar bajo la influencia de algún compuesto estrogénico o con acción similar presente probablemente en el alimento balanceado (Pellisero *et al.*, 1989; Pellisero y Sumpter, 1991) o en el ambiente, con la consecuente aparición de VTG (Sumpter, 1999; Fent *et al.*, 1999; Hylland, 1999) inclusive en los machos (Fitzpatrick *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1999; Flammarion *et al.*, 2000). Sin embargo estas causas no se pueden considerarse con certeza en este estudio ya que no existe evidencia al respecto.

Existe la posibilidad de que algunos machos de *A. tropicus* bajo condiciones normales produzcan VTG ya que en otras especies de peces se han detectado machos produciendo vitelogenina aún sin haber sido tratados con estrógenos. En el caso de *Acanthopagrus schlegeli* se observó que el plasma de estos individuos puede reaccionar positivamente a anticuerpos anti-VTG de la misma especie (Chang *et al.*, 1996). En este mismo estudio también se observó que generalmente en los machos los niveles de VTG son inferiores a 0.6 mg/ml. Esto coincide con Patiño (com. pers., 2001); quien indica que en algunas especies es posible observar de forma normal niveles de VTG en machos, inclusive similares a los producidos por las hembras maduras.

La posibilidad de identificación del sexo de *A. tropicus* implica necesariamente la cuantificación de los niveles en aquellos ejemplares de edad reproductiva positivos a VTG. Al ser una proteína relacionada con la maduración del ovocito no se encuentra presente en ejemplares inmaduros (Heppell y Sullivan, 1999). Los valores empleados para la identificación de sexos en el primer ensayo pueden ser útiles considerando que fueron efectivos para reconocerlo y planificar los desoves. La inducción inicial con las hembras que presentaron niveles superiores a 3.0 mg/ml de VTG permitió constatar que estaban maduras. Por otro lado, las hembras que presentaron en la misma fecha niveles superiores a 1.4 mg/ml al desovar posteriormente; indican que aparentemente estas se encontraban en el proceso de vitelogénesis pudiendo alcanzar niveles superiores con el avance de la temporada. Estos resultados concuerdan con los resultados de Tyler *et al.*, (1990) en *Oncorhynchus mykiss*. En esta especie se ha observado que el incremento en las concentraciones plasmáticas de VTG está fuertemente asociado a un incremento en el peso y tamaño de los ovocitos durante la vitelogénesis, siendo la concentración de VTG de 1.5 mg/ml al inicio de la misma y llegando hasta 25 mg/ml a la ovulación. Resultados similares han sido observados por Heppell y Sullivan, (1999) en *Mycteroperca microlepis* donde la VTG no pudo ser detectada en hembras con ovocitos en estadios de crecimiento inicial. La proteína aparece cuando los ovocitos inician su incremento en peso y manifiesta su valor máximo de ~3 mg/ml en hembras en vitelogénesis tardía, fase de maduración final y ovulación. Asimismo en el caso de *Sardinops melanostictus* los

niveles de VTG al inicio de la vitelogénesis son de 0.56 mg/ml, incrementándose sustancialmente hasta 1.45 mg/ml en la vitelogénesis tardía (Matsubara *et al.*, 1995).

En caso de observarse falsos positivos en organismos silvestres y debido a que no se conoce la fluctuación de los niveles de VTG de los machos de pejelagarto durante la temporada reproductiva (especialmente a su inicio), algunos de estos organismos podrían ser catalogados erróneamente como hembras. De la misma manera, las hembras que inician tarde la vitelogénesis pueden ser erróneamente identificadas como machos debido a niveles bajos de VTG. Es posible que la presencia de VTG en machos ocurra con un número reducido de ejemplares, siendo necesario cuantificarla para la identificación de los sexos. En el caso de las hembras se requerirá de revisión histológica para conocer el estadio de madurez asociado a un nivel de VTG, de tal forma que se obtenga el comportamiento típico de la especie durante el ciclo reproductivo. Esta información será conveniente porque permitirá conocer las proporciones sexuales de ejemplares adultos de pejelagarto y el estadio de madurez gonádica tanto de ejemplares en cautiverio como silvestres. También podría estimarse la proporción sexual de organismos colectados por las pesquerías considerando que la VTG también se puede cuantificar en extractos de músculo (Heppell y Sullivan, 2000) y moco (Chang *et al.*, 1996).

Debido a que el nivel más bajo de vitelogenina detectado en los organismos en los que la inducción hormonal para el desove fue efectiva fue de 2.36 mg/ml, proponemos que los valores superiores a 3.0 mg/ml podrían emplearse como indicadores para garantizar el éxito de las inducciones en esta especie. Probablemente esta concentración de VTG se encuentre cercana al valor máximo que se presenta en pejelagarto cuando culmina la vitelogénesis, indicando que los ovocitos están listos para ser ovulados. Un comportamiento similar se ha observado en *Dicentrarchus labrax* en el cual se alcanza un nivel máximo de VTG dos meses antes del desove (3 mg/ml), manteniéndose constante durante y algunos días después del desove para posteriormente decaer (Mañanós *et al.*, 1994a; Asturiano *et al.*, 2000). En *Ictalurus punctatus* se ha observado también un incremento durante la maduración de los ovocitos, alcanzando hasta 30.21 mg/ml. Este valor disminuye considerablemente justo después del desove alcanzando valores

promedio de 3.79 mg/ml (Pacoli *et al.*, 1990). Estos resultados son consistentes con datos obtenidos en otros peces teleosteos (Tyler *et al.*, 1990; Heppell y Sullivan, 1999).

La cuantificación en *A. tropicus* de los niveles de VTG puede llegar a ser un indicador adecuado del estado de madurez de la gónada, su susceptibilidad a la inducción del desove y la culminación de la temporada reproductiva. Estos valores han sido empleados con éxito en otras especies de peces (Matsubara *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1994; Takemura y Teruya, 1997; Fujita *et al.*, 1998; Heppell y Sullivan, 1999). Estos autores también sugieren que se requiere conocer el estadio de madurez gonádica asociado a la concentración de la proteína para que las inducciones sean más efectivas

La técnica SRID empleada en pejelagarto para medir la concentración plasmática de VTG fue efectiva en un rango amplio de concentraciones. Esta misma técnica se ha empleado exitosamente como un medio para la cuantificación de las proteínas asociadas a la vitelogénesis (Chiba *et al.*, 1994; Matsubara y Sawano, 1995; Matsubara y Koya, 1997; Fujita *et al.*, 1998), siendo efectiva a concentraciones bajas (Shimizu *et al.*, 2000).

Los resultados de la inducción señalan que las hormonas análogas de factores liberadores de gonadotropinas des-Gly<sup>10</sup>-(D-Ala<sup>6</sup>)LHRH etilamida, D-Ala<sup>6</sup>-LHRHa y Ovaprim pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. tropicus*. La carencia de desoves en los organismos de los grupos control valida ampliamente estos resultados. La acción de estos compuestos en *A. tropicus* es probablemente similar a la que se presenta en *Cynoscion xanthulus* caracterizada por la maduración final ovocitaria (FOM) y desove (Thomas *et al.*, 1994). La efectividad de estos análogos de GnRH ha sido demostrada en varias especies ya que una sola dosis de 100 µg/kg de LHRH ha permitido obtener hasta un 92% de eficiencia en la ovulación en *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al.*, 1993). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Brzuska y Adamek (1999) en *Silurus glanis* quienes obtuvieron una eficiencia de ovulación del 100% al administrar 20 µg/kg de des-Gly<sup>10</sup> combinada con 10mg/kg de pimozido y del 80% con Ovaprim (0.33 mL/kg). Una ventaja adicional es que generalmente solo se requiere una dosis con respecto a otros métodos como la hipofisación o el uso de la

gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual además a través de su uso repetido provoca resistencia antigénica. Estos métodos, generalmente requieren más de una inyección (Drori *et al.*, 1994; Kucharczyk *et al.*, 1997;) incrementando el manejo de ejemplares y el esfuerzo cuando son grupos numerosos de reproductores; o bien, solo son efectivos cuando los ovocitos han iniciado FOM (Weber *et al.*, 2000).

El tiempo más corto de respuesta a los estimuladores del desove se observó en los análogos (des-Gly<sup>10</sup> y D-Ala<sup>6</sup>). Esto coincide con Alok *et al.* (1993) quienes observaron una eficiencia del 100% en desoves con un tiempo de 14 a 18 horas en *Heteropneustes fossilis* al suministrar sGnRH. Resultados similares fueron obtenidos por Brzuska (2000) quien empleó una mezcla de kobarelina (des Gly<sup>10</sup> -D-Ala<sup>6</sup> - GnRH Etilamida) y metoclopramida (20 µg y 10 mg/kg respectivamente) en *Cyprinus carpio*. En este caso obtuvo la ovulación entre 16 y 19 horas comparado con el suministro de Pituitaria de Carpa (PC) que demora 12 horas después de la segunda inyección (24 horas en total). Las variaciones en la respuesta al desove en *A. tropicus* probablemente estén también relacionadas con el estadio de madurez final del ovocito. Este proceso es acelerado por efecto de las gonadotropinas (Nagahama y Yamashita, 1989; Nagahama, 1990; Patiño y Thomas, 1990; Yaron, 1995) que son liberadas bajo acción de los de GnRH endógenos y análogos sintéticos (Aida, 1983; Yaron, 1995). Estos resultados se han observado en *Cyprinus carpio*, *Morone chrysops* y en *Stizosteidon vitreum* especies en las que estos análogos promueven la ruptura de la vesícula germinativa (GVBD) indicando que el ovocito está próximo a ser ovulado (Drori *et al.*, 1994; Mylonas *et al.*, 1997; Malison *et al.*, 1998). Los resultados de los experimentos 1 y 2 de este estudio, así como los desoves exitosos fuera de la temporada normal de los ejemplares de laboratorio (agosto) son consistentes con respecto a que las hembras de pejelagarto probablemente mantengan los ovocitos listos para ser desovados por un tiempo amplio, en espera de las condiciones que propicien la FOM. En este sentido, Asturiano *et al.* (2000) han observado resultados similares en *Dicentrarchus labrax*. En esta especie la FOM se puede presentar en un rango amplio de tiempo cuando la vitelogénesis ha culminado. De la misma manera, dicha respuesta individual puede depender de factores externos o internos que controlan la secreción de hormonas a nivel del eje reproductivo neuroendocrino como se ha



observado en *Acipenser transmontanus* (Doroshov *et al.*, 1997) desencadenándola bajo condiciones adecuadas o inhibiéndola por el estrés causado por la manipulación (Björnsson *et al.*, 1998).

Considerando lo anterior, la temporada de desoves de *A. tropicus* en laboratorio pudo ampliarse de dos semanas en agosto a casi cuatro meses (julio-octubre) mediante el uso conjunto de niveles de VTG y de las inyecciones de los análogos. Esto permitió obtener crías de buena calidad con alta supervivencia durante fases de la temporada reproductiva en las que no ocurre el desove de forma natural (especialmente al inicio y final), según nuestra experiencia con la especie. Respuestas similares se han descrito en otras especies de peces. En *Ictalurus punctatus* la utilización de LHRH y pimozido permiten mejorar la calidad de los desoves cuando se aplican a inicios de la temporada reproductiva. (Silverstein, *et al.*, 1999). Por otro lado, en el caso de *Stizosteidon vitreum* el desove se puede obtener 10 semanas antes de la temporada normal con la administración de des-Gly<sup>10</sup> y hGC mediante inyección; obteniéndose huevos y larvas con calidad equivalente a las de la temporada normal (Malison *et al.*, 1998). De igual forma, la administración de implantes con los análogos de GnRH puede ser una alternativa para acelerar la maduración y obtener el desove como lo han reportado Mugnier *et al.* (2000) en *Scophthalmus maximus*; Alok *et al.* (1994) en *Heteropneustes fossilis* quienes lograron la madurez de las hembras 4 meses antes de la temporada con tasas de eclosión entre 60-70%. Con este mismo método, Crim y Glebe (1984) obtuvieron un 30% de desoves 45 días antes de la temporada normal en *Salmo salar*.

Las tasas de fertilización de los dos experimentos de este estudio en donde fueron suministrados los análogos fueron altas. Esto sugiere que los niveles de vitelogenina empleados como indicador son adecuados para seleccionar a las hembras susceptibles a la inducción del desove, produciendo tasas de fertilización > 96 %. Resultados similares se han obtenido en *Cynoscion xanthulus* donde inyecciones de LHRH y pimozide han permitido valores de fertilización de hasta 84.4%, mientras que en los controles solo se obtuvo el 1.2% (Thomas *et al.*, 1994). De igual manera, Alok *et al.*, (1993) demostraron que la tasa de eclosión de huevos producidos por inyección de análogo de GnRH de

salmón fue normal (50%) en *Heteropneustes fossilis*, mientras que en el grupo control no se observaron desoves.

No obstante, la aplicación de estimuladores de desove no siempre produce resultados satisfactorios, así por ejemplo, Silverstein *et al.*, (1999) observaron que la tasa de fertilización en *Ictalurus punctatus* fue ligeramente mayor cuando al aplicar LHRH, comparada con el control, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas. Por otro lado Ako *et al.*, (1994) encontraron que en *Chanos chanos* la inducción con el análogo des-Gly<sup>10</sup> (D-Ala<sup>6</sup>) LHRHe produjo una respuesta contraria; las tasas de eclosión de 37.3% fueron inferiores a las de los desoves naturales (> 91%); de igual manera que en el caso de *Salmo trutta* donde el acelerar el desove administrando análogos redujo substancialmente la tasa de fertilización debido probablemente a que los ovocitos fueron ovulados sin completar la FOM (Mylonas *et al.*, 1992).

Las observaciones de las muestras de semen obtenidas del testículo indicaron que los machos de pejelagarto estaban listos para el desove desde inicios de la temporada, manteniéndose maduros a lo largo de ella y estando aptos para fertilizar huevos aún después de las fechas en las que típicamente se observan eventos reproductivos. Aún cuando no fueron inyectados, resultaron fértiles y activos durante el desove. Esto coincide con los datos reportados por Tucker *et al.* (1991) para *Epinephelus striatus* y Holland *et al.* (1996) para *Morone saxatilis*. En estas especies se observó que los machos son fértiles desde inicios de la temporada reproductiva, siendo la madurez de las hembras la que condiciona el desove. Un comportamiento inverso fue observado por Mayes *et al.*, (1993) en *Micropterus salmoides floridanus* en donde los desoves inducidos no fueron viables cuando solo se inyectó a las hembras con GnRH y hCG debido a que los machos aparentemente no culminaron la espermiación.

El bajo nivel de fertilización observado en la hembra tratada con Ovaprim puede estar asociado a consecuencias de la manipulación excesiva durante la aplicación de las diversas inyecciones de aceite previas, ya que este organismo pertenecía al grupo control

del primer experimento. Esto también se reflejó en la tasa de supervivencia de las crías obtenidas en este desove a la primera alimentación y durante el cultivo larval.

El análisis de covarianza de los resultados de tamaño y peso de los huevos y larvas indican, que no existen diferencias significativas en los tratamientos del experimento 2 cuando se emplea como co-factor el peso de la hembra, existiendo una fuerte asociación entre ambas variables. Esto fue confirmado en el análisis de regresión lineal simple. En el caso del experimento 1, probablemente se comporte de la misma manera aunque el análisis no se realizó debido al reducido número de observaciones. Tamaru *et al.* (1988) han encontrado resultados coincidentes en *Chanos chanos* al no observar diferencias en el diámetro de los huevos por efectos de la hormona LHRHa utilizando dosis de 1 a 65  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Según se ha observado en algunas especies el peso de la hembra depende de la edad, alimentación y tasa de crecimiento específica de cada individuo (Tucker, 1994; Doroshov *et al.*, 1997; Tan-Fermin *et al.*, 1997).

Es posible que todos aquellos factores que afectan a las hembras de pejelagarto durante la maduración gonádica produzcan un efecto directo sobre los huevos y la calidad de las larvas producidas. Este comportamiento se ha observado en larvas de *Perca flavescens* producidas por hembras sometidas a diferentes tratamientos de temperatura y fotoperiodo durante la maduración gonadal (Ciereszko *et al.*, 1997). En *Dicentrarchus labrax*, el suministro de dietas comerciales durante el proceso de maduración produce niveles inferiores de VTG, comparado con dietas naturales. Esto se refleja en una tasa de eclosión y viabilidad de huevos muy baja (Navas *et al.*, 1998).

La calidad de las larvas obtenidas después del periodo de larvicultura indican que la inducción temprana al desove apoyada en los niveles de VTG puede ser una herramienta adecuada para eficientizar la producción de postlarvas de *A. tropicus*. Los desoves se pueden distribuir a lo largo de la temporada reproductiva y facilitar el manejo durante las etapas tempranas de crianza. Esto permitirá la optimización de las instalaciones de producción de larvas de pejelagarto.

## 7. CONCLUSIONES

Es posible realizar la identificación del sexo de ejemplares adultos de *Atractosteus tropicus* mediante la detección y cuantificación de la Vitelogenina plasmática, empleando suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada.

El suero anti-VTG reacciona positivamente en presencia de plasma de machos tratados con estradiol, hembras maduras y extractos de huevo de pejelagarto, lo cual confirma que la proteína purificada es VTG de *A. tropicus*.

La identificación del sexo de esta especie empleando los niveles de VTG, evita el uso de métodos invasivos; estos mismos niveles pueden ser un indicador efectivo del estado de madurez gonádica y susceptibilidad al desove.

Los análogos superactivos de los factores liberadores de gonadotropinas (*des-Gly*<sup>10</sup>- (*D-Ala*<sup>6</sup>) *LHRH ethylamide* y *D-Ala*<sup>6</sup>-*LHRHa*) y Ovaprim, pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. tropicus*, permitiendo obtener larvas de calidad adecuada.

El empleo conjunto de los niveles de VTG y de los agentes inductores mencionados, permite programar los desoves durante la temporada, de dos semanas a cuatro meses.

## 8. LITERATURA CITADA.

- AIDA, K. 1983. *Effect of LH-Releasing Hormone on Gonadal Development in Salmonoid fish, the Ayu*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 49(5): 711-718.
- ALEMAN, L. y W. CONTRERAS. 1987. *Algunas consideraciones sobre el pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y descripción de sus hábitos alimenticios*. Memorias del IX congreso nacional de Ictiología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México.
- ALOK, D., T. KRISHNAN, D. SALUNKE., H. GUPTA., G. P. TALWAR and L. C. GARG. 1994. *Precocious ovarian recrudescence and induced off-season spawning of *Heteropneustes fossilis* by D-Lys<sup>6</sup> salmon gonadotropin releasing hormone analog (sGnRH-A)*. Journal of fish biology 45:909-915.
- ALOK, D., T. KRISHNAN., G. P. TALWAR and L. GARG. 1993. *Induced spawning of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using D-Lys<sup>6</sup> salmon gonadotropin-releasing hormonal analog*. Aquaculture 115: 159-167.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L., D. GUERRERO-TORTOLERO and J. C. PEREZ-URBIOLA. 2001. *Validation of an ovarian biopsy method in sea bass, *Centropomus medius* Günther*. Aquaculture Research 32: 379-384.
- ALVAREZ-LAJONCHERE, L. y O. G. HERNANDEZ M. 2001. *Producción de Juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: Diseño, operación y tecnologías*. World Aquaculture Society-Latinoamerican Chapter. 422 p.
- AKO, H., C. S. TAMARU and C. LEE. 1994. *Chemical and physical differences in milkfish (*Chanos chanos*) eggs from natural and hormonally induced spawns*. Aquaculture 127: 157-167.
- ASTURIANO, J. F., L. A. SORBERA, J. RAMOS, D. E. KIME, M. CARRILLO and S. ZANUY. 2000. *hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach*. Journal of fish Biology 56: 1155-1172
- BERLINSKY, D. L., W. KING, R. HODSON and C. V. SULLIVAN. 1997. *Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus**. Journal of the World Aquaculture Society 28(1): 79-86.
- BERLINSKY, D. L., W. KING, T. SMITH, R. D. HAMILTON, J. HALLOWAY and C. V. SULLIVAN. 1996. *Induced ovulation of summer flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants*. Journal of the World Aquaculture Society 2(2):143-151.

- BJÖRNSSON, B. T., Ó. HALLDÓRSSON, C. HAUX, B. NORBEG and C. L. BROWN. 1998. *Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus): plasma thyroid hormone and calcium levels.* Aquaculture 166: 117-140.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- BRZUSKA, E. 2000. *Artificial spawning of carp Cyprinus carpio L.: differences between the effects on reproduction in females of Polish and Hungarian provenance treated with carp pituitary and (D-Ala<sup>6</sup>) GnRH proNHet (Kobarelin).* Aquaculture Research 31: 457-465.
- BRZUSKA, E. and J. ADAMEK. 1999. *Artificial spawning of European catfish Silurus glanis L.: stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract.* Aquaculture Research 30: 59-64.
- CARNEVALI, O. and P. BELVEDERE. 1991. *Comparative studies of Fish, Amphibian and Reptilian Vitellogenins.* The journal of Experimental Zoology 259:18-25.
- CHAN, S. L., C. H. TAN, M. K. PANG and T.J. LAM. 1991. *Vitellogenin ourification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (Oreochromis niloticus, Linnaeus 1766).* The Journal of Experimental Zoology 257: 96-109.
- CHANG, C. F., E. L. LAU, B. Y. LIN and S. R. JENG. 1996. *Characterization of vitellogenin induced by estradiol 17-β in protandrus black porgy, Acanthopagrus schlegeli.* Fish Physiology and Biochemistry 15 (1): 11-19.
- CHÁVEZ, M., A. MATTHEEUWS y M. PÉREZ. 1989. *Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura.* INIREB-FUCID. Xalapa, Veracruz, México. 222p
- CHIBA, H. , K. IWATSUKI, K. HAYAMI, A. HARA and K. YAMAUCHI. 1994. *Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels Anguilla anguilla during artificial induced ovarian development.* Journal of the World Aquaculture Society 25(4): 553-559.
- CIERESZKO, R. E., K. DABROWSKI., A. CIERESZKO., J. EBELING and J. S. OTTOBRE. 1997. *Effects of temperature and photoperiod on reproduction of female yellow perch Perca flavescens: Plasma concentrations of steroid hormones. spontaneous and induced ovulation, and quality of eggs.* Journal of the world aquaculture Society 28(4): 344-356.

- CONTRERAS, W. 1988. *Implementación de un semicultivo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) en la comunidad del espino municipio del Centro, Tabasco.* Informe Técnico Secretaría de Educación Pública C8703-382. 30 p.
- CONTRERAS, W. y L. ALEMÁN. 1987. *Aspectos reproductivos y desarrollo embrionario del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill), en el estado de Tabasco.* Memorias del IX congreso nacional de Zoología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México.
- CONTRERAS, W. 1990. *Monitoreo de las poblaciones de pejelagarto *Atractosteus tropicus* en el estado de Tabasco, México.* Informe técnico. SEDUE. 60 p.
- CONTRERAS, W. y G. MÁRQUEZ. 1988. *Crecimiento y alimentación de *Lepisosteus tropicus* en áreas confinadas, Tabasco, México.* Resúmenes de la semana de investigación y cine científico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 1:28.
- CONTRERAS, W., G. MÁRQUEZ y J. L. GARCÍA. 1989. *Habilitación de zonas pantanosas para el semicultivo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* una propuesta para el manejo del ecosistema.* En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp 15-19.
- CONTRERAS, W. y S. MARAÑÓN. 1991. *Utilización de modelos matemáticos para la determinación del sexo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus*: una propuesta para el manejo de la especie.* En Memorias del I simposio sobre desarrollo socioeconómico de los humedales. 5-8 de Noviembre. Matanzas, Cuba. p. 48.
- CONTRERAS, S. W., C. B. SCHRECK, M. S. FITZPATRICK and C. B. PEREIRA. 1998. *Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).* Biology of Reproduction 58: 439-447.
- CRAIK, J.C. and S. M. HARVEY. 1984. *A biochemical method for distinguishing between sexes of fishes by presence of yolk protein in the blood.* Journal of Fish Biology 25: 293-303.
- CRIM, L. W., D. M. EVANS and B. H. VICKERY. 1983. *Manipulation of seasonal reproductive cycle of the Landlocked Atlantic salmon *Salmo salar* by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development.* Canadian Journal of fisheries and Aquatic Sciences 40:61-67.
- CRIM, L. W. and B. D. GLEBE. 1984. *Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog.* Aquaculture 43: 47-56.
- DANIEL, W. W., 1990. *Applied nonparametric statistics.* The Duxbury advanced series in statistic and desition sciences. PWS-Kent Publishing Company, Boston U.S.A. 635 p.

- DE VLAMING, V. L., H. S. WILEY, G. DELAHUNTY and R. A. WALLACE. 1980. *Goldfish (Carassius auratus) vitellogenin induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 613-623.
- DÍAZ, E. 1969. *Anatomía del tubo digestivo de Lepisosteus tropicus (Gill, 1863)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. México, 23 p.
- DOROSHOV, S. I., G. P. MOBERG and J. P. VAN EENENNAAM. 1997. *Observations on the reproductive cycle of cultured sturgeon Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes* 48: 265-278.
- DRORI, S., M. OFIR, B. LEVAVI-SIVAN and Z. YARON. 1994. *Spawning induction in common carp (Cyprinus carpio) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature*. *Aquaculture* 119:393-407.
- ESPINOZA, H., M. GASPAR y P. FUENTES., 1993. *Listados Faunísticos de México: III.- Los Peces dulceacuicolas Mexicanos*. Instituto de Biología. UNAM. México. 99 p.
- FENT, K., G. ACKERMANN and J. SCHOWAIGER. 1999. *Long-term effects of nonylphenol on vitellogenin and zona radiata protein expression in juvenile rainbow trout..* In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4.9 July. 499 p.
- FERRARA, A. M. and E. R. IRWIN. 2001. *A standardized procedure for internal sex identification in Lepisosteidae*. *North American Journal of Fisheries Management* 21(4): 956-961.
- FLAMMARION, P., F. BRION, M. BABUT, J. GARRIC, B. MIGEON, P. NOURY, E. THYBAUD, C. R. TYLER and X. PALAZZI. 2000. *Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (Leuciscus cephalus)*. *Ecotoxicology* 9: 127-135.
- FLETT, P.A. and J. F. LEATHERLAND. 1989. *Dose-related effects of 17  $\beta$ -oestradiol ( $E_2$ ) on liver weight, plasma  $E_2$ , protein, calcium and thyroid hormone levels, and measurement of the binding of thyroid hormones to vitellogenin in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson*. *Journal of fish Biology* 34:515-527.
- FITZPATRICK, M. S., G. W. FEIST, E. P. FOSTER and C. B. SCHRECK. 1999. *Reproductive biomarkers in white sturgeon: is endocrine disruption occurring in the Columbia river?*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4.9 July. 499 p.



- FITZPATRICK, M., J. REDDING., F. D. RATTI and C. B. SCHRECK. 1987. *Plasma testosterone concentration predicts the ovulatory response of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to gonadotropin-releasing hormone analog*. Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences 44(7): 1351-1357.
- FOSTIER, A., B. JALABERT., R. BILLARD., B. BRETON and Y. ZOHAR. 1983. *The Gonadal Steroids*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 277-372.
- FUJITA, T., A. TAKEMURA and K. TAKANO. 1998. *Immunochemical detection of precursors proteins yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus**. Journal of fish biology 52:1229-1240.
- GÓMEZ, M. 1989. *Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica*. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp 13-14
- GORBMAN, A. 1983. *Reproduction in Cyclostome fishes and its regulation*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 1-30
- GRIER, J. H. 1991. *Environmental control of reproduction in a livebearing fish*. American Zoologist. 31(5): 1-36.
- GWO, J. C., S. STRAWN and C. R. ARNOLD. 1993. *Induced ovulation in atlantic croaker (*scianidae*) using hCG and LHRH analog: a preliminary study*. Theriogenology. 39: 353-361.
- HAMAZAKI, T. S., I. IUCHI and K. YAMAGAMI. 1987. *Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost *Orizias latipes**. The Journal of Experimental Zoology 242:333-341.
- HARVEY, B. J. NACARIO, L.W. CRIM, J. V. JUARIO and C. L. MARTE. 1985. *Induced spawning of sea bass *Lates calcarifer*, and rabbitfish *Siganus guttatus*, after implantation of pelleted LHRH analog*. Aquaculture 47: 53-59.
- HEAD, W. D., W. O. WATANABE, S. C. ELLIS and E. P. ELLIS. 1996. *Hormone induced multiple spawning of captive Nassau grouper broodstock*. The progressive fish-culturist 58:65-69.
- HEPPELL, A. S. and C. V. SULLIVAN. 1999. *Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked*

*immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. Fish Physiology and Biochemistry* 20: 361-374.

HEPPELL, A. S. and C. V. SULLIVAN. 2000. *Identification of gender and reproductive maturity in the absence of gonads: muscle tissue levels of sex steroids and vitellogenin in gag (Mycteroperca microlipis)*. *Canadian Journal of Aquatic Science* 57: 148-159.

HERNANDEZ, V. U. 1999. *Punto crítico de no retorno en larvas de Pejelagarto Atractosteus tropicus (Gill)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 46 p.

HERNÁNDEZ, V. U., G. MÁRQUEZ., S. PÁRAMO., S. FÉLIX y S. HERNÁNDEZ, 1997. *Valor nutritivo de nauplios de Artemia spp. y su uso en la larvicultura del pejelagarto Atractosteus tropicus*. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997. pp 65-68.

HOLLAND, C. M., C. C. MYLONAS and Y. ZOHAR. 1996. *Sperm characteristics of precocious 1-year-old male striped bass Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 27(2): 208-212.

HYLLAND, K. 1999. *The Use of juvenile atlantic cod to monitor environmental estrogens*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4-9 July. 499 p.

KHOO, K. H. 1979. *The histochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovaries*. *Canadian Journal of Zoology* 57: 617-626.

KOMATSU, m., w. MATSUMOTO and S. HAYASHI. 1996. *Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B (3): 561-571.

KUCHARCZYK, D., R. KUJAWA, M. LUCZYNSKY, J. GLOGOWSKI, I. BABIAK and E. WYSZORMIRSKA. 1997a. *Induced spawning in bream Abramis brama (L.), using carp and bream pituitary extract and hCG*. *Aquaculture Research* 28:139-144.

KUCHARCZYK, D., R. KUJAWA, A. MAMCARZ, A. SKRZYPCZAK and E. WYSZORMIRSKA. 1998. *Induced spawning perch, Perca fluviatilis L. using FSH + LH with pimozide or metoclopramide*. *Aquaculture Research* 29: 131-136.

LAINE, A. (1992). *Quantitative and Qualitative immunoelectrophoresis. (Ch.20)*. In: *Methods in molecular biology, Immunochemical protocols. The press Inc., Totowa NJ*. M.Manson (ed), 10: 195-200

- LE BAIL, P. Y. and B. PRETON. 1981. *Reapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination*. *Aquaculture* 22:367-375.
- LAEMMMLI, U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227: 680-685.
- LAINE, A. (1992). Rocket immunoelectroforesis technique or electroimmunodiffusion. (Ch.21). In: *Methods in molecular biology, Immunochemical protocols*. The press Inc., Totowa NJ. M.Manson (ed)., 10: 201-205.
- LIN, F., A. CIERESZKO and K. DABROWSKI. 1996. *Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection*. *The progressive fish-culturist* 58:32-37.
- LINARES-CASENAVE, J. 1993. *Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of blood plasma vitellogenin in white sturgeon, Acipenser transmontanus*. Master of Science Thesis. University of California, Davis, CA. USA. 69 p.
- MALDONADO, E. 1991. *Aprovechamiento de peces forrajeros en la alimentación de Atractosteus tropicus (Gill) en jaulas flotantes en el estado de Tabasco, México*. *Universidad y Ciencia* 8(15):77-90.
- MALISON, J. A., L. S. PROCARIONE, T. B. KAYES, J. H. HANSEN and J. A. HELD. 1998. *Induction of out-of-season spawning walleye (Stizostedion vitreum)*. *Aquaculture* 163: 151-161.
- MANCINI, G., A. O. CARBONARA and J. F. HEREMANS 1965. *Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion*. *Immunochemistry* 2: 235-254.
- MAÑANÓS, E., J. NÚÑEZ, S. ZANUY, M. CARRILLO and LE MENN. 1994a. *Sea bass (Dicentrarchus labrax L.) vitellogenin. II- Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 217-223.
- MAÑANÓS, E., S. ZANUY, LE MENN, M. CARRILLO and J. NÚÑEZ. 1994b. *Sea bass (Dicentrarchus labrax L.) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 205-216.
- MARQUEZ, G. 1999. *Biología y Tecnología para el Cultivo del pejelagarto en el sureste de México*. En: *Memorias de la IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura SEMARNAP-INP-DGIC*. Cuernavaca, Morelos 19-21 de Octubre 1999. México. pp. 265-268.

- MÁRQUEZ, G., S. PÁRAMO., C. BAUTISTA., U. HERNÁNDEZ., S. FÉLIX., D. CASTILLO., S. SANTIAGO., H. GUZMAN., L. ARIAS., F. GONZÁLEZ. y L. DORANTES. 1997. *Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y supervivencia de larvas del pejelagarto *Atractosteus tropicus**. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997 . pp 76-79.
- MARQUEZ, P. H. 1998. *Efectos de la temperatura en el desarrollo de embriones y en el crecimiento de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* bajo condiciones de Laboratorio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. 43 p.
- MATSUBARA, T. and K. SAWANO. 1995. *Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*)*. The Journal of Experimental Zoology 272:34-45
- MATSUBARA, T., S. HONDA, T. WADA, K. SOYANO and A. HARA. 1995. *Seasonal changes in serum vitellogenin and estradiol 17- $\beta$  related to sexual maturation in rearing female Japanese sardine *Sardinops melanostictus**. Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst. 59: 19-29.
- MATSUBARA, T., N. OHKUBO, T. ANDOH, C. V. SULLIVAN and A. HARA. 1999. *Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder *Verasper moseri* a marine teleost that spawn pelagic eggs*. Developmental Biology 213: 18-32.
- MATSUBARA, T., T. WADA and A. HARA. 1994. *Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*)*. Comp. Biochem. Physiol. 109B (4): 545-555.
- MATSUBARA, T. and Y. KOYA. 1997. *Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs*. The Journal of Experimental Zoology 278: 189-200.
- MAYES, K. B., P. M. ROSENBLUM and T. M. BRANDT. 1993. *Raceway spawning of florida largemouth bass: effects of acclimation time and hormone treatment on spawning success*. The progressive fish-culturist 55 (1): 1-8.
- MUGNIER, C., M. GUENNOC., E. LEBEGUE., A. FOSTIER and B. BRETON. 2000. *Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot *Scophthalmus maximus* L. broodstock by implantation of sustained-release GnRH-a pellet*. Aquaculture 181: 241-255.

- MYLONAS, C. C., J. M. HINSHAW and C. V. SULLIVAN. 1992. *GnRH-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality*. *Aquaculture* 106: 379-392.
- MYLONAS, C. C., Y. MAGNUS., Y. KLEBANOV., A. GISSIS and Y. ZOHAR. 1997. *Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass*. *Journal of fish biology* 51: 234-250.
- MYLONAS, C., Y. ZOHAR., B. M. RICHARDSON and S. P. MINKKINEN. 1995. *Induced spawning of wild American shad *Alosa sapidissima* using sustained administration of gonadotropin releasing hormone analog (GnRH $\alpha$ )*. *Journal of the world aquaculture society* 26: 240-251
- MYLONAS, C., Y. ZOHAR., C. WOODS., P. THOMAS and R. SCHULZ. 1998. *Hormone profiles of captive striped bass *Morone saxatilis* during spermiation and long term enhancement of milt production*. *Journal of World Aquaculture Society* 29(4):379-392.
- NAGAHAMA, Y. 1983. *The functional morphology of teleost gonads*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). *Fish Physiology*, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 223-275.
- NAGAHAMA, Y. 1990. *Endocrine control of oocyte maturation in teleosts*. *Progress in Comparative Endocrinology*: 358-392.
- NAGAHAMA, Y. and M. YAMASHITA. 1989. *Mechanism of synthesis and action of 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturing-inducing substance*. *Fish Physiology and Biochemistry* 7(1-4):193-200.
- NAGAHAMA, Y., M. YOSHIKUNI, M. YAMASHITA, N. SAKAI and M. TANAKA. 1993. *Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation on fish*. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1-6): 3.14.
- NAGLER, J. J., S. RUBY, D. R. IDLER and Y. P. SO. 1987. *Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout*. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2421-2425.
- NAVAS, J. M., E. MAÑANÓS, M. THRUSH, J. RAMOS, S. ZANUY, M. CARRILLO, Y. ZOHAR and N. BROMAGE. 1998. *Effects of dietary lipid composition on vitellogenin, 17  $\beta$  estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax*)*. *Aquaculture* 165: 65-79.
- NG, T. B. and D. IDLER. *Yolk formation and differentiation in Fishes*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). *Fish Physiology*, Vol. IX A. Academic Press, New York, N.Y. pp. 373-404.

- OUCHTERLONY, Ö. 1953. *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reaction in coordinated systems of diffusion.* Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 32: 231-240.
- PACOLI, C. Q., J. M. GRIZZLE and J. T. BRADLEY. 1990. *Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus*.* Aquaculture 90:353-367.
- PATIÑO, R. 1997. *Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals.* The progressive fish-culturist 59:118-128.
- PATIÑO, R. and P. THOMAS. 1990. *Gonadotropin stimulates  $17\alpha$ ,  $20\beta$   $21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one from endogenous substrates in atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation in vitro.* General and Comparative endocrinology 78: 474-478.
- PELISSERO, C., B. CUISSET and F. LE MENN. 1989. *The influence of sex steroids in commercial fish meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*.* Aquat. Living Resour. 2: 161-168.
- PELISSERO, C. and J. P. SUMPTER. 1992. *Steroid and "Steroid-like" substances in fish diets.* Aquaculture 107: 283-301.
- PEREZ, E. 1995. *Efecto de la gonadotropina coriónica humana (GCH) en la maduración gonádica del pejelagarto *Atractosteus tropicus* Gill, 1823 en condiciones de laboratorio.* Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. 46 p.
- PÉREZ, E. y S. PÁRAMO. 1998. *Estudio Histológico de las gónadas de Pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisoteiformes:Lepisosteidae).* Universidad y Ciencia 14(27): 69-82.
- PETER, R. E. 1983. *The brain and neurohormones in teleosts reproduction.* . In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 97-136.
- REDDING, M. J. and R. PATIÑO. 1993. *Reproductive Physiology.* In D. H. Evans (Editor). The Physiology of Fishes Chapter 16. CRC Press, Boca Raton Florida.
- REDDY, P., R. RENAUD and J. F. LEATHERLAND. 1998. *Effect of cortisol and triiodothyronine on ovarian steroidogenesis in vitro in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at two different stages of oocyte maturation.* 1998. In J. Trant, Y. Zohar, A. Place and D. Mackinlay (Editors). International Congress on the biology of fish. Baltimore MD, July 26-30 pp. 95-99

- RESÉNDEZ, A. y M. SALVADORES. 1983. *Contribución al conocimiento de la biología de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill) y la tenguyaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco*. Biotica 8(4):413-426.
- RODRIGUEZ, G. M. 1992. *Técnicas de Evaluación Cuantitativa de la Madurez Gonádica en Peces*. AGT Editor. México. 79 p.
- SALAMI, A. A., O. A. BELLO-OLUSOJI, O. A. FAGBENRON and Y. AKEGBEJO-SAMSONS. 1997. *Induced breeding of two clariid catfishes *Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis* using tilapia pituitary extracts*. . Journal of the world aquaculture Society 28(1): 113-117.
- SATOH, H., K. YAMAMORI and T. HIBIYA. 1992. *Induced sawing of the Japanese eel*. Nippon Suisan Gakkaishi 58(5): 825-832.
- SCHRECK, C. B., W. CONTRERAS-SANCHEZ, and M. S. FITZPATRICK. 2001. *Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny*. Aquaculture 197: 3-24.
- SCOTT, A. P., C. STEWARD, Y. ALLEN and P. MATTHIESSEN. 1999. *17 $\beta$  oestradiol in male flatfish*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen 4.9 July. 499 p.
- SHIMIZU, M., H. FUKADA, T. FUJITA, N. HIRAMATSU and A. HARA. 2000. *Serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) in Sakhalin taimen after treatment with oestrogens and during oocyte growth*. Journal of Fish Biology 57: 170-181.
- SILVERSTEIN, J. T., B. BOSWORTH and W. WOLTERS. 1999. *Evaluation of dual injection of LHRHa and dopamine receptor antagonist pimozide in cage spawning of channel catfish *Ictalurus punctatus**. Journal of the World Aquaculture Society 30 (2): 263-268.
- SOWER, A. S., R. N. IWAMOTO., W. W. DICKHOFF and A. GORBMAN. 1984. *Ovulatory and steroidal response in coho salmon and steel trout following administration of salmon gonadotropin and D-Ala<sup>6</sup>, des Gly<sup>10</sup> gonadotropin releasing hormone ethylamide (GnRH<sub>a</sub>)*. Aquaculture 43: 35-46.
- SUMPTER, J. P. 1999. *Endocrine disrupting chemicals in the aquaculture environment*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen 4.9 July. 499 p.

- SUNDARARAJ, B. I., P. NATH and E. BURZAWA-GÉRARD. 1982. Synthesis of vitellogenin and its uptake by the ovary in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) in response to carp gonadotropin and its subunits. *General and comparative Endocrinology* 46: 93-98.
- TAKEMURA, A., A. HARA and K. TACAÑO. 1991. *Immunochemical identification and partial characterization of female-specific serum proteins in white-edged rockfish *Sebastes taczanowskii**. *Environmental Biology of Fishes* 30: 49-56.
- TAKEMURA, A. and M. OKA. 1998. *Immunochemical sexing of living yellow tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin like protein*. *Aquaculture Research* 29: 245-249.
- TAKEMURA, A. and K. TERUYA. 1997. *Purification and partial characterization of the vitellogenin of coral trout *Plectropomus leopardus**. *Bulletin of Marine Science* 61 (3): 791-800.
- TAMARU, C. S., C. S. LEE, C. D. KELLEY, J. E. BANNO, P. Y. HA, K. AIDA and I. HANYU. 1988. *Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH-analogue therapy for induction of milkfish (*Chanos chanos*) to spawn*. *Aquaculture* 74: 147-163.
- TAN-FERMIN, J., R. R. PAGADOR and R. CHAVEZ. 1997. *LHRHa and Pimozide-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive cycle*. *Aquaculture* 148: 323-331.
- TARANGER, G. L., C. HAUX, S. O. STEFANSSON, B. T. BJÖRNSSON, B. T. WALTHER and T. HANSEN. 1998. *Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol 17- $\beta$  profiles in Atlantic salmon *Salmo salar**. *Aquaculture* 162: 85-98.
- THOMAS, P., P. COPELAND and J. C. PRENTICE. 1994. *Preliminary observations of the reproductive physiology of female orangemouth corvine in captivity*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25(2): 214-224.
- TUCKER, J. W. 1994. *Spawning by captive serranid fishes: a review*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25(3): 345-359.
- TUCKER, J. W., J. E. PARSONS, G. C. EBANKS and P. G. BUSH. 1991. *Induced spawning of Nassau grouper *Epinephelus striatus**. *Journal of the World Aquaculture Society* 22(3): 187-191.
- TYLER, C. 1993. *Electrophoretic patterns of yolk proteins throughout ovarian development and their relationship to vitellogenin in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. *Comp. Biochem. Physiol.* 106b (2): 321-329.



- TYLER, C., J. P. SUMPTER and N. BROMAGE. 1988. *In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, Salmo gairdneri*. The Journal of Experimental Zoology 246: 171-179.
- TYLER, C. R. J. P. SUMPTER and P. R. WITTHAMES. 1990. *The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Biology of Reproduction 43: 202-209.
- VUTHIPHANDCHAI, V. and Y. ZOHAR. 1999. *Age related sperm quality of captive striped bass Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society 30 (1): 65-72.
- WAAGBOE, R. and K. SANDNES. 1988. *Determination of vitellogenin in serum of rainbow trout (Salmo gairdneri) by high performance gel permeation chromatography*. Journal of Chromatography 427: 138-143.
- WATANABE, W., E. ELLIS and S. ELLIS. 1998. *Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder Paralichthys dentatus broodstock*. Journal of the World Aquaculture Society 29 (4): 293-404.
- WATANABE, W. O., E. P. ELLIS, S. C. ELLIS, J. CHAVEZ., C. MANDREFFI, R. W. HAGOOD., M. SPARSIS and S. ARNESON. 1998. *Artificial propagation of mutton snapper Lutjanus analis A new candidate marine fish species for aquaculture*. Journal of the World Aquaculture Society 29 (2): 176-187.
- WEBER, K. and M. OSBORN. 1969. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. Journal Biol. Chem., 244:4406-4412.
- WEBER, G. M., W. KING., R. W. CLARK., R. G. HODSON and C. V. SULLIVAN. 2000. *Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass Morone saxatilis*. Aquaculture 188:133-146.
- WILEY, H.S., L. OPRESKO, and R. A. WALLACE. 1979. *New method for purification of vertebrate vitellogenin*. Analytical Biochemistry 97: 48-53.
- YAO, Z. and L. CRIM. 1996. *A biochemical characterization of vitellogenin isolated from marine fish ocean pout (Macrozoarces americanus L.), lumpfish (Cyclopterus lumpus) and Atlantic cod (Gadus morhua)*. Comp. Biochem. Physiol. 113B (2): 247-253.
- YARON, Z. 1995. *Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp*. Aquaculture 129: 49-73.

ZAR, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 p.

ZACARÍAS, A., G. MÁRQUEZ., S. PÁRAMO., C. BAUTISTA., L. DORANTES., I. CANDELARIO y A. RAMOS, 1997. *Supervivencia y Crecimiento de juveniles de pejalagarto *Atractosteus tropicus* expuestos a fotoperiodo continuo en la etapa larval*. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997. pp 84-87.

ZOHAR, Y. 1998. *Gonadotropin Releasing hormones: why do fish need multiple forms?* 1998. In J. Trant, Y. Zohar, A. Place and D. Mackinlay (Editors). International Congress on the biology of fish. Baltimore MD, July 26-30 pp. 1-4



