

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Génesis y descripción del desarrollo esquelético y
malformaciones óseas en lobina rayada (*Morone saxatilis*) en
un cultivo comercial**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Aida Victoria Muñoz Ruiz

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Aida Victoria Muñoz Ruiz
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. Rosalía Aguilar Medrano



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Aida Victoria Muñoz Ruiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Acuicultura.

Génesis y descripción del desarrollo esquelético y malformaciones óseas en lobina rayada (*Morone saxatilis*) en un cultivo comercial

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Entre las especies de peces cultivados, la incidencia de malformaciones óseas es frecuente y muy variable, ya que depende de factores como los nutricionales, ambientales y genéticos. Muy pocas piscifactorías producen el 100% de peces sin malformaciones. Las más comunes afectan a la columna vertebral y al complejo mandibular. El objetivo de este estudio fue describir el desarrollo esquelético y las malformaciones óseas de lobina rayada (*Morone saxatilis*) proveniente de un cultivo comercial. Se recolectaron muestras de 50 organismos a los 0-15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 40, 50, 60, 70 DDE: Se registró la longitud notocordal o total y el peso. Para describir el desarrollo esquelético se utilizó la técnica de diafanización y doble tinción, con azul de alcian para el cartílago y rojo de alizarina para el hueso. El desarrollo esquelético comenzó a los 2 DDE con la formación de las estructuras del complejo mandibular y de las aletas pectorales (esqueleto apendicular), a los 7 DDE aparecieron los primeros arcos hemales que forman parte del esqueleto axial y a los 9 DDE comenzó la osificación de las vértebras. Todo el desarrollo óseo y la osificación del esqueleto terminó alrededor de los 70 DDE. Las malformaciones observadas en este estudio se dividieron en dos grupos, aparentes y no aparentes, en el primer grupo se observó una mayor prevalencia de anomalías que involucran a una o más vértebras, las cuales representaron un 14.25 %, en el segundo grupo prevalecieron las malformaciones de los arcos y espinas neurales con un 82.14 % y 93.87 % respectivamente, también se observó la compresión vertebral en organismos de 70 DDE con una prevalencia del 12.75%. La morfometría geométrica (MG) es un método sensible con el cual se pueden detectar malformaciones esqueléticas que no son detectables a simple vista, en lobina rayada la MG ayudó a detectar las variaciones en la forma del pedúnculo caudal, que estuvieron asociadas con alteraciones de la columna vertebral.

Palabras clave: desarrollo esquelético, hueso, cartílago, malformación, morfometría geométrica, doble tinción

Abstract of the thesis presented by **Aida Victoria Muñoz Ruiz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Genesis and description of skeletal development and skeletal malformations in striped bass (*Morone saxatilis*) in a commercial culture

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

Among cultivated fish species, the incidence of skeletal malformations is common and highly variable, as it depends on factors such as nutrition, environment, and genetics. Very few fish farms produce 100% of fish without malformations. The most common malformations affect the spine and the mandibular complex. The objective of this study was to describe the skeletal development and bone malformations of striped bass (*Morone saxatilis*) from a commercial culture. Samples of 50 organisms were collected at 0-15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 40, 50, 60, and 70 days post-hatch development (DPH). The notochordal or total length and weight were recorded. To describe skeletal development, the techniques of clearing and double staining were used, with Alcian blue for cartilage and Alizarin red for bone. Skeletal development began at 2 DPH with the formation of the structures of the mandibular complex and pectoral fins (appendicular skeleton). At 7 DPH, the first hemal arches that belongs to the axial skeleton, appeared; and, at 9 DPH, the ossification of the vertebral, began. Complete bone development and ossification of the skeleton were finished around 70 DDE. The malformations observed in this study were divided into two groups: apparent and non-apparent; in the first group, a higher prevalence of anomalies involving one or more vertebrae was observed, which represented 14.25%. In the second group, malformations of the neural arches and spines predominated, with a prevalence of 82.14% and 93.87%, respectively. Vertebral compression was also observed in organisms at 70 DDE with a prevalence of 12.75%. Geometric morphometry (GM) is a sensitive method, which allows detect skeletal malformations that are not recognizable with the naked eye. In striped bass, GM helped detect variations in the shape of the caudal peduncle, which were associated with alterations in the spine

Keywords: skeletal development, bone, cartilage, malformation, geometric morphometric, double staining.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi mamá Araceli, mi papá Victor y mi hermana Anais, que estuvieron siempre apoyándome a la distancia, dándome fuerzas para continuar.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico para realizar mis estudios y esta tesis de maestría.

Al Dr. Benjamín Barón, por aceptarme en su laboratorio, por siempre guiarme cuando más perdida me sentía y darme seguridad para continuar, y sobre todo por estar disponible para responder todas mis dudas.

A la Dra. Mónica Hernández porque a pesar de todo me adoptó en su laboratorio, haciéndome sentir parte de un equipo. Gracias por siempre estar disponible para resolver mis dudas de lo que fuera.

A la Dra. Rosalía Aguilar por los nuevos aprendizajes y por ayudarme a entender nuevos análisis. Espero que en un futuro pueda volver a trabajar con usted.

Al Dr. Del Río, por todo lo que me enseñó durante sus clases, por siempre estar dispuesto a resolver mis dudas, fue un guía en todo este proceso de la maestría.

A las técnico M. C. Yanet Guerrero y Dra. Magali Zacarias, por todo el apoyo que me brindaron en estos dos años y en enseñarme que siempre se pueden hacer mejor las cosas.

Al técnico Luis Murillo, por haber hecho más ameno mi estancia en el laboratorio de Ecofisiología, por las pláticas y las risas.

Al personal administrativo del departamento de Acuicultura por todo el apoyo que me brindaron durante la maestría.

A mis papás, Araceli y Victor, por apoyarme en esta gran decisión de hacer la maestría lejos de casa y por darme palabras de liento cuando más las necesité.

A mi hermana Anais, por estar siempre disponible para escucharme cuando algo no estaba saliendo bien o cuando vivir sola se estaba poniendo difícil y por apoyarme en cada decisión.

A Slinky y Booster, mis dos perros salchichas, que, aunque ya se acostumbraron a que los deje, me siguen demostrando su amor, siempre estuvieron presentes en mis pensamientos y me impulsaron a nunca rendirme.

A mi tía por siempre preguntarme cómo estaba y mandarme muchos abrazos y besos.

A mis primos, Aaron y Úrian, que siempre me mandaban cosas chistosas, lo que ayudaba a no sentirme lejos de la familia.

A Daniel que siempre me mantuvo informada sobre cosas de fútbol y que de vez en cuando en las videollamadas aparecías haciendo tus caras chistosas lo que me hacía olvidarme un poco del estrés.

A Maximiliano por estar conmigo durante este proceso a la distancia, siempre actualizándonos sobre nuestras vidas y dándome fuerzas para continuar. Gracias por tu amistad tan sincera.

A Jazmín que estuvo dispuesta a escucharme y que me hacía olvidar por un momento lo mal que lo estaba pasando, siempre dándome fuerza para seguir.

A Cesar por ser un amigo verdadero, por a pesar de los obstáculos aquí seguimos, por ser mi confidente, mi compañero de postres y un excelente manager, por siempre escucharme y darme un abrazo cuando lo necesité. Te quiero.

A Doris, por enseñarme el verdadero significado de mejor amiga, te agradezco todo el apoyo que me diste, por los buenos momentos, los consejos, las enseñanzas y todo el cariño que me diste, fuiste y siempre serás como mi hermana mayor. Espero vivir más aventuras juntas. Te quiero.

A mis compañeros de la generación (Aldo, Nayeli, Angélica, Mayra, Evelyn, Romario y Hillary) por los buenos momentos, las risas y todo su apoyo que alguna vez me brindaron.

A Noé por hacerme reír con sus videos de gatos, por siempre seguirme a los planes que incluían cafeterías y por las pláticas y consejos.

A Sergio por haber sido mi compañero de laboratorio, por toda la comprensión, la empatía y el cariño que me brindaste, por siempre escucharme y estar durante estos dos años. Gracias por todos los cafés y pasteles que compartimos.

A Eliasid, Héctor y Rubén, por darme momentos de diversión, muchas risas y sobre todo mucho baile.

A Corina, por ser la mejor roomie que he tenido, por las pláticas nocturnas, los consejos, los desayuno y más. Gracias por tu compañía en los buenos y peores momentos. Te quiero.

A Everly, quien me orientó sobre la maestría y me ayudó a no sentirme sola cuando llegué a Ensenada. Gracias por toda la ropa bonita.

A la maestra Claudia, por los nuevos bailes, las risas y sobre todo por no dejarme olvidar lo bonito que es el folklor, además de abrirme la puerta de su hogar y siempre apoyarme en todo, aun cuando todo parecía no tener solución.

A todas las integrantes de Ña Chpac, por brindarme un lugar feliz para seguir bailando, por las risas y todas las presentaciones. Siempre las voy a llevar en mi corazón.

A Sofía y Anna Paula, quienes me enseñaron a disfrutar cada momento, que a pesar de ser pequeñas me mostraron cosas tan valiosas como la amistad. Son como mis hermanitas.

Al Dr. José Luis, por haberme impulsado a continuar con la maestría y siempre creer en mí. Gracias por todo lo que me enseñó, sin usted nada de esto habría sido posible.

A la Dra. Bertha por haber cuidado de mi en la licenciatura, por ayudarme y apoyarme siempre. Gracias por seguir acordándose de mí. Espero verla pronto.

A Valeria, mi mejor amiga, que, aunque no nos escribíamos mucho sabía que siempre estaba para escucharme y darme un consejo.

A Darinka y Aranza por estar presentes durante estos dos años que me ausenté, sé que a pesar de no escribirnos mucho, están siempre dispuestas a escucharme y darme palabras de aliento.

A Xihuitzilli y sus directores Juve y Leo, que, a pesar de la distancia, siempre me recordaban lo bonito que es la danza y el orgullo de ser mexicana y por ser un impulso para volver lo más pronto a la CDMX.

A la Academia de Música ApArte, que a través de estos 15 años me mostraron que la música siempre ayuda a superar cualquier obstáculo y por estar en cada etapa de mi vida.

Tabla de contenido

| | Página |
|--|-----------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | x |
| Lista de tablas | xvii |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Biología de la especie (<i>Morone saxatilis</i>)..... | 7 |
| 1.2 Antecedentes | 8 |
| 1.3 Justificación | 9 |
| 1.4 Hipótesis..... | 10 |
| 1.5 Objetivos | 10 |
| 1.5.1 Objetivo general..... | 10 |
| 1.5.2 Objetivos específicos..... | 10 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología..... | 12 |
| 2.1 Muestreo de los organismos y primera clasificación de malformaciones aparentes..... | 12 |
| 2.2 Morfometría geométrica (MG) | 13 |
| 2.3 Técnica de transparentación y doble tinción | 14 |
| 2.3.1 Transparentación y doble tinción para peces de 2 a 21 DDE con el método de Park y Kim, 1984..... | 14 |
| 2.3.2 Transparentación y doble tinción para peces de 23 a 70 DDE (Darias <i>et al.</i> , 2010 con modificaciones de Gavaia <i>et al.</i> 2000) | 16 |
| 2.4 Descripción del desarrollo esquelético | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 3. Resultados..... | 18 |
| 3.1 Crecimiento | 18 |
| 3.2 Descripción del desarrollo esquelético de <i>Morone saxatilis</i> | 19 |
| 3.2.1 Descripción del esqueleto mandibular y aletas pares..... | 19 |
| 3.2.2 Descripción del esqueleto axial y aletas impares (caudal, dorsal y anal) | 34 |
| 3.3 Prevalencia de malformaciones | 48 |
| 3.4 Morfometría geométrica (MG) | 53 |
| | |
| Capítulo 4. Discusión | 71 |
| 4.1 Desarrollo esquelético | 71 |
| 4.2 Malformaciones esqueléticas | 75 |
| 4.3 Morfometría geométrica..... | 77 |
| | |
| Capítulo 5. Conclusiones..... | 81 |
| | |
| Literatura citada | 82 |

Lista de figuras

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1 Diagrama que muestra los principales factores que pueden afectar las células esqueléticas, el cartílago o el desarrollo de la matriz y la mineralización óseas en larvas y juveniles de peces cultivados (Tomada de Boglione <i>et al.</i> 2013 y modificado por Waagbø 2006)..... | 2 |
| 2 Lobina rayada (<i>M. saxatilis</i>) cultivada por la empresa Pacifico Aquaculture en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México. (Tomada de: https://www.pacificoaquaculture.com/nuestra-lobina | 7 |
| 3 a) Lobina europea (<i>Disentrarchus labrax</i>) y b) lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>) (Tomadas de: www.stockfood.com.mx y https://www.pacificoaquaculture.com/nuestra-lobina)..... | 8 |
| 4 Gradilla que muestra los landmarks (rojo) y semilandmarks (negro) en un organismo de lobina rayada A) sin malformación y B) con malformación..... | 14 |
| 5 Distribución de tallas de <i>M. saxatilis</i> a lo largo del estudio..... | 18 |
| 6 Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 2 DDE (Lt=0.63cm), 3 DDE (Lt = 0.67 cm), 4 DDE (Lt = 0.69cm) y 5 DDE (Lt = 0.71 cm). A) vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; PcoPr, proceso coracoideus; PHy, par hyomandibularis; PMpt, par metapterigoideal; PQ, par quadrata; PRPI, plato radial pectoral; Psy, par simplectica..... | 19 |
| 6 (continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 2 DDE (Lt=0.63cm), 3 DDE (Lt = 0.67 cm), 4 DDE (Lt = 0.69cm) y 5 DDE (Lt = 0.71 cm). A) vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; PcoPr, proceso coracoideus; PHy, par hyomandibularis; PMpt, par metapterigoideal; PQ, par quadrata; PRPI, plato radial pectoral; Psy, par simplectica..... | 20 |
| 7 Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE (Lt = 0.71cm), 7 DDE (Lt = 0.76 cm), 8 DDE (Lt = 0.80 cm), 9 DDE (Lt = 0.82 cm). CScco, cartílago escapulocoracoide; CM, cartílago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, quadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular..... | 21 |
| 7 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE (Lt = 0.71cm), 7 DDE (Lt = 0.76 cm), 8 DDE (Lt = 0.80 cm), 9 DDE (Lt = 0.82 cm). CScco, cartílago escapulocoracoide; CM, cartílago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, quadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular..... | 22 |
| 7 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE (Lt = 0.71cm), 7 DDE (Lt = 0.76 cm), 8 DDE (Lt = 0.80 cm), 9 DDE (Lt = 0.82 cm). CScco, cartílago | |

- escapulocoracoide; CM, cartílago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, quadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular. 22
- 8 Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE (Lt = 0.86 cm), 11 DDE (Lt=0.92 cm), 12 DDE (Lt=0.92 cm) y 13 DDE (Lt = 1.03 cm). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, procesus coracoideus; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sy, symplectica, 23
- 8 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE (Lt = 0.86 cm), 11 DDE (Lt=0.92 cm), 12 DDE (Lt=0.92 cm) y 13 DDE (Lt = 1.03 cm). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, procesus coracoideus; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sy, symplectica. 23
- 8 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE (Lt = 0.86 cm), 11 DDE (Lt=0.92 cm), 12 DDE (Lt=0.92 cm) y 13 DDE (Lt = 1.03 cm). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, procesus coracoideus; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sy, symplectica, 24
- 9 Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartílago basypterigium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CPTg, cartílago propterygial; CRPc, cartílago radial pectoral; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, procesus coracoideus; Pmx, premaxilar; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica. 25
- 9 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartílago basypterigium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CPTg, cartílago propterygial; CRPc, cartílago radial pectoral; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, procesus coracoideus; Pmx, premaxilar; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica. 26
- 9 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartílago basypterigium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CPTg, cartílago propterygial; CRPc, cartílago radial pectoral; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, procesus coracoideus; Pmx,

- premaxilar; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....27
- 10 Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....28
- 10 (Continuación). Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....29
- 10 (Continuación). Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....30
- 11 Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostral; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....31
- 11 (Continuación) Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostral; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....32

- 11 (Continuación) Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago babasipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostralCScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.....33
- 12 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 7 DDE (Lt = 0.76cm) B) 8 DDE (Lt = 0.80 C) 9 DDE (Lt = 0.82cm) y D) 10 DDE (Lt = 0.86). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cph, cartilago parhipural; V, vertebra; Ch, cartílago hipural; R, radio.....34
- 13 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 11 DDE (Lt = 0.92cm) B) 12 DDE (Lt = 0.96cm) C) 13 DDE (Lt = 1.03cm) D) 14 DDE (Lt = 1.13 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Ch, cartílago hipural; Cph, cartílago parhipural; CpH, cartílago post-hemal; CpPH, cartílago post-prehipural CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.....36
- 13 (Continuación) Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 11 DDE (Lt = 0.92cm) B) 12 DDE (Lt = 0.96cm) C) 13 DDE (Lt = 1.03cm) D) 14 DDE (Lt = 1.13 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Ch, cartílago hipural; Cph, cartílago parhipural; CpH, cartílago post-hemal; CpPH, cartílago post-prehipural CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.....37
- 14 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 15 DDE (Lt = 1.17cm) B) 17 DDE (Lt = 1.30cm) C) 19 DDE (Lt = 1.40cm) D) 21 DDE (Lt = 1.34cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurale; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.....39
- 15 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 23 DDE (Lt = 1.72 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.....40
- 16 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 25 DDE (Lt = 1.87cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurale; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.....41
- 17 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 27 DDE (Lt = 1.99cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurale; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.....42

- 18 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 29 DDE (Lt = 2.24cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurale; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pozh, postzigapofisis hemal; Pozn, postzigapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Pt, pterigioforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.....43
- 19 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 31 DDE (Lt = 2.50cm). A) Costillas pleurales B) Aleta caudal y anal C) Aleta caudal. An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurale; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigióforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.....44
- 20 Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 40 DDE (Lt = 3.03cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.70). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleuraleS; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Lp, leptotriquia; Ph, parhipural; Pozh, postzygapofisis hemal; Pozn, postzygapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Przn, prezigapofisi neural Pt, pterigióforos; U, urostilo; Un, uroneural; V, vertebra; R, radio.....45
- 20 (Continuación). Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 40 DDE (Lt = 3.03cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.70). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleuraleS; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Lp, leptotriquia; Ph, parhipural; Pozh, postzygapofisis hemal; Pozn, postzygapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Przn, prezigapofisi neural Pt, pterigióforos; U, urostilo; Un, uroneural; V, vertebra; R, radio.....46
- 21 Secuencia del desarrollo esquelético y osificación de *Morone saxatilis* agrupado en esqueleto apendicular (Aa, aleta anal; Ac, aleta caudal; Ad, aleta dorsal; Apec, aleta pectoral; Apel, aleta pectoral), complejo mandibular y esqueleto axial.....47
- 22 Frecuencia de malformaciones aparentes en lobina rayada, *Morone saxatilis*.....49
- 23 A) Compresión vertebral en un organismo de 70 DDE y B) Cifosis en un organismo de 15 DDE. An, arco neural; V, vértebra.....51
- 24 Prevalencia por clase de edad (DDE) de las malformaciones óseas en lobina rayada (*Morone saxatilis*).....51
- 25 Malformación de arcos y espinas neurales abiertas en lobina rayada (*Morone saxatilis*).....52
- 26 Malformaciones en los pterigióforos de la aleta anal de la lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 27 DDE y B) 29 DDE.....53
- 27 Análisis de componentes principales (PCA) y gradillas para lobina rayada con una edad de 19 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....55

- 28 Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 19 DDE.....56
- 29 Análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 21 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....57
- 29 (Continuación). Análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 21 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....58
- 30 Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 21 DDE.....58
- 30 (Continuación). Comparación del resultado del analisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 21 DDE.....59
- 31 Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 23 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....60
- 31 (Continuación). Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 23 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....61
- 32 Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 23 DDE.....61
- 33 Análisis de componentes principales (PCA) y gradillas para lobina rayada con una edad de 25 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).....63
- 34 Comparación del resultado del analisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 25 DDE.....64

- 35 Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 27 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo). 66
- 36 Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 27 DDE. 67
- 37 Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 70 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo). 68
- 37 (Continuación) Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 70 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo). 69
- 38 Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 70 DDE. 69
- 38 (Continuación) Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 70 DDE. 70

Lista de tablas

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1 Clasificación taxonómica de lobina rayada, <i>Morone saxatilis</i> | 8 |
| 2 Tiempos de incubación para transparentación y doble tinción (Park y Kim, 1984) | 15 |
| 3 Tiempos de incubación para transparentación y doble tinción (Darias <i>et al.</i> , 2010 con modificaciones de Gavaia <i>et al.</i> , 2000) | 17 |
| 4 Frecuencia y porcentaje de malformaciones aparentes en lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>) en un cultivo comercial. | 49 |
| 5 Frecuencia y porcentaje de malformaciones óseas no aparentes en lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>), en un cultivo comercial. | 50 |

Capítulo 1. Introducción

En la acuicultura, la incidencia de malformaciones esqueléticas es muy variable, en diferentes especies y bajo diferentes condiciones de cría. El porcentaje de peces con anomalías medias a severas difiere mucho, no solo entre granjas, sino también entre diferentes lotes dentro de la misma planta de incubación o incluso dentro del mismo lote de huevos (Boglione *et al.*, 2013a). Actualmente, muy pocas piscifactorías pueden afirmar que producen de forma rutinaria el 100% de peces sin malformaciones (Boglione *et al.*, 2013b). En el continente europeo, en el año 2018 se estimó una pérdida de entre 366,000 y 4,094,000 euros en incubadoras medianas, causado por una alta mortalidad debido a anomalías esqueléticas graves. Por eso, reducir las malformaciones le daría un valor económico más alto al producto, ya que aumentaría la calidad, además de darle una mejor imagen a la acuicultura, por lo tanto, los consumidores podrían estar dispuestos a pagar precios más altos, lo que se reflejaría en toda la cadena de suministro, afectando positivamente los cultivos (Hough, 2009; Cantillo *et al.*, 2023)

Las malformaciones esqueléticas son alteraciones de la formación o el desarrollo de las estructuras osteocartilaginosas (Ridruejo *et al.*, 2011). La presencia de estas malformaciones en los peces teleósteos cultivados es un problema constante que conlleva perjuicios económicos, biológicos y de bienestar animal. Los peces con alguna deformidad deben ser retirados manualmente y este fenómeno se repite cada vez con mayor frecuencia, y los productos de estos peces a menudo terminan en filetes o harina de pescado, con la consiguiente pérdida de beneficios (Koumoundouros *et al.* 1997 a, b; Boglione *et al.* 2001, 2003, 2009). Además de que el procesamiento de filetes se ve afectado por la presencia de anomalías esqueléticas (sobre todo vertebrales) ya que las máquinas que los procesan están diseñadas para peces de forma normal, y es necesario un mayor procesamiento manual y un recorte extra (Branson y Turnbull, 2008).

Existen diversos factores que pueden causar malformaciones esqueléticas en peces cultivados, especialmente en el periodo de cría de larvas. Parámetros físicos y químicos como el pH (Steingraeber y Gingerich, 1991), el oxígeno (Hattori *et al.*, 2004), temperatura del agua (Sfakianakis *et al.*, 2004; Georgakopoulou *et al.* 2007) y salinidad (Okamoto *et al.*, 2009); otros factores que también están relacionados con anomalías óseas y han tomado importancia son el color de la pared del tanque (Cobcroft y Battaglione 2008; Cobcroft *et al.* 2012), la corriente de agua (Owen *et al.* 2012) y el sistema de contención (Can, 2013). También se ha asociado a estas alteraciones el suministro deficiente de nutrientes, como fosfolípidos, ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) específicamente el DHA y vitaminas como la A,

C, D y E (Boglione *et al.*, 2013b), esto se observa con mayor frecuencia en las primeras etapas de vida de los peces (Fig. 1).

Otro factor que podría contribuir a las malformaciones es el genético, que, aunque se consideran como marginales (Boglione *et al.*, 2013b), se ha observado que la exposición a altas temperaturas induce una reducción en la transcripción de los genes relacionados con la matriz extracelular que limita la maduración y mineralización de los osteoblastos, lo que conduce al desarrollo de malformaciones de la columna vertebral en el salmón del Atlántico (Ytteborg *et al.*, 2010), malformación ocular congénita y anomalías esqueléticas en el pez cebra (Babcock *et al.*, 2014), correlación intrínseca entre lordosis y consanguinidad (Izquierdo *et al.*, 2010); entre otras, sin embargo, se sabe poco sobre los factores genéticos responsables de tales malformaciones. Es importante mencionar que las técnicas de cultivo generalmente conducen a la endogamia, con la consecuente pérdida de variabilidad genética de las progenies, lo cual puede contribuir al desarrollo de malformaciones. (Aulstad y Kittelsen, 1971).

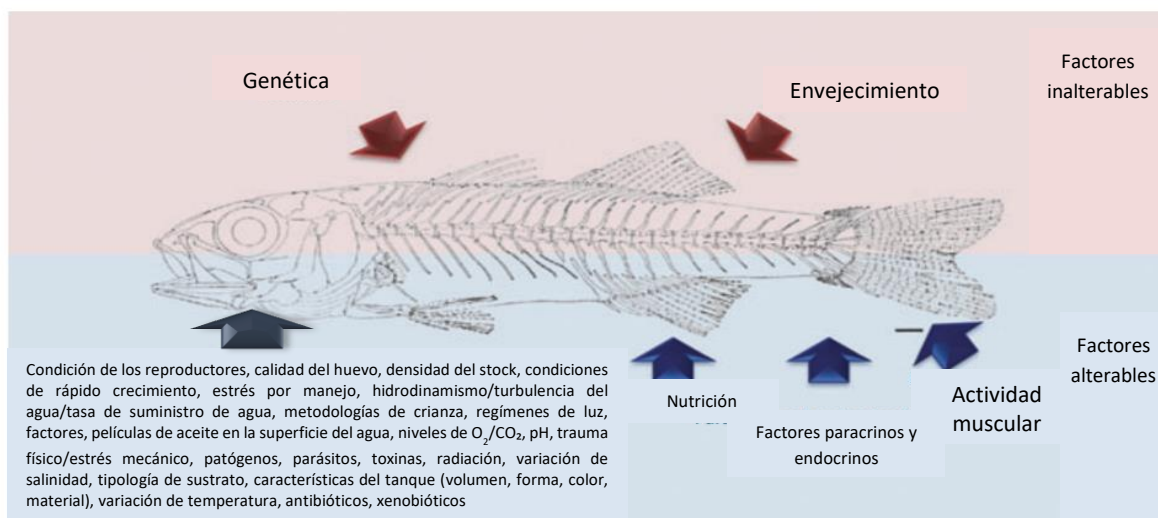


Figura 1. Diagrama que muestra los principales factores que pueden afectar las células esqueléticas, el cartílago o el desarrollo de la matriz y la mineralización óseas en larvas y juveniles de peces cultivados (Tomada de Boglione *et al.* 2013 y modificado por Waagbø 2006).

Se han registrado una gran diversidad de malformaciones óseas en los peces, las cuales se pueden clasificar de acuerdo con su ubicación, morfología e impacto. Por su ubicación se puede dividir en tres regiones: la cabeza, el tronco y la aleta caudal. De éstas, las más comunes son la displasia en los huesos operculares, el aparato maxilar-mandibular y los huesos mandibulares; anomalías en aletas y ojos (Mise *et al.*, 2017), neoplasias óseas y cutáneas; y deformaciones de la columna vertebral (Flores-Lopes *et al.*, 2010). También se han observado malformaciones de la columna vertebral en diferentes direcciones: lordosis (curvatura

de concavidad), escoliosis (desviación con convexidad lateral) o cifosis (curvatura de convexidad dorsoventrales (lordosis), lateral (escoliosis) o curvatura espinal ascendente (cifosis) las cuales pueden causar una apariencia corporal anómala (Bengtsson *et al.*, 1985). Las malformaciones de columna a menudo no pueden detectarse a simple vista, en particular si solo se ven afectadas unas pocas vértebras (Gjerde *et al.*, 2005; Kvellestad *et al.*, 2000; Witten *et al.*, 2006).

Las malformaciones económicamente más importantes afectan principalmente a la columna vertebral y la región cefálica, con formas corporales alteradas, comportamientos anormales de natación y alimentación atípicos, y por consiguiente aumento de la susceptibilidad al estrés y la invasión de patógenos (Eissa *et al.*, 2021). Estas malformaciones son percibidas en forma negativa por los consumidores, ya que pueden considerar que el producto se cultiva en un ambiente de baja calidad (Boglione *et al.*, 2013). Los datos que se tienen registrados hasta ahora sobre la incidencia de las anomalías se recopilan utilizando diferentes métodos de diagnóstico, tales como observaciones de la morfología del cuerpo, radiografías, palpación, tinción de montajes completos, histopatología, histoquímica e inmunohistoquímica (Boglione *et al.*, 2013b) las cuales proporcionan distintos niveles de precisión y que varían en función de la etapa de la vida considerada. Sin embargo, algunas requieren de sacrificar organismos, lo cual no beneficia a los cultivos ya que es pérdida de producto, por eso se han propuesto nuevas técnicas menos invasivas como la que a continuación se menciona.

Entre las técnicas para estudiar la morfología del cuerpo, la morfometría geométrica (MG), desarrollada por Bookstein (1991), consiste en utilizar puntos anatómicos de referencia (PAR), que permiten explorar el morfoespacio de los objetos (Zelditch *et al.*, 2012). Estos PAR son puntos de coordenadas que se utilizan para representar la forma, en este caso el contorno del pez, utilizando estructuras anatómicas como el principio y final de la aleta dorsal, caudal y anal. La característica para utilizar la morfometría es que las estructuras deben ser de fácil identificación y se deben encontrar en todos los especímenes (homólogos), por lo que todos los especímenes estudiados tienen el mismo número de PARs. Esta técnica se desarrolló para abordar las deficiencias de los métodos lineales clásicos, basados en el volumen o área que no preservan las relaciones geométricas entre las mediciones, y que por lo tanto generan dificultades en la interpretación de las relaciones espaciales (Bookstein 1991, Glat *et al.*, 1996, Mitteroecker *et al.*, 2004). Este método morfométrico no se ve afectado por su rotación ni escala, por lo que la forma del objeto en estudio no se describe en términos de sus dimensiones, sino de la relación espacial entre sus partes (Zelditch *et al.*, 2004; Toro-Ibacache *et al.*, 2010). Por esta razón la MG es una herramienta útil y sencilla para evaluar similitudes y diferencias de carácter morfológico y ecológico entre individuos, grupos de una misma especie, entre especies distintas, poblaciones, etc. (Toro-Ibacache *et al.*, 2010; Benítez y Püschel,

2014). La MG ilustra y explica las diferencias morfológicas lo que permite profundizar y recuperar variaciones de la forma que a simple vista son difíciles de determinar, esta técnica utiliza tanto la morfología como la estadística para cuantificar la variación de la forma, basándose en dos áreas matemáticas, modelos lineales generales y modelos algebraicos, que sirven de base para el análisis de componentes principales (Black, 2014).

El conocer la incidencia y cuáles son los tipos de malformaciones presentes en los peces teleósteos cultivados, tiene una gran relevancia, ya que así se podrían identificar y entender las causas y que a largo plazo se pueda obtener producto de mejor calidad, ya que los peces con alguna malformación son mal vistos por el consumidor y deben de ser destinados para generar harina de pescado u obtener filetes de manera manual, pero para llegar a ese punto, es necesario complementar con el conocimiento del desarrollo esquelético, desde etapas larvarias hasta juveniles.

El conocimiento del desarrollo óseo de los peces es importante, no solo desde el punto de vista embriológico, sino también para la biología de la especie y la acuicultura. En esta área, el entendimiento de la osteogénesis sirve para comprender las tendencias funcionales y las preferencias alimentarias y ambientales en las diferentes etapas del desarrollo (Fukuhara, 1992). Desde el punto de vista de la acuicultura, el conocimiento preciso del desarrollo óseo es un requisito previo para la detección temprana y prevención de las malformaciones esqueléticas comunes en condiciones de cultivo, además de conocer la etapa de vida en la que se presentan y así mismo tener un mayor control de parámetros físicos y químicos, así como nutricionales, ya que estos factores podrían aumentar la prevalencia de anomalías esqueléticas (Divanach *et al.*, 1996, Doroshev y Aronovich, 1974; Bengtsson *et al.*, 1988; Bolla y Holmefjord, 1988, Koumoundouros *et al.*, 1997 a, b).

El esqueleto es el armazón de soporte de los vertebrados, comprenden más de 200 piezas distintas con diferentes formas, tamaños y ubicaciones. Este sistema está formado por huesos y tejidos cartilagosos, conformados por tipos celulares específicos (condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) (Nie *et al.*, 2021). Existen dos maneras en las que las estructuras pueden osificarse, una de ellas es la osificación endocondal, en la que las células mesenquimales (MSC) se diferencian primero en condrocitos y cartílago para finalmente ser reemplazado por hueso. El otro tipo es la osificación intramembranosa, en la que las MSC se diferencian directamente en osteoblastos sin condrocitos (Hall, 1988; Karsenty y Wagner, 2002). En vertebrados la osificación endocondral implica la formación de tejido cartilaginoso a partir de células mesenquimales agregadas y el reemplazo posterior del tejido cartilaginoso por hueso (Horton, 1990); este proceso se divide en cinco etapas:

- 1) Las células mesenquimales se comprometen a convertirse en células de cartílago. Este evento es controlado por la proteína Sonic hedgehog, que induce a las células de esclerotomas cercanos a expresar el factor de transcripción Pax1, el cual inicia una cascada que depende de factores paracrinicos y factores de transcripción internos.
- 2) En la segunda fase, las células de mesénquima comprometidas se condensan en nódulos compactos y se diferencian en condrocitos, las células del cartílago. Son responsables de inducir la expresión de las moléculas de adhesión N-cadherina y N-CAM y el factor de transcripción Sox9. La N-cadherina es importante en el inicio y N-CAM parece fundamental para mantenerlas. Sox9 activa otros factores de transcripción, así como los genes que codifican el colágeno II y el agricano, que son críticos en la función del cartílago.
- 3) Los condrocitos proliferan rápidamente para formar el modelo de cartílago para el hueso. A medida que se dividen, los condrocitos secretan una matriz extracelular específica del cartílago.
- 4) Los condrocitos dejan de dividirse y aumentan su volumen drásticamente, convirtiéndose en condrocitos hipertróficos. Este paso parece estar mediado por el factor de transcripción RunX2 que es necesario para el desarrollo del hueso intramembranoso y endocordal. RunX2 está regulado por la histona deacetilasa-4, una forma de enzima de reestructuración de la cromatina que se expresa en el cartílago prehipertrófico. Los condrocitos hipertróficos secretan numerosas vesículas pequeñas, unidas a la membrana en la matriz extracelular. Estas vesículas contienen enzimas que son activas en la generación de iones calcio y fosfato e inician el proceso de mineralización dentro de la matriz cartilaginosa. Los condrocitos hipertróficos, su metabolismo y las membranas mitocondriales se alteran y mueren por apoptosis.
- 5) Los vasos sanguíneos inducidos por el Factor de crecimiento endotelial vascular invaden el modelo de cartílago. A medida que los condrocitos hipertróficos mueren, las células que rodean el modelo de cartílago se diferencian en osteoblastos. El reemplazo de los condrocitos por células óseas depende de la mineralización de la matriz extracelular. Los osteoblastos comienzan a formar una matriz ósea en la matriz parcialmente degradada y construyen un collar óseo alrededor de las células del cartílago moribundo.

La osificación intramembranosa en general para los vertebrados es una conversión directa del tejido mesenquimal en hueso. Comienza cuando las células mesenquimales que derivan de la cresta neural se

diferencian en células especializadas formadoras de hueso llamadas osteoblastos, los cuales se unen en grupos y forman un centro de osificación. Los osteoblastos comienzan a secretar osteoide, una matriz de colágeno-proteoglicano no mineralizada que puede unirse al calcio. La unión del calcio al osteoide da como resultado el endurecimiento de la matriz y el aprisionamiento de los osteoblastos. Este evento da lugar a la transformación de los osteoblastos a osteocitos (este paso puede variar entre los grupos de vertebrados, como en los peces).

Mientras que el osteoide continúa siendo secretado por los osteoblastos, rodea los vasos sanguíneos, formando hueso trabecular/esponjoso. Las células mesenquimales en la superficie del hueso forman una membrana llamada periostio. Las células de la superficie interna del periostio se diferencian en osteoblastos y secretan osteoide paralelo al de la matriz existente, formando así capas. Estas capas se denominan colectivamente hueso compacto/cortical (Percival y Richtsmeier, 2013).

Los huesos de los peces están compuestos principalmente de sales de hidroxipatita de calcio-fósforo (parte inorgánica, aproximadamente el 65% de la masa seca del hueso) incrustadas en una matriz de fibras de colágeno tipo I (Ibrahim *et al.*, 2020). El colágeno representa más del 90% de la matriz orgánica ósea y confiere resistencia a la estructura y establece propiedades biomecánicas del tejido (Moro *et al.*, 2000). La relación entre el colágeno y la hidroxipatita es crucial para la dureza y rigidez de los huesos ((Landis, 1995).

Los peces son vertebrados que cuentan con dos diferentes tipos de sistema esquelético, el primero incluye el esqueleto dérmico (exoesqueléto) y el endoesqueleto (Maisey, 2000; Janvier, 2015). En los peces teleósteos el endoesqueleto se subdivide en el esqueleto axial el cual incluye el cráneo y la columna vertebral y el esqueleto apendicular que soporta a los apéndices (aletas), mientras que el exoesqueleto de los peces está conformado por escamas, radios dérmicos en las aletas, los mamíferos carecen de estas estructuras (Sire y Huysseune, 2003; Burton y Burton, 2017).

Otra característica importante de los peces es que tienen la capacidad de reemplazar permanentemente los dientes y regenerar elementos esqueléticos durante toda su vida, como las escamas y los radios de las aletas, lo que aumenta el valor de los peces como modelos para diferentes investigaciones (Kondo *et al.*, 2001; Sire y Akimenko, 2004; Harris *et al.*, 2008). Cabe mencionar que los osteocitos representan el 95% de todas las células de los mamíferos (Franz-Osendaal *et al.*, 2006); sin embargo, estas células no están presentes en todas las estructuras del sistema esquelético ni en todas las etapas de la vida de los peces, ni tampoco en todas las especies (Sire *et al.*, 1990; Witten *et al.*, 2001; Sire y Akimenko, 2004)

1.1 Biología de la especie (*Morone saxatilis*)

El cultivo de peces marinos comenzó en Japón, Canadá, Francia, España y Noruega, hace más de 50 años, y llegó a México en la década de los años 80 (DOF, 2022), sin embargo, el cultivo de la lobina rayada es relativamente reciente. Desde el año 2013 una sola empresa en el país, Pacífico Aquaculture, en la Isla de Todos Santos, Baja California, México, se ha dedicado a su producción comercial, la cual cuenta con su propio laboratorio donde desarrolla el cultivo de ciclo completo para abastecerse de juveniles y realizar su maricultivo.

Morone saxatilis (Fig. 2) es un pez que tiene una distribución natural en las costas atlánticas de los Estados Unidos, desde la frontera de Canadá hasta la frontera con México (Golfo de México). Se introdujo en las costas del Pacífico desde la costa de California hasta el sur de Ensenada, Baja California, México. En esta zona se tiene registro de la presencia de lobina rayada desde 1959 (CDFG, 1961). En el 2020 se tenía una producción de lobina rayada de 1800 ton (DOF, 2022).



Figura 2. Lobina rayada (*M. saxatilis*) cultivada por la empresa Pacífico Aquaculture en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México. (Tomada de: <https://www.pacificoaquaculture.com/nuestra-lobina>)

La lobina rayada (Tabla 1) es una especie que ha tenido diversos cambios en cuanto a su clasificación taxonómica. McCully (1962) propuso una primera filogenia en la que se incluía a las familias Moronidae, Percidae y Lateolabracidae en un grupo monofilético. A esto le siguió una primera revisión que situaba los géneros *Morone*, *Dicentrarchus*, *Lateolabrax* y *Sinoperca* en la familia Percichthyidae (Gosline, 1966), en una segunda revisión se incluyó a todos los géneros en la familia Moronidae excepto *Sinoperca* (Johnson, 1984). Williams *et al.* (2011) realizaron diversos estudios genéticos y filogenéticos, con los cuales descubrieron que los géneros *Morone* y *Dicentrarchus* están emparentados ya que comparten el gen mt-nd6 por lo que se agruparon a las cuatro especies del género *Morone* con las dos de *Dicentrarchus*. Por lo tanto, *Dicentrarchus labrax* comúnmente conocida como lobina europea, la cual ha sido ampliamente estudiada (Darias, 2010; Koumoundouros *et al.*, 2002; Mazurais *et al.* 2009), es una es una especie

filogenéticamente cercana a *Morone saxatilis*, por lo que presentan una morfología y un desarrollo esquelético similar, debido a esto se puede considerar como un modelo a seguir para lobina (Fig. 3).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de lobina rayada, *Morone saxatilis*.

| | |
|------------------|---|
| Reino: | Animalia |
| Filo: | Chordata |
| Clase: | Actinopterygii |
| Orden: | Perciformes |
| Suborden: | Percoidei |
| Familia: | Moronidae |
| Género: | <i>Morone</i> |
| Especie: | <i>Morone saxatilis</i> (Walbaum, 1792) |

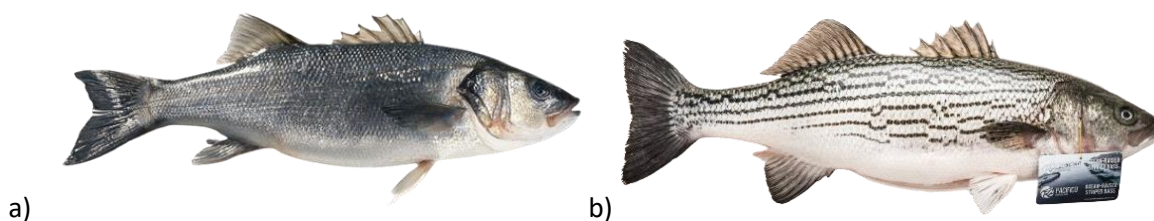


Figura 3. a) Lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) y b) lobina rayada (*Morone saxatilis*) (Tomadas de: www.stockfood.com.mx y <https://www.pacificoaquaculture.com/nuestra-lobina>)

1.2 Antecedentes

En relación con la descripción de la génesis ósea en lobina rayada, solo se tienen reportados dos estudios: Fritzsche y Johnson (1980), en el cual realizaron la descripción del desarrollo esquelético de *Morone saxatilis* proveniente del medio natural. Otro estudio fue el de Nowroozi *et al.* (2012) en el cual observaron el desarrollo vertebral de cinco lobinas rayadas y reportaron que cuenta con 24 vertebras, contando el urostilo.

En cuanto a la detección precoz de anomalías en las aletas, Marino *et al.* (1993) describieron malformaciones en la segunda aleta dorsal, primera dorsal y anal, que aparecieron inicialmente en las larvas de lobina europea de 10, 7, 12, 6 y 13.5 mm de longitud estándar (SL), respectivamente.

El estudio realizado por Koumoundouros *et al.* (2002) indicaron que en *Dicentrarchus labrax* la cifosis prehemoral (que afecta principalmente a las vértebras 5-6), se desarrolla durante la etapa larvaria (en el rango de 10-17 mm en longitud total), mientras que en la siguiente etapa y en metamorfosis, es letal para los peces afectados.

De acuerdo al trabajo de Mazurais *et al.* (2009) con lobina europea, la incidencia de malformaciones craneales que afectan a los huesos maxilar y premaxilar, dentarios, opérculo, radios branquiostegales y la región glosohial fue menor para los grupos que contenían 0 y 5 mg/kg de retinol. Por otro lado, la frecuencia de malformaciones vertebrales (ligeras fusiones y cifosis de las cinco vértebras anteriores, sobremineralización y lordosis de las vértebras distales, transformación de la última vértebra prehemática en hemal) y de las aletas (deformaciones de los pterigióforos dorsal y anal, desviaciones de los radios relacionados, modificaciones de la anatomía de los elementos de soporte caudales, falta parcial a completa de las aletas pélvicas), se presentaron con menor frecuencia en los grupos a los que se les adicionaron de 5 a 70 mg/kg de retinol. Estos resultados sugieren que el nivel óptimo de retinol para una ontogénesis armoniosa fluctúa a lo largo del desarrollo de las larvas de lobina europea y que los niveles inadecuados de retinol en la dieta alteran la morfogénesis a nivel genético.

Smith y colaboradores (1985) describieron las malformaciones en lobinas híbridas cultivadas (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*). Los autores reportaron que las mortalidades de estas lobinas híbridas F2 se debían principalmente a malformaciones como la escoliosis y las de la mandíbula.

Andrades *et al.* (1996) informaron que, aunque el 27% de las larvas de dorada recién nacidas mostraron desviaciones de la notocorda más o menos graves, solo muy pocas de ellas eran lordosis. La notocorda desviada se caracterizó por la penetración de tejido conectivo en la notocorda, con la formación de septos y rodeando la hoja notocordal. En doradas de 60 dde, las desviaciones del eje (principalmente lordosis) afectaron al 5% de los peces supervivientes

En relación con la descripción de las malformaciones y la génesis ósea en lobina rayada, son escasos los estudios, por lo que es importante generar los conocimientos en esta especie para aplicar mejoras en los cultivos con el fin de promover una producción de alta calidad, lo que permitirá que el mercado de esta especie cultivada siga creciendo.

1.3 Justificación

Los peces cultivados presentan una gran variedad de malformaciones óseas, causadas por distintos factores como la deficiencia de nutrientes, temperatura del agua o incluso el color del estanque, entre otros. En la producción comercial, estas malformaciones pueden tener efectos negativos como alta mortalidad y la disminución en la comercialización, lo que ocasiona pérdidas económicas. El presente

estudio, contribuirá al conocimiento de la génesis del esqueleto de *Morone saxatilis*, de las malformaciones óseas y las estructuras óseas, en las etapas larval y juvenil (1-157 DDE) de la lobina rayada, *Morone saxatilis*. Los resultados de este estudio servirán de base para el desarrollo de futuros proyectos dedicados a la evaluación de los factores (temperatura, flujo de agua, alimentación, entre otros) que propician estas malformaciones, con el objetivo de reducirlos y obtener organismos sanos y de mejor calidad. El propósito es disminuir la pérdida de producto y que el mercado de lobina rayada siga en aumento.

1.4 Hipótesis

La lobina rayada (*M. saxatilis*) tiene un desarrollo esquelético similar al descrito para lobina europea (*Dicentrarchus labrax*), ya que pertenecen a la misma familia y son filogenéticamente cercanas.

En las primeras etapas de vida de los peces se comienza a desarrollar el sistema esquelético, por lo que en lobina rayada (*Morone saxatilis*) se observará una mayor presencia de malformaciones óseas durante este periodo, siendo las de columna vertebral las más prevalentes

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar las malformaciones óseas de la lobina rayada (*Morone saxatilis*), en cultivo comercial, desde el momento de su aparición, identificando los elementos esqueléticos alterados usando la técnica de transparentación y doble tinción

1.5.2 Objetivos específicos

- Describir el desarrollo esquelético de *M. saxatilis* en un cultivo comercial.
- Observar y describir las malformaciones óseas de lobina rayada, utilizando la técnica de transparentación y doble tinción.

- Cuantificar el porcentaje y tipos de malformaciones en lobina rayada en un cultivo comercial.
- Clasificar cuantitativamente las malformaciones óseas mediante la técnica de morfometría geométrica

Capítulo 2. Metodología

Para cumplir los objetivos planteados el trabajo se dividió en los siguientes apartados:

- a) Cuantificación de la prevalencia de las malformaciones esqueléticas.
- b) Morfometría geométrica y estadística multivariada
- c) Descripción del desarrollo y malformaciones óseas (técnica de transparentación o diafanización)

2.1 Muestreo de los organismos y primera clasificación de malformaciones aparentes

Los ejemplares de lobina rayada fueron proporcionados por la empresa Pacifico Aquaculture S. A. P. I de C. V., la cual se dedica a la producción de esta especie en la Isla de Todos Santos en Ensenada Baja California, México. cuenta con un laboratorio de reproducción, cultivo larval y de producción de juveniles.

Se realizaron visitas a la zona de criadero (“hatchery”) del laboratorio de reproducción para obtener las muestras de lobina rayada, una vez recolectadas se transportaron al laboratorio de Reproducción y Desarrollo de peces en el Departamento de Acuicultura del CICESE en recipientes de 1L llenos con agua dulce o de mar, lo que correspondía de acuerdo con el estadio de desarrollo. El muestreo inicial se hizo de manera continua del 0 a los 15 días después de la eclosión (DDE), posteriormente las muestras se tomaron cada tercer día (17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31 DDE) con el fin de observar un mayor avance en el desarrollo óseo y finalmente se recolectaron organismos de 40, 50, 60 y 70 DDE para ver el grado de osificación de las estructuras y asegurar que el desarrollo óseo haya concluido. Cada muestra estuvo conformada por 50 organismos, los cuales se anestesiaron con una dosis de 0.1g L^{-1} de tricaina metasulfonato (Western chemical, Inc.), se les tomó la longitud notocordal o longitud total (aleta caudal diferenciada) utilizando un estereoscopio marca Olympus modelo SZ61 y una cámara marca Infinity I, que trabaja con el software INFINITY ANALYZE, mientras que para los organismos mayores a los 29 DDE se utilizó un ictiómetro y una balanza marca OHAUS Scout-Pro. Posteriormente se hizo una revisión morfológica simple con la que se realizó un conteo y clasificación preliminar de las malformaciones aparentes (columna, aletas o cráneo/mandíbula), al finalizar este paso se colocaron en frascos con tapa que contenían una solución de

formol al 10% con fosfatos (Roberts, 2012) para fijarlos, la cual ayudó a preservar los tejidos sin alterar la composición ósea.

Para el análisis y observación de las malformaciones en edades más avanzadas, la empresa Pacifico Aquaculture proporcionó más de 300 organismos, los cuales se mantuvieron en un sistema raceway a flujo abierto en el laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura de CICESE. El mantenimiento que recibieron constó de la limpieza diaria con un sifón y alimentación cuatro veces al día (25g/ración) con el alimento marca EWOS (54% proteína y 14% lípidos), además se midió la temperatura del agua con un termómetro de mercurio. Se realizaron biometrías a los 70, 78, 106, 128 y 157 DDE, de las cuales solo se tomó una muestra de 50 organismos a los 70 DDE, en los demás solo se preservaron aquellos peces que tuvieran alguna malformación aparente, los cuales se almacenaron en frascos etiquetados que contenían una solución de formol con fosfatos.

2.2 Morfometría geométrica (MG)

El primer paso consistió en integrar una base de datos (fotografías) para cada una de las siguientes edades: 19, 21,23, 25, 27 y 70 DDE. Se realizó un análisis preliminar de las imágenes para definir los puntos anatómicos de anclaje o landmarks (Lm) y los semipuntos de anclaje o semilandmarks (SLm). Con este criterio definido, se analizó cada imagen (formato JPG) de cada grupo de edad para asegurar que cada estructura se pudiera observar en todos los organismos (principio de homología). Las imágenes en las que no se pudieron identificar los Lm, no se consideraron para el análisis.

Con las imágenes de los peces de cada edad y con ayuda del programa tpsUtil (Rohlf, 2021), se transformaron las imágenes del formato "JPG" a ".tps". Posteriormente, con el programa tpsDig (Rohlf, 2021) se colocaron los Lm y SLm en cada organismo, teniendo en cuenta que los puntos deben estar equidistantes.

El siguiente paso fue crear los archivos "linkfile" y "sliderfile" (el programa identifica cuales son Lm o SLm), así como la lista de especímenes, para cada edad. Posteriormente con el programa tpsRelw (Rohlf, 2021) se obtuvieron las matrices de variación morfológica (Rw, relativewarps) y las gradillas de deformación para todos los grupos. Para tener una mejor edición de los graficos, las variables de la forma (Rw) se graficaron en un analisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés Principal Components Analyses)

en PAST 4 (Hammer *et al.*, 2021) en el cual se señalaron con color rojo aquellos organismos que previamente se observaron con alguna malformación aparente (Fig. 4B).

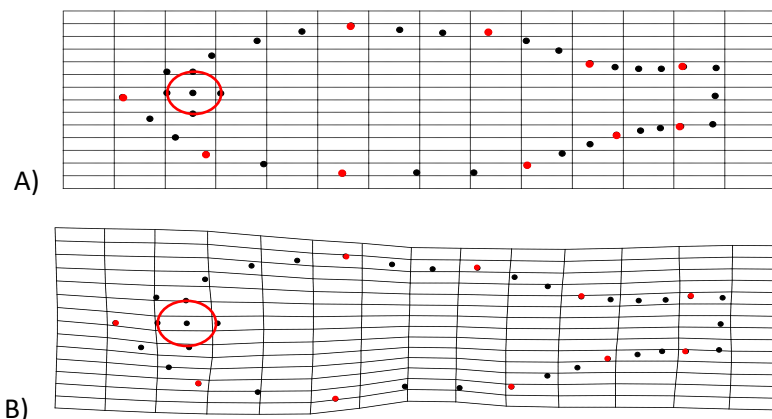


Figura 4. Gradilla que muestra los landmarks (rojo) y semilandmarks (negro) en un organismo de lobina rayada A) sin malformación y B) con malformación.

2.3 Técnica de transparentación y doble tinción

Para analizar la ontogenia del esqueleto y detectar los huesos implicados en las malformaciones óseas de *M. saxatilis*, los organismos muestreados se procesaron con la técnica de transparentación y doble tinción. Para las larvas de 1-21 DDE se utilizó el método descrito por Park y Kim (1984) y para los organismos de 23 DDE en adelante se usó la técnica descrita por Darías *et al.* (2010), y siguiendo las recomendaciones de Gavaia *et al.* (2000). El fundamento de la técnica de transparentación consiste en diferenciar los tejidos cartilagineos y óseos mediante el uso de los colorantes azul de alcian y rojo de alizarina, los cuales tienen afinidad por los tejidos cartilagineos y óseos respectivamente.

De cada muestra se seleccionaron todos los organismos con alguna malformación visible y 10 organismos con morfología normal.

2.3.1 Transparentación y doble tinción para peces de 2 a 21 DDE con el método de Park y Kim, 1984

El primer paso para procesar las muestras fue realizar un lavado con agua de la llave por 5 min para eliminar los restos de la solución fijadora (formol con fosfatos). Para remover los pigmentos propios de los peces (melanina, eritrina, xantinas, etc.), se utilizó una mezcla de 5 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 5%

con 1-3 ml de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), la duración de la muestra en esta solución dependió del tamaño de los organismos (Tabla 2). El siguiente paso fue realizar un lavado con agua de la llave para evitar que los residuos de H_2O_2 interfirieran con la tinción.

Para la tinción del cartílago se utilizó una solución de azul de alcian 8GX al 0.01%, en 27 ml de alcohol etílico absoluto y 18 ml de ácido acético glacial, la duración de este paso fue de 2 horas. A continuación, las muestras se deshidrataron en baños de alcohol etílico absoluto por 3 horas, este procedimiento se repitió dos veces; es importante concluir este paso, de lo contrario, la tinción de los huesos podría tener un efecto negativo. La deshidratación elimina el agua de los tejidos, promueve el endurecimiento y facilita la sustitución del agente deshidratador por el material usado para la impregnación (Essenfeld *et al.*, 1997).

Para la maceración y tinción del hueso se utilizó una solución de 10 ml de KOH al 5% adicionando de 5 a 10 gotas de rojo de alizarina S al 0.1% que previamente se disolvió en alcohol etílico al 90%, la duración de este paso dependió del tamaño de los organismos (Tabla 2). Para finalizar las muestras se preservaron en un recipiente con glicerol absoluto y cristales de timol.

Tabla 2. Tiempos de incubación para transparentación y doble tinción (Park y Kim, 1984)

| DDE | Blanqueamiento (min) | Tinción con azul de alcian (horas) | Alcohol absoluto (Horas) | Tinción con rojo de alizarina (min) | |
|-----|----------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----|
| 1 | 40 | 2 | 3 | 5 | |
| 2 | | | | 6 | |
| 3 | | | | 6 | |
| 4 | 45 | | | 8 | |
| 5 | | | | 10 | |
| 6 | | | | 12 | |
| 7 | 50 | | | 19 | |
| 8 | | | | 23 | |
| 9 | | | | 25 | |
| 10 | | | | 60 | 60 |
| 11 | | | | | |
| 12 | | | | | |
| 13 | 60 | | | 90 | 90 |
| 14 | | | | | |
| 15 | | | | | |
| 17 | 90 | 90 | 90 | | |
| 19 | | | | | |
| 21 | | | | | |
| 21 | | | | | |

*Los tiempos pueden variar de acuerdo con el tamaño y cantidad de tejido en el organismo.

2.3.2 Transparentación y doble tinción para peces de 23 a 70 DDE (Darias *et al.*, 2010 con modificaciones de Gavaia *et al.* 2000)

El primer paso consistió en realizar un lavado con agua de la llave por 24 horas a flujo constante, para lo cual la submuestra se colocó en un recipiente de vidrio y se cubrió con una gasa sujeta con una liga para evitar pérdidas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada, cada uno con una duración de 1 hora.

A continuación, se deshidrataron los tejidos transfiriendo las muestras secuencialmente a soluciones de alcohol etílico con las siguientes concentraciones: 25, 30, 50, 70, 80, 90% y alcohol absoluto, con intervalos de 2 horas (la muestra se puede quedar en alcohol al 70% toda la noche), al finalizar esta etapa, las muestras se secaron con papel absorbente. En seguida, las muestras se colocaron en acetona por 48 horas, al finalizar este paso se secaron con papel absorbente y se colocaron en alcohol etílico absoluto por 24 horas.

Para la tinción de las estructuras cartilaginosas, se utilizó una solución de azul de alcian, por 12-24-48 horas dependiendo del tamaño de los organismos. Como siguiente paso se rehidrató el tejido con soluciones de alcohol etílico con concentraciones descendentes (90, 80, 70, 50, 20 y 10%).

El siguiente paso consistió en el blanqueamiento o eliminación del exceso de colorante, el cual se hizo con una solución de KOH al 1% + H₂O₂ en una proporción 9:1 por 24 hrs o mayor tiempo dependiendo del tamaño del organismo (Tabla 2) o hasta que los pigmentos de la piel se eliminaron y que se observaron los músculos marcados. En este paso es recomendable desprender las escamas por medio de frotación con una aguja, ya que por su constitución ósea se teñirán de color rojo y dificultarán la observación de los elementos esqueléticos.

Posteriormente la submuestra se pasó a una solución de tripsina (0.5g en 30ml de solución de borato de sodio saturado), hasta que el músculo se maceró completamente y se observaron los huesos del esqueleto, este paso también depende del tamaño del organismo y tomó hasta 4 días o más tiempo.

Después los organismos se pasaron a una solución de KOH al 2% por 3-6 horas, posteriormente se pasaron a KOH al 0.5% por 1-3 horas. Al finalizar estos dos pasos se realizaron 4 lavados con agua destilada y un lavado con alcohol al 10%, cada uno por 15 minutos respectivamente.

Tabla 3. Tiempos de incubación para transparentación y doble tinción (Darias *et al.*, 2010 con modificaciones de Gavaia *et al.*, 2000)

| DDE | Tinción con azul de alcian (horas) | Blanqueamiento (horas) | Transparentación c/tripsina (horas)* | Tinción con rojo de alizarina (horas) |
|-----|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 23 | 12 | 1 | 24 | 24 |
| 25 | | | | |
| 27 | 10 | 2 | 72 | 24 |
| 29 | 12 | | 96 | |
| 31 | 24 | 2 | 96 | 24 |
| 40 | | 3 | 120 | |

*Los tiempos pueden cambiar a los reportados dependiendo el tamaño, cantidad de tejido y calidad de la enzima.

Para la tinción del tejido óseo se utilizó una solución alcohólica de rojo de alizarina (la misma que se utilizó en el método de Park y Kim, 1984). Al finalizar la doble tinción, los organismos pasaron por una solución de glicerina + KOH al 1% con una proporción 40%-60%, posteriormente, para eliminar gradualmente el agua que contenían se colocaron en una solución de glicerina + KOH 1% con una proporción 60%-40%. Como paso final se colocaron en glicerol absoluto con cristales de timol para su preservación.

2.4 Descripción del desarrollo esquelético

Para la descripción del desarrollo esquelético de lobina rayada, se observaron y tomaron fotografías de las muestras procesadas por la doble tinción y transparentación, con ayuda de un microscopio estereoscópico marca ZEISS modelo Discovery.V8 y el software ZEN 2.6 (blue edition) que se encuentra dentro del laboratorio de Ecofisiología.

El cuerpo del pez se dividió en tres regiones, el esqueleto axial, apendicular (aletas pares e impares) y el complejo mandibular (estructuras involucradas en alguna malformación), además las estructuras se clasificaron de acuerdo con su grado de osificación, dependiendo de la intensidad de la tinción con rojo de alizarina.

Para nombrar a cada estructura se utilizaron como referencia los trabajos de Kubicek y Conway (2015), Topp y Cole (1968) y Fritzsche y Johnson (1980), mientras que para la clasificación y descripción de las vértebras se utilizó el trabajo realizado por Nowroozi *et al.* (2012).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Crecimiento

Se realizó una descripción del desarrollo con base en la longitud total de *M. saxatilis*, en el diagrama de caja y bigote (Fig. 5) se puede observar que en las primeras etapas de vida (0-21 DDE) el crecimiento es lento y, tiene una tendencia casi lineal. En este periodo, las reservas energéticas (gota de aceite y vitelo), se destinan a la organogénesis y esqueletogénesis, además la utilizan para satisfacer sus necesidades energéticas antes de la apertura de la boca.

A partir del día 23 DDE el crecimiento se acelera y las longitudes comienzan a ser más heterogéneas, para el día 31 DDE se observaron los primeros casos extremos, eso significó que los organismos se encontraron fuera del 95% de los datos, lo mismo sucedió para el día 60 DDE (Fig. 5) donde la desviación estándar de este grupo fue de 0.62 cm. Esto puede ser producto de la dominancia de organismos con tallas mayores al promedio, los cuales suelen alimentarse mejor y más rápido.

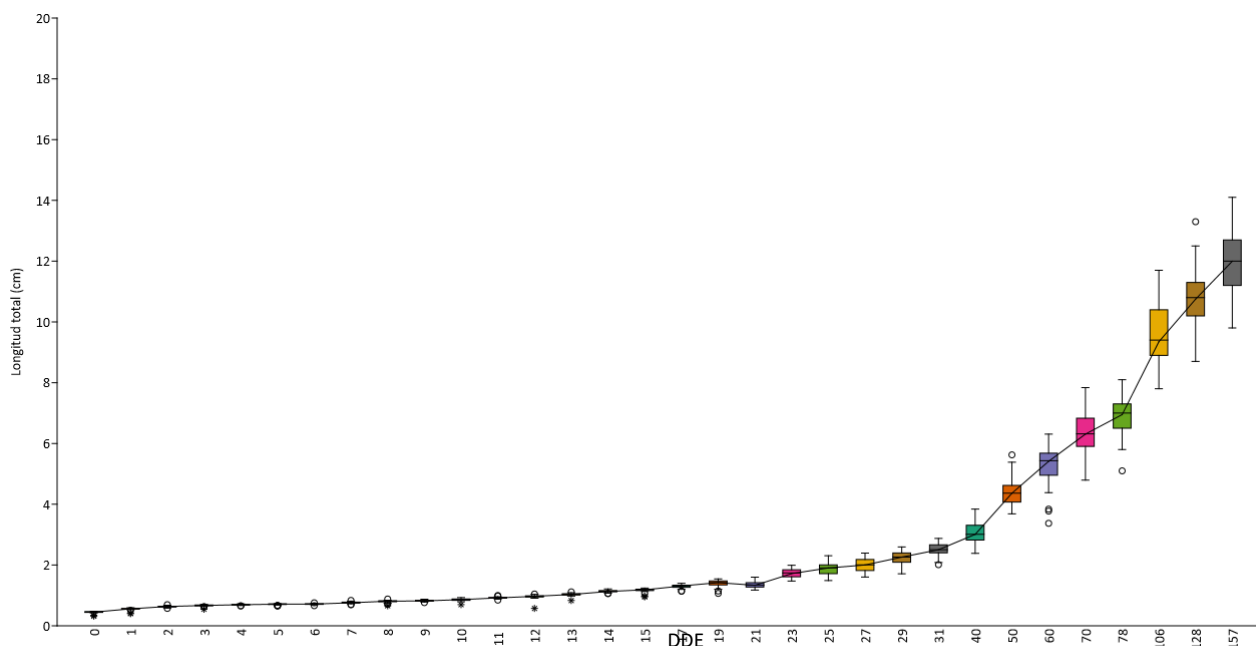


Figura 5. Distribución de tallas de *M. saxatilis* a lo largo del estudio.

3.2 Descripción del desarrollo esquelético de *Morone saxatilis*

3.2.1 Descripción del esqueleto mandibular y aletas pares

En los organismos de 2, 3, 4, y 5 DDE (Ltmin = 0.57 cm; Ltmax =0.73 cm), las primeras estructuras que comienzan a formarse y desarrollarse son las que constituyen tanto la mandíbula como las aletas pectorales (Fig. 6A y B, 1-4).

En el complejo mandibular comienzan a formarse las estructuras inferiores y de soporte (Fig. 6-A1) como el dentario (De), el cartílago de Meckel (CM), el par hyomandibularis (PHy), el par simplectica (Psy), par quadrata (PQ) y el par metapterigoidea (PMpt), las cuales presentan un proceso de osificación endocondral.

En las aletas pectorales se comienzan a formar tres estructuras básicas que son el cartílago escapulocoracoide (CScco), proceso coracoideus (PcoPr) y el plato radial pectoral (PRPI). Es importante mencionar que estas estructuras se encuentran en fase cartilaginosa (Fig. 6 A-B, 1-4), por lo tanto, tienen una osificación endocordal. En esta zona también se puede observar la formación del cleithrum (Cl), que se desarrolla directamente como hueso (Fig. 6-B2), ya que presenta osificación directa.

2 DDE

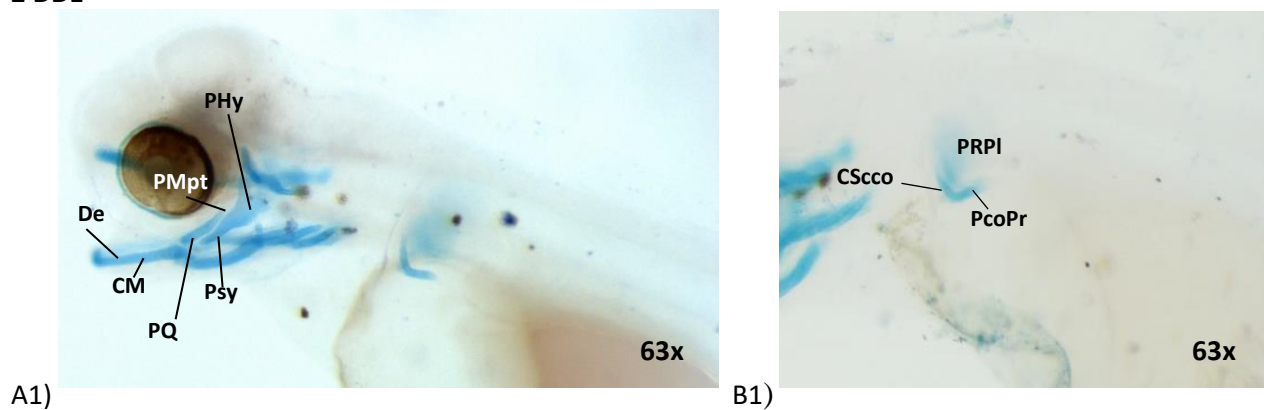
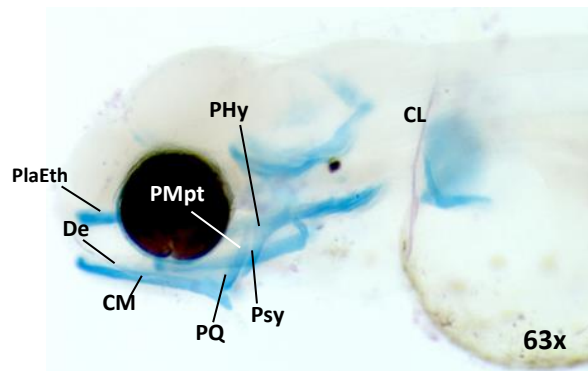
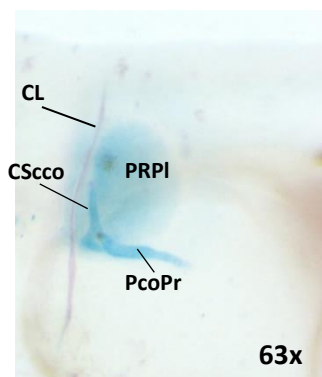


Figura 6. Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 2 DDE (Lt=0.63cm), 3 DDE (Lt = 0.67 cm), 4 DDE (Lt = 0.69cm) y 5 DDE (Lt = 0.71 cm). A) vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; PcoPr, proceso coracoideus; PHy, par hyomandibularis; PMpt, par metapterigoidea; PQ, par quadrata; PRPI, plato radial pectoral; Psy, par simplectica.

3 DDE

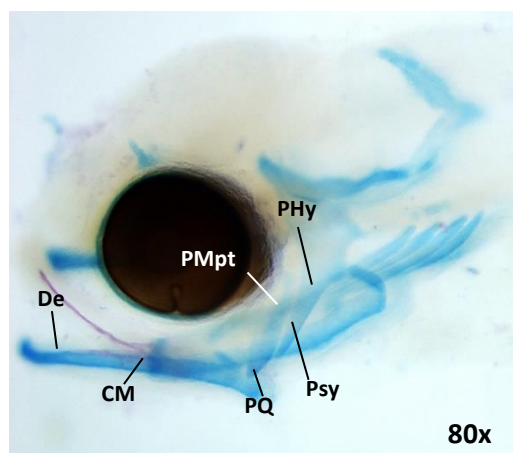


A2)

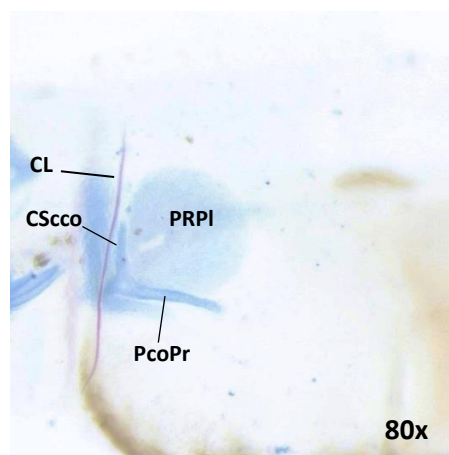


B2)

4 DDE

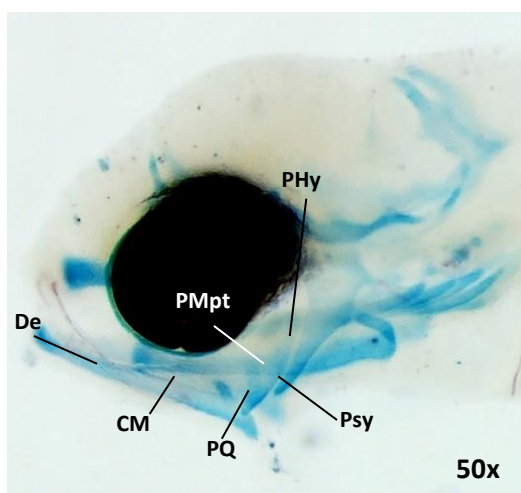


A3)

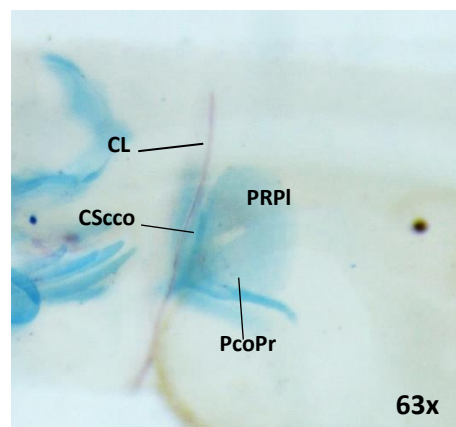


B3)

5 DDE



A4)



B4)

Figura 7 (continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 2 DDE (Lt=0.63cm), 3 DDE (Lt = 0.67 cm), 4 DDE (Lt = 0.69cm) y 5 DDE (Lt = 0.71 cm). A) vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; PcoPr, proceso coracoideus; PHy, par hyomandibularis; PMpt, par metapterigoideal; PQ, par quadrata; PRPI, plato radial pectoral; Psy, par simplectica.

En los organismos que comprenden las edades de **6, 7, 8 y 9 DDE** ($L_{t_{\min}} = 0.66$ cm; $L_{t_{\max}} = 0.87$ cm) se puede observar un mayor desarrollo de las tres estructuras que inicialmente conforman las aletas pectorales, el PcoPr presenta una mayor longitud, mientras que el PRPI tiene una mayor superficie y comienza a formarse la primera hendidura (Fig. 7A y B, 1-4)

En cuanto a la mandíbula se comienza a formar el premaxilar (Pmx) y el maxilar (Mx), las cuales comprenden la parte superior de la mandíbula y, tienen un proceso de osificación directo. Otro evento importante en el desarrollo esquelético mandibular es el comienzo del proceso de osificación del De (Fig. 7-A1), ya que se observa un tono rosa tenue y para las demás estructuras (PMpt, PHy, PQ, Psy, R) la osificación inicia entre el día 6 y 7 DDE, mientras que para el retroarticular (Ra) comienza en el día 8 DDE (Fig. 7-A3). Otro evento que se destaca es la formación de los primeros dientes en el día 6 DDE (Fig. 7-A1).

En el día 9 DDE se puede observar la formación de uno de los tres otolitos, la sagitta (Sa) (Fig. 7-A4). En esta edad el proceso de osificación de las estructuras superiores e inferiores de la mandíbula comienza a ser más notorio por la intensidad del color rojo, mientras que en las estructuras de soporte como el cuadrata (Q), simplectica (Sy) y el retroarticular (Ra), se presentan algunas regiones cartilaginosas, por lo tanto, cambian de nombre (Fig. 7-A4).

6 DDE

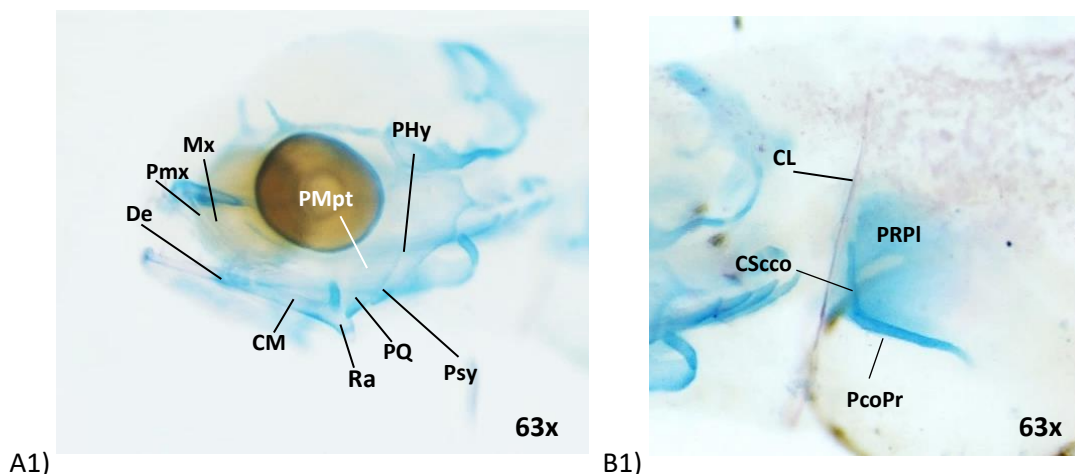
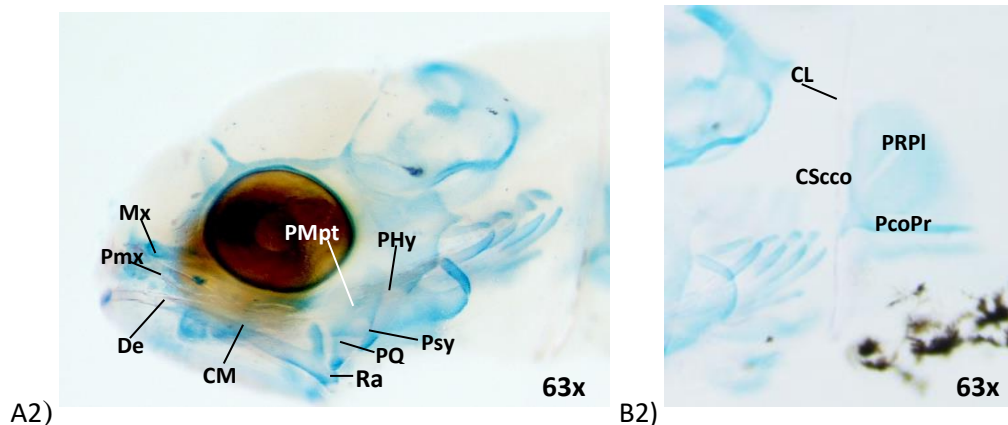


Figura 8. Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE ($L_t = 0.71$ cm), 7 DDE ($L_t = 0.76$ cm), 8 DDE ($L_t = 0.80$ cm), 9 DDE ($L_t = 0.82$ cm). CScco, cartílago escapulocoracoide; CM, cartílago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, cuadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular.

7 DDE



8 DDE

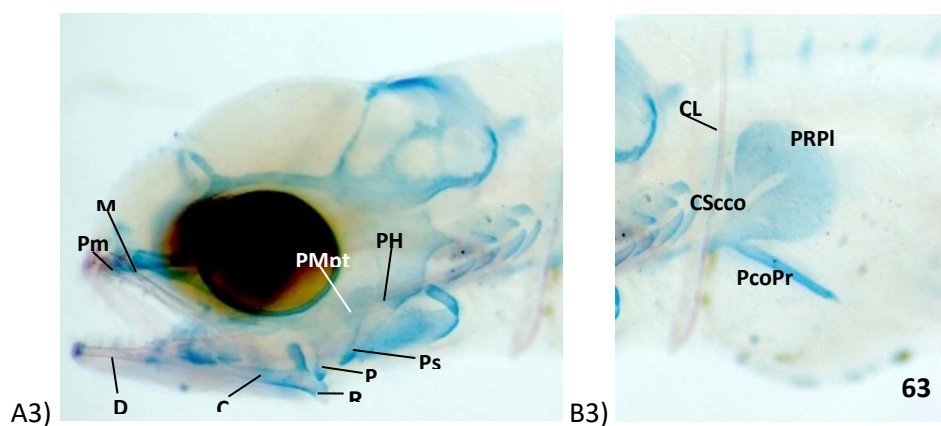


Figura 9 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE (Lt = 0.71cm), 7 DDE (Lt = 0.76 cm), 8 DDE (Lt = 0.80 cm), 9 DDE (Lt = 0.82 cm). CScco, cartilago escapulocoracoide; CM, cartilago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, quadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular.

9 DDE

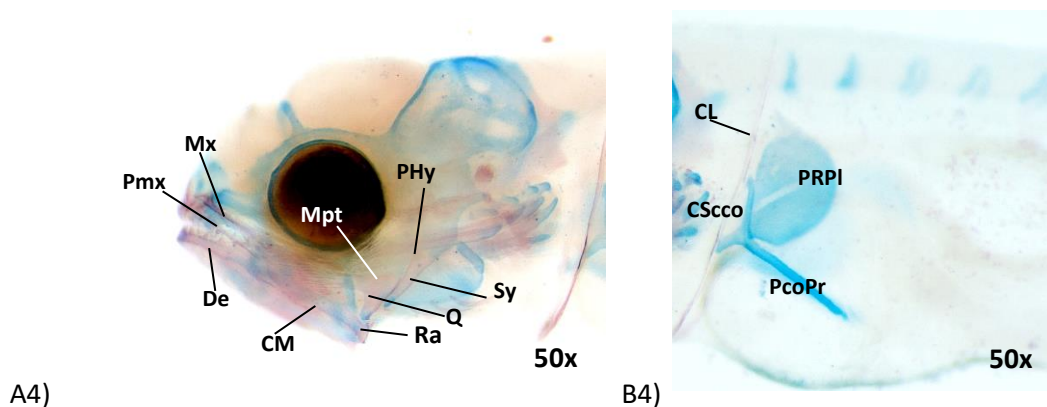


Figura 10 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 6 DDE (Lt = 0.71cm), 7 DDE (Lt = 0.76 cm), 8 DDE (Lt = 0.80 cm), 9 DDE (Lt = 0.82 cm). CScco, cartilago escapulocoracoide; CM, cartilago de Meckel; De, dentario; Mx, maxilar; PcoPr, procesus cocacoideus; PHy, Par Hyomandibularis; Pmx, premaxilar; PMpt, Par Metapterigoidea; PRPI, plato radial pectoral; PQ, parquadrata; Q, quadrata; PSy, Pars Symplectica; Ra, retroarticular.

Para los organismos de 10, 11, 12, 13 DDE ($Lt_{min} = 0.69\text{cm}$; $Lt_{max} = 1.11$), se pudo observar un grado de osificación mayor, esto debido a la coloración más rosada que presentan las estructuras de la mandíbula (De, Pmx, Mx, PHy, Mpt, Sy, Ra y Q) (Fig. 8A y B, 1-4), así como el otolito mayor, que es la sagitta (Sag) (Fig. 11-A1). En cuanto al desarrollo de las aletas pectorales, solo se pudo observar un aumento en el área que abarca el plato radial pectoral (PRPI) y mayor longitud del procesus coracoideus (PcoPr), ya que siguen en fase cartilaginosa (Fig. 11 A-B, 1-4), mientras que el cleithrum (Cl) presenta mayor grado de osificación (Fig. 8-B4).

10 DDE

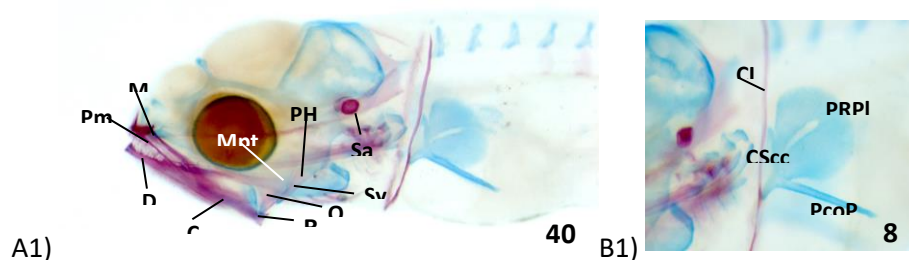
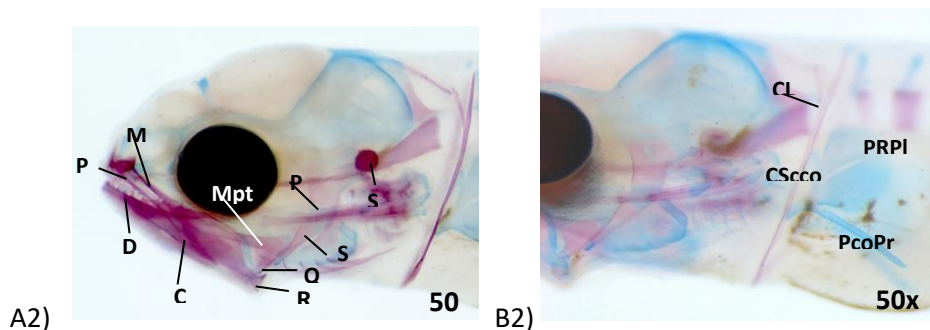


Figura 11. Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE ($Lt = 0.86\text{ cm}$), 11 DDE ($Lt=0.92\text{ cm}$), 12 DDE ($Lt=0.92\text{ cm}$) y 13 DDE ($Lt = 1.03\text{ cm}$). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, procesus coracoideus; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sy, symplectica,

11 DDE



12 DDE

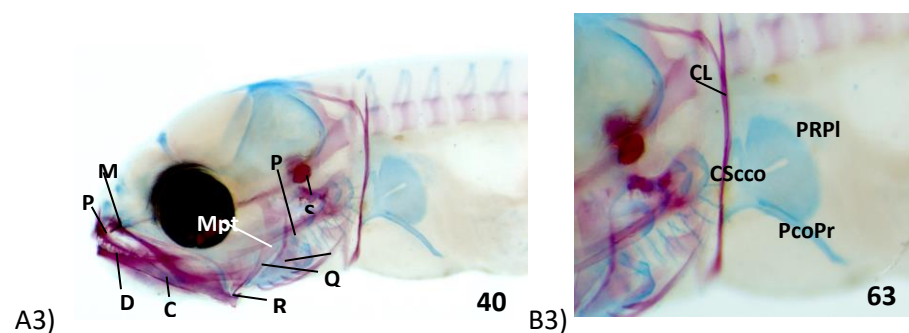


Figura 12 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE ($Lt = 0.86\text{ cm}$), 11 DDE ($Lt=0.92\text{ cm}$), 12 DDE ($Lt=0.92\text{ cm}$) y 13 DDE ($Lt = 1.03\text{ cm}$). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, procesus coracoideus; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sy, symplectica.

13 DDEA4)

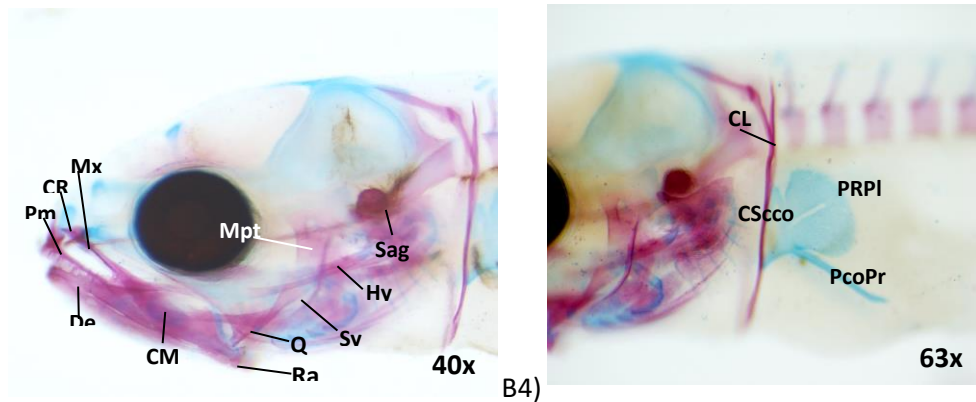


Figura 13 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de las larvas de 10 DDE (Lt = 0.86 cm), 11 DDE (Lt=0.92 cm), 12 DDE (Lt=0.92 cm) y 13 DDE (Lt = 1.03 cm). A) Vista lateral del cráneo y B) vista lateral de la aleta pectoral. CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Mx, maxilar; Mpt, metapterigoideo; PcoPr, proceso coracoideo; PHy; par hyiomandibularis; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; Ra, retroarticular; Sag, sagitta; Sv, symplectica,

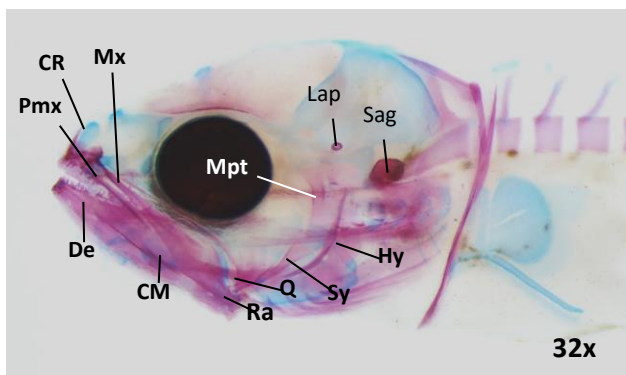
Para los organismos de 14, 15, 17 y 19 DDE (Ltmin = 1.06 cm; Ltmax = 1.54 cm) se puede ver como la tinción de los huesos que conforman el complejo mandibular están por concluir la primera fase de la osificación ya que las estructuras siguen siendo solo una capa delgada de hueso, la cual ira aumentando conforme a la edad y los depósitos de calcio sean mayores (Fig. 9A y B, 1-4). Otra estructura que comienza a formarse es el segundo otolito llamado lapillus (Lap), mientras que la Sag solo aumentó de tamaño (Fig. 9-A1).

En cuanto al desarrollo de las aletas pectorales se observó que a los 15 DDE comenzó la formación del cartílago propterygial (CPTg), empieza la diferenciación del supracleithrum (Scl) y el cleithrum (Cl), aparecen los primeros radios, así como un esbozo del postcleithrum (Pcl) (Fig. 9-B2).

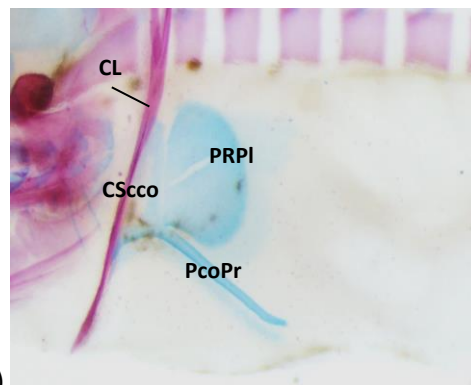
Para la edad de 17 DDE el plato radial pectoral presenta dos hendiduras por lo tanto cada una recibe el nombre de cartílago radial pectoral (CRPc 1-3) (Fig. 9-B3). Otro evento para destacar del desarrollo de estas aletas son el aumento de radios (11) a los 19 DDE (Fig. 9-C4).

El primer esbozo de las aletas pélvicas empieza a los 15 DDE, iniciando con la formación del cartílago basipterygium (CBp) (Fig. 9-B2), para los 19 DDE esta estructura presentó un aumento en longitud más no ha comenzado su proceso de osificación (Fig. 9-C4).

14 DDE

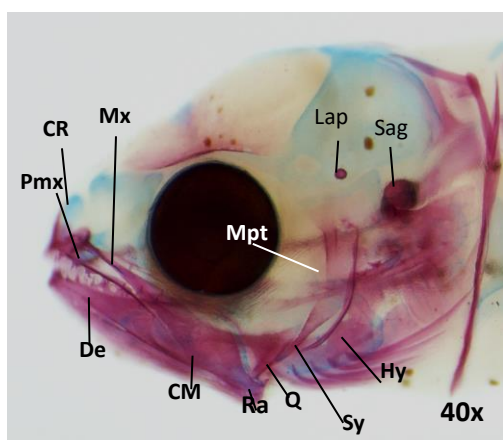


A1)

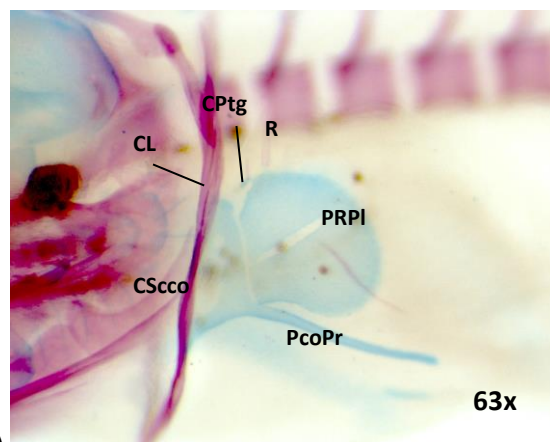


B1)

15 DDE



A2)



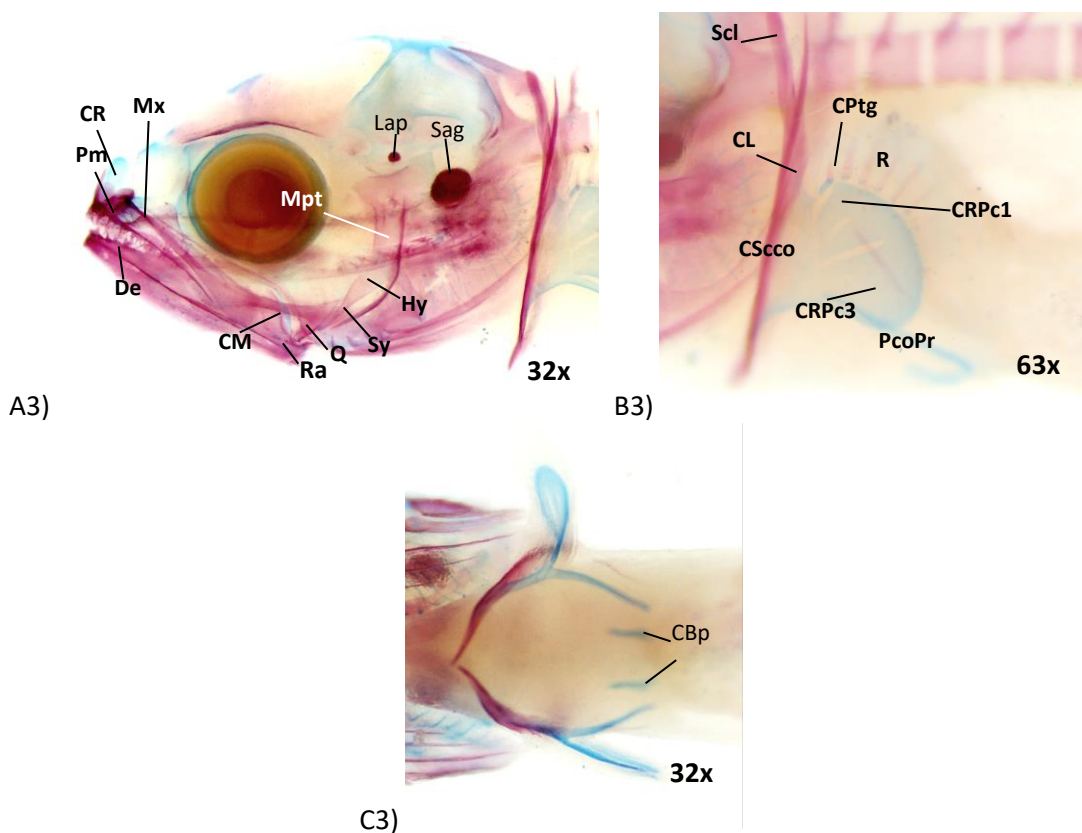
B2)



C2)

Figura 14. Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartilago basypterigium; Cl, cleithrum; CM, cartilago de Meckel; CPTg, cartilago propterygial; CRPc, cartilago radial pectoral; CScco, cartilago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, proceso coracoide; Pmx, premaxilar; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

17 DDE



19 DDE

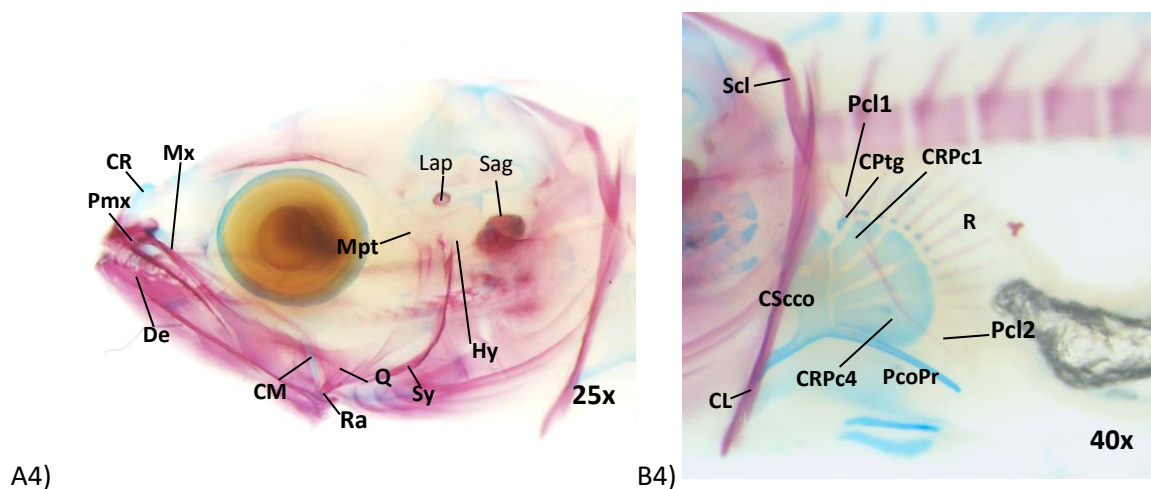


Figura 15 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartílago basypterigium; CL, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; CPTg, cartílago propterygial; CRPc, cartílago radial pectoral; CScco, cartílago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, proceso coracoideo; Pmx, premaxilar; PRPI, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

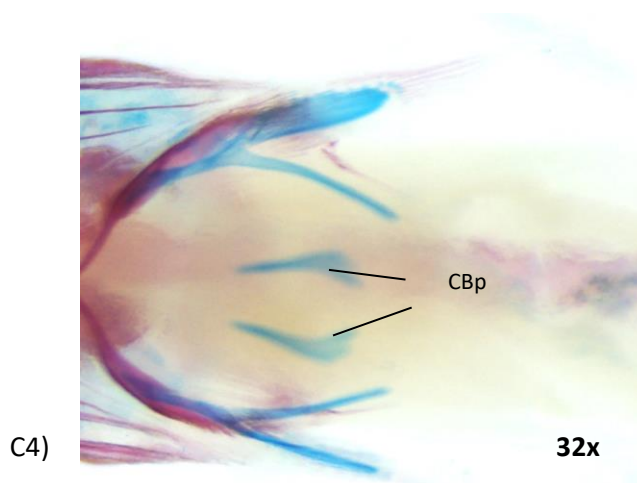


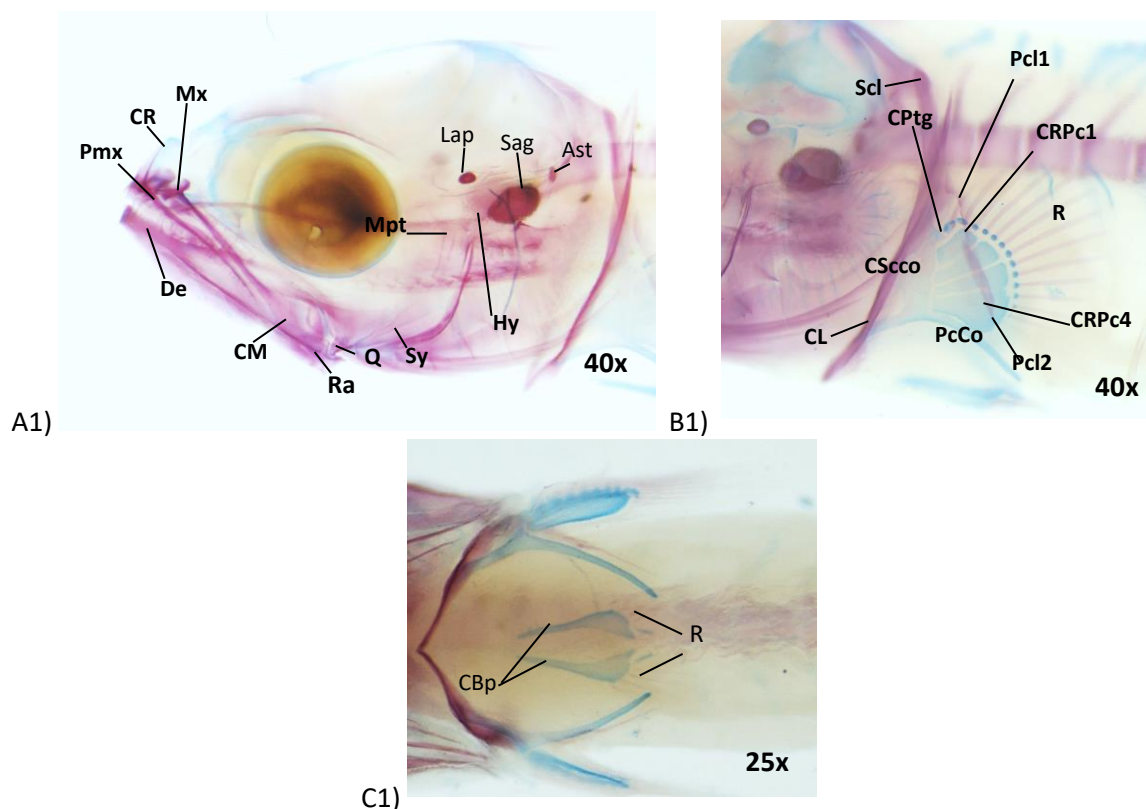
Figura 16 (Continuación). Desarrollo del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 14 DDE (Lt = 1.13 cm), 15 DDE (Lt = 1.17 cm), 17 DDE (Lt = 1.30 cm) y 19 DDE (Lt = 1.40 cm). A) Vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. CBp, cartilago basypterigium; Cl, cleithrum; CM, cartilago de Meckel; CPTg, cartilago propterygial; CRPc, cartilago radial pectoral; CScco, cartilago escapulocoracoide; De, dentario; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mx, maxilar; Pcl (1 y 2), postcleithrum; PcoPr, procesus coracoideus; Pmx, premaxilar; PRPl, plato radial pectoral; Q, quadrata; R, radio; Ra, retroarticular; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

En los organismos que comprenden las edades de **21, 23, 25 y 27 DDE** ($Lt_{\min} = 1.17$ cm; $Lt_{\max} = 2.39$ cm) se observó la formación del último de los otolitos que es el asteriscus (Ast) (Fig. 10-A1), además de un aumento en el tamaño de la Sag (Fig. 10-A4).

En cuanto a las estructuras que forman el complejo mandibular hubo un aumento en el grosor de los huesos ya que comienzan a ser menos traslucidos, esto debido a la densidad ósea, comparando con los 21 DDE (Fig. 10-A1) con la edad de 27 DDE (Fig. 10-A4).

En cuanto al desarrollo de las aletas pectorales se observó que los cartílagos radiales pectorales (CRpc) comienzan su proceso de osificación a los 21 DDE (Fig. 10-B1), presentando en el centro de cada estructura una coloración rosa muy tenue, siendo el CRPc4 el último en entrar en esta fase (Fig. 10-B2). Mientras que, en las estructuras de soporte, el cartilago escapulo coracoide (CScco) el cual ahora recibe el nombre de escapula (Sc) y el procesus coracoideus (PcoPr) que ahora se llamará coracoide (Co), se pudo observar esta diferenciación de cartilago a hueso (Fig. 10-B2). También se pudo ver un mayor desarrollo del postcleithrum (1 y 2). En las aletas pélvicas se pudo observar el inicio de la osificación del cartilago basypterigium a los 21 DDE (Fig. 10-C1), haciéndose más notorio a los 23 DDE en donde también comenzó la diferenciación del CBp y del cartilago radial pélvico (CRPlv), además comienzan a formarse las espinas que se encuentran en la parte externa de estas aletas (Fig. 10-C2).

21 DDE



23 DDE

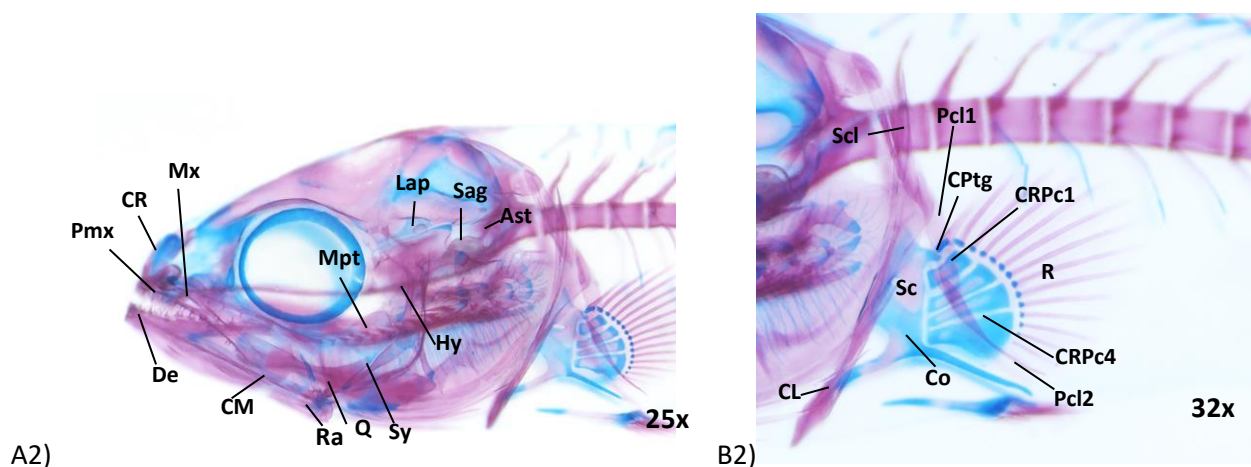


Figura 17. Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPTg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPC, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

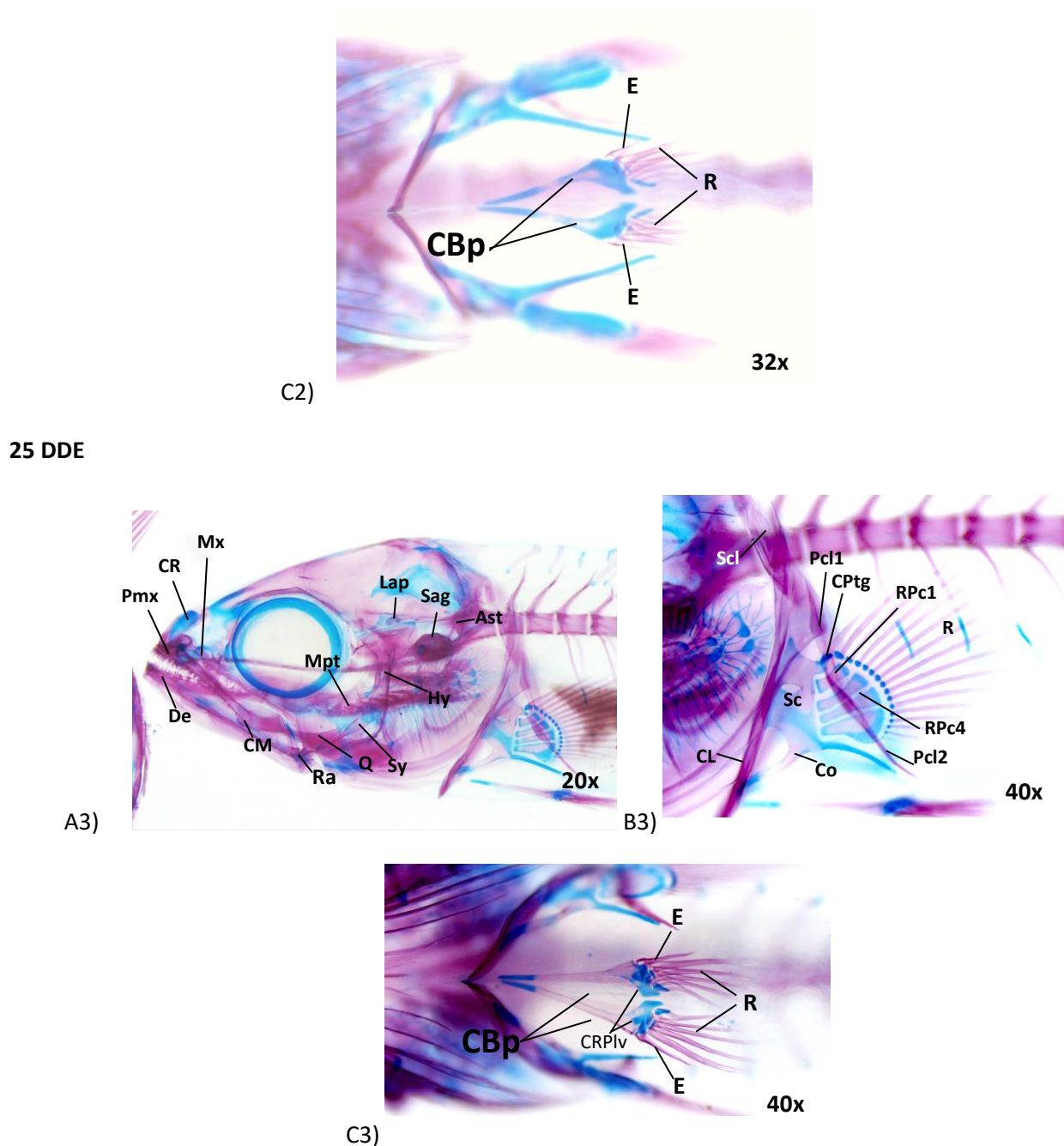


Figura 18 (Continuación). Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoides; CPTg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoides; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPC, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

27 DDE

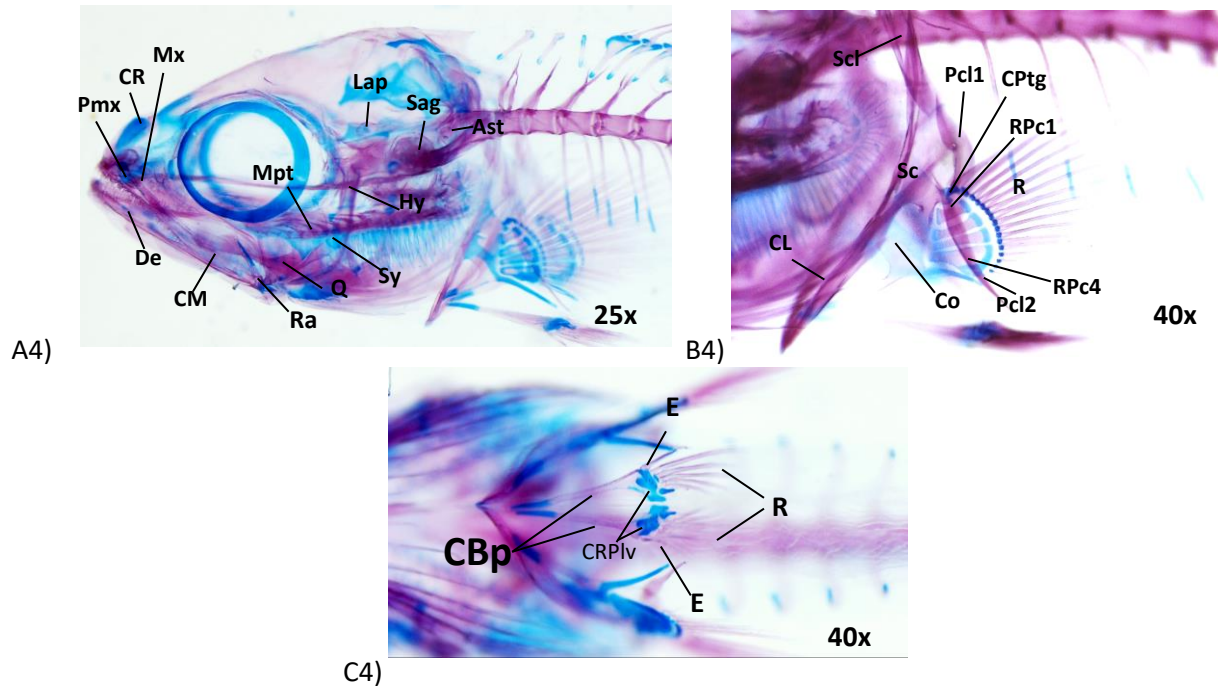


Figura 19 (Continuación). Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 21 DDE (Lt = 1.34 cm), 23 DDE (Lt = 1.72 cm), 25 DDE (Lt = 1.87 cm) y 27 DDE (Lt = 1.99 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; CBp, cartílago basipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPTg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPIv, cartílago radial pélvico; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

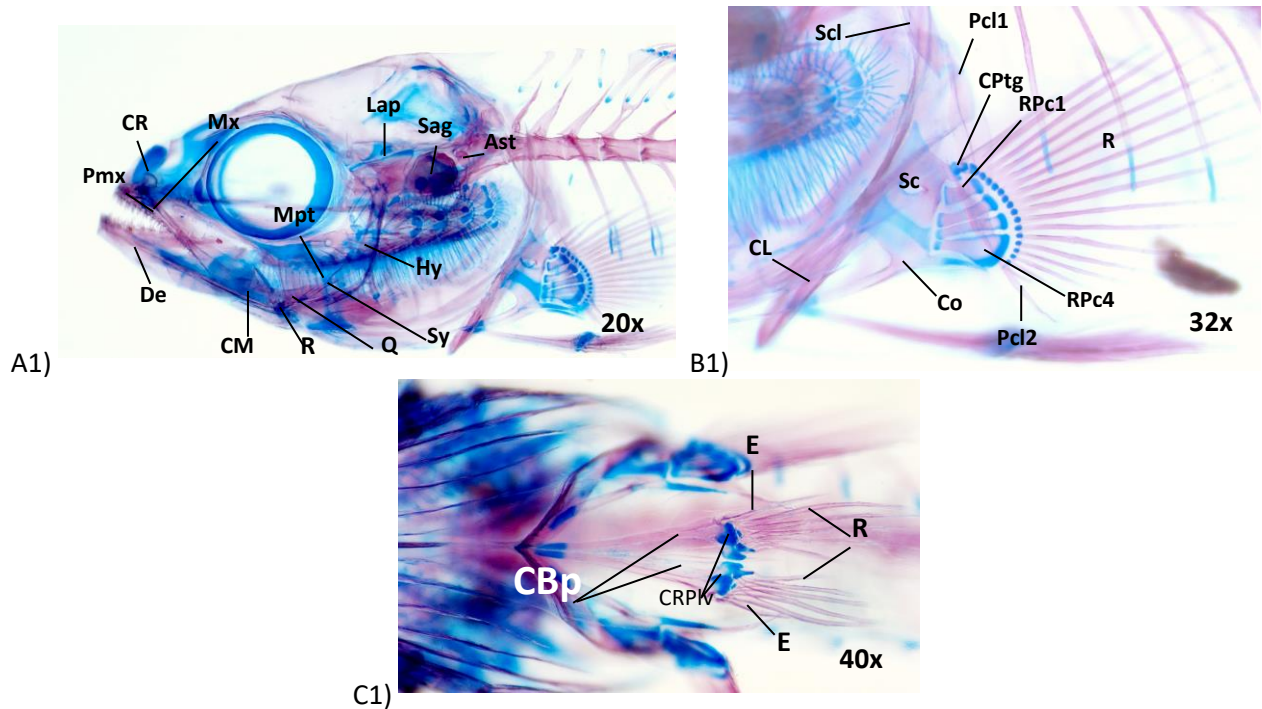
Para las edades de **29, 31, 40, 50 y 70 DDE** ($Lt_{\min} = 1.71$ cm; $Lt_{\max} = 7.61$ cm), la intensidad de la coloración en los huesos indicó que el proceso de osificación está por finalizar, lo que indica que hay un aumento en los depósitos de calcio, lo cual es evidente por la mayor afinidad por el rojo de alizarina. Los cambios en las estructuras del complejo mandibular no son tan evidentes como en las primeras etapas del desarrollo esquelético, exceptuando los otolitos (Sag, Ast y Lap) los cuales presentaron un aumento de tamaño.

Para las estructuras que conforman las aletas pectorales se observó que el proceso de osificación es más lento ya que a los 29 DDE la escapula (Sc) presentó grandes regiones cartilaginosas y fue hasta los 40 DDE (Fig. 11-B3) donde terminó la fase de transición de cartílago a hueso.

En las aletas pélvicas se pudo observar que a los 29 DDE los cartílagos basipterygium (CBp) todavía presentan una región considerable de cartílago (Fig. 11-A1), a los 31 DDE esta estructura recibe el nombre

de basiterigium (Bp) y para el día 70 DDE ya se encontraba completamente osificado, la única región que permanecerá en su forma cartilaginosa es el CRPiv (Fig. 11-C4).

29 DDE



31 DDE

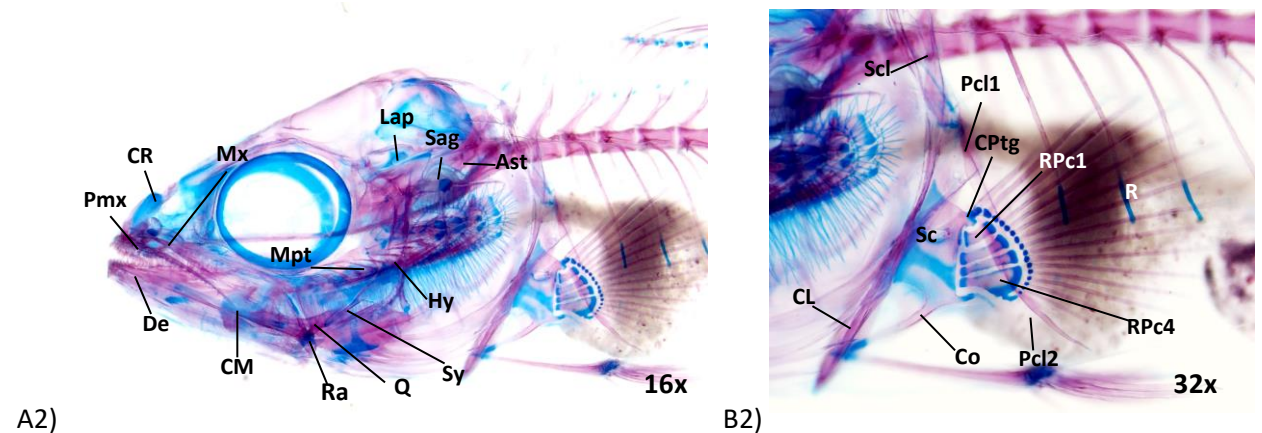


Figura 20. Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago babasipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPtg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPiv, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostral; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

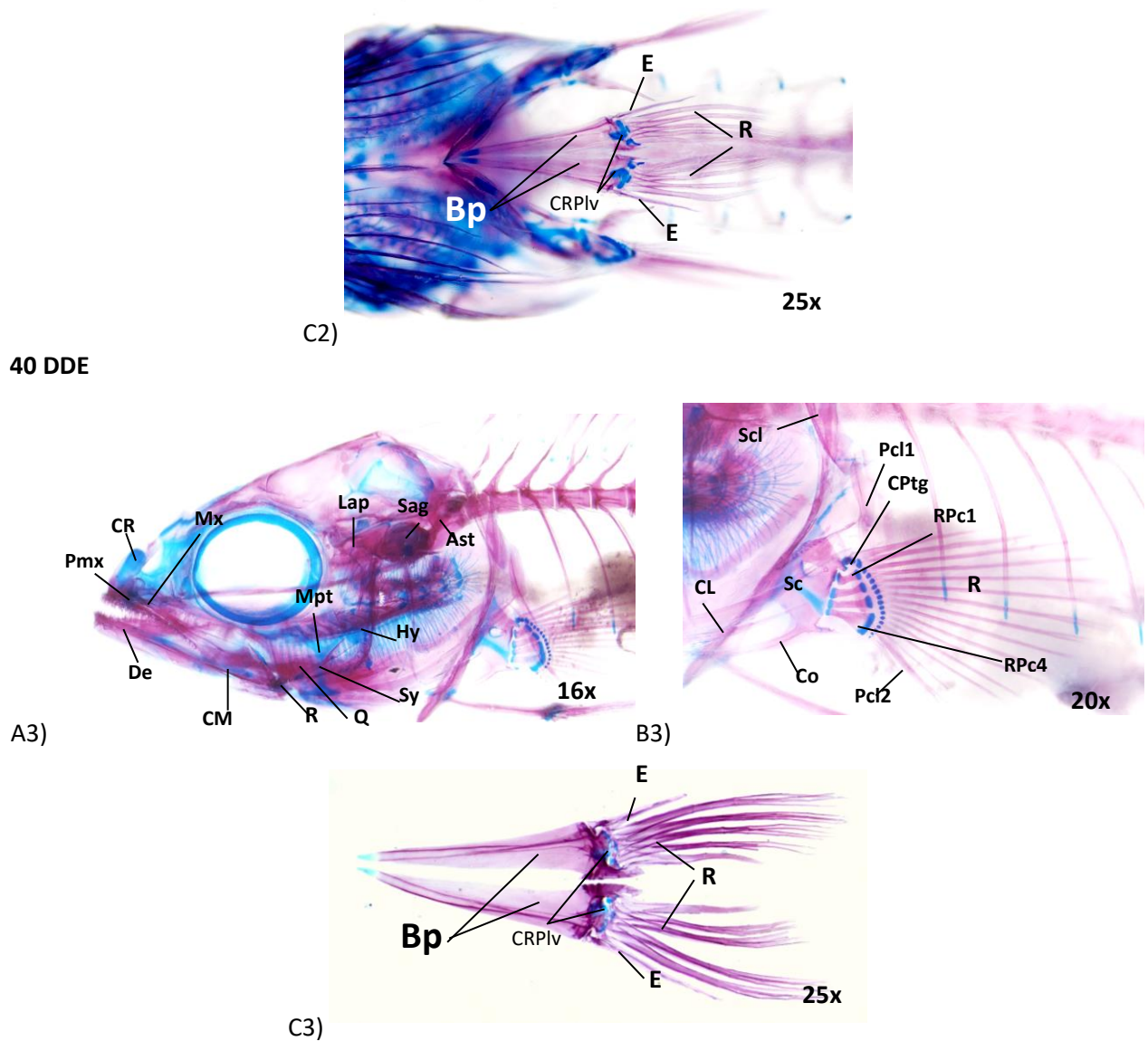
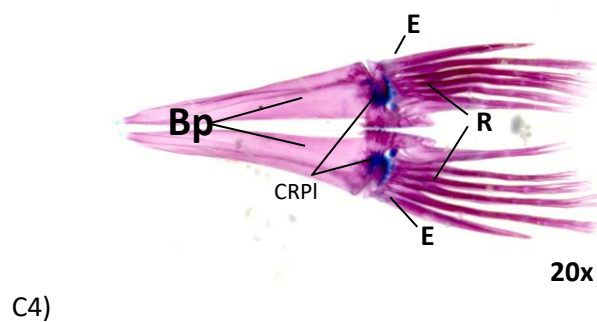
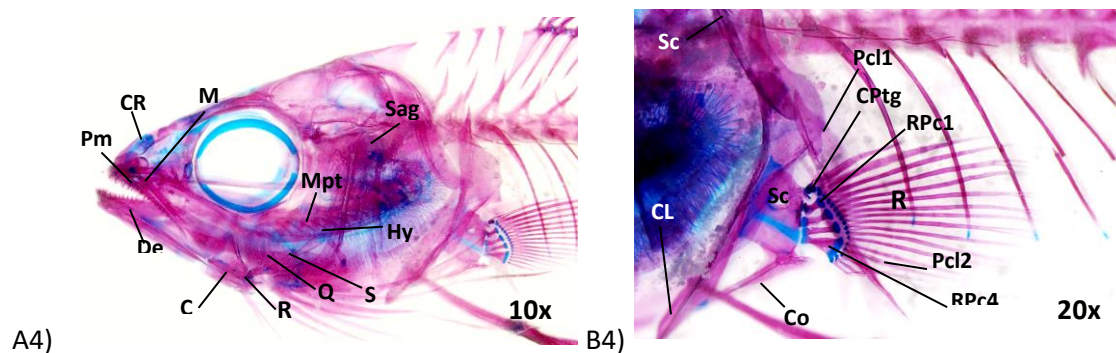


Figura 21. (Continuación) Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago babasipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoide; CPTg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPlv, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostral; CScco, cartílago scapulocoracoide; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

50 DDE



70 DDE

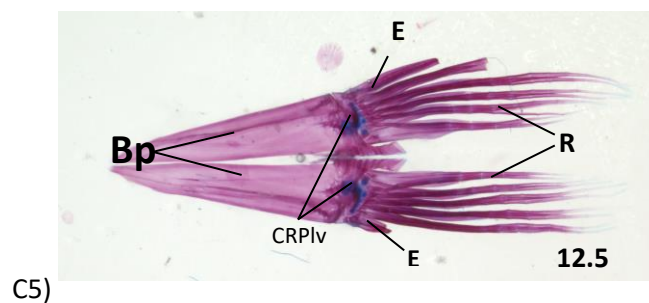
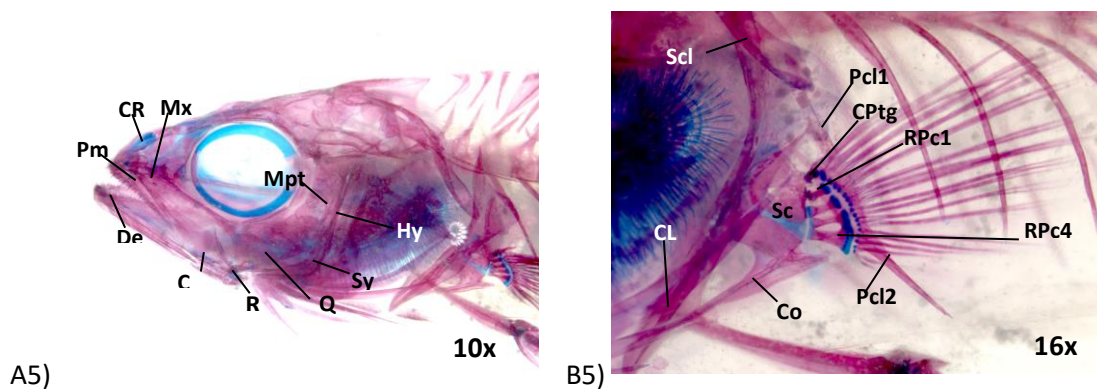


Figura 22. (Continuación) Desarrollo esquelético del complejo mandibular y aletas pares de larvas de 29 DDE (Lt = 2.24 cm), 31 DDE (Lt = 2.50 cm), 40 DDE (Lt = 3.03 cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.24 cm). A) vista lateral del cráneo, B) vista lateral de la aleta pectoral y C) vista ventral de las aletas pélvicas. Ast, asteriscus; Bp, basipterygium; CBp, cartílago babasipterygium; Cl, cleithrum; CM, cartílago de Meckel; Co, coracoides; CPTg, cartílago propterigial; CRPc, cartílago radial pectoral; CRPIV, cartílago radial pélvico; CR, cartílago rostral; CSco, cartílago scapulocoracoides; De, dentario; E, espina; Hy, hyomandibularis; Lap, lapillus; Mpt, metapterigoidea; Mx maxilar; Pcl, postcleithrum; Q, quadrata; R, radios; Ra, retroarticular; RPc, radio pectoral; Sag, sagitta; Sc, escápula; Scl, supracleithrum; Sy, symplectica.

3.2.2 Descripción del esqueleto axial y aletas impares (caudal, dorsal y anal)

En las larvas de 7, 8, 9 y 10 DDE (Ltmin = 0.69 cm; Ltmax = 0.92 cm), se observó el inicio del desarrollo del esqueleto axial y las aletas impares (caudal, dorsal y anal). Las primeras estructuras que comenzaron a formarse fueron los cartílagos hipurales (Ch 1-3) los cuales dan soporte a la aleta caudal, también se observaron esbozos de los arcos hemales (Ah) que protegen a las venas y arterias caudales (Fig. 12-A).

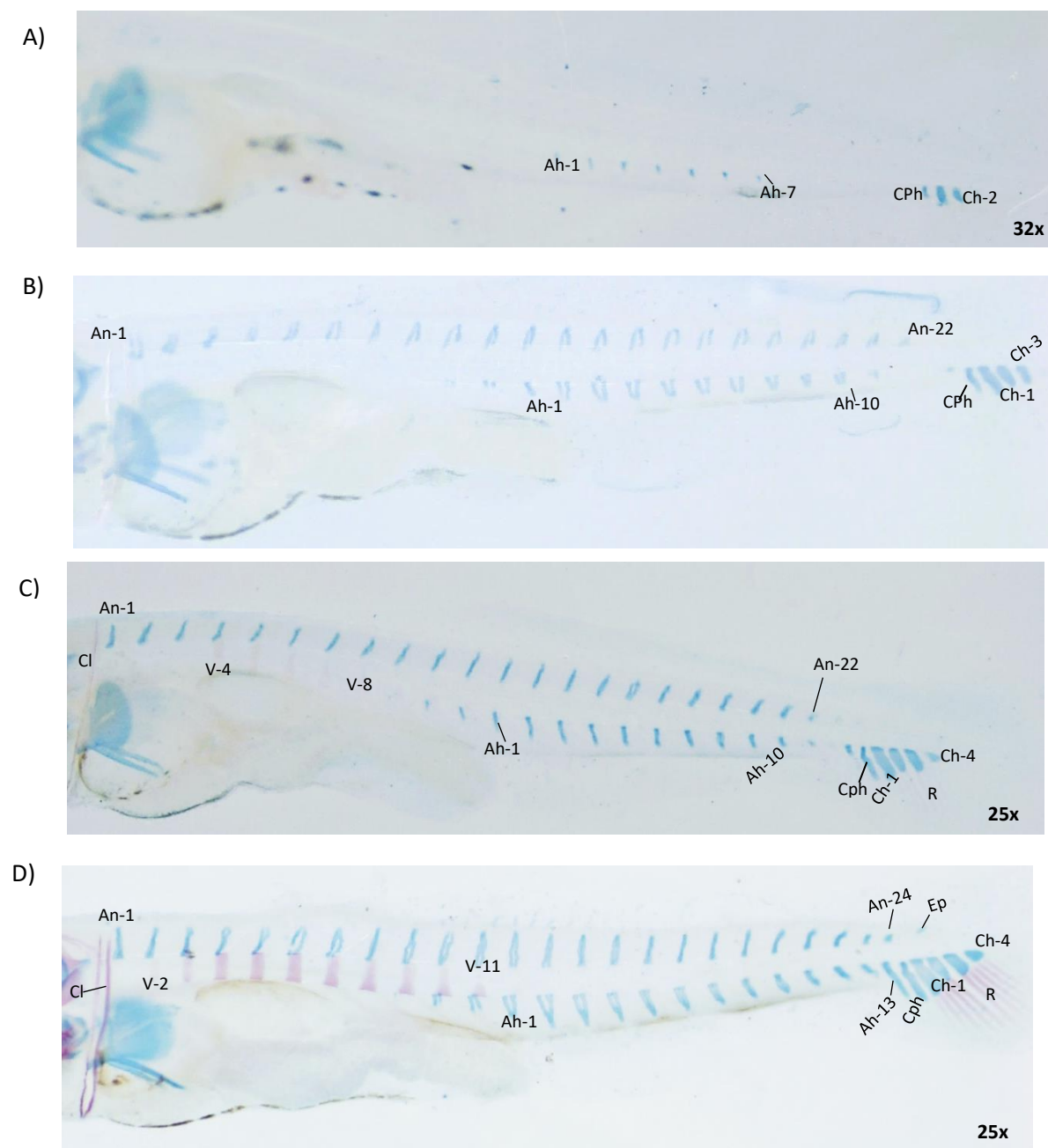


Figura 23. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 7 DDE (Lt = 0.76cm) B) 8 DDE (Lt = 0.80) C) 9 DDE (Lt = 0.82cm) y D) 10 DDE (Lt = 0.86). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cph, cartilago parhipural; V, vertebra; Ch, cartilago hipural; R, radio.

A los 8 DDE (Fig. 12-B) se comenzaron a formar los arcos neurales (1-22) y los arcos hemales (1-13) solo presentaron un aumento en longitud, pero siguen en su fase cartilaginosa. En la región caudal se observó la osificación directa de los primeros radios de la aleta caudal. Para los 9 DDE comenzaron a desarrollarse parcialmente las vértebras abdominales (4-8) las cuales se osifican en forma directa. Se observó un aumento en el número de arcos neurales (1-24) y arcos hemales (1-13). En la región caudal se observó la aparición del cartílago parhipural (CPh) que da soporte a la aleta, con esta estructura se completó la formación de los cuatro cartílagos hipurales, los cuales comenzaron su proceso de osificación ya que presentan una ligera coloración rosa en el centro. En organismos de 10 DDE se pudo observar la aparición parcial de las vértebras proximales (2) y las abdominales (3-11), mayor desarrollo de los arcos neurales (1-24) y arcos hemales (1-14) así como esbozos de las espinas neurales (En) y hemales (Eh), estos en su fase cartilaginosa. Mientras que en la región caudal hay un aumento en la longitud de los radios, los Ch y el CPh, los cuales presentan un grado más avanzado de osificación (Fig. 12-D), también se forman los cartílagos epurales.

Para las edades que comprenden a los organismos de **11, 12, 13 y 14 DDE** (Ltmin = 0.84cm; Ltmax = 1.21cm) se observó un desarrollo avanzado de la columna vertebral, completando la primera capa de hueso de las vértebras, así como cambios y formación de nuevas estructuras en la región caudal.

En organismos de 11 DDE se observó un desarrollo parcial de las vértebras proximales 1 y 2, abdominales 9-11 y caudales 12-16, mientras que las vértebras 3-8 completaron su primera capa de hueso (Fig. 13-A). En cuanto a los arcos neurales y hemales comenzaron su proceso de transición de cartílago a hueso iniciando desde la base y extendiéndose hacia las espinas neurales y hemales. En la zona dorsal y ventral se observaron los primeros cartílagos radiales proximales de la aleta dorsal y anal. En la aleta caudal se observó un grado mayor de osificación de los huesos hipurales.

A los **12 DDE** se observó una osificación completa de la primera capa de hueso de las vértebras 2-12 y parcial 1 y 13-20. En estas larvas se pudo apreciar un mayor grado de osificación de los arcos hemales y neurales con una región cartilaginosa en los bordes. En la región caudal, los hipurales presentan una mayor superficie en proceso de osificación, mientras que el parhipural comienza con la transición a hueso. A esta edad se hizo más evidente la formación de los cartílagos epurales (1-3). La región caudal se mantiene sin cambios.

A los **13 DDE** (Fig. 13-C) se observó que las vértebras proximales (1 y 2) se encuentran osificadas, formando solo una delgada capa externa de hueso, así como de las abdominales (3-11) y caudales (12-14), mientras

que las vértebras 15-20 presentaron una formación y osificación parcial. En aleta dorsal se pudo observar la formación del cartílago radial distal, así como la osificación directa de los radios, mientras que en la aleta anal aparecen los primeros radios. En la aleta caudal los huesos hipurales presentaron mayor grado de osificación excepto los extremos donde hay zonas cartilagosas. Se comienza a formar parcialmente el urostilo, que se desarrolló desde el centro hacia los extremos, también se formó el último cartílago epural (3).

En los organismos de **14 DDE** se observó la osificación completa (primera placa de hueso) de las vértebras proximales y abdominales, mientras que las caudales (17-22) presentan osificación incompleta y las vértebras 23 y 24 fueron las últimas en formarse (Fig. 13-D). Los arcos hemales y neurales siguen en proceso de osificación, mientras que las espinas continúan creciendo y osificándose. Hay un mayor desarrollo en los cartílagos radiales distales y proximales tanto de la aleta dorsal como de la anal, así como un aumento en el número de radios. En la aleta caudal se observa un grado de osificación mayor de los huesos hipurales y del urostilo, pero también hay estructuras con osificación incompleta o sin osificar como el parhipural y los epurales, respectivamente.

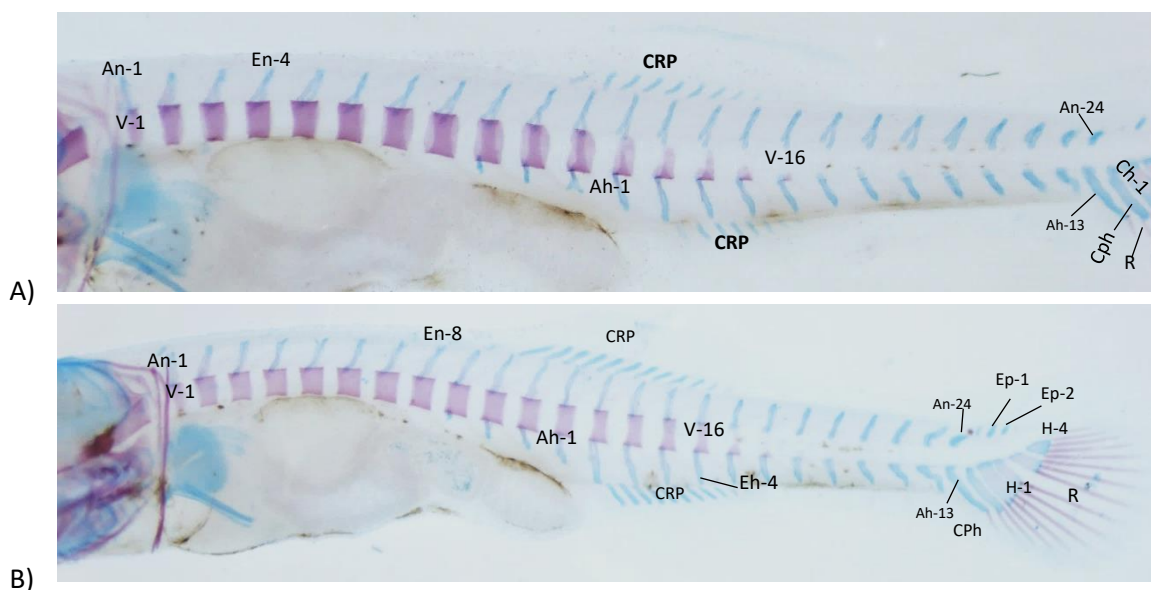


Figura 24. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 11 DDE (Lt = 0.92cm) B) 12 DDE (Lt = 0.96cm) C) 13 DDE (Lt = 1.03cm) D) 14 DDE (Lt = 1.13 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Ch, cartílago hipural; Cph, cartílago parhipural; CpH, cartílago post-hemal; CpPH, cartílago post-prehipural CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.

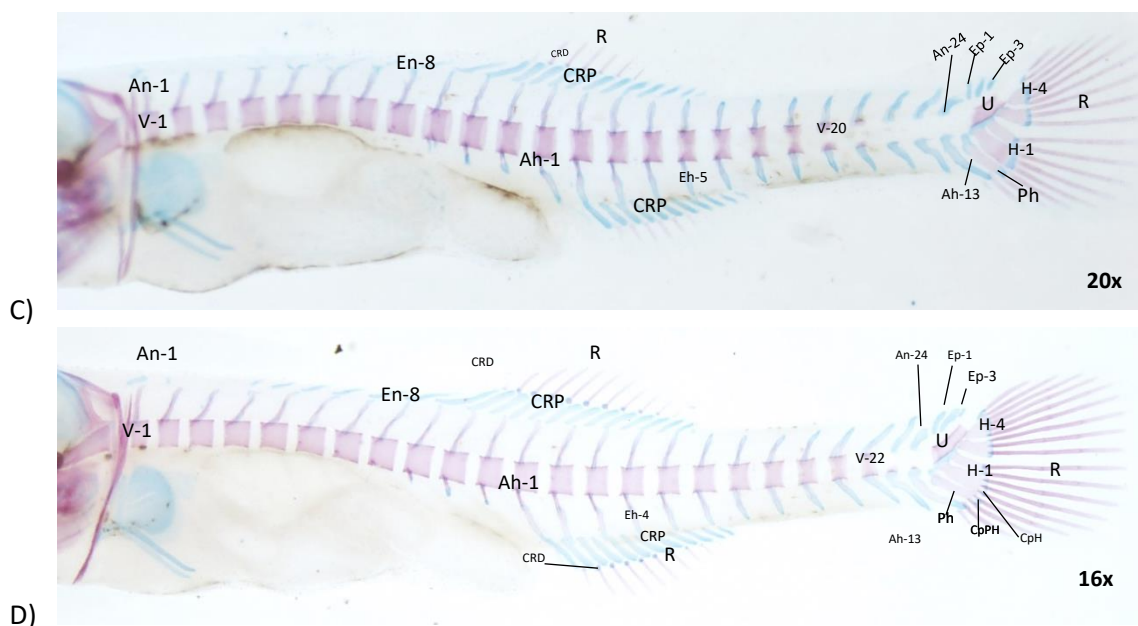


Figura 25. (Continuación) Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 11 DDE (Lt = 0.92cm) B) 12 DDE (Lt = 0.96cm) C) 13 DDE (Lt = 1.03cm) D) 14 DDE (Lt = 1.13 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Ch, cartílago hipural; Cph, cartílago parhipural; CpH, cartílago post-hemal; CpPH, cartílago post-prehipural CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.

En los organismos de **15, 17, 19 y 21 DDE** ($Lt_{\min} = 0.95$ cm; $Lt_{\max} = 1.59$ cm) se observó el desarrollo completo de la columna vertebral, así como de la región caudal que abarcó el U, Ep, H, Ph y R.

En las larvas de **15 DDE**, las vértebras de la 1 a la 22 completaron la primera fase de osificación, que es solo una capa delgada de hueso (Fig. 11-A), mientras que en las caudales (23 y 24) se observó un desarrollo parcial; en cuanto a los arcos neurales la transición de cartílago a hueso se completó del 1 al 16, mientras que del 17-20 presentaban zonas cartilaginosas y del 21-24 continuaron en su fase cartilaginosa. En los arcos hemales se observó una osificación completa del 1-6, parcial de 7-11 y 16, y del 12 al 15 aún se encontraron en fase cartilaginosa. En cuanto a la aleta anal se observó que en los CRP se le formó una extensión de cartílago más delgada que la principal tomando una forma de Y invertida (Fig 14-A). A esta edad comenzó la formación de los soportes de la aleta dorsal con espinas, el cartílago radial proximal (CRP), así como los cartílagos supraneurales que se encuentran en la región dorsal, sobre las espinas neurales 1-3.

En la región caudal se observó que el proceso de osificación superficial se completó en los huesos hipurales 3 y 4, mientras que en el 1 y 2 aún se podían distinguir pequeñas zonas cartilaginosas, este mismo proceso

se presentó en el parhipural. A los **17 DDE** las vértebras completaron la primera fase de osificación, excepto la 24, que todavía presentaba un desarrollo incompleto. Otro cambio importante en el desarrollo esquelético de estas larvas es la transición completa de cartílago a hueso de los arcos y espinas neurales que se extendió hasta la vértebra 19, mientras que en las 20-24 es parcial, esto quiere decir que la espina neural sigue en su forma cartilaginosa. En cuanto a los arcos y espinas hemales presentaron osificación completa del 1-11 (Ah) y 2-9 (Eh), y parcial del 12-15 (Ah) y 9-14 (Eh). En la aleta dorsal y anal, los cartílagos radiales proximales comenzaron la transición de cartílago a hueso por lo tanto cambia su nombre a pterigióforos (Pt), pero se mantuvieron los cartílagos radiales distales.

En la aleta caudal se observó la osificación completa de los huesos hipurales (1-4) y el parhipural, además de la formación del último hipural (5), los epurales comenzaron la transición de cartílago a hueso.

Para los organismos de **19 DDE** (Fig. 14-C) se completó el proceso de osificación superficial de la columna vertebral, así como de los arcos neurales (1-21) y hemales (1-13), espinas neurales (1-19) y hemales (4-11); mientras que los An (22-24) y Ah (13-15) presentaron osificación parcial, lo mismo sucedió con las En (20-24) y Eh (12-15). A este nivel de desarrollo óseo se observó la aparición de las costillas pleurales que comienzan en la vértebra 5 y finalizan en la 8. En la aleta dorsal los pterigióforos presentaron un mayor grado de osificación, tanto de la sección de la aleta con radios, como la sección con espinas, esto mismo comportamiento se repitió para la aleta anal. En la región caudal los huesos hipurales completaron el proceso de osificación, así como el parhipural, mientras que los epurales apenas comenzaron la fase de transición a hueso.

En la lobina rayada de **21 DDE** (Fig. 14-D) se observó la osificación completa de los arcos neurales (1-21) y hemales (1-13), espinas neurales (1-19) y hemales (4-11 y 16 "modificado"); mientras que los An (22-24), Ah (14), En (20-24) y Eh (12-15) presentaron una osificación parcial. El desarrollo de las costillas pleurales que comenzó a partir de la vértebra 3 a la 8 presentaron mayor longitud, pero siguen en su fase cartilaginosa. En la aleta dorsal se pudo observar un mayor desarrollo de los pterigióforos anteriores (soporte de las espinas) que continuaron en fase cartilaginosa, así como también hubo un aumento en la longitud de las espinas; mientras que en la sección con radios comenzaron a osificarse desde el centro a los extremos, lo mismo se repite en la aleta anal, donde el color rosa se volvió más predominante que el azul (cartílago). En la aleta caudal se observó una osificación parcial de los epurales (1-3) y comenzó a formarse el uroneural, por osificación directa; también se pudo apreciar con mayor claridad el cartílago de la espina post-hemal (CpH) y el post-parhipural (CpPh).

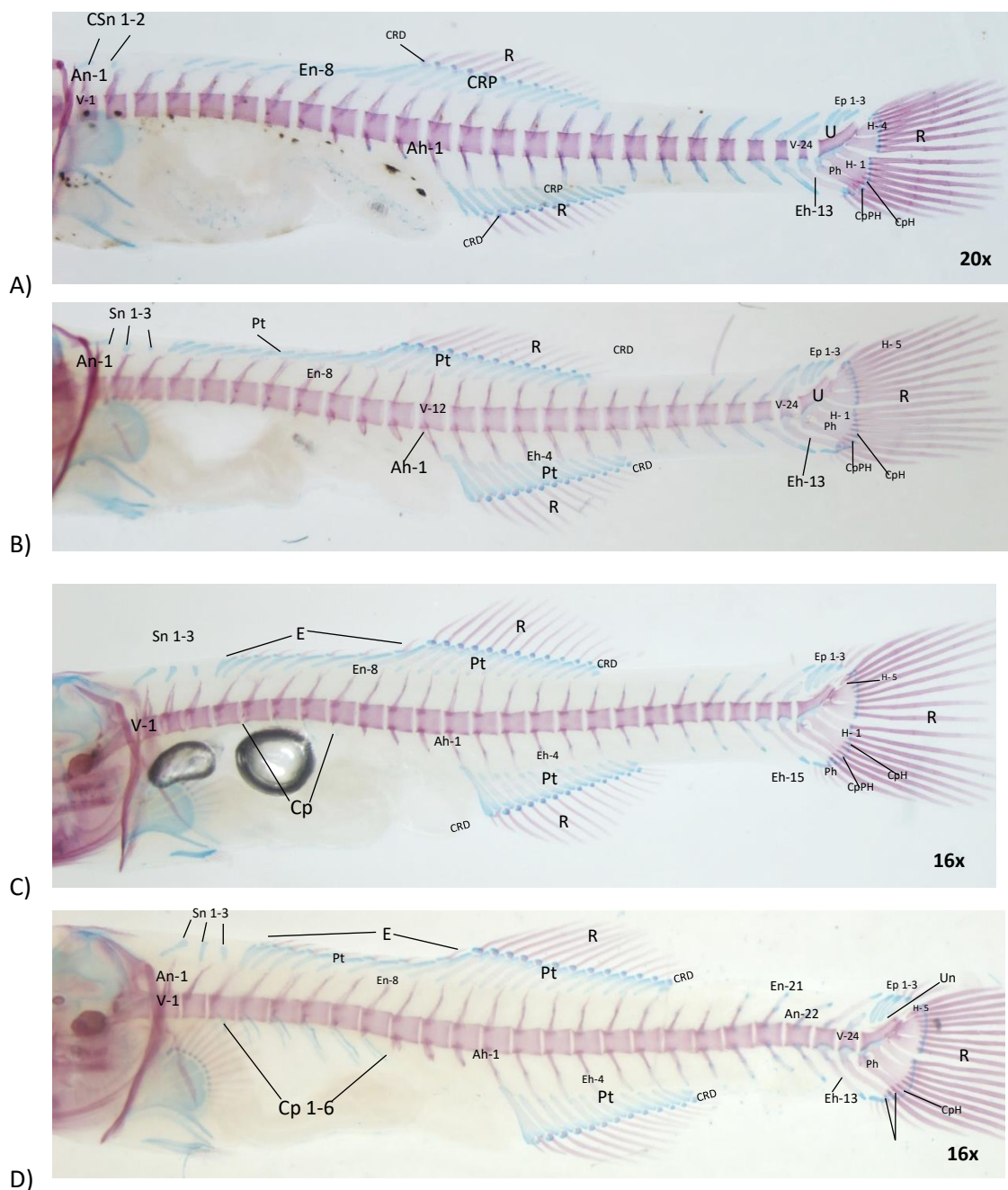


Figura 26. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 15 DDE (Lt = 1.17cm) B) 17 DDE (Lt = 1.30cm) C) 19 DDE (Lt = 1.40cm) D) 21 DDE (Lt = 1.34cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehural; CRD, Cartílago radial distal; CRP, Cartílago radial proximal; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.

En larvas de lobina rayada con una edad de **23 DDE** ($L_{t_{min}} = 1.47$ cm; $L_{t_{max}} = 1.99$ cm) se observó un avance en la osificación de las costillas pleurales (2-6) la cual comenzó desde su articulación con las vértebras y siguió hacia los extremos donde su composición sigue siendo cartílago. En la región caudal las espinas

neurales (20-24) presentan osificación parcial, igualmente para las espinas hemales (20-23) y los epurales (1-3), mientras que los hipurales completaron el proceso de osificación (Fig. 15).

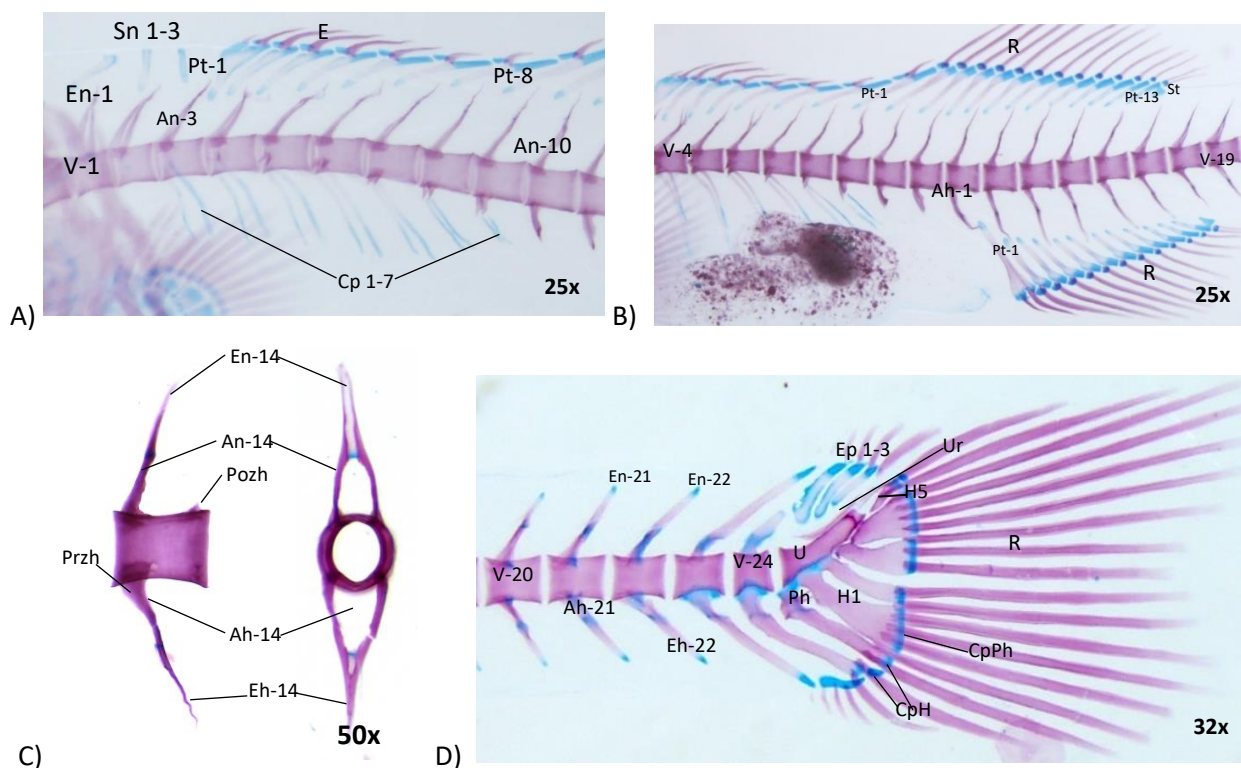


Figura 27. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 23 DDE (Lt = 1.72 cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigióforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.

El esqueleto axial a la edad de **25 DDE** (Lt_{min} = 1.47 cm; Lt_{max} = 1.99 cm) presentó osificación completa de la columna vertebral, arcos y espinas tanto neurales como hemales. Se observó mayor osificación de las costillas pleurales (1-6) excepto los extremos distales que aún son de cartílago (Fig. 16-A), mientras que las costillas 7 y 8 continúan en la fase cartilaginosa (Fig. 16-B). En la aleta caudal los huesos hipurales (H), el urostilo (U), el parhipural (Ph) y el uroneural (Ur) completaron el proceso de osificación, mientras que los huesos epurales iniciaron este proceso, lo que fue evidente al observar un ligero tono color rosa.

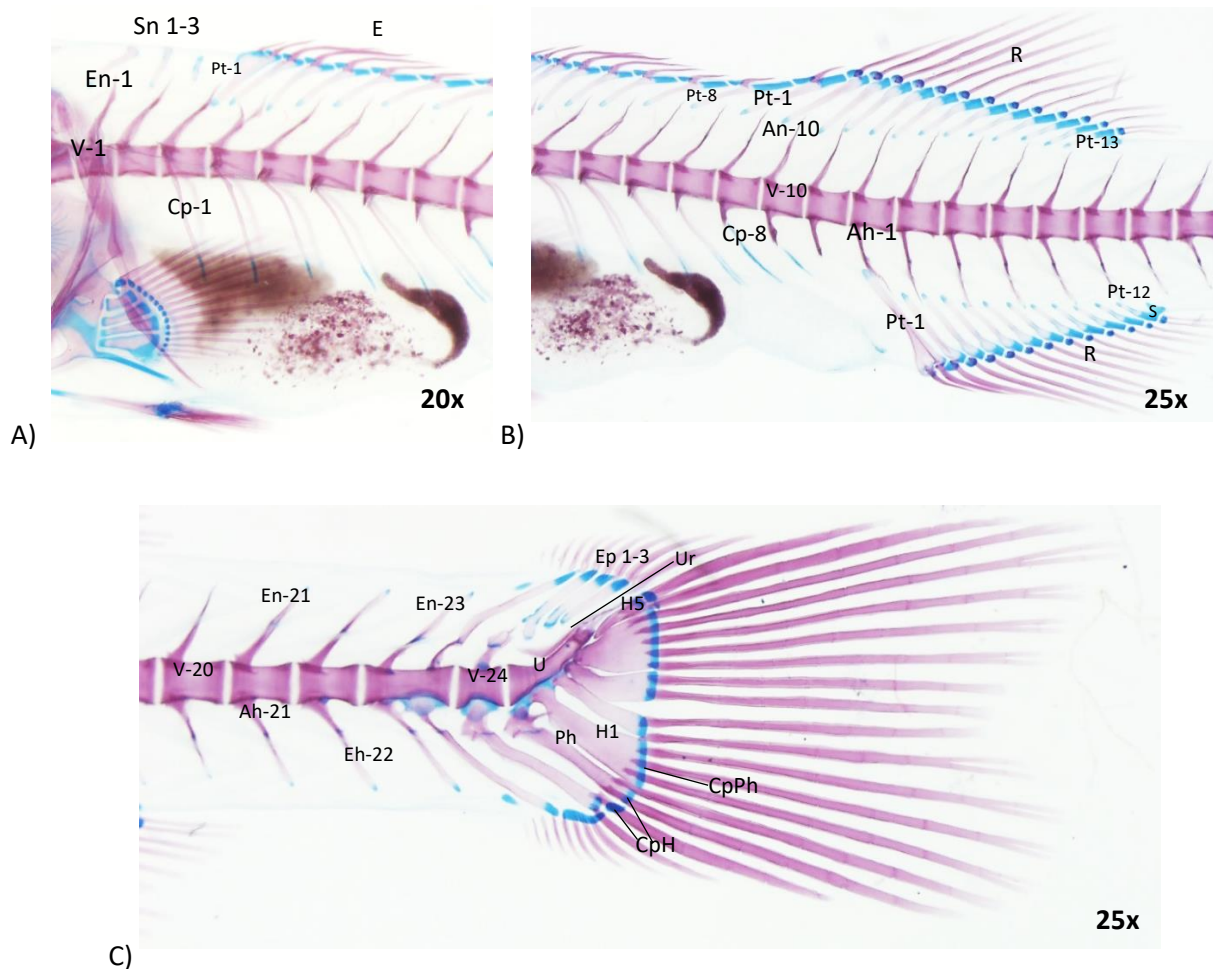


Figura 28. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 25 DDE (Lt = 1.87cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.

A los **27 DDE** ($Lt_{\min} = 1.47$ cm; $Lt_{\max} = 1.99$ cm) solo se observaron cambios en el grado de osificación (la intensidad de la coloración), de los supraneurales (Sn), pterigioforos (Pt) de la aleta dorsal espinosa y radiada (Fig. 17-A), así como la aleta anal (Fig. 17-B), además de los epurales (Ep), las espinas neurales (En) y hemales (Eh) de la vertebra 22, así como mayor longitud de las costillas pleurales (Cp). En la región caudal no se observaron grandes cambios, solo se observó un aumento en el desarrollo del uroneural (Ur) y el hipural (H5) (Fig. 17-C).

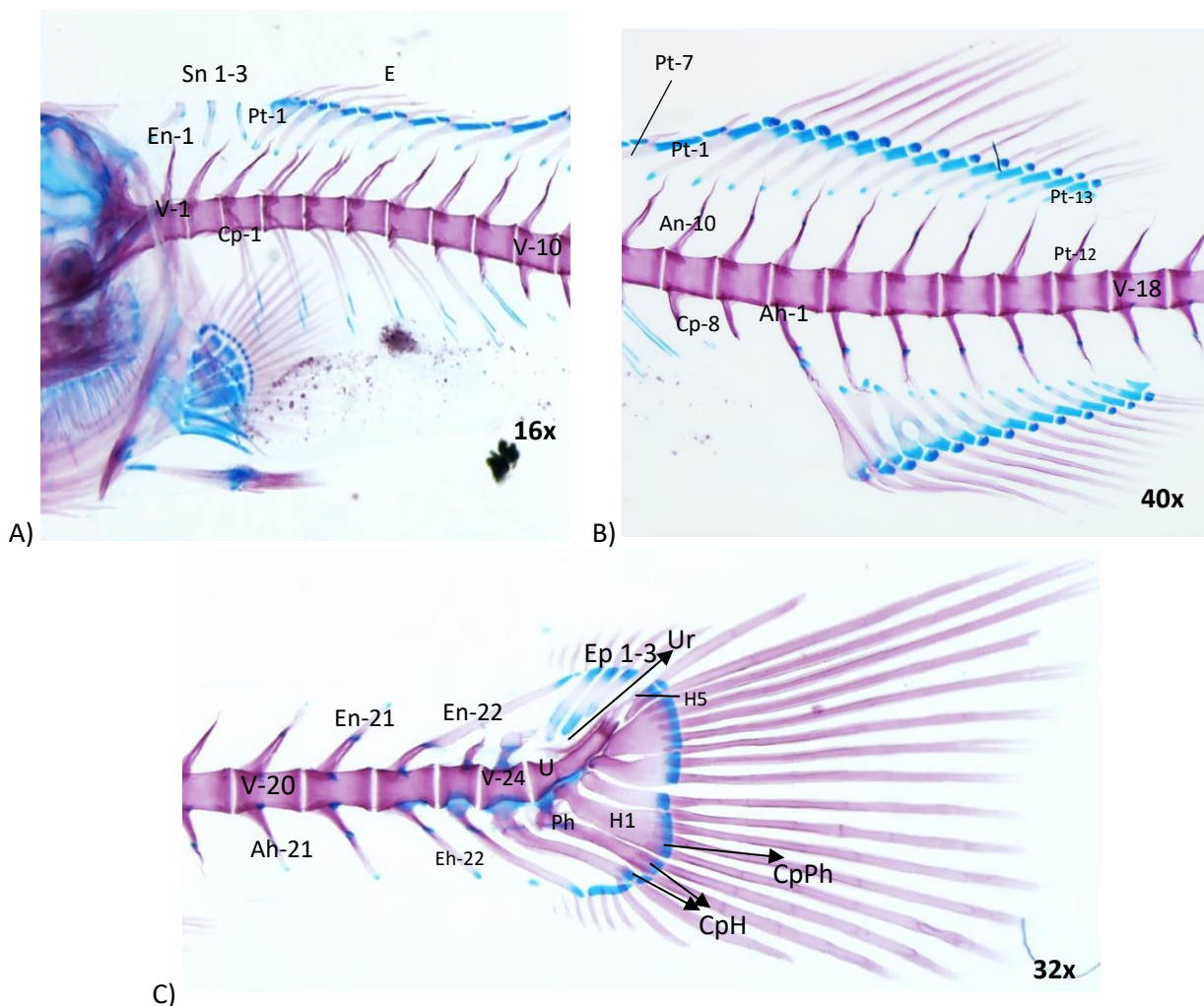


Figura 29. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 27 DDE ($L_t = 1.99\text{cm}$). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-hipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigioforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.

A la edad de **29 DDE** ($L_{t_{\min}} = 1.47\text{ cm}$; $L_{t_{\max}} = 1.99\text{ cm}$) la costilla 8 y 9 mostraron un retraso en la osificación, ya que son las últimas en comenzar la transición cartílago-hueso (Fig. 18). Otro cambio notorio fue el aumento en la osificación en los pterigioforos tanto de la aleta dorsal como anal, pero sus extremos distales son cartilaginosos (Fig. 15B).

Es importante mencionar que las vértebras mostraron un cambio morfológico importante en los arcos neurales ya que se formó una extensión del hueso llamada postzigapofisis neural y en el arco hemal se formó el postzigapofisis y la prezigapofisis hemal.

En la región caudal las espinas neurales y hemales de la vertebra 24 poseen zonas mínimas de cartílago, lo mismo se observó con los epurales y hubo mayor diferenciación del uroneural.

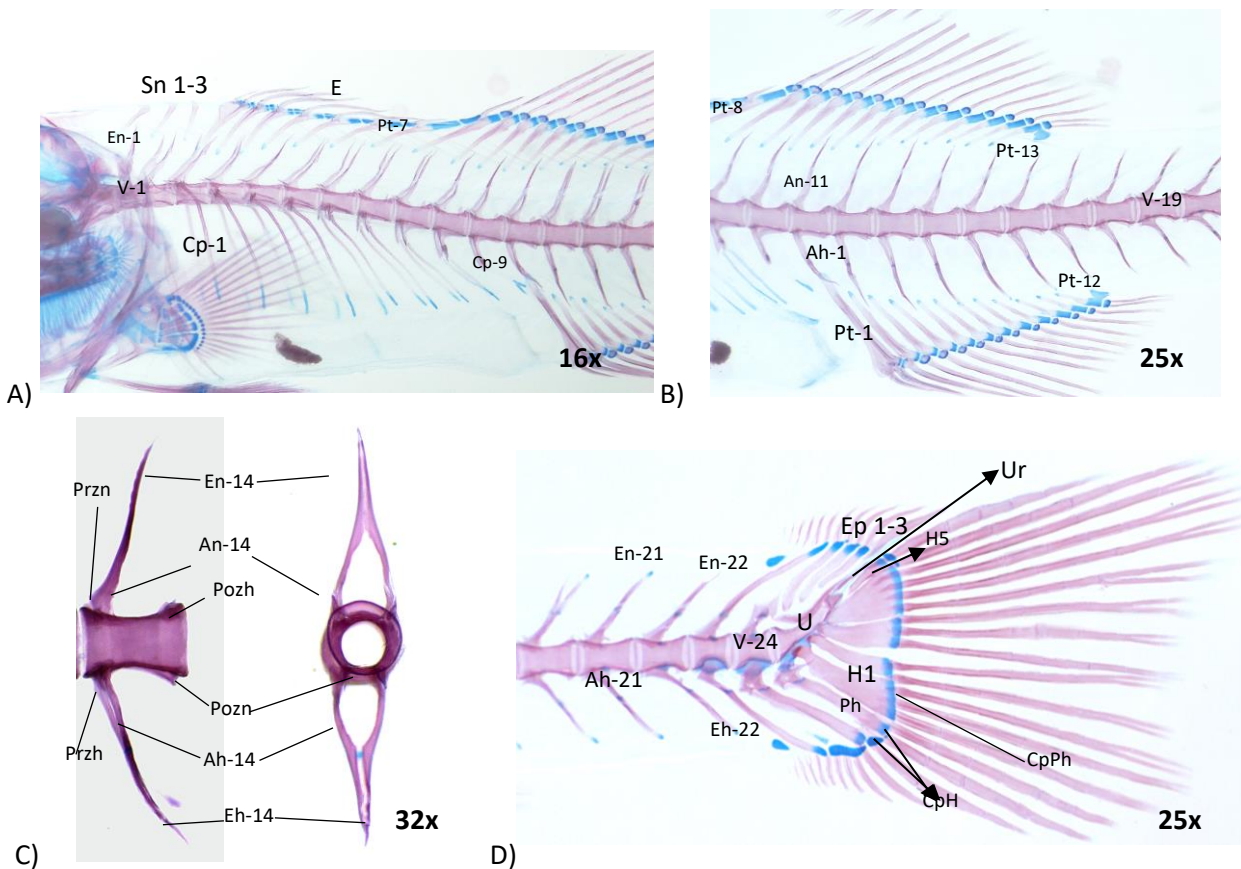


Figura 30. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 29 DDE (Lt = 2.24cm). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pozh, postzigapofisis hemal; Pozn, postzigapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Pt, pterigióforos; U, urostilo; V, vertebra; R, radio.

El desarrollo de lobina rayada a los 31 DDE (Ltmin = 2.01 cm; Ltmax = 2.87 cm) se observó un grado de osificación mayor en la parte inicial de las costillas pleurales al igual que en los pterigióforos de la aleta dorsal anterior (espinas) y posterior (radios), así como en los soportes de la aleta anal, todas estas estructuras tuvieron un aumento en su longitud (Fig. 19- A, B y C)

En la región caudal los cartílagos post-hemal (CpH) y post- parhipural (CpPh) se observaron más diferenciados (Fig. 19-C), los epurales presentaron una osificación parcial, ya que el grado de coloración es muy tenue y aún presentan una fracción de cartílago.

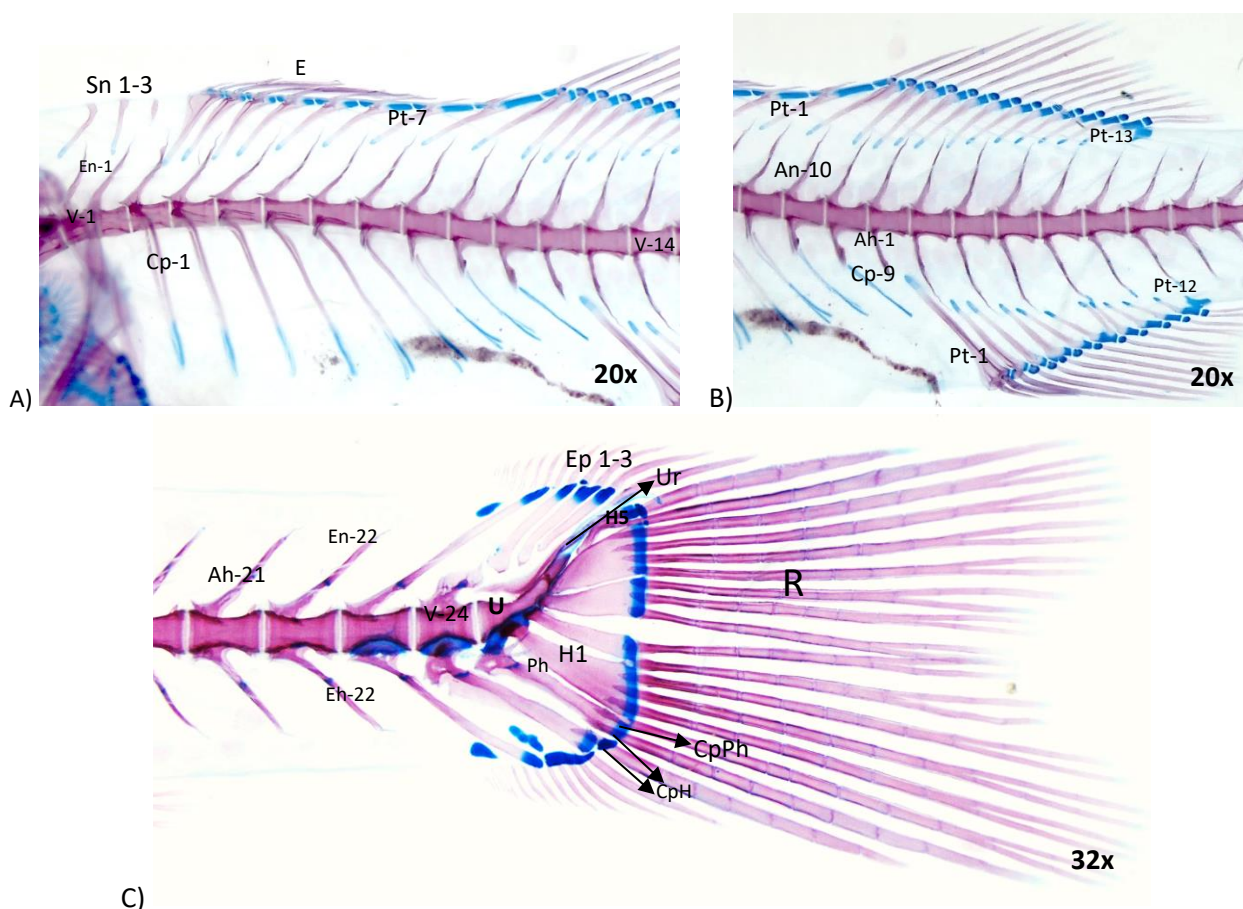


Figura 31. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 31 DDE (Lt = 2.50cm). A) Costillas pleurales B) Aleta caudal y anal C) Aleta caudal. An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Ph, parhipural; Pt, pterigióforos; U, urostilo; Ur, uroneural; V, vertebra; R, radio.

Los organismos correspondientes a las edades de **40, 50 y 70 DDE** ($Lt_{\min} = 2.38$ cm; $Lt_{\max} = 7.61$ cm) se observó un mayor grado de osificación de las costillas, siendo la 8 y 9 las últimas en pasar por este proceso. Las vértebras continuaron cambiando tanto su morfología como su composición, ya que se observó que el proceso de osificación ocurre de afuera hacia adentro aumentando las capas de hueso, además la prezigapofisis neural (Przn) y el postzigapofisis hemal (Przh) tuvieron un mayor desarrollo (Fig. 20-D3). Los pterigióforos de la aleta dorsal y anal concluyeron el proceso de transición de cartílago a hueso, pero se mantuvieron los cartílagos radiales distales (Fig. 20-B3).

En la región dorsal no se observaron grandes cambios exceptuando los epurales que finalizaron la transición de cartílago a hueso (Fig. 20-C1). Se observó, un incremento gradual de depósitos de calcio, que se observan como una mayor coloración (Fig. 20-C3).

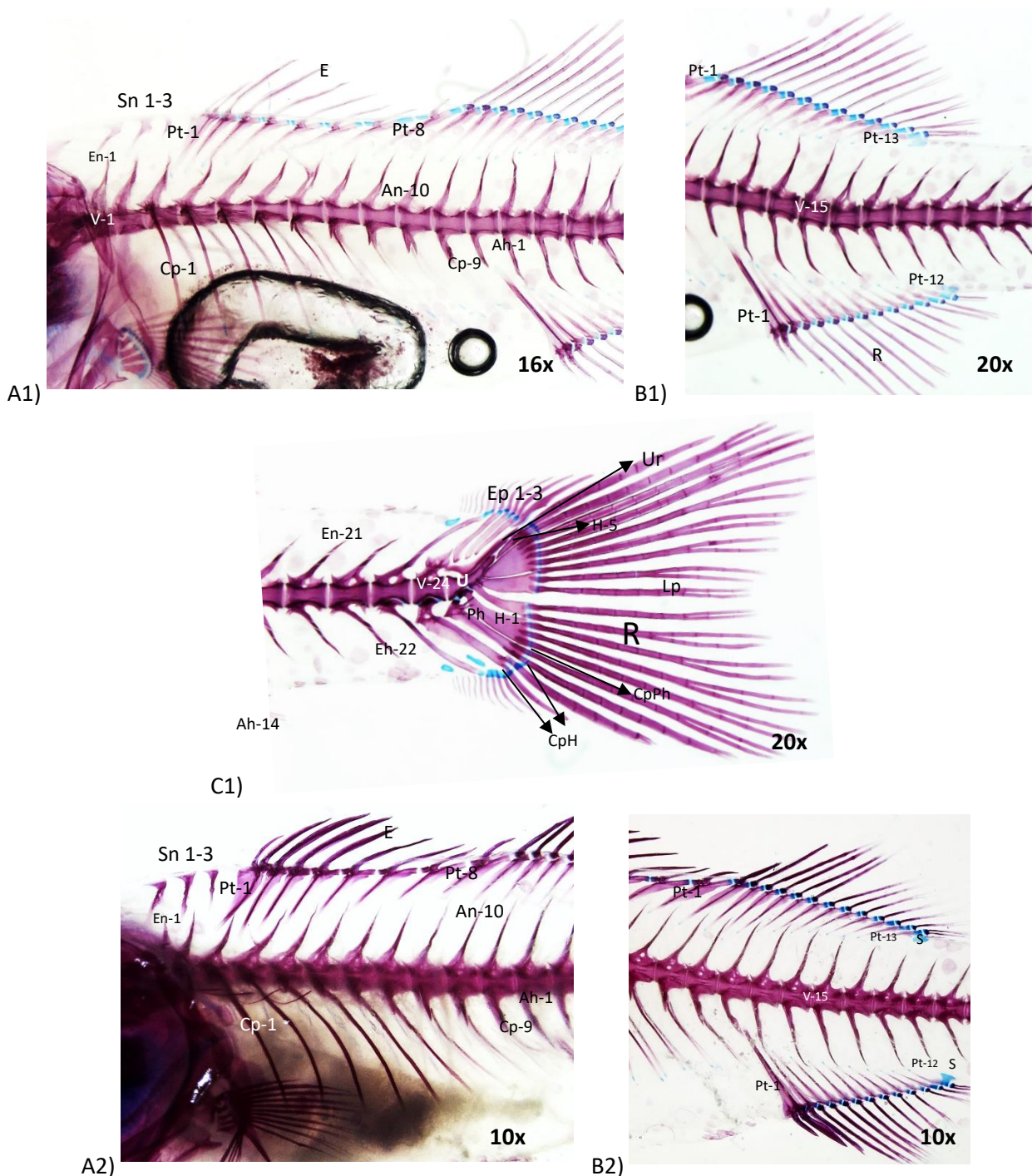


Figura 32. Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 40 DDE (Lt = 3.03cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.70). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartilago post-hemal; CpPh, cartilago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Lp, leptotriquia; Ph, parhipural; Pozh, postzygapofisis hemal; Pozn, postzygapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Przn, prezigapofisis neural Pt, pterigióforos; U, urostilo; Un, uroneural; V, vertebra; R, radio.

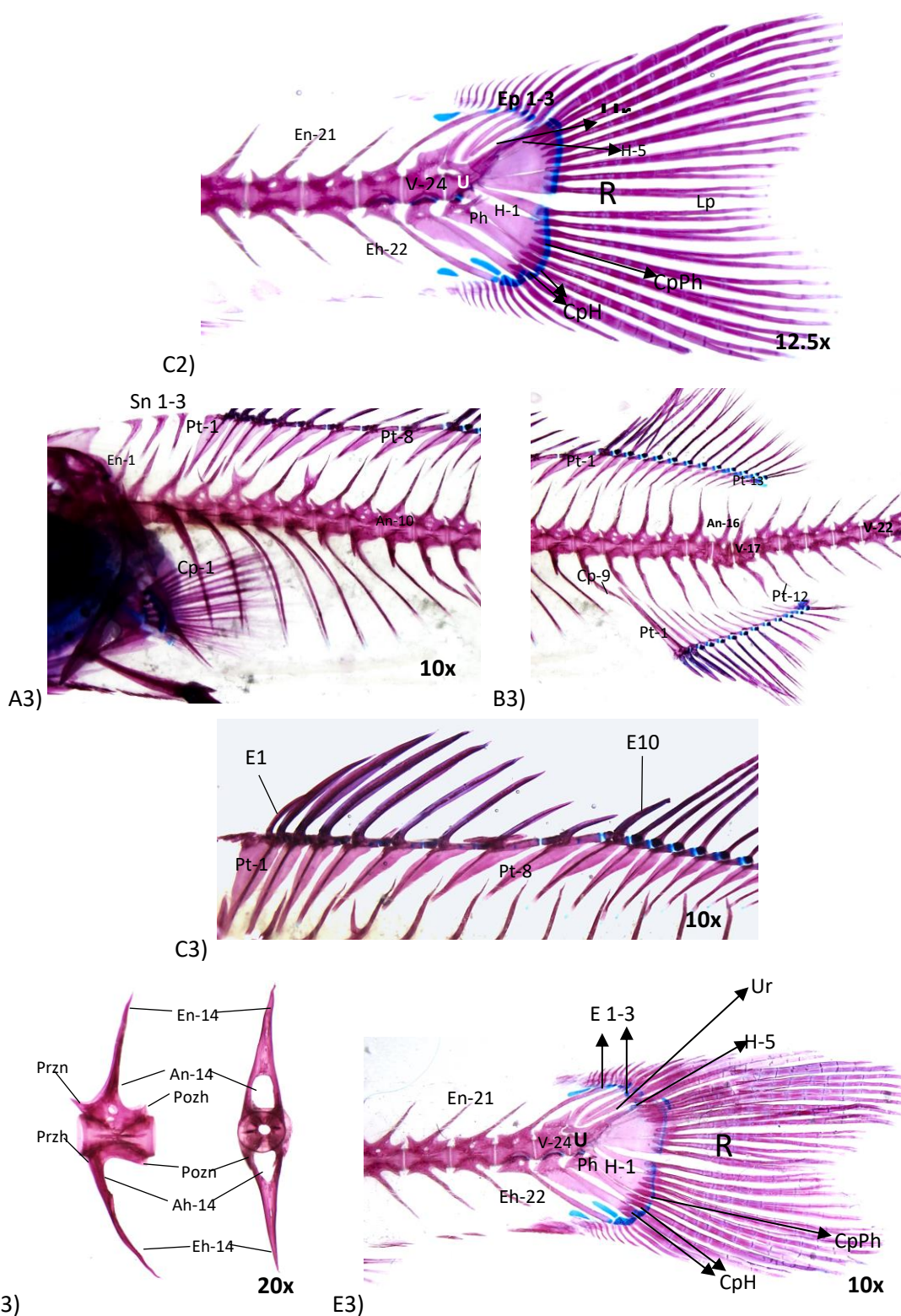


Figura 33 8Continuación). Desarrollo del esqueleto axial de Lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 40 DDE (Lt = 3.03cm), 50 DDE (Lt = 4.36 cm) y 70 DDE (Lt = 6.70). An, arco neural; Ah, arco hemal; Cp, costillas pleurales; CpH, cartílago post-hemal; CpPh, cartílago post-prehipural; E, espina; En, espina neural; Eh, espina hemal; Ep, epural; H, hipural; Lp, leptotriquia; Ph, parhipural; Pozh, postzygapofisis hemal; Pozn, postzygapofisis neural; Przh, prezigapofisis hemal; Przn, prezigapofisis neural Pt, pterigióforos; U, urostilo; Un, uroneural; V, vertebra; R, radio.

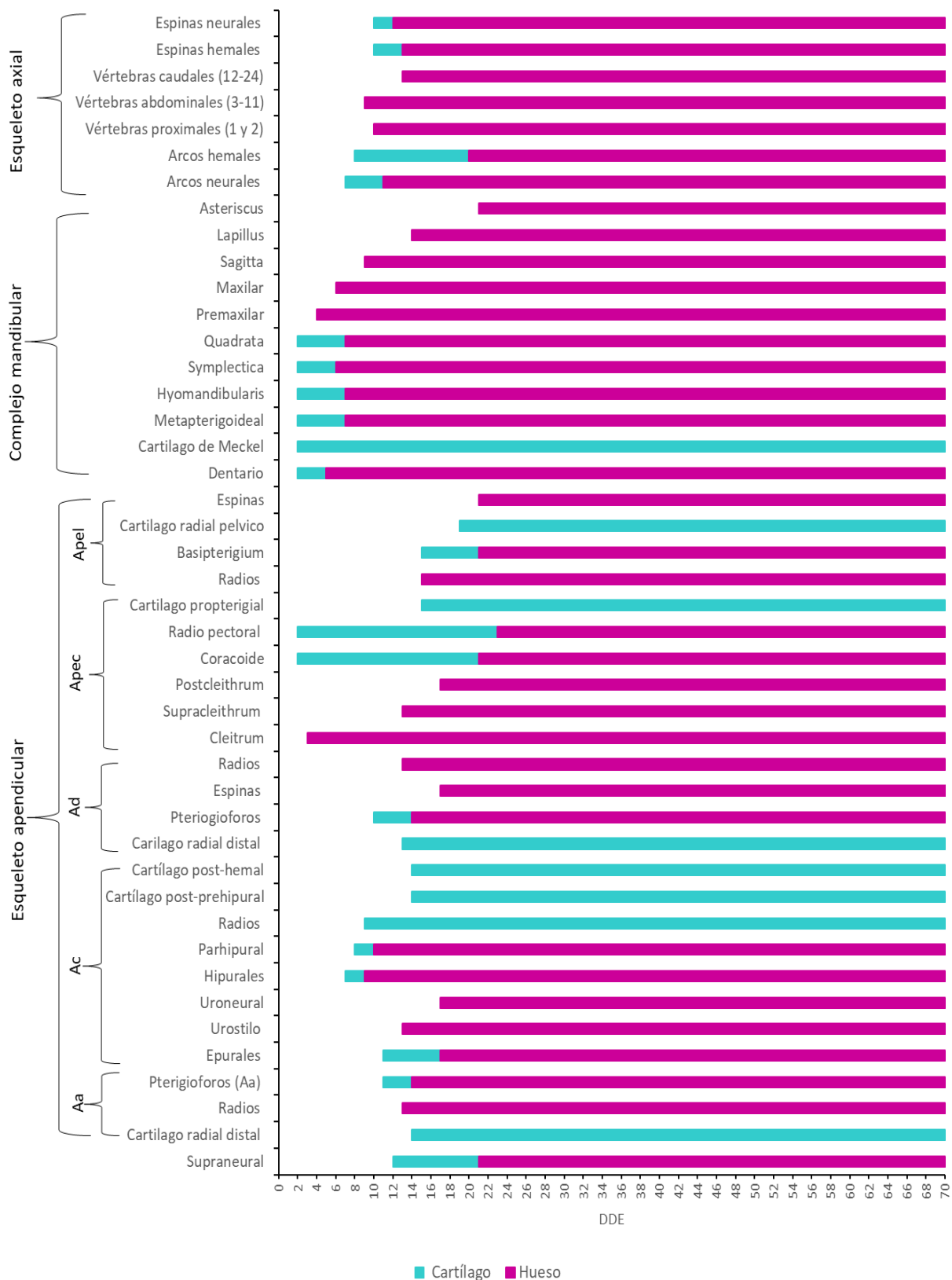


Figura 34. Secuencia del desarrollo esquelético y osificación de *Morone saxatilis* agrupado en esqueleto apendicular (Aa, aleta anal; Ac, aleta caudal; Ad, aleta dorsal; Apec, aleta pectoral; Apel, aleta pectoral), complejo mandibular y esqueleto axial.

Después de que se describió el desarrollo esquelético de *Morone saxatilis* que incluyó el esqueleto apendicular y axial así como el complejo mandibular, se observó que las primeras estructuras en formarse fueron las del complejo mandibular (Fig. 21) comenzando por el dentario (De), cartílago de Meckel (CM), metapterigoideal (Mpt), hyomandibularis (Hy), symplectica (Sy) y quadrata (Q), que están pasando por una fase cartilaginosa, lo que indica que el proceso de osificación es endocondral, esto mismo se repite con otras estructuras del esqueleto axial (espinas y arcos tanto neurales como hemales y el parhipural) y del esqueleto apendicular (Bp; basipterigium; R_{Pc}, radio pectoral; Co, coracoide; Pt, pterigióforos de la aleta dorsal y anal; Ph, parhipural; H, hipurales; Ep, epurales), a diferencia del premaxilar (Pmx), maxilar (Mx), columna vertebral, otolitos, radios de todas las aletas, postcleitrum (Pcl), supracleithrum (Scl), espinas (E), uroneural (Ur) y el urostilo (U), que tienen una osificación intramembranosa, esto quiere decir que directamente se formó el hueso.

Se observó que al finalizar el proceso de osificación algunas estructuras se mantuvieron en su forma cartilaginosa, como son las uniones que se encuentran entre los radios y los pterigióforos de las aletas pectorales, pélvicas (Fig. 11-B5 y C5), dorsal, anal y caudal (Fig. 20-B3, C3 y E3), así como la región media de las espinas y los pterigióforos de las aletas dorsal y pélvicas. En la región de la mandíbula se mantuvo el cartílago de Meckel y el cartílago rostral, mientras que en la región del cráneo se encontró la permanencia del cartílago escleral (Fig. 11-A5).

3.3 Prevalencia de malformaciones

Para el análisis de la prevalencia de las malformaciones se optó por realizar una primera clasificación considerando todas las edades, y se dividieron en dos grupos, la aparentes y no aparentes (pero visibles con el proceso de transparentación y doble tinción). Una segunda clasificación se hizo de acuerdo con la ubicación anatómica de la malformación, ya sea que estuviera en el cráneo/mandíbula, notocorda/columna o en las aletas (pares o impares).

En la tabla 4 se puede observar que las malformaciones aparentes que tuvieron mayor prevalencia en la lobina rayada fueron las de columna vertebral, ya sean cifosis, lordosis o escoliosis o algún otro tipo de desviación en la columna vertebral o notocorda que no corresponde a los tres tipos antes mencionados. El mayor porcentaje de malformaciones de columna se observó en la edad de 70 DDE con un 56%, afectando la región caudal. En contraste, a los 157 DDE no se observó esta anomalía (0%) (Fig. 22) lo que podría significar que pueden ser malformaciones difíciles de detectar a simple vista.

Para las malformaciones en el cráneo y/o mandíbula, solo se registraron tres organismos, uno a los 50 DDE que corresponde al 2% de la muestra y 2 a los 157 DDE que representan el 1.96%. Las malformaciones menos comunes para esta muestra de lobina rayada fueron las de aletas, en este caso se presentaron en las aletas pectorales y en la dorsal, siendo tan solo el 4% de la muestra de organismos de 17 DDE.

Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de malformaciones aparentes en lobina rayada (*Morone saxatilis*) en un cultivo comercial.

| DDE | N | Cráneo | % | Columna/Notocorda | % | Aletas | % |
|-----|-----|--------|------|-------------------|----|--------|---|
| 1 | 50 | - | | 6 | 12 | - | |
| 2 | 50 | - | | 5 | 10 | - | |
| 3 | 50 | - | | 10 | 20 | - | |
| 4 | 50 | - | | 5 | 10 | - | |
| 5 | 50 | - | | 7 | 14 | - | |
| 6 | 50 | - | | 7 | 14 | - | |
| 7 | 50 | - | | 24 | 48 | - | |
| 8 | 50 | - | | 21 | 10 | - | |
| 9 | 50 | - | | 16 | 32 | - | |
| 10 | 50 | - | | 12 | 24 | - | |
| 11 | 50 | - | | 4 | 8 | - | |
| 12 | 50 | - | | 16 | 32 | - | |
| 13 | 50 | - | | 15 | 30 | - | |
| 14 | 50 | - | | 5 | 10 | - | |
| 15 | 50 | - | | 11 | 22 | - | |
| 17 | 50 | - | | 8 | 16 | 2 | 4 |
| 19 | 50 | - | | 6 | 12 | - | |
| 21 | 50 | - | | 12 | 24 | - | |
| 23 | 50 | - | | 2 | 4 | - | |
| 25 | 50 | - | | 3 | 6 | - | |
| 27 | 50 | - | | 7 | 14 | - | |
| 29 | 50 | - | | 12 | 24 | - | |
| 31 | 50 | - | | 8 | 16 | - | |
| 40 | 50 | - | | 4 | 8 | - | |
| 50 | 50 | 1 | 2 | 15 | 30 | - | |
| 70 | 50 | | | 27 | 54 | | |
| 157 | 102 | 2 | 1.96 | 0 | 0 | - | |

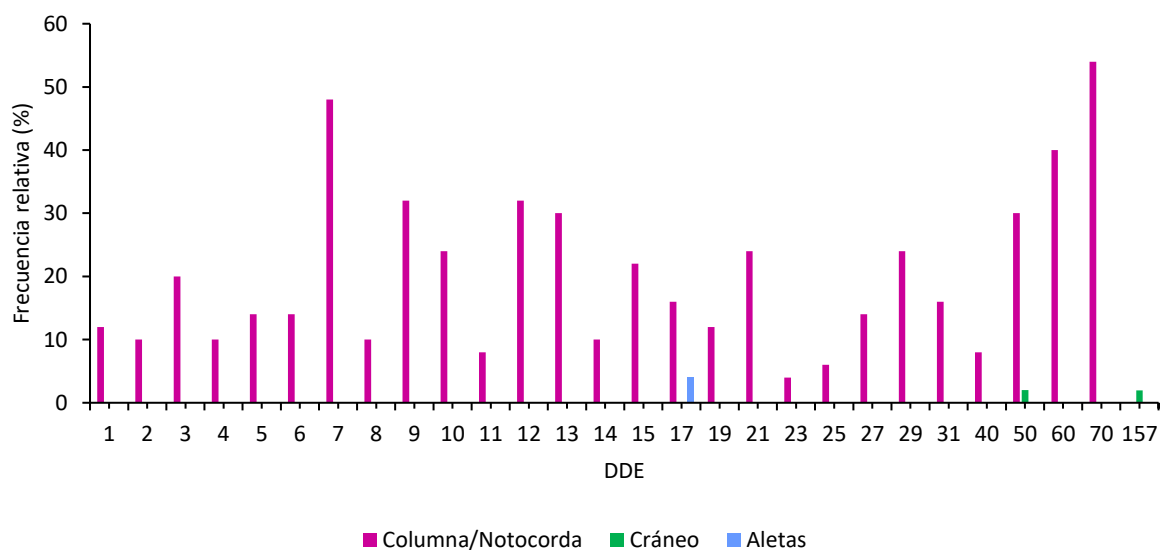


Figura 35. Frecuencia de malformaciones aparentes en lobina rayada, *Morone saxatilis*

En la tabla 5 se presentan las malformaciones no aparentes (después de la transparentación y doble tinción), las cuales tuvieron mayor prevalencia en el esqueleto axial. Específicamente, las vértebras 16 a la 22, presentaron una ligera compresión (Fig. 23-A), que a su vez afecta la morfología tanto del arco neural como el arco hemal, esta anomalía se observó en el 48% de los 50 organismos de 70 DDE analizados (Fig. 24). En lobinas de 15 DDE esta malformación solo se presentó en 1 de 13 ejemplares, lo que equivale a un 7.6% para este grupo de edad, en este mismo grupo de observó una afectación en las vértebras anteriores ocasionado por una alteración de la vejiga gaseosa.

En cuanto a otras anomalías no aparentes, se presentaron arcos neurales abiertos en todas las muestras a partir del día 12 DDE cuando el grado de desarrollo fue mayor (Fig. 25-C). Esta malformación se detectó en 186 de 196 lobinas, en promedio al menos 13 lobinas de cada edad superiores a los 14 DDE presentaron esta malformación, con un porcentaje total del 94%.

En las lobinas de edad superiores a los 14 DDE, las espinas neurales también se observaron con bifurcación, a partir de esta edad el desarrollo de esta estructura está más avanzado. De 161 organismos 153 presentaron esta malformación, con un promedio de 13 lobinas rayadas por edad, esto representó un porcentaje total de 95%.

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de malformaciones óseas no aparentes en lobina rayada (*Morone saxatilis*), en un cultivo comercial.

| DDE | N | Arcos neurales abiertos | % | Espinas neurales bifurcadas | % | Vértebras | % | Aletas | % |
|-----|----|-------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------|-----|--------|------|
| 12 | 18 | 16 | 88.88 | | | | | | |
| 13 | 17 | 15 | 88.23 | | | | | | |
| 14 | 15 | 14 | 93.33 | 7 | 46.66 | | | | |
| 15 | 13 | 12 | 92.3 | 4 | 30.76 | 1 | 7.6 | | |
| 17 | 20 | 17 | 85 | 9 | 45 | | | | |
| 19 | 21 | 12 | 57.14 | 7 | 33.33 | | | | |
| 21 | 22 | 15 | 68.18 | 3 | 13.63 | | | | |
| 23 | 18 | 11 | 61.11 | 10 | 55.55 | | | | |
| 25 | 16 | 11 | 68.75 | 14 | 87.5 | | | | |
| 27 | 30 | 19 | 63.33 | 19 | 63.33 | | | 2 | 6.66 |
| 29 | 22 | 9 | 40.9 | 14 | 63.64 | | | 1 | 4.54 |
| 31 | 18 | 10 | 55.55 | 9 | 50.00 | | | | |
| 40 | 22 | 7 | 31.81 | 15 | 68.18 | | | | |
| 70 | 50 | 16 | 32 | 42 | 84.00 | 24 | 48 | | |

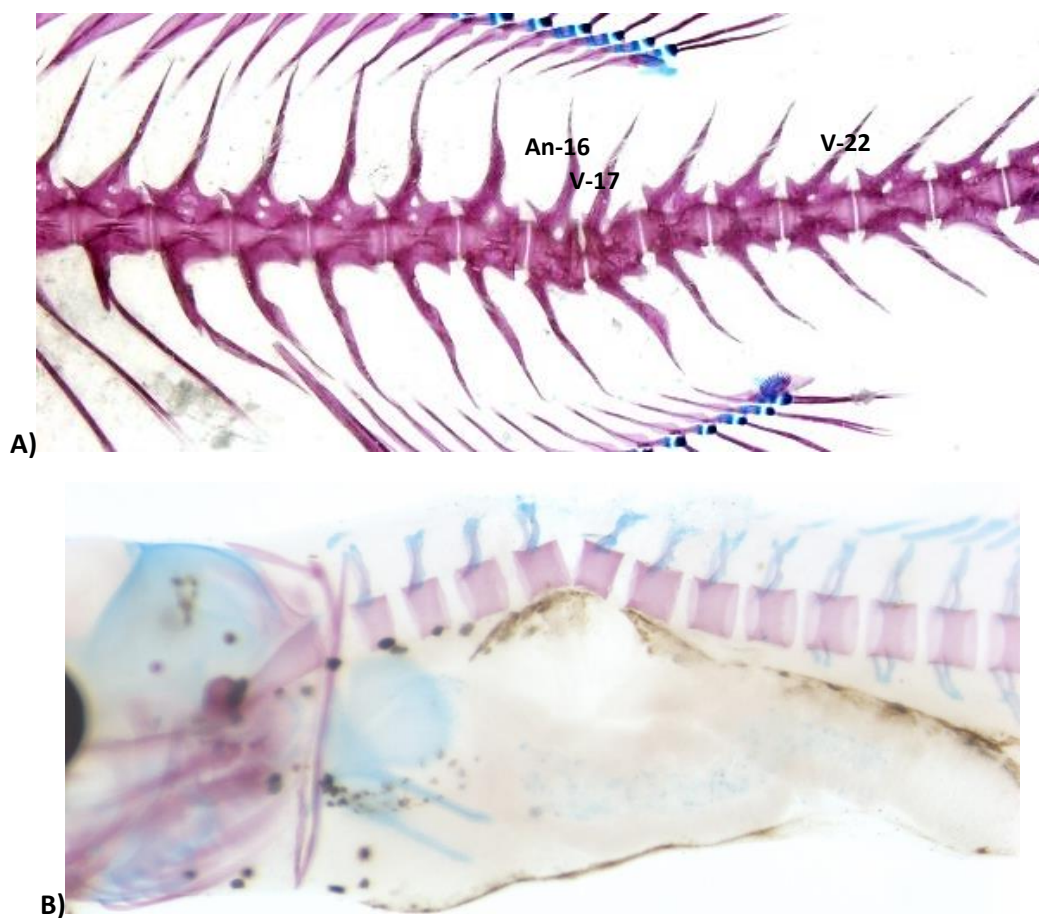


Figura 36. A) Compresión vertebral en un organismo de 70 DDE y B) Cifosis en un organismo de 15 DDE. An, arco neural; V, vértebra.

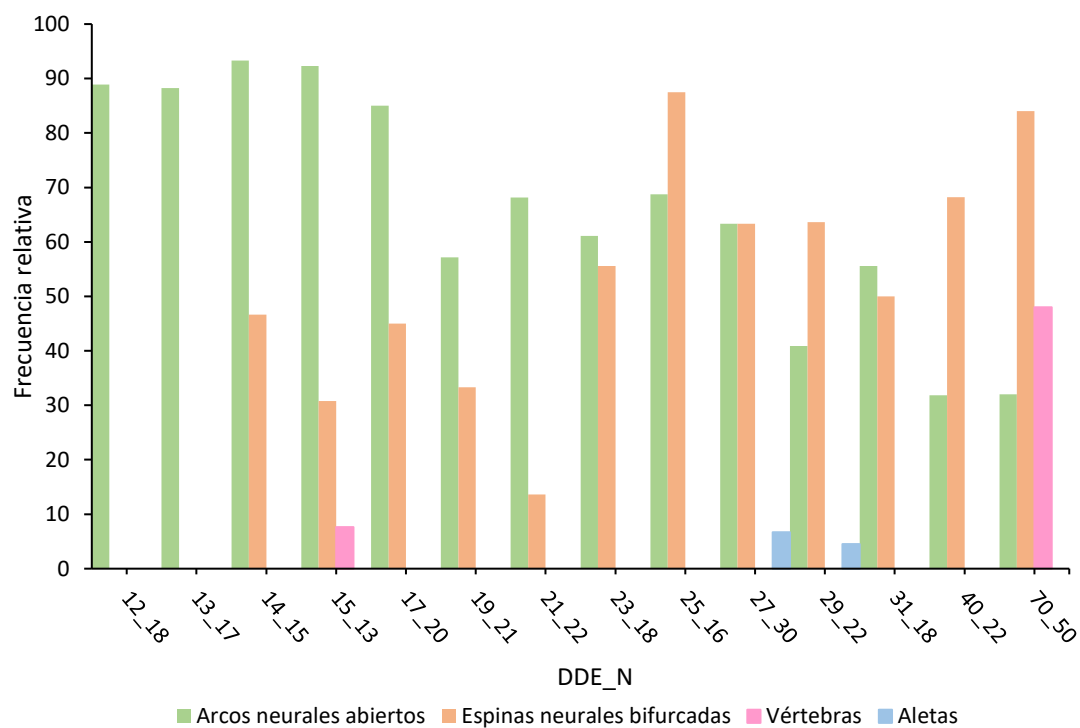


Figura 37. Prevalencia por clase de edad (DDE) de las malformaciones óseas en lobina rayada (*Morone saxatilis*).

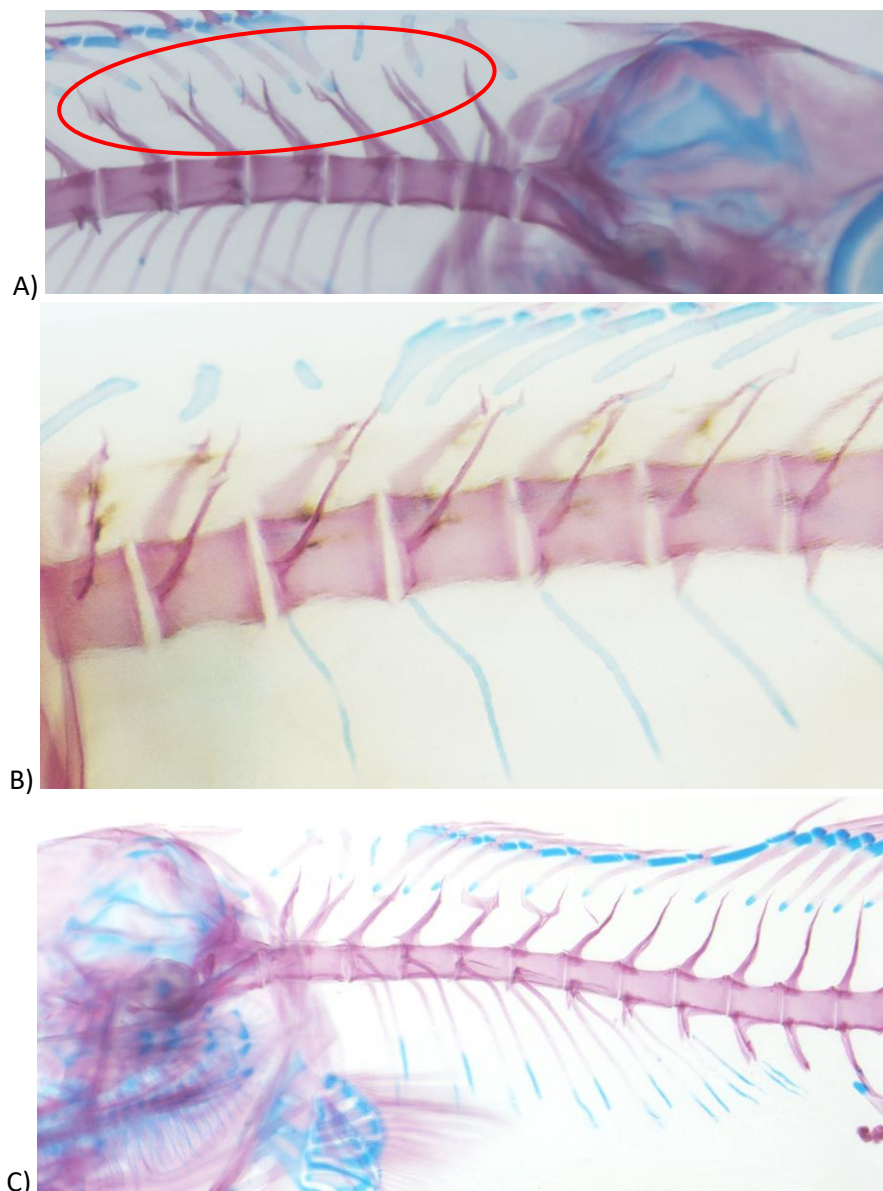


Figura 38. Malformación de arcos y espinas neurales abiertas en lobina rayada (*Morone saxatilis*)

La doble tinción también permitió observar malformaciones, de las aletas pares e impares, aunque en este caso solo se observaron anomalías en organismos de 27 y 29 DDE, específicamente en los pterigióforos de la aleta anal, que presentaron una forma de Y (Fig. 26), a diferencia de los pterigióforos normales que no están bifurcados y tienen una forma ligeramente curvada que se dispone en forma paralela a las espinas hemales. Para la edad de 27 DDE esta malformación representó el 6.66% de una muestra de 30 lobinas y para los 29 DDE la prevalencia fue del 4.54% para un total de 22 organismos.

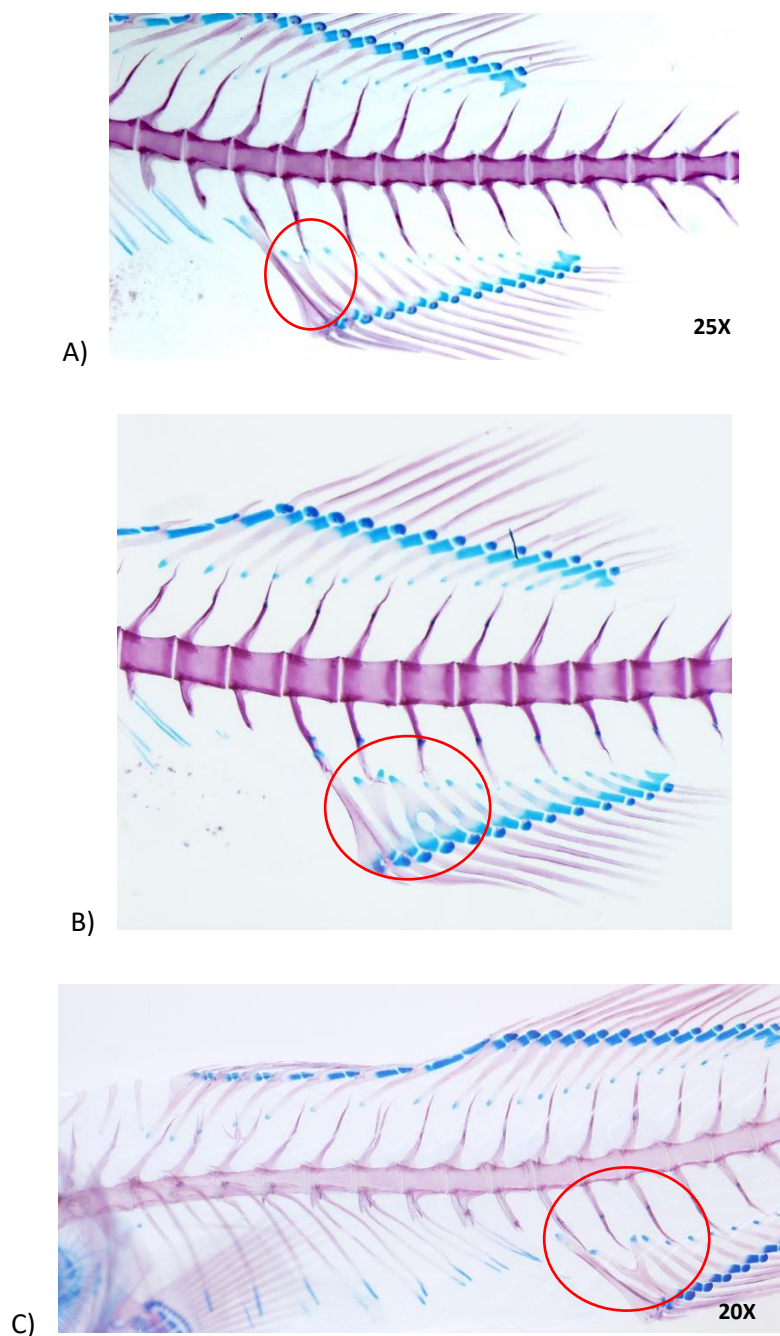


Figura 39. Malformaciones en los pterigióforos de la aleta anal de la lobina rayada (*Morone saxatilis*). A) 27 DDE y B) 29 DDE.

3.4 Morfometría geométrica (MG)

La MG ayudó a identificar, reconocer y diagnosticar malformaciones que son difíciles de percibir a simple vista, ya que este análisis tiene un alto grado de sensibilidad ante cualquier cambio en los puntos anatómicos de anclaje (landmarks y semilandmarks), identificados en la morfología de los organismos.

Para este análisis se consideraron los peces de 19, 21, 23, 25, 27 y 70 DDE, tomando en consideración el número de malformaciones aparentes que se encontraron en la primera clasificación (Tabla 5).

Con el fin de ubicar los organismos que previamente se habían identificado con alguna malformación se señalaron con un punto rojo en el gráfico que arrojó el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Además, para cada edad se seleccionaron las gradillas de deformación de organismos que se encontraban más alejados del centro, para cada componente y cada eje (positivo y negativo), se hizo una comparación de las gradillas con organismos procesados por la doble tinción y transparentación, es importante mencionar que el ejemplar ya procesado no corresponde al observado en la gradilla, ya que no se utilizó ningún método de marcaje para diferenciarlos durante la transparentación y doble tinción

que no es específicamente el organismo solo es un representante de esa malformación más no el ejemplar, solo se utilizó la forma como método de selección ya que no se utilizó ningún método de marcaje para diferenciar a los organismos.

En la muestra analizada de **19 DDE** (Fig. 27), la cual estuvo compuesta de 40 organismos, se pudo observar en el PCA que 5 de 7 organismos previamente catalogados como malformados se ubicaron en los cuadrantes negativos, tanto del componente 1 como del componente 2, mientras que los organismos con anomalías restantes se ubicaron, uno en la región positiva del componente 2 y la negativa del componente 1, mientras que el otro se ubicó en la región opuesta. En tanto que los organismos considerados como normales se distribuyeron a lo largo del componente 2 y ligeramente abarcando el componente 1.

En el componente 1, el cual expresa un 73% de la variación, mostró en la gradilla de deformación variación morfológica de la región dorsoventral; mientras que el componente 2 solo representa 13.63% de la variación, mostró variación en la morfología del pedúnculo caudal. Ambos componentes acumularon un porcentaje del 86.36 % de variación total.

Específicamente para cada componente y eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

En eje positivo (Fig. 28-B1) la gradilla de deformación mostró cambios en la región dorsoventral ya que los organismos presentaron una forma cóncava, mientras que en el eje negativo se observó un comportamiento inverso (convexa) (Fig. 28-B2)

Componente 2

En el eje negativo el pedúnculo caudal es más alargado (Fig. 28-C1), mientras que en el eje positivo hay una ligera compresión (Fig. 28-C2), por lo tanto, esta región se acorta.

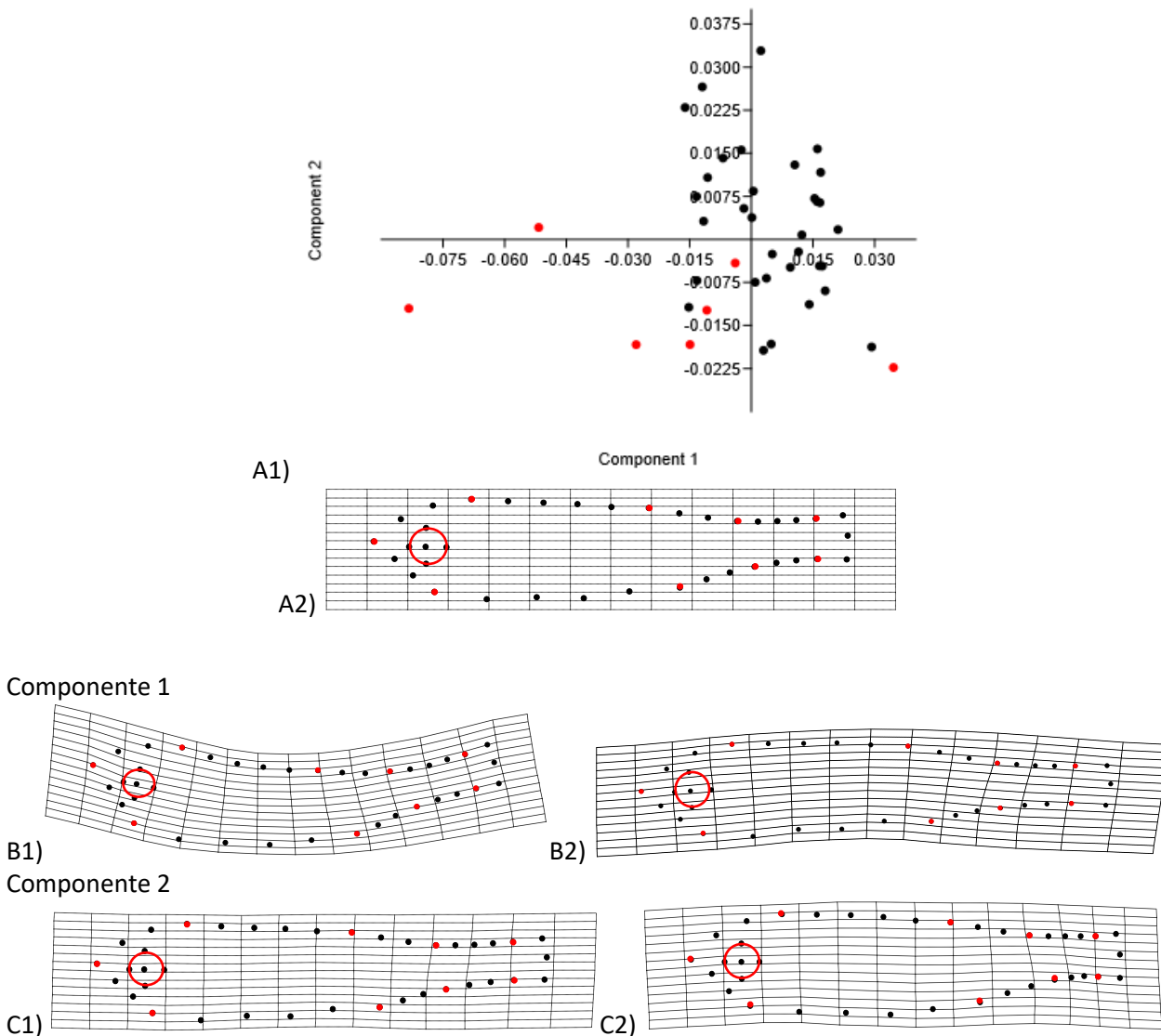


Figura 40. Análisis de componentes principales (PCA) y gradillas para lobina rayada con una edad de 19 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

Complementando esta técnica con la transparentación y doble tinción se pudo hacer un mejor diagnóstico de algunas malformaciones como se describen en el siguiente organismo (Fig. 29) donde en la MG no se

observa un cambio tan evidente, pero al realizar la transparentación y doble tinción se pudo observar una ligera desviación en las vértebras anteriores.

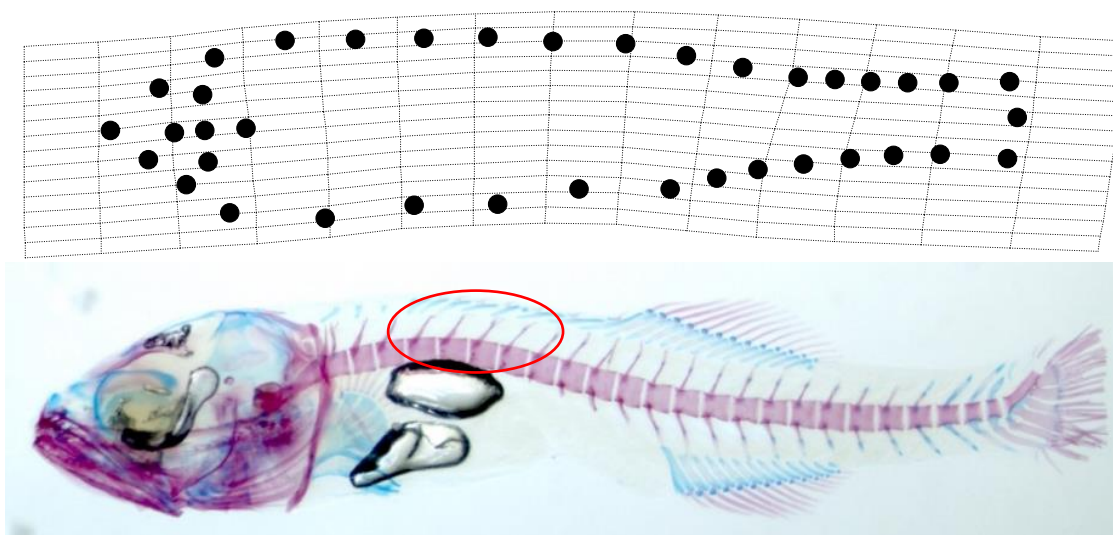


Figura 41. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 19 DDE.

En organismos pertenecientes a la muestra de **21 DDE**, el PCA arrojó los siguientes resultados, comenzando por la distribución de los organismos en el PCA, en el cual se observó que de los 16 organismos señalados como malformados el 37.5% se distribuyeron en la zona inferior del gráfico de PCA, mientras que el 56.25% se encuentra en la parte superior y solo el 6.25% se encuentra sobre la línea del eje negativo del componente 1. El resto de los organismos se distribuyeron en los cuatro cuadrantes tendiendo más hacia el centro del gráfico (Fig. 29-A1). Para este grupo el componente 1 expresa la variación morfológica con un 65.49%, mientras que el componente 2 solo un 8.10%, teniendo un porcentaje acumulado del 73.59%. Específicamente para cada componente y eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

En el eje positivo (Fig. 29-B1) la gradilla de deformación mostró alteraciones en la región dorsoventral tomando una forma cóncava, mientras que en el eje negativo se observó un comportamiento inverso (convexo) (Fig. 29-B2).

Componente 2

En este componente las variaciones morfológicas se observaron en la zona del pedúnculo caudal, en el eje positivo (Fig. 29-C1) los organismos presentaron un acortamiento, mientras que en el eje negativo (Fig. 29-C2) los organismos presentan un pedúnculo caudal más largo, esto quiere decir que no hay compresión vertebral o alguna otra anomalía que pueda alterar su morfología.

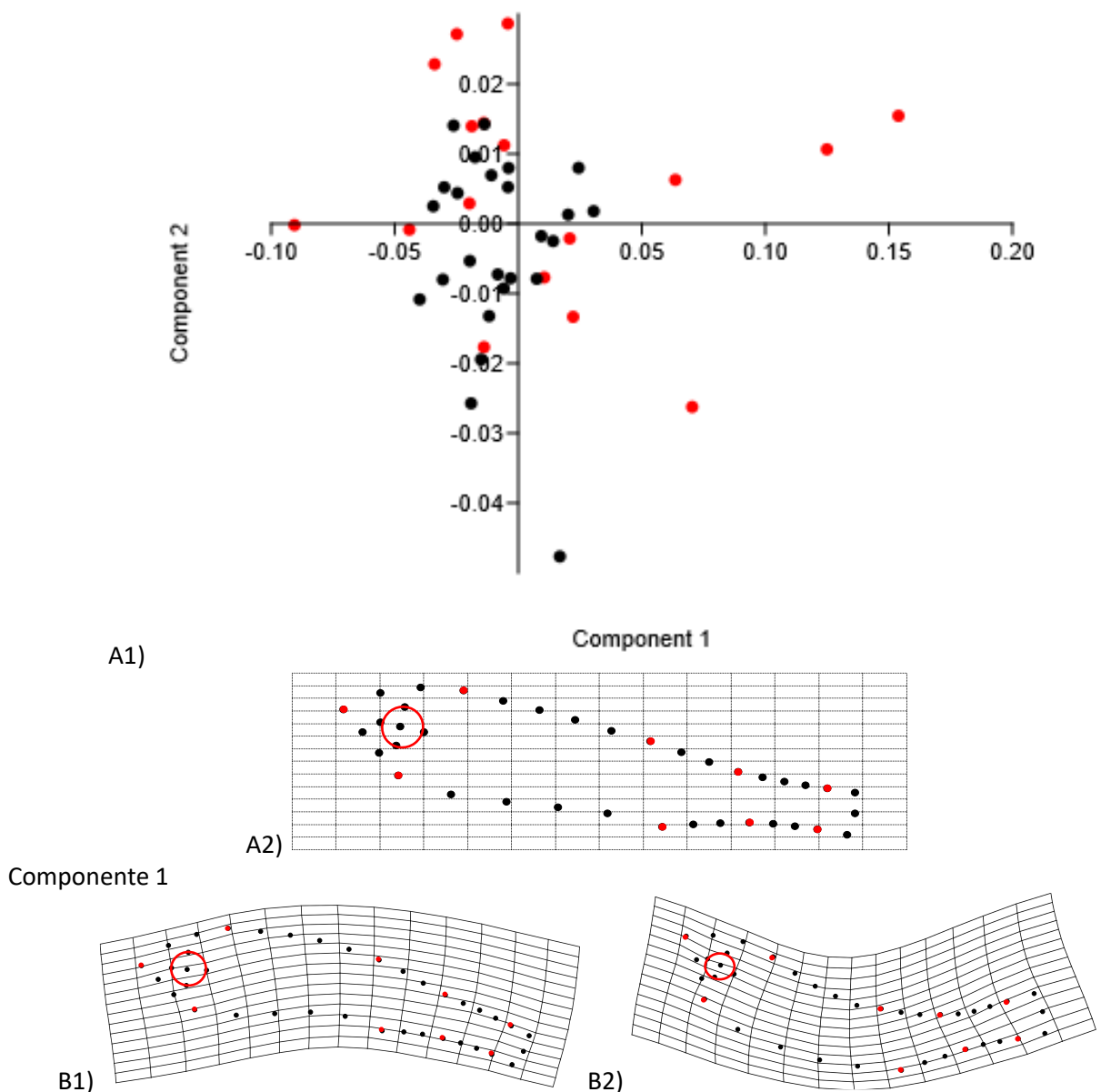


Figura 42. Análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 21 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

Componente 2

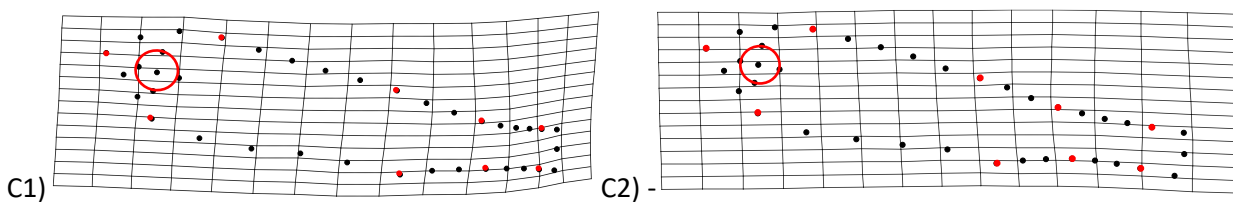


Figura 43 (Continuación). Análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 21 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

Complementando el análisis de la MG con la transparentación y doble tinción, se pudo apreciar que las malformaciones de columna vertebral como la escoliosis (Fig. 30-A) también pudieron ser detectadas con esta técnica morfométrica. Algunas curvaturas de columna son fáciles de detectar a simple vista y con la MG se pudo localizar en que región del cuerpo se localiza y la gravedad de estas anomalías, pero la técnica de doble tinción ayudó a localizar y nombrar con mayor precisión las estructuras involucradas o en este caso las vértebras que se vieron afectadas, como sucedió con el organismo que ejemplifica la alteración morfológica del componente 1 en el eje negativo. (Fig. 30-B)

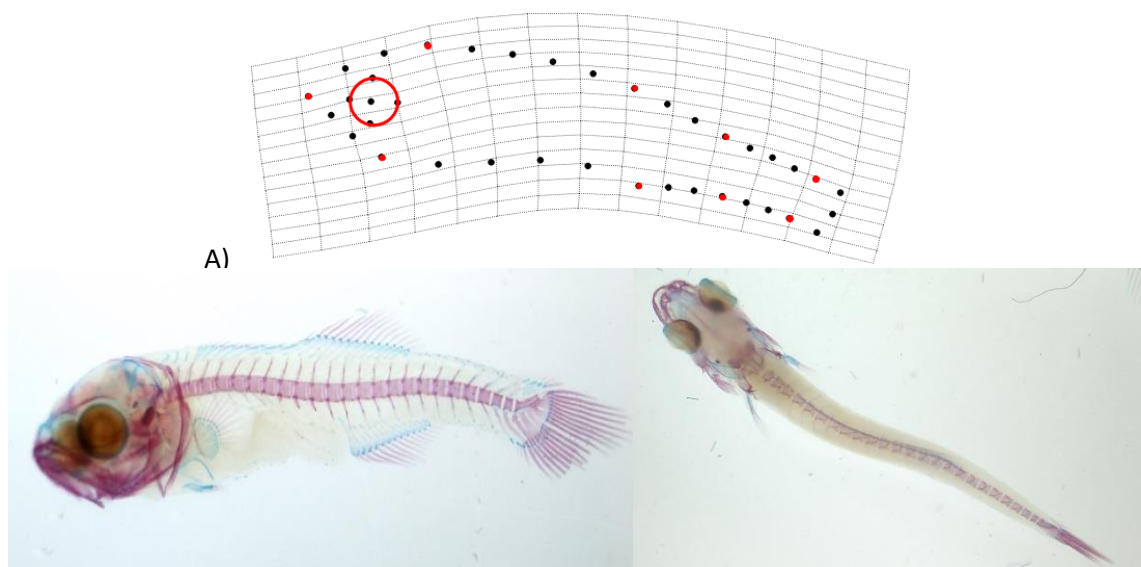


Figura 44. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 21 DDE.

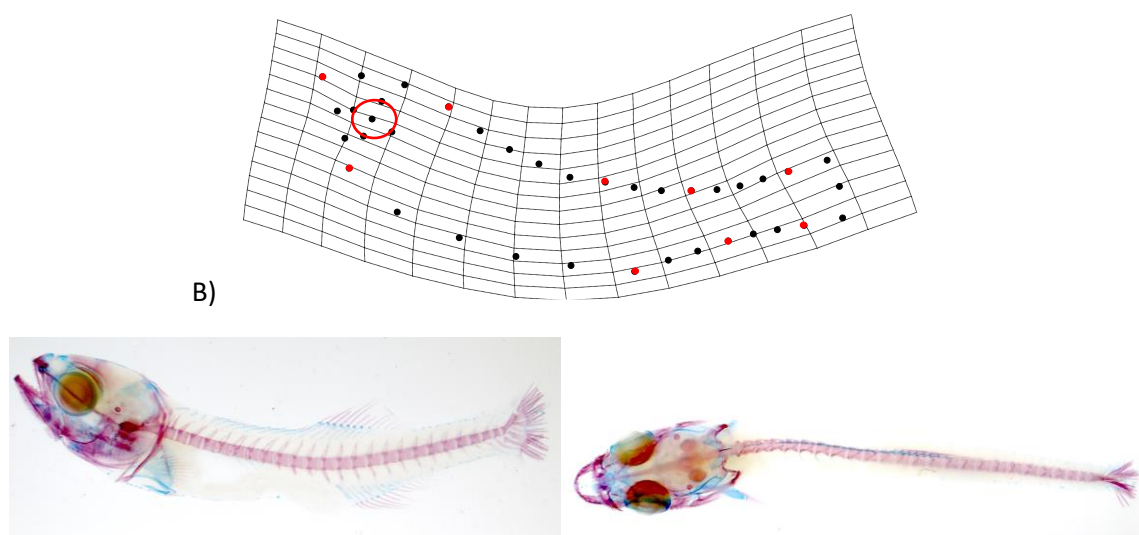


Figura 45 (Continuación). Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 21 DDE.

Para organismos con una edad de 23 DDE el análisis de morfometría geométrica y componentes principales, arrojó los siguientes resultados, comenzando por la distribución de los organismos en el PCA, en el cual se observó que de las 11 lobinas rayadas que presentaron alguna malformación el 45.45% se encuentra en la región inferior del gráfico de PCA y el 54.54% en la parte superior, en tanto que los demás organismos considerados como normales no presentaron un patrón específico de distribución ya que se encontraron dispersos en todo el gráfico.

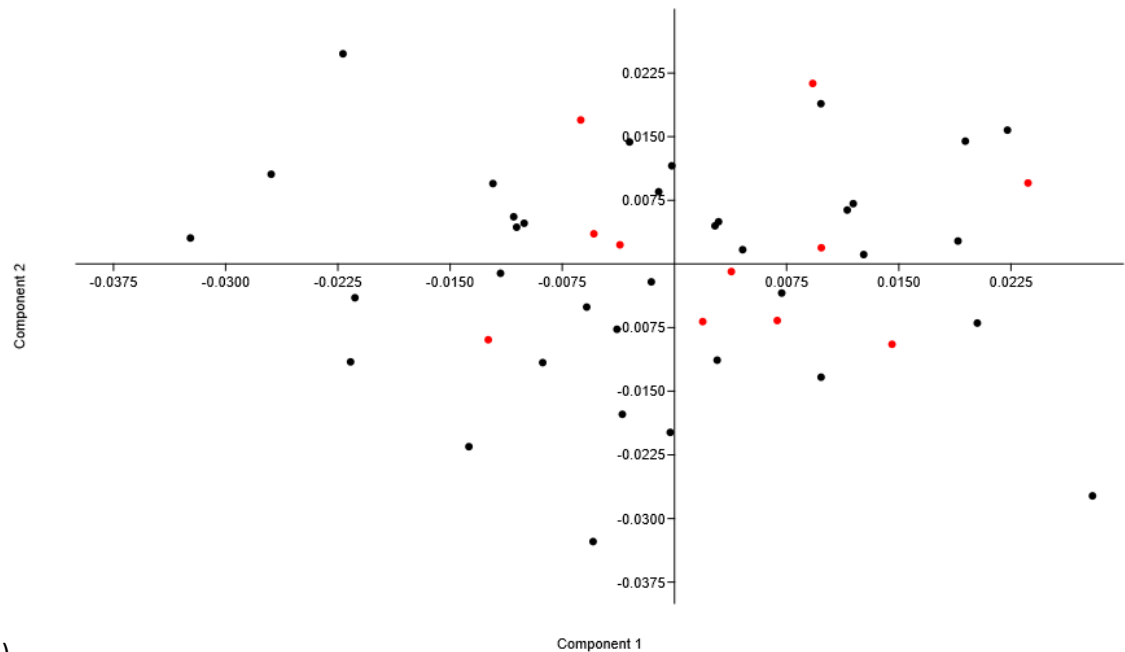
Para este grupo se observó que el componente 1 solo explicó el 21.20% de la variación, mientras que el componente 2 tuvo un porcentaje del 17.59%, en este caso se reportaron 4 componentes ya que fue ahí donde el acumulado alcanzó un porcentaje $>60\%$, el último componente que se reportó aportó un 10.07% a la variación. Específicamente para cada componente y eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

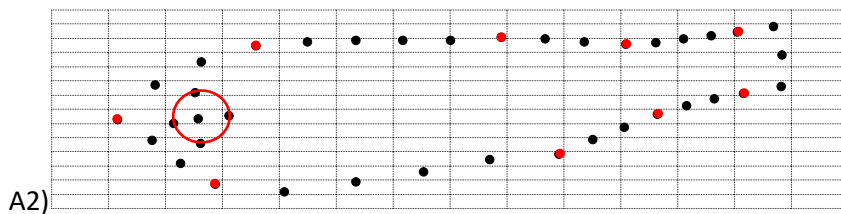
En el eje positivo se observó una deformación en la región que comprende las aletas dorsal y anal, en el eje negativo (Fig. 31-B1) el organismo más alejado del centro tuvo una ligera compresión en la zona antes mencionada, mientras que el eje positivo (Fig. 31-B2) tuvo un comportamiento inverso, pero a la vez se presentó una ligera curvatura de la columna.

Componente 2

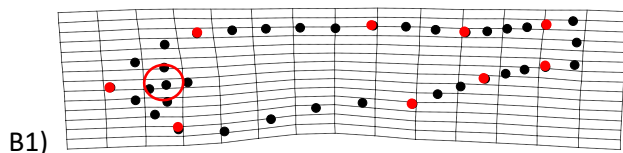
La gradilla mostró cambios morfológicos en el pedúnculo caudal, así como en la región dorsoventral, en el eje negativo (Fig. 31-C1) se observó una compresión que abarca desde el inicio de la aleta dorsal radiada hasta donde se encuentra el supraoccipital, mientras que en el eje positivo se observó un comportamiento inverso, pero además de esto se pudo detectar una ligera compresión del pedúnculo caudal a comparación con el organismo que ejemplifica el comportamiento del eje negativo.



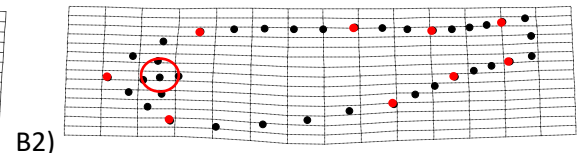
A1)



A2)



B1)



B2)

Figura 46. Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 23 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

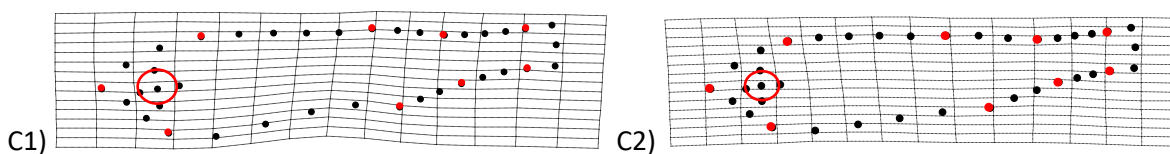


Figura 47 (Continuación). Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 23 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

Para esta edad, al igual que el grupo de 19 DDE, hubo varios organismos que presentaron escoliosis, la cual también fue detectada por la MG tanto en el componente 1 como en el 2, por esta razón presentaron una ligera malformación en la región dorsoventral como se observa en las gradillas (Fig. 32-A,B), la cual con la transparentación y doble tinción no se percibió como una anomalía, pero con la MG se observó una desviación en la región de la aleta dorsal y anal, así como una compresión ligera de las vértebras posteriores.

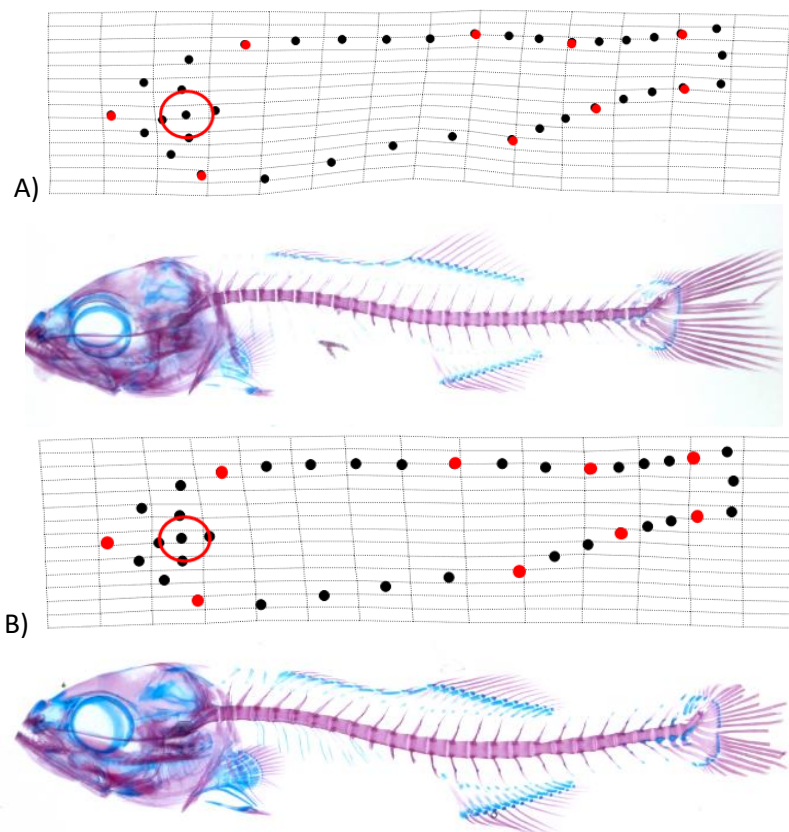


Figura 48. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 23 DDE.

En el grupo que comprenden a organismos de 25 DDE se encontró el siguiente comportamiento, tanto para la técnica de morfometría geométrica como para el análisis de componentes principales. Comenzando por la distribución de los organismos en el gráfico del PCA (Fig. 33-A1), donde se observó que de los 4 organismos identificados con alguna malformación, el 75 % se encontró en el cuadrante (C1+, C2-) y el 25 % en el cuadrante contrario, en esta muestra es importante destacar que se localizó otro organismo con malformación con tendencia hacia el componente 2, que no se detectó en la primera clasificación, mientras que los organismos considerados como normales aparentemente se agruparon en una franja alrededor del eje del componente 1 y en menor cantidad en el componente 2.

En cuanto a los porcentajes obtenidos del PCA para este conjunto de datos, donde el componente 1 explica la variación morfológica con un 27.31 %, en este caso también se reportaron 4 componentes ya que ahí fue donde el porcentaje acumulado superó el 60 %, siendo este último componente el que aportó un 8.17 % a la variación. Específicamente para cada componente y eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

En este componente se observó que la región donde hubo mayor deformación fue la dorsoventral que involucró las últimas vértebras anteriores y las vértebras medias, en el eje negativo (Fig. 33-B1) se pudo observar cómo los organismos adquieren una forma ligeramente convexa, mientras que en el eje positivo es lo contrario, teniendo una forma ligeramente cóncava, donde además se puede apreciar una compresión dorsoventral.

Componente 2

En este componente las deformaciones se centraron en la misma región que el componente 1, en el eje negativo (Fig. 33-C1) se observó que los organismos presentaron una forma más cercana al promedio con una ligera curvatura en la región dorsal, mientras que en el eje positivo (Fig. 33-C2) hay una compresión de la región dorsoventral y tienden a una forma más alargada comparado con el eje negativo donde son más anchos que largos.

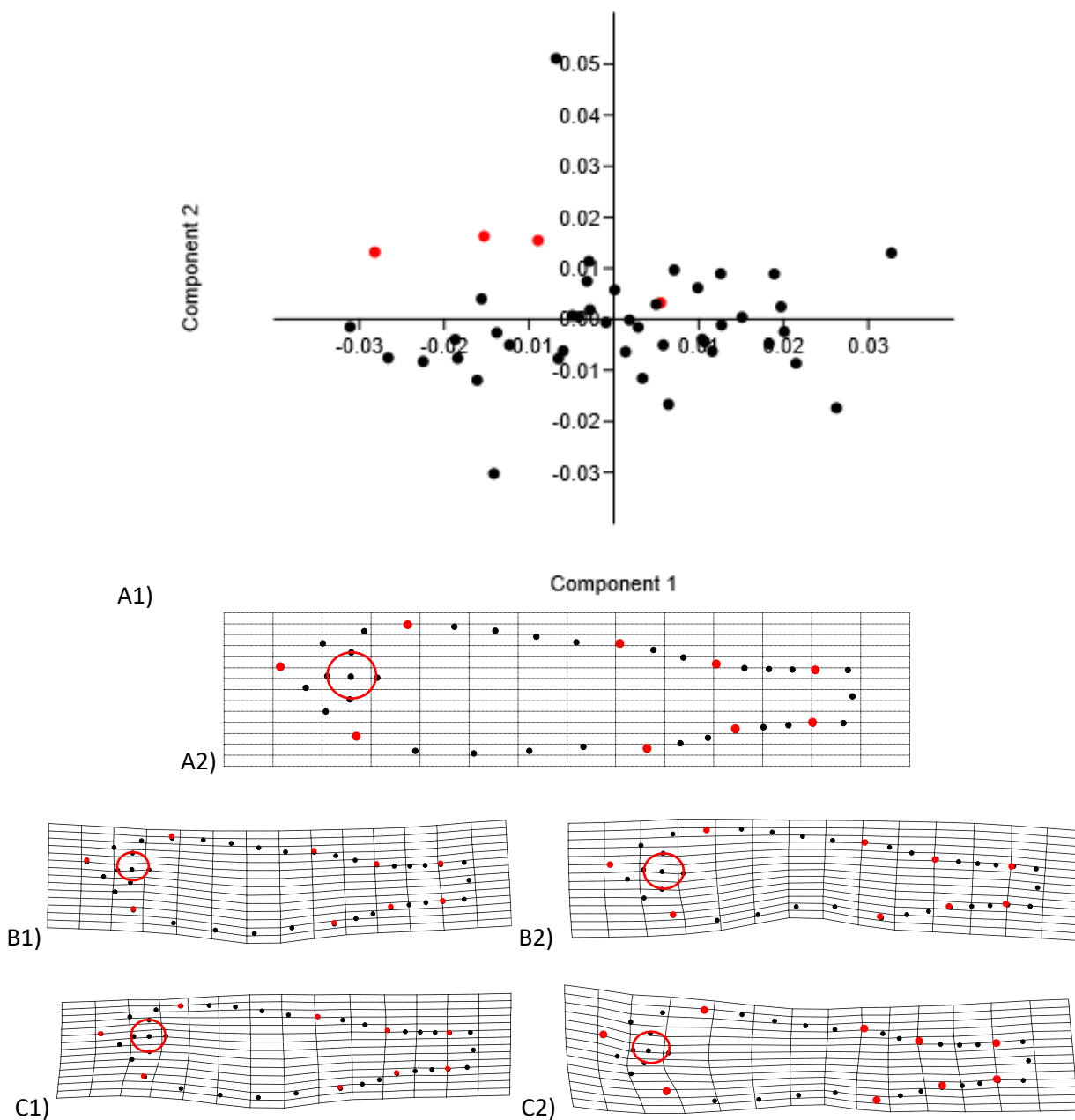


Figura 49. Análisis de componentes principales (PCA) y gradillas para lobina rayada con una edad de 25 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

En esta edad se repitió el comportamiento de los grupos anteriores, donde la escoliosis fue una de las malformaciones que más prevaleció, y teniendo en cuenta que la forma que tomaron los organismos con esta anomalía es como S, es posible que no fuera detectada con la MG, pero como se muestra en la Fig. 34- A, B y C, presentaron una curvatura sutil, pero detectable para esta técnica, así como pequeñas

variaciones morfológicas en la aleta caudal que a simple vista se pudieron considerar como la forma promedio pero con la doble tinción y transparentación se pudo apreciar mejor.

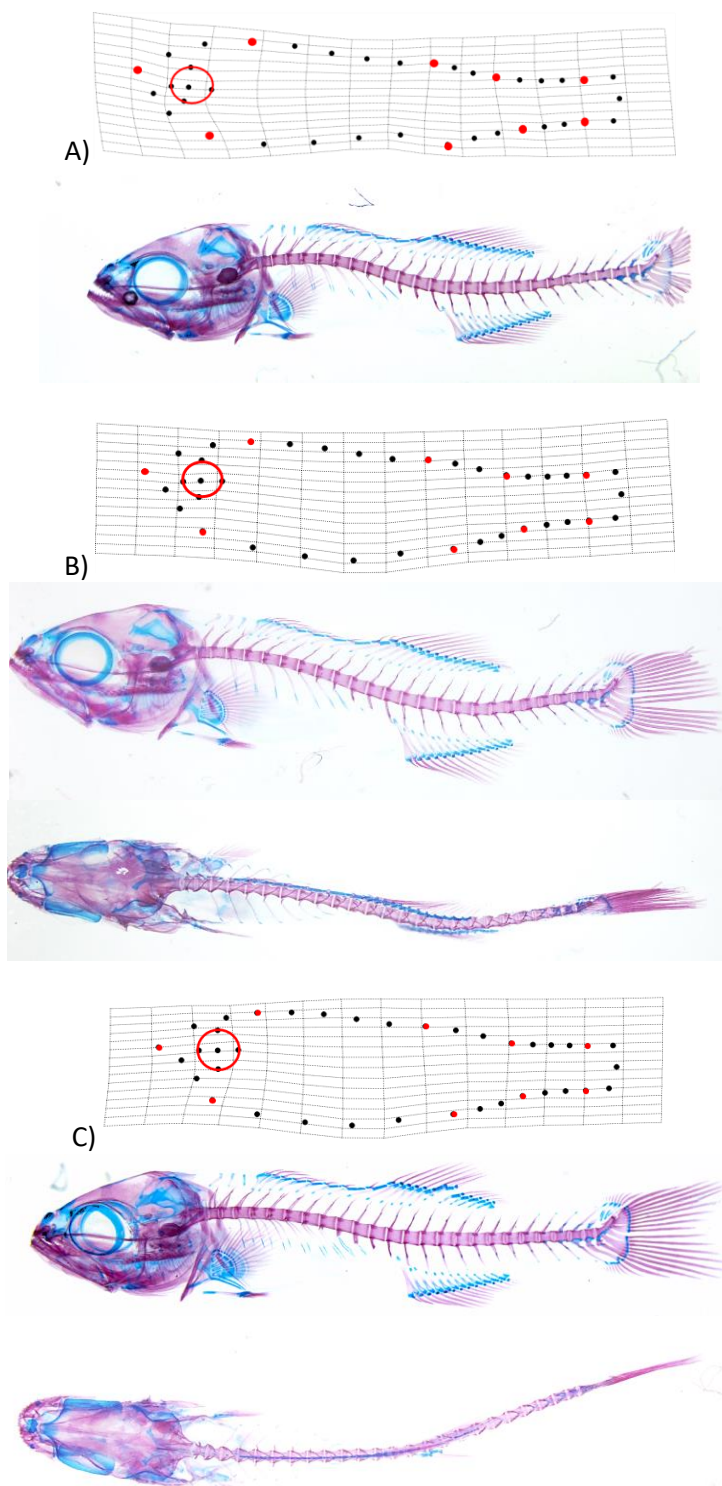


Figura 50. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 25 DDE.

En el grupo de lobina rayada de 27 se obtuvieron los siguientes resultados, comenzando por la distribución de los organismos en el gráfico que arrojó el PCA (Fig. 35-A1), donde de los nueve organismos que se clasificaron con alguna malformación el 44.44% se ubicó en la parte inferior de la gráfica, así como en la superior, mientras que solo el 11.11% se posicionó sobre el eje del componente 1 en la región positiva, en cuanto a los organismos considerados como normales se observó una concentración en el centro del gráfico y algunos más dispersos que posiblemente fueron organismos que aparentemente no se pudieron clasificar con alguna malformación.

En cuanto a los porcentajes que se obtuvieron del PCA para este conjunto de datos, donde el componente 1 explicó la variación morfológica con un 35.23%, para esta edad se reportó hasta el componente 3 con un porcentaje del 9.92%, con lo que se obtuvo un acumulado fue del 62.86%. Específicamente para cada componente y eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

Los organismos que se encuentran cerca del eje negativo (Fig. 35-B1) presentaron una forma ligeramente cóncava, mientras que en el eje positivo tuvieron un comportamiento inverso, esto quiere decir una forma convexa (Fig. 35-B2).

Componente 2

De acuerdo con las gradillas de deformación se puede decir que los organismos que se encuentren en la región del eje negativo mostraron una pequeña alteración en la región que comprende del supraoccipital hasta el inicio de la aleta dorsal radiada (Fig. 35-C1), además de que tienen una forma más delgada, a diferencia de los que se encuentran cerca o sobre el eje positivo (Fig. 35-C2) que son más anchos.

A pesar de que las malformaciones que se encontraron en esta edad son evidentes, se pudo hacer una mejor clasificación con ayuda de la transparentación y doble tinción (Fig. 36-A), ya que con la MG solo se observó que era una curvatura de la columna, pero al complementar las dos técnicas se clasificó como escoliosis ubicada en la región caudal. Lo mismo se demostró con un organismo que se encontraba dentro de los cuadrantes del componente 1, por lo que morfológicamente la anomalía no era tan grave, pero después de la transparentación y doble tinción se observó como la aleta caudal tuvo una ligera desviación y eso podría causar otras afectaciones en su desempeño.

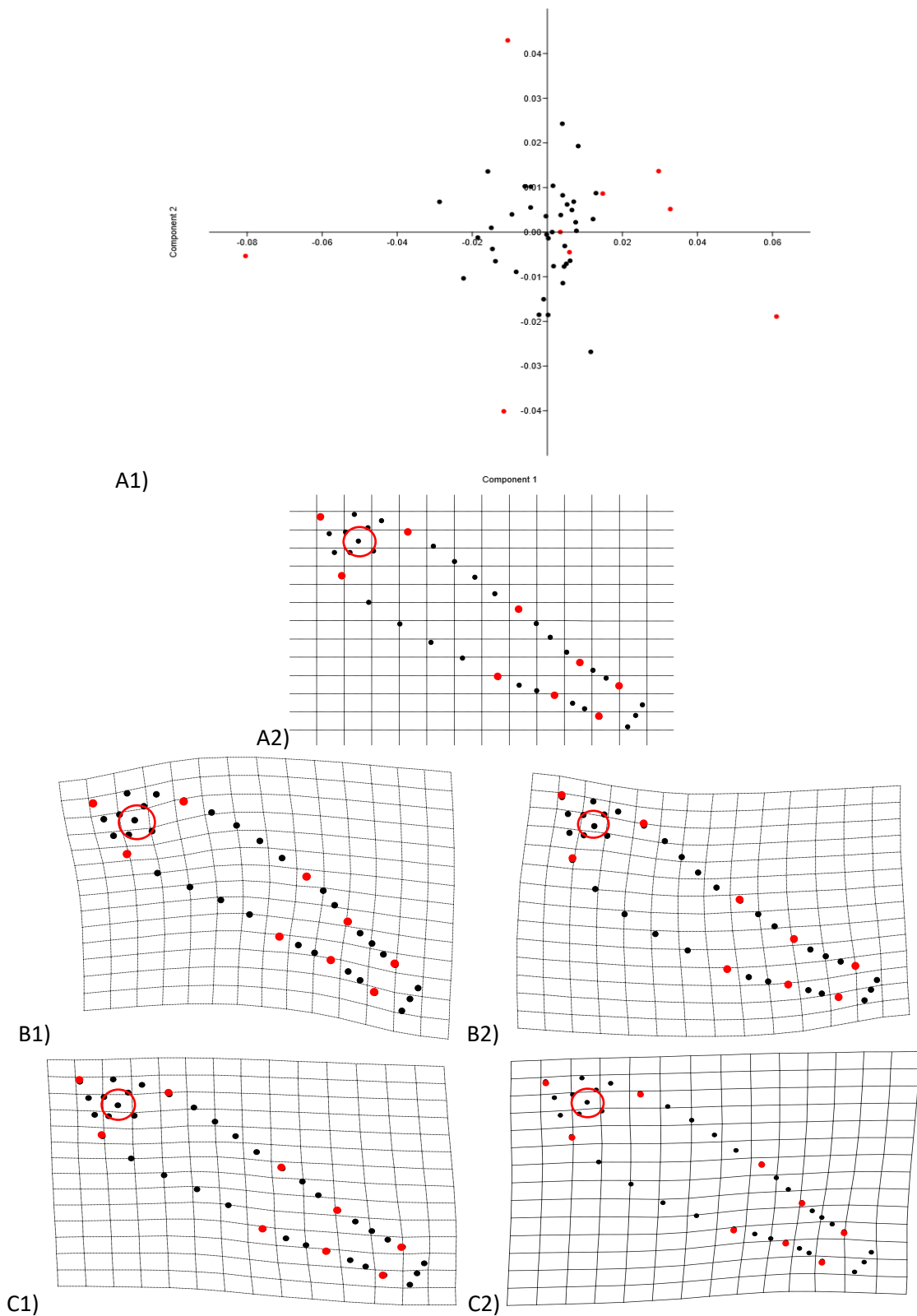


Figura 51. Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 27 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

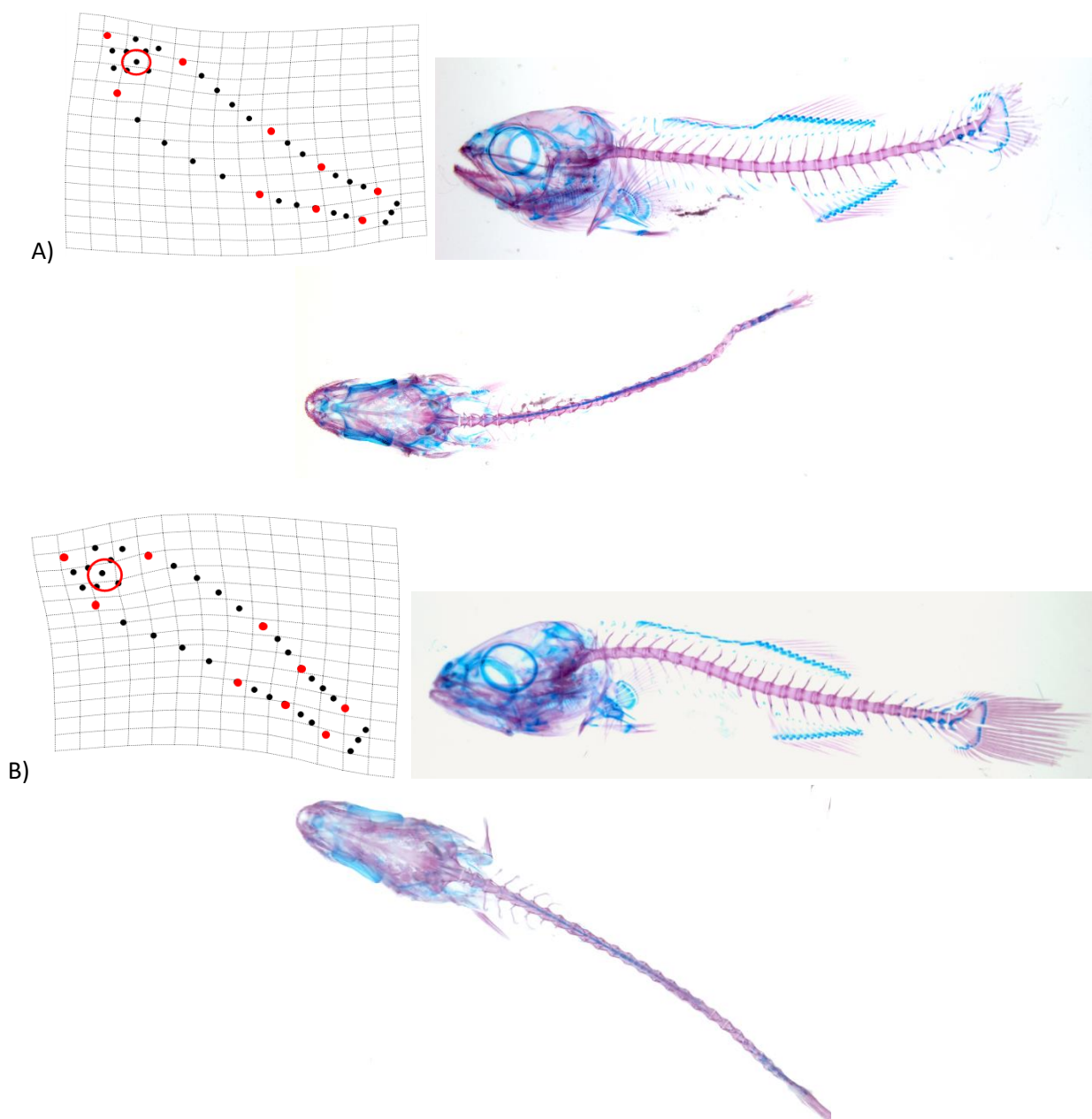


Figura 52. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 27 DDE.

En los organismos de 70 DDE el análisis de morfometría geométrica y el análisis de componentes principales mostró que en la distribución de los organismos en el gráfico del PCA (Fig. 37-A1), de los 13 organismos clasificados con alguna malformación el 69.23% se ubicaron en la parte inferior del gráfico y dos de ellos se posicionaron sobre el eje negativo del componente 2, mientras que el 30.76% está en la parte superior y solo uno estaba sobre el eje del componente 2 (positivo). En cuanto a los organismos considerados como normales aparentemente no presentaron una distribución específica, sino que

estaban dispersos en todo el gráfico. De acuerdo con el PCA para este grupo, el componente 1 explicó un 25.08% de la variación morfológica, seguido del componente 2 con un 17.03%, Al igual que en las dos edades anteriores se reportó hasta el componente 4, con un porcentaje acumulado del 63.48%. Específicamente para cada componente (1 y 2) y cada eje las gradillas de deformación mostraron lo siguiente:

Componente 1

Los cambios morfológicos en este componente se centraron en la región del pedúnculo caudal, en el eje negativo (Fig. 37-B1) se posicionaron todos los organismos que presentaron una compresión de esta zona, mientras que en el eje positivo (Fig. 37-B2) se encontraron organismos con una morfología más cercana al promedio.

Componente 2

Las deformidades se centraron en la región dorsoventral, como se observa en el eje negativo (Fig. 37-C1) en donde la gradilla de deformación presentó una forma más cercana al promedio o al centro, mientras que en el eje positivo (Fig. 37-C2) sufrieron de una compresión hacia la línea media.

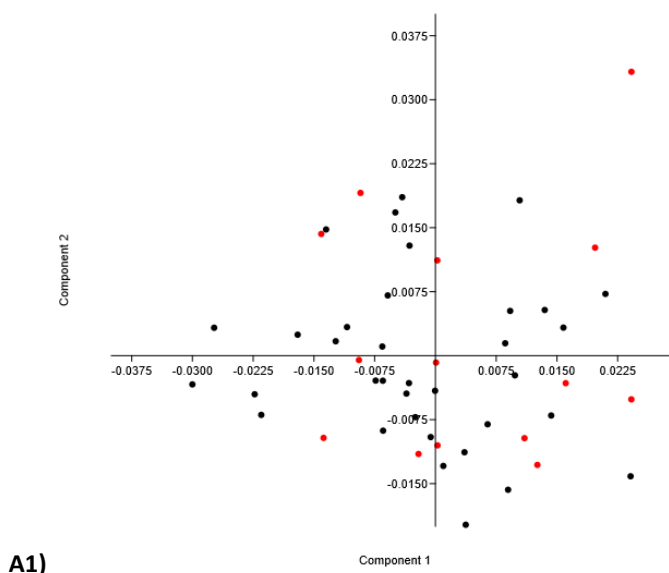


Figura 53. Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 70 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

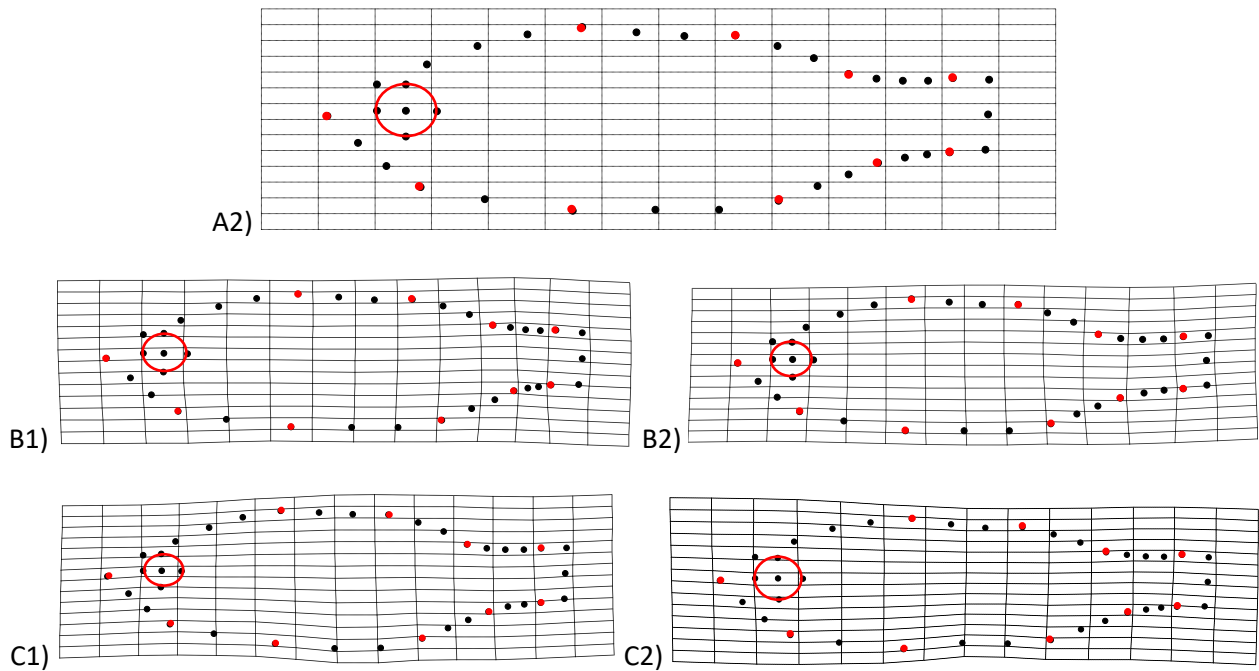


Figura 54. (Continuación) Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y gradillas para lobina rayada con una edad de 70 DDE. A1) Gráfico de PCA; A2) Gradilla del organismo cercano al promedio/centro; B1) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje negativo); B2) Gradilla del organismo más alejado del componente 1 (eje positivo); C1) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje negativo) y C2) Gradilla del organismo más alejado del componente 2 (eje positivo).

En estos organismos de 70 DDE se observó que hay malformaciones que fueron difíciles de detectar solo con la apariencia externa, pero al combinar la MG con la transparentación y doble tinción se encontró que un gran número de los organismos de esta muestra presentaron compresión vertebral, cifosis leve y/o lordosis leve lo que ocasionó que el pedúnculo caudal se viera más largo (Fig. 38-A) o más corto (Fig. 38-B).

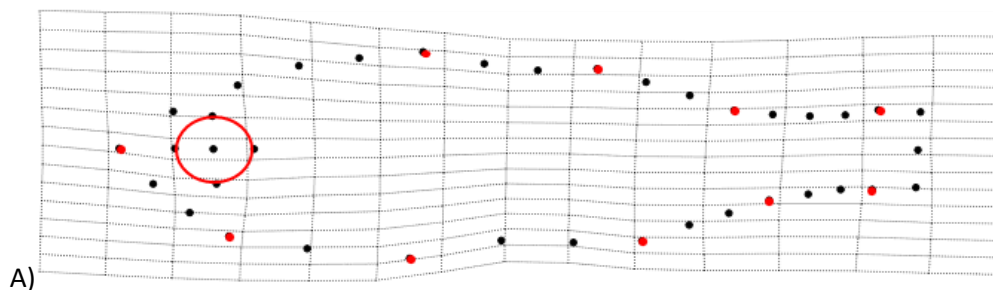


Figura 55. Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 70 DDE.

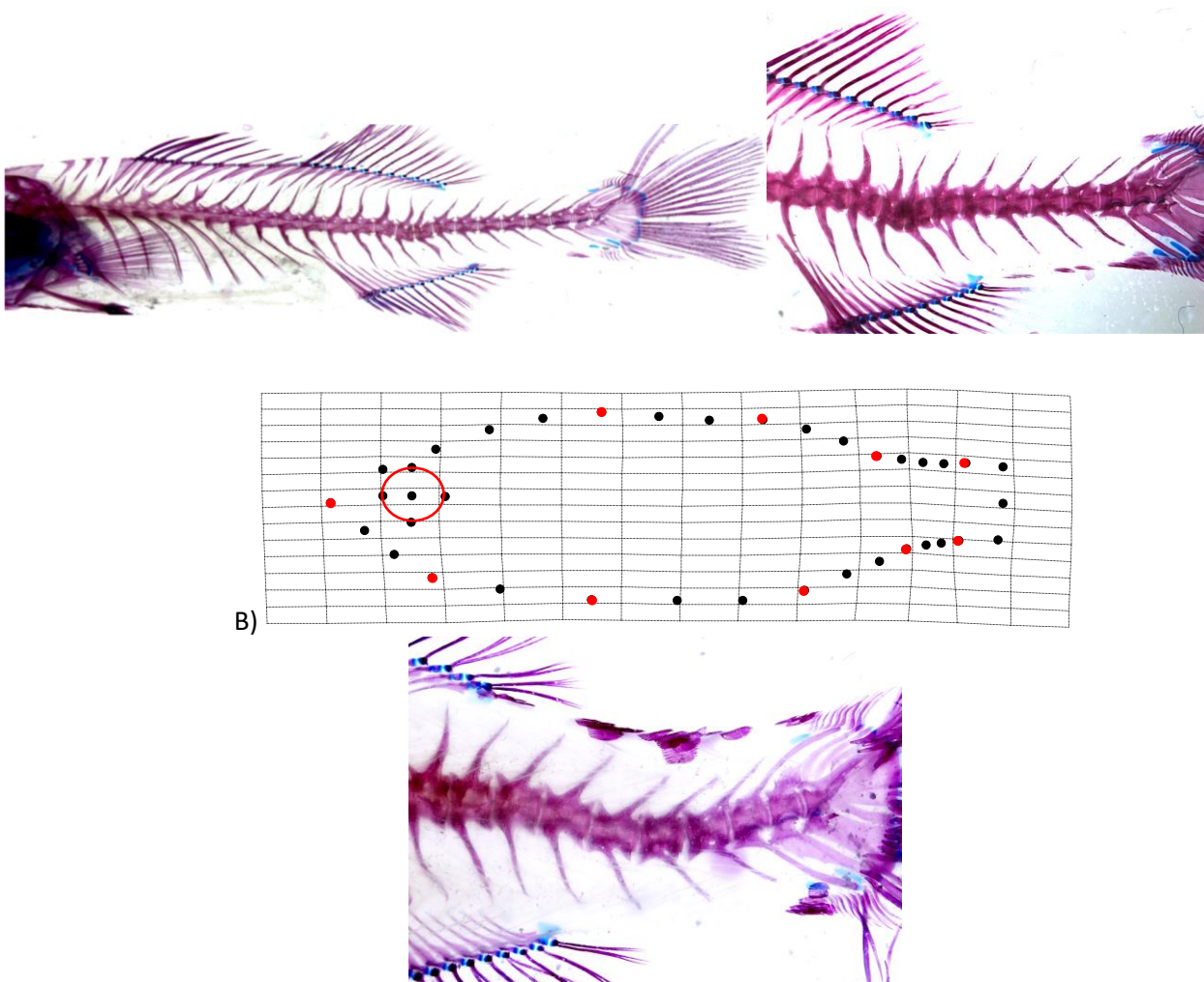


Figura 56. (Continuación) Comparación del resultado del análisis de morfometría geométrica con la estructura esquelética observada después de la transparentación y doble tinción de lobina rayada de 70 DDE.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Desarrollo esquelético

El esqueleto de los peces óseos presenta una gran diversidad de formas, la cual se refleja en las variadas estrategias de historia de vida de estos organismos. El esqueleto proporciona soporte estructural para la musculatura y al mismo tiempo provee protección para los órganos internos y los sistemas sensoriales. En los peces se conforma por cientos de elementos óseos y cartilagosos individuales que pueden variar en forma, lo que refleja la función de cada elemento en un organismo (Hilton, 2011).

El desarrollo esquelético de lobina rayada comenzó por el **complejo mandibular** a los 2 DDE (Lt = 0.63cm), este conjunto de estructuras cumple la función de darle al organismo la capacidad de pasar de una alimentación endógena (vitelo y gota de aceite) a tener una alimentación exógena (nauplios, metanauplios o dieta comercial) lo que depende del estadio de vida en el que se encuentre. De acuerdo con la descripción que realizaron Fritzsche y Johnson (1980) para *M. saxatilis* (Lt = 0.73 cm), del medio natural y con ayuda del método de doble tinción y transparentación observaron un desarrollo aparente de los premaxilares y en organismos de 0.84 cm documentaron una débil osificación del dentario, lo cual coincide con lo observado en este estudio exceptuando el grado de osificación del dentario ya que la coloración era más intensa, esto fue evidente en organismos pertenecientes a la edad de 6 DDE y 9 DDE respectivamente. En el estudio de Darias (2010) reportó para la lobina europea (*D. labrax*) con una Lt = 0.63 cm, un desarrollo óseo avanzado con osificación del maxilar y el dentario, este resultado contrasta con la esqueletogénesis de lobina rayada (Lt = 0.63 cm), debido a que no presentaron desarrollo del maxilar y el dentario no tuvo señales de osificación. La comparación entre ambas especies, permite resaltar que la lobina europea inició el proceso de osificación del aparato mandibular de forma más precoz con respecto a la lobina rayada.

Simultáneamente con el desarrollo del complejo mandibular se formó el esqueleto apendicular que comprende las aletas pares (pélvicas y pectorales) y aletas impares (dorsal, anal y caudal). En relación con las **aletas pectorales**, a los 2 DDE (Lt = 0.63 cm) empezaron a formarse y terminaron de osificarse a los 70 DDE, este conjunto de estructuras cumple la función de dar estabilidad, dirección y frenado durante el nado (Chalchisa, 2023). Fritzsche y Johnson (1980), reportaron en lobina rayada con una longitud aproximada de 0.46 cm, el inicio del desarrollo de estas estructuras, donde pudieron observar la formación del cartílago escapulocoracoide además de la osificación directa del cleithrum en forma de una delgada

línea. En los ejemplares, recolectados para este trabajo en un cultivo comercial, se observó que para esa longitud no había desarrollo de ninguna estructura, sin embargo, los autores mencionados anteriormente, indicaron que el radio pectoral o también conocido como plato radial pectoral (PRPI) conformado por una placa de cartílago con una hendidura en el centro, termina de formarse cuando los organismos tienen una Lt entre 0.75 y 0.85 cm, este mismo patrón de desarrollo se observó en la lobina rayada de 9 y 10 DDE (Lt = 0.82-0.86 cm). Darias *et al.* (2010) reportaron para lobina europea con una Lt = 0.83 cm, que el plato radial pectoral solo presentó una hendidura, lo que concuerda con lo descrito para *M. saxatilis*, tanto por lo reportado por Fritzsche y Johnson (1980) así como en la presente investigación. De manera general la descripción del desarrollo óseo de las aletas pectorales que se realizó en este estudio, concuerda con la descripción de Fritzsche y Johnson (1980), ya que a los 4.3 cm de longitud máxima que reportaron, observaron una osificación parcial de la escapula y el coracoide, tal y como se registró en la lobina rayada de 50 DDE.

Siguiendo con el esqueleto apendicular, el desarrollo de las **aletas pélvicas** comenzó a los 15 DDE (Lt = 1.17 cm) y concluyó (osificación completa) a los 70 DDE (Lt = 6.24 cm). El conjunto de estructuras que las conforman, cumplen la función de darle al pez un perfil hidrodinámico, freno, propulsor y timón, además de brindarles ayuda en la flotación y estabilidad (Standen, 2017). La longitud en la que comenzaron a desarrollarse concuerda con la reportada por Fritzsche y Johnson (1980), comenzando por los basipterigios, en organismos de lobina europea con una longitud de entre 0.84-1 cm hasta alcanzar su configuración adulta a una Lt = 1.6 cm (una espina y 5 radios). Este patrón concuerda con el observado en este estudio con lobina rayada. De acuerdo con la descripción de Marino *et al.* (1993), en lobina europea proveniente de un cultivo comercial, el desarrollo de las aletas pélvicas comenzó cuando los organismos tenían una longitud estándar de 1.13 cm, empezando por la formación de los cartílagos basipterigios. Esta cronología de desarrollo, concuerda con la descrita para la lobina rayada, pero hay una discrepancia con respecto a la longitud en la que comenzaron a formarse.

En relación con las aletas impares, la **aleta dorsal** comenzó a formarse a los 11 DDE (Lt = 0.92 cm), con la formación de los CRP y terminó a los 50 DDE, cuando aparentemente concluyó el proceso de osificación de los pterigióforos, con 9 espinas y de 10 a 12 radios. Sin embargo, Fritzsche y Johnson (1980), reportaron que, en los organismos adultos, la aleta dorsal tiene 10 espinas (raramente 11) y de 10 a 12 radios. Es importante mencionar que Carpenter (2002b), menciona que en organismos adultos las espinas se distribuyen de la siguiente manera, 8 o 9 espinas en la primera sección de la aleta y 1 espina más 10 a 13 radios en la segunda sección. Fritzsche y Johnson (1980) describieron que en organismos de entre 0.69-0.91 cm se observaron de 10-12 pterigióforos entre las espinas neurales 9 y 16. En este estudio, la cantidad

de pterigióforos antes mencionada se observó cuando las lobinas tuvieron una $L_t = 0.96-1.13$ cm. En lobina europea, Marino *et al.* (1993) reportaron la presencia de los primeros pterigióforos cartilaginosos en organismos que tenían una longitud estándar de 1.15 cm, mientras que en lobina rayada de la misma longitud se observó cierto grado de osificación de estas estructuras además de la diferenciación de la aleta dorsal con espinas y con radios.

En cuanto a la **aleta anal**, comenzó a desarrollarse a los 11 DDE ($L_t = 0.92$ cm) con la aparición de los CRP y culminó con la osificación de los mismos a los 70 DDE. Fritzsche y Johnson (1980), observaron que lobina rayada de entre 0.69 a 0.91 cm ya poseían de 10-12 pterigióforos ubicados entre las espinas hemales 12 y 17, mientras que, en lobina rayada cultivada, se observó esta cantidad de pterigióforos o cartílagos radiales proximales (CRP) en ejemplares con una $L_t = 0.96-1.13$ cm. En *D. labrax*, Marino *et al.* (1993) reportaron siete pterigióforos en organismos con una longitud estándar de 0.85 cm ($L_t = 0.96$ cm aproximada), mientras que Darías *et al.* (2010) reportaron en organismos con una $L_t = 1.28$ cm, tenían formados 11 pterigióforos en fase cartilaginosa. Es importante mencionar que los dos estudios realizados con lobina europea se hicieron con organismos de cultivos comerciales. Las principales diferencias que se observaron en el desarrollo esquelético de la aleta anal de lobina rayada y el de lobina europea son las siguientes: los ejemplares de lobina rayada con una $L_t = 0.96$ cm tenían 10 pterigióforos mientras que en *D. labrax* se observaron 7 pterigióforos, en longitudes más avanzadas se observó que la lobina rayada ($L_t = 1.30$ cm) presentó cierto grado de osificación y en lobina europea ($L_t = 1.28$ cm) observaron 11 de estas estructuras en fase cartilaginosa.

Otra estructura que pertenece al esqueleto apendicular, específicamente a las aletas impares, es la **aleta caudal**, la cual comenzó a formarse a los 7 DDE ($L_t = 0.76$ cm) con el desarrollo de los cartílagos hipurales y el cartílago parhipural y concluyó entre el día 50 y 70 DDE, donde todas las estructuras que pasan por un proceso de osificación endocondral llegan a ser hueso completamente (hipurales, epurales, uroneural y parhipural), mientras que los radios se forman por osificación intramembranosa, además de concluir con la formación de los cartílagos que se encuentran entre los soportes (hipurales y epurales) y los radios. Todo este conjunto de huesos y cartílagos cumplen varias funciones dentro de las que destacan, formar parte importante de los procesos de locomoción ya que genera las fuerzas impulsoras para mover a los peces hacia adelante, además les da dirección y gran capacidad para maniobrar, proporcionar equilibrio y ayudar en la captura de presas o para la defensa (Giammona, 2021). La descripción realizada por Fritzsche y Johnson (1980), donde observaron la formación de los tres primeros hipurales (forma cartilaginosa) en organismos con una $L_t = 0.69 - 0.74$ cm y los primeros radios en ejemplares con una $L_t = 0.80 - 0.84$ cm, al comparar con la lobina rayada cultivada se observó la formación de estas estructuras en organismos con

una $L_t = 0.76$ cm (7 DDE) y los radios ($L_t = 0.82$ cm), se ubicaron dentro del rango que ellos proponen. De acuerdo con Marino *et al.* (1993), en lobina europea el desarrollo de la aleta caudal comienza en organismos con una longitud estándar de 0.63 cm con los cartílagos hipurales, en contraste, Darías *et al.* (2010) observaron que en organismos con una $L_t = 0.83$ cm se había completado el desarrollo de los cartílagos hipurales, par hipural y epurales, además de un proceso parcial de osificación. En lobina rayada se observó, a la misma longitud, la formación de cuatro cartílagos hipurales y el parhipural (osificación endocontral) y la osificación de los primeros radios. En conclusión, se podría decir que *D. labrax* tiene un desarrollo más temprano de esta aleta que *M. saxatilis*.

En el **esqueleto axial**, las primeras estructuras de la columna vertebral que comenzaron a formarse fueron los arcos hemales, los cuales tienen como función dar protección a la vena y arteria caudal (Lindsey, 1978; Burton y Burton, 2017). El proceso comienza por una fase cartilaginosa que abarca desde el día 7 DDE hasta los 19 DDE donde comienzan el proceso de osificación de tipo endoncontral, completando este proceso a los 70 DDE o al llegar a la edad adulta. La siguiente estructura en desarrollarse fueron los arcos neurales, cuya principal función es proteger la medula espinal, además de dar sostén a la musculatura dorsal (Lindsey, 1978; Burton y Burton, 2017), al igual que los arcos hemales, pasan por una fase cartilaginosa que abarca desde los 8 DDE hasta los 12 DDE ($L_t = 0.96$ cm), cuando comenzó el proceso de osificación y culminó entre los 40 – 70 DDE. La columna vertebral comenzó a desarrollarse con las vértebras proximales (1 y 2) a los 10 DDE ($L_t = 0.86$), abdominales (3-11) entre los 9 y 13 DDE y caudales (12-24) del 13-19 DDE, siendo un total de 24 vértebras. Es importante mencionar que su proceso de osificación no concluye a los 19 DDE sino hasta el día 70 DDE o más, donde el centro del cuerpo de las vértebras se va cerrando hasta quedar un pequeño orificio.

Otras estructuras que tuvieron un desarrollo simultáneo al de la columna, fueron el urostilo y las costillas pleurales, el primero comenzó a osificarse a los 13 DDE ($L_t = 1.03$ cm) y terminó a los 50 DDE ($L_t = 4.36$ cm) con una osificación intramembranosa, mientras que las costillas fueron apareciendo a partir de los 19 DDE ($L_t = 1.40$ cm) y terminaron de osificarse a los 70 DDE, por el proceso de osificación endocondral. En otras descripciones del desarrollo esquelético de *M. saxatilis* como la realizada por Fritzsche y Johnson (1980), el desarrollo de los arcos neurales y hemales comienza de la región media hacia los extremos anterior y posterior, en organismos con una $L_t = 0.68 - 0.80$ cm y su osificación concluye en ejemplares con un $L_t = 0.90 - 1.6$ cm, exceptuando los últimos 3 o 4 arcos. Para el desarrollo de la columna vertebral observaron un total de 25 vértebras, las cuales comenzaron a diferenciarse en organismos con una longitud total de entre 0.80 y 0.91 cm, en cuanto a las costillas, observaron de 4 a 7 pares a partir de la tercera vértebra en ejemplares de entre 1.12 y 1.40 cm y completaron su desarrollo cuando los organismos tuvieron un rango

de longitudes de 1.73-1.80 cm. Estos resultados indican que el desarrollo de la columna vertebral y costillas pleurales es diferente entre la lobina rayada cultivada y la del medio natural, en la primera se observó un total de 24 vértebras, las cuales comenzaron a formarse en organismos con una $L_t = 0.82$ cm y en la segunda 25 vértebras, que comenzaron a formarse entre 0.80 y 0.91 cm, lo que significa que el proceso sucede primero en longitudes menores en lobina rayada del medio natural que en la cultivada, sin embargo tanto en el periodo de formación como de osificación de los arcos neurales y hemales son similares. Otros autores, como Nowroozi *et al.* (2012), se han centrado en la descripción del desarrollo vertebral de *M. saxatilis*, en su análisis de la morfología macroscópica de 5 ejemplares, observaron que la lobina rayada tiene 24 centros vertebrales, contando al urostilo. Sin embargo, en la presente investigación se analizaron más de 100 organismos en los que se realizó el conteo de vértebras y todos, sin excepción, poseían 24 vértebras sin contar el urostilo. En cuanto a la especie más emparentada con *M. saxatilis*, Darias *et al.* (2010) reportaron que para lobina europea de 0.83 cm cultivada a una temperatura de 20°C, la formación completa de los 24 An y los 13 Ah (fase cartilaginosa) y el desarrollo vertebral completo (24 vértebras + urostilo) en organismos con una longitud total de 1.55 cm, mientras que *M. saxatilis* presentó un desarrollo de 22 An y 10 Ah a una $L_t = 0.83$ cm y la formación de las 24 vértebras + urostilo se observó a una $L_t = 1.40$ cm. El desarrollo de los arcos neurales y hemales es precoz en lobina europea comparado con la lobina rayada, mientras que la formación de las vértebras tuvo una osificación tardía en lobina europea en contraste con lo observado para la lobina rayada.

4.2 Malformaciones esqueléticas

Las deformidades económicamente importantes afectan principalmente a la columna vertebral y a la región cefálica, con formas corporales alteradas, así como modificaciones en el comportamiento del nado y alimentación, y el consiguiente aumento de la susceptibilidad al estrés y a la invasión de patógenos (Eissa *et al.*, 2021). Entre los diversos tipos de alteraciones óseas de la columna vertebral, las más comunes son la lordosis, cifosis y escoliosis (Fernández *et al.*, 2009, Lall y Lewis-McCrea, 2007, Gavaia *et al.*, 2009, Valgasholm y Djupvik, 1998, Hattori *et al.*, 2003) Las malformaciones esqueléticas se observan con frecuencia en especies de importancia comercial como el besugo (*Pagrus major*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), el jurel (*Seriola sp.*) y el mero (*Epinephelus sp.*) en países asiáticos y europeos. La tasa de aparición de deformidades esqueléticas varía entre estas especies, oscilando entre el 50 y el 100% de la producción total (Barahona-Fernández, 1982, Boglione *et al.*, 2001;

Gavaia *et al.*, 2009, Glamuzina *et al.*, 1998, Hosoya y Kawamura, 1991, Pierre *et al.*, 2008; Shiozawa, 2006; Setiadi *et al.*, 2006). Sin embargo, se estima que la incidencia de malformaciones en juveniles es aproximadamente menos del 10 % de la producción total (Hattori *et al.*, 2003, Puvanendran *et al.*, 2009, Fjellidal *et al.*, 2007).

La identificación de las causas de las malformaciones esqueléticas en los peces, es determinante para prevenirlas. Sin embargo, la tasa de ocurrencia de deformidades esqueléticas en los peces es muy variable, incluso en la misma unidad de cultivo (Hattori *et al.*, 2003, Yamamoto, 2004). Por esta razón, es difícil demostrar si las manipulaciones ambientales y dietéticas o ambas, pueden ocasionar una reducción de la presencia de malformaciones esqueléticas ya que el nivel basal de la deformidad es variable. Otra incógnita, es que hay varios factores involucrados: factores ambientales (fotoperiodo, intensidad de luz, oxígeno y dióxido de carbono disueltos, velocidad de la corriente de agua) (Hattori *et al.*, 2004, Kihara *et al.*, 2002; Koumoundouros *et al.*, 1997; Fjellidal *et al.*, 2005, Bolla y Holmfjord, 1988), y nutricionales (lisina, triptófano, fenilalanina, vitamina A, C, D, E, K, ácido graso altamente insaturado n-3, fosfolípido, fósforo, manganeso, zinc) (Cahu *et al.*, 2003, Du y Haga, 2004, Fernandez *et al.*, 2009, Kitajima *et al.*, 1994, Lall y Lewis-McCrea, 2007, Nguyen *et al.*, 2008, Saavedra *et al.*, 2009, Saavedra *et al.*, 2010), y antecedentes genéticos (Ferraresso *et al.*, 2010; Gjerde *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2011, Taniguchi *et al.*, 1984).

Las malformaciones óseas registradas en este estudio se observaron en organismos que se cultivaron en condiciones estándar de producción, desarrolladas por el laboratorio comercial, pero no son el resultado de la exposición experimental a algún factor que pudiera ser causante de un desarrollo óseo anormal o inductor de malformaciones, como es la temperatura, flujo del agua, deficiencias nutricionales, entre otros. Entre las malformaciones más comunes y de importancia económica, se encuentran las de columna vertebral (Eissa *et al.*, 2021), que en este estudio fueron las más prevalentes, y se clasificaron en dos grandes grupos, aparentes y óseas (después de la doble tinción y transparentación). En el primer grupo se observó un mayor porcentaje de malformaciones de columna vertebral en organismos de 70 DDE con un 54 %, mientras que en el segundo grupo se observó una prevalencia del 48 % en organismos de 70 DDE, donde se observaron afectaciones de la vértebra 16 a la 22, presentando un grado considerable de compresión. Las investigaciones que se han realizado sobre malformaciones óseas en lobina rayada son escasas. En las larvas de *M. saxatilis* proveniente de Brook Hatchery, Koo y Johnston (1978), reportaron entre el 5 y 10 % de malformaciones en la notocorda en el grupo control, comparado con lo obtenido en este estudio, se observó que en las primeras 24 hrs de desarrollo larval (1DDE) el 12 % (N= 50) presentaron un desarrollo anormal de la notocorda. En otro estudio, Hickey *et al.* (1977), analizaron 23 lobinas rayadas

capturadas en aguas de Nueva York, con edades estimadas entre +0 a +8 años, y observaron una gran variedad de malformaciones, tanto de columna vertebral, mandíbula y aletas. Esta misma diversidad de anomalías óseas se reportó en esta investigación, ya que se observó el desarrollo anormal de la mandíbula (50, 70 y 157 DDE), notocorda/columna vertebral (1-70 DDE) y aletas (17 DDE), solo considerando las que eran aparentes, ya que después de procesar las muestras con la doble tinción y transparentación, se pudieron detectar malformaciones en los arcos y espinas neurales (12-70 DDE).

En otras investigaciones realizadas con especies pertenecientes a la familia *Moronidae*, Moore y Hixson (1977), reportaron para *M. americana* recolectada en el río Potomac, una baja prevalencia de malformaciones óseas, donde de 42,936 organismos analizados el 0.23% presentó alguna malformación aparente como cifosis, lordosis o escoliosis, mientras que 130 especímenes presentaron algún desarrollo esquelético anormal, de los cuales solo 10 (7.6%) presentaron defectos espinales y afectaciones en elementos de los arcos neurales que a simple vista no pudieron ser detectados. Estas malformaciones se reportaron para lobina rayada, ya que mediante el análisis de su morfología externa se detectaron diversas anomalías de columna vertebral, con una prevalencia del 19.83% (N = 1452), mientras que otras se detectaron con ayuda de la doble tinción y transparentación (N = 196), como la compresión vertebral que tuvo una prevalencia del 12.75 % y las alteraciones en los pterigióforos con un 1.53%.

En lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) se han realizado diversas investigaciones sobre malformaciones óseas, la mayoría experimentando con alguna variable que pueda derivar en alguna anomalía. Divanach *et al.* (1997) expusieron a larvas de lobina europea a una baja y alta velocidad de corriente, después de 137 días de mantenimiento observaron un 33 (peso promedio de 1.6 g) y 93% (peso promedio de 1.5 g) de los organismos con alguna malformación, respectivamente y de manera general encontraron afectaciones entre las vértebras 13 y 18, de las cuales, el 84.8% se localizaron en las vértebras de la 15 a la 17, además, observaron compresión vertebral, lo cual provocó un acortamiento en los organismos. En la presente investigación con lobina rayada, se encontraron malformaciones aparentes de notocorda/columna vertebral, mandíbula y aletas, las cuales representaron un 20.17 % (N = 1452), siendo las de columna vertebral las que prevalecieron con un 19.83% (N = 288). El análisis de malformaciones que no se observaron a simple vista, reveló un porcentaje alto de compresión vertebral en organismos de 70 DDE (Lt = 6.70 cm) afectando las vértebras de la 16 a la 22, lo que concuerda con el estudio antes mencionado, esto quiere decir que el flujo del agua es un precursor de malformaciones en el esqueleto axial y que se debe de tener controlado hasta que los organismos completen el proceso de osificación vertebral.

Abdel *et al.* (2004) observaron que *D. labrax* de aproximadamente 190 días de edad, mantenidas a diferentes temperaturas, 15 y 19 °C, se producen malformaciones en un 30.18 (N = 901) y 66.44 % (N = 742) de los ejemplares, respectivamente. Las más importantes en ambos tratamientos, tanto por su frecuencia como en su incidencia afectaron los opérculos, la cabeza y la columna vertebral, además observaron que con las altas temperaturas hay mayores alteraciones bilaterales lo que causa un lento crecimiento de los organismos y establecieron que la lordosis tiene una relación estrecha con el desarrollo anormal de la vejiga natatoria. En el cultivo de lobina rayada en este estudio, las larvas recién eclosionadas se mantuvieron a una temperatura de 14°C, posteriormente, a los 21 DDE la temperatura se incrementó a 19.3°C y alcanzó la máxima a los 29 DDE con 23°C, este aumento se hizo gradualmente (Pacífico Aquaculture S.A.P.I. de C.V., comunicación personal, 2023), de acuerdo con esto se observó que en las primeras etapas de vida el porcentaje de malformaciones, específicamente de notocorda/columna vertebral, fue menor, mientras que en el intervalo de cambio de temperatura hubo un aumento de estas malformaciones(9-17 DDE), esto podría deberse a que es la etapa en la que la columna no está completamente formada. Sin embargo, en edades más avanzadas (50-70 DDE) y con una temperatura aproximada de 19°C, hubo un repunte de estas malformaciones, donde prevalecieron la compresión vertebral en la región del pedúnculo caudal. Tomando en cuenta el de Abdel *et al.* (2004) con *D. labrax* y lo reportado en lobina rayada en este estudio se puede inferir que la temperatura es específica para cada etapa de vida.

Printzi *et al.* (2024) reportaron para la lobina europea, que en el periodo de los 64 a los 92 DDE y administrando 3 dietas experimentales (0, 6 y 12 % de incorporación de péptidos), se observaron malformaciones del esqueleto axial, como la cifosis en las vértebras hemales (donde se encuentran las costillas pleurales), lordosis hemática en baja frecuencia, mineralización anormal de los centros vertebrales y escoliosis en el pedúnculo caudal. En la cabeza observaron una afectación en los radios branquiostegales, mordida cruzada y desalineación de los huesos dentarios de la mandíbula inferior. En organismos con una Lt de 0.8 -1.0 cm y alimentados con la dieta de 12% de incorporación de péptidos, observaron un incremento en la mineralización de las vértebras en comparación con el control, además demostraron a través de una prueba de desafío de nado que adquirieron cierta resistencia a la lordosis, donde solo el 16 % de los organismos ejercitados desarrollaron lordosis, mientras que en el grupo control y la dieta de 6% el 54.4 y 46.4% respectivamente. Al comparar con lo observado en lobina rayada de esta investigación, se encontró que en el rango de longitud de 0.8-1.0 cm, un 28% correspondían a malformaciones de columna vertebral aparentes, esto podría traducirse en que en la etapa de vida que va de los 8 a los 13 DDE, la dieta se podría adicionar con cierta cantidad de péptidos para disminuir las

alteraciones de la columna vertebral, como la lordosis que se puede generar por la fuerza del flujo del agua.

En este estudio se identificaron malformaciones en los arcos y espinas neurales, los cuales se observaron a partir del día 12 DDE cuando hay un mayor desarrollo de los arcos neurales. En este periodo la prevalencia fue de un 13.14 %, con arcos neurales abiertos y un 95.03 % de espinas neurales bifurcadas, las cuales se comenzaron a contabilizar a partir del día 14 DDE, cuando estas estructuras comienzan a formarse. Es importante mencionar que estas dos anomalías se presentaron en la región proximal de la columna vertebral. Aydin *et al.* (2022) también reportaron malformaciones en estas estructuras en organismos diploides y triploides de *Scophthalmus maximus*, 346 y 400 veces, respectivamente, siendo de las más comunes. Majeed *et al.* (2018) observaron este tipo de malformaciones en *Tor putitora*, de las cuales las espinas neurales anormales tuvieron una prevalencia del 13.53%, que afecta en un 50% a los organismos deformados, mientras que un 0.75% tuvo arco neural no fusionado. Esta información permite suponer que este tipo de alteraciones óseas son comunes, pero no son fáciles de detectar a simple vista y podrían causar alguna afectación en la medula espinal ya que queda expuesta.

4.3 Morfometría geométrica

Existen diversos métodos para diagnosticar las malformaciones óseas, que van desde observaciones externas, radiografías, palpación, tinción de montaje completo, tomografías, histología e histoquímica (Boglione *et al.*, 2013), la selección del método depende de la precisión que se requiera en la investigación o en un cultivo comercial. Con el fin de conocer las estructuras que se involucraron en las malformaciones, así como saber la variación en la forma de los peces, en este trabajo se utilizó una combinación de métodos, la observación externa, la doble tinción y transparentación (también conocida como diafanización) y la morfometría geométrica. Con este conjunto de técnicas se pudo observar que hay malformaciones que con observaciones externas son difíciles de diagnosticar, como sucedió con la compresión vertebral en los organismos de 70 DDE, ya que en una primera clasificación, no se observó una alta frecuencia de malformaciones de columna, mientras que al utilizar la morfometría geométrica, el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) mostró una variabilidad en la forma del pedúnculo caudal por lo que se pudieron clasificar de manera más precisa los organismos con una malformación de columna y para confirmar, la doble tinción permitió observar la afectación de las vértebras distales y algunas de la región media. Actualmente no se han reportado estudios de morfometría geométrica y doble tinción en lobina rayada para detectar sus malformaciones. En la lobina europea (*D.*

labrax) si se han realizado investigaciones con estas dos técnicas, como muestra en el estudio de Geoga *et al.* (2010), al reportar cambios en el desarrollo y la morfología de las aletas pélvicas (55 DDE) derivado de cambios en el contenido de vitamina A en la alimentación este micronutriente es un factor importante en la esquelotogénesis y gracias a las dos técnicas antes mencionadas lograron observar los cambios tanto en la longitud como en la posición de las aletas pélvicas. La morfometría geométrica ayudó a detectar cambios en el basipterigio de ambas aletas, así como en el cleithrum, mientras que la doble tinción detecto la ausencia de radios, mal posicionamiento de estas dos estructuras y también pudieron detectar alteraciones mínimas en la aleta dorsal, que con observaciones externas no son perceptibles, tal y como sucedió con la compresión vertebral en lobina rayada a los 70 DDE.

Korwin-Kossakowski *et al.* (2016) mencionan que la técnica de morfometría geométrica es una herramienta útil para la detección temprana de anomalías corporales en peces. Sin embargo, se debe tener conocimiento de los tipos y ubicaciones de las malformaciones más comunes y definir las variables asociadas a la forma de los peces, sin importar el tamaño de los organismos. En lobina rayada se logró hacer la detección de malformaciones en los organismos de 27 DDE a través de esta técnica, que solo con la observación directa de los ejemplares en fresco, no es posible distinguir. A demás este método es lo suficientemente sensible como para detectar diferencias en la forma corporal de los peces alimentados intensivamente con diferentes dietas y puede dar información para detener el proceso de malformaciones cambiando las condiciones del cultivo (Korwin-Kossakowski *et al.*, 2016)

Capítulo 5. Conclusiones

El proceso del desarrollo esquelético de *Morone saxatilis* es similar al de *Dicentrarchus labrax*, debido a su gran parentesco, a los 70 DDE el esqueleto está completamente osificado.

El porcentaje de malformaciones aparentes en lobina rayada cultivada en la empresa Pacifico Aquaculture fue del 20.17%, de las cuales las malformaciones de notocorda/columna vertebral fueron las más comunes con un 19.83% (N= 288) de los organismos deformes, el resto corresponden a malformaciones en el esqueleto apendicular y el complejo mandibular.

Se identificaron 4 tipos de malformaciones óseas en *Morone saxatilis* de un cultivo comercial, las cuales son difíciles de identificar solo con observaciones externas, de estas malformaciones donde el 13.14% fueron en arcos neurales abiertos, el 12.75% a espinas neurales bifurcadas, el 12.75% a compresión vertebral y el 1.53% a alteraciones de pterigióforos de la aleta dorsal. Estas malformaciones pueden ser detectadas a partir de los 12 DDE, donde hay desarrollo parcial de los arcos neurales y se observan esbozos de las espinas neurales.

La técnica de MG en conjunto con la doble tinción y transparentación son métodos que pueden ayudar a un mejor diagnóstico de las malformaciones óseas, además de que permiten identificar el momento de su aparición.

La MG es una técnica sensible que detecta cambios morfológicos mínimos, además de que no es invasiva y se puede realizar sin necesidad de sacrificar a los organismos.

Literatura citada

- Abdel, I., Abellán, E., López-Albors, O., Valdés, P., Nortes, M., & García-Alcázar, A. (2004). Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and effect on growth. *Aquaculture International*, 12(6), 523-538. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-0349-9>
- Andrades, J., Becerra, J., & Fernández-Llebarez, P. (1996). Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141(1-2), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01226-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01226-5)
- Aulstad, D., & Kittelsen, A. (1971). Abnormal body curvatures of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inbred fry. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 28(12), 1918-1920. En PDF
- Aydin, İ., Öztürk, R. Ç., Terzi, Y., Küçük, E., Polat, H., & Altinok, İ. (2022). Skeletal development and malformations in the early life stage of diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 550, 737886. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737886>
- Babcock, H. E., Dutta, S., Alur, R. P., Brocker, C., Vasiliou, V., Vitale, S., Abu-Asab, M., & Brooks, B. P. (2014). *aldh7a1* Regulates Eye and Limb Development in Zebrafish. *PLoS ONE*, 9(7), e101782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101782>
- Barahona-Fernandes, M. H. (1982). Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence and effect on fish survival. *Journal Of Fish Biology*, 21(3), 239-249. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02830.x>
- Bengtsson, B. E., Bengtsson, Å., & Himberg, M. (1985). Fish deformities and pollution in some Swedish waters. *Ambio*, 32-35. En Archivo PDF.
- Bengtsson, Å., Bengtsson, B. E., & Lithner, G. (1988). Vertebral defects in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis* L., exposed to heavy metal pollution in the Gulf of Bothnia. *Journal Of Fish Biology*, 33(4), 517-529. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05496.x>
- Benítez, H. A., & Püschel, T. A. (2014). Modelando la Varianza de la Forma: Morfometría Geométrica Aplicaciones en Biología Evolutiva. *International Journal Of Morphology*, 32(3), 998-1008. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022014000300041>
- Black, CR. (2014). Geometric morphometric analysis of skeletal shape variation across the pleuronectiformes. Master Thesis, University of Northern Iowa, 39-42. En Archivo PDF.
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M., & Cataudella, S. (2001). Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192(1), 1-22. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00446-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00446-4).
- Boglione, C., Costa, C., Di Dato, P., Ferzini, G., Scardi, M., & Cataudella, S. (2003). Skeletal quality assessment of reared and wild sharpnose sea bream and pandora juveniles. *Aquaculture*. 227(1-4), 373-394. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00515-5](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00515-5)
- Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P., & Cataudella, S. (2009). Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different

- methodologies and larval densities. *Aquaculture*. 291(1-2), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.041>
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., & Witten, P. E. (2013a). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Aquaculture*, 5(s1). <https://doi.org/10.1111/raq.12015>
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P. J., Witten, P., Moren, M., Fontagné, S., & Koumoundouros, G. (2013b). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Aquaculture*, 5, S121-S167. <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- Bookstein, F. L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. New York: Cambridge University Press. En Archivo PDF.
- Bolla, S., y Holmefjord, I. (1988). Effect of temperature and light on development of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture*, 74(3-4), 355-358. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90379-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90379-1)
- Branson, E.J. and Turnbull, T. (2008). Welfare and Deformities in Fish. In Fish Welfare, E.J. Branson (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470697610.ch13>
- Burton, D., & Burton, M. (2018). Essential Fish Biology: Diversity, Structure and Function. Oxford University Press.
- California Department of Fish and Game (CDFG). (1961). California Department of Fish and Game.
- Cahu, C. L., Infante, J. L. Z., & Barbosa, V. (2003b). Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal Of Nutrition*, 90(1), 21-28. <https://doi.org/10.1079/bjn2003880>
- Can, E. (2013). Effects of Intensive and Semi-Intensive Rearing on Growth, Survival, and V-Shaped (Lordotic) Skeletal Deformities in Juvenile Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Israeli Journal Of Aquaculture - Bamidgeh*, 65. <https://doi.org/10.46989/001c.20662>
- Cantillo, J., Martín, J. C., & Román, C. (2023). Assessing the economic impacts of severe skeletal anomalies in Mediterranean hatcheries culturing seabream and seabass. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 55(1), 329-352. <https://doi.org/10.1111/jwas.13008>
- Cobcroft, J. M., & Battaglione, S. C. (2008). Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behaviour and tank colour. *Aquaculture*, 289(3-4), 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.018>
- Cobcroft, J. M., Shu-Chien, A. C., Kuah, M., Jaya-Ram, A., & Battaglione, S. C. (2012). The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw malformation in striped trumpeter larvae. *Aquaculture*, 356-357, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.035>
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). (2022). Carta Nacional Acuícola. México. 120.
- Chalchisa, T. (2023). Functions and Adaptations of Fish Fins. *Fish Aqua* J.14:341. En Archivo PDF

- Darias, M. J., Lan Chow Wing, O., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., and Mazurais, D. (2010). Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 280–285. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x>
- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M., & Cataudella, S. (1996). Abnormalities in finfish mariculture: An overview of the problem, causes and solutions. En PDF.
- Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G., & Kentouri, M. (1997). Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture*, 156(1-2), 145-155. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)00072-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00072-0)
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Carta Nacional Acuicola. Diario Oficial (DOF). 14-17. En PDF.
- Doroshev, S., & Aronovich, T. (1974). The effects of salinity on embryonic and larval development of *Eleginus navaga* (Pallas), *Boreogadus saida* (Lepechin) and *Liopsetta glacialis* (Pallas). *Aquaculture*, 4, 353-362. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(74\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(74)90064-7)
- Du, S.J., Haga, Y. (2004). The zebrafish as a model for studying skeletal development, In: Baeuerlein, E. (Ed.), *Biomineralization: Progress in Biology, Molecular Biology and Application*, (2nd Edn). Wiley-VCH, Weinheim, pp. 283–304.
- Eissa, A. E., Abu-Seida, A. M., Ismail, M. M., Abu-Elala, N. M., & Abdelsalam, M. (2021). A comprehensive overview of the most common skeletal deformities in fish. *Aquaculture Research*, 52(6), 2391-2402. <https://doi.org/10.1111/are.15125>
- Essenfeld, E. A. P. y. C., Essenfeld, H. A. P. C., & Morales, A. (1997, 20 agosto). ES2313752T3 - Un metodo de fijacion-deshidratacion-eliminacion de grasa-impregnacion de tejidos de produccion continua, de alta calidad. - *Google Patents*. <https://patents.google.com/patent/ES2313752T3>
- Fernández, I., Pimentel, M. S., Ortiz-Delgado, J. B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Zambonino-Infante, J. L., & Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295(3-4), 250-265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.046>
- Ferraresso, S., Milan, M., Pellizzari, C., Vitulo, N., Reinhardt, R., Canario, A. V., Patarnello, T., & Bargelloni, L. (2010). Development of an oligo DNA microarray for the European sea bass and its application to expression profiling of jaw deformity. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-354>
- Fjellidal, P. G., Hansen, T. J., & Berg, A. E. (2007). A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 273(4), 721-728. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.009>
- Fjellidal, P. G., Nordgarden, U., Berg, A., Grotmol, S., Totland, G. K., Wargelius, A., & Hansen, T. (2005). Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. *Aquaculture*, 250(1-2), 516-524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.05>

- Flores-Lopes, F., Cetra, M., & Malabarba, L. R. (2010). Utilization of ecological indexes on assemblages of fish as instrument of assessment of the environmental degradation in monitoring programs. <https://www.biotaneotropica.org.br/BN/article/view/734>
- Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2005). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*, 235(1), 176-190. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- Fukuhara O. 1992. Study on the development of functional morphology and behaviour of the larvae of eight commercially valuable teleost fishes. *Contrib Fish Res Japan Sea Block* 25:1–122
- Gavaia, P. J., Sarasquete, C., & Cancela, M. L. (2000). Detection of Mineralized Structures in Early Stages of Development of Marine Teleostei Using a Modified Alcian Blue-Alizarin Red Double Staining Technique for Bone and Cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*, 75(2), 79-84. <https://doi.org/10.3109/10520290009064151>
- Gavaia, P. J., Domingues, S., Engrola, S., Drake, P., Sarasquete, C., Dinis, M. T., & Cancela, M. L. (2009). Comparing skeletal development of wild and hatchery-reared Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858): evaluation in larval and postlarval stages. *Aquaculture Research*, 40(14), 1585-1593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02258.x>
- Georga, I., Glynatsi, N., Baltzois, A., Karamanos, D., Mazurais, D., Darias, M. J., Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., & Koumoundouros, G. (2010). Effect of vitamin A on the skeletal morphogenesis of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 42(5), 684-692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02676.x>
- Georgakopoulou, E., Angelopoulou, A., Kaspiris, P., Divanach, P., & Koumoundouros, G. (2007). Temperature effects on cranial deformities in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal Of Applied Ichthyology*, 23(1), 99-103. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00810.x>
- Gjerde, B., Pante, M. J. R., & Baeverfjord, G. (2004). Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244(1-4), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.002>
- Glamuzina, B., Skaramuca, B., Glavic, N., & Kozul, V. (1998). Preliminary studies on reproduction and early life stages in rearing trials with dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquaculture Research*, 29(10), 769-771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.29100769.x>
- Glat, P. M., Freund, R. M., Spector, J. A., Levine, J., Noz, M., Bookstein, F. L., McCarthy, J. G., & Cutting, C. B. (1996). A Classification of Plagiocephaly Utilizing a Three-Dimensional Computer Analysis of Cranial Base Landmarks. *Annals Of Plastic Surgery*, 36(5), 469-474. <https://doi.org/10.1097/0000637-199605000-00006>
- Gjerde, B., Pante, M. J. R., & Baeverfjord, G. (2004b). Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244(1-4), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.002>
- Gosline, W. A. (1966). The limits of the fish family Serranidae, with notes on other lower percoids. *Proceedings of the California Academy of Science* 33, 91–112. En PDF
- Hall, B.K. (1998). *Evolutionary Developmental Biology*. (2nd ed.), Chapman and Hall. En PDF.

- Harris, M. P., Rohner, N., Schwarz, H., Perathoner, S., Konstantinidis, P., & Nüsslein-Volhard, C. (2008). Zebrafish *eda* and *edar* Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000206. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000206>
- Hattori, M., Sawada, Y., Takagi, Y., Suzuki, R., Okada, T., & Kumai, H. (2003). Vertebral deformities in cultured red sea bream, *Pagrus major*, Temminck and Schlegel. *Aquaculture Research*, 34(13), 1129-1137. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00915.x>
- Hattori, M., Sawada, Y., Kurata, M., Yamamoto, S., Kato, K., & Kumai, H. (2004). Oxygen deficiency during somitogenesis causes centrum defects in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 35(9), 850-858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01076.x>
- Hickey, C. R., JR., Young, B. Y. y David, B. R. (1977). Skeletal abnormalities in striped-bass. N. Y. *Fish & Game J.*, 24, 69-85. En Archivo PDF
- Horton, W. A. (1990). The biology of bone growth. *Growth Genet. Horm.* 6(2):1–3. En Archivo PDF.
- Hough, C. (2009) Improving the sustainability of European fish aquaculture by the control of malformations. Oral communication at the FINEFISH Final Workshop, 7 Sep 2009, held during Larvi 2009 - 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium; 7–10 Sep 2009, Ghent University, Belgium.
- Hosoya, K., Kawamura, K., 1991. Osteological evaluation in artificial seedling of *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). UJNR Tech. Rept. 24, 107–114. En PDF
- Izquierdo, M. S., Socorro, J., & Roo, J. (2010). Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *Journal Of Applied Ichthyology*, 26(2), 320-326. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01429.x>
- Janvier, P. (2015). Facts and fancies about early fossil chordates and vertebrates. *Nature*, 520(7548), 483-489. <https://doi.org/10.1038/nature14437>
- Johnson, G. D. (1984). Percoidei: development and relationships. In *Ontogeny and Systematics of Fishes Special Publication No. 1* (Moser, H. G., Richards, W. J., Cohen, D. M., Fahay, M. P., Kendall, A. W. & Richardson, S. L., eds), pp. 464–498. New York, NY: American Society of Ichthyologists and Herpetologists. En Archivo PDF
- Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Developmental Cell*, 2(4), 389-406. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00157-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00157-0)
- Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota, I., & Yamaguchi, R. (2002). Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212(1-4), 149-158. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00871-7](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00871-7)
- Kitajima, C., Watanabe, T., Tsukashima, Y., & Fujita, S. (1994). Lordotic Deformation and Abnormal Development of Swim Bladders in Some Hatchery-Bred Marine Physoclistous Fish in Japan. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 25(1), 64-77. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00806.x>
- Kondo, S., Kuwahara, Y., Kondo, M., Naruse, K., Mitani, H., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Asakawa, S., Shimizu, N., & Shima, A. (2001). The medaka *rs-3* locus required for scale development encodes

- ectodysplasin-A receptor. *Current Biology*, 11(15), 1202-1206. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00324-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00324-4)
- Koo, T. S., & Johnston, M. L. (1978). Larva deformity in striped bass, *Morone saxatilis* (walbaum), and blueback herring, *Alosa aestivalis* (mitchill), due to heat shock treatment of developing eggs. *Environmental Pollution* (1970), 16(2), 137-149. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(78\)90128-3](https://doi.org/10.1016/0013-9327(78)90128-3)
- Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., & Kentouri, M. (1997a). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, 149(3-4), 215-226. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(96\)01443-3](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(96)01443-3)
- Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S., & Kentouri, M. (1997b). The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture*, 156(1-2), 165-177. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)89294-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)89294-0)
- Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P., & Kentouri, M. (2002b). Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209(1-4), 49-58. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00821-3](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00821-3)
- Kubicek, K. M., & Conway, K. W. (2015). Developmental osteology of *Sciaenops ocellatus* and *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae), economically important sciaenids from the western Atlantic. *Acta Zoologica*, 97(3), 267-301. <https://doi.org/10.1111/azo.12122>
- Kvellestad, A., Høie, S., Thorud, K., Tørud, B., & Lyngøy, A. (2000). Platyspondyly and shortness of vertebral column in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-description and interpretation of pathologic changes. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 39, 97-108. <https://doi.org/10.3354/dao039097>
- Lall, S. P. y Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture*, 267(1-4), 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.053>
- Landis, W. (1995). The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*, 16(5), 533-544. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00076-p](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00076-p)
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(35), 12748-12753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>
- Maisey, J.G., (2000). *Discovering Fossil Fishes*. Westview Press, Boulder Colorado.
- Majeed, Z., Ajab, Z., Zuberi, A., Akhtar, S., & Muhammad, A.A. (2018). Meristic variations and skeletal deformities in natural population of mahseer fish, *Tor putitora* (Hamilton, 1822). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 17, 208-216. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.115612>
- Marino, G., Boglione, C., Bertolini, B., Rossi, A., Ferreri, F., & Cataudella, S. (1993b). Observations on development and anomalies in the appendicular skeleton of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, larvae and juveniles. *Aquaculture Research*, 24(3), 445-456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00568.x>

- Matsuoka, M. (2003). Comparison of Meristic Variations and Bone Abnormalities between Wild and Laboratory-Reared Red Sea Bream. *Japan Agricultural Research Quarterly JARQ*, 37(1), 21-30. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.21>
- Mazurais, D., Glynatsi, N., Darias, M. J., Christodouloupoulou, S., Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J., & Koumoundouros, G. (2009). Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294(3-4), 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.008>
- McCully, H. H. (1962). The relationship of the Percidae and Centrarchidae to the Serranidae as shown by the anatomy of their scales. *American Zoologist* 2, 430. En Archivo PDF.
- Mise, F. T., Tencatt, L., & Santos, B. F. D. (2017). Record of morphological deformities in *Corydoras aff. longipinnis* in two reservoirs under urban influence in Upper Iguaçú and Southern Coastal basins in Paraná State, Brazil. *Biota Neotropica/Biota Neotropica*, 17(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0230>
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Bernhard, M., Schaefer, K., & Bookstein, F. L. (2004). Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal Of Human Evolution*, 46(6), 679-698. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2004.03.006>
- Moore, C. J., & Hixson, J. H. (1977). Incidence of Crooked Vertebral Columns in Adult Potomac River White Perch, *Morone americana*. *Copeia*, 1977(2), 384–387. <https://doi.org/10.2307/1443924>
- Moro, L., Romanello, M., Favia, A., Lamanna, M. P., & Lozupone, E. (2000). Posttranslational Modifications of Bone Collagen Type I are Related to the Function of Rat Femoral Regions. *Calcified Tissue International*, 66(2), 151-156. <https://doi.org/10.1007/s002230010030>
- Nie, C., Zhang, N., Chen, Y., Chen, Z., Wang, G., Li, Q., & Gao, Z. (2021). A comparative genomic database of skeletogenesis genes: from fish to mammals. *Comparative Biochemistry And Physiology Part D Genomics And Proteomics*, 38, 100796. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100796>
- Nguyen, V. T., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., & Kotani, T. (2008). Effect of zinc and manganese supplementation in *Artemia* on growth and vertebral deformity in red sea bream (*Pagrus major*) larvae. *Aquaculture*, 285(1-4), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.030>
- Okamoto, T., Kurokawa, T., Gen, K., Murashita, K., Nomura, K., Kim, S., Matsubara, H., Ohta, H., & Tanaka, H. (2009). Influence of salinity on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*, at completion of yolk resorption. *Aquaculture*, 293(1-2), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.005>
- Owen, M., Eynon, B., Woodgate, S., Davies, S., & Fox, S. (2012). Increased water current induces micro-architectural changes to the vertebral bone of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 344-349, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.001>
- Park, E., & Kim, D. S. (1984). A Procedure for Staining Cartilage and Bone of Whole Vertebrate Larvae While Rendering All Other Tissues Transparent. *Stain Technology*, 59(5), 269-272. <https://doi.org/10.3109/10520298409113869>

- Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013). Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(8), 909–922. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23992>
- Pierre, S., Gaillard, S., Prévot-D'Alvise, N., Aubert, J., Rostaing-Capaillon, O., Leung-Tack, D., & Grillasca, J. (2007). Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquatic Conservation Marine And Freshwater Ecosystems*, 18(3), 297-308. <https://doi.org/10.1002/aqc.840>
- Printzi, A., Jodet, S., Fournier, V., Collet, S., Madec, L., Simon, V., Zambonino-Infante, J., Koumoundouros, G., & Mazurais, D. (2024). Effect of early peptide diets on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) skeletal development. *Aquaculture*, 740657. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740657>
- Puvanendran, V., Calder-Crewe, C., & Brown, J. A. (2009). Vertebral deformity in cultured Atlantic cod larvae: ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture Research*, 40(14), 1653-1660. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02268.x>
- Ridruejo, J. S., Arribas, C. B., Alvarado, E. A., De León Luis, J. A., Aldarete, F. G., & Fernández-Pacheco, R. P. (2011). Malformaciones esqueléticas: diagnóstico ecográfico y resultados perinatales. *Diagnóstico Prenatal*, 22(1), 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2010.01.005>
- Roberts, R. J. (2012d). *Fish pathology* (4.^a ed.). John Wiley & Sons.
- Saavedra, M., Barr, Y., Pousão-Ferreira, P., Helland, S., Yúfera, M., Dinis, M. T., & Conceição, L. E. C. (2009). Supplementation of tryptophan and lysine in *Diplodus sargus* larval diet: effects on growth and skeletal deformities. *Aquaculture Research*, 40(10), 1191-1201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02219.x>
- Saavedra, M., Conceição, L. E. C., Barr, Y., Helland, S., Pousão-Ferreira, P., Yúfera, M., & Dinis, M. T. (2010). Tyrosine and phenylalanine supplementation on *Diplodus sargus* larvae: effect on growth and quality. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02446.x>
- Setiadi, E., Tsumura, S., Kassam, D., & Yamaoka, K. (2006). Effect of saddleback syndrome and vertebral deformity on the body shape and size in hatchery-reared juvenile red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Perciformes: Serranidae): a geometric morphometric approach. *Journal Of Applied Ichthyology*, 22(1), 49-53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00524.x>
- Shiozawa, S. (2006). II-4-(4) Health of juvenile. Production Technique of Juvenile Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Research Agency, Yokohama, Japan*, 39-42. En Archivo PDF
- Silva, T. S., Cordeiro, O., Richard, N., Conceição, L. E., & Rodrigues, P. M. (2010). Changes in the soluble bone proteome of reared white seabream (*Diplodus sargus*) with skeletal deformities. *Comparative Biochemistry And Physiology Part D Genomics And Proteomics*, 6(1), 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.03.008>
- Sire, J., Huysseune, A., & Meunier, F. J. (1990). Osteoclasts in teleost fish: Light-and electron-microscopical observations. *Cell And Tissue Research*, 260(1), 85-94. <https://doi.org/10.1007/bf00297493>
- Sire, J., & Huysseune, A. (2003). Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. *Biological Reviews/Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society*, 78(2), 219-249. <https://doi.org/10.1017/s1464793102006073>

- Sire, J., & Akimenko, M. (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *The International Journal Of Developmental Biology*, 48(2-3), 233-247. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272389>
- Sfakianakis, D., Koumoundouros, G., Divanach, P., & Kentouri, M. (2003). Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, 232(1-4), 407-424. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.014>
- Smith, T. I. J., Jenkins, W. E., & Snelvel, J. F. (1985). Production characteristics of striped bass (*Morone saxatilis*) and F1, F2 hybrids (*M. saxatilis* and *M. chrysops*) reared in intensive tank systems¹. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 16(1-4), 57-70. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00187.x>
- Steingraeber, M. T. y Gingerich, W. H. (1991). Hatching, growth, ion accumulation, and skeletal ossification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) alevins in acidic soft waters. *Canadian Journal Of Zoology*, 69(8), 2266-2276. <https://doi.org/10.1139/z91-317>
- Taniguchi, N., Azuma, K., & Umeda, S. (1984). Difference due to Parents in Incidence of Vertebral Malformation in Artificially-bred Red Seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50(5), 787-792. https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=201902021466582804
- Topp, R. W. & Cole, C. F. 1968. An osteological study of the sciaenid genus, *Sciaenops* Gill (Teleostei, Sciaenidae). *Bulletin of Marine Science* 18, 902–945.
- Toro Ibacache, María Viviana, Manriquez Soto, Germán, & Suazo Galdames, Iván. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*. 28(4), 977-990. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000400001>
- Valgasholm, N., y Djupvik, N. (1998). Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal Of Fish Diseases*, 21(1), 47-53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00069.x>
- Waagbø, R. (2006). Chapter 13 Feeding and disease resistance in fish. En *Biology of growing animals* (pp. 387-415). [https://doi.org/10.1016/s1877-1823\(09\)70100-6](https://doi.org/10.1016/s1877-1823(09)70100-6)
- Williams, E. P., Peer, A. C., Miller, T. J., Secor, D. H., & Place, A. R. (2011). A phylogeny of the temperate seabasses (Moronidae) characterized by a translocation of the mt-nd6 gene. *Journal Of Fish Biology*, 80(1), 110-130. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03158.x>
- Witten, P. E., Hansen, A., & Hall, B. K. (2001). Features of mono- and multinucleated bone resorbing cells of the zebrafish *Danio rerio* and their contribution to skeletal development, remodeling, and growth. *Journal Of Morphology*, 250(3), 197-207. <https://doi.org/10.1002/jmor.1065.abs>
- Witten, P. E., Obach, A., Huysseune, A., & Baeverfjord, G. (2006). Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture*, 258(1-4), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.005>
- Yamamoto, E. (2004). Vertebral Fusion in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* and Prevention. Text Book of 2008 Practical Course of Fish Farming Technology, Technical Approaches to Prevent Morphological Abnormality in Flounder Seed Production. Japan Sea Farming Association, Tokyo.

Ytteborg, E., Baeverfjord, G., Torgersen, J., Hjelde, K., & Takle, H. (2010). Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Physiology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-12>

Zelditch ML (2004) Introduction: in geometric morphometric for biologist. Elsevier Ltd:1–8p

Zelditch, M., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Academic Press.