Uso de técnicas para aclaración y tinción de estructuras óseas y cartilaginosas en estudios taxonómicos en larvas de peces planos (Pleuronectiformes)

*Ramiro Flores Vargas
**María del Carmen Navarro Rodríguez
*José Ángel Hinojosa Larios
**Luis Fernando González Guevara

*Departamento de Estudios para el Desarrollo Sustentable de Zonas Costeras, Centro Universitario de la Costa Sur
**Departamento de Ciencias, Centro Universitario de la Costa

Uso de técnicas para aclaración y tinción de estructuras óseas y cartilaginosas en estudios taxonómicos en larvas de peces planos
(Pleuronectiformes)

Ramiro Flores Vargas
María del Carmen Navarro Rodríguez
José Ángel Hinojosa Larios
Luis Fernando González Guevara

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de la Costa
2005

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

José Trinidad Padilla López
Rector general

Itzcóatl Tonatiuh Bravo Padilla
Vicerrector ejecutivo

Carlos Jorge Briseño Torres
Secretario general

CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA

Javier Orozco Alvarado
Rector

Melchor Orozco Bravo
Secretario académico

Antonio Ponce Rojo
Secretario administrativo

Primera edición, 2005

D.R. © 2005, Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de la Costa
Av. Universidad 203, Delegación Ixtapa
48280 Puerto Vallarta, Jalisco, México

ISBN 970-27-0608-4

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

Índice

Introducción /7

Aspectos biológicos y ecológicos /9

Aspectos taxonómicos /13

Antecedentes /19

Material y método /21

Resultados /29

Conclusiones /39

Bibliografía /43

Introducción

Al hablar de la biología como la ciencia que estudia los seres vivos que habitan el planeta, un tema sumamente indispensable es el conocimiento de la gran diversidad que el mismo alberga. Para ello, algunas herramientas de valor indiscutible para el conocimiento y clasificación de los organismos es sin duda lo que hoy conocemos como sistemática y taxonomía. Los peces como cualquier organismo vivo son apropiados para este tipo de estudios debido a que son abundantes en número, forma y tamaño. Para su identificación se pueden utilizar características morfológicas como lo son colores, formas, tallas y longitudes de aletas, bocas, ojos etc., así como patrones conductuales y fisiológicos. Sin embargo, lo más práctico es utilizar la morfología del organismo en cuestión para definir su identidad. Esto se torna difícil si los organismos que necesitamos identificar se encuentran en estadios juveniles y aun más en estadios larvales, ya que en ocasiones, las claves utilizadas para su identificación mencionan algunos aspectos que no son fáciles de definir si el organismo que tenemos no concuerda exactamente con las características descri-

tas en las claves. Aunado a lo anterior, el grupo de larvas de peces pleuronectiformes presenta características que se pierden durante su desarrollo (transitorias) y otras que se conservan (permanentes) lo que los hace aún más difícil de identificar. Por tal motivo, este trabajo es considerado de suma importancia; ya que brinda una serie de elementos útiles no solo para la zona estudiada donde existen pocos trabajos al respecto, si no para la ictiología en general, al permitir por medio de las técnicas de aclaración y tinción descritas, tener una mayor certeza en la correcta identificación de los organismos. Finalmente, cabe mencionar que además, las técnicas descritas aportan información que puede ser utilizada para otros grupos de larvas y juveniles de peces, caracterizándose por su gran versatilidad.

Mirella Saucedo Lozano

Aspectos biológicos y ecológicos

Los pleuronectiformes o peces planos como su nombre lo señala son de cuerpo anatómicamente aplanado y dependiendo de la especie, pueden ser ovalados o alargados con apariencia de punta de lanza, su distribución y abundancia al igual que en la mayoría de las especies de peces es cosmopolita, por lo que es común capturarlos en todos los mares y océanos del mundo.

Es un grupo de teleósteos bastante especializados, debido a que su anatomía corporal en la fase adulta les permite permanecer relativamente fijos a la superficie del fondo marino en donde son muy abundantes, otro aspecto que también contribuye con la especialización de estos organismos es la ubicación de ambos ojos situados en la parte superior de la cabeza, lo que les permite presentar una amplia adaptación y distribución en infinidad de sustratos blandos del fondo marino, esta característica es descrita como una posición asimétrica de los ojos conocida como *synapomorphy* presente únicamente en peces pleuronectiformes.

Sin embargo, durante la transición de estadio larval a postlarval y durante la etapa de prejuvenil, presen-

tan simetría bilateral, lo que significa que a partir de la eclosión y durante el desarrollo postlarval, son comparativamente idénticas con cualquier otro tipo de larvas de las diferentes especies de peces que se encuentren en el mismo medio, esta simetría bilateral desaparece a medida que se transforman de juveniles a organismos adultos (Brewster, 1987) (Figuras 1 y 2).

Las características de mayor relevancia que identifican a estas especies en su medio, es el aspecto biológico y el ecológico dada la abundancia que representan la gran mayoría de estas especies, por lo que en los ecosistemas marinos, estos organismos son uno de los componentes de mayor importancia que se relacionan con las cadenas alimenticias formando asociaciones con otros grupos de peces (Tucker, 1982).

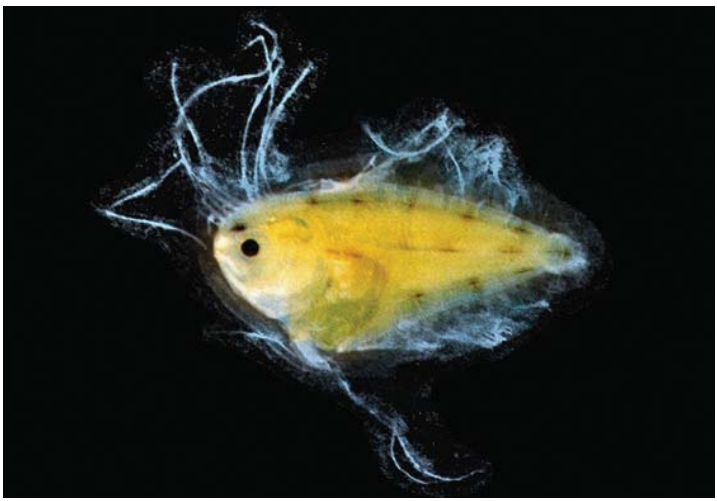


Figura 1 Simetría bilateral presente en un ejemplar de *Cyclopsetta panamensis* (25 mm de longitud).

La mayoría de las especies del orden Pleuronectiforme en su etapa adulta, se distribuyen ampliamente sobre el fondo marino correspondiente al área de la plataforma continental, esta particularidad les permite permanecer en estrecha relación con el medio, formando parte de las comunidades bentónicas asociadas al sustrato, que por lo general es de consistencia blanda y, de los cuales los más comunes se encuentran compuestos principalmente por fango y arena. Por otro lado, existen especies tolerantes a bajas concentraciones de salinidad, situación que les permite distribuirse de forma temporal e incluso permanente en la mayoría de los sistemas estuarinos costeros como es el caso de la Familia Achiridae y con frecuencia llegar a encontrarse de forma moderada en los cauces de los ríos (Allen *et. al.*, 1998).

Los pleuronectiformes, al igual que la mayoría de los peces son ovíparos, por lo que es común encontrar especies en reproducción con una alta tasa de puestas con numerosos huevecillos, tal es el caso de *Paralichthys californicus*, que presenta puestas con 1.6 a 7.7 millones de huevecillos de 5-13 veces por temporada la cual pude durar aproximadamente de dos semanas a un mes (Moser *et. al.*, 1996).

Por otro lado, estos peces han desarrollado patrones de pigmentación que les permiten cambiar con rapidez el color de su cuerpo, para confundirse con el sustrato de su entorno, ya sea como una estrategia para su sobrevivencia o bien para atrapar a sus presas, estos organismos se alimentan principalmente de peces y crustáceos bentónicos, debido a este hábito alimentario, lle-

gan a ser con frecuencia el componente de peces demersales, más común en los lances de arrastre durante la captura del camarón (Coronado-Molina y Amezcua-Linares, 1988; Van der Heiden y Mussot-Pérez, 1995; Aguilar-Palomino *et. al.*, 1996; Allen *et. al.*, 1998 y Mariscal-Romero *et. al.*, 1998).

Aspectos taxonómicos

Los lenguados, peces planos o medios, como comúnmente se les conoce, son fáciles de identificar a primera vista tomando como referencia el aspecto aplanado de su cuerpo, la ubicación de ambos ojos ya sea del lado izquierdo o bien del lado derecho (situación que es poco frecuente) de su cuerpo, las aletas dorsal y anal, las que pueden ser continuas como las que se presentan en la familia Cynoglossidae, o bien discontinuas, observadas principalmente en las especies de la familia Paralichthyidae. En la mayoría de estos organismos las aletas, principalmente la dorsal se origina a partir de la primera vértebra en dirección a los ojos, en tanto que la segunda aleta anal inicia en dirección a las branquias, presentándose en ambas aletas numerosos radios segmentados (Moser, 1996).

Debido a la similitud que presentan las diferentes especies de lenguados, durante sus primeras fases de vida, es común encontrar cierto grado de dificultad en su identificación, principalmente si se pretende identificar el desarrollo anatómico y/o morfológico de las estructuras que se van presentando o modificando duran-

te las diferentes etapas del desarrollo larval de este grupo de peces. El abordar aspectos sobre la taxonomía, puede en un principio manifestarse como un verdadero problema, por lo que se presenta la necesidad de llevar a cabo investigaciones que en cierta medida surgen como una iniciativa de algunos autores y que finalmente a partir de múltiples ensayos con diversas técnicas de aclaración y tinción, se llegan a obtener las metodologías adecuadas para su aplicación, cuyo principio es el de difundirlas para ser utilizadas como una herramienta que facilite los trabajos taxonómicos realizados en la identificación de los organismos.

Una de las metodologías que presentan mejores resultados sobre los aspectos taxonómicos de las especies, es la aplicación de las técnicas de transparentación y tinción de su endoesqueleto, técnicas que han sido desarrolladas con mayor frecuencia en las larvas de peces de clupeidos, carángidos y pleuronectiformes.

A través de esta metodología se ha ido superando la antigua práctica de la descripción de los organismos mediante la utilización de las características externas como son: los patrones de pigmentación, los tipos de aletas dorsal, anal y caudal, la forma, el ancho y alto del cuerpo, de la cabeza y de la boca, la posición de los ojos, la diferencia entre el tamaño de los radios dorsales y pélvicos, entre otros.

La identificación de los organismos a través de esta práctica cuando no se tiene la habilidad y experiencia necesaria para la descripción de los especimenes, se presenta cierto grado de confusión, principalmente si el trabajo de identificación no cuenta con otras técnicas

de apoyo, un ejemplo claro de esta situación es observada durante la identificación de las larvas de peces del orden Pleuronectiforme. Sin embargo, todo ésto se ha podido minimizar, a partir de estudios detallados sobre el desarrollo osteológico de diferentes grupos de peces descritos en los trabajos de Dunn (1983) y Munroe (1990) (Figura 2).

Con respecto a los trabajos de investigación enfocados principalmente a la taxonomía y sistemática del ictioplancton, es muy frecuente encontrar que algunos investigadores, se apoyen en los principios de técnicas de aclaración y tinción, ya que éstas se pueden modificar y ajustar de acuerdo a la talla y nivel de osificación del espécimen a estudiar, destacando que el método se basa principalmente en el empleo de colorantes bási-

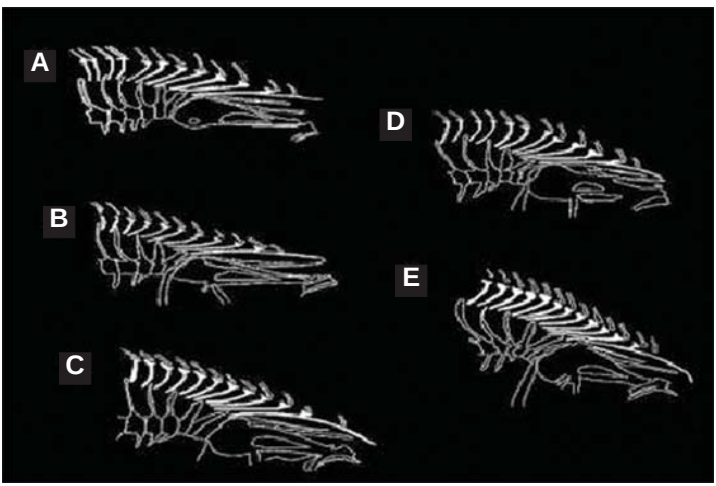


Figura 2 Patrón de interdigitación e inserción de los primeros tres radios dorsales en *Symphurus neubulosus*, (a) 1-2-3; (b) 1-3-2 y (c) 1-3-3, y *S. trewavasea*. (d) 1-4-2 y (e) 1-4-3 (Munroe, 1998).

cos como son: el *rojo alizarina*, *azul alciano* y *azul de toluidina* que reaccionan positivamente en el proceso de tinción de cartílago y hueso en larvas y juveniles de peces (Ahlstrom, 1983; Dunn, 1983).

Otro método utilizado en el análisis de las estructuras óseas en estadios larvales de peces, es la aplicación de la radiografía propuesta por Tucker (1982) sin embargo, el uso de esta técnica sólo permite obtener información sobre estructuras óseas de organismos adultos, presentando el inconveniente de omitir información sobre estructuras cartilaginosas principalmente si se trata de embriones y organismos en etapas larvales, por lo que se hace énfasis en que las técnicas de aclaración y tinción, es el método más práctico y apropiado que permite describir con mayor detalle el desarrollo osteológico y morfológico en larvas y juveniles de

Figura 3 Migración del ojo derecho hacia el lado izquierdo en un juvenil del género *Symphurus* (40mm longitud).

peces para fines taxonómicos de estos organismos (Ahlstrom, 1983).

Moser (1984), señala que no sólo las características morfológicas y merísticas pueden ser de gran valor en la identificación de las larvas de peces a nivel familia, orden o suborden, sino que también es importante conocer el desarrollo larval de las especies, como la forma anatómica, por ejemplo, destacando entre ellas el aspecto y posición de las aletas, además de aquellas características que en su momento pudieran ser utilizadas en estudios sobre la taxonomía y sistemática de las especies de peces (Figura 3).

Sobre este aspecto Dunn (1983) señala que para realizar trabajos sobre taxonomía en larvas de peces, es fundamental conocer las estructuras merísticas de los adultos, debido a que algunos trabajos carecen de

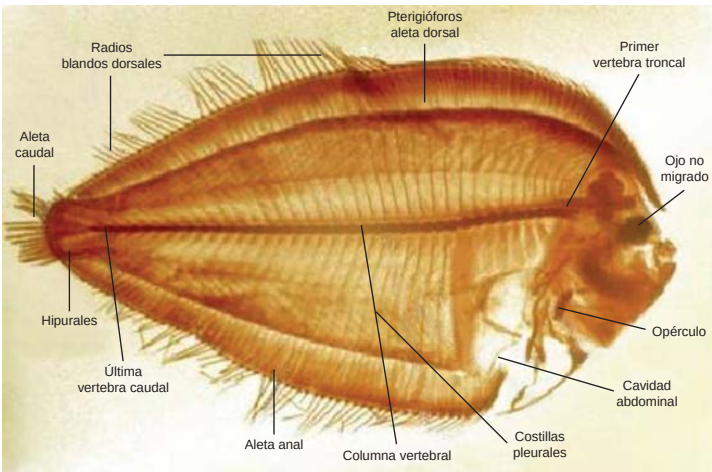


Figura 4 Esquema de las estructuras cartilaginosas y óseas más importantes en una post larva de *Botus leopardinus.*

detalles específicos sobre estructuras óseas de los adultos y cuando se realiza el análisis de la estructura cartilaginosa en las larvas de peces, los resultados son la obtención de una identificación errónea de aquellas especies que por primera vez se pretenden identificar (Figura 4).

Antecedentes

Las investigaciones sobre técnicas de aclaración y tinción de estructuras óseas y cartilaginosas, han sido fundamentales en el campo de la investigación en materia del ictioplancton, aplicadas principalmente en la identificación y taxonomía (Simons and Van Horn, 1971; Griffiths *et. al.*, 1976), así como los trabajos realizados por Potthoff, (1974); Potthoff, (1975); Potthoff, (1980); Potthoff, (1982); Potthoff, (1984); Munroe, (1992) y Aceves, (1992).

En el presente trabajo, el principal objetivo que se plantea es el uso y aplicación de técnicas de aclaración y tinción sobre estructuras óseas y cartilaginosas para la descripción taxonómica de las especies de peces pleuronectiformes, en etapas larvales.

Material y método

El material ictioplanctónico estudiado se obtuvo en 12 estaciones de muestreo situadas a lo largo de la plataforma continental de Jalisco y Colima cubriendo una superficie marina de 414 km^2. Las estaciones fueron ubicadas de acuerdo a la batimetría del área entre los 50 y 100 m de profundidad, los arrastres fueron nocturnos de forma oblicua con una trayectoria semicircular mediante el empleo de una red tipo Bongo de dos mangas de 333 y 505 mm de luz de malla (3.0 m de largo y 0.60 m de diámetro), las muestras fueron preservadas con formalina al 4% y neutralizada con una solución saturada de borato de sodio.

La identificación de los especimenes se realizó en dos fases:

La primera fase consistió en la identificación de los organismos mediante el empleo de las claves para la descripción de estructuras externas conforme a los criterios de Moser (1996).

En la segunda fase se corroboran los datos obtenidos en la primera fase, mediante la aplicación de las técnicas de tinción, empleando una muestra represen-

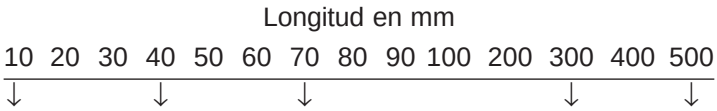
tativa de las especies correspondientes a las familias Bothidae, Paralichthidae y Cinoglossidae, con tallas de entre los 0.2 a los 40 mm de longitud.

De acuerdo al grado de dificultad durante la identificación de las larvas de las especies de las familias Bothidae, Paralichthidae y Cynoglossidae se utilizó el método de aclaración y tinción específico para estructuras óseas y cartilaginosas en larvas de peces propuesto por Potthoff (1984), así como el empleo de la fórmula de Interdigitación propuesta por Moser (1986) y Mouroe (1992), en tanto que en las larvas de las familias Bothidae y Paralichthidae sólo se empleo el método de Potthoff (1984) únicamente para corroborar el conteo de vértebras y radios totales en cada especie.

El método (Potthoff, 1984) se ensayó hasta obtener el punto óptimo de su aplicación, cabe señalar que la talla fue clave en cada uno de los pasos correspondientes al método, un ejemplo observado fue, si la talla en el espécimen es de 10 cm el proceso de fijación tendrá una duración en promedio de un día, si ésta corresponde de los 20 y 30 cm el proceso tendrá una duración aproximada de dos días, y así de forma sucesiva. Cabe hacer la aclaración, que para el presente trabajo, el método de Potthoff (1984), fue modificado por los autores únicamente en el proceso de adelgazamiento del tejido de las larvas (punto 3, tabla inferior), retirando el exceso de tejido mediante el empleo de un estereoscopio óptico, pinzas y aguja de disección. Sobre la base de las múltiples pruebas aplicadas a larvas de peces, se obtuvo que un tratamiento lento con una duración de 8 a 10 días, fue un factor clave, que permitió obtener con-

tinuidad en cada uno de los pasos de la metodología y de esta forma llegar a los resultados derivados de la presente investigación.

De acuerdo a la metodología, la duración de cada uno de los tratamientos se establece en tiempo de 24 horas, o en días, tomando como base la longitud de las tallas en cada uno los especimenes previamente especificadas con flechas en la regla inferior, mismas que se toman como base para establecer el tiempo requerido para la aplicación de cada uno de los tratamientos descritos a continuación.



1) Fijación: durante este paso se trata a cada organismo mediante el empleo de una solución diluida de formalina del 10-15%, según la talla la duración será de:

1día	2 días	3 días	5 días

2) Deshidratación: en este paso se emplea una solución de 50% de etanol al 95%.

1 día	2 días	3 días	5 días

De acuerdo a la metodología establecida por Potthoff (1984) se puede utilizar para la deshidratación de los especimenes una solución de etanol absoluto al 95%.

1 día	2 días	3 días	7 días

Nota: en este trabajo se utilizó una solución del 50% de etanol absoluto al 95% para la deshidratación, ya que se presentó una consistencia blanda y manejable del espécimen, y que al utilizarse la solución del etanol absoluto al 95%, se observó que los organismos presentaron un endurecimiento de los tejidos impidiendo el proceso correcto de tinción.

Adelgazamiento y transparentación

3) Posterior a la fase de fijación, los organismos fueron sometidos a un proceso de adelgazamiento de tejido bajo un tratamiento lento con una duración de 8 a 10 días mediante la aplicación de una solución de KOH (hidróxido de potasio) al 0.01%, facilitando una observación precisa de las estructuras óseas del organismo.

a) Neutralización del efecto de KOH (hidróxido de potasio), mediante una solución saturada de Borato de Sodio.

½ día	2 días

Tinción

4) Tinción de cartílago:

a) Se emplearon 100 ml de una solución combinada de 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de ácido acético por 20 mg de azul alciano (solución A).

b) Segunda opción, es con una solución de 100 ml con 60 ml de etanol absoluto, 40 ml de ácido acético y 30 mg de azul alciano (solución B).

1 día	1½ días	2 días
Solución A	Solución B	

Se recomienda utilizar la solución A cuando el tejido es menos denso ya que presenta una tinción óptima, en tanto que el empleo de la solución B es más eficáz en tejidos de mayor densidad, sin embargo, en ambos tratamientos se recomienda observar continuamente el proceso para evitar una sobresaturación de colorante.

5) Para neutralizar el proceso de tinción se empleó una solución de alcohol etílico al 70%.

1 hora	1½ horas

6) Aclaración de pigmentos o manchas externas en larvas:

Para aclarar los pigmentos y manchas, se emplea una solución al 50% de peróxido de hidrógeno.

20 min.	40 min.	1 hora

También se recomienda que durante este proceso se observe cuidadosamente el tiempo de aclaración, ya que éste varía dependiendo de la talla del organismo y tamaño del pigmento o mancha, si se excede el tiempo puede ocurrir la degradación total del organismo.

7) En el proceso de tinción de hueso se emplea una solución de KOH al 1% y rojo alizarina al 1%, con un tiempo de fijación de:

30 min. 1 hora

En este paso se recomienda hacer observaciones continuas para no sobrepasar el grado de tinción con respecto al que se desea obtener.

8) Decoloración: este paso solo se llevará a cabo siempre y cuando el grado de tinción de los organismos se haya excedido. Se recomienda utilizar una solución al 50% de alcohol etílico, el tiempo es variable y generalmente es menor a los 20 minutos, una vez que se observa el tono del color deseado, posteriormente los organismos son sometidos a un lavado con agua destilada para eliminar los residuos del colorante, dejándolos reposar un día.

Preservación

Para la fase de preservación de los organismos teñidos se emplea una solución de glicerina al 70%, ya que se requiere una menor viscosidad.

El tiempo de conservación es de 1 a 4 meses, a una temperatura promedio de 28º C, sin embargo, puede alargarse su preservación manteniéndolos en refrigeración a una temperatura de 4º C.

Es recomendable utilizar una solución de 30% de glicerina y un 70% de hidróxido de potasio al 1% y/o

una solución de 60% de glicerina y un 40% de hidróxido de potasio, debido a que puede presentarse contaminación por hongos, originada por los diversos factores ambientales ocasionando la destrucción del material, se recomienda cambiar la solución preservadora continuamente en caso de contaminación.

Resultados

LOS RESULTADOS OBTENIDOS sobre las estructuras de cada una de las especies de larvas y juveniles de peces pleuronectiformes procesadas mediante la técnica de aclaración y tinción fueron positivos, correspondiendo en su mayoría con las características descritas en la literatura específica para este grupo, principalmente para la Familia Cynoglossidae.

A continuación se describen aspectos generales de cada una de las especies tratadas bajo esta técnica, así como el patrón de las estructuras óseas de mayor importancia obtenido en cada una de ellas:

Symhpurus elongatus. Especie descrita por Gunther (1968), identificada en su ambiente natural como «Lengua clara fina» esta especie, forma parte de la comunidad íctica de peces tropicales, del Pacífico Central Mexicano capturados en la costa de Jalisco y Colima, comúnmente estos organismos habitan en el medio marino en áreas de aguas someras con profundidades de 1 a 100 m, su distribución considera desde el Golfo de California hasta el Ecuador, son especies que se distribuyen con regularidad en sistemas estuarinos costeros

(Moser, 1996). En el área de estudio se obtuvo un registro de 97 organismos, capturados entre las isobatas de 40 y 80 m con tallas desde 0.2 a 60 mm. Mediante la aplicación del método de aclaración y tinción (Figura 5), se obtuvo un conteo de 96 radios dorsales, 80 anales, 12 caudales, 51-52 vértebras y un ID pattern (patrón de interdigitación de los primeros radios dorsales, proximales, espinales y neurales) 1, 5, 3, (se refiere al número de radios insertados en las tres primeras vértebras ver ejemplo, figura 2).

Symhpurus chabanaudi. Especie descrita por Mahandeva y Munroe (1990), conocida comúnmente como «Lengua de cauda obscura» habita en aguas someras de 1 a 60 m de profundidad, presenta una distribución desde el Golfo de California hasta el Perú. En el área de estudio, esta especie estuvo representada por 46 ejemplares con tallas bastante homogéneas de 20 mm de longitud, esta especie fue capturada a profundidades supe-

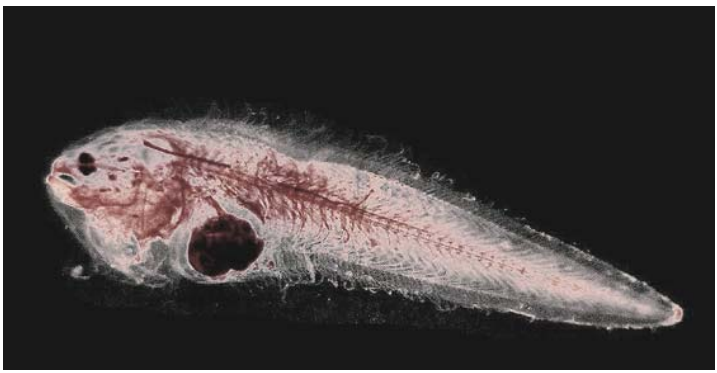


Figura 5 Aplicación del método de aclaración y tinción en un prejuvenil de *Symphurus elongatus* (35 mm de longitud).

riores de los 80 m. Hasta el momento de la elaboración del presente trabajo no existen reportes de la presencia de adultos, sin embargo es evidente que la población de adultos se distribuye y reproduce en áreas de influencia de la plataforma continental de Jalisco y Colima, formando parte de la comunidad íctica tropical distribuida en el Pacífico Central Mexicano, esta especie presentó: de 102 a 103 radios dorsales, de 84 a 86 anales y 12 caudales con un total de 53 vértebras, y una formula interdigital ID pattern de 1,5,3,2 radios (Figura 6).

Symhpurus atramentetus. Especie descrita por Robin and Bollman (1890), conocida como «Lengua tintorera» las larvas de esta especie fueron capturadas a profundidades de 80 m, su rango de distribución es desde Baja California Sur, Golfo de California hasta el Perú (Munro *et. al*., 1995), esta especie estuvo representada en el área de estudio por 80 ejemplares de tallas bastante homogéneas de aproximadamente 25 mm de lon-

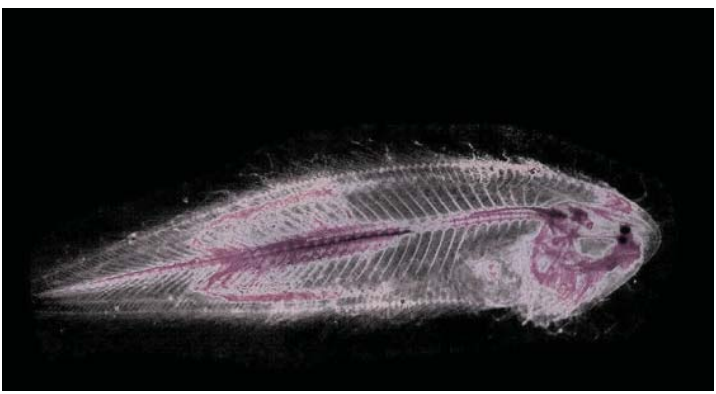


Figura 6 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en un ejemplar de *Symphurus chabanaudi* (30 mm de longitud).

gitud, hasta el momento el registro de larvas es el único dato que se tiene de esta especie en el área de estudio, desconociéndose aspectos generales de los organismos adultos.

Los resultados obtenidos del proceso de aclaración y tinción fueron un patrón de 90 radios dorsales, 75 anales y 12 caudales, con 49 vértebras en total y un ID pattern de 1, 3, 3, 2 (Figura 7).

Symhpurus williamsi. Descrita por Jordan y Culver (1895), es conocida como «Pez lengua» su hábitat esta relacionado principalmente en áreas someras de 1 m hasta los 52 m de profundidad. Su distribución en el Pacífico Tropical, se localiza de la región de Baja California Sur, el Golfo de California hasta el Perú. En el área de estudio esta especie fue registrada con un total de 15 organismos de tallas aproximadas a los 0.2 y 0.5 mm de

Figura 7 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en un ejemplar de *Symphurus atramentatus.*

longitud, su registro es único, no se cuenta con la descripción de adultos, sin embargo el hecho de haber encontrado organismos larvales plenamente identificados como *S. williamsi* permite constatar que zoogeográficamente esta especie forma parte de las comunidades ícticas distribuidas en el Pacífico Central Mexicano.

El patrón óseo y cartilaginoso obtenido para esta especie fue de 91 a 95 radios dorsales, 77 anales y 12 caudales, con 50 a 51 vértebras y con un ID pattern de 1, 5, 3, (Figura 8).

Respecto a la Familia Bothídae, específicamente en la especie: *Botus leopardinus* descrita por Gunther (1862) y Jordán y Bollman (1890), es conocida como «Lenguado leopardo del Pacífico», presenta una distribución batimétrica entre los 55 a 120 m y zoogeográficamente se encuentra desde Baja California Sur, Golfo de

Figura 8 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en un ejemplar de *Symphurus williamnsi.*

California hasta el Perú (Moser, 1996). En el área de estudio fueron capturados 18 organismos larvales, en la isobata de los 80 m de profundidad, el registro de tallas obtenidos fueron desde 0.2 hasta 25 mm de longitud.

Las larvas de *Engyophrys sanctilaurentia*, descritas por Gunther (1862) y Jordán y Bollman (1890), son conocidas como «Lenguado cola manchada» presentan un rango de distribución batimétrica de los 45 a 157 m de profundidad, su rango de distribución va desde Bahía Sebastián Vizcaíno, Baja California Sur hasta Panamá (Moser, 1996). En el área de estudio, únicamente fueron capturados cuatro organismos, de manera esporádica, los registros de tallas fueron de 0.4 a los 0.8 mm de longitud, la razón que puede justificar la escasa presencia de esta especie en el área de estudio, puede

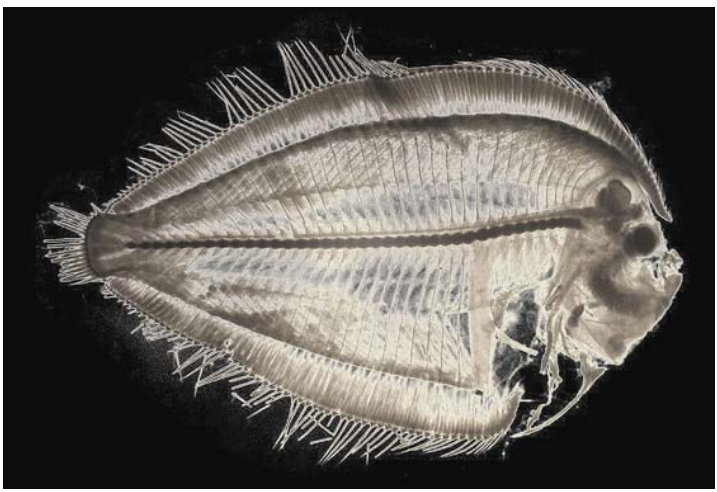


Figura 9 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en un ejemplar de *Botus leopardinu*.

estar en función del rango de distribución batimétrica de los adultos.

En lo que respecta a la aplicación de la técnica de aclaración y tinción de ambas especies, los resultados fueron los siguientes: en ambas se identificaron 88 radios dorsales, 71 anales, 17 caudales y 38 vértebras, cabe señalar que estas especies son bastante similares tanto en características externas como en el patrón óseo, a través de este proceso se lograron distinguir detalles que a simple vista no era posible como son: la curvatura de los cuatro radios de las primeras vértebras cervicales, la cavidad estomacal, la anchura de las estructuras operculares, diferente altura de la cabeza y amplia diferenciación en la estructura del hocico (Figuras 9 y 10).

Figura 10 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en un ejemplar de *Engyophrys sanctilaurentia*.

En las siguientes especies únicamente se detallan los resultados obtenidos mediante la técnica de tinción, debido a la singularidad de sus tallas no fue posible obtener las imágenes fotográficas.

Etropus corossotus (familia Paralichthydae) descrita por Jordan y Gilbert (1882), es conocida comúnmente como «Lenguado ribete» especie que de acuerdo a la captura de adultos realizada por Moser (1996), presenta un rango de distribución desde la parte central de Baja California, Golfo de California hasta el Perú, así como en aguas del Mar Caribe, costas de Brasil, e incluso en el Atlántico en la Bahía Chesapeake. En el área de estudio los registros estuvieron constituidos por 19 organismos en etapa larval con tallas aproximadas de 0.2 a 0.5 mm de longitud capturados en las isobatas de los 40 y 80 m de profundidad.

El conteo de las estructuras óseas y cartilaginosas fueron de 84 radios dorsales, 65 anales y 17 caudales, con 35 vértebras, datos corroborados y respaldados con las descripciones hechas para esta especie por Moser (1996).

En lo que respecta a *Paralichtys woolmani* especie descrita por Jordan y Williams (1897), es conocida como «Lenguado manchado o lenguado huarache» debido a cierto patrón de manchas que presenta en su cuerpo durante la fase adulta. Esta especie se distribuye desde Baja California Sur hasta el Perú y son capturadas frecuentemente en sistemas estuarinos a poca profundidad de 1 a 22 m. En el área de estudio esta especie estuvo representada por cinco organismos con tallas de 0.3 a 0.5 mm de longitud y capturadas a pro-

fundidades de los 40 y 80 m, a un cuando aparentemente fue poca la representatividad de esta especie, a nivel de adulto ha sido reportada por Aguilar-Palomino *et. al.*, (1996) para el área, como una especie abundante en la fauna de acompañamiento del camarón quedando plenamente identificada como parte de la fauna tropical distribuida en la plataforma continental de Jalisco y Colima.

Los resultados obtenidos del proceso de aclaración y tinción de esta especie, presentaron un total de 78 radios dorsales, 62 anales y 17 caudales, y 35 vértebras, resultados corroborados con la descripción hecha por Moser (1996).

Citharichtys platoprhrys especie descrita por Gillbert (1891), es conocida comúnmente como «Lenguado pequeño o lenguado zingua» y que se distribuye desde la región de Baja California Sur, el Golfo de California hasta el Perú (Moser, 1996), presenta una distribución batimétrica en áreas someras que van de los 11 a los 54 m de profundidad. En lo que respecta al área de estudio, esta especie estuvo representada por 12 ejemplares de tallas aproximadas de 0.3 a 0.5 mm de longitud y capturadas en la isobata de los 80 m, tomando como referencia la profundidad a la que fue capturada esta especie puede asumirse que se encuentra ampliamente distribuida en los primeros 200 m de la columna de agua formando parte de la comunidad íctica de afinidad tropical del área de estudio.

Los datos obtenidos a partir de la aplicación de la técnica de tinción en esta especie, fue de 78 radios dorsales, 61 anales y 17 caudales, con un total de 34 vérte-

bras, resultados corroborados con los de la descripción realizada para esta especie por Moser (1996).

Finalmente la especie *Syacium ovale* descrita por Gunther (1864), es conocida como «Lenguado ovalado» presenta una distribución desde Baja California Sur, Golfo de California hasta el Perú (Hensley, 1995). Esta especie fue la más abundante del resto de las especies, representada por 140 ejemplares capturados en las isobatas de los 40 y 80 m, presentando una diversidad de tallas desde los 0.2 a hasta los 12 mm de longitud, esta especie fue la que registró una mayor distribución con respecto a las especies antes mencionadas.

De la aplicación de la técnica de tinción se logró observar en *S. ovale* un patrón de 83 radios dorsales, 66 anales, 17 caudales y 34 vértebras (Figura 11) los cuales fueron corroborados con la descripción de esta especie por Moser (1996).

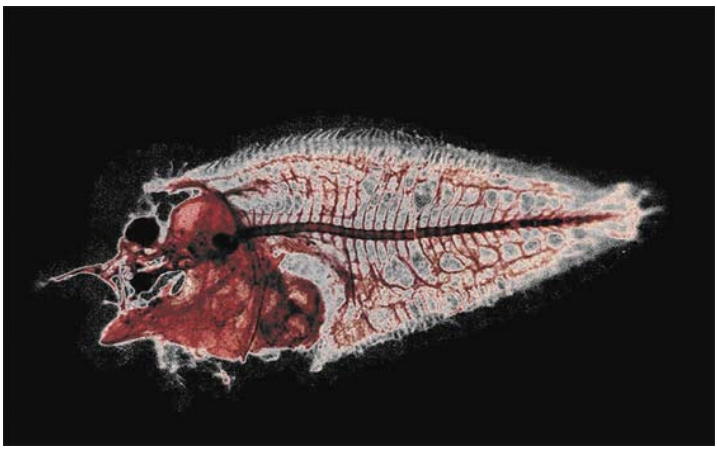


Figura 11 Proceso final de la aplicación de la técnica de aclaración y tinción en *Syacium ovale*.

Conclusiones

Se observó que el número de radios y vértebras en las especies tratadas, mediante el método de aclaración y tinción para estructuras óseas y cartilaginosas, pueden presentar variaciones, principalmente si se realiza en muestras representativas, de tal forma que se pueden encontrar diferencias de +2+3 radios o vértebras o bien, en forma inversa, es decir, puede ser menor el número de éstas, este aspecto en ningún momento indica que se estén manejando especies diferentes, son solo diferencias entre ellas que no interfieren con el patrón taxonómico descrito para cada una de ellas.

La clave principal que permitió la realización de un proceso adecuado del método de tinción, estuvo en función del tratamiento previo aplicado a cada organismo para obtener su adelgazamiento y transparentación, empleando una solución suave de KOH (hidróxido de potasio) al 0.01% durante 8 a 10 días, este tratamiento, bajo una estricta observación permitió eliminar y retirar el tejido de los organismos, dándole así un aspecto de transparencia y flexibilidad, permitiendo una mayor eficiencia del método de tinción.

Mediante la aplicación del método de tinción, se obtuvo una serie de datos que permitieron la identificación de diferentes especimenes determinando que en tallas de aproximadamente 3 mm se pierde nitidez, en tanto que, en los organismos de tallas superiores a los 40 mm de longitud el grosor de su tejido es un factor que limita y retarda el proceso de adelgazamiento.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se observó que una aplicación correcta de las soluciones, así como, una observación continua y el tiempo adecuado en cada uno de los pasos, permitieron identificar variables que inhibieron los resultados esperados.

Una de las variables identificadas, fue que durante el proceso de adelgazamiento, cuando no son neutralizados correctamente los residuos de KOH presentes en el tejido del organismo, éste continúa activo y puede destruir gradualmente al espécimen, para eliminar este efecto, se emplea una solución concentrada de Borato de Sodio inhibiendo el efecto del KOH (hidróxido de potasio).

Otro efecto similar al anterior, puede ocurrir durante la aclaración de pigmentos presentes en el tejido mediante el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), ya que el efecto prolongado de esta solución disuelve las estructuras óseas y cartilaginosas. Un tercer efecto identificado, es el exceso de tejido, pues este puede absorber demasiado color alterando la calidad de la visión del esqueleto presentando como resultado una figura demasiado opaca.

Durante la aplicación del método de tinción, se observó que no siempre en la primera aplicación del méto-

do se obtienen los resultados esperados, ya que en alguno de los procesos se pueden presentar efectos negativos, lo que implica iniciar nuevamente el proceso.

La aplicación del método de tinción de Potthoff (1984), con algunos ajustes en la técnica, demostró ser una alternativa de apoyo importante en la identificación de estructuras óseas y cartilaginosas, tanto de larvas y juveniles de peces Pleuronectiformes como del ictioplancton en general.

Bibliografía

Aceves Medina, G., R.J. Saldierna y M.E. Hernández. 1992. Variación diurna de la abundancia de larvas de peces en la Boca de Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. Rev. Inv. Cient. 3 (1): 61-69.

Aguilar-Palomino, B., J. Marical-Romero, G. González-Sansón y L.E. Rodríguez-Ibarra. 1996. Ictiofauna demersal de fondos blandos de la plataforma continental de Jalisco y Colima, México, en la primavera de 1995. Ciencias Marinas 22(4):469-481.

Ahlstrom, E.H. 1983. Ontogeny and systematics of fishes. No.1 American Society of Ichthyologistmand Herpetologists 35-44 pp.

Allen, G.R. y D.R. Robertson. 1998. Peces del Pacífico Oriental Tropical. Universidad de Honolulu, Hawai press. 327 p.

Brewester, B. 1987. Eye migration and cranial development durin Flatfish metamorphosis: a reapprasal (Teleostei: Pleuronectiformes). J. Fish Biol. 31: 805-833.

Coronado-Molina, C.A. y F. Amezcua-Linares. 1988. Distribución y Abundancia de los Peces Demersales

de las Costas de Guerrero en el Pacífico Mexicano Ciencias del Mar y Limnología 15 (2): 67-93.

Dunn, J.R. 1983. The utility of developmental osteology in taxonomic and systematic studies of teleost larvae: A reviw. NOAA Tecnical Report NMFS circular 450, pp. 1-19.

Griffiths, F.B., B.K. Fleminger y M. Vannucci. 1976. Shipboard and curating teccniques. In: UNESCO (ed.) Zooplankton fixation and preservation. Monogr.Oceanogr.Methodol, pp. 17-31.

Hensley, D.A. 1995. Paralichthyidae lenguados, p. 349. En: W. Fisher, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. Guía FAO para la Identificación de especies para los fines de la pesca, Pacífico Centro Oriental. Vol. III Vertebrados, Roma FAO. 1386 p.

Mariscal-Romero, J., B. Aguilar-Palomino, L. Lucano-Ramírez, A.R. Raymundo-Huizar, L.E. Rodríguez-Ibarra, S. Ruíz-Ramírez y G. González-Sansón. 1998. Asociaciones de peces demersales de la plataforma continental de Jalisco y Colima, México (primavera de 1995). Ciencias Marinas 24(1):35-53.

Moser, H.G. (ed.) 1984. Ontogeny and systematic of fishes. American Society of Ichtyologists and Herpetologists. Special publication No. 1, 760 p.

—— (ed.) 1996. The early stages of fishes in the California Current region. CALCOFI Atlas No. 33, 1505 p.

—— 1996. Achiridae: American soles. 1404-1407pp. In: The early stages of fishes in the California Current region. CALCOFI Atlas No. 33, 1505 p.

Munroe, T.A. 1990. Easter Atlantic Tonguefishes (Symphurus: Cynoglossidae, Pleuronectiformes), Whit Descriptions of two new species. Bulletin of Marine Science, 47 (2): 464-515.

—— 1992. Interdigitation Pattern of Dosal-Fin Pterygiophoes and Neural spines, an Important Diagnostic Characterfor Symphurine Tonguefishes (Symphurus: Cynoglossidae: Pleuronectiformes. Bulletin of Marine Science, 50 (3): 357-403.

Munroe, T.A., F. Krupp y M. Scheneider. 1995. (Cynoglossidae, lenguas, lenguetas) 1035-1059. Guía FAO Para la Identificación de especies para los fines de la pesca, Pacífico Centro Oriental, Vol. II Tomo II Roma FAO.1199 p.

Potthoff, T. 1974. Osteological development and variation in young tunas, genus *Thunnus* (Pisces: Scombridae), from the Atlantic Ocean. Fish. Bull., U.S. 72:563-588.

—— 1975. Development and structure caudal complex, the vertebral column, and the pterygiophores in the blackfin tuna (*Thunnus atlanticus*, Pisces: Scombridae) Bull. Mar. Sci. 25: 205-231.

—— 1980. Development and structure of finds and fin supports in dolphin fishes *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiselis* (Coryphaenidae) Fihs. Bull., U.S. 78: 277-312.

Potthoff, T., and S. Kelley, 1982. Development of the vertebral column, fins and fin supports, branchiostegal rays and squamation in the swordfish (*Xiphias gladius*). Fish. Bull. U.S. 80:161-186.

—— 1984. Clearing and staining techniques. in: H.G. Moser (ed.) Ontogeny and Sistematycs of Fishes. Am. Soc. Ichthyol. NMFS, NOAA, USDC, Spec. Publ. pp. 35-37.

Simons, E. and J.R. Van Horn. 1971. A new procedure for whole-mount alcian blue staining the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potasium hydroxide. Acta Morphol. Neerl-Scand 8:281-292.

Tucker, J.W. 1982. Larval Development of *Citharichthys cornutus*, *C. gymnorhinus*, *C. spilopterus* and *Etropus crossotus* (Bothidae) with notes on larval occurrence. Fish. Bull. 80 (1): 35-73.

Van der Heiden, A.M. y S. Massot-Pérez. 1995. *Citharichthys mariajorisae*, a New Flatfish from shallow coastal waters of the Eastern Tropical Pacific (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). Copeia (2):439-446.

Uso de técnicas para aclaración y tinción
de estructuras óseas y cartilaginosas en estudios
taxonómicos en larvas de peces planos (Pleuronectiformes)
terminó de imprimirse en enero de 2005
en los talleres de Ediciones de la Noche,
noche@megared.net.mx,
Guadalajara, Jalisco, México.

Composición tipográfica: Laura Biurcos Hernández.

Tiraje: 1 000 ejemplares.