

38,
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

“DETERMINACION DE UN METODO PARA RESALTAR LAS BANDAS DE CRECIMIENTO DE LOS DISCOS VERTEBRALES DEL TIBURON GATA *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1783)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

HERNANDEZ RODRIGUEZ GRISELDA MA. EUGENIA



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO

1998

TESIS CON
ALLA DE CRIGEN

27-1973



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

*A mis amados padres:
Ma. Elena y Publio.*

*A mis queridos hermanos:
Alex, Publito, "Popis", Gabi, Rosa, Pepe y Jose.*

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo, deseo manifestar un especial agradecimiento a la asociación Amigos de Sian ka 'an, por el apoyo financiero otorgado a este proyecto; y sus esfuerzos por preservar nuestro entorno natural.

Al T.P, Gabriel Escobedo (“pacachero”), por su inapreciable colaboración en la realización de este trabajo, y a quien agradezco también su amistad

A los pescadores de la tiburonera Bahía Quino en Isla Mujeres, por su cooperación y valioso trabajo en el mar.

Al Centro Regional de Investigación Pesquera de Puerto Morelos por las inestimables facilidades otorgadas, durante mi estancia en dicho centro

A todos los investigadores de dicho centro, especialmente a mi asesora de tesis Biol. Martha Basurto Origel y al Biol. Manuel Puerto Mocochoa, director del CRIP, quienes además de sus conocimientos, compartieron conmigo su amistad, a la M. en C. Martha Sandoval y al Biol. Francisco Aguilar, por sus consejos e interés en mi trabajo.

Aprovecho la oportunidad para expresar mi profunda gratitud a la institución a la cual debo mi formación profesional, la UNAM, a mis profesores, y compañeros por haber sido además parte fundamental de mi formación como ser humano.

Asimismo agradezco el apoyo técnico que me brindaron la Dra. Lourdes Segura Puertas del laboratorio de zooplacton, de la estación de CMYL-Puerto Morelos (UNAM), y la Dra. Claudia Leonce del laboratorio de Biología pesquera del CINVESTAV-Mérida.

Me toca ahora agradecer infinitamente a mis padres y hermanos por su confianza, cariño y apoyo incondicional.

A David por su comprensión, paciencia, y amor.

A la inigualable Karla por su consejos, regaños y afecto.

A la inimitable Ana por estar siempre dispuesta a escuchar; y al inconfundible Ricardo por su amistad, su clase de redacción y muy especialmente por esas inolvidables charlas de locura.

A Juan por el tiempo compartido.

A Zahaed y Angélica por sus peripecias en las oficinas de la escuela, así como por su aliento y amistad.

A cada uno de los seres y elementos que forman parte de este maravilloso y poco comprendido Universo, por darme la oportunidad de ser.

Finalmente deseo agradecer la atención, paciencia y apoyo brindado por los investigadores que me han hecho el honor ser integrantes del jurado de mi examen profesional:

Biol Jorge Gersenowies Rodriguez
Biol. Jose del C Benitez Flores
Biol. Mario A. Fernandez Araiza
Biol. Martha Basurto Origel
M.en C. Monica Gonzalez Isais

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION.....1

ANTECEDENTES

 Descripción y distribución de la especie.....5

 Metodológicos.....6

OBJETIVOS.....12

AREA DE ESTUDIO.....13

MATERIAL Y METODOS

 Trabajo de campo.....15

 Trabajo en laboratorio.....16

 Trabajo de gabinete.....21

RESULTADOS Y DISCUSION.....24

CONCLUSIONES.....44

RECOMENDACIONES.....45

BIBLIOGRAFIA.....46

ANEXO

RESUMEN

Durante el mes de julio de 1995 y de abril a agosto de 1996, se muestrearon 46 tiburones gata (*Ginglymostoma cirratum*). De cada individuo se colectó una sección vertebral con 7 a 10 discos vertebrales, de la región localizada a la altura del pliegue terminal de la aleta pectoral. Se probaron ocho métodos de resaltamiento, para determinar cuales de ellos permiten una mejor observación de las bandas de crecimiento en sus discos vertebrales. Los métodos de tinción con Cristal Violeta, Rojo de Alizarina "S" y nitrato de plata, resaltamiento con grafito, radiación con Rayos-X, Aclaramiento con aceite de madera de cedro, así como observaciones directas, con luz transmitida, de discos vertebrales completos y observaciones directas, con luz reflejada, de secciones longitudinales de la vértebra, fueron las ocho técnicas comparadas y evaluadas entre si en base a los siguientes criterios: calidad de contraste, número de bandas observadas y cantidad de vértebras eliminadas. Después de aplicar las pruebas estadísticas de Mann-Whitney, Ji-cuadrada (X^2), Kruskal-Wallis y un análisis de similitudes (análisis en cluster) se encontró que las técnicas que representan las mejores opciones, para resaltar las bandas en las vértebras de *G. cirratum*, son: tinción con Rojo de Alizarina "S", tinción con Cristal Violeta y la aplicación de grafito. Estas tres técnicas, permitieron la mejor observación de las bandas, aunque la inconstancia de la tinción con las dos primeras originó la pérdida de varias vértebras, mientras que con grafito fue difícil la definición de la totalidad de las bandas principalmente en las vértebras de individuos más viejos.

INTRODUCCION

En las aguas de México habitan aproximadamente 100 de las 360 especies de tiburones distribuidos mundialmente (Castillo, 1990; Compagno, 1990). A nivel nacional se capturan comercialmente 44 especies pero solo 15 de ellas, incluyendo al tiburón gata *Ginglymostoma cirratum* Bonaterre (1783), son las principales especies capturadas en el Golfo de México y Mar Caribe (Uribe, 1993; Bonfil, 1994). En el área del Caribe mexicano Isla Mujeres, municipio del estado de Quintana Roo, es actualmente el centro de mayor producción pesquera de tiburón de dicho estado (Fig. 1), de la que *G.cirratum* representa el 26 % de la captura total.

A pesar de su importancia comercial, el escaso valor económico de las especies explotadas ha repercutido en la escasez de información pesquera y biológica de dichas especies (Branstetter, 1987b; Bonfil, 1994), así como en la falta de una normatividad oficial que regule su pesca (Anderson, 1990; Bonfil *et al.*, 1990; Castillo, 1992). Por lo anterior el manejo racional de este recurso pesquero, depende de un incremento en el conocimiento de la biología y ecología de sus poblaciones (Pitcher y Hart, 1982).

Cabe mencionar que el grupo de los elasmobranquios en general, presentan una serie de características dentro de su ciclo de vida que los ubica en el grupo de las especies clasificadas como estrategias "K", las cuales consisten principalmente en un lento crecimiento, un periodo de gestación prolongado, maduración sexual tardía y poca fecundidad. La combinación de dichas características origina una relación directa entre el tamaño de la población y el reclutamiento, es decir que el número de crías que pueden producir es limitado y depende del número de adultos de la población. Como consecuencia, estas especies no poseen la capacidad para soportar una intensa y prolongada presión de pesca, lo que los hace particularmente vulnerables a una sobreexplotación (Hoenig y Gruber, 1990; Anderson, 1990; Pratt y Casey, 1990; Castillo, 1991).

En 1990 Hoenig y Gruber señalaron que hasta entonces no se había desarrollado una descripción de los indicios de una sobreexplotación, ejercida sobre las poblaciones de elasmobranquios, similar a la desarrollada para las poblaciones de teleósteos y sugirieron que

estos síntomas podrían incluir una reducción, en la edad y talla media de la población, así como en la edad de maduración y la proporción de hembras grávidas, entre otros.

La determinación de la edad de los peces es la base para hacer los cálculos que permiten conocer el crecimiento, mortalidad, reclutamiento y otros parámetros fundamentales de la población. Por lo tanto los estudios de edad y crecimiento resultan esenciales para la evaluación de la dinámica y estructura poblacional de las especies explotadas (Holden y Raitt, 1975; Powers, 1983; Anónimo, 1993b; Officer *et al.*, 1996). Sin embargo la información sobre edad y crecimiento de la mayoría de las especies de tiburones es escasa y dispersa, debido principalmente a la ausencia de un indicador de edad confiable en estos organismos (Parsons, 1993), y a la dificultad de obtener un tamaño de muestra representativa de la población durante los muestreos, ya que además presentan grandes tallas, baja abundancia y un comportamiento migratorio (Casselman, 1983; Cailliet *et al.*, 1983b).

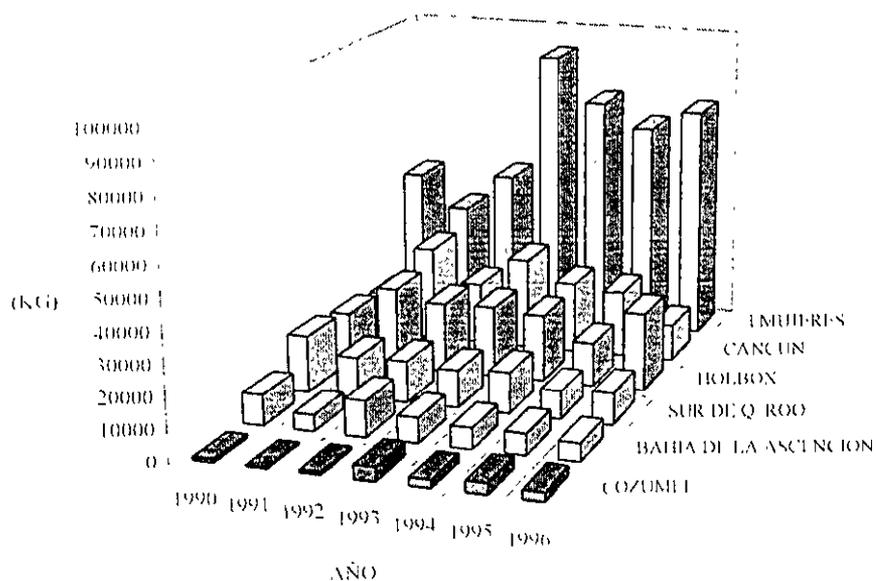


Figura 1 - Captura media anual de tiburón, por región, en el estado de Quintana Roo.

El uso de métodos indirectos, como el análisis de frecuencia de tallas y progresión modal entre otros, se basan en el supuesto de que todos los individuos de la muestra, tienen la misma edad a la misma longitud y han producido resultados poco confiables en la estimación de edad de especies de crecimiento lento y larga vida, como los elasmobranquios, ya que varios grupos de edad se presentan en una sola clase de talla, violando dicho supuesto (Brothers, 1983; Padovani y Vooren, 1991).

El seguimiento del crecimiento de organismos marcados-liberados y recapturados ó mantenidos en cautiverio es uno de los métodos directos mas confiables para la determinación de la edad y crecimiento de elasmobranquios, sin embargo el bajo porcentaje de organismos recuperados y la incapacidad de muchas especies para sobrevivir en cautiverio, así como el costo de mantenimiento de este y el tiempo requerido para la obtención de resultados, han restringido el uso de esta técnica a unas cuantas especies (Branstetter, 1987c).

Por otra parte, y a diferencia de los peces óseos, los elasmobranquios poseen un esqueleto cartilaginoso calcificado con osificación pericondrial (Ridewood, 1921; Padovani y Vooren, 1991), por lo que los métodos comúnmente utilizados para determinar la edad de los peces óseos, como el análisis de escamas y otolitos calcáreos, no son útiles en el caso de los elasmobranquios (Cailliet, *et al.*, 1983a). Es por ello que se ha propuesto una técnica moderadamente directa, pero exitosa, la cual consiste en el análisis de estructuras duras tales como sus vértebras, y en algunas especies, las espinas de las aletas. Esta técnica se basa en la interpretación de ciertas zonas con cantidades diferenciales de calcio, localizadas en el borde vertebral (Fig. 2), como bandas de crecimiento cuya formación obedece a cambios estacionales a través de la vida del individuo (Branstetter, *et al.*, 1987; Casselman, 1974).

Desde que Haskell sugirió en 1949 que estas zonas podrían ser útiles en la determinación de edad, se han desarrollado y utilizado varios métodos para resaltar dichas zonas en diversas especies de elasmobranquios (Cailliet, *et al.*, 1983b). Dichos métodos de resaltamiento incluyen diversos métodos de tinción, radiación con rayos-X, marcaje con tetraciclina, análisis histológicos, impregnación del borde vertebral con grafito y observaciones didrectas, entre otros.

No obstante en la actualidad, no existe un método único que pueda ser utilizado satisfactoriamente, en el grupo de los elasmobranquios en general (Parsons, 1983), debido a que los patrones de calcificación, responsables de la formación de las bandas, pueden variar considerablemente entre las especies (Ridewood, 1921; Urist, 1961; Cailliet, *et al.*, 1983b; Geisler *et al.*, 1998); por lo que el establecimiento de una técnica apropiada para evidenciar el patrón de bandeo en las vértebras de una especie determinada, depende de una revisión y evaluación de las metodologías disponibles.

Dado que la estimación de la edad de *G.cirratum*, mediante la lectura de bandas de crecimiento en sus discos vertebrales no se ha intentado con anterioridad, y considerando que el éxito de una técnica específica depende del patrón de calcificación de las vértebras de cada especie, el presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de su edad, mediante la evaluación de algunos de los métodos de resaltamiento mas comunmente utilizados, en estudios de determinación de la edad de otras especies.

ANTECEDENTES

El tiburón gata, *G. cirratum*, es una especie frecuentemente utilizada en investigaciones biomédicas, como lo indican los más de 22 reportes de investigación encontrados (consulta ASFA, 1996), pero los estudios sobre la biología y pesquería de la especie son escasos. Los dos trabajos reportados hasta la fecha son el de Klimley (1980), quien describió brevemente el comportamiento de cortejo y copulación de *G. cirratum* en cautiverio; y el realizado por Carrier y Luer (1990), para estimar la tasa de crecimiento de 44 individuos marcados y recapturados y tres organismos mantenidos en cautiverio. Por su parte Fisher (1978), Compagno (1984) y Castro (1993), resumieron la información biológica de la especie disponible hasta entonces.

Descripción y distribución.

El tiburón gata presenta una boca terminal con barbas sobresalientes (semejantes a bigotes) en cada lado de la boca; y su primera aleta dorsal se origina sobre, ó posteriormente, al origen de la aleta pélvica, su color va de café oscuro a café claro en el dorso y café más claro en la parte ventral; sus ojos se ubican por detrás de la boca (Castro, 1993). Los adultos miden entre 230 y 300 cm (Castro, *op. cit.*) pero la máxima talla registrada es de 430 cm. Son organismos ovovivíparos con camadas hasta de 26 crías, su talla al nacer es de 27 a 29 cm (Fischer, 1978). Los machos alcanzan la madurez sexual a los 200 ó 210 cm y las hembras a los 240 ó 260 cm (Carrier y Luer, 1990). Según Klimley (1980) el apareamiento ocurre entre junio y julio.

En el Atlántico Occidental, el tiburón gata se distribuye desde cabo Hatteras hasta Brasil (Castro, 1993) incluyendo el Golfo de México y Mar Caribe; y en el Pacífico Oriental, desde el Golfo de California hasta las costas de Perú, (Fischer, 1978; Carrier y Luer, 1990). Aunque la especie habita tanto en aguas costeras como en aguas profundas, su mayor abundancia, en lugares con fondos arenosos ó rocosos, sugiere una mayor preferencia por aguas someras (Uribe, 1993)

La ubicación taxonómica de *G. cirratum* es la siguiente: (Compagno, 1984)

Phylum	Chordata	Haeckel, 1874
Subphylum	Vertebrata	Duchesne, 1975
Superclase	Gnatostomata	Save y Soderbergh, 1934
Clase	Elasmobranchimorphi	Jarvich, 1960
Subclase	Chondrichthyes	Arambourg y Bertin, 1958
Infraclase	Elasmobranchii	Muller, 1844
Superorden	Euselachi	Regan, 1966
Orden	Orectolobiformes	Compagno, 1973
Familia	Ginglymostomatidae	Muller y Henle, 1837
Género	Ginglymostoma	Muller y Henle, 1837
Especie	<i>G. cirratum</i>	Bonnaterre, 1788

Antecedentes Metodologicos

En la mayor parte de las investigaciones sobre edad y crecimiento, hasta hoy realizadas, se han utilizado más de dos métodos, con el fin de comparar y apoyar la información obtenida en cada uno, y ampliar la confiabilidad de los resultados. Brothers (1983) y Cailliet (1990) han señalado que entre los métodos más usados se encuentran:

- 1) Monitoreo del crecimiento de organismos mantenidos en cautiverio
- 2) Monitoreo del crecimiento de organismos en libertad en estudios de marcaje-recaptura.
- 3) Marcas periódicas, naturales ó con tetraciclina en estructuras calcificadas (vértebras y espinas de aletas) de las que se derivan:
 - a.- análisis del incremento marginal del disco vertebral ó espina.
 - b.- proporcionalidad de crecimiento y retrocálculo.
 - c.- análisis de la composición elemental y/ó características histológicas del margen del borde del centro vertebral ó espina.
- 4). Análisis de frecuencia de tallas.
- 5). Fechación radiométrica.

Cailliet *et al.* (1983b) señalaron que una de las desventajas de los estudios de crecimiento en cautiverio, es que los individuos no se encuentran bajo condiciones naturales y por lo tanto pueden exhibir tasas de crecimiento anormales. Algunos autores han mencionado que los

tiburones pueden crecer rápidamente en cautiverio ya que aprovechan las condiciones de abundante alimentación (Gruber y Stout, 1983). Parsons, (1993) por su parte, observó una disminución en la tasa de crecimiento de 8 especímenes de *S. tiburo* capturados y mantenidos en cautiverio. El autor menciona que posiblemente las especies de tiburones de grandes tallas se enfrentan a una alimentación más limitada que las especies de talla pequeña, cuando se encuentran en libertad.

Por otra parte, los estudios de marcaje y recaptura, para determinar la edad y crecimiento de tiburones, han aumentado recientemente, no obstante la dificultad que representa la recaptura de los organismos marcados, así como el bajo porcentaje de organismos recapturados. En 1985 Casey *et al.* hicieron estimaciones retrocalculadas a partir de la información de los anillos y mediciones de los discos vertebrales, analizados histológicamente, de especímenes de *Carcharhinus plumbeus* provenientes de la pesca comercial, ejemplares mantenidos en cautiverio y organismos marcados y recapturados después de varios años en libertad.

Brown y Gruber (1988) encontraron que la formación de las bandas vertebrales sigue un patrón estacional en *Negrapion brevirostris*, al comparar los datos sobre el número de bandas en secciones vertebrales teñidas con Rojo de Alizarina "S" y secciones marcadas con fluorescencia, de organismos inyectados con tetraciclina y mantenidos en cautiverio. En 1990 Tanaka realizó estimaciones de edad, a partir de los anillos vertebrales marcados con fluorescencia, de especímenes de *Orectolobus japonicus* y *Cephaloseyllum umbratile*, mantenidos en cautiverio desde su nacimiento.

El análisis de las bandas y anillos de crecimiento en los discos vertebrales, ha sido uno de los métodos de mayor éxito y el más prometedor en algunas especies (Francis, 1981; Cailliet, *et al.* 1983b; Parsons, 1985; Cailliet, 1990).

El supuesto de que los discos vertebrales son buenos indicadores de edad se apoya en tres hechos importantes:

I) En los elasmobranquios el crecimiento del esqueleto cartilaginoso calcificado, ocurre por un proceso de depositación de calcio y no existe evidencia de reabsorción ó modificación interna de este (Simkiss, 1974, Clement, 1992).

II) El incremento de las tallas corporales es acompañado por un incremento en el diámetro vertebral.

III) La diferencia en la densidad de las bandas, se debe a diferencias de mineralización durante las fases de crecimiento, como resultado de cambios ambientales (Martin y Cailliet, 1988, Casselman, 1974).

En 1988 Martin y Cailliet, analizaron con cinco técnicas diferentes el borde de los discos vertebrales de *Myliobatis californica*, pero solo el aclaramiento con aceite de cedro y el uso de rayos-X resultaron útiles. Así también, encontraron que la formación de las bandas en los discos vertebrales, de dicha especie, proporciona un registro continuo de crecimiento y por lo tanto es apropiado para la determinación de su edad. Branstetter (1987a y 1987b); Branstetter y Stiles (1987) y Branstetter y Musik (1994) realizaron el conteo de las bandas de crecimiento de *Carcharhinus limbatus*, *C. falciformis*, *Galeocerdo cuvieri* y *Odontaspis taurus*, respectivamente, sin aplicar alguna técnica para resaltarlas.

La radiación de las vértebras con rayos-X ha sido aplicada por Cailliet, *et al.* (1983a), en *Prionace glauca*, *Alopius vulpinus* e *Isurus oxyrinchus*; Cailliet, *et al.*, (1983b), en *Triakis semifasciata*, *M. henlei* y *M. californica*; Natanson y Cailliet (1990), en *Squatina californica*; Yudin y Cailliet (1990), en *M. californicus* y *M. henlei* y Padovani y Vooren (1991), en *Galeorhinus galeus*. En todos los trabajos anteriores se probaron otras técnicas de resaltamiento, pero a excepción de Padovani y Vooren (*op. cit.*), quienes se apoyan fuertemente en el análisis histológico de sus vértebras, todos los autores encontraron que los rayos-X fue la técnica más apropiada para resaltar las bandas en las vértebras de sus especies.

Thorson y Lacy (1982), tiñeron con nitrato de plata los discos vertebrales de *Carcharhinus leucas*, para contar los anillos y estimar su edad. En 1983 Schwartz encontró que solo las técnicas de tinción con nitrato de plata y Cristal Violeta, resaltan eficientemente las bandas en las estructuras vertebrales de *Sphirna lewini* y *Carcharhinus obscurus*.

Parsons (1985), utilizó un lápiz del número 2 para resaltar las bandas de crecimiento, pasando suavemente la punta del lápiz sobre el borde de las vértebras de especímenes de *R. terranova*, mantenidos en cautiverio.

En 1983 Gruber y Stout, probaron varias técnicas para resaltar las bandas en las vértebras de *Negrapion brevirostris*, y estimar su tasa de crecimiento, pero solo la tinción con Rojo de Alizarina "S" les permitió diferenciar claramente dichas bandas. Otros autores como Moulton, *et al.* (1992), estimaron la edad y la tasa de crecimiento de *Mustelus antarcticus* y *G. galeus*, a partir de la lectura de las bandas de crecimiento, teñidas con Rojo de Alizarina "S", pero mencionan que la tasa de crecimiento de la segunda especie resulta subestimada con este método, debido a la dificultad que presentó la tinción y lectura de las bandas muy compactas del margen exterior del borde.

Más recientemente Gelsleichter *et al.*, (1998), evaluaron la utilidad de tres metales, como métodos alternativos para determinar la edad de *Mustelus canis*, *G. cirratum*, *C. plumbeus* y *R. terranova*, *Carcharhinus altimus*, *Gymnura altavela* y *Raja eglanteria*. Los autores observaron que la sustitución de las sales de calcio, de los depósitos vertebrales, por las de cobre, plomo ó hierro, producen una coloración diferencial, variable pero eficiente en 5 de las especies estudiadas, mientras que en *G. cirratum* y *C. altimus* el contraste entre las bandas resultó ineficiente con los tres métodos.

Cailliet, *et al.* (1990), utilizaron hematoxilina y rayos-X, para resaltar las bandas de crecimiento en las vértebras de especímenes de dos poblaciones de *Mustelus manazo*, y determinar las diferencias en el crecimiento de ambas poblaciones

La técnica de fechación radiométrica, basada en los niveles de radioactividad de los isótopos que ocurren naturalmente en diferentes partes del disco vertebral, se ha utilizado para estimar la edad y crecimiento de *Carcharodon carcharias*, *Squatina californica*, *Triakis semifasciata* y *Alopias vulpinus*, sin embargo debido a la poca confiabilidad de los resultados, al alto costo del método y al elevado consumo de tiempo que requiere, no se ha intentado en otras especies de elasmobranquios (Cailliet, 1990).

El hecho de que no exista un método que pueda emplearse efectivamente en la mayoría de las especies de tiburones, ha originado una falta de estandarización no solo en cuanto a los términos apropiados para describir las bandas de crecimiento de acuerdo a sus características ópticas (translúcidas u opacas), sino también para definir las de acuerdo a su origen, es decir el período de crecimiento que representan (lento ó rápido) (Casselman, 1983). Debido a lo anterior los diversos términos reportados en la literatura, tales como claras y oscuras, blancas y negras, translúcidas ó hialinas y opacas, así como annulus, annuli, anillo y banda, entre otros (Casselman, 1983), pueden resultar confusos ó incluso contradictorios, especialmente si no se pone atención en el tipo de iluminación empleada por el autor, ya que las cualidades ópticas de las diferentes zonas varían según el ángulo de incidencia de la luz.

En la mayor parte de la literatura, los discos vertebrales comúnmente se describen como centros ó estructuras vertebrales integrados por un centrum (vestigio notocordal) y un borde (área comprendida entre el centrum y margen exterior, en ambas superficies cóncavas de una vértebra) (Fig. 2a). Las bandas de crecimiento se localizan sobre el borde y pueden estar constituidas por un grupo de anillos muy compactos formando una banda angosta, ó espaciados formando una banda ancha. Las bandas cuyo contenido de calcio es abundante, representan periodos en los cuales el crecimiento se interrumpe, ó es más lento; mientras que aquellas con cantidades menores de calcio representan periodos de rápido crecimiento (Casselman, 1974).

La región de la columna vertebral utilizada comúnmente para la lectura de bandas de crecimiento, es la comprendida entre los discos 25 a 35, localizada a la altura de la primera aleta dorsal. Ésta se considera la región donde las vértebras presentan la menor variación en el número

total de bandas, y el mayor diámetro vertebral, en la mayoría de las especies. Sin embargo, en 1990 Natanson y Cailliet, encontraron que en las vértebras de *S. californica* dicha región comprende los discos 12 a 14 de su columna vertebral, y que puede ser más amplia en los individuos de menor talla, es decir, que la variación en el número de bandas a lo largo de la columna vertebral completa, aumenta en los individuos de mayor longitud.

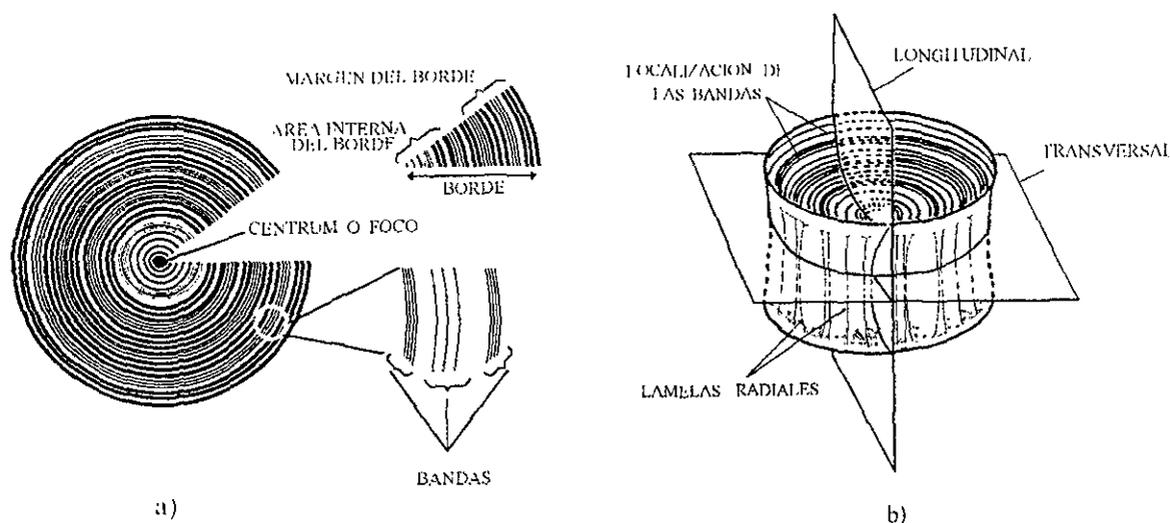


Figura 2.- a) Vista de la cara superior de un disco vertebral, señalando como esta constituido y la interpretación de las bandas. b) Diagrama de un típico disco vertebral mostrando los planos de corte y la localización de las lamelas radiales (Modificado de Cailliet *et al.* 1983b).

OBJETIVO GENERAL

Establecer un método que permita el mejor resaltamiento posible de las bandas de crecimiento en los discos vertebrales del tiburón gata *Ginglymostoma cirratum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A) Evaluar la capacidad de resaltamiento de diferentes técnicas, para resaltar las bandas en los discos vertebrales de *G. cirratum*.
- B) Determinar la metodología apropiada para resaltar las bandas de crecimiento de *G. cirratum*.
- C) Definir la región de la columna vertebral, de *G. cirratum*, con mayor constancia en el número de bandas (región de meseta).

AREA DE ESTUDIO

Isla Mujeres es un poblado con intensa actividad pesquera localizado entre los $21^{\circ}12'04''$ y $21^{\circ}16'06''$ de latitud Norte y los $86^{\circ}46'47''$ y $86^{\circ}45'00''$ de longitud Oeste (Ornat, 1983). Se asienta sobre la plataforma continental en el extremo norte de los arrecifes que bordean el litoral del estado de Quintana Roo, entre los límites del Mar Caribe y el Golfo de México. El límite norte del arrecife en barrera es el arrecife de Punta Nizuc en Cancún, más al norte no hay barrera coralina, únicamente corales aislados, y de Isla Mujeres a Isla Contoy hay una antigua línea de costa rocosa ahora sumergida que técnicamente constituye un arrecife, pero no es de coral (Morales, 1993). La ubicación de la isla, provoca marcados contrastes en las comunidades faunísticas que se desarrollan en torno a esta, ya que el desarrollo arrecifal de la parte sur está más influenciado por los vientos del sureste, mientras que hacia la parte Norte, la biota marina tiene una mayor influencia de la surgencia de la corriente submarina del canal de Yucatán (De La Torre *et al.*, 1994).

Las corrientes superficiales en la zona corren de sur a norte a una velocidad promedio de 1.5 a 2 nudos, por lo que en áreas cuya profundidad son menores a 10 mts. la claridad del agua disminuye. Los vientos alisios provenientes del Este son dominantes en la región. En febrero, y de abril a junio los vientos se desplazan hacia el suroeste, llamándose surestes. Agosto es el mes más sereno en cuanto a vientos, mientras que septiembre se considera el mes de los huracanes. En octubre los vientos se dirigen ocasionalmente, del este al noreste u oeste (Miller, 1982). El clima es cálido subhúmedo del tipo A(w) (Rodríguez *et al.* 1994), con lluvias en verano. La temperatura media anual se encuentra entre los 25°C y 26.9°C . La precipitación pluvial anual, mínima es de 1,203 mm y la máxima de 1,504 mm (Anónimo, 1993a).

Las áreas de captura de tiburón gata, *G. cirratum*, se localizan hacia el sur, sureste, este y noreste de Isla Mujeres, entre las coordenadas $21^{\circ}06'$ latitud Norte y $86^{\circ}40'$ longitud Oeste (Fig. 3). La ubicación de dichas áreas, se determinó en base a la información obtenida en las entrevistas realizadas a los pescadores de la tiburonera Bahía Quino.

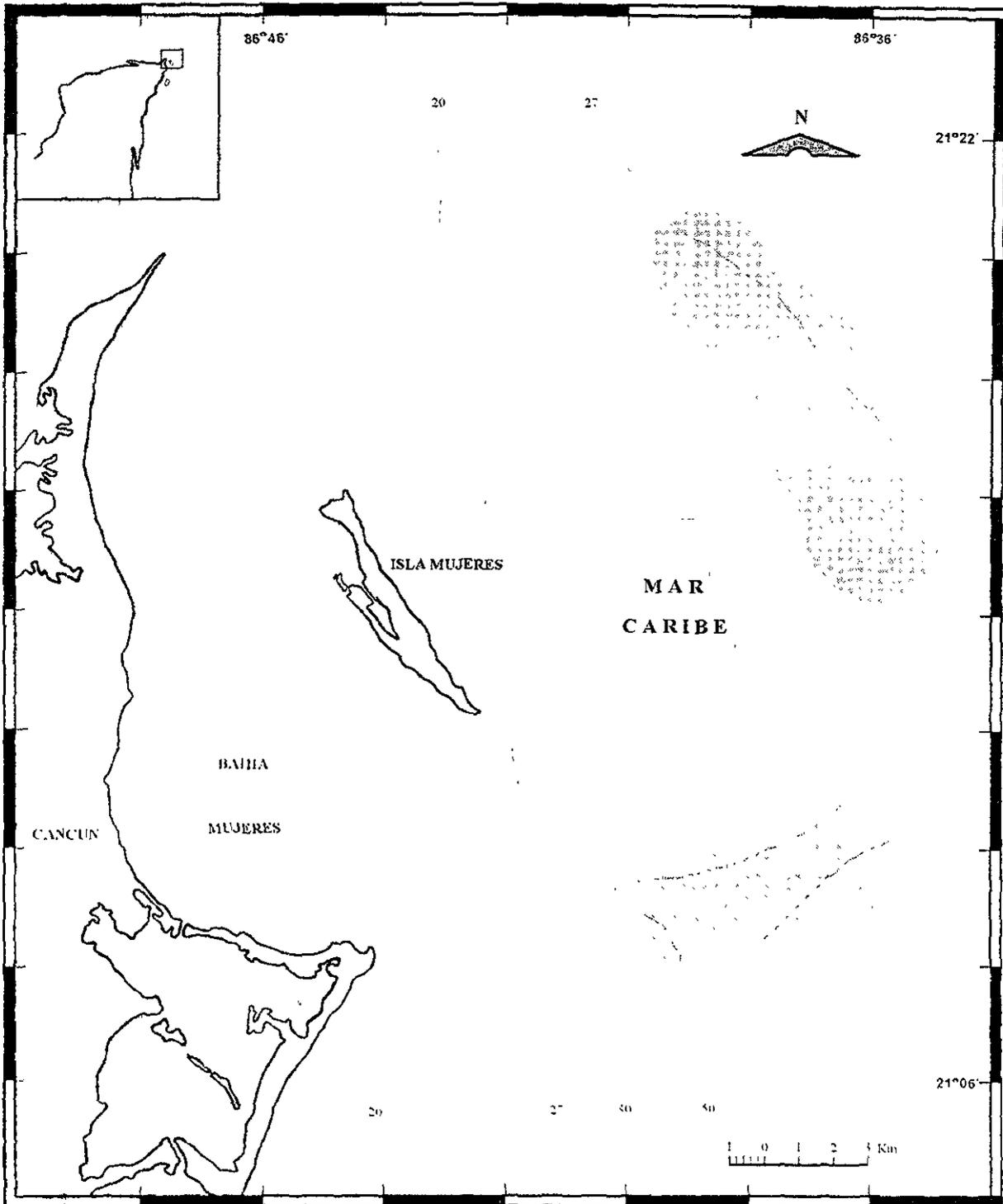


Figura 3.- Localización del zona de estudio. Las zonas sombreadas señalan la ubicación de las áreas de captura del tiburón gata, *G. cirratum*.

MATERIAL Y METODOS

Trabajo de campo.

El período de estudio comprende el mes de julio de 1995 y los meses de abril a agosto de 1996. Los muestreos se realizaron en la planta tiburonera Bahía Quino, localizada en Isla Mujeres, Quintana Roo. Los individuos de *G. cirratum* se identificaron en base a las características taxonómicas descritas por Castro (1993). De cada espécimen se midió su longitud total y furcal, con un flexómetro con precisión de 5 mm, definiendo la primera como la distancia entre la punta del morro u hocico y la punta del lóbulo superior de la aleta caudal, en posición natural; mientras que la segunda se define como la distancia entre la punta del morro u hocico y el origen de la aleta caudal, ya que *G. cirratum* no presenta muesca dorsal precaudal (Fig. 4). Asimismo se anotaron el peso total y el sexo (el cual se determinó en base a la presencia ó ausencia de gonopterigios (“claspers”), así como el área y arte de captura.

Después de registrar los datos anteriores, 46 especímenes fueron eviscerados y fileteados para extraer su columna vertebral y coleccionar la sección vertebral, con 7 a 10 discos, localizada a la altura del pliegue terminal de la aleta pectoral (Fig. 4). Dicha sección comprende los discos vertebrales número 25 a 35, iniciando la numeración en el primer disco posterior a la cabeza. Adicionalmente se coleccionaron las columnas vertebrales completas de 5 ejemplares, que fueron utilizadas para analizar y confirmar la ubicación de la región más apropiada para la colecta de vértebras (región donde el número de bandas permanece constante).

Una vez que se retiró el exceso de tejido conectivo que las cubre, cada sección se identificó con una etiqueta de papel en la que se anotó la fecha de captura, longitud total y furcal, sexo, y número de organismo. Enseguida, los discos vertebrales de las 46 secciones se separaron individualmente y se procedió a su almacenamiento, el cual se llevo a cabo de la siguiente manera: Los primeros 15 juegos de vértebras, coleccionados en Julio de 1995, se enterraron en arena por un periodo de 10 a 15 días, con el fin de eliminar por medios naturales el tejido conectivo que

las envuelve, y facilitar el resaltamiento de sus bandas (penetración del colorante ó aceite). Una vez transcurrido el tiempo, cada juego se colocó en una bolsa de plástico con la etiqueta correspondiente. Sin embargo, la fragilidad producida por el excesivo desgaste que sufrieron las vértebras, y otras dificultades ajenas al desarrollo de este trabajo, propiciaron que se optara por otros métodos de almacenamiento.

Por lo anterior los siguientes 26 juegos de discos, así como las 5 columnas completas, se expusieron al sol durante 24 horas para eliminar la humedad y evitar su descomposición. Cada juego de vértebras secas se almacenó en una bolsa de plástico con su etiqueta. Por último los 5 juegos restantes, identificados con una etiqueta de papel albanene, se colocaron en una bolsa de plástico perforada y se almacenaron en un recipiente con alcohol iso-propílico al 70 %, hasta su uso en el laboratorio.

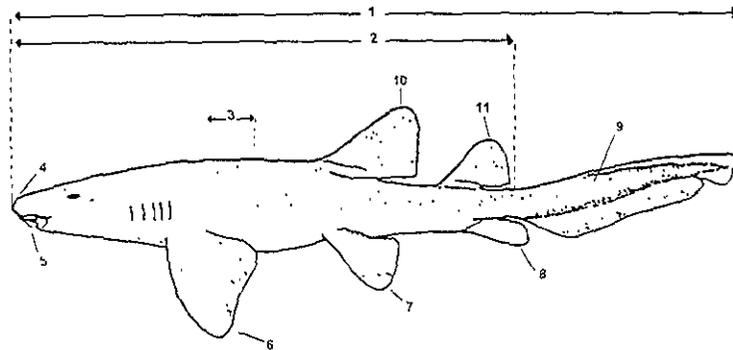


Figura 4.- Esquema de *Ginglymostoma cirratum*. 1.- Longitud total, 2.- Longitud furcal, 3.- Localización de la región vertebral colectada, 4.- Morro u hocico, 5.- Barbas ó bigotes, 6.-Aleta pectoral, 7.-Aleta pélvica, 8.-Aleta anal, 9 - Aleta caudal, 10.- Primera aleta dorsal, 11.- Segunda aleta dorsal (Modificado de Fischer, 1978).

Trabajo en el laboratorio.

La limpieza de las vértebras expuestas al sol, y las almacenadas en alcohol, se realizó sumergiendo cada uno de ellas en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 6%, para

retirar el tejido conectivo que las envuelve. El tiempo de inmersión fue de 30 a 60 minutos, dependiendo de su tamaño. Para eliminar los restos de hipoclorito de sodio, se lavaron con agua corriente durante 15 minutos y con agua destilada durante 24 horas, haciendo un cambio de agua después de las primeras 12 horas. Posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas. Este proceso de limpieza fue necesario para facilitar la penetración del colorante ó aceite, excepto para aquellos discos que fueron radiados con rayos-X (Schwartz, 1983; Branstetter y McEachran, 1986; Parsons, 1993).

Comparación de técnicas

Se probaron 8 técnicas de resaltamiento en los 46 juegos y se utilizó un disco vertebral de cada juego para cada técnica. Las técnicas de resaltamiento probadas son:

- Tinción con nitrato de plata (N.P).
- Tinción con Rojo de Alizarina "S" (R.A).
- Tinción con Cristal Violeta (C.V).
- Impregnación de la superficie vertebral (borde) con grafito de un lápiz suave (número 2).
- Radiación con rayos-X.
- Observaciones directas, iluminando las vértebras con luz transmitida (L.T).
- Aclaramiento de las bandas con aceite de madera de cedro en secciones longitudinales.
- Observaciones directas de secciones longitudinales, iluminandolas con luz reflejada (Cortes).

Para observar y contar las bandas, se utilizó un microscopio de disección (Hiroscope), con un aumento de 4.2x a 10x. La iluminación se dirigió directamente sobre la superficie observada, desde arriba (luz reflejada) ó directamente a través de ella desde abajo (luz transmitida) (Williams and Bedford, 1974). Con el fin de evaluar la confiabilidad de las lecturas, el conteo de las bandas se hizo por duplicado por un solo lector, sin que tuviera conocimiento de los datos de longitud de los organismos a los que pertenecieron las vértebras. El tiempo transecurrido entre la primera y segunda lectura fue de 15 días. En algunas vértebras se realizó un tercer conteo, cuando el

número de bandas de una vértebra no fue igual en las dos primeras lecturas, para tratar de alcanzar un consenso en el número de bandas.

Nitrato de plata al 1 %. Esta técnica se basa en la sustitución química de las sales de calcio por las de nitrato de plata y el oscurecimiento de las últimas por una fuente de luz ultravioleta, por lo que las áreas de mayor calcificación se vuelven visiblemente más oscuras (Cailliet *et al.* 1983b; Thorson y Lacy, 1982). Las vértebras se colocaron en la solución colorante durante 1 a 30 segundos, según su tamaño, exponiéndose después a la luz ultravioleta de una lámpara UVG-11, Mineralight®, de 0.5 a 3 minutos según su tamaño y enseguida se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Con el propósito de reducir la tinción excesiva y fijar la sustitución química, algunas vértebras, se sumergieron en una solución de tiosulfato de sodio al 5 % (Cailliet *op cit*, 1983b; Schwartz, 1983), pero aunque la tinción disminuyó, también lo hizo el contraste entre las bandas, por lo que este último procedimiento se suspendió.

Rojo de Alizarina "S". Debido a que el calcio posee la capacidad de formar quelatos coloreados con este y otros colorantes, el Rojo de Alizarina "S", se ha convertido en uno de los reactivos más populares para su tinción. (Kiernan, 1990). Se probaron dos concentraciones de la solución colorante, la primera consistió en una solución básica débil de Rojo de Alizarina "S" y KOH al 0.1 %, en una proporción 1:9, respectivamente, preparada a partir de una solución concentrada de Rojo de Alizarina "S" (Moulton *et al.* 1992; Grouber and Stout, 1983). La segunda fue una solución al 0.1 % de Rojo de Alizarina "S" y KOH al 4 % en la misma proporción que la anterior. El tiempo de inmersión de las vértebras, fue de 15 a 30 seg. en la primera y más de 5 min. en la segunda. Después de transcurrido el tiempo necesario para su tinción, las vértebras se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Con la segunda concentración las vértebras no se tiñeron y el proceso de tinción se continuó sólo con la primera.

Cristal Violeta al 0.01 % (Schwartz, 1983). La tinción con este colorante consistió en sumergir las vértebras en la solución durante 1 a 3 minutos, según su tamaño, ó de 5 a 10

minutos, para llevar a cabo una sobretinción. Las vértebras sobreteñidas intencionalmente ó accidentalmente, se sumergieron después en alcohol al 50 % durante 5-10 seg (Schwartz, *op cit.*) para disminuir la intensidad de la tinción. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se procedió a contar el número de bandas en la vértebra.

Grafito. Este método, acentúa los cambios en la microtopografía de la superficie del borde vertebral, permitiendo que las bandas se midan y se cuenten (Parsons, 1993; Padovani y Vooren, 1991). Para hacerlo bastó con pasar la punta de un lápiz suave (número 2) sobre la superficie completa del borde vertebral.

Aclaramiento con aceite de madera de cedro. Este método, resalta las bandas ópticamente, translúcidas y elimina las irregularidades superficiales (Cailliet, *et al.* 1983b).” Las secciones vertebrales se obtuvieron cortando longitudinalmente (Fig. 2b) cada uno de los discos, con una cortadora “Isomet”. Cada sección vertebral, se baña con una capa de aceite y se colocó sobre una base negra. Algunas vértebras completas también se cubrieron con una capa de aceite. A partir de la primera hora transcurrida, después de aplicar el aceite, las secciones vertebrales y los discos completos se observaron al microscopio cada hora, durante dos días, sin embargo no se observó ningún incremento en la translucencia óptica de las bandas.

Cortes. Debido a que el aclaramiento con aceite de madera de cedro, no mejoró el resaltamiento de las bandas, los cortes se aprovecharon para intentar el resaltamiento, observándolas directamente con luz reflejada sobre un fondo oscuro. Este método se basa en el bloqueo y desviación de la luz, por las áreas de mayor densidad, mientras que las de menor densidad permiten la transmisión de la misma, originando un contraste entre las bandas.

Luz transmitida. Las vértebras completas se colocaron sobre un fondo oscuro, iluminándolas con luz transmitida paralelamente. Al igual que con la luz reflejada, el principio de este método se basa en el bloqueo y transmisión de la luz por las áreas de mayor densidad, pero las cualidades ópticas de las bandas se invierten.

Rayos-X. Los rayos-X detectan la diferencia de densidades originada por la mayor ó menor mineralización de las bandas y permite la apreciación de bandas oscuras y claras en las radiografías (Yudin y Cailliet, 1990; Natanson y Cailliet, 1990; Cailliet *et al.* 1983a). Un total de 16 discos vertebrales completos sin limpiar se radiaron con un equipo Senographe 600 "T", con filtro de aluminio mini R Kodak[®], con 30 a 32 Kv y 8 a 12 "más", utilizando acetatos con una sola cara con emulsión. Las radiografías se examinaron bajo un microscopio de disección, con luz transmitida, para contar y medir las bandas.

Cada técnica se evaluó, considerando los siguientes criterios:

I - Grado de resaltamiento: Capacidad del método para contrastar claramente las bandas de lento crecimiento (más calcificadas) con respecto a las de crecimiento rápido (menos calcificadas).

El Grado de resaltamiento se midió en una escala ordinal del 1 al 3, considerando que tan "bueno," "regular" ó "malo" es el resaltamiento. Cada valor de la escala se definió de la siguiente manera:

- 1: Buen contraste que permite definir y contar claramente las diferentes bandas.
- 2: Contraste poco intenso con una ligera dificultad para definir las bandas.
- 3: Carencia total de contraste, ó casi total, y las bandas no se observan.

II - Definición del mayor número de bandas: Capacidad del método para resaltar todas las bandas localizadas en el borde vertebral, lo cual lleva implícito una mejor definición de las bandas del margen.

III - Eliminación de vértebras: Que propicie el menor número de vértebras desechadas por producir un contraste insuficiente y/ó incompleto, ó por no proporcionar conteos repetibles (igual número de bandas al menos en dos lecturas).

Definición de la región donde el número de bandas es constante.

Las columnas vertebrales completas se colocaron en un recipiente con agua corriente, durante una hora, para ablandar el tejido que une a los discos vertebrales y facilitar su separación. Después de secarlos con aire a temperatura ambiente, cada uno de los discos se almacenó individualmente en una bolsa de plástico con una etiqueta en la que se anotó el número del espécimen y el número de disco, iniciando la numeración por la región del tronco. Uno de cada cuatro discos se limpió de tejido conectivo, siguiendo el proceso utilizado para limpiar las vértebras para la comparación de técnicas, y se midió su diámetro vertebral con un vernier, con una aproximación de 0.01 mm, por la parte más ancha. Las vértebras no utilizadas, se mantuvieron en congelación para evitar su descomposición. Las bandas de crecimiento se resaltaron con grafito y al igual que en la comparación de técnicas, la lectura de bandas se realizó por duplicado para mayor confiabilidad, y cuando hubo una variación en el número de bandas de ambas lecturas, se realizó un tercer conteo. Tanto el número de bandas como el diámetro vertebral se gráfican contra el número progresivo del disco vertebral. Finalmente se aplicó un análisis de regresión lineal entre el diámetro vertebral y la longitud del individuo y se calculó el coeficiente de correlación "r".

En el anexo único de este trabajo, se presentan los datos resultantes de la evaluación de las técnicas probadas (número de bandas, grado de resaltamiento), así como los datos de longitud, sexo y diámetro vertebral, de cada ejemplar.

Trabajo de gabinete.

Se realizó una prueba de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$) en el resaltamiento de las bandas, en función de los tres métodos de almacenamiento utilizados.

Así mismo se realizó una prueba de Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas, en el grado de resaltamiento observado, entre las dos lecturas consideradas. La fórmula de Mann-Whitney es la siguiente:

$$a) \quad U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_1, \text{ (para grupos de datos de tamaño } \leq 20 \text{).}$$

donde: n_1 y n_2 son el número de datos en los grupos de lecturas 1 y 2 respectivamente, y R_1 es la suma de los rangos de los datos en el grupo de lecturas 1 (Zar, 1984; Wayne, 1987).

$$b) \quad Z = \frac{|U - \mu_U| - 0.5}{\sigma_U} \text{ (para grupos de datos, de tamaño mayor a 20 y rangos empatados).}$$

$$\mu_U = \frac{n_1 n_2}{2}, \quad \sigma = \sqrt{\frac{n_1 n_2}{N^2 - N} \cdot \frac{(N^3 - N - \sum T_i)}{12}} \quad \sum T = \sum (t_i^3 - t_i)$$

donde: U es el valor resultante en la ecuación; n_1 y n_2 representan el número total de datos en los grupos 1 y 2 respectivamente; $N = n_1 + n_2$; y t_i es el número de empates en un grupo de valores empatados (Zar, 1984; Wayne, 1987).

Para determinar si el grado de resaltamiento depende de la técnica de resaltamiento utilizada, se aplicó la prueba de independencia "ji-cuadrada" con $\alpha = 0.05$ y grados de libertad = $(r-1)(c-1)$.

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

donde: O_i es la i -ésima frecuencia observada; E_i es la i -ésima frecuencia esperada; $r-1$ es el número de renglones menos uno y $c-1$ es el número de columnas menos uno (Wayne, 1987).

Número de bandas: Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) en el número medio de bandas observado, en función de la técnica aplicada, en las dos lecturas realizadas:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

donde: N es el número total de observaciones en todos los k grupos, R_i es la suma de los rangos de las n_i observaciones en el grupo i, y n_i es el número de observaciones en el grupo i (Zar, 1984; Wayne, 1987).

Para probar si existen similitudes resaltamiento producido por las diferentes técnicas, se realizó un análisis en cluster de los tres criterios de evaluación, para lo cual se obtuvo: el promedio ponderado de la suma de las frecuencias de los tres grados de resaltamiento, en cada técnica; el número medio de bandas (número promedio de bandas de ambos conteos) y la proporción de vértebras eliminadas con cada técnica (número total de vértebras eliminadas entre el número total de vértebras tratadas). El método de agrupación fue el de promedio, utilizando distancias euclidianas (González, 1994; Crisi, 1983).

Los valores medios de cada uno de los tres criterios de evaluación se estandarizaron mediante la fórmula:

$$Z = \frac{X - \bar{X}}{D.S \text{ (Desviación estándar)}} \text{ (Gómez y Luque, 1998)}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

El rango de longitud total de 45 organismos, de los que provinieron las vértebras para la comparación de técnicas, fue de 152 a 263 cm, más un individuo cuya longitud se desconoce. Las columnas vertebrales completas, colectadas para determinar la sección más apropiada para la lectura de bandas, fueron extraídas de 5 individuos de tallas entre 112 y 240 cm.

Método de almacenamiento.

Durante el desarrollo del estudio se observó que el tiempo de tinción con R.A y C.V de los discos vertebrales que se enterraron para su almacenamiento, precisó 2 ó más veces el requerido por las vértebras almacenadas por los dos métodos restantes. Aún así, la tinción de algunas de las vértebras enterradas fue muy débil e incompleta, ó no se llevó a cabo. Cuando se cubrieron con grafito presentaron una superficie lisa, particularmente en el margen del borde, por lo que las bandas de estas áreas no se observaron. Debido a lo anterior se decidió comparar, estadísticamente, los datos del grado de resaltamiento, en función del método de almacenamiento utilizado, para determinar si este puede influir en la calidad del resaltamiento (Tabla 1).

Tabla 1.- Niveles de probabilidad (α) obtenidos con Mann-Whitney para evaluar el resaltamiento de las bandas, en función del método de almacenamiento utilizado.

	Cristal	Rojo de	Nitrato de			Luz
	Violeta	Alizarina	plata	Grafito	Cortes	transmitida
Enterrada*-sol*	0.7495	0.8855	0.9288	0.34487	0.2305	0.0193
Enterrada-alcohol*	0.1374	0.5474	0.1310	0.03494	0.7035	0.0731
Sol-alcohol	0.0761	0.4054	0.1884	0.3378	0.6669	0.7529

*Tamaño de muestra: enterradas=15, sol=26, alcohol=5 (Anexo único).

Según la tabla anterior, el único caso donde se observó una diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en el resaltamiento producido, en función del método de almacenamiento utilizado, fue entre las vértebras enterradas y las expuestas al sol, observadas directamente con luz transmitida. Para

confirmar si estas diferencias se deben al método de almacenamiento, es decir si el enterramiento de las vértebras afecta el resaltamiento observado, se analizó el número de vértebras que presentaron un resaltamiento ineficiente ó incompleto de las bandas (grado 3) en ambos grupos. Se encontró que únicamente dos de las 15 vértebras enterradas presentaron un grado de 3 de resaltamiento, mientras que en el grupo de las expuestas al sol hubo 9 con un grado 3 de resaltamiento, por lo que es posible deducir que las dificultades para resaltar adecuadamente las bandas con luz transmitida, se deben al método de resaltamiento y no al de almacenamiento.

Aunque estadísticamente el enterrar las vértebras no afecta el resaltamiento de las bandas, los inconvenientes surgidos durante el proceso de tinción con C.V y R.A, y la aplicación de grafito; sugieren que durante el enterramiento, probablemente, ocurre una descalcificación de la vértebra, ocasionada por los ácidos producidos durante la descomposición del tejido. Este problema no se presentó en las vértebras conservadas en alcohol y las expuestas al sol, por lo que se puede utilizar cualquiera de los dos, sin embargo el método de exposición al sol es el más recomendable tomando en cuenta su bajo costo económico.

Interpretación y observación de las bandas.

En la Tabla 2 se muestran las características ópticas de las bandas de crecimiento rápido y lento, observadas en los discos vertebrales de *G. cirratum*, de acuerdo con el tipo de iluminación y método de resaltamiento utilizados. Las características ópticas, de las bandas, producidas por la tinción con N.P y radiación con rayos-X, se utilizaron como apoyo para determinar diferencias en el contenido de calcio de las distintas zonas, más calcificadas ó menos calcificadas, y posteriormente confirmar su correspondencia con las características ópticas y/ó de resaltamiento producidas con las técnicas restantes. Las bandas más calcificadas (crecimiento lento) impiden el paso de las radiaciones y aparecen blancas ó claras en la radiografía, mientras que las menos calcificadas (crecimiento rápido) se aprecian oscuras, ya que los rayos-X pueden pasar a través de ellas. La tinción con N.P produce una tonalidad que va de café oscuro a negro en las primeras y café claro en las segundas.

Tabla 2.- Características ópticas de las bandas de crecimiento, en los discos vertebrales de *G. cirratum*, en función de la técnica de resaltamiento empleada.

Técnica	Tipo de iluminación empleada	Zonas de crecimiento lento (más calcificadas)	Zonas de crecimiento rápido (menos calcificadas)
Rayos X	Transmitida	Claros, Opacos	Oscuros, Translúcidos
Observaciones directas (L.T)	Transmitida	Claros, translúcidos	Oscuros, opacos
Observaciones directas	Reflejada	Oscuros, translúcidos	Claros, opacos
Grafito	Reflejada	Claros, translúcidos	Oscuros, opacos
Nitrato de Plata (N.P)	Reflejada	Oscuros, translúcidos,	Claros, opacos, no teñidos
Rojo de Alizarina "S" (R.A)	Reflejada	Oscuros, translúcidos,	Claros, opacos, no teñidos
Cristal Violeta (C.V)	Reflejada	Oscuros translúcidos,	Claros, opacos, no teñidos

Grado de Resaltamiento.

En general, 7 de las 8 técnicas probadas proporcionaron un contraste suficiente para distinguir las diferentes bandas de crecimiento en las vértebras de *G. cirratum*. Sin embargo cada una de ellas presentó inconvenientes derivados del método y/o del patrón de calcificación de las vértebras, que afectan de uno u otro modo su capacidad de resaltar las bandas. Enseguida se describen las observaciones realizadas sobre el contraste producido, con cada una de las técnicas.

Rayos X. Después de numerosos intentos variando la intensidad de la radiación y el tiempo de exposición a la misma, se obtuvieron un total de 16 placas, pero el resaltamiento de las bandas se apreció únicamente en 11 de ellas. En 9 de las 11 placas, el resaltamiento fue parcial y solo en dos es posible observar las bandas en el borde completo (Fig. 5a). En las 11 placas las numerosas lamelas radiales, localizadas entre ambas caras cóncavas (bordes) de las vértebras (Fig. 2b), interfieren con la claridad de las bandas, mientras que en las 5 placas restantes, donde no se observaron las bandas, es lo único que se resalta (Fig. 5b). Por lo anterior, las 11 placas se utilizaron únicamente para confirmar la correspondencia de bandas entre las técnicas, de acuerdo con las diferencias de mineralización de las primeras y el principio de resaltamiento de cada técnica.

Aclaramiento con aceite de madera de cedro. El aclaramiento con aceite de madera de cedro no produjo contraste alguno entre las bandas, ni en discos completos ni en secciones

longitudinales de los mismos, y por lo tanto se descartó como posible método de resaltamiento de las bandas de crecimiento en las vértebras de *G. cirratum*, en el presente estudio.

Luz Transmitida. El patrón de bandas alternadas, translúcidas y opacas, se observó claramente en la mayoría de las vértebras, cuando la cantidad de luz que llegó al borde fue suficiente y homogénea (Fig. 5c). No obstante en varias vértebras se observaron bandas opacas muy anchas, dentro de las cuales podría haber una ó más bandas translúcidas (Fig. 5d). El contraste entre bandas disminuyó ó no se produjo cuando las lamelas radiales, entre los bordes, bloquearon el paso de luz, debido a que algunas de ellas se encuentran soldadas entre sí. La transmisión incompleta de luz también se observó en algunas vértebras cuyas lamelas se encuentran separadas una de otra, por lo que el bloqueo de luz debe ocurrir igualmente a nivel del borde como consecuencia de las diferencias en la mineralización del mismo.

Rojo de Alizarina "S" y Cristal Violeta. El resaltamiento que producen estas dos técnicas depende en gran medida de la intensidad y uniformidad de la tinción, de tal manera que la coloración diferencial de las bandas, permita su separación en el área completa del borde. Cuando la tinción con ambas técnicas fue adecuada, se observó un buen contraste entre las bandas y su definición y conteo fue relativamente fácil (Figs. 5e y 6a). Cuando la intensidad de la tinción fue excesiva (sobretinción), el contraste entre las bandas se anuló impidiendo la apreciación de las bandas. El número de vértebras sobreteñidas fue mucho mayor con C.V que con R.A y el desteñimiento posterior con alcohol al 50 %, mejoro el resaltamiento solo en algunos de los discos sobreteñidos con C.V. Si la tinción es débil el contraste entre las bandas disminuye considerablemente, produciendo un resaltamiento "regular" (2) ó "malo" (3). En algunas vértebras se observó una sobretinción, ó una tinción débil, ó ambas, en ciertas áreas del borde vertebral únicamente, lo cual afectó principalmente el número de bandas contabilizado (Fig. 6b). Las áreas que con mayor frecuencia quedaron sin teñir son el centro y/ó el margen del borde vertebral. Un incidente observado en todos los discos que se almacenaron por enterramiento, fue que requirieron un prolongado tiempo para su tinción y sin embargo esta fue incompleta, débil, ó no se llevo a cabo (Fig. 5f).

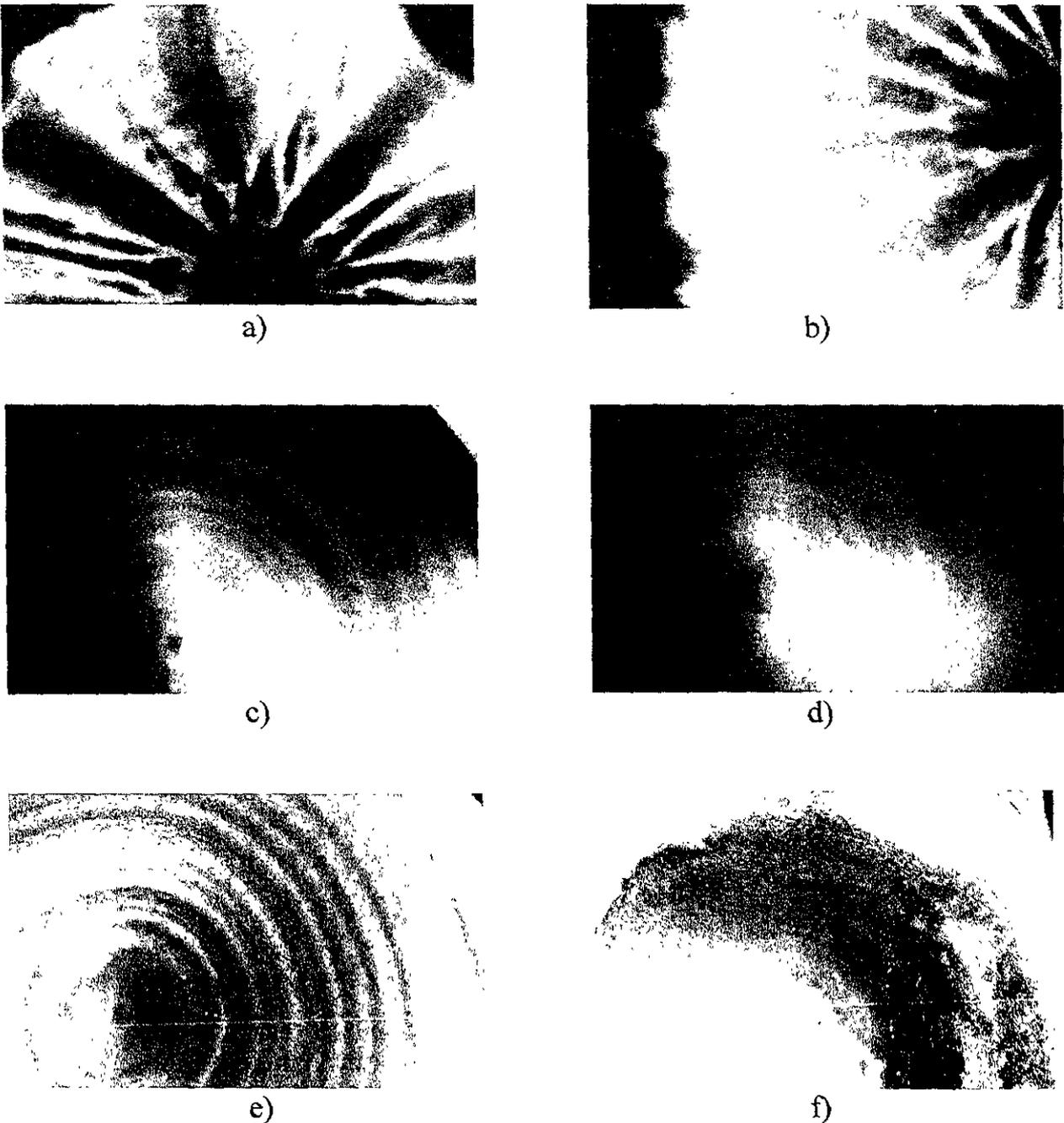


Figura 5.- Vista superior de los discos vertebrales mostrando el resaltamiento producido por: a) Rayos -X, se observan las bandas oscuras y claras, alternadas, así como las lamelas radiales; b) Rayos-X, únicamente se ven las lamelas radiales; c) Luz transmitida, buen contraste entre las bandas en el borde vertebral completo (Resaltamiento =1); d) Luz transmitida, contraste regular entre las bandas, no hay resaltamiento de las bandas en el área más externa del borde (Resaltamiento =2); e) Cristal violeta, con buen contraste entre las bandas (Resaltamiento =1); f) Cristal violeta, se observa una tinción incompleta, sin contraste entre las bandas (Resaltamiento =3).

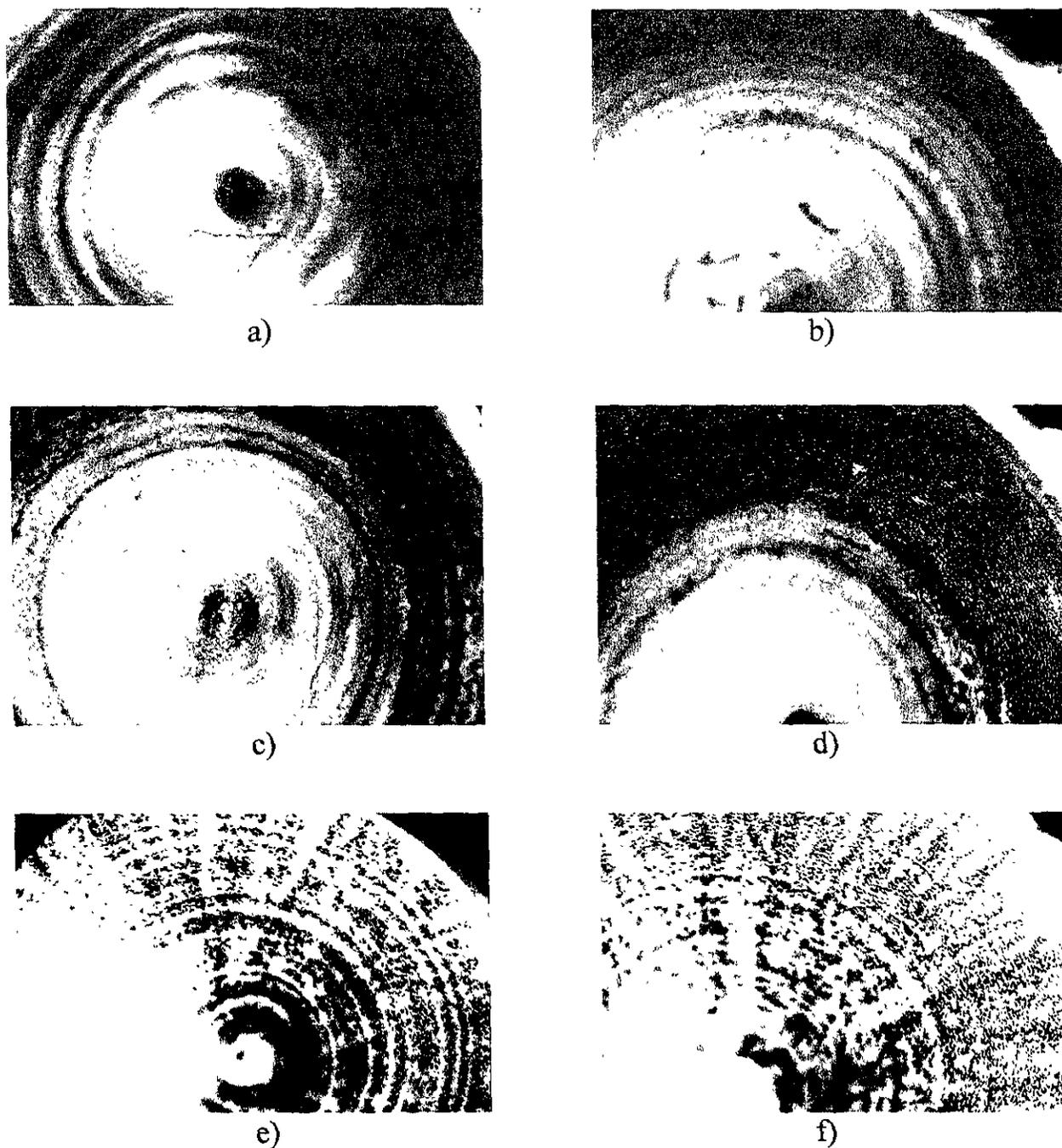


Figura 6.- Vista superior de los discos vertebrales mostrando el resaltamiento producido por: a) Rojo de alizarina, con tinción completa y buen contraste entre las bandas (Resaltamiento =1); b) Rojo de alizarina, con tinción completa, pero con un contraste regular entre las bandas (Resaltamiento =2); c) Nitrato de plata, con un buen contraste entre las bandas (Resaltamiento =1);d) Nitrato de plata, con un contraste regular entre las bandas (Resaltamiento =2); e) Grafito, con buen contraste entre las bandas (Resaltamiento =1); f) Grafito, las bandas más internas no se pueden separar individualmente y las bandas más externas no se resaltaron (Resaltamiento =3).

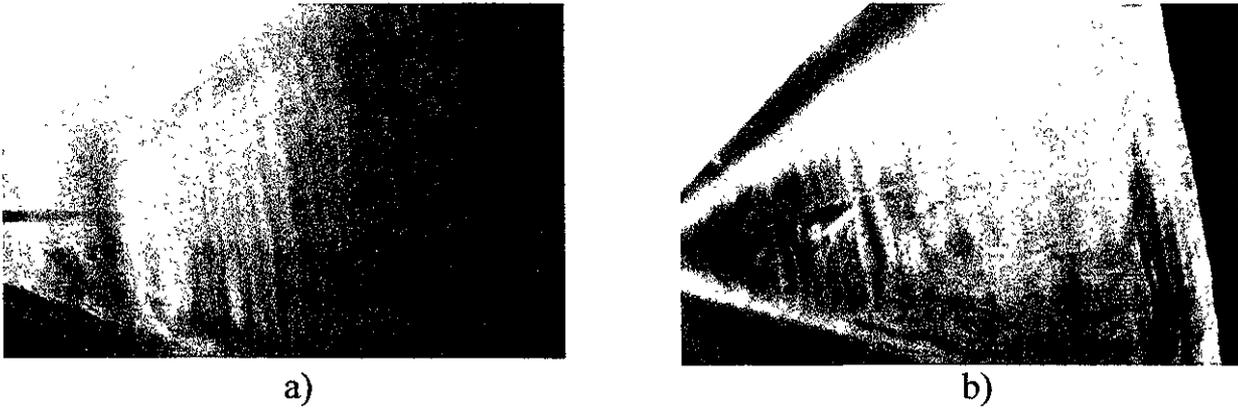


Figura 7.- Secciones longitudinales del disco vertebral: a) Se observan las bandas en la superficie completa del corte (Resaltamiento =1); b) Contraste regular en la mayor parte de la superficie del corte (Resaltamiento =2).

Nitrato de Plata. Contrariamente a lo que se esperaba, esta técnica resulto un método poco apto para resaltar las bandas de crecimiento de esta especie, ya que a pesar de los intentos con diferentes concentraciones, tiempos de inmersión en la solución y de exposición a los rayos UV, solamente en 5 vértebras se pudo apreciar un marcado contraste entre las bandas (Fig. 6c) y en 13 más el contraste fue apenas suficiente para definir las, debido a la coloración similar de ambos tipos de bandas (Fig. 6d). No se logro contraste alguno en el 50 % de las vértebras. Al igual que con C.V y R. A, la tinción irregular de algunas vértebras afectó el resaltamiento de las bandas, debido a la sobretinción generalmente del margen, ó ausencia de color generalmente en el centro.

Grafito. Este sencillo método, produce un buen resaltamiento de las bandas a simple vista (Fig. 6e). Sin embargo, la variación en la distancia entre los diversos anillos que constituyen las bandas, muy separados ó muy juntos, fue el principal inconveniente observado en varios discos vertebrales. Cuando la distancia entre los anillos aumenta es difícil definir a cual banda pertenecen ó si constituyen una banda por si solos, en el caso contrario, se crea un amontonamiento de bandas, ocasionando que su separación individual sea difícil ó imposible. Como resultado, las bandas se observan muy anchas ó muy angostas. Aunque una ó ambas situaciones se observaron regularmente en la mayoría de las vértebras, el amontonamiento de bandas, fue un hecho más frecuente en el margen de las vértebras de los individuos más viejos. En algunas vértebras se observó un alisamiento ó falta de relieve en ciertas áreas de la superficie del disco, en donde las bandas no se observaron (Fig. 6f).

Cortes. El contraste producido con está técnica fue menos intenso, comparado con el de las 5 técnicas anteriores, a pesar de ello son apreciables una gran cantidad de anillos en toda el área del corte incluyendo el margen, donde es posible observar las bandas que no son visibles con otras técnicas (Fig. 7a). Sin embargo, al igual que con grafito, la ubicación de los diversos anillos en una u otra banda ocasionó confusiones en cuanto al número total de bandas en la mayoría de las vértebras. Adicionalmente la lectura de las bandas fue difícil ó incompleta, en aquellas secciones que sufrieron daños en el momento del corte, tales como: ocultamiento de una pequeña área por una porción de la mitad complementaria, fracturas, ó alisamiento de la superficie producido por fricción (Fig. 7b).

Análisis estadístico.

Los datos de resaltamiento, utilizados para determinar si existe una relación entre la técnica utilizada y el grado de resaltamiento, corresponden a los de la primera lectura, ya que como resultado de la prueba de Mann-Whitney, realizada *a priori*, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los datos de resaltamiento de la 1ra y 2da lecturas. El número de vértebras que fueron asignadas a un determinado grado de resaltamiento, en cada técnica, se muestran como frecuencias observadas en la tabla de contingencia elaborada para realizar la prueba de independencia X^2 (Tabla 3).

Al aplicar la prueba de X^2 , se encontró que el grado de resaltamiento de las bandas depende de la técnica utilizada, ya que el valor calculado $X^2 = 21.49$, es mayor al valor tabulado $X^2_{0,05} = 18.30$, con $g.l = 10$ y $\alpha = 0.05$. Con el fin de precisar cuales técnicas fueron estadísticamente determinantes para obtener este resultado, se realizó un análisis de las relaciones de frecuencias observadas/esperadas, cuyos valores contribuyen de manera importante al valor total de X^2 (Tabla 4).

Tabla 3.- Tabla de contingencia para realizar la prueba estadística X^2 . Los números fuera de paréntesis son las frecuencias observadas (O), los números entre paréntesis son las frecuencias esperadas (E).

Grado de Resaltamiento	Cristal Violeta	Rojo de Alizarina "S"	Nitrato de plata	Grafito	Luz transmitida	Cortes	Total	X^2
1	18 (15)	16 (15)	5 (15)	23 (15)	18 (15)	11 (15)	91	
2	12 (15)	17 (15)	18 (15)	12 (15)	15 (15)	17 (15)	91	
3	16 (16)	13 (16)	23 (16)	11 (16)	13 (16)	18 (16)	94	
Total	46	46	46	46	46	46	276	21.49

Como se puede ver en la Tabla 4, los métodos que más contribuyen a la relación entre el método utilizado y el resaltamiento observado son N.P, grafito y los cortes. El valor más alto, así como el tercero corresponden al N.P. El primero de estos se debe a que la frecuencia con la que se observó un buen resaltamiento (grado 1) fue mucho menor que la esperada, mientras que el segundo fue el resultado de una frecuencia del grado 3 de resaltamiento mayor a la esperada. El segundo valor de la tabla pertenece al grafito, el cual produjo un buen grado de resaltamiento (grado 1) con una frecuencia mayor a la esperada. Estos tres valores representan el 65.9 % del valor total de $X^2 = 21.49$. El cuarto valor esta dado por una frecuencia del grado 2, producido con grafito, menor a la esperada, lo cual se debe principalmente al aumento de observaciones en el primer grado. El último valor es el resultado de la poca frecuencia con la que se obtuvo un buen resaltamiento con el método de los cortes.

Tabla 4.- Relaciones de las frecuencias observadas/esperadas de los valores de X^2 individuales que más contribuyen al valor total de X^2 y el grado de resaltamiento en el que se ubican.

Técnica	X^2	Asociación	Relación O/E	Grado de resaltamiento
N.P	6.81	>	5/15	1
Grafito	4.04		23/15	1
N.P	3.43		23/16	3
Grafito	1.39		12/15	2
Cortes	1.14	<	11/15	1

De acuerdo con el análisis anterior la tinción con N.P fue la técnica menos eficiente para resaltar las bandas de crecimiento. Aunque en total fueron 23 los discos vertebrales, donde se pudo apreciar un contraste entre las bandas, solo 5 de estas se clasificaron en el grado 1 y el resto en el grado 2. Consecuentemente la proporción de vértebras donde no hubo resaltamiento, fue la más alta en relación a la observada con el resto de los métodos.

El uso de este método, por Thorson y Lacy en 1982, proporcionó buenos resultados en el resaltamiento de las bandas de crecimiento en vértebras de *Carcharhinus leucas*; pero Cailliet *et al.* (1983a), reportaron que tuvieron que teñir varios discos del mismo espécimen debido a que la tinción de vértebras de *Alopias vulpinus* e *Isurus oxyrinchus* “fue inconsistente”, mientras que Yudin y Cailliet (1990) suspendieron su uso al no poder “distinguir las bandas del margen del borde” en vértebras de *Mustelus californicus* y *M. henlei*. Según lo descrito anteriormente y lo observado en este trabajo es evidente que el éxito de la técnica depende, no solamente del patrón de calcificación de cada especie, sino que además las características de la tinción pueden variar de una vértebra a otra en un mismo individuo.

Aparentemente el grafito es el método que proporciona un mejor resaltamiento, pero como se analizará más adelante la dificultad para ubicar los anillos en una u otra banda, así como para separar las bandas individualmente, puede producir resultados poco confiables y por lo tanto aminorar su capacidad como método de resaltamiento. Aunque Parsons (1983 y 1993) utilizó este método para resaltar las bandas de las vértebras de *Rhizoprionodon terraenovae*, y *Sphyrna tiburo*, respectivamente, no hace mención alguna sobre la dificultad para ubicar los anillos en una u otra banda en las vértebras de dichas especies. En cambio, Padovani y Vooren (1991) reportaron que no pudieron definir las bandas localizadas en el margen del borde, resaltadas con grafito, en las vértebras de los individuos más viejos de *Galeorhinus galeus*, debido a su amontonamiento.

Aunque la observación directa de los cortes con luz reflejada, produjo el contraste necesario para distinguir las bandas en más del 50 % de las vértebras, su intensidad fue notablemente menor que el observado con el resto de las técnicas. Lo anterior ocasionó que la lectura óptima de las bandas se lograra únicamente en 11 discos vertebrales. Algunos de los pocos reportes sobre la observación directa de discos vertebrales ó secciones de los mismos, con buenos resultados, son los de Branstetter, Musik y Colvocoresses (1987) y Branstetter y Stiles (1987), quienes trabajaron con *Galeocerdo cuvieri* y *Carcharhinus leucas* respectivamente, aunque el plano del corte y el tipo de iluminación difieren de los utilizados en este trabajo. En la Figura 8 se presenta de manera gráfica la variabilidad en el resaltamiento, producida con cada una de las técnicas.

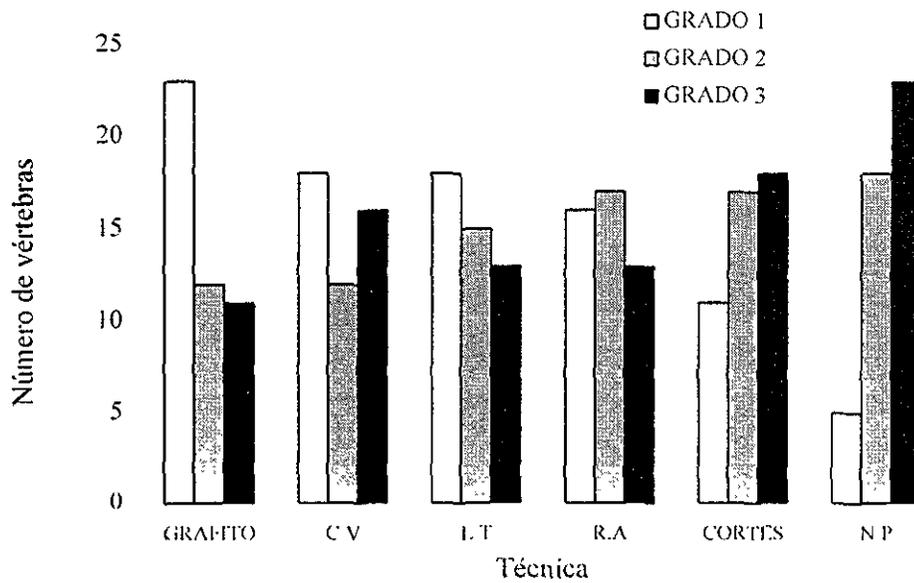


Figura 8.- Frecuencia observada de cada uno de los tres grados de resaltamiento, con cada técnica probada.

Número de bandas observadas.

Los resultados de la prueba Kruskal-Wallis, para precisar si existe una relación entre el número medio de bandas observadas y el método de resaltamiento utilizado, son los siguientes: $H_1 = 40.30$ para el primer conteo y $H_2 = 20.12$, para el segundo. Ya que $p(X^2_{0.05,5} > H_1 \text{ ó } H_2) < 0.005$, el número de bandas en ambos conteos se encuentra en función de la técnica utilizada. El número medio de bandas de ambos conteos se indica en la Tabla 5.

El mayor número de bandas se observó con el método de los cortes, dado que permite distinguir, aunque con menor contraste, bandas aparentes que no son apreciables con otros métodos. Además de las bandas, también es posible observar los diversos anillos que las constituyen, sin embargo, la mayor ó menor distancia entre ellos con frecuencia hizo difícil su asignación a una u otra banda y es muy probable que la incorrecta interpretación de algún ó algunos anillos como bandas, haya contribuido a elevar el número de estas.

Si bien el método con L.T produjo un buen contraste entre las bandas, el número de las mismas fue el más bajo, debido a que algunas bandas translúcidas quedaron ocultas dentro de una ó más bandas oscuras, como consecuencia del patrón de calcificación vertebral.

Tabla 5.- Número medio de bandas, lecturas pares y vértebras eliminadas, registrados con cada técnica.

Técnica	Número medio de bandas	Lecturas pares	Total de vértebras eliminadas
Grafito	8.4	37	9
L.T	7.9	26	20
Cortes	9.8	30	16
C.V	8.8	26	20
R.A	9.0	30	16
N.P	8.6	20	26

* El número total de discos vertebrales en cada técnica fue de 46

Un factor importante que influyó en la determinación del número de bandas observado en una vértebra, fue la presencia de bandas que se dividen en dos, en algún punto de su recorrido por el borde vertebral conocidas como falsas bandas. Con las técnicas de grafito y L.T estas son fácilmente visibles, pero con R.A, C.V y N.P son más difíciles de identificar a causa del estrecho espacio entre los anillos teñidos, que constituyen la doble banda. Por otra parte con el método del corte longitudinal, las bandas falsas no se pueden identificar, ya que no es posible seguir una banda a lo largo de toda la estructura vertebral. Si estas no se identifican, el número total de ellas aumenta al considerar dos bandas donde solo hay una. En 1982, Thorson y Lazy, reportaron la presencia de estas bandas en las vértebras de *Carcharhinus leucas*.

Un inconveniente común en todas las técnicas, fue la dificultad para definir la primera banda, ya que mientras en algunas vértebras se localizó muy cerca del centrum, en otras la distancia entre el centrum y la primera banda observada fue mucho mayor. Padovani y Vooren (1991), Branstetter (1987a) y Parsons (1993), observaron la presencia de una primera banda en

entre el centrum y la primera banda observada fue mucho mayor. Padovani y Vooren (1991), Branstetter (1987a) y Parsons (1993), observaron la presencia de una primera banda en organismos con pocos meses de nacidos, la cual fue interpretada como una marca ó banda de nacimiento por Branstetter y McEachranhan (1986), Cailliet *et al.* (1983a); y por lo tanto no la incluyen en el conteo de bandas con fines de estimación de la edad de sus especies. Por otra parte Natanson y Cailliet (1990) y Cailliet *et al.* (1983b) observaron hasta 5 bandas en embriones y recién nacidos de *S. californica* y *T. semifasciata*, respectivamente y las interpretaron como marcadores de las diferentes fases del desarrollo embrionario.

En este trabajo no se obtuvieron individuos neonatos ó que fueran menores de un año de edad, por lo que hay incertidumbre en cuanto al origen de la formación de la banda más cercana al centrum, la cual se consideró de crecimiento en los conteos de las bandas de los discos vertebrales analizados.

Perdida de vertebras en cada técnica utilizada.

Las vértebras eliminadas son aquellas donde no fue posible coincidir en el número de bandas en dos lecturas, además de aquellas donde no se pudo llevar a cabo la identificación y conteo de todas las bandas, ó de la mayoría de ellas, por la ausencia ó insuficiencia de contraste. La Figura 9 muestra el porcentaje de vértebras eliminadas por técnica, señalando la causa por la cual se eliminaron. Así mismo se indica el porcentaje de vértebras con lecturas pares.

El resaltamiento inadecuado con N.P. propicio la eliminación de más del 50 % de las vértebras. El C.V y L.T generaron la eliminación del 43.47 % cada una, mientras que R.A y Cortes coincidieron con un 34.78 %. El porcentaje más bajo fue el registrado con el método de grafito (19.5 %).

Analizando las vértebras eliminadas separadamente, se encontró que la falta de una lectura ó ambas, fue más frecuente cuando se probaron las técnicas de tinción con C.V, R.A y N.P. debido

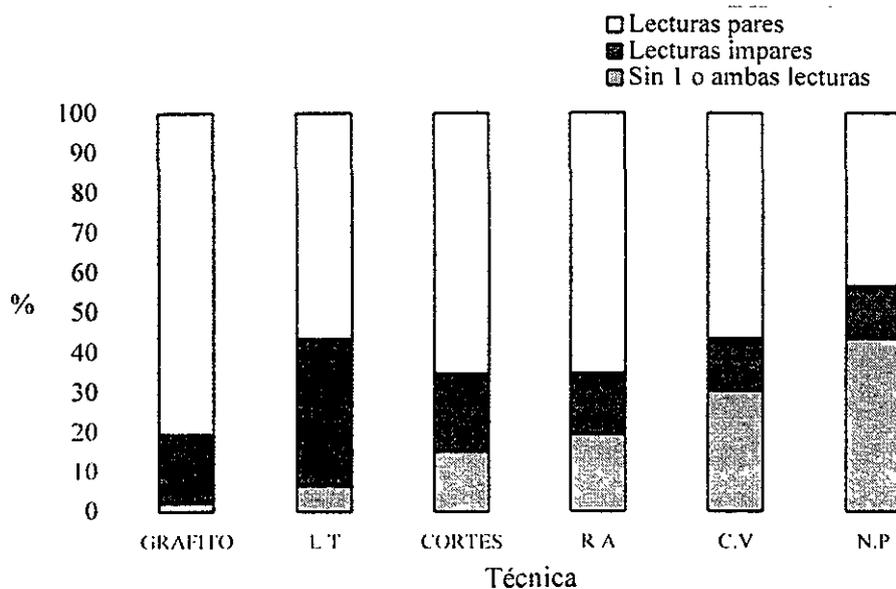


Figura 9.- Porcentaje de vétebras eliminadas en cada técnica (lecturas impares y falta de una ó ambas lecturas) y porcentaje de vétebras con lecturas pares.

Por el contrario, el porcentaje de lecturas impares fue mayor cuando el resaltamiento se produjo con L.T, cortes y grafito, como consecuencia del amontonamiento de bandas ó la indefinición de las mismas, debido a la estrecha ó amplia distancia entre los anillos, así como el ocultamiento de una ó varias bandas en cualquier área del borde vertebral. Estos inconvenientes, no solo generan dudas en cuanto a un número definido de bandas, en uno u otro conteo, sino que además pueden conducir a la determinación incorrecta de un número total de bandas, aún cuando haya coincidencia en las lecturas.

Las vétebras que son tomadas en cuenta, para fines de estimación de la edad, son aquellas cuyo número de bandas coinciden en dos ó más conteos, de modo que no exista duda sobre la clase de edad a la cual pertenece el individuo.

Los mayores porcentajes de lecturas pares son los obtenidos con grafito, R.A. y cortes. En algunos estudios donde se comparan dos ó más técnicas de resaltamiento, la repetibilidad de los

conteos es el principal criterio de evaluación (Moulton 1992, Natanson y Cailliet 1990). No obstante los resultados obtenidos con grafito y cortes, se debe tener en cuenta que la dificultad para separar claramente las bandas con estas técnicas, puede conducir a estimaciones incorrectas.

Análisis en Cluster.

En la Tabla 6 se encuentran los valores medios estandarizados de las variables utilizadas para realizar el análisis en cluster. La Figura 10 es el dendograma resultante del análisis de similitudes, en el que se muestra la asociación de las técnicas de acuerdo a la distancia promedio de similitud entre una técnica y otra, así como entre un grupo de técnicas y otro.

Como resultado del agrupamiento de las técnicas, en función de los tres criterios de evaluación, el dendograma muestra que la mayor similitud se encuentra entre C.V y R.A. las cuales generaron el mejor contraste entre las bandas. A este primer subgrupo se encuentra asociado el N.P, ya que las tres técnicas producen la eliminación de una cantidad de vértebras similar. La asociación separada de los métodos con L.T y grafito, se debe principalmente al bajo número de bandas observado con ambas técnicas. El método de los cortes es el que más difiere en cuanto a los criterios evaluados, razón por la cual no se encuentra incluido en alguna de las agrupaciones anteriores.

Tabla 6.- Variables para realizar el Análisis de similitudes. a) datos originales y b) datos estandarizados (Valores "Z")

Técnica	Resaltamiento		No. de bandas		Vértebras eliminadas	
	a*	b	a	b	a	b
Cristal Violeta	1.95	-6.71	8.8	-4.91	0.43	-2.63
Rojo-alizarina "S"	1.89	-6.77	9.0	-4.71	0.34	-2.72
Nitrato de plata	2.39	-6.27	8.6	-5.11	0.56	-2.50
Grafito	1.73	-6.93	8.4	-5.31	0.19	-2.87
Luz transmitida	1.89	-6.77	7.9	-5.81	0.43	-2.63
Cortes	2.15	-6.51	9.8	-3.91	0.34	-2.72

*Promedio ponderado de las frecuencias observadas de los tres grados de resaltamiento.

Determinación de la región más constante en número de bandas.

En los gráficos de la Figura 11, se presentan el número de bandas y el diámetro vertebral registrados en uno de cada 4 discos vertebrales, a lo largo de las 5 columnas completas colectadas para dicho fin. Como se puede ver, el número de bandas difiere a lo largo de la columna vertebral de los 5 individuos. La variabilidad fue de 3-4 bandas en 4 individuos en un rango de 112- 247 cm, y de 5 bandas en un individuo de 240 cm de longitud total. Aunque el tamaño de muestra fue pequeño para obtener una tendencia entre la longitud de los individuos y la variabilidad del número de bandas de los discos de su columna vertebral, se observó que esta variabilidad al parecer no se incrementa con la talla de los tiburones gata, lo que es contrario a lo observado por Natanson y Cailliet en 1990, para *Squatina californica*.

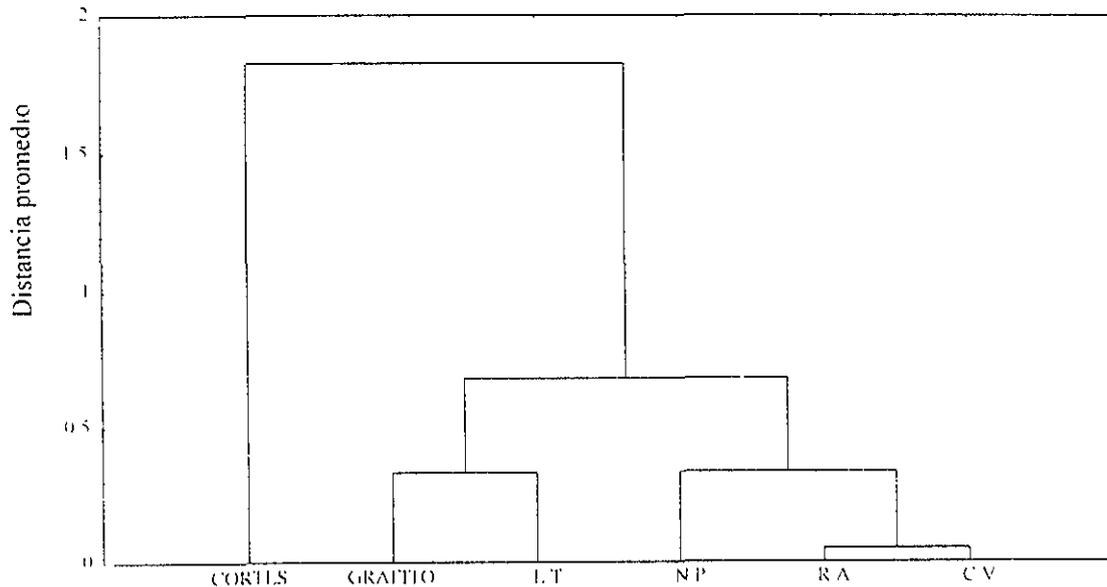


Figura 10.- Dendrograma de similitudes entre técnicas.

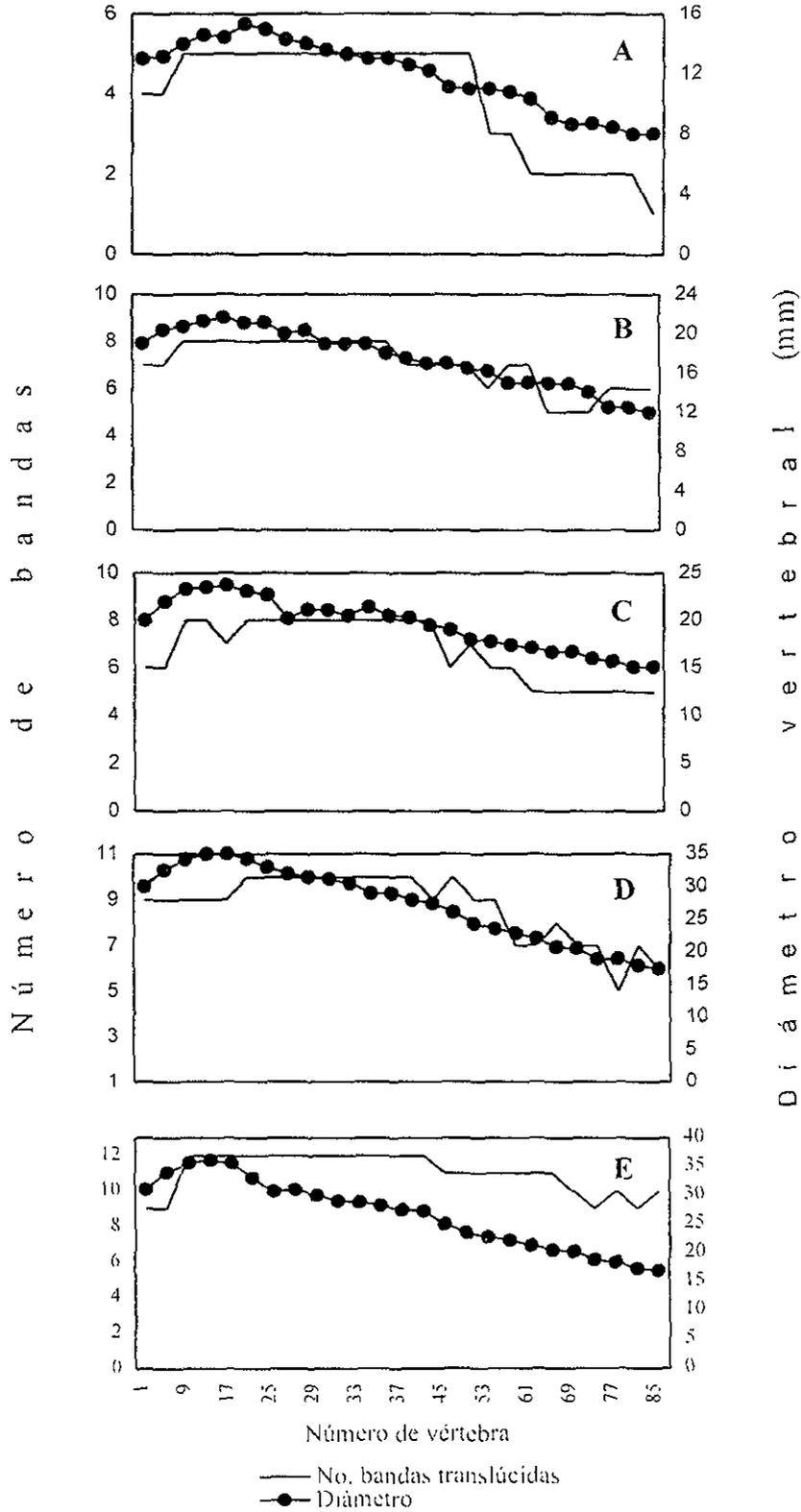


Figura 11.- Ubicación de la región de "meseta" (número constante de bandas) y de la región de mayor diámetro vertebral, a lo largo de la columna vertebral completa de 5 especímenes de *G. virratum*. La longitud total de cada individuo es: a) 112 cm. b) 181 cm. c) 186 cm. d) 240 cm e) 247 cm

En la columna vertebral, de 3 de los 5 individuos, la región donde el número de bandas se mantiene sin cambios inicia en el disco No 9, mientras que en las dos restantes inicia en el disco No. 21. La amplitud de dicha sección, reportada como región de “meseta” por Natanson y Cailliet (1990), varía en los 5 individuos pero en todos ellos, se extiende al menos hasta el disco No 37. La región con una constancia en el número de bandas coincidió con la mayor cantidad de estas, antes y después su número disminuye de 1 a 3 y hasta 5 bandas respectivamente. Dado que la extensión de la región, con un número constante de bandas, puede variar en todos los individuos de *G. cirratum*, se consideró que para mayor seguridad el área que debe ser reconocida como la región de “meseta”, es la comprendida entre los discos No. 21 a 37. La sección colectada para la comparación de técnicas de este estudio incluyó los discos No. 25 a 35, la cual coincide con la región de meseta determinada.

La determinación de una relación lineal entre el diámetro vertebral y la longitud del individuo, es importante para realizar las operaciones matemáticas necesarias en la estimación de edad por retrocálculo de los elasmobranquios, (Smith, 1983). Por lo anterior se midió y gráfico el diámetro de los discos de las 5 columnas de *G. cirratum* colectadas. Se encontró que las vértebras de esta especie alcanzan su mayor magnitud en la región constituida por los discos No. 9 a 21 localizados entre la región cefálica y el tronco, de las 5 columnas invariablemente (Fig. 11). A partir del disco No. 21 comienza a disminuir y continua decreciendo hasta el último disco de la columna. La sección colectada con los discos No. 25 a 35 no forman parte de la región de mayor diámetro vertebral, lo cual explica la baja correlación obtenida en la regresión lineal entre el diámetro vertebral y la longitud del individuo ($r = 0.8299$). En la Figura 12 se presenta esta relación.

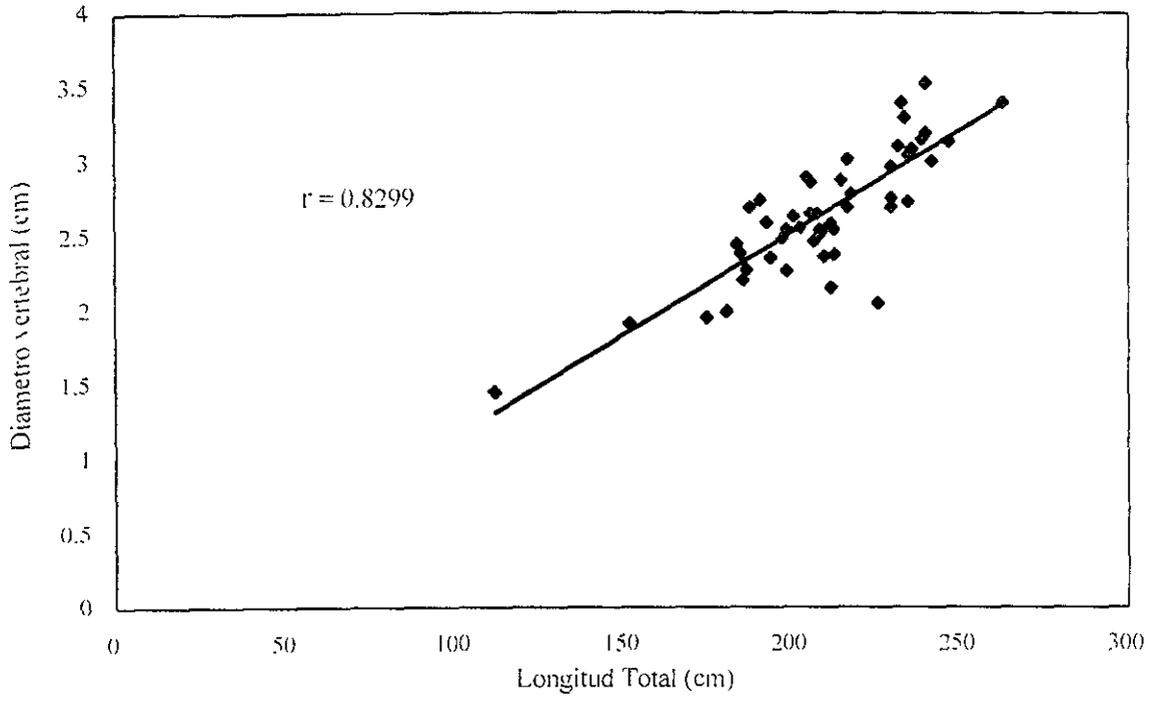


Figura 12.- Relación entre el diámetro vertebral y la longitud de *G. cirratum*.

CONCLUSIONES

- A excepción de la técnica de Aclaramiento con aceite de cedro, las diferentes zonas de crecimiento sobre las vértebras de *G. cirratum* fueron visibles con todas las técnicas probadas.
- De las 7 técnicas, la radiación con rayos-X, y la tinción con nitrato de plata, fueron las técnicas menos convenientes para el resaltamiento de las bandas de crecimiento en los discos vertebrales del tiburón gata.
- La observación directa de secciones longitudinales con luz reflejada (cortes), produce un contraste poco intenso, pero el número de bandas observadas es el más alto.
- El resaltamiento con grafito, luz transmitida, Rojo de Alizarina "S" y Cristal Violeta, arrojaron los mejores resultados, en cuanto al contraste entre las bandas, pero el número de bandas producido por las dos primeras parece subestimado con respecto al producido por las dos últimas.
- Teniendo en cuenta los resultados de las tres criterios de evaluación, y que no hubo una técnica que cumpliera satisfactoriamente con los tres, se concluye que las técnicas más apropiadas para resaltar las bandas de crecimiento en las vértebras de *G. cirratum*, son: tinción con Rojo de Alizarina "S", Cristal Violeta y grafito, siempre y cuando se tomen en cuenta las medidas necesarias para superar los inconvenientes derivados de cada una de ellas, tales como aumentar el tamaño de muestra y comparar los resultados con los de alguna otra técnica de resaltamiento.
- La sección vertebral, en la columna vertebral de *G. cirratum*, donde los discos presentaron un número constante de bandas (región de "meseta"), se localiza entre los discos No. 21 a 37, fuera de esta región el número de bandas varia de ± 1 a ± 4 .

- La región de mayor diámetro vertebral esta comprendida por los discos 9-21.
- La sección apropiada para la colecta de vértebras, con fines de estimación de edad se encuentra entre los discos 9-37.

RECOMENDACIONES

Probar el uso de los Rayos-X en secciones longitudinales, de pocos milímetros de espesor, de vértebras de la especie, para intentar mejorar el resaltamiento de las bandas de crecimiento ó confirmar la ineficiencia de la técnica en los discos vertebrales de *G.cirratum*.

Probar la tinción con Rojo de Alizarina "S", Cristal Violeta ó de algún otro colorante en secciones longitudinales de las vértebras de *G. cirratum*.

Teñir varios discos vertebrales de un mismo individuo, si se utiliza la tinción con R.A y C.V, realizando las variaciones convenientes, de concentración del colorante y tiempo de contacto con las vértebras y por consiguiente, contar con un tamaño de muestra lo suficientemente grande, que represente cada clase de edad abundantemente.

Para estudios de crecimiento es necesario definir el origen de la formación de la primera banda, para ello deben incluirse en los individuos muestreados embriones, neonatos y tiburones menores a 1 año de edad.

Colectar las vértebras que se encuentren dentro de la sección comprendida por los discos 9 a 37, ya que en esta coinciden la región más constante en número de bandas y de mayor diámetro en la columna vertebral de *G. cirratum*.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, E. D. 1990. Fishery models as applied to elasmobranch fisheries. In: H.L Pratt Jr., , S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fisheries. NOAA tech Rep. NMFS (90): 473-484
- Anónimo. 1993a. Anuario estadístico del estado de Quintana Roo. I.N.E.G.I. Gobierno del estado de Q. Roo. México. 3-11.
- Bonfil, R. S; D. F. de Anda y R. A. Mena. 1990. Shark fisheries in México: "The case of Yucatán as an example. In: H.L Pratt Jr., S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fisheries NOAA tech Rep. NMFS (90): 427-441
- Bonfil, R. S. 1994. Overview of world fisheries. Fish. Tech. Pap. FAO. 341: 1-119
- Branstetter, S. y J. D. McEachran. 1986. Age and growth of four carcaharhinid sharks common to the Gulf of Mexico: A summary paper. In Indo-pacific Fish biology: proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura. (Eds). Ichthyological Society of Japan, Tokyo. 361-371
- Branstetter, S. 1987a Age and growth estimates for blacktip, Carcharhinus limbatus, and Spinner, C. brevipinna, sharks from the Northwestern Gulf of México. COPEIA. 1987 (4): 964-974
- Branstetter, S. 1987b Age and growth reproductive biology of the silky shark, Carcharhinus falciformis, and the scalloped hammerhead, Sphyrna lewini, from the Northwestern Gulf of Mexico. Environ. Biol. Fishes. (19)3: 161-173
- Branstetter, S. 1987c Age and growth validation of newborn sharks held in laboratory aquaria, with comments on the life history of the Atlantic sharpnose shark, Rhizoprionodon terraenovae. COPEIA. 1987 (2): 291-300
- Branstetter, S; J. A. Musik y J. A. Colvocoresses. 1987. A comparison of the age and growth of the tiger shark, Galeocerdo cuvieri, from off Virginia and from the Northwestern Gulf of Mexico. Fish Bull. (85)2: 269-279
- Branstetter, S. y R. Stiles. 1987. Age and growth estimates of the bull shark, Carcharhinus leucas, from the Northern gulf of Mexico. Environ. Biol. Fish. (20)3. 169-181
- Branstetter, S. y J. A. Musik. 1994. Age and growth estimates for the sand tiger in the Northwestern Atlantic Ocean. Trans. Am. Fish. Soc. 123: 242-254

- Brothers, E. B. 1983. Summary of round table discussions on age validation. NOAA Tech. Rep. NMFS. 8:35-44
- Brown, C. A y S. H. Gruber. 1988. Age assement of the lemon shark, Negaprion brevirostris, using tetracycline validated vertebral centra. COPEIA, 1988 (3): 47-753
- Cailliet, G. M; L. K. Martin; J. T. Harvey; D. Kusher.y B. A. Welden. 1983a. Preliminary studies on the age and growth of blue, Prionace glauca, common thresher, Alopius vulpinus, and shortfin mako, Isurus oxyrinchus, sharks from California waters. NOAA Tech. Rep. NMFS (8): 179-188
- Cailliet, G M.; L. K. Martin; D. Kusher; P. Wolf. y B. A. Welden. 1983b. Techniques for enhancing vertebral bans in age estimation of California elasmobranchs. NOAA Tech. Rep. NMFS 8: 157-165
- Cailliet, G. M. 1990. Elasmobranch age determination and verificacion: an updated review In: H.L Pratt Jr., , S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fhiseries. NOAA tech Rep. NMFS (90): 157-165.
- Cailliet, G. M; K. G. Yudin; S. Tanaka y T. Taniuchi. 1990. Growth characteristics of two populations of Mustelus manazo from Japan based upon cross-readings of vertebral bands. In: H.L Pratt Jr., , S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fhiseries. NOAA tech Rep. NMFS (90): 167-176
- Carrier, J. C. y C. A. Luer. 1990. Growth rates in the nurse shark, Ginglymostoma cirratum. COPEIA, 1990 (3): 686-692
- Casey, J.G; H.L. Pratt, Jr. y Ch. E. Stillwell. 1985. Age and Growth of the Sandbar shark, Carcharhinus plumbeus, from the Western North Atlantic. In: E.D.Prince and L. M. Pulos (Eds.). Proceedings of the international wokshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and sharks. NOAA Tech. Rep. NMFS 8: 189-191
- Casselmann, J. M. 1983. Age and growth assessment of fish from their calcified structures- techniques and tools. In: NOAA tech. Rep. NMFS 8: 1-17
- Casselmann, J. M. 1974. Analysis of hard tissue of pike Esox Lucius L. With special reference to age and growth. In: T. B. Bagenal (Ed), The ageing of fish. Unwin Brothers, Ltd. England. p 13-27.
- Castillo, J. L. 1990. Contribución al conocimiento de la biología y pesquería del cazón bironche, Rhizoprionodon longurio (Jordan y Gilbert, 1882) (Elasmobranchii, Carcharhinidae), del sur de Sinaloa, México. Tesis profesional. Fac. de Ciencias, U.N.A.M. 128 pp.
- Castillo, J. L. 1991. Tiburón. Panorama pesquero. (1)3:27-31

- Castillo, J. L. 1992. Diagnósis de la pesquería de tiburón en México. Secretaria de Pesca. México. 72 pp.
- Castro, J.I. 1993. A field guide to the sharks commonly caught in commercial fisheries of the Southeastern United States. NOAA Tech. Mem. NMFS SEFSC 338.
- Clement, G. J. 1992. Re-examination of the fine structure of endoskeletal mineralization in chondrichthyans: Implications for growth, ageing and calcium homeostasis. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 43: 157-181.
- Compagno, L. J. V. 1984. Sharks of the World. FAO. Species catalogue. Vol. 4. Part. 1. Roma. 205 pp.
- Compagno, L. J. V. 1990. Shark exploitation and conservation. In: H.L Pratt Jr., S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries. NOAA tech Rep. NMFS (90): 391-314.
- Crisi, J.V y Lopez, A.M.F. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Secretaria General de la Organización de los estados americanos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington. D.C. 119 pp.
- De la Torre, R; M. Lara; C. Padilla; G. Garcia; Ma. T. Nava y R. Urquiza. 1994. Descripción de un área al Sur de Isla Mujeres para la ubicación de habitats artificiales y operación de el submarino de la compañía Atlantis Submarines. Documento Interno. Anexo manifestación ambiental para Atlantis Submarine S. A. de C.V. 13 pp.
- Fischer, W. 1978. FAO Species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (fishing área 31). Vols.1-7. FAO. Fish. Dep. Vol.:V.
- Francis, M. P. 1981. Von Bertalanffy growth rates in species of Mustelus (Elasmobranchii: Triakidae) COPEIA. 1981(1): 189-192
- Gelsteichter, J., A. Piercy and J.A. Musick. 1998. Evaluation of copper, iron and lead substitution techniques in elasmobranch age determination. Journal of Fish Biology: 53, 465-470.
- Gomez, V. L. y Luque, G.A. 1998. Métodos estadísticos para investigadores I y II (Apuntes). CICATA-IPN. México. pp 1-75.
- González, S.G. 1994. Apuntes para un curso de métodos multivariados aplicados en ecología y sistemática. Centro de Estudios de la Costa. Universidad de Guadalajara. México. pp 75
- Gruber, S. H. and Stout, R. G. 1983. Biological materials for the study of age and growth in a tropical marine elasmobranch, the lemon shark, Negaprion brevirostris (Poey). In: Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic

- Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks. Ed. E Prince and L.M. Pulos) NOAA Tech. Rep. NMFS (8): 193-205.
- Hoening, M. J y S. H. Gruber. 1990. Life-History patterns in the elasmobranchs: Implications for fisheries management. In: H.L Pratt Jr., S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fisheries NOAA tech Rep. NMFS (90): 1-16.
- Holden, M.J. and D.F.S. Raitt (Eds.) 1975. Manual de ciencia pesquera. Parte 2 Métodos para investigar los recursos y su aplicación. Doc. Téc. FAO. Pesca. (115)1:74 p.
- Klimley, A. P. 1980. Observations of courtship and copulation in the nurse shark, Ginglymostoma cirratum. COPEIA. 1980 (4): 878-882
- Kiernan, J.A. 1990. Histological and histochemical methods, theory and practice. 2daEd. Oxford Pergamon. 433pp.
- Miller, D.L. 1982. Mexico's caribbean fishery: Recent change and current issues. A the submiteed in partial fulfillment of the requeriments for the degree of doctor of phylosophy in Geography. The University of Wisconsin-Milwakee. 250 pp.
- Martin, L. K. y G. M. Cailliet. 1988. Age and growth determination of the bat ray, Myliobatis californicus gill, in Central California. COPEIA. 1988. 3: 762-773
- Morales, J. J. 1993. Introducción a los ecosistemas de la península de Yucatán. El mar y sus recursos. Sian Ka'an. Serie documentos. Quintana Roo, México. 38 p.
- Moulton, P. L.; S. R. Saddler y T.I. Walker. 1992. Age and growth of gummy shark, Mustelus antarcticus Günther, and school shark, Galeorhinus Galeus (Linnaeus), from Southern Australian waters. pp. 879-911 in: Age determination and other aquatic animals. (Ed. D. C. Smith). Aust. J. of Mar. and Freshwater Res. 43(5)
- Natanson, L. J y G. M. Cailliet. 1990. Vertebral growth zone deposition in Pacific angel sharks. COPEIA. 1990 (4): 1133-1145
- Officer, R. A.; A .S. Gason; T. I. Walker y J. G. Clement. 1996. Sources of variation in counts of growth increments in vertebrae from gummy shark, Mustelus antarcticus, and school shark, Galeorhinus galeus: implications for age determination. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 53: 1765-1777.
- Ornat, L.A. 1983. Diagnóstico ecológico de Quintana Roo. En. Estudios económicos preliminares de Quintana Roo. El territorio y la población 1902-1983. CIQRO. P. Morelos, Q.Roo. 12 p
- Padovani, B. F y C. C. Vooren. 1991. Age, growth, and structure of vértebra in the school shark Galeorhinus galeus (Linnaeus, 1758) from Southern Brazil. Fish Bull., U.S. 89:19-31

- Parsons, G. R. 1983. An examination of the vertebral rings of the atlantic sharpnose shark, Rhizoprionodon terranovae. NE. Gulf. Sci. (6)1: 63-66
- Parsons, G. R. 1985. Growth and age estimation of the Atlantic sharpnose shark, Rhizoprionodon terranovae: A comparison of techniques. COPEIA, 1985 (1): 80-85
- Parsons, G. R. 1993. Age determination and growth of the bonnethead shark Sphyrna tiburo: a comparison of two populations. Mar. Biol. 117: 23-31
- Pitcher, J. T. y P. J. B. Hart. 1982. Fisheries ecology. Chapman and Hall. London. 197 pp.
- Powers, J. E. 1983. Some statistical characteristics of ageing data and their ramifications in population analysis of oceanic pelagic fishes. NOAA tech Rep. NMFS (8):19-24
- Pratt, H. Jr. y J. G. Casey. 1990. Shark reproductive strategies as a limiting factor in directed fisheries, with a review of Holden's method of estimating growth-parameters. In: H.L Pratt Jr., S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fisheries NOAA tech Rep. NMFS (90): 97-109.
- Ridewood, W.G. 1921. On the calcification of the vertebral centra in sharks and rays. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 210:311-407
- Rodríguez, C.; F. Palacios; S. Cruz; P. Díaz. 1994. Atlas pesquero de México. I.N.P. SEPESCA. México. 12-13 p.
- Schwartz, F. J. 1983. Shark ageing methods and age estimation of scalloped hammerhead, Sphyrna lewini, and dusky, Carcharhinus obscurus, sharks. Based on vertebral ring counts. In: Prince, E.D. and Pulos, L. M. (Eds.) Tunas, billfishes and sharks. Proceedings of the International Workshop on age determination of oceanic pelagic fishes. NOAA Tech. Rep. NMFS 8: 167-173
- Simkiss, K. 1974. Calcium metabolism of fish in relation to ageing. In: The ageing of fish. J. B. Bagel (Ed.). Unwin Bros. England. pp 1-12.
- Smith, C. L. 1983. Summary of round table discussions on back calculation. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 8: 45-47
- Tanaka, S. 1990. Age and growth studies on the calcified structures of newborn sharks in laboratory aquaria using tetracycline. In: H.L Pratt Jr., S.H. Gruber and T. Taniuchi (Eds.) Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the estatus of the fisheries. NOAA tech Rep. NMFS (90): 89-202
- Thorson, T. B. y E. J., Jr Lacy. 1982. Age, growth rate and longevity of Carcharhinus leucas estimated from tagging and vertebral rings. COPEIA, 1982. 1: 110-116

- Uribe, M.J. 1993. Distribución, abundancia, estructura y biometría de especies de tiburones capturados en la sonda de Campeche, México. Tesis profesional. Fac. de Ciencias, U.N.A.M. 113 pp.
- Urist, M.R. 1961. Calcium and phosphorus in the blood and skeleton of the elasmobranchii. Endocrinology. 69:778-801.
- Wayne, D.W. 1987. Biostatística. 3ra ed. De. Limusa. 667 pp.
- Williams, T. y B. C. Bedford. 1974. The use of otoliths for age determination. In: T. B. Baginall (Ed). The ageing of fish. Unwin Brothers, Ltd. England. p 13-27.
- Yudin, K. G. y G. M. Cailliet. 1990. Age and growth of the gray smoothhound, Mustelus californicus, and the brown smoothhound, M. henlei, sharks from Central California. COPEIA. 1990 (1):191-204
- Zar, H.J. 1984. Biostatistical Analysis. 2da. ed. Prentice Hall., Inc. Englewood Cliffs, NJ. 718 pp.

Fecha de captura	No organismo	L1 (cm)	L4 (cm)	Sexo	Método almacenamiento	Diámetro (mm)	Cristal violeta			Rojo de alizarina			Nítrato de plata			Cuafito			Luz transmitida			Cones			
							1er.	2do	R.	1er.	2do	R.	1er.	2do	R.	1er.	2do	R.	1er.	2do	R.	1er.	2do	R.	1er.
	1	187	150	m	enterrada	2.28			3			3	9	8	3	8	8	3	6	6	3	10	10	3	
	2	212	148	h	enterrada	2.59	6		3	8	8	1	9		3	8	8	1	7	7	1	9	9	1	
	3	194	140	m	enterrada	2.36	7	7	1	8	7	2	8	7	2	8	8	2	8	8	1	9		3	
	4	188	131	h	enterrada	2.7	8		3			3	9		3	6	8	3	7	6	1	9		3	
	5	193	133	h	enterrada	2.6	8	8	1	10	10	1		9	3	8	8	1	8	8	3			3	
	6	210	145	m	enterrada	2.37	9	9	1			8	3		3	9	9	1	6	6	2	11	9	3	
	7	208	144	h	enterrada	2.66	13		3			3	6	8	3	6	8	3	7	7	1			3	
	8	185	127	h	enterrada	2.39	7	7	2	9		3	7	7	2	7	7	1	6	6	1	7	7	2	
	9	218	151	m	enterrada	2.79	8	8	1	7	7	2	9	9	2	8	8	2	6	6	2	9	9	3	
	10	212	148	m	enterrada	2.16	9	9	2	9	9	1	9	9	2	9	9	1	8	8	1	9	8	2	
	11	226	158	m	enterrada	2.06	8	10	2	11	10	2	9	9	2	10	10	1	7	9	2	11	11	1	
	12	242	177	h	enterrada	3.01	10		3	9	9	1	10	10	2	10	10	1	11	11	1	11	11	2	
	13	206	115	h	enterrada	2.66	9	9	1	9	9	2	10	10	2	9	9	1	7	10	1	8	8	3	
	14	207	142	m	enterrada	2.47	9	9	1	8	9	1	9	9	2	9	9	1	8	8	1	10	10	1	
	15	203	142	m	enterrada	2.56	7	9	2	8	8	1	8	8	2	7	7	1	7	7	1	9	9	2	
	16	240	175	m	sol	3.53		10	3	12	12	1	10		3	10	10	3	9	12	2	12	12	2	
	17	197.5	138	m	sol	2.49	8	8	2	8	8	2	8		3	7	7	1	6	6	3	9	9	1	
	18	234	165	h	sol	3.3	11	11	1	11	11	2	10	10	2	11	11	2	8	11	2	13	13	2	
	19	152	107	m	sol	1.92	6	6	1	8	8	1	7	7	1	6	6	1	8	8	1	7	7	1	
	20	233	166	h	sol	3.4	10	12	3	10	10	1	11		3	10	10	2	8	11	2	13	13	2	
	21	205	147	m	sol	2.9	8	9	3	7	7	2		8	3	9	9	1	7		3	10	10	3	
	22	263	185	m	sol	3.4	10	10	1	12	12	1	10	10	1	10	10	2	10	10	1	13	13	1	
	23	217	162	m	sol	2.7	9	9	1	9	9	2	10	10	1	7	9	3	8	8	2	8	8	1	
	24	217	160	h	sol	3.02	10	10	2	10	10	2	7	10	2	8	8	1	9	9	1	8	12	2	
	25	230	163	m	sol	2.7	10	10	1	11	11	2	10	10	1	10	10	2	10	10	2	11	10	2	
	26	232	163	h	sol	3.11	10	10	1	9	9	1	9		3	7	11	2	8	7	2	10	10	1	
	27	235	169	h	sol	2.74		8	3	11	9	2	10	10	2	8	10	2	8	8	3	10	10	2	
	28	239	173	h	sol	3.16	9		3	12		3	10	10	2	10	10	1	8	11	3	13	13	3	
	29	206	144	h	sol	2.87	8	8	2	9	10	2			3	10	10	1	8	9	3			3	
	30	209	146	h	sol	2.55	9		3	7		3	8	8	2	7	7	2	8	7	3	10	10	2	
	41	191	134	h	sol	2.75	9	9	2	9	9	1	8	7	2	8	8	1	8	8	2	9	10	3	
	42	184	131	h	sol	2.45	8	8	1		7	3	7	9	3	7	7	1	7	7	2	7	8	3	
	43	175	122	m	sol	1.96	7	7	1	6	6	1	6	6	1	6	6	1	6	6	1	6	6	1	
	44	201	139	m	sol	2.64	10	10	1	9	9	1	9	9	2	9	9	2	9	9	1	10	10	2	
	45	213	155	m	sol	2.38	9	9	2	8	8	2	7		3	8	8	2	8	8	3	8	8	1	
	46	199	138	h	sol	2.27	7	7	1	7	7	1	7	7	2	7	7	1	6	8	1	9	9	3	
	47	199	138	h	sol	2.55	7		3	6	8	3	8		3	6	8	3			3	9	9	2	
	48	230	160	h	sol	2.76	10	10	1	9	9	2	10		3	8	8	1	8	9	2	11	11	3	
	49	?	?	?	sol	3.84	10	12	2	12	12	3			3	11	11	2	9	10	2	13	13	2	
	50	234	155	h	sol	3.3	10	10	1	10	10	2	10		3	10	10	1	10	10	1	11	10	2	
	51	235	166	h	sol	3.05			3			3			3	8	8	3	7	5	3			10	3
	53	230	169	h	alcohol	2.97	9		3	10	10	3		9	3	9	9	3		10	3	11	11	1	
	54	209	146	m	alcohol	2.53	7		3	8	9	2		6	3		6	3	7	7	3	10	8	2	
	55	213	147	m	alcohol	2.55	7	7	2	8	8	2		9	3	8	8	1	6	7	2			10	3
	56	215	153	h	alcohol	2.88	9	11	2	10	10	1	9	9	2	8	10	3	8	11	2	11	11	2	
	57	236	168	h	alcohol	3.09	9	10	3	10	10	3	11		3	9	9	3	9	10	1	11	10	3	

1er: Número de bandas en el primer conteo o lectura; 2do: Número de bandas en segundo conteo o lectura; R: Grado de resaltamiento observado