

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Dpt. Biol. Veg. y Ecol.

de la Fac. Biología

de esta Universidad desde el día 2-Nov-95

hasta el día 20-Nov-95

Sevilla 20 de Nov.

EL DIRECTOR DEL Dpto.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

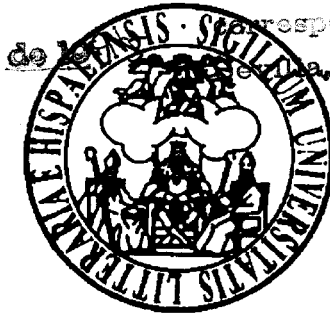
Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 250 número 38 del libro

responsable.

31 OCT 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,

TD
483



INTERPRETACIÓN DEL CICLO DE VIDA DE *Barbus sclateri* (PISCES: CYPRINIDAE) EN BASE AL ESTUDIO DE LOS OTOLITOS Y DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Carmelo Escot Muñoz

957020743

cescot@univ-sev.es

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
1995

TD

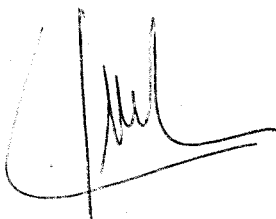
R. 13490

**Departamento de Biología Vegetal y Ecología
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla**

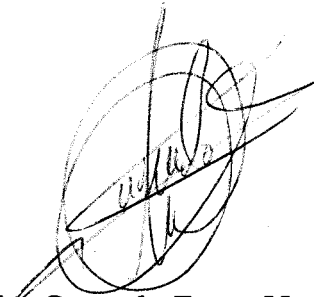
**INTERPRETACIÓN DEL CICLO DE VIDA DE
Barbus sclateri (PISCES: CYPRINIDAE)
EN BASE AL ESTUDIO DE LOS OTOLITOS Y
DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por
Carmelo Escot Muñoz**

**Director:
Dr. Carlos Granado Lorenzo
Profesor Titular de la Universidad de Sevilla**



Fdo: Carlos Granado Lorenzo



Fdo: Carmelo Escot Muñoz

Sevilla, Diciembre 1995

A mi familia y amigos

Índice

Agradecimientos	vii
Organización de la memoria.....	ix
Introducción General	1
Objetivos	5
Presentación de la especie estudiada	6
Presentación del área de estudio	8
1. El uso del otolito para estimar la edad y el crecimiento de <i>Barbus sclateri</i>	11
Introducción	11
Material y Métodos	13
<i>Extracción, preparación y observación de los otolitos</i>	14
<i>Validación del momento de formación de los anuli</i>	17
<i>Validación y precisión del retrocálculo para los estudios de crecimiento</i>	17
<i>Estimación del crecimiento</i>	18
<i>Análisis estadístico</i>	19
Resultados	22
<i>Características de los otolitos de <i>Barbus sclateri</i></i>	22
<i>Determinación de la edad y validación del momento de formación de los anillos</i>	26
<i>Relación del tamaño del pez y del otolito</i>	32
<i>Validación y precisión del retrocálculo para los estudios de crecimiento</i>	41
<i>Estimación de los parámetros de crecimiento</i>	46
<i>Estimación de los cambios anuales en el crecimiento del otolito</i>	50
Discusión	57

2. Estudio comparativo de la variación estacional del peso corporal, hepático y gonadal entre dos poblaciones de <i>Barbus sclateri</i>.....	69
Introducción.....	69
Material y métodos	71
<i>Análisis estadísticos</i>	72
Resultados.....	73
Discusión.....	81
3. Contenido de los ácidos nucleicos en el músculo esquelético y en el hígado de <i>Barbus sclateri</i>. Estudio de los efectos de la temperatura del agua en condiciones naturales	89
Introducción.....	89
Material y métodos	91
<i>Análisis de los ácidos nucleicos</i>	91
<i>Análisis estadísticos</i>	92
Resultados.....	93
Discusión.....	101
4. Variación temporal del contenido de los ácidos nucleicos en el músculo, hígado y gónada en dos poblaciones de <i>Barbus sclateri</i>	105
Introducción.....	105
Material y métodos	106
<i>Análisis estadísticos</i>	107
Resultados.....	107
<i>Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en el músculo blanco</i>	107
<i>Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en el hígado</i>	114
<i>Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en la gónada</i>	123
<i>Relación de los ácidos nucleicos con el tamaño y la edad del pez</i>	133
Discusión.....	134
<i>Dinámica del crecimiento muscular</i>	134
<i>Dinámica del crecimiento del hígado</i>	141
<i>Dinámica del crecimiento de las gónadas</i>	144
Discusión General	149
Conclusiones	155
Referencias citadas	157
Apéndice.....	

Agradecimientos

Este estudio se llevó a cabo durante los años 1992-1995 en el Grupo de Ecología de Peces, Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla. Quiero agradecer al Departamento por proporcionarme la posibilidad de investigar y la ayuda económica necesaria para que este trabajo fuera posible.

Especialmente quiero agradecer al profesor Carlos Granado Lorencio y a mis compañeros de grupo, Lourdes Encina, Dora Rodríguez, Emiliano Mellado y José Prenda, que con sus actitudes positivas, combinadas con una crítica constructiva, han hecho mucho más agradable el desarrollo y la culminación de mi trabajo.

Quiero agradecer muy sinceramente a todos mis amigos y colegas de la Facultad de Biología y sobre todo del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, por su apoyo y por crear un entorno agradable de trabajo.

Sevilla, Diciembre 1995

Carmelo Escot Muñoz

Organización de la memoria

La estructuración de nuestra memoria es un híbrido entre una presentación convencional (introducción, material y métodos, resultados, discusión) y una, en la que cada capítulo constituye una entidad homogénea e independiente. De esta forma, pretendemos por una parte, que el lector tenga una visión completa de cada uno de los objetivos y por otra, facilitarle una lectura fraccionada del manuscrito. Los resultados presentados en cada capítulo son discutidos no sólo respecto al objetivo específico, sino como parte de los resultados e interpretaciones anteriores. De esta forma, el lector podrá comprender mucho mejor nuestros razonamientos a través de una discusión progresiva

I

Introducción general

Los estudios sobre los peces como un elemento importante de las aguas dulces o epicontinentales van incorporándose paulatinamente en los objetivos de la limnología. Esta entrada ha incrementado nuestro conocimiento sobre el funcionamiento del ecosistema acuático, demostrando entre otras muchas cosas, el papel importante que la ictiofauna juega en la gestión de nuestros ríos y de nuestras grandes masas de agua (lagos y embalses). Esto evidentemente implica que un mejor conocimiento de la ecología de las distintas especies de peces, permite hacer un mejor uso de los recursos disponibles para controlar la calidad del agua. Por ejemplo, Allan (1995) señala que los esfuerzos de conservación en los ríos que no tengan una adecuada base científica no tendrán éxito.

La complejidad estructural y la dinámica de los elementos del sistema fluvial, determinan las asociaciones biológicas y el ritmo de los procesos metabólicos (Granado-Lorencio en prensa). De esta forma, las propiedades de cada una de las zonas del río permitirán el establecimiento de aquellas especies que se encuentren adaptadas a las características predominantes del tramo fluvial. Estas adaptaciones al ambiente determinan unas formas y estrategias de vida, que les permitirá a los individuos responder con mayor eficiencia a los cambios ambientales durante su vida (Wootton 1990). Esta mayor eficiencia consiste en una prudente inversión de los recursos, que ofrece, a su vez, nuevas alternativas –por ejemplo, dar más hijos o protegerlos mejor aunque sean menos–, y es en último término la optimización pedida y conseguida por la selección natural (Margalef 1991).

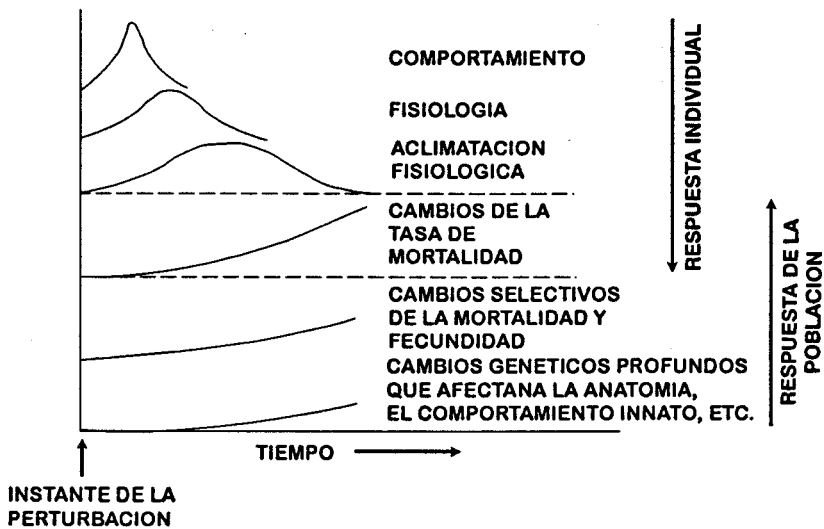


FIGURA I.1. Representación esquemática y simplificada de las respuestas a un cambio en las condiciones ambientales según Slobodkin y Rapoport (1974) (en Wootton 1990)

La autoecología incluye el conocimiento de las características demográficas de la especie (life history traits) y de sus requerimientos ambientales (Baltz 1990). Según Stearns (1992), los principales aspectos de un ciclo de vida son: el tamaño al nacer, el patrón de crecimiento, la edad y el tamaño de madurez, el número y tamaño de la prole, la inversión reproductora a una determinada edad, la mortalidad y por último, la esperanza de vida. Todas estas características que definen a la especie o a la población, corresponden a la expresión de una táctica o estrategia adaptativa, con la finalidad de maximizar la supervivencia individual o poblacional y por tanto, la perpetuidad de la especie (Sibly y Callow 1986). Pero la naturaleza y la amplitud de la respuesta adaptativa, dependerá de la duración del cambio ambiental en relación a la longitud generacional de la especie (Wootton 1990). Un cambio rápido puede ser eludido o sus efectos aminorados por una respuesta en el comportamiento. Si el cambio persiste, entonces se produce una aclimatación del organismo por cambios bioquímicos y fisiológicos. Si el cambio dura mucho tiempo, puede influir en ciertos aspectos del ciclo de vida. Y en algunas ocasiones, el cambio puede durar tanto que se produzcan alteraciones en el patrimonio genético (Figura I.1).

Al intentar interpretar las respuestas poblacionales a determinados cambios naturales y antropogénicos en el ambiente, podemos encontrar con una gran diversidad de estrategias, de etapas de vida y de escenarios ambientales (Winemiller y Rose 1992); y de evidencias que indican que conocer las diferencias entre los individuos es muy importante (Lomnicki 1992). Según esta situación, Van Winkle *et al.* (1993) creen que integrar el

conocimiento de los procesos básicos de reproducción, crecimiento y mortalidad individual de las especies de peces con diferentes ciclos de vida, ayudará a solventar nuestro gran reto, predecir las respuestas de las poblaciones de peces a los cambios ambientales. Pero como Stearns (1983) encontró al estudiar seis poblaciones de *Gambusia affinis*, la mayoría de los cambios que podemos encontrar en los aspectos demográficos entre poblaciones, son causados principalmente por adaptaciones fenotípicas a los cambios ambientales. Esta plasticidad fenotípica es una característica importante de los peces y en particular de los ciprínidos (Mills 1991).

La comunidad de peces más representativa de las aguas continentales en el sur de la Península Ibérica son los ciprínidos y el *Barbus sclateri* uno de sus endemismos más importantes (Elvira 1990; Doadrio *et al.* 1991). De esta especie en Andalucía se conoce algunos aspectos de su biología en base a métodos tradicionales, como cuantificar el crecimiento y la reproducción utilizando medidas morfométricas y gravimétricas (Lucena y Camacho 1978; Lucena *et al.* 1979; Castelló 1981; Lucena 1984; Herrera *et al.* 1988; Herrera y Fernández-Delgado 1992; Rodríguez-Ruiz 1992; Prenda 1993) y mediante el contenido de proteínas y lípidos (Lucena *et al.* 1983), y el análisis calorimétrico del contenido energético del músculo y la gónada (Encina 1991). No existe ningún estudio en el cual se utilice índices de crecimiento fisiológico y bioquímico. Estos métodos pueden medir la tasa a la cual el tejido corporal se elabora, como el caso de la síntesis de proteínas, o elementos que están relacionados con el crecimiento del pez, como la tasa ARN/ADN. Pero además, una de las ventajas importantes es que son más sensibles que los métodos tradicionales; los cambios que se observan durante el crecimiento ocurren primero a nivel celular, después a nivel tisular y finalmente se verían reflejados a nivel orgánico (Robison y Ware 1988). Por tanto, utilizar los ácidos nucleicos nos posibilitaría obtener una mejor información a la hora de determinar la influencia del ambiente sobre el pez, ya que detectaríamos los cambios en el crecimiento en el momento en el cual el pez es capturado (Busacker *et al.* 1990).

De los ácidos nucleicos, el ADN es el constituyente básico de los cromosomas de la célula y como tal permanece relativamente constante, y esta cantidad aparentemente no se ve alterada ni por las condiciones ambientales (Dortch *et al.* 1983), ni por el tipo de tejido (Nasiri 1972; Sable 1974). Por ejemplo, la especie que nosotros estudiamos, *B. sclateri*, muestra la misma dotación cromosómica (tetraploide: $2n=100$) en el músculo esquelético y en el hígado (Collares-Pereira y Madeira 1990; Machordom 1990). Por otro lado, el ARN es el organizador de la síntesis de proteínas y está presente en cantidades variables en el núcleo y en el citoplasma. Su concentración varía directamente con la síntesis proteínica, por tanto, se esperaría que una mayor concentración en un tejido refleje un crecimiento

rápido; son muchos los autores que encuentran una correlación entre la concentración de los ácidos nucleicos y el crecimiento (ver revisión de Bulow 1987; Mustafa *et al.* 1991; Bastrop *et al.* 1992; Wang *et al.* 1993).

También en todos los trabajos sobre *B. sclateri* que anteriormente hemos mencionado, la edad y el crecimiento han sido estudiados utilizando los annuli de las escamas, excepto Lucena y Camacho (1978) y Lucena *et al.* (1979), que utilizaron la primera vértebra. Ombredane y Bagliniere (1992) realizaron una revisión bibliográfica sobre la utilización de las escamas en la ecología de peces. Estos autores encontraron que las escamas presentan grandes problemas debido por ejemplo, a que pueden no mostrar estructuras superficiales bien diferenciadas (como en el género *Barbus*), a la ausencia o dificultad de encontrar el primer anillo, a la regeneración o reabsorción del margen, a que subestiman la edad en los peces de crecimiento lento, etc... Por tanto, parece necesario buscar un método alternativo que complemente o mejore la estima de la edad en esta especie.

Durante muchos años los otolitos han sido usados para estimar la edad en los peces (Bagenal 1974; Summerfelt y Hall 1987). Los otolitos son una masa de carbonato cálcico situados en el oído interno de los peces teleósteos (Platt, 1977; Popper y Coombs 1982). El otolito suministra al pez información relativa a los cambios de dirección y posición, actúa como un acelerómetro, y es capaz de detectar estímulos acústicos (Jobling 1995). Hay tres pares de otolitos (el *sagitta*, *asteriscus* y el *lapillus*) sobre cada uno de los lados de la cabeza, pero solamente el mayor otolito, usualmente el *sagitta*, ha sido utilizado en la mayoría de los estudios. Los otros dos otolitos (el *asteriscus* y el *lapillus*) se usan cuando el *sagitta* es más pequeño y frágil, como en el caso de los ciprinídeos (Secor *et al.* 1991), y pueden también contener una información ecológica valiosa, aunque para ello sea necesario mucha más investigación (Radtko 1984). El valor del otolito para el estudio de las estrategias de vida en peces se puede resumir en 4 puntos, según Secor *et al.* (1995):

- Los otolitos son estructuras acelulares y crecen de una manera más similar a las conchas de los moluscos que por osificación, lo cual ocurre en las escamas, espinas, y otras partes duras del pez.
- Como el crecimiento de los otolitos está aislado, no están sujetos a reabsorción y remodelación como lo están otras estructura duras. Así, los otolitos pueden usarse como un reloj en la historia del pez.
- El análisis microestructural de los otolitos permite estimar las tasas de crecimiento diario y estacionales. Por tanto, los otolitos son la única estructura dura que se puede utilizar para los estudios de las primeras etapas de la vida del pez y para estudios de reclutamiento.
- Las actuales y futuras aplicaciones de las técnicas basadas en los otolitos, se extenderán más allá del radio de acción de los estudios tradicionales de edad y crecimiento.

La utilización del otolito como una estructura válida para los estudios de edad está mucho más desarrollada en los peces marinos; en una reciente revisión de 104 trabajos, Beckman y Wilson (1995) encontraron sólo 7 en los que se utilizó peces de agua dulce. En la Península Ibérica también se confirma esta regla, los estudios de otolitos de peces marinos son los más abundantes, siendo los trabajos de la Doctora Morales-Nin (Institut d'Estudis Avançats de les Illes Balears) el exponente más representativo. En el ámbito de las aguas epicontinentales, sólo conocemos el trabajo de Fernández-Delgado *et al.* (1989) llevado a cabo en el estuario del río Guadalquivir sobre la anguila (*Anguilla anguilla*), pero aunque existan algunos más, es evidente que esta estructura no ha sido abundantemente estudiada en los peces de este tipo de hábitats y sobre todo en los ciprínidos. Esto nos ha motivado a estudiar el otolito de *B. sclateri* y contribuir de este modo, al desarrollo del conocimiento de las estrategias de vida de esta especie.

Objetivos

Nuestra tarea será la de incluir una pieza más en un puzzle, parte del cual engloba un conjunto complejo de estrategias en el ciclo de vida de *B. sclateri*, que el Grupo de Ecología de Peces del Departamento de Biología Vegetal y Ecología está completando en el río Guadalete, con el fin de conocer mejor la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos continentales y de sus organismos.

Este gran puzzle se empezó a construir conociendo por un lado, las características físico-químicas y de forma general, las características de los distintos hábitats que forman el río, y por otro lado, la biología de las especies que forman parte de la comunidad de peces que habitan en él (Rodríguez-Ruiz 1992; Rodríguez-Ruiz y Granado-Lorencio 1992). También se ha estudiado la ecología trófica y la dinámica energética de la comunidad íctica (Encina 1991; Encina y Granado-Lorencio 1994) y por último, se cubrió un aspecto fundamental e íntimamente unido al funcionamiento del río, que fue conocer las estrategias de ocupación del tiempo y del espacio por los peces, y la influencia que tiene sobre estas estrategias las diferentes interacciones entre ciertos elementos de la red trófica fluvial (fitobentos, macroinvertebrados y superdepredadores, la nutria) (Prenda 1993; Prenda y Granado-Lorencio en prensa).

Todo lo anterior lo podemos encuadrar en el grupo de trabajos típicamente extensivos, y es ahora el momento de subdividir cada pieza, con el fin de empezar a conocer la autoecología con técnicas más avanzadas y mucho más precisas (trabajo intensivo). De esta forma, las estrategias en los

ciclos de vida en los peces que son extraordinariamente complejas, pueden entenderse mejor al estudiar la misma especie en diferentes lugares o ambientes (Stearns 1978; Baltz y Moyle 1982) y esta variación interpoblacional nos permitirá situar estos estudios en un contexto evolutivo (Baltz 1990).

Los principales objetivos de este trabajo se fijaron, por tanto, en conocer:

1. Si el otolito es una herramienta útil para los estudios de edad y crecimiento en el *B. sclateri*.
 - a) Estableciendo el momento de la formación de sus anillos.
 - b) Estableciendo la relación entre el tamaño del otolito y del pez, y conociendo la influencia del sexo, la talla y el ambiente sobre esta relación.
 - c) Conociendo la validez y la precisión del retrocálculo a partir de ellos.
 - d) Estimando los parámetros de crecimiento.
 - e) Estableciendo el uso potencial de los otolitos en los estudios de biocronología.
2. El uso de los ácidos nucleicos como una técnica capaz de valorar la distribución de los recursos del pez hacia el crecimiento, la supervivencia y la reproducción.
 - a) Describiendo con precisión las variaciones temporales en el peso corporal, del hígado y de la gónada.
 - b) Conociendo si los mecanismos homeostáticos del pez frente a la variación estacional de la temperatura del agua, son capaces de enmascarar las diferencias temporales e interpoblacionales en el contenido de los ácidos nucleicos.
 - c) Describiendo la variación temporal del contenido de los ácidos nucleicos en el músculo esquelético, el hígado y la gónada.

Presentación de la especie estudiada

Presentamos de una manera sintética las características principales de *B. sclateri*, como son la posición taxonómica (Torrey 1978; Jobling 1995), la morfología externa (Lozano-Rey 1935; observación personal); régimen alimenticio (Encina 1991) y distribución geográfica (Machordom 1990; Doadrio *et al.* 1991).

Posición taxonómica

- Filo: Chordata
- Subfilo: Vertebrata
- Clase: Osteichthyes
- Subclase: Actinopterygii
- Orden: Cypriniformes
- Familia: Cyprinidae
- Género: *Barbus*
- Especie: *Barbus sclateri* (Günther 1868)

Morfología externa

- Cuerpo fusiforme, más o menos alargado y algo comprimido.
- Cabeza de sección triangular, con labios gruesos.
- Boca subterminal con cuatro barbillones largos.
- El radio más largo de la dorsal no ramificado, denticulado en casi todos su borde posterior.
- Nueve dientes faríngeos dispuesto en tres filas.
- Entre 45 y 46 escamas a lo largo de la línea lateral.
- Patrón de coloración no uniforme: dorso pardo verdoso, flancos más claros y superficie ventral amarillenta. Este fuerte contraste entre la parte ventral y el dorso se acentúa en la época de reproducción.
- Color de las aletas verde-anaranjadas.

Régimen alimenticio

- **General:** Bentófago, de tipo omnívoro. Material detrítico, perifiton, larvas de quironómidos, efémeras y tricópteros.
- **Tallas < 115 mm:** Presentan un porcentaje elevado de zooplancton.
- **Tallas > 115 mm:** Hay una mayor incidencia de perifiton, detrito y sedimentos, así como esporádicamente de semillas y macrófitas.
- **Periodicidad de la actividad alimenticia:** De una forma continuada durante el periodo de insolación.

Distribución geográfica

Especie endémica de la Península Ibérica. Vive en las cuencas del Guadalquivir, Guadiaro, Guadalete, Guadalhorce, Segura y Guadiana, aunque es escasa en esta última cuenca (Figura I.2).

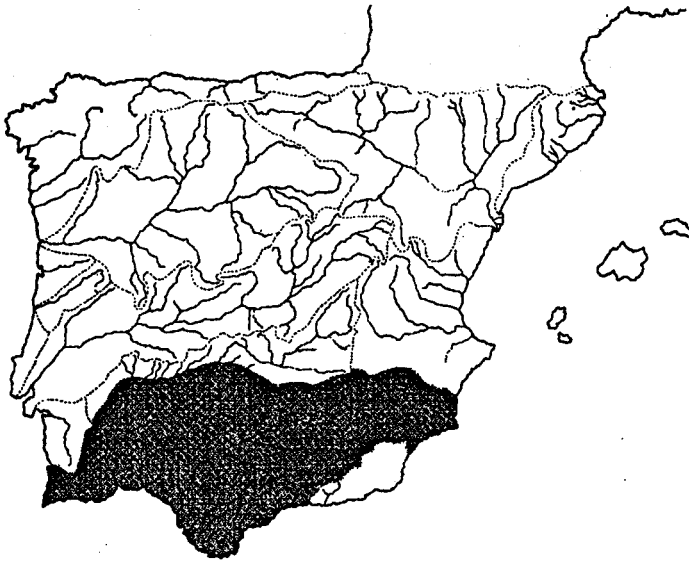


FIGURA I.2. Distribución geográfica de *B. Sclateri* en la Península Ibérica (según Doadrio *et al.* 1991)-

Presentación del área de estudio

Nuestra investigación se ha llevado a cabo en la cuenca del río Guadalete. Las características generales de su red hidrográfica han sido estudiadas por numerosos autores, en cuanto a su geología, edafología, climatología, hidrografía y limnología. Nosotros vamos a describir algunas características generales, pero para una descripción más exhaustiva, el lector puede utilizar las Tesis Doctorales de Dora Rodríguez-Ruiz (1992) y de José Prenda Marín (1993), de la cuales basamos fundamentalmente nuestra descripción.

El río Guadalete tiene una longitud aproximada de 167 km y es el eje de una cuenca de 3.677 km² que drena casi el 50% de la provincia de Cádiz. La topografía de la zona es montañosa, con altitudes que oscilan entre los 200 y los 1.654 m.s.n.m. El sustrato geológico es calizo, si bien en su parte oriental es silicio. Esto hace que la mayoría de los cursos de agua sean mineralizados, con valores de conductividad que oscilan entre 0,5 y 2,5 mS/cm. Posee tres embalses a lo largo de su recorrido, el de Zahara en su tramo alto, y el de Bornos y Arcos en su tramo medio. El clima de la cuenca puede calificarse como mediterráneo con influencia oceánica. Debido a que nace en la Sierra de Grazalema, con 2.200 l/m² de precipitación, los cursos de agua presentan, o un caudal suficiente durante todo el año, o las pozas aisladas no sufren una reducción excesiva.

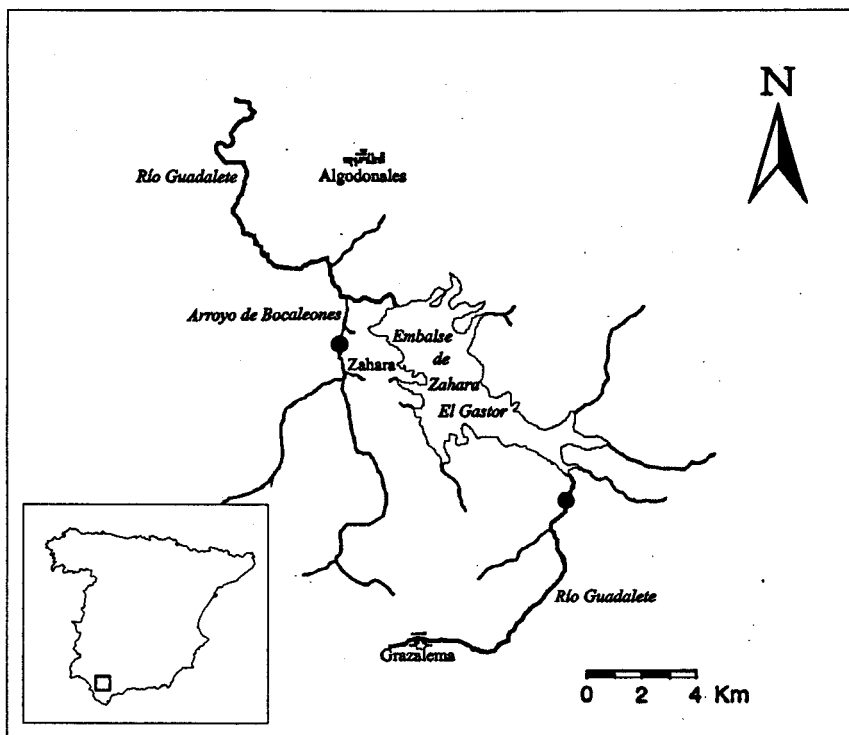


FIGURA I.3. Situación de las estaciones de muestreo (puntos negros) en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones, en los cuales se capturaron los ejemplares de *B. Sclateri* utilizados en este estudio.

La zona de nuestro estudio comprende el curso alto del río Guadalete. La primera estación de captura de peces se situó en el propio río, antes del embalse de Zahara (Figura I.3). Está situada a 370 m.s.n.m. y marca el límite superior de distribución de los peces en el río. Posee una pendiente del 1,6% y las márgenes presentan una elevada cobertura vegetal leñosa, formada por fresnos (*Fraxinus angustifolia*), chopos (*Populus* spp.), sauces (*Salix* spp), aladiernos (*Rhamnus alaternus*), quejigos (*Q. canarensis*), adelfas (*Nerium oleander*) y zarzas (*Rubus ulmifolius*). La segunda estación se situó en el arroyo de Bocaleones, un afluente de primer orden del río Guadalete, aguas abajo de la presa del embalse de Zahara (Figura I.3). Al igual que la primera zona, presenta una elevada cobertura vegetal de orilla, dominada en algunos tramos por *Arundo donax*. Está situada a una altitud de 300 m.s.n.m. y la pendiente es de 1,18%. El periodo de estudio comprende la fase de llenado del embalse, por lo que nos asegurábamos que las dos poblaciones de *B. sclateri* no pudieran mezclarse.

En ambos lugares, la calidad del agua se puede considerar bastante buena, con baja concentración de nutrientes y gran transparencia. La zona más

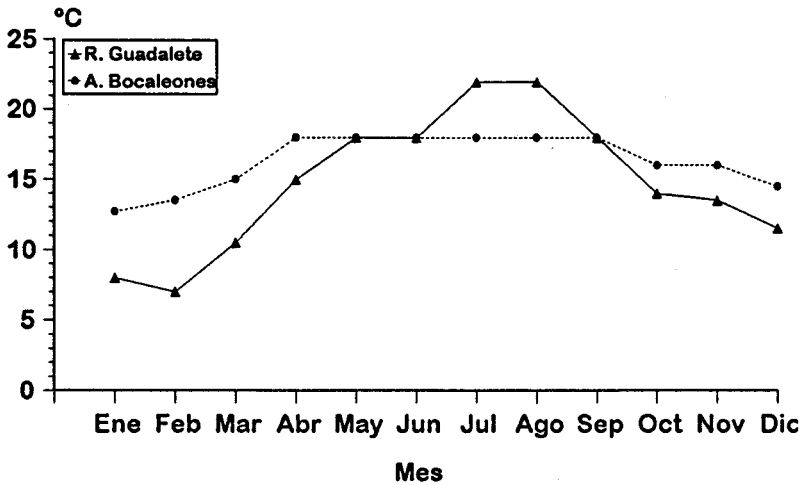


FIGURA I.4. Variación mensual de la temperatura del agua registrada en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones durante el periodo de estudio.

estable, desde un punto de vista estructural, es la estación del arroyo de Bocaleones. Prenda (1993) destaca la importancia que puede tener el origen de los caudales circulantes sobre la estabilidad del hábitat fluvial. Así, el arroyo de Bocaleones presenta un caudal y un régimen térmico, prácticamente constante a lo largo del año (Figura I.4). Por un lado, gran parte de su caudal procede de manantiales próximos a la zona de captura, y por otro, su pequeña cuenca de recepción presenta una cobertura vegetal arbórea de prácticamente el 100%. Aparte del diferente grado de estabilidad, existen diferencias estructurales, siendo la cobertura de algas filamentosas, la variable que discrimina con mayor fuerza las dos zonas; le siguen en importancia la anchura del cauce y la heterogeneidad del sustrato. En este sentido, la estación del río Guadalete presenta una mayor granulometría del sustrato y una mayor cobertura de algas filamentosas, mientras que la del arroyo de Bocaleones muestra una anchura mayor del cauce. Pero uno de los aspectos más importantes es que el hábitat otoñal es similar, en las dos estaciones de muestreo, al de primavera.

El uso del otolito para estimar la edad y el crecimiento de *Barbus sclateri*

Introducción

La edad de los peces es estimada normalmente por la interpretación de patrones en las estructuras de ciertos tejidos duros, tales como los otolitos, escamas, vértebras y otros huesos (Panella 1980; Baltz 1990). Las relaciones entre el tamaño de estas estructuras calcificadas y el tamaño del pez han sido muy utilizadas y el conocimiento de la relación matemática hace posible calcular las longitudes en anteriores edades por retrocálculo (Casselman 1990), con el propósito de construir la historia del crecimiento de la población. Pero como señalan muchos autores, es necesario validar tanto el procedimiento por el cual se estima la edad, como la fórmula de retrocálculo utilizada (Beamish y McFarlane 1987; Baltz 1990; Francis *et al.* 1992; y otros).

Ricker (1992) recomienda un trabajo de Francis (1990) que contiene una valiosa revisión de la literatura referente al cálculo de las longitudes de peces en sus edades previas (retrocálculo) a partir de marcas sobre escamas, otolitos, etc. En este trabajo, el autor establece con claridad las fórmulas de retrocálculo y propone la base para la validación de las mismas, propuesta que también presenta el mismo autor en un trabajo mucho más reciente (Francis 1995). Esta puede ser dividida en tres partes, es decir se debe confirmar:

(i) que el radio de una marca es el mismo que el radio de la estructura en el momento que la marca se formó;

- (ii) que el tiempo presumible de la formación de la marca es el correcto;
y
(iii) que la fórmula usada relacione exactamente el radio de la estructura y el tamaño para cada individuo.

El primer punto se refiere a la posible reabsorción de la estructura, el segundo a la validación de la periodicidad de la marca, y el tercero consiste simplemente en comparar las longitudes observadas con aquellas predichas por el modelo, esta comparación puede hacerse para un pez individual o para un grupo de peces (la más utilizada).

Una vez que obtenemos las longitudes de cada edad, por retrocálculo o a partir de las longitudes observadas, se puede cuantificar las tasas de crecimiento de la población. Esto nos permitirá comprender la estructura de la misma y por consiguiente, las claves esenciales para la conservación de la especie. Pero para esto último, es necesario además valorar los efectos del ambiente sobre el crecimiento, y por ello comparar los crecimientos de la misma edad que tienen lugar en distintos años. Weisberg y Frie (1987) presentaron una técnica que era capaz de separar los efectos de la edad sobre el crecimiento, de los del ambiente. Ellos propusieron un modelo para el crecimiento del pez usando datos de los incrementos anuales en las escamas, por lo tanto obviaban el riesgo del retrocálculo (Francis 1990) y la dependencia ambiental de las relaciones entre el tamaño del pez y de la estructura utilizada (Mosegard *et al.* 1988; Reznick *et al.* 1989; Secor and Dean 1989). El análisis divide el crecimiento en dos partes, la que se debe a la edad del pez en un año determinado y la que se debe a la variación en el ambiente. Esta técnica nos permitirá comprobar si el otolito en el *B. sclateri* puede ser una herramienta valiosa para la construcción de su historia de crecimiento o biocronología. Esto, como indican Pereira *et al.* (1995), puede ser usado para conocer las condiciones ambientales (bióticas y abióticas) a la cual la población estuvo sujeta y por tanto, conducimos a la interpretación de su ecología.

Pero lo primero que tenemos que hacer, es elegir la estructura que mejor nos informe de la edad y crecimiento de la población que estamos estudiando. Las escamas son las más usadas para determinar la edad (varias escamas pueden ser tomadas de un mismo pez, sin sacrificarlo) pero existen claros límites para su utilización (Linfield 1974; Willians y Bedford 1974; Lentsch y Griffith 1987; Casselman 1990; Nedreaas 1990). Recientemente, Ombredane y Bagliniere (1992) realizaron una revisión bibliográfica sobre la utilización de las escamas en la ecología de peces. Estos autores encuentran que existen especies cuyas escamas no presentan estructuras superficiales bien diferenciadas, entre ellas las del género *Barbus*; anillos supernumerarios difíciles de distinguir de los annuli; la ausencia o la dificultad de encontrar el primer anillo; la erosión del margen de la escama; la regeneración de un

número elevado de escamas; que las primeras escamas aparecen cuando el pez tiene ya una cierta talla, lo que no permite analizar la historia de la vida del pez durante sus primeros estados (eclosión y reabsorción); y como regla general, la estimación de la edad es muy difícil (tendente a subestimar) en peces de crecimiento lento (edad alta). La literatura muestra que, aunque la escama es una estructura ampliamente usada, no parece ni muy exacta ni muy precisa en las estimas de edad si no se especifica su validez y sus límites de uso. En ciprínidos es la más utilizada y en las ocasiones cuando el primer annulus de los ejemplares más viejos es difícil de ver, la determinación de la edad se hace con ayuda de las modas en las distribuciones de frecuencia de sus longitudes (Mann 1991).

En *Barbus sclateri* normalmente se ha utilizado la escama, aunque existe un estudio que usa los anillos de crecimiento de la cara plana de la primera vértebra (Lucena y Camacho 1978). En este trabajo sólo fue posible datar a los ejemplares menores de ocho años, ya que según los autores por encima de esta edad el recuento era bastante impreciso. Herrera (1991) y Rodríguez-Ruiz (1992) en un estudio de una población de *B. sclateri* en la cuenca del Río Guadalquivir y en la del Río Guadalete respectivamente, mostraron que la escama era un método útil para determinar la edad en esta especie, aunque la primera autora encontró dificultades por la presencia de marcas falsas y en determinar la posición del primer anillo. Nosotros no entraremos en el debate sobre que estructura debería ser usada en la estimación de la edad y crecimiento en esta especie, pero vamos a aprovechar todos estos estudios y el poco uso en la Península Ibérica (total en el caso de *B. sclateri*) de los otolitos en las especies de peces de aguas continentales, para valorar su utilidad como método alternativo en el análisis de la edad y crecimiento de una especie autóctona de nuestros ríos, el "Barbo".

Material y Métodos

Los ejemplares de *B. sclateri* fueron recolectados mediante pesca eléctrica desde Enero a Diciembre de 1992, en las dos estaciones de muestreo descritas en la Introducción. La longitud total (L_t , precisión 0,1 mm), la longitud estándar (Les , precisión 0,1 mm), el peso total (precisión 0,01 g) y el peso somático (sin vísceras; precisión 0,01 g) fueron registrados para cada pez. Todas las longitudes son dadas como longitud estándar y ésta puede ser convertida a longitud total usando la regresión,

$$L_t = 4,399 + 1,164 Les \quad (R^2 = 0,99, N=340, F_{1,138}, P < 0,0001).$$

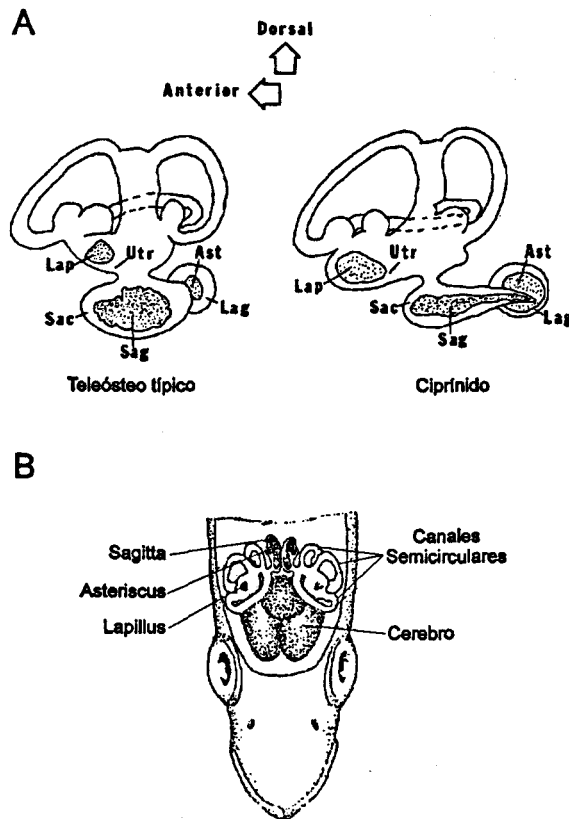


FIGURA 1.1. Anatomía del aparato vestibular. (A) Situación de los otolitos en un teleósteo típico y en un ciprínido. (B) Vista dorsal del aparato vestibular dentro de la cabeza. Ast = asteriscus; Lag = vestibulo lagenar; Lap = lapillus; Sac = vestibulo sacular; Sag = sagitta; Utr = vestibulo utricular (según Secor *et al.* 1991).

Las gónadas fueron examinadas macroscópicamente para determinar el sexo. Para separar los ejemplares adultos y juveniles se siguió el procedimiento que se describe en el capítulo 2. Por último, la cabeza fue cortada, etiquetada y congelada para extraer posteriormente los otolitos.

Extracción, preparación y observación de los otolitos

La primera decisión que se tomó fue cual de los otolitos: *sagitta*, *lapillus* o *asteriscus*, era el mejor para el estudio del crecimiento y de la edad en el barbo. Una buena elección pensamos que podría ser la de considerar el mayor o el de más fácil extracción, o incluso el de mejor manejo. De los tres pares de otolitos presentes en los peces teleósteos, los *sagittae* son los más grandes y más utilizados en estudios de estimas de edad y crecimiento. De los otros dos pares de otolitos, los *lapilli* y *asterisci*, el primero se utiliza cuando

los *sagittae* son pequeños y comparativamente más frágiles (Campana y Neilson 1985), éste es el caso de los ciprínidos.

La Figura 1.1 muestra la disposición de los tres pares de otolitos en la cavidad ótica. Se optó por extraer los otolitos por la parte superior de la cabeza (Open-the-hatch method, Secor *et al.* 1991): Se realizan dos cortes a cada lado del hueso supraoccipital a lo largo del parietal y frontal, se levanta, quedando al descubierto el cerebro y con mucho cuidado se retira éste. Después de una minuciosa observación, podremos encontrar los canales semicirculares en cada una de las paredes laterales de la cavidad cerebral. De esta forma se localiza los *lapilli*, en los cuales confluyen los canales. Se limpia de liquido la cavidad y en el fondo podremos observar el hueso paraesfenoides y basioccipital. Entre ambos se encuentran dos cavidades, el sáculo, donde en cada una de ellas se encuentra el *sagitta*. Si seguimos hacia la parte posterior del hueso basioccipital, dos láminas longitudinales sobre su superficie interna delimitan las dos cavidades lagenares, donde se encuentran encapsulados los *asterisci*.

La descripción usual de la orientación de los otolitos es cara sulcal (*sulcus*: zona asociada a la mácula) o interna y cara anti-sulcal o externa (Panella 1980). Esta descripción de orientación no es la adecuada para los otolitos del barbo, debido a las diferencias de orientación entre ellos. Los otolitos en *B. sclateri* están orientados de tal forma *in situ* que los planos medios del *sagitta* y del *asteriscus* están aproximadamente desplazados 90° respecto al plano medio del *lapillus*. Esto significa que la parte anterior y posterior del otolito se describen como tal, pero es necesario aclarar que la cara derecha e izquierda del *lapillus* se corresponden con la ventral y dorsal respectivamente del *sagitta* y del *asteriscus*. Esta misma regla es la que siguen Gauldie *et al.* (1993) en el estudio de los otolitos de 3 especies de pez gato (*Ictalurus punctatus*, *Clarias fuscus* y *Hypostomus* sp.).

Una vez que se extrajeron, fueron limpiados en hipoclorito sódico al 10% (lejía), después se lavaron con agua destilada para impedir que la lejía formara cristales en la superficie del otolito. Por último, se sumergieron en etanol al 95% para favorecer su desecación y se guardaron secos en placas múltiples de cultivo debidamente etiquetados.

La descripción de los otolitos se realiza en base a la observación a microscopio óptico y electrónico. Para este último, los otolitos fueron pegados secos en un porta de acero con pintura de plata coloidal, cubiertos de oro y fotografiados por un microscopio electrónico de barrido Philips (**marca**) mediante una vídeo-impresora Sony (**marca**).

A partir de aquí, utilizaremos la palabra 'otolito' para referimos al *lapillus*. Tanto el otolito derecho como el izquierdo, fueron pesados (precisión 0.0001 g). El otolito derecho, siempre que fue posible, se sumergió en agua y se observó mediante una lupa binocular (X40), utilizando luz reflejada sobre

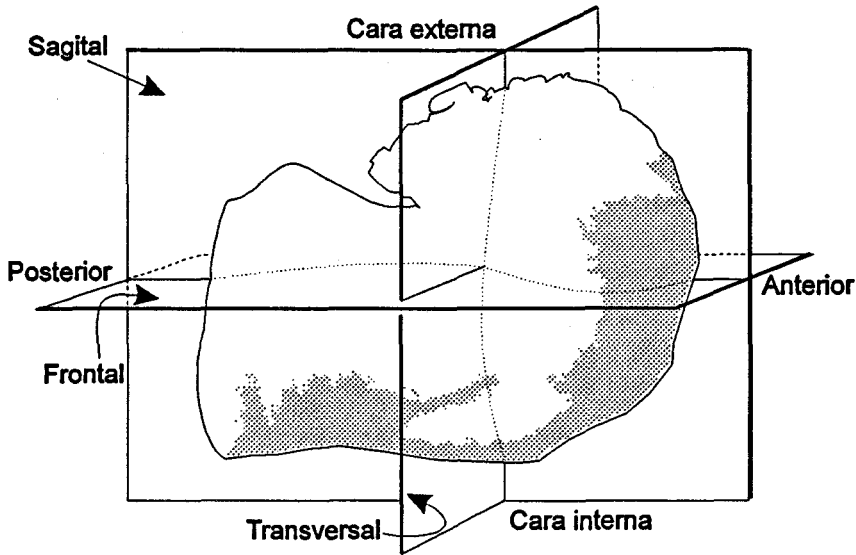


FIGURA 1.2. *Lapillus* izquierdo de *B. Sclateri* mostrando los planos de corte utilizados en este estudio.

un fondo negro. No hubo necesidad de realizar un aclaramiento previo (pe. con glicerina), ya que los otolitos de *B. sclateri* mostraron claras bandas opacas alternando con translúcidas. Con luz reflejada, la zona opaca es blanca y luminosa, mientras que la zona translúcida es oscura. En un principio, suponiendo que una banda opaca y una translúcida se forman anualmente, los annuli fueron definidos como la frontera entre el anillo oscuro (zona translúcida) y el luminoso (zona opaca). Las zonas de crecimiento completo para cada año se representan por la combinación de una zona opaca y una zona translúcida consecutivas entre cada annulus. El primer annulus es un caso especial, consiste en el núcleo más la primera zona translúcida.

El número de annuli del otolito entero fue contado a lo largo de su eje mayor (antero-posterior) por su cara dorsal (anti-sulcal). Se midió mediante un ocular micrométrico (para 40 aumentos, 1 unidad micrométrica = 0,025 mm) el radio total, desde el centro (core) a la parte posterior del otolito, y el diámetro, eje mayor que pasa por el centro. Se midió la distancia a cada annulus, y el ancho de las bandas opacas sobre el mismo eje. En principio pensamos que como las bandas se podían ver con claridad, el otolito entero podía ser utilizado mejor que secciones transversales o sagitales. La utilización del otolito entero tiene la ventaja de su fácil preparación. Además, Williams y Bedford (1974) indicaron que había que tener mucha precaución cuando se retrocalculan longitudes a partir de secciones de otolito; el tamaño relativo de los anillos depende del punto de ruptura y es más difícil localizar el centro exacto del núcleo. De todas formas comprobamos cual sería el mejor eje de

corte, para ello seleccionamos 20 otolitos que fueron montados en resina Epoxi transparente, lijados con papel de lija de 320, 500 y 1000, y pulidos con pasta de diamante de 1 μm . Se realizaron cortes transversales, frontales y sagitales respecto al eje antero-posterior del pez y a la colocación de los otros dos otolitos (Figura 1.2).

Validación del momento de formación de los annuli

Es importante para una correcta determinación de la edad y del crecimiento, comprobar si realmente los anillos opacos y translúcidos se forman una vez por año. El método de validación usado por nosotros fue el del Análisis del incremento marginal, esta técnica consiste en examinar desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo el margen del otolito proveniente de peces recolectados en diferentes periodos del año. Este método es el más utilizado y da unos resultados muy satisfactorios para una gran variedad de especies (ver revisión en Baillon 1992). Por un lado, desde el punto de vista cualitativo, se contabilizó el porcentaje de otolitos con márgenes opacos o translúcidos a lo largo del año (Japp 1990; Ross y Stevens 1995; Thompson y Beckam 1995; Yosef y Casselman 1995). Por otro lado, desde el punto de vista cuantitativo, se midió el ancho de las dos zonas de crecimiento más externas (cada lado opaco del último annulus). La Tasa de Crecimiento Marginal (TCM) fue calculada como la proporción del ancho de la zona de crecimiento actual respecto a la zona de crecimiento del año precedente (Maceina and Betsill 1987; Gooley 1992).

Validación y precisión del retrocálculo para los estudios de crecimiento

Para evaluar los diferentes métodos de retrocálculo se utilizó el procedimiento seguido por Schramm *et al.* (1992). Se comparó las longitudes estimadas a partir del último annulus (L_u) con las longitudes en la captura (L_c) para los peces que habían formado recientemente un annulus. La distancia del annulus formado más recientemente (R_u) tenía que ser al menos, el 95% del radio total del otolito (R_c), esto es, $R_u/R_c \geq 0,95$. Entre estos peces, nosotros esperaríamos que su L_u fuese menor que su L_c pero mayor o igual que el 0.95 de la longitud observada en la captura (L_c).

Una vez que se establecieron las relaciones entre el tamaño del pez y del otolito, las longitudes fueron retrocalculadas por el método de Monastyrsky (Francis 1990) (ecuación 1), el método de Fraser-Lee modificado por Maceina y Betsill (1987) (ecuación 2), el método de la intersección biológica (Campana 1990) (ecuación 3) y el método de regresión (Francis 1990) (ecuación 4):

$$L_i = L_c \left(\frac{R_i}{R_c} \right)^b \quad \text{o también} \quad \log L_i = \log L_c + b(\log R_i - \log R_c) \quad (1)$$

$$\log L_i = a + (\log L_c - a) \frac{\log R_i}{\log R_c} \quad (2)$$

$$\log L_i = \log L_c + \frac{(\log R_i - \log R_c)(\log L_c - \log L_o)}{\log R_c - \log R_o} \quad (3)$$

$$\log L_c = a + b \log R_c \quad (4)$$

L_i es la longitud retrocalculada a la edad i , L_c es la longitud en la captura, R_c es el radio del otolito en la captura, R_i es la distancia al annulus i , R_o y L_o son las coordenadas necesarias para el método de la intersección biológica, a es la intersección y b la pendiente de la regresión lineal del logaritmo de la longitud del pez sobre el logaritmo del radio del otolito (ecuación 3). R_o y L_o necesitan ser determinados empíricamente, pero desafortunadamente no está claro cual es el punto donde el tamaño de la larva (o embrión) y el tamaño del otolito empiezan a ser proporcionales (Secor y Dean 1992). Campana (1990) sugirió que el tamaño del pez y del otolito en el momento de la eclosión de la larva pueden usarse como inicio de la proporcionalidad. Nosotros hemos utilizado los datos de Winkler (com. per.) sobre *Barbus barbuis*, en los que $L_o=9,3$ mm y $R_o=0,019$ mm

Por otro lado evaluamos los efectos de estimar la longitudes en cada edad usando los peces de edades más altas. Para ello también seguimos el procedimiento de Schramm *et al.* (1992), comparamos las longitudes retrocalculadas a partir sólo del annulus formado más recientemente con las longitudes retrocalculadas de los annuli anteriores. Por ejemplo, las longitudes retrocalculadas en la edad 2 usando los peces que estuvieran en su tercera estación de crecimiento, fueron comparadas con las longitudes retrocalculadas en la edad 2 usando los peces que estuvieran en su cuarta o más avanzada estación de crecimiento. Las longitudes retrocalculadas para cada grupo de edad a partir del annulus más reciente y de los annuli anteriores fueron asumidas como muestras independientes y comparadas mediante el análisis de la varianza con las longitudes observadas en la captura para cada edad. Es importante recordar que estas longitudes observadas pertenecían a los peces capturados en la época donde formaban el annulus, por lo que las longitudes observadas eran las propias de cada edad.

Estimación del crecimiento

El modelo de crecimiento de von Bertalanffy (VBGF) (Bagenal y Tesch 1978; Busacker *et al.* 1990) fue usado para describir el incremento en longitud del pez en cada una de las edades, usando las longitudes observadas en cada

edad en los meses que forman el annulus y las longitudes retrocalculadas. La relación es expresada por la ecuación

$$L_t = L_\infty \left\{ 1 - e^{-K(t-t_0)} \right\},$$

donde L_t es la longitud a la edad t , L_∞ es la longitud asintótica predicha por la ecuación, K es la tasa de crecimiento o como la define Moreau (1987) el factor de estrés (una medida de la tasa a la cual se consigue la L_∞), y t_0 es el momento hipotético en el cual, la longitud es cero si el crecimiento sigue lo que predice la ecuación.

Como método alternativo se incorporó la técnica de Weisberg y Frie (1987) que permite estimar el crecimiento considerando las posibles influencias de la edad y del año de crecimiento, o lo que es lo mismo del ambiente. Esta técnica nos permitió, por un lado valorar el crecimiento a cada edad, independientemente del año de crecimiento; por otro, valorar el crecimiento en cada año independientemente de la edad y por último, conocer si el efecto del ambiente (año) era igual para todas las edades. Estos autores consideran un modelo aditivo, es decir, el crecimiento se describe como una función de la edad del pez y de la variación anual en el ambiente. El modelo se ajusta a los incrementos anuales de los otolitos, por tanto, los datos observados son las mediciones de los anchos anuales observados en el otolito y no la longitud retrocalculada del pez. El modelo estimará unos coeficientes que servirán de base para comparar las dos poblaciones y comprobar la eficacia de esta técnica para conocer la historia del crecimiento de la población. .

Análisis estadísticos

La estadística paramétrica utilizada requiere muestreos independientes, normalidad de las variables y homogeneidad de las varianzas (Zar 1984). Para ello se utilizó el test de Kolmogorow-Smirnov para comprobar la normalidad y el test de Bartlett para comprobar la homocedasticidad (Sokal y Rohlf 1981). Cuando fue necesario las variables fueron transformadas para que cumplieran estos requisitos. En nuestro caso se utilizó la transformación mediante el logaritmo decimal en todas las variables morfométricas. Para no utilizar valores negativos fueron previamente multiplicadas por 10^2 , este procedimiento (multiplicar por una potencia de 10) se utiliza cuando los valores se encuentra en un rango de 0 a 1 (Sokal y Rohlf 1981). En el caso de la Tasa de Crecimiento Marginal (TCM) se utilizó la función del arcoseno ya que es la mejor para normalizar y conseguir la homogeneidad de las varianzas de porcentajes o proporciones (Sokal y Rohlf 1981). Lo valores de TCM se

convirtieron de radianes a grados mediante un factor de conversión: el radian equivale a $360/2\pi$ grados.

Nuestro estudio comprende en general la comparación de respuestas biológicas dentro de una serie de condiciones ambientales (internas o externas al pez). Como estas respuestas tienen una distribución continua y las condiciones son discretas, inherentes o por diseño, es apropiado analizar los datos usando el análisis de la varianza (ANOVA) o el análisis de la covarianza (ANCOVA).

En los trabajos de ecología sobre organismos individuales en su medio natural, la mortalidad, la migración o la imposibilidad de recolectar los individuos de ciertos grupos, impide que obtengamos el mismo tamaño de muestra o nos falte alguna combinación de los factores. Shaw y Mitchell-Olds (1993) recomiendan la utilización de métodos para el cálculo de la suma de los cuadrados (SS) que se han diseñado específicamente para datos no balanceados. En concreto, el análisis del Tipo III se utiliza cuando se observan todas las combinaciones de los tratamientos pero el número de observaciones varía. En el caso de que además falte alguna combinación de los tratamientos, como ocurre en el procedimiento de Weisberg y Frie (1987) seguido por nosotros (los datos forman una matriz triangular y no cuadrada), no se puede utilizar las fórmulas normales para ajustar el análisis de la varianza de dos factores. Estos autores recomiendan, (1) un análisis general de la varianza o un programa de regresión lineal, como el procedimiento GLM del SAS®; (2) usar los mínimos cuadrados ponderados, utilizando para ello el número de peces de cada grupo de edad; (3) para compensar la falta de combinaciones (datos no balanceados) se debe ajustar primero el efecto de la edad y después el del ambiente, esto se consigue utilizando en el procedimiento GLM del SAS® la suma de cuadrados del Tipo I; y (4) es conveniente ajustar el modelo sin forzar una intersección común.

Otro requerimiento básico en el diseño es determinar si las condiciones o efectos son fijos o aleatorios. El error más común encontrado en la literatura es tratar incorrectamente los efectos aleatorios como fijos o viceversa, lo que es crucial para interpretar los resultados (Bennington y Thayne 1994). Estos mismos autores indican que el lugar (río) y el tiempo (años o meses, dependiendo del análisis) son difíciles de clasificar como aleatorios o fijos, todo depende de los objetivos de la investigación. Atendiendo a sus recomendaciones, nosotros consideramos fijos todos los efectos a saber, sexo, edad, lugar y tiempo. En el caso del lugar y el tiempo nosotros lo que pretendíamos comprobar es si estos factores (condiciones ambientales distintas, mes a mes, año a año o de un río a otro) influyen en la respuesta de las variables, más que estimar la magnitud de la variación asociada con ellos (efecto aleatorio).

Cuando el efecto de interacción entre ambos factores fue significativo, la interpretación de esta interacción se hizo a partir de un análisis de los efectos simples (Riba 1990). Las diferencias entre las medias fueron comprobadas a posteriori mediante el procedimiento de Bonferroni por el método de repetición o por el simple. El primero compara la media de un grupo con la del anterior y el segundo compara todas las medias con una, la cual es designada por nosotros según el objetivo del análisis. Las comparaciones de Bonferroni permiten analizar sólo un subconjunto de todas las comparaciones posibles y un mejor control del error tipo I (Riba 1990).

Para predecir de una forma objetiva la edad en *B. sclateri*, los datos generados a partir de las mediciones en el otolito y en el pez fueron aplicados a un modelo de regresión múltiple:

$$\text{Edad} = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4$$

En este modelo, la edad en años fue determinada contando los anulli, a = intersección, b = coeficientes de regresión, x = variables. Las regresiones fueron ajustadas mediante el procedimiento paso a paso, con un nivel de inclusión para las variables del 0,05. Las posibles variables independientes fueron el radio, el diámetro y el peso del otolito, y la longitud estándar y el peso somático del pez.

Las curvas de crecimiento de von Bertalanffy (VBGF) fueron ajustadas separadamente para machos y hembras en cada una de las poblaciones mediante el método no lineal de mínimos cuadrados (Saila *et al.* 1988) usando el algoritmo de Marquardt. Como el modelo no es lineal, no se puede usar un análisis convencional de la covarianza (ANCOVA) para detectar diferencias entre los distintos grupos. En cambio, el análisis de la suma de cuadrados de los residuos (ARSS) utilizado por Chen *et al.* (1992) nos permitió comparar las VBGF entre sexos y entre poblaciones. El procedimiento del ARSS es el siguiente: (1) se calculó la suma de cuadrados residual (RSS) y su grado de libertad (GL) de la VBGF en cada grupo, (2) las RSS y GL de cada grupo fueron sumadas, (3) los datos de cada grupo fueron agrupados para calcular la RSS y el GL de la VBGF total, y (4) el estadístico F fue calculado como

$$F = \frac{\frac{RSS_p - RSS_s}{3 \cdot (K - 1)}}{\frac{RSS_s}{N - 3 \cdot K}}$$

donde RSS_p = a la RSS de cada VBGF ajustada a los datos agrupados, RSS_g = suma de los RSS de cada VBGF ajustada a los datos de cada grupo individual, N = tamaño de la muestra, y K = número de grupos comparados. Para comprobar si hubo diferencias en las VBGF entre los grupos, el valor de la F calculada fue comparado con el valor crítico de la F , con los grados de libertad del numerador y denominador igual a $3(K-1)$ y $N-3K$, respectivamente.

Todos los análisis fueron llevados a cabo con los paquetes estadísticos SAS® y SPSS®. Para todos los test una probabilidad menor o igual de 0,05 fue considerada suficiente como para rechazar la hipótesis nula (H_0).

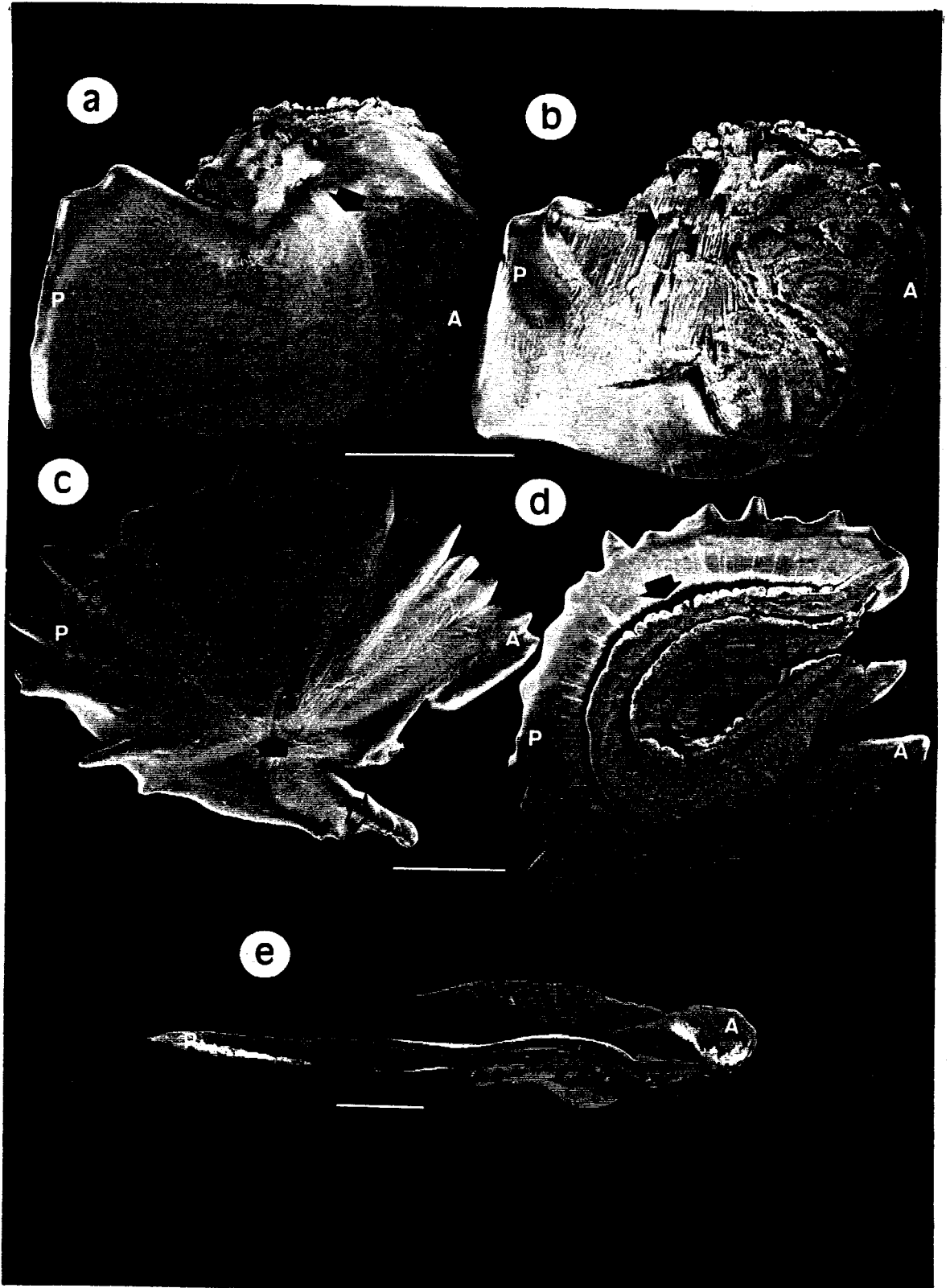
Resultados

Características de los otolitos de *Barbus sclateri*

Bauzá (1971) describió los otolitos de *B. sclateri* confundiendo totalmente el nombre de cada uno. Así al *sagitta* le llamó *lapillus*, a éste *asteriscus* y a este último *sagitta*. Rojo (1987) dibujó correctamente cada uno de los otolitos de *B. bocagei*, que coinciden con los de *B. sclateri*. En la Figura 1.3 se pueden observar los tres pares de otolitos de *B. sclateri*.

- ◊ El *Lapillus* a microscopio óptico es de forma globosa, con un segmento redondeado y otro triangular, y con una escotadura entre ambos. Es el más fácil de extraer, presenta con claridad la alternancia de bandas translúcidas y opacas sin ninguna preparación, y para las edades utilizadas en este estudio no tuvieron problemas de opacidad.

FIGURA 1.3. Otolitos de *Barbus sclateri* mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM). a) La superficie antisuical del *lapillus* está aplanada y muestra elementos concéntricos (flecha negra) en la parte anterior (A). b) La superficie sulcal del *lapillus* está formado por grupos de largos cristales (flecha negra) que crecen paralelos al plano horizontal y otros grupos de cristales orientados en una estructura semejante a una roseta, delimitados por un surco (flecha hueca) en la parte anterior (A). c) La superficie antisuical del *asteriscus* muestra márgenes que radian concéntricamente (flechas huecas) alrededor de un foco (flecha negra). d) La superficie sulcal del *asteriscus* muestra una parte cristalina central en forma de herradura, separada por un profundo surco (flecha negra) de una superficie exterior más lisa y lobulada. e) La superficie sulcal de *sagitta* muestra dos surcos (flechas negras) que se unen para formar la parte posterior (P). Los surcos se forman debido a la presencia de una expansión superior (S), media (M) e inferior (I). La expansión inferior y superior está formada por cristales que crecen concéntricamente (flechas huecas). Las barras representan 1 mm.



A microscopio electrónico la cara anti-sulcal está aplanada y muestra elementos concéntricos en la parte anterior, con una estructura cristalina de granos muy finos (Figura 1.3a). Esta superficie anti-sulcal lisa cambia abruptamente en una estructura cristalina tosca de la superficie sulcal, visible en el margen superior del lapillus en la Figura 1.3a. La superficie sulcal está formado por grupos de largos cristales que crecen paralelos al plano horizontal del otolito (Figura 1.3b) y otros grupos de cristales orientados en una estructura semejante a una roseta, delimitados por un surco en la parte anterior. Por tanto la superficie sulcal se compone de cristales que crecen paralelos o en cierto ángulo respecto de la mácula.

- ◊ El *Asteriscus* a microscopio óptico recuerda a una rueda dentada, sobre todo en peces de edades avanzadas, ligeramente cóncavo en su cara interna y un rostro saliente y agudo en el borde anterior; a medida que aumenta su tamaño, se forma una estructura en forma de herradura en su cara interna cada vez mayor, esto impide el pasde la luz y no deja ver con claridad las marcas. Además este fenómeno se ve potenciado por la mayor ondulación de la superficie de su cara externa en peces de tamaño grande, formando unos lóbulos que radian desde el centro (esto corresponde a la 'disposición en forma de abanico de los haces de aragonito' descrito por Pannella 1980).

A microscopio electrónico la superficie anti-sulcal es lisa, con márgenes que radian concéntricamente alrededor de un foco, dando la apariencia de una estructura prismática y lobular. Se aprecian también rasgos de crecimiento concéntrico a partir del foco (Figura 1.3c). La superficie sulcal muestra una parte cristalina central en forma de herradura, separada por un profundo surco de una superficie exterior más lisa y lobulada (Figura 1.3d).

- ◊ El *Sagitta* a microscopio óptico da la sensación de fragilidad, es de forma alargada, fina y con tres expansiones en el centro, no observándose claramente ninguna banda.

A microscopio electrónico la superficie sulcal muestra dos surcos (Figura 1.3e) que se unen para formar la parte posterior del sagitta.

La buena definición de las bandas opacas y translúcidas encontradas en el *lapillus* determinó que eligiéramos éste para nuestro estudio. Fueron procesados un total de 347 otolitos, de los cuales 7 se excluyeron del estudio (2%) por una deficiente cristalización tanto en el izquierdo como en el derecho. Se comprobó la utilización de fotografías y de cámaras de vídeo para su visualización; en general, ambos procedimientos son aceptables, aunque confiamos menos en la determinación de la edad por fotografías. Con este método se notó una pérdida de definición al permitir un menor ajuste en

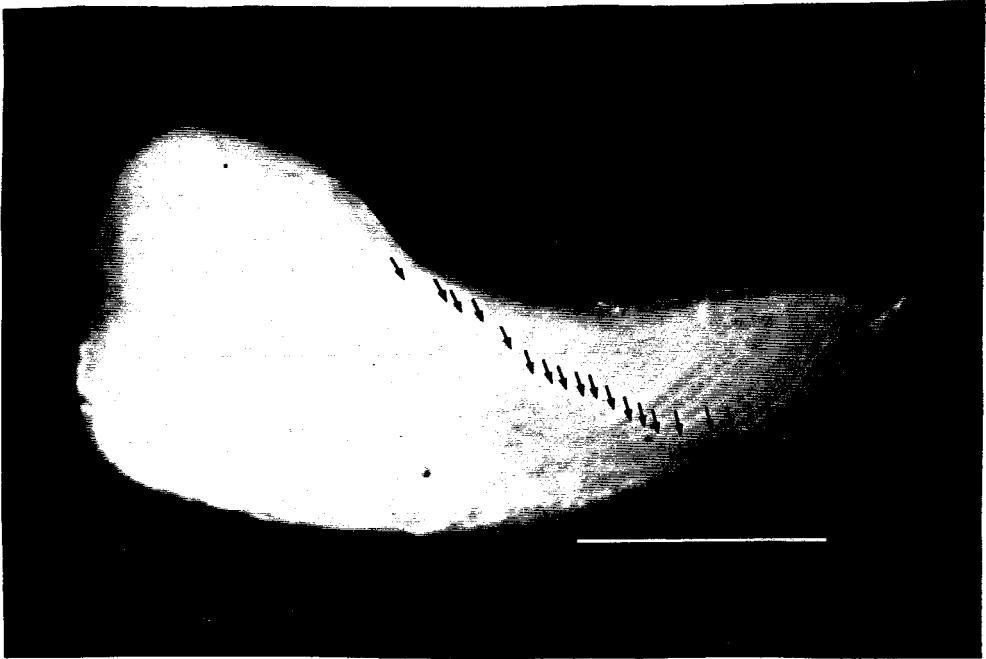


FIGURA 1.4. Corte frontal del *lapillus* de una hembra de 20 años, con una longitud total de 480 mm y capturada en el río Guadalete durante el mes de Agosto. Esta imagen se obtuvo sumergiendo el otolito seccionado en agua, con fondo negro y luz reflejada. Las flechas indican cada *annulus*. La barra = 1 mm.

la luz, en el plano focal y en el aumento de determinadas partes del otolito, que directamente a través del microscopio o de la lupa. La observación directa por medio de cámaras de vídeo dieron buenos resultados, aunque en muchos casos se observaron interferencias visuales en las áreas de intenso color blanco. Este fenómeno es el que Welleman y Storbeck (1995) denominan “blooming”, y es el resultado de la peor detección de los niveles de grises en la frontera entre un anillo opaco y un translúcido. El “blooming” puede ser inhibido, según los autores anteriores, usando cristales polarizados. De todas formas, el hecho de no poder acoplar la cámara al microscopio y sólo poderlo hacer a la lupa, nos impidió utilizarlo para otolitos de pequeño tamaño. Esto nos condicionó el no poder emplear el sistema de análisis de imagen, ya que preferíamos usar el mismo sistema de visualización y de medida para todos los tamaños de otolito, aunque esto implicara un aumento considerable de la carga de trabajo.

En cuanto a la utilización de los cortes o secciones, pudimos comprobar que con el corte sagital, tanto a partir de la cara interna como de la externa, se perdía información, sobre todo en los tamaños grandes debido a que aumentaba la concavidad o convexidad respectivamente, es decir, no

contenía información de la zonas periféricas. De todas formas si se quiere utilizar este corte habría que contabilizar los primeros anillos y cuando desaparecieran contabilizar los últimos. Con el corte transversal se perdía también información, ya que por un lado era más difícil asegurarnos de la presencia del núcleo y por otro, se difuminaban más los anillos. El corte frontal es el que ha dado mejores resultados, coincidiendo casi en un 100% las estimas de edad respecto a las del otolito entero. Se pudo encontrar con facilidad el núcleo y no se perdió definición en cuanto a los anillos del eje posterior o de mayor crecimiento. Este corte lo utilizamos posteriormente para comprobar la edad en una hembra de 20 años con una longitud total de 480 mm procedente del río Guadalete (Figura 1.4). Utilizar los cortes tiene una ventaja adicional, es poder observar los otolitos a través del microscopio electrónico de barrido (SEM). Como forma ilustrativa, ya que no era el propósito de este estudio, se puede observar en la Figura 1.5 distintas fotografías obtenidas por microscopía electrónica de cortes frontales atacados con 0,1 N de HCl durante 3 minutos.

Determinación de la edad y validación del momento de formación de los anillos

La Figura 1.6 muestra claramente las bandas opacas y translúcidas del otolito (*lapillus*) entero del *B. sclateri*. Se detectó en algunos otolitos la presencia de ciertas bandas translúcidas que aunque en el eje de la lectura eran claras, a medida que nos acercábamos a la parte superior o inferior del otolito se difuminaban, estas bandas fueron consideradas como falsas.

Aunque se observó una zona translúcida en el margen de los otolitos a lo largo de todo el año (Figura 1.7a), la proporción de otolitos con una zona translúcida mostró un ciclo anual unimodal. En general, en Abril y Mayo la mayoría de los otolitos (>80%) tenían una zona translúcida marginal; aunque si lo descomponemos por río, más del 80% de los otolitos procedentes del Guadalete poseían un margen translúcido en Abril y los procedentes del Bocaleones entre Marzo y Junio (Figura 1.7b, c).

En general la presencia de un margen opaco en el otolito también varió con el momento del año (Figura 1.7a). Los otolitos muestreados desde Julio a Enero mostraron un margen de material opaco, patrón que se mantiene en líneas generales cuando lo separamos por ríos (Figura 1.7b, c).

El efecto del momento de la captura (mes) y del ambiente (río) sobre la media mensual de la Tasa de Crecimiento Marginal (TCM) se evaluó usando el análisis de la varianza (Tabla 1.1). El momento de la captura influyó significativamente sobre la cantidad de material opaco presente en el margen del otolito ($P < 0,00001$), mostrando ambos ríos el mismo patrón de variación ($P = 0,174$) y la misma TCM ($P = 0,212$) (Figura 1.7a, b, c). Según los

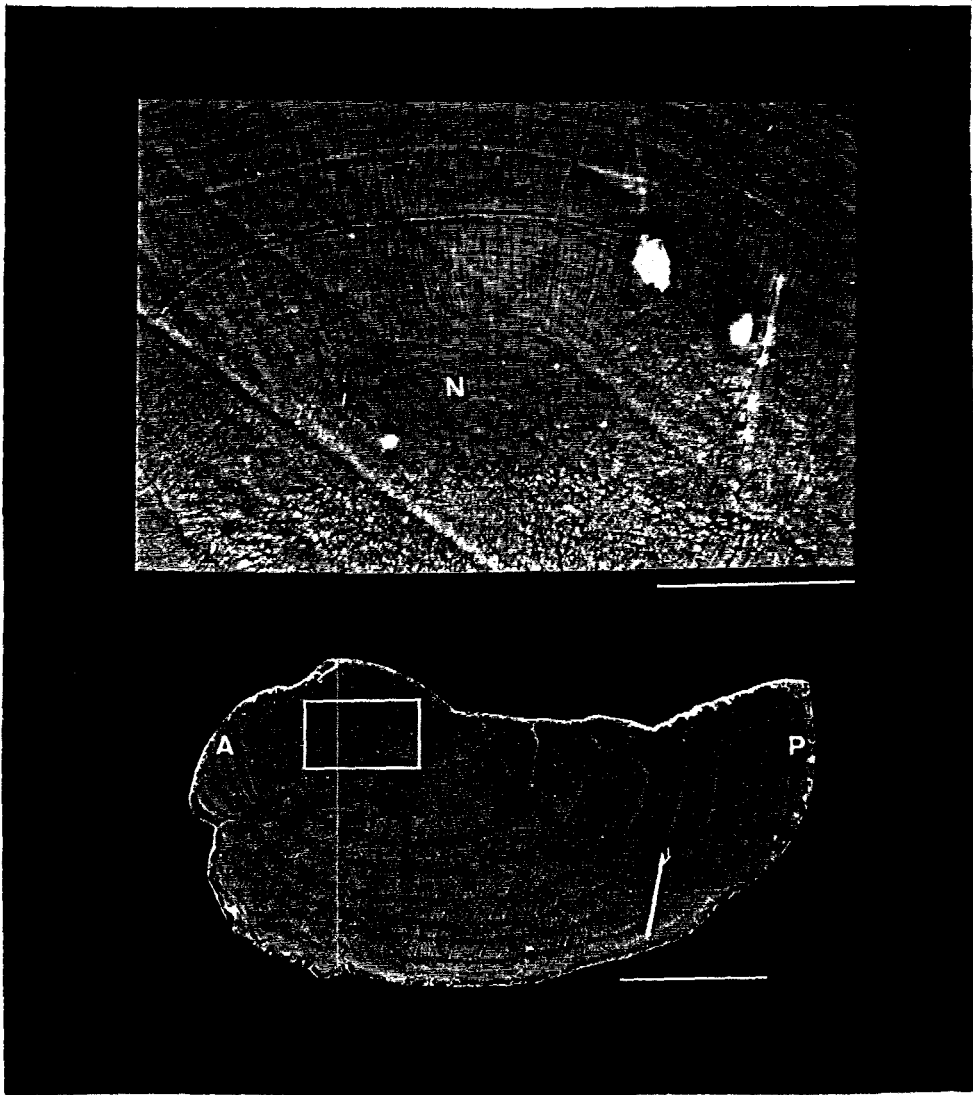


FIGURA 1.5. Microfotografía a microscopio electrónico de barrido (SEM) de un corte frontal del lapillus de *B. sclateri* (barra = 500 μm) y de la zona del núcleo (N) (barra = 100 μm). El otolito fue decalcificado con 0,1N de HCl durante 3 minutos y pertenecía a un macho de 8 años, con una longitud total de 274 mm y capturado en el río Guadalete durante el mes de Diciembre. (A) anterior, (P) posterior.

resultados del análisis a posteriori, mediante las comparaciones de Bonferroni (Tabla 1.1), la tasa de crecimiento marginal mostró tres periodos claros durante el año, de Febrero a Mayo se registraron los mínimos valores, hubo un aumento significativo en Junio y por último otro aumento en Septiembre. Es conveniente señalar que el mes de Enero no se ha incluido en el análisis de



FIGURA 1.6. Visión del *lapillus* entero de *B. sclateri* bajo lupa binocular, sumergiéndolo en agua, sobre fondo negro y utilizando luz reflejada. El otolito mayor pertenece a una hembra de 11 años, de 260 mm de longitud total y capturada en el arroyo de Bocaleones durante el mes de Noviembre (barra = 1 mm). El otolito más pequeño pertenece a un macho de 6 años, de 92 mm de longitud total y capturado en el arroyo de Bocaleones durante el mes de Enero (barra = 0,5 mm). Las flechas negras indican cada *annulus*.

la varianza, ya que en este mes no se capturó ningún individuo en el río Guadalete. Como hubo un patrón claro en el crecimiento de la banda opaca para el conjunto de datos y para los de cada río, quisimos comprobar si ocurría lo mismo en todas las edades, para lo cual los datos fueron separados

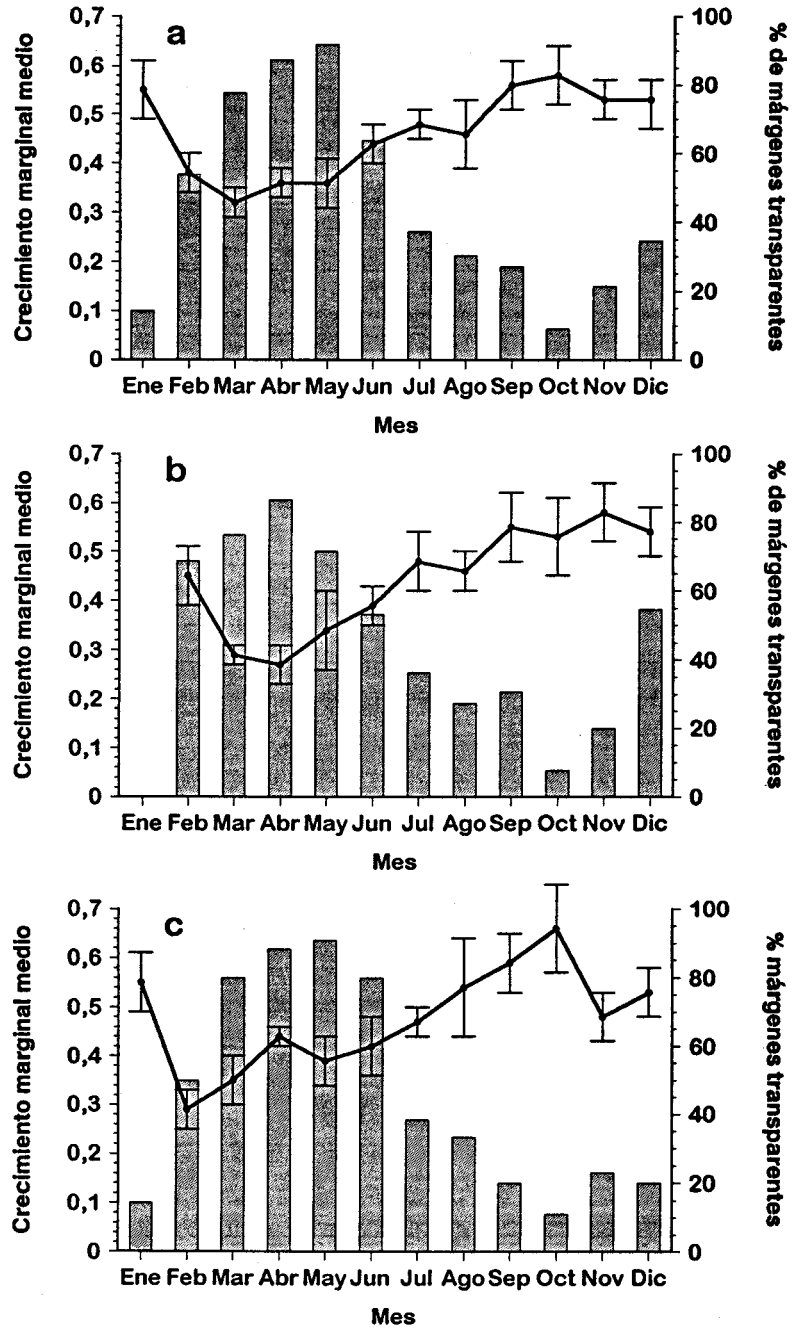


FIGURA 1.7. Representación gráfica del porcentaje de otolitos con márgenes translúcidos (barras) y del crecimiento marginal medio con su error estándar durante los meses de estudio para el total de los ejemplares de *B. sclateri* capturados (a), el río Guadalete (b) y el arroyo de Bocaleones (c).

TABLA 1.1. Análisis de la varianza de los efectos del momento de la captura (mes) y el lugar (río) sobre la Tasa de Crecimiento Marginal (TCM) de *B. sclateri* durante el periodo de estudio. Se usó las comparaciones de Bonferroni para determinar las diferencias entre las medias adyacentes.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
Mes	3,76	10	0,38	6,58	<0,00001
Lugar	0,09	1	0,09	1,56	0,212
Interacción					
mes-lugar	0,81	10	0,08	1,41	0,174
Error	16,50	289	0,06		

Fe=Ma=Ab=My<Jn=Jl=Ag<Se=Oc=No=Di

por grupos de edad dentro de cada río. Los grupos fueron elegidos de tal forma que pudiéramos contrastar el mayor número de edades, pero tuviéramos un tamaño adecuado de muestra: para el Guadalete, de 2-4, de 5-8 y de 9-16 anillos; para el Bocaleones, de 2-4, de 5-8, de 9-12 y de 13-18 anillos. En la Figura 1.8 se observa como el patrón general se mantiene entre los grupos de edad en ambos ríos.

Los resultados anteriores demuestran que una banda opaca y una translúcida se forman en diferentes momentos del año, y que la combinación de una y otra es de naturaleza anual. Para los propósitos de la interpretación de la edad, la porción distal de cada zona translúcida fue considerada como un *annullus*. El término *annullus* se asocia con la zona translúcida que se forma una vez por año en las estructuras calcificadas de peces de regiones templadas y es usado para interpretar el crecimiento de la estructura en términos de tiempo y edad (Casselman 1987).

Una vez que se contaron los anillos (*annulli*), estos se convirtieron en una estima de edad. Este último paso es lo que Francis *et al.* (1992) se referían como la interpretación del margen. Esto implica decidir sobre el momento (o fecha) de formación del anillo más externo que se cuenta. La conversión del número de anillos contados en cada otolito en una edad, implica considerar la relación entre esta fecha y otras dos fechas: la de captura y la de nacimiento (Francis 1995). Nosotros hemos adoptado el 1 de Enero como la fecha de nacimiento nominal para las dos poblaciones estudiadas, que no tiene porque coincidir con la del nacimiento natural (Williams y Bedford 1974). De esta forma, la edad absoluta de cada pez se determinó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

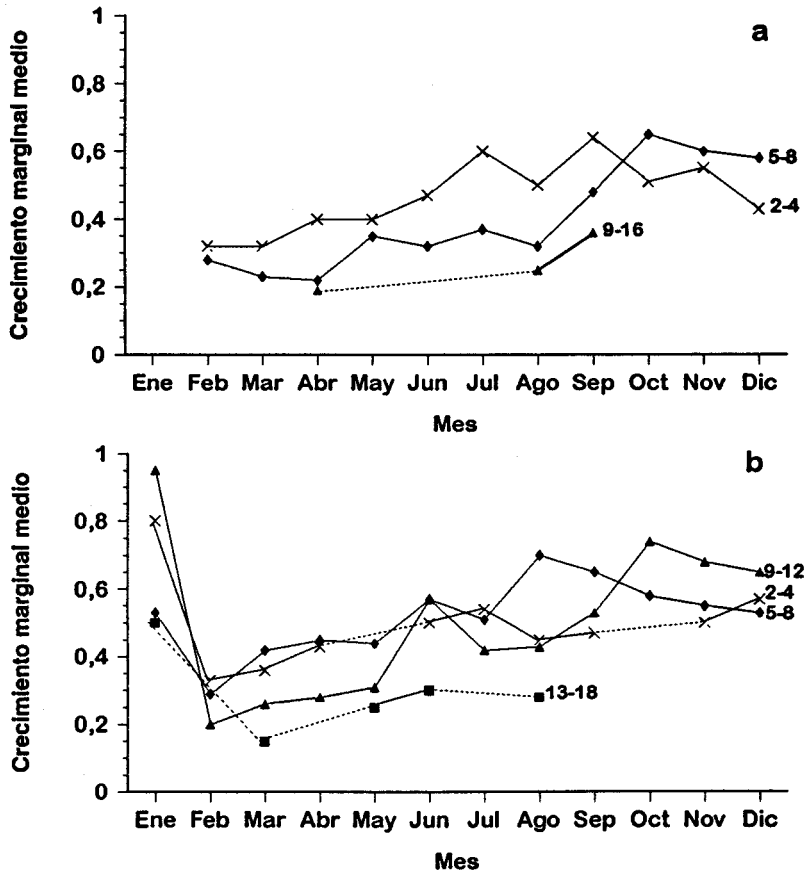


FIGURA 1.8. Representación gráfica del crecimiento marginal medio por grupo de edad durante los meses de estudio para los ejemplares de *B. sclateri* capturados en el río Guadalete (a) y en el arroyo de Bocaleones (b).

- ⇒ Si el otolito presentaba el margen opaco, independientemente de la fecha de captura, la edad fue igual al número de anullí.
- ⇒ Si el otolito presentaba el margen translúcido, el cálculo de la edad dependía de la fecha de captura, así:
 - Si el pez procedía del periodo de Julio a Diciembre, la edad fue igual al número de anullí que tuvieran una zona opaca posterior.
 - Si el pez procedía del periodo de Enero a Junio, la edad fue igual al número de anullí que tuvieran una zona opaca posterior más uno.

El máximo de edad estimada en los barbos capturados en el río Guadalete fue de 20 años para las hembras y 15 años para los machos. En el arroyo de Bocaleones fue de 18 años para las hembras y 10 años para los machos. En cuanto a la edad mínima se capturaron individuos de sexo desconocido con 1 año en el arroyo de Bocaleones, hembras de 2 años en

ambos ríos y machos de la misma edad en el río Guadalete, y sólo fueron capturados machos a partir de 3 años en el arroyo de Bocaleones.

Un histograma de frecuencias de la edad estimada (edad media individual) de los datos del río Guadalete fue construido por sexo. El 51% de los peces analizados mostraron edades estimadas menores o iguales a 6 años (Figura 1.9a). No hubo diferencias entre la distribución de frecuencia de edades entre machos y hembras, indicando que ambos sexos en el río Guadalete contribuyeron de igual forma a la estructura de edad de la población (test de Kolmogorov-Smirnov, $z=0,425$, $P=0,994$, $N=168$), a pesar del ejemplar hembra de 20 años capturado. De igual forma, el 60% de los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones tenían edades estimadas de 6 años o menos, sin embargo si hubo diferencias en la distribución de frecuencias entre los dos sexos, ya que no se capturaron machos de más de 10 años (test de Kolmogorov-Smirnov, $z=2,912$, $P<0,0001$, $N=157$; Figura 1.9b). Si combinamos los sexos, tampoco existió diferencias en la distribución de frecuencias de la edad entre las dos poblaciones (test de Kolmogorov-Smirnov, $z=1,062$, $P=0,209$, $N=325$).

En términos de edad para nuestros datos, el 62,5% de las hembras del río Guadalete eran adultas a los 5 años y el 100% a los 6 años; el 80% de los machos del río Guadalete maduraron a los 4 años y el 100% a los 5 años; el 50% de las hembras capturadas en el arroyo Bocaleones eran adultas a los 4 años y el 100% a los 5 años; y el 50% de los machos del arroyo eran adultos a los 3 años y el 100% a los 5 años. Dentro de cada cohorte los ejemplares adultos fueron mayores que los juveniles en ambos sexos (Prueba de la t, $P<0,05$).

Relación del tamaño del pez y del otolito

En la Tabla 1.2 se presenta la media de todas las medidas morfométricas tomadas sobre el otolito y del tamaño del cuerpo de ambos sexos en cada población. En las hembras capturadas en el río Guadalete, las medias están influidas por el individuo de 20 años, sobre todo en el peso del otolito como pone de manifiesto el error estándar (hembra: 0,29; macho: 0,04). Por tanto si eliminamos este individuo, tendríamos hembras de hasta 16 años con una longitud estándar de 362 mm, un peso somático de 729 gr, un peso del otolito de 11,9 mg, un radio de 2,27 mm y un diámetro de 3,03 mm.

La Figura 1.10 muestra la relación entre las medidas tomadas sobre el otolito y la longitud estándar. El peso del otolito incrementó exponencialmente con la longitud estándar (Figura 1.10a). La representación gráfica del diámetro y del radio del otolito frente a la longitud fueron

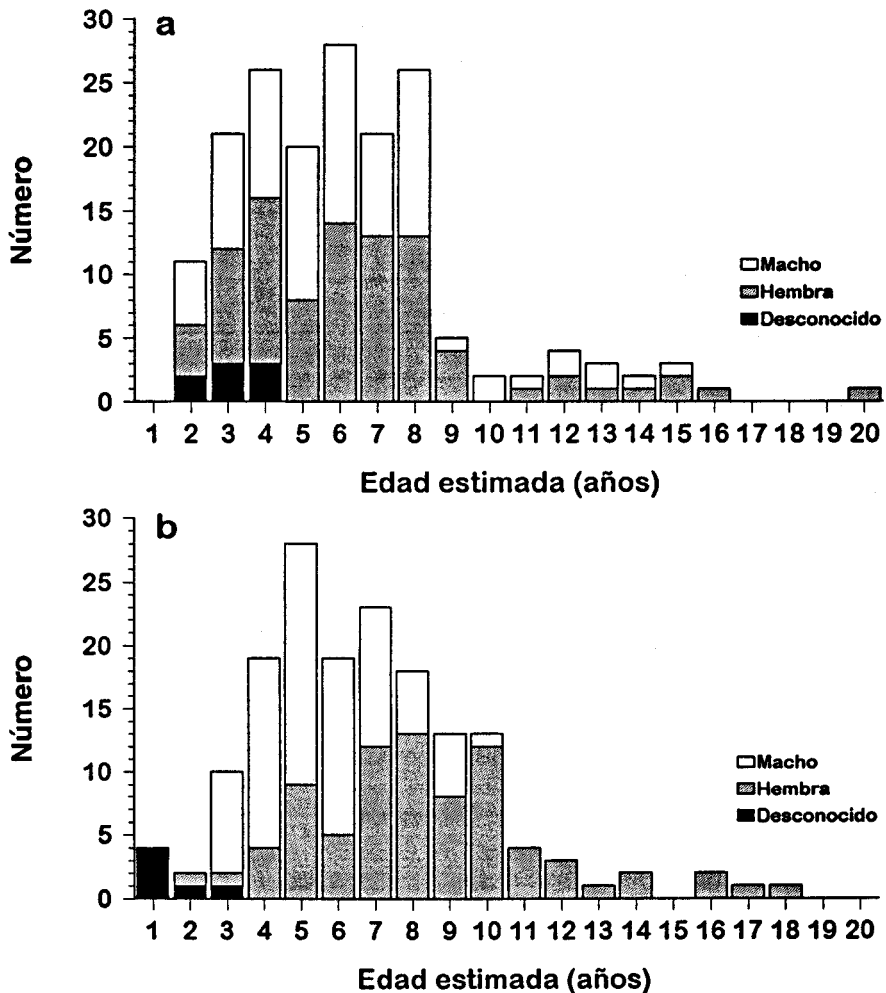


FIGURA 1.9. Histogramas de frecuencia de la edad estimada en todos los ejemplares de *B. sclateri* capturados en el río Guadalete (a, N=176) y en el arroyo de Bocaleones (b, N=168).

convexas, con pendientes que disminuían sobre el rango de 100 a 400 mm de longitud (Figura 1.10b).

Las relaciones entre las tres variables del otolito y la longitud son claramente no lineales, por lo que fueron transformadas mediante \log_{10} para examinar los efectos del sexo y el lugar mediante el análisis de la Covarianza. En este caso, las pendientes de las líneas de regresión fueron significativamente distintas (peso: $F_{3,317}=5,64$, $P<0,001$; diámetro: $F_{3,317}=5,92$, $P<0,001$; radio: $F_{3,317}=8,20$, $P<0,0005$), por lo que no nos permitió determinar los efectos de ambos factores. Cuando separamos los peces en adultos y juveniles, los primeros siguieron presentando heterogeneidad de las pendientes (peso: $F_{3,251}=3,96$, $P=0,008$; diámetro:

TABLA 1.2. Tamaño de la muestra (N), media (\bar{X}), error estándar (E.E) y rango de la longitud estándar, del peso somático y de la edad estimada de los ejemplares capturados de *B. sclateri* en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones.

	\bar{X}	E.E	Rango
<i>río Guadalete</i>			
Macho ($N = 80$)			
Longitud estándar (mm)	133,72	6,14	54 - 265
Peso somático (g)	56,44	7,12	1,98 - 293
Peso del otolito (mg)	2,95	0,04	0,46 - 9,00
Radio del otolito (mm)	1,12	0,04	0,55 - 1,80
Diámetro del otolito (mm)	1,75	0,04	0,97 - 2,75
Edad estimada (año)	6,17	0,32	2 - 15
Hembra ($N = 87$)			
Longitud estándar (mm)	161,01	8,00	47 - 410
Peso somático (g)	112,74	17,55	2,08 - 1056
Peso del otolito (mg)	3,65	0,29	0,60 - 16,70
Radio del otolito (mm)	1,29	0,04	0,55 - 2,27
Diámetro del otolito (mm)	1,96	0,05	1,00 - 3,37
Edad estimada (año)	6,57	0,37	2 - 20
<i>arroyo Bocaleones</i>			
Macho ($N = 75$)			
Longitud estándar (mm)	118,41	4,26	54 - 246
Peso somático (g)	31,72	3,67	2,01 - 200
Peso del otolito (mg)	2,32	0,14	0,60 - 8,60
Radio del otolito (mm)	1,08	0,02	0,70 - 1,55
Diámetro del otolito (mm)	1,68	0,03	1,10 - 2,35
Edad estimada (año)	5,57	0,19	3 - 10
Hembra ($N = 79$)			
Longitud estándar (mm)	187,17	6,24	72 - 316
Peso somático (g)	120,51	10,57	6 - 498
Peso del otolito (mg)	4,91	0,27	0,80 - 11,60
Radio del otolito (mm)	1,46	0,03	0,77 - 2,25
Diámetro del otolito (mm)	2,18	0,04	1,30 - 3,00
Edad estimada (año)	8,41	0,35	2 - 18

$F_{3,251}=2,79$, $P=0,040$; radio: $F_{3,251}=3,57$, $P=0,014$), aunque los juveniles ya no la presentaban (peso: $F_{3,58}=2,19$, $P=0,097$; diámetro: $F_{3,58}=0,87$, $P=0,461$; radio: $F_{3,58}=0,47$, $P=0,699$). Si volvemos a observar la Figura 1.10 y como apuntábamos en el párrafo anterior, parece que las pendientes se suavizaban sobre los 100 mm de longitud y nos hizo pensar en dividir las

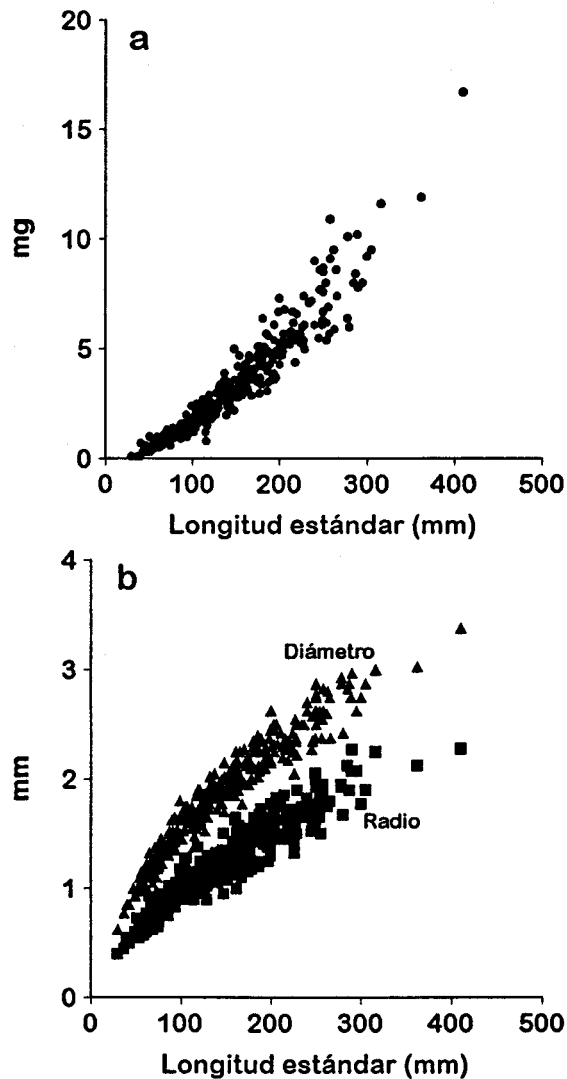


FIGURA 1.10. Representación gráfica del (a) peso del otolito, y (b) del diámetro y radio del otolito respecto a la longitud estándar del *B. sclateri*. Los datos corresponden a todos los ejemplares capturados.

capturas a partir de la longitud a la cual las hembras pasaban al estado adulto. De esta forma conseguimos homogeneizar las pendientes (peso: $F_{3,206}=1,24$, $P=0,296$; diámetro: $F_{3,206}=1,12$, $P=0,340$; radio: $F_{3,206}=1,13$, $P=0,339$) y por tanto, podíamos comprobar el efecto del sexo y del lugar sobre las medidas tomadas en el otolito.

En primer lugar la longitud influyó significativamente sobre las tres variables (Tabla 1.3), éstas aumentaban conforme el pez crecía. Sobre el radio y el diámetro no existió efecto del sexo y el lugar, es decir, que

TABLA 1.3. Análisis de la covarianza del efecto del sexo y el lugar sobre el peso, diámetro y radio del otolito de ejemplares de >115 mm de longitud. Las variables dependientes y la covariable (longitud estándar) fueron transformadas mediante \log_{10} . g.l son los grados de libertad.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
Peso					
Longitud	5,81892	1	5,81892	1229,00	<0,0001
Lugar	0,00637	1	0,00637	1,34	0,247
Sexo	0,00803	1	0,00803	1,69	0,194
Sexo x lugar	0,04023	1	0,04023	8,50	0,004
Error	0,98954	209	0,00473		
Diámetro					
Longitud	0,68170	1	0,681700	1146,50	<0,0001
Lugar	0,00003	1	0,00003	0,06	0,813
Sexo	0,00108	1	0,00108	1,81	0,180
Sexo x lugar	0,00043	1	0,00043	0,71	0,399
Error	0,12427	209	0,00059		
Radio					
Longitud	1,00270	1	1,00270	546,86	<0,0001
Lugar	0,00008	1	0,00008	0,43	0,836
Sexo	0,00511	1	0,00511	2,78	0,097
Sexo x lugar	0,00020	1	0,00020	0,01	0,915
Error	0,38321	209	0,00183		

TABLA 1.4. Análisis de la covarianza de efectos simples para el peso del otolito. La variables dependiente y la covariable (longitud estándar) fueron transformadas mediante \log_{10} . g.l son los grados de libertad.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
<i>Por lugar</i>					
Longitud	5,81892	1	5,81892	1229,00	<0,0001
Lugar	0,00637	1	0,00637	1,34	0,247
Sexo					
Guadalete	0,04640	1	0,04640	9,81	0,002
Bocaleones	0,00469	1	0,00469	0,99	0,317
Error	0,98954	209	0,00473		
<i>Por sexo</i>					
Longitud	5,81892	1	5,81892	1229,00	<0,0001
Sexo	0,00803	1	0,00803	1,69	0,194
Lugar					
Machos	0,00595	1	0,00595	1,26	0,263
Hembras	0,05188	1	0,05188	10,97	0,001
Error	0,98954	209	0,00473		

independientemente de ellos, dos peces de igual tamaño mostraban otolitos de igual radio y diámetro. Esto no pasó con el peso del otolito, porque aunque globalmente ocurría lo mismo, la interacción significativa no nos permitía independizar los efectos de cada factor y posiblemente enmascaraba resultados mucho más interesantes. Así, con el análisis de los efectos simples (Tabla 1.4) verificamos que en el río Guadalete un macho poseía un otolito de mayor peso que una hembra de igual talla (Media ajustada, macho: 4,25 mg; hembra: 3,86 mg), pero que en el arroyo de Bocaleones no existía diferencias entre los sexos (macho: 3,87 mg; hembra: 3,99 mg). Y por otro lado (Tabla 1.4), un macho del Guadalete (Media ajustada: 3,55 mg) tenía el mismo peso de otolito que un macho del Bocaleones de igual longitud (3,45 mg), pero una hembra del Bocaleones (Media ajustada, 4,78 mg) tenía un otolito más pesado que una de igual talla capturada en el Guadalete (4,34 mg).

Es curioso que estos mismos resultados se den cuando analizamos la edad media ajustada al tamaño de los mismos individuos. Así, comparando ejemplares de igual talla, no existió diferencias de edad entre los machos ($F_{1,80}=0,93$, $P=0,337$; Guadalete: 6,16 años, Bocaleones: 5,49 años), pero sí entre las hembras ($F_{1,128}=7,06$, $P=0,009$; Guadalete: 7,58 años, Bocaleones: 9,54 años); y comparando ambos sexos, por un lado existió diferencias significativas en el río Guadalete ($F_{1,106}=11,98$, $P=0,001$; machos: 8,91 años, hembras: 5,62 años), y por otro, no existió en el arroyo de Bocaleones ($F_{1,102}=0,31$, $P=0,577$; machos: 7,58 años, hembras: 6,76 años).

Para los individuos menores de 115 mm de longitud estándar, los resultados son más fáciles de interpretar debido a las interacciones no significativas encontradas en el análisis de la Covarianza (Tabla 1.5). Podemos concluir que los peces del arroyo de Bocaleones mostraron otolitos más grandes y más pesados que los del río Guadalete del mismo tamaño, independientemente de cual era su sexo. Igual pasó con la edad, en el río Guadalete los machos tuvieron una edad estimada ajustada al tamaño de 3,89 años, las hembras de 3,63 años, los machos del Bocaleones de 4,27 años y las hembras de 4,46 años.

La Figura 1.11 ilustra el descenso en el ancho de las zonas opacas con la edad y muestra como este ancho va sufriendo una disminución conforme aumenta la edad. Estos resultados son apoyados por los patrones de crecimiento en otolitos encontrados por Williams y Bedford (1974): *“a medida que el pez crece las zonas opacas se vuelven progresivamente más estrechas, pero las zonas translúcidas permanecen aproximadamente con el mismo ancho. Este proceso continua hasta que los anillos más externos (opaco y translúcido) se convierten en extremadamente finos, regulares e iguales de ancho”*. Es decir al aumentar la edad, el otolito crecería menos sobre su eje

TABLA 1.5. Análisis de la covarianza del efecto del sexo y el lugar sobre el peso, diámetro y radio del otolito de ejemplares menores de 115 mm de longitud. Las variables dependientes y la covariable (longitud estándar) fueron transformadas mediante \log_{10} . g.l son los grados de libertad.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
Peso					
Longitud	2,23115	1	2,23115	285,36	<0,0001
Lugar	0,03386	1	0,03386	4,33	0,040
Sexo	0,00061	1	0,00061	0,07	0,780
Sexo x lugar	0,00866	1	0,00866	1,11	0,295
Error	0,82879	106	0,00782		
Diámetro					
Longitud	0,35107	1	0,35107	483,50	<0,0001
Lugar	0,00442	1	0,00442	6,08	0,015
Sexo	0,00004	1	0,00004	0,05	0,814
Sexo x lugar	0,00060	1	0,00060	0,83	0,364
Error	0,07697	106	0,00073		
Radio					
Longitud	0,49447	1	0,19447	344,02	<0,0001
Lugar	0,02679	1	0,02679	18,64	<0,0001
Sexo	0,00046	1	0,00046	0,32	0,573
Sexo x lugar	0,00006	1	0,00006	0,04	0,834
Error	0,15236	106	0,00144		

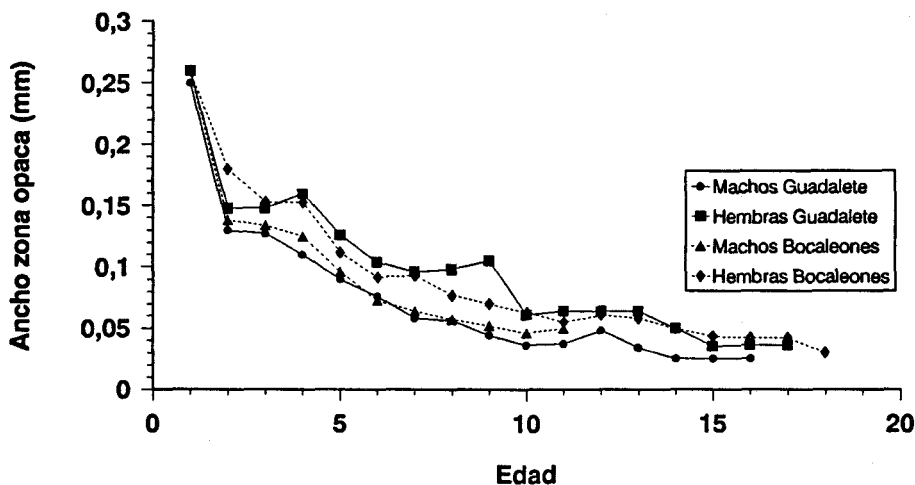


FIGURA 1.11. Medidas del ancho de la zona opaca de cada annulus en los otolitos de *B. sclateri*, por sexo y lugar de captura.

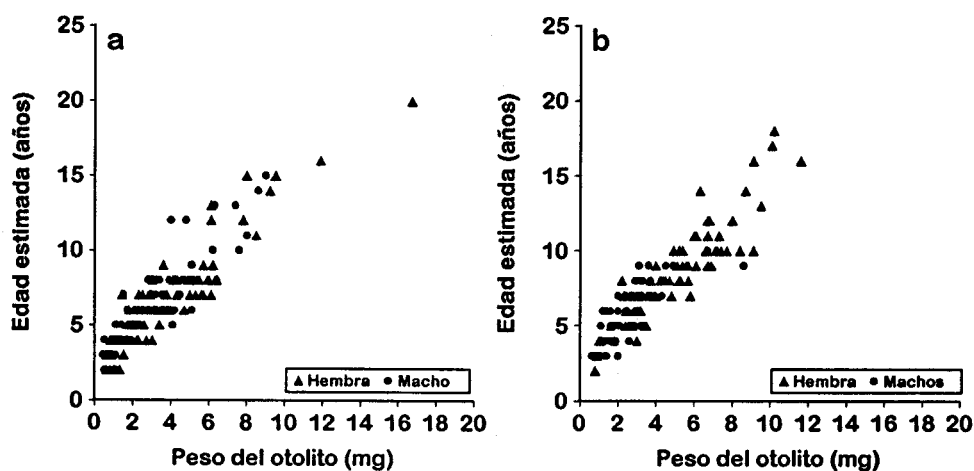


FIGURA 1.12. Relación entre la edad estimada y el peso del otolito de los ejemplares capturados de *B. sclateri* en el río Guadalete (a) y en el arroyo de Bocaleones (b).

longitudinal y posiblemente incrementaría su espesor, aumentando por tanto su peso. Esto puede explicar porque el peso del otolito incrementa su valor, a pesar de la ralentización del crecimiento en longitud del otolito y del pez. Este proceso sería la causa de porqué existen diferencias en el peso del otolito entre individuos del mismo tamaño pero con edades significativamente distintas, hecho que no ocurre con el radio y con el diámetro.

Estos resultados muestran que el diámetro o el radio están más asociados al tamaño del pez que a la edad, mientras que el peso del otolito puede ser una buena variable predictora de la misma. Las relaciones entre el peso del otolito y la edad (Figura 1.12) mostraron pendientes distintas e intersecciones iguales entre los machos y hembras capturados en el arroyo de Bocaleones (Pendientes: $F_{1,153}=3,95$, $P=0,048$; Intersecciones: $F_{1,154}=1,28$, $P=0,258$) y al contrario en los capturados en el río Guadalete (Pendientes: $F_{1,164}=0,889$, $P=0,347$; Intersecciones: $F_{1,165}=4,725$, $P=0,031$); por tanto los modelos de regresión múltiple fueron ajustados separadamente para cada población y en cada uno de los sexos. Las variables dependientes que los modelos de regresión múltiple paso a paso incluyeron fueron, el peso del otolito y la longitud estándar para los machos del río Guadalete; el peso del otolito, el radio del otolito y la longitud estándar para las hembras de la misma población; y el peso del otolito y el radio del otolito para ambos sexos del arroyo de Bocaleones. Los resultados estadísticos se presentan en la Tabla 1.6.

Como el peso del otolito explicó la mayoría de la variabilidad en la edad (82–89%), fue el mejor estimador de todas las variables morfométricas consideradas. Sin embargo, hubo todavía una considerable variabilidad del

TABLA 1.6. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados a los modelos de regresión múltiple de la edad para *B. sclateri*. Los modelos fueron ajustados paso a paso usando como variables independientes el peso, el radio y el diámetro del otolito, y la longitud estándar y el peso somático del pez. Las variables fueron transformadas mediante \log_{10} .

Variable	Coefficiente	EE	P	R^2 parcial
Machos Guadalete (N = 80)				
(Modelo univariante)				
Intersección = -0,679				
Peso del otolito	1,365	0,082	<0,0001	0,876
(Modelo multivariante)				
Intersección = -4,886				
Peso del otolito	0,568	0,137	<0,0001	0,876
Longitud estándar	1,487	0,278	<0,001	0,012
Hembras Guadalete (N = 87)				
(Modelo univariante)				
Intersección = -1,214				
Peso del otolito	1,556	0,089	<0,0001	0,825
(Modelo multivariante)				
Intersección = -4,886				
Peso del otolito	0,568	0,137	<0,0001	0,825
Radio del otolito	0,750	0,111	<0,001	0,013
Longitud estándar	1,487	0,278	<0,001	0,012
Machos Bocaleones (N = 75)				
(Modelo univariante)				
Intersección = -0,654				
Peso del otolito	1,337	0,109	<0,0001	0,889
(Modelo multivariante)				
Intersección = -1,015				
Peso del otolito	0,385	0,082	<0,0001	0,889
Radio del otolito	0,418	0,112	<0,001	0,009
Hembras Bocaleones (N = 79)				
(Modelo univariante)				
Intersección = -2,001				
Peso del otolito	1,877	0,113	<0,0001	0,859
(Modelo multivariante)				
Intersección = -4,207				
Peso del otolito	1,197	0,271	<0,0001	0,859
Radio del otolito	1,854	0,377	<0,001	0,019

peso del otolito dentro de cada clase de edad. Aunque algo de la variabilidad restante (1-2%) fue explicada al considerar la longitud estándar del pez y/o el radio del otolito, la variabilidad que no se explicó por estos modelos fue todavía considerablemente grande.

Validación y precisión del retrocálculo para los estudios de crecimiento

Para obtener una mejor relación entre el tamaño del pez y del otolito, y comparar las ecuaciones de retrocálculo, se escogió una submuestra de peces del periodo en los que fue probable que formaran o que estuvieran formando el annulus (Febrero-Junio). Existió en esta submuestra una relación lineal positiva entre el radio del otolito y la longitud estándar (Tabla 1.7), pero al transformar las variables mediante \log_{10} se consiguió estabilizar las varianzas y mejorar la predicción del modelo, como se observa al incrementar los valores del coeficiente de determinación (R^2). El análisis de la covarianza indicó que había homogeneidad de las líneas de regresión ($P=0,269$, Tabla 1.8). Por otra parte, el término de interacción entre los factores lugar y sexo no fue significativo ($P=0,296$), y el efecto de este último tampoco ($P=0,385$). Pero la intersección de las regresiones fueron significativamente distintas entre los dos ríos ($P<0,002$). Por tanto, se trató las dos poblaciones por separado, aunque en cada una de ellas se combinaron los sexos para obtener las relaciones entre la longitud del pez y el radio del otolito.

Un total de 50 ejemplares procedentes del Guadalete y 31 del Bocaleones habían formado recientemente su annulus ($R_u/R_c \geq 0,95$). Cuando las longitudes de estos peces fueron retrocalculadas para el annulus más reciente (L_u):

- por la ecuación (1), ningún pez del Guadalete y 1 del Bocaleones (3%) estuvieron en el rango del 95-100% de la longitud de captura (L_c). Dos peces (4%) del Guadalete tuvieron una L_u de 2-5 mm menor que el 0,95 de L_c y 48 peces (96%) del Guadalete excedieron de 16-222 mm de L_c , mientras que 30 peces (97%) del Bocaleones excedieron de 22-216 mm.
- por la ecuación (2), 45 peces (90%) del Guadalete y 29 (94%) del Bocaleones estuvieron en el rango del 95-100% de L_c . Sólo 1 del Guadalete excedía en 12 mm de L_c , y 4 (8%) del Guadalete eran menores en un rango de 1-2 mm de 0,95 de L_c . Dos peces (6%) del Bocaleones eran menores en un rango de 2-3 mm.
- por la ecuación (3), 49 peces del Guadalete (98%) y 30 del Bocaleones (97%) estaban en el rango del 95-100% de L_c y sólo 1 pez del Guadalete (2%) y otro del Bocaleones (3%) excedían de la L_c .
- por la ecuación (4), 5 peces (10%) del Guadalete y 4 (13%) del Bocaleones estaban en el rango del 95-100% de L_c ; 21 peces (42%) del Guadalete tenían las L_u de 5-42 mm menores que el 0,95 de L_c y 9 peces (29%) en un rango de 2-38 mm en el Bocaleones; y 24 peces (48%) del Guadalete tenían las L_u que excedían de 5-45 mm

TABLA 1.7. Ecuaciones de regresión que describen la relación entre la longitud estándar y el radio del otolito de *B. sclateri* del río Guadalete y del arroyo de Bocaleones. R^2 = coeficiente de determinación; g.l. = grados de libertad

Modelo	N	Rango de longitud (mm)	Parámetros estimados		R^2	g.l.	F	P
			a	b				
<i>Ambos ríos</i>								
Lineal	161	47-305	-46,04	152,86	0,88	1,159	1358	<0,0001
Logarítmico	161	47-305	1,36	1,31	0,93	1,159	1484	<0,0001
<i>Río Guadalete</i>								
Lineal	93	47-305	-40,07	150,87	0,88	1,91	757	<0,0001
Logarítmico	93	43-305	1,44	1,30	0,94	1,91	974	<0,0001
<i>Arroyo Bocaleones</i>								
Lineal	68	54-287	-57,04	157,78	0,87	1,66	623	<0,0001
Logarítmico	68	54-287	1,14	1,42	0,93	1,66	690	<0,0001

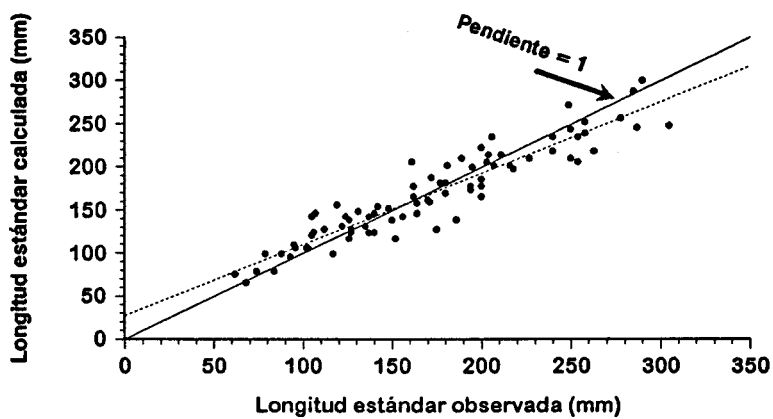
TABLA 1.8. Resultados de la ANCOVA de los efectos del lugar y sexo sobre la relación de la longitud estándar del pez y el radio del otolito en *B. sclateri* de Febrero a Junio. La longitud (variable dependiente) y el radio (covariable) fueron transformadas mediante \log_{10} . CM = cuadrados medios; g.l. grados de libertad. La hipótesis del paralelismo (homogeneidad de pendientes) es testada por la interacción de la covariable con los factores unidos.

Origen	g.l.	CM	F	P
Radio	1,156	4,161	1321,00	<0,0001
Lugar	1,156	0,029	9,33	<0,002
Sexo	1,156	0,002	0,75	0,385
Lugar x sexo	1,156	0,003	1,09	0,296
Radio x factores	3,153	0,004	1,32	0,269

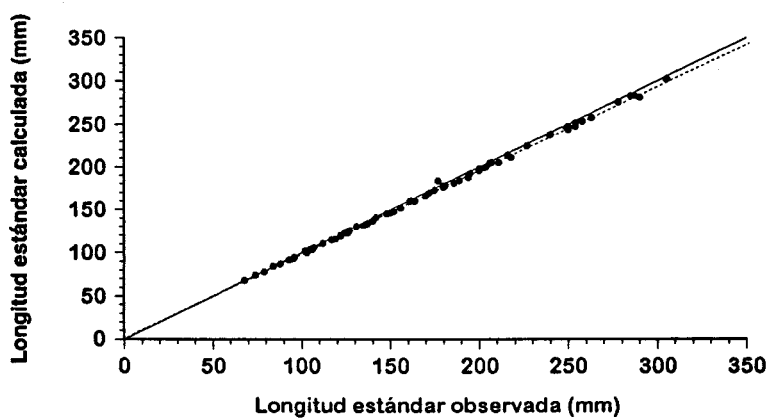
de L_c , mientras que 18 peces (58%) del Bocaleones lo hacían en una rango de 4-40 mm.

Las longitudes retrocalculadas de las ecuaciones (2), (3) y (4) fueron confrontadas con las longitudes observadas de cada edad para evaluar desde otro punto de vista, la eficacia relativa de los métodos más usados en la literatura (Figura 1.13). Las desviaciones a las longitudes observadas fueron substancialmente menores en los dos métodos de Fraser-Lee. El método de regresión mostró un sesgo positivo en los peces de menores tallas y un sesgo negativo en los de mayor talla. El método de Fraser-Lee modificado por Maceina y Betsill (1987) no mostró sesgo para los peces de pequeño tamaño, aunque en los de mayor tamaño aumentaba un poco la varianza. El método de Fraser-Lee modificado por Campana (1990) o de Intersección Biológica mostró mucha menos desviación de las longitudes retrocalculadas respecto a las observadas y ajustó mejor los datos. En base a estos resultados se escogió el método de la Intersección Biológica, como la mejor fórmula de retrocálculo

Método de Regresión Simple



Método de Intersección Biológica



Método de Fraser-Lee

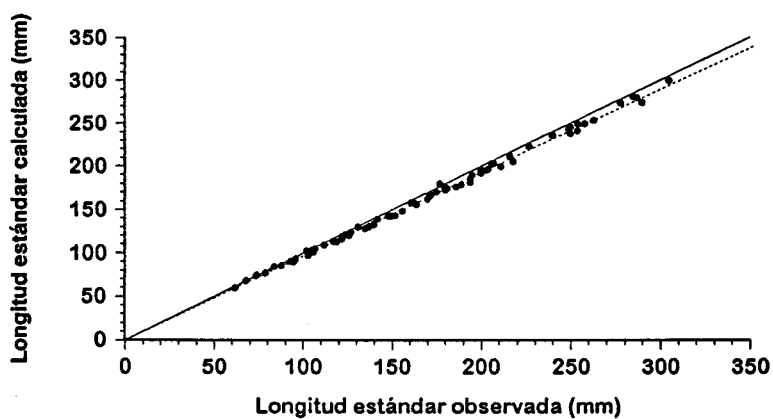


FIGURA 1.13. Longitud observada *versus* longitud retrocalculada por el método de regresión ($27,08 + 0,827 L$; $N = 81$, $R^2 = 0,874$); el método de intersección biológica ($-0,03 + 0,98 L$; $N = 81$, $R^2 = 0,998$); y el método de Fraser-Lee ($-0,85 + 0,96 L$; $N = 81$, $R^2 = 0,981$).

TABLA 1.9. Análisis de la varianza de los efectos del método y de la edad sobre la longitud del pez. La variable dependiente (longitud estándar) fue transformada mediante \log_{10} . g.l son los grados de libertad

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
<i>río Guadalete</i>					
método	5510,04	2	2755,02	5,78	0,003
edad	583864,49	7	83409,21	174,90	<0,0001
Interacción					
edad-método	12215,12	12	1017,93	2,13	0,014
Error	280422,16	588	476,91		
<i>arroyo Bocaleones</i>					
método	4022,75	2	2011,37	4,84	0,008
edad	279155,98	7	39879,43	95,88	<0,0001
Interacción					
edad-método	12377,26	12	1031,43	2,48	0,003
Error	187165,80	450	415,92		

que era capaz de corregir con mayor eficiencia las diferencias en las intersecciones.

Una vez escogida la fórmula más idónea, comprobamos cual era el efecto sobre las longitudes retrocalculadas utilizando el annulus más reciente, que es lo que habíamos hecho anteriormente, o los annuli anteriores. Para ello se escogió las ocho primeras edades, de forma que en cada grupo de edad estuvieran representados los sexos y los lugares. Se realizó un análisis de la varianza de dos factores, edad y método. Este último factor comprende tres niveles, el *control* (longitud observada), la longitud calculada con el annulus más reciente y la longitud calculada a partir de los annuli anteriores. El análisis de la varianza (Tabla 1.9) puso de manifiesto la existencia de una interacción significativa entre el método y la edad. Asimismo se constató que ambos factores presentaban globalmente efecto significativo sobre la longitud.

El análisis de los efectos simples nos permitió explicar la interacción entre los factores del diseño, analizando los efectos del método dentro de cada edad. Este análisis de efectos simples es el que recoge la Tabla 1.10. Al comparar dichos resultados con los de la Tabla 1.9 se constata que la variabilidad explicada por ambos modelos es la misma (las sumas de cuadrados totales y residuales coinciden), es decir, el modelo de efectos simples supone únicamente modificar la descomposición de la variabilidad explicada. Puesto que el factor método presenta tres niveles y posee dos grados de libertad los contrastes "a posteriori" se realizaron por el procedimiento de Bonferroni utilizando la opción *Simple* en el SPSS®. Esta opción nos permitió comparar entre los resultados al aplicar los dos métodos

TABLA 1.10. Análisis de la varianza de los efectos simples sobre la longitud del pez. La variable dependiente (longitud estándar) fue transformada mediante \log_{10} . g.l son los grados de libertad

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
<i>río Guadalete</i>					
edad	583864,49	7	83409,21	174,90	<0,0001
método(1)					
método(2)	3645,57	2	1822,79	3,82	0,022
método(3)	19885,88	2	9942,94	20,85	<0,0001
método(4)	9993,89	2	4996,95	10,48	<0,0001
método(5)	5184,67	2	2592,34	5,44	0,005
método(6)	2778,87	2	1389,43	2,91	0,055
método(7)	5510,04	2	2755,02	5,78	0,003
método(8)	761,71	2	380,85	,80	0,450
Error	280422,16	588	476,91		
<i>arroyo Bocaleones</i>					
edad	279155,98	7	39879,43	95,88	<0,0001
método(1)	1239,93	2	619,96	1,49	0,226
método(2)					
método(3)	4386,05	2	2193,02	5,27	0,005
método(4)	13283,33	2	6641,67	15,97	<0,0001
método(5)	7482,74	2	3741,37	9,00	<0,0001
método(6)	6807,17	2	3403,58	8,18	<0,0001
método(7)	4022,75	2	2011,37	4,84	0,008
método(8)	612,95	2	306,48	0,74	0,479
Error	187165,80	450	415,92		

y los del control (longitudes observadas). En la Figura 1.14 se observa como generalmente en todas las edades las longitudes retrocalculadas a partir de los annuli anteriores son significativamente mayores a las longitudes observadas en la captura y a las calculadas a partir del annulus más reciente.

Con estos resultados ya podemos utilizar de una manera satisfactoria las longitudes retrocalculadas para la estima del crecimiento de las dos poblaciones. Pero como la tasa de crecimiento no es lineal (ver siguiente apartado), no podemos calcular tasas de crecimiento absoluto, como indican Busacker *et al.* (1990), es decir, calcular simplemente la diferencia entre las longitudes retrocalculadas de una edad a otra. Estos autores apuntan que en los casos en los que la tasa de crecimiento es exponencial, como cuando trabajamos en intervalos de tiempo de un año, el crecimiento se expresa mejor con la tasa instantánea. En la Tabla 1.11 y 1.12 se muestran los resultados finales de la estima de la tasa de crecimiento de la población y del crecimiento medio individual según la metodología descrita por Ricker (1975; pág. 220).

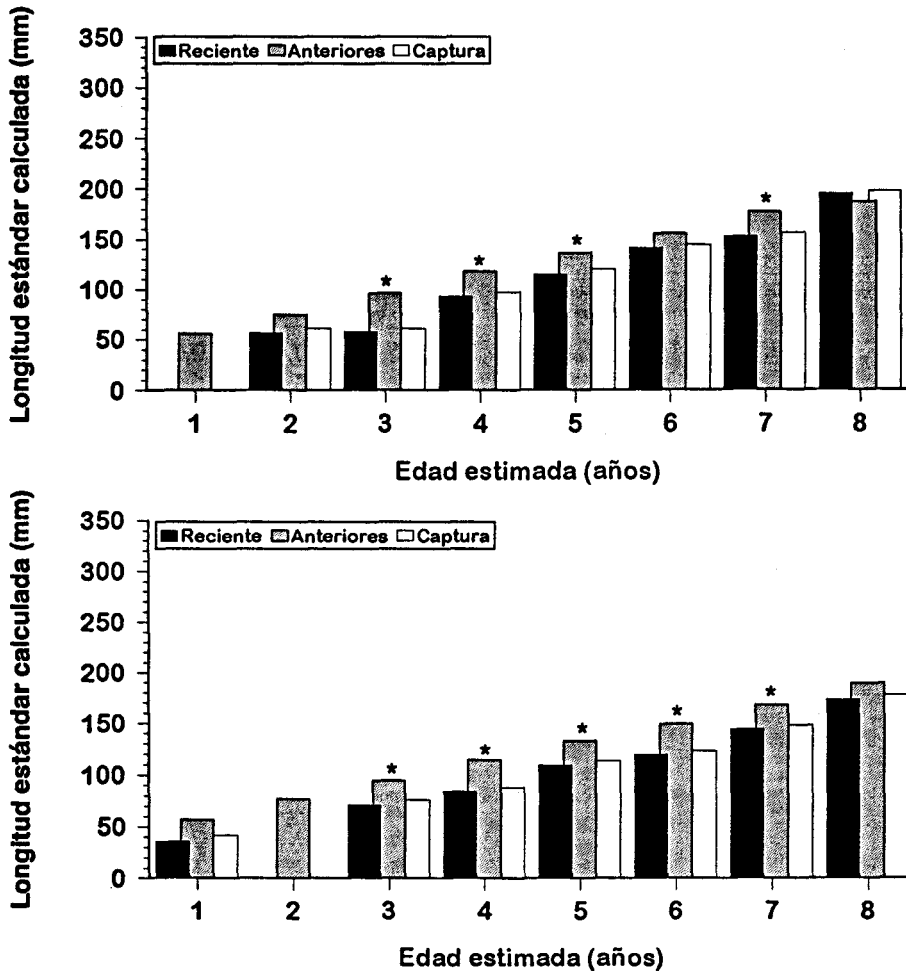


FIGURA 1.14. Longitudes estándar de *B. sclateri* retrocalculadas a partir del último annulus y a partir de los annuli anteriores por el método de intersección biológica en los ocho primeros años. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$), por el procedimiento de Bonferroni, respecto a la longitud media observada en la captura de los ejemplares del río Guadalete (a) y del arroyo de Bocaleones (b). Los datos proceden del periodo comprendido entre Febrero y Junio.

Estimación de los parámetros de crecimiento

Las curvas de crecimiento de von Bertalanffy fueron ajustadas a la longitud observada en cada una de las edades. El modelo se ajustó a los machos y hembras por separado capturados entre Febrero y Junio en cada población (Tabla 1.13; Figura 1.15a, b).

También se ajustó el modelo de von Bertalanffy a las longitudes retrocalculadas a partir de los dos últimos annuli. Los parámetros fueron similares a los calculados a partir de las longitudes observadas:

TABLA 1.11. Cálculos de la tasa de crecimiento de la población y de la tasa de crecimiento verdadera, para los peces capturados en el río Guadalete.

Intervalo de edad	Crecimiento de la población		Crecimiento medio individual	
	Intervalo longitud	Diferencias logaritmo natural	Intervalo longitud	Diferencias logaritmo natural
	<i>mm</i>		<i>mm</i>	
Machos				
2-3	59-65	0,097	49-65	0,282
3-4	65-84	0,256	72-84	0,154
4-5	84-105	0,223	94-105	0,111
5-6	105-137	0,266	124-137	0,099
6-7	137-141	0,028	131-141	0,073
7-8	141-174	0,210	161-174	0,077
8-9	174-181	0,039	174-181	0,039
9-10	181-213	0,163	179-213	0,174
10-11	213-234	0,094	226-234	0,035
11-12	234-241	0,029	234-241	0,029
12-13	241-248	0,028	238-248	0,041
13-14	248-251	0,012	240-251	0,045
14-15	251-262	0,043	252-262	0,039
Hembras				
2-3	60-66	0,095	55-66	0,182
3-4	66-96	0,374	81-96	0,169
4-5	96-126	0,271	107-126	0,163
5-6	126-150	0,174	132-150	0,128
6-7	150-168	0,113	152-168	0,100
7-8	168-196	0,154	171-196	0,136
8-9	196-206	0,049	194-206	0,060
9-10	206-	-	-	-
10-11	-220	-	215-220	0,022
11-12	220-237	0,074	225-237	0,052
12-13	237-250	0,053	241-250	0,036
13-14	250-290	0,148	274-290	0,056
14-15	290-296	0,020	278-296	0,063
15-16	296-355	0,182	338-355	0,049

TABLA 1.12. Cálculos de la tasa de crecimiento de la población y de la tasa de crecimiento verdadera, para los peces capturados en el arroyo de Bocaleones.

Intervalo de edad	Crecimiento de la población		Crecimiento medio individual	
	Intervalo	Diferencias	Intervalo	Diferencias
	longitud <i>mm</i>	logaritmo natural	longitud <i>mm</i>	logaritmo natural
Machos				
3-4	73-86	0,164	73-86	0,164
4-5	86-105	0,199	97-104	0,069
5-6	105-111	0,055	100-111	0,104
6-7	111-141	0,239	130-141	0,081
7-8	141-149	0,294	138-149	0,076
8-9	149-182	0,200	172-182	0,056
9-10	182-210	0,143	202-210	0,038
Hembras				
2-3	72-97	0,298	62-97	0,447
3-4	97-100	0,030	85-100	0,162
4-5	100-128	0,246	116-128	0,098
5-6	128-138	0,075	127-138	0,083
6-7	138-151	0,090	137-151	0,097
7-8	151-179	0,170	167-179	0,069
8-9	179-202	0,120	187-202	0,077
9-10	202-217	0,072	210-217	0,033
10-11	217-231	0,062	221-231	0,044
11-12	231-244	0,055	232-244	0,050
12-13	244-256	0,048	245-256	0,043
13-14	256-265	0,034	254-265	0,042
14-15	265-	-	-	-
15-16	-260	-	254-260	0,023
16-17	260-275	0,056	259-275	0,059
17-18	275-282	0,025	271-282	0,039

Para los machos del río Guadalete:

$$L_t = 378(1 - e^{-0,073(t+0,180)}) \quad N=244, R^2 = 0,85$$

Para las hembras del río Guadalete

$$L_t = 501(1 - e^{-0,056(t+0,160)}) \quad N=307, R^2 = 0,84$$

Para los machos del arroyo Bocaleones

$$L_t = 1370(1 - e^{-0,015(t+0,280)}) \quad N=200, R^2 = 0,74$$

Para las hembras del arroyo Bocaleones

$$L_t = 408(1 - e^{-0,063(t+0,078)}) \quad N=270, R^2 = 0,86$$

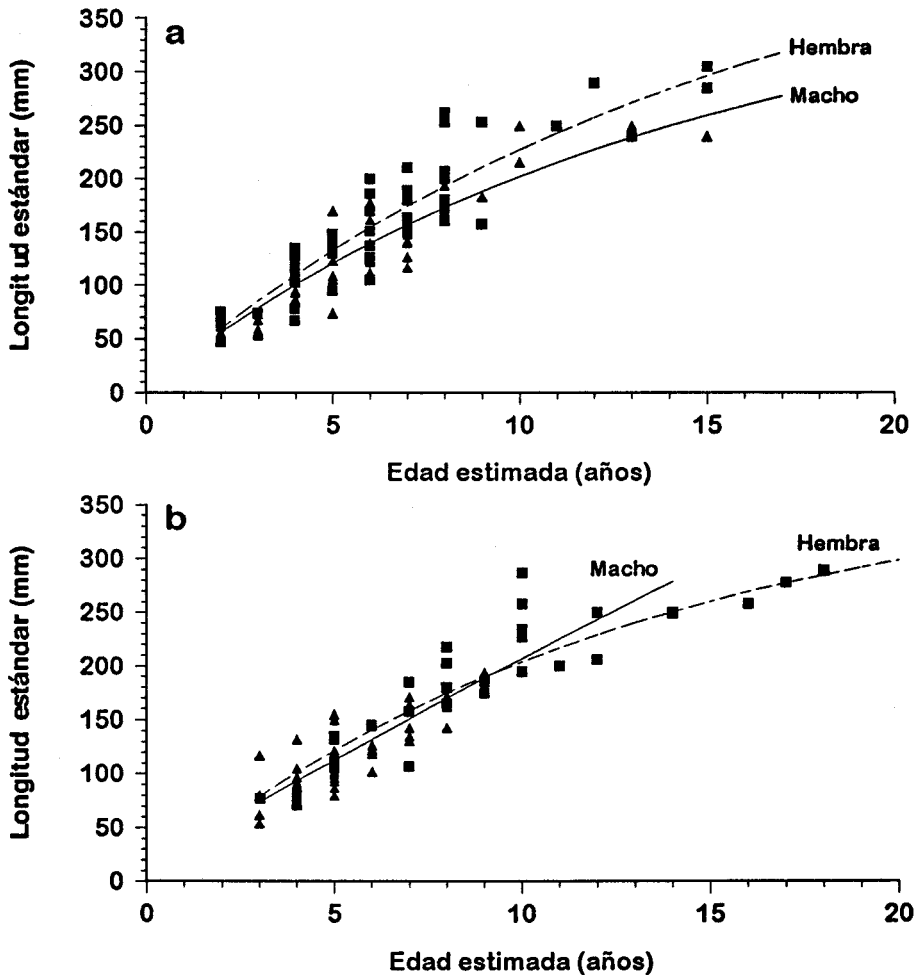


FIGURA 1.15. Curvas de crecimiento de von Bertalanffy ajustadas a las longitudes estándar observadas en la captura de *B. sclateri*. Los datos pertenecen al periodo comprendido entre Febrero y Junio para los machos ($N=47$, $R^2=0,85$) y las hembras ($N=46$, $R^2=0,81$) del río Guadalete (a), y para los machos ($N=36$, $R^2=0,79$) y las hembras ($N=28$, $R^2=0,85$) del arroyo de Bocaleones (b).

Las estimas de las L_{∞} para los peces en este estudio estuvieron cerca de las longitudes máximas observadas, excepto para los machos del arroyo de Bocaleones. Los valores obtenidos para este grupo (1789 mm y 1370 mm) no fueron reales, ya que como Moreau (1987) indica, los valores de L_{∞} y de $L_{m\acute{a}x}$ deben de estar muy cercanos para que la estima de la L_{∞} sea fiable. Nosotros pensamos que estos valores son consecuencia de que no se han capturado ejemplares de edades mayores a 10 años y no a que realmente los machos del arroyo posean esa edad máxima. Esto se ve corroborado ajustando la curva a los datos de los machos del río Guadalete utilizando también sólo los ejemplares de hasta 10 años, el valor de la L_{∞} en este caso fue de 903 mm, K de 0,024 mm/año y t_0 de -0,55 años. En cuanto a los otros dos parámetros,

TABLA 1.13. Estima de los parámetros de von Bertalanffy en cada una de las poblaciones estudiadas. Los parámetros estimados son presentados con sus correspondientes errores estándar asintóticos (EEA) y sus coeficientes de variación (CV).

	Matriz de correlación			Estimas			
	L_{∞}	K	t_0	Estima	EEA	CV	
Machos del río Guadalete							
L_{∞}	1,000			L_{∞}	336,0	38,08	0,096
K	-0,993	1,000		K	0,079	0,003	0,044
t_0	-0,819	0,875	1,000	t_0	-0,206	0,114	-0,553
Hembras del río Guadalete							
L_{∞}	1,000			L_{∞}	537,2	63,28	0,118
K	-0,996	1,000		K	0,054	0,009	0,166
t_0	-0,821	0,861	1,000	t_0	-0,190	0,098	-0,516
Machos del arroyo de Bocaleones							
L_{∞}	1,000			L_{∞}	1798,5	189,15	0,105
K	-0,998	1,000		K	0,011	0,008	0,727
t_0	-0,969	0,959	1,000	t_0	-0,660	0,127	-0,192
Hembras del arroyo de Bocaleones							
L_{∞}	1,000			L_{∞}	385,0	31,01	0,080
K	-0,949	1,000		K	0,068	0,002	0,027
t_0	-0,704	0,866	1,000	t_0	-0,079	0,024	-0,304

el coeficiente K en todos los casos estuvo comprendido entre 0 y 1; y todas las estimas de t_0 fueron menores a cero. Además los errores estándar (Tabla 1.13) de todos los parámetros estimados fueron menores que el valor del propio parámetro (Coeficiente de variación, $CV < 1$), lo que indicó que los parámetros estuvieron bien definidos por los datos utilizados.

El análisis de la suma de cuadrados residual (ARSS) mostró que el crecimiento del barbo en las dos poblaciones fue significativamente diferente entre los sexos y entre las poblaciones, usando tanto las longitudes observadas como las retrocalculadas (Tabla 1.14).

Estimación de los cambios anuales en el crecimiento del otolito

Utilizamos los incrementos anuales en el otolito para inferir los cambios en el crecimiento de las dos poblaciones de *B. sclateri* durante el periodo comprendido entre 1977 y 1991. El ajuste del modelo aditivo,

$$\text{crecimiento} = \text{efecto de la edad} + \text{efecto del ambiente}$$

TABLA 1.14. Comparación de los crecimientos ajustados por la función de von Bertalanffi mediante el análisis de la suma de cuadrados residual. Se ha utilizado las longitudes observadas entre Febrero y Junio, y las retrocalculadas a partir de los dos últimos annulli. g.l. grados de libertad.

Comparación entre	RSS _p	g.l.	RSS _s	g.l.	F	P
<i>Longitudes observadas</i>						
Sexos						
Guadalete	61508,26	90	54207,23	87	3,91	0,011
Bocaleones	37054,00	67	32172,01	64	3,23	0,028
Poblaciones	104319,00	160	98562,26	157	3,06	0,029
<i>Longitudes retrocalculadas</i>						
Sexos						
Guadalete	264891,49	549	237295,60	545	21,12	<0,0001
Bocaleones	220001,00	467	176950,87	464	37,79	<0,0001
Poblaciones	496627,73	1018	484892,49	1015	8,18	<0,0001

RSS_p y RSS_s vienen definidos en el apartado de Material y Métodos

se realizó para cada una de las poblaciones y para cada sexo, en la Tabla 1.15 se resumen los resultados de los análisis de la varianza. En ambas poblaciones, la edad y el ambiente afectan significativamente al crecimiento anular del otolito en cada uno de los sexos. En ningún caso existió interacción significativa ($P > 0,05$) entre los factores, esto supone que el modelo aditivo se adecua por completo a los datos y permite estimar el crecimiento como la suma del efecto de cada factor. Como la interacción no está incluida en el modelo y la edad fue ajustada antes que el ambiente, las estimas para el efecto de la edad corresponden a los incrementos anuales de los otolitos en mm por año para cada población y sexo en un ambiente constante. La Tabla 1.16 y 1.17 reflejan las estimas de los efectos según el procedimiento GLM del SAS®.

La interpretación de los efectos ambientales requiere tener en cuenta que los coeficientes del año más reciente, 1991 en nuestro caso, es automáticamente puesto a cero por el programa estadístico. De esta forma, como el programa comprueba si los parámetros de los otros años son distintos a cero, en último término lo que hace es compararlos con el último año; así, si presentan valores negativos son peores años y si tienen valores positivos son mejores años para el crecimiento que 1991. Los valores de la t comparan cada coeficiente con los del año 1991 y en el caso de la edad estiman si existe crecimiento significativo (H_0 : crecimiento = 0). En el caso de la edad los incrementos son mayores en las primeras y de forma general descienden al incrementar éstas. También en general los crecimientos no son significativos a partir de los 10–12 años. Los efectos del año o ambiente, no parece que sigan ningún patrón definido, lo que sugiere que la variación en el

TABLA 1.15. Análisis de la varianza de los efectos de la edad y el año (ambiente) sobre los incrementos anuales de los otolitos. g.l. = grados de libertad.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Significación de la F
<i>Guadalete</i>					
Machos					
Edad	16,056	15	1,070	361,40	<0,0001
Año	0,082	14	0,005	1,98	0,0186
Interacción edad-año	0,338	90	0,004	1,27	0,0675
Error	1,051	355	0,002		
Hembras					
Edad	20,979	16	1,311	338,01	<0,0001
Año	0,197	15	0,013	3,40	<0,0001
Interacción edad-año	0,269	83	0,003	0,84	0,8386
Error	1,609	415	0,003		
<i>Bocaleones</i>					
Machos					
Edad	16,411	10	1,641	778,50	<0,0001
Año	0,127	9	0,014	6,70	<0,0001
Interacción edad-año	0,092	33	0,002	1,53	0,110
Error	0,790	375	0,002		
Hembras					
Edad	19,428	16	1,214	423,67	<0,0001
Año	0,146	15	0,009	3,39	<0,0001
Interacción edad-año	0,222	89	0,002	0,87	0,7892
Error	1,378	481	0,002		

ambiente tiene un importante efecto sobre el crecimiento, pero sin una tendencia clara. Estos resultados se muestran en la Figura 1.16 y 1.17, en ellas podemos observar como dentro de cada sexo y cada población los patrones de variación del crecimiento esperado por cohorte son similares. Además parece como si los crecimientos anuales de las cohortes se igualen a partir de una cierta edad. Así, en las hembras del río Guadalete el crecimiento anular de una edad a otra son muy parecidas entre las cohortes a partir de aproximadamente los 5 años; en los machos de la misma población a partir de los 3 años; en las hembras del arroyo a partir de los 4 años y en los machos a partir de los 3 años. En ningún caso, las líneas son totalmente paralelas o coincidentes, indicando si esto hubiera ocurrido, que el crecimiento estuvo determinado sólo por la edad o sólo por el ambiente respectivamente.

TABLA 1.16. Coeficientes estimados para los efectos de la edad y el año/ambiente de los incrementos anulares de los otolitos por sexo en el río Guadalete. EE = error estándar.

	Efectos de la edad				Efectos del año/ambiente				
	Estima	EE	<i>t</i>	<i>P</i>	Estima	EE	<i>t</i>	<i>P</i>	
Machos									
(N=474)									
1	0,340	0,080	4,21	0,0001	1977	-0,040	0,097	-0,41	0,6814
2	0,230	0,024	9,45	0,0001	1978	-0,105	0,059	-1,76	0,0791
3	0,169	0,018	9,34	0,0001	1979	-0,069	0,057	-1,21	0,2269
4	0,176	0,015	10,24	0,0001	1980	-0,126	0,057	-2,210	0,0277
5	0,158	0,015	10,08	0,0001	1981	0,016	0,056	0,29	0,7688
6	0,152	0,014	10,48	0,0001	1982	0,122	0,056	2,17	0,0303
7	0,135	0,019	7,06	0,0001	1983	-0,110	0,057	-1,92	0,0554
8	0,143	0,016	8,73	0,0001	1984	0,006	0,056	0,12	0,9046
9	0,075	0,054	1,38	0,0544	1985	-0,025	0,076	-0,32	0,7455
10	0,350	0,054	6,43	0,0001	1986	-0,300	0,076	-3,90	0,0001
11	0,075	0,054	1,38	0,1690	1987	-0,000	0,076	-0,00	1,0000
12	0,087	0,038	2,27	0,0236	1988	-0,037	0,066	-0,56	0,5741
13	0,087	0,038	2,27	0,0236	1989	-0,037	0,066	-0,56	0,5741
14	0,100	0,054	1,84	0,0670	1990	0,025	0,076	0,32	0,7455
15	0,100	0,054	1,84	0,0670	1991	0			
Hembras									
(N=529)									
1	0,443	0,082	5,39	0,0001	1976	-0,093	0,103	-0,91	0,3646
2	0,268	0,031	8,63	0,0001	1977	-0,375	0,069	-0,63	0,5302
3	0,175	0,022	7,95	0,0001	1978	0,250	0,066	0,38	0,7053
4	0,188	0,017	10,91	0,0001	1979	-0,346	0,064	-0,21	0,8351
5	0,228	0,022	10,36	0,0001	1980	-0,312	0,066	-2,32	0,0209
6	0,212	0,016	12,77	0,0001	1981	-0,750	0,064	-2,13	0,0335
7	0,198	0,017	11,06	0,0001	1982	-0,891	0,064	-1,53	0,1278
8	0,164	0,017	9,52	0,0001	1983	-0,394	0,064	-0,11	0,5422
9	0,181	0,031	5,82	0,0006	1984	-0,106	0,069	-1,53	0,1278
10	0,062	0,098	0,63	0,0984	1985	0,012	0,116	0,11	0,9146
11	0,225	0,088	2,55	0,0880	1986	-0,125	0,107	-1,16	0,2472
12	0,272	0,044	6,19	0,0440	1987	-0,172	0,076	-2,26	0,0243
13	0,175	0,062	2,81	0,0622	1988	-0,075	0,088	-0,85	0,3950
14	0,075	0,062	1,20	0,0622	1989	0,050	0,088	0,57	0,5706
15	0,162	0,044	3,69	0,0440	1990	-0,112	0,076	-1,47	0,1410
16	0,125	0,062	2,01	0,0622	1991	0			

Si representamos las diferencias entre los valores observados y los esperados para cada cohorte de los grupos considerados (Figura 1.18 y 1.19), observamos que el modelo se ajusta peor en las primeras edades en ambas poblaciones. Para poder comprender mejor la historia del crecimiento de cada población, ya que existe una dificultad visual por el gran número de líneas de

TABLA 1.17. Coeficientes estimados para los efectos de la edad y el año/ambiente de los incrementos anulares de los otolitos por sexo en el Arroyo de Bocaleones. EE = error estándar.

	Efectos de la edad				Efectos del año/ambiente				
	Estima	EE	<i>t</i>	<i>P</i>	Estima	EE	<i>t</i>	<i>P</i>	
Machos									
(N=427)									
1	0,403	0,053	7,49	0,0001	1982	-0,078	0,070	-0,10	0,2703
2	0,166	0,052	3,15	0,0018	1983	0,033	0,070	0,48	0,6300
3	0,256	0,016	15,79	0,0001	1984	-0,056	0,048	-1,16	0,2488
4	0,220	0,011	18,56	0,0001	1985	0,005	0,047	0,11	0,9161
5	0,164	0,010	15,61	0,0001	1986	-0,089	0,047	-2,05	0,0470
6	0,113	0,012	9,24	0,0001	1987	-0,038	0,047	-0,81	0,4201
7	0,134	0,013	9,70	0,0001	1988	-0,084	0,047	-2,20	0,0463
8	0,150	0,022	6,53	0,0001	1989	-0,075	0,051	-1,46	0,1448
9	0,110	0,020	5,36	0,0001	1990	-0,010	0,050	-0,20	0,8425
10	0,075	0,045	1,63	0,1032	1991	0			
Hembras									
(N=601)									
1	0,350	0,084	4,13	0,0001	1976	-0,112	0,092	-1,21	0,2256
2	0,375	0,053	7,00	0,0001	1977	-0,150	0,065	-2,29	0,0226
3	0,225	0,053	4,20	0,0001	1978	-0,137	0,065	-2,10	0,0365
4	0,193	0,026	7,24	0,0001	1979	-0,093	0,046	-2,02	0,0437
5	0,161	0,017	9,03	0,0001	1980	0,001	0,041	0,03	0,9735
6	0,137	0,026	5,14	0,0001	1981	-0,037	0,046	-0,81	0,4190
7	0,182	0,016	10,78	0,0001	1982	-0,057	0,041	-1,39	0,1662
8	0,135	0,015	8,76	0,0001	1983	-0,010	0,040	-0,25	0,7990
9	0,143	0,018	7,59	0,0001	1984	-0,031	0,042	-0,74	0,4607
10	0,139	0,015	9,03	0,0001	1985	-0,052	0,040	-1,27	0,2041
11	0,118	0,026	4,44	0,0001	1986	-0,031	0,046	-0,67	0,5006
12	0,166	0,030	5,39	0,0001	1987	-0,041	0,048	-0,85	0,3943
13	0,100	0,053	1,87	0,0624	1988	0,012	0,065	0,19	0,8443
14	0,230	0,037	6,08	0,0001	1989	-0,130	0,053	-2,43	0,0155
15	0,112	0,075	1,49	0,1380	1990	0	0,065	0,00	1,0000
16	0,150	0,037	3,96	0,0001	1991	0			

las figuras anteriores, hemos representado los residuos medios combinando las cohortes y los sexos en cada río (Figura 1.20). El lector considerará las tres figuras en su conjunto (Figura 1.18, 1.19 y 1.20), porque estamos uniendo en el residuo medio peces de distinta edad, sobre todo, como apuntábamos anteriormente, individuos jóvenes en los cuales el modelo no ajustaba bien. En la Figura 1.20, esta posible influencia de las primeras edades e incluso las posibles diferencias entre los sexos, la pone de manifiesto los errores estándar de la media. Teniendo en cuenta, por tanto las tres figuras, podemos observar como el modelo se ajusta mejor en los peces capturados en el arroyo de

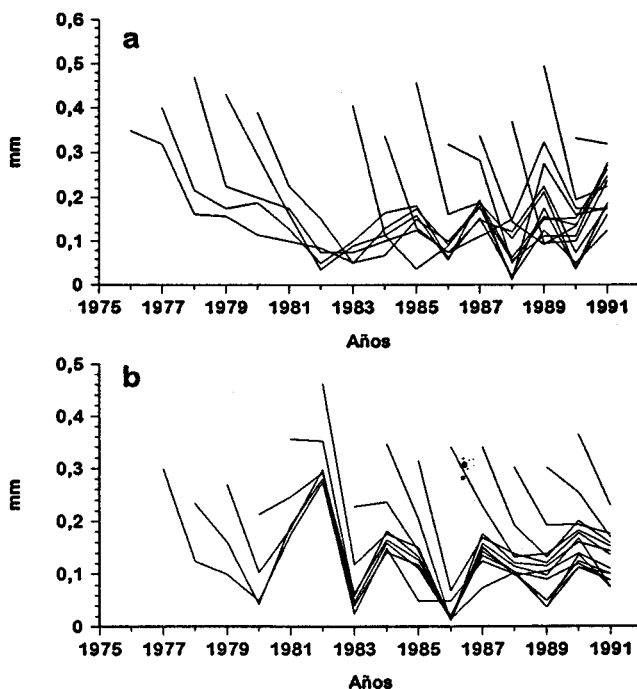


FIGURA 1.16. Incrementos anuales de crecimiento esperados en el otolito según el modelo de la Tabla 16, para cada cohorte de las hembras (a) y de los machos de en el río Guadalete.

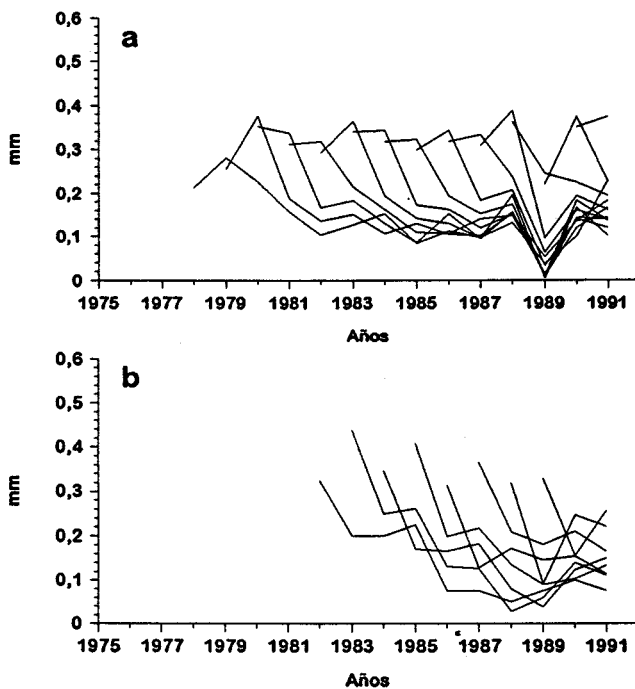


FIGURA 1.17. Incrementos anuales de crecimiento esperados en el otolito según el modelo de la Tabla 17, para cada cohorte de las hembras (a) y de los machos de en el arroyo de Bocaleones.

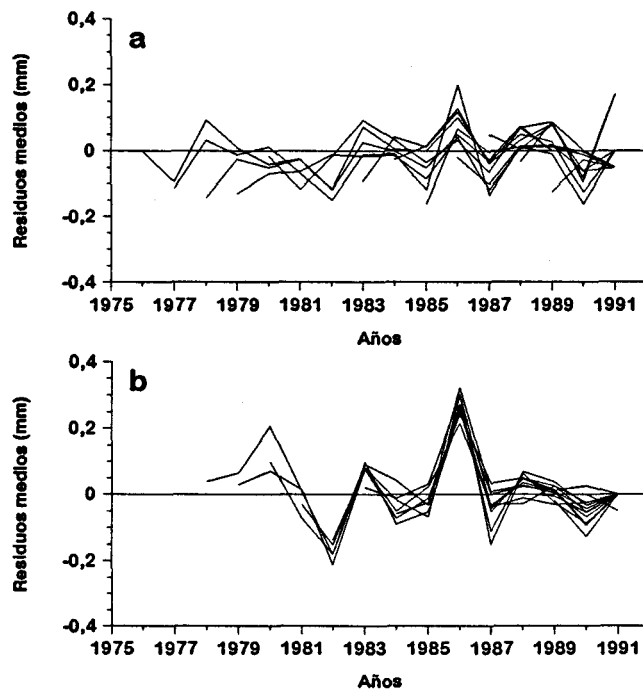


FIGURA 1.18. Residuos de los valores observados del crecimiento anual del otolito, según el modelo de la Tabla 16, para cada cohorte de las hembras (a) y de los machos en el río Guadalete.

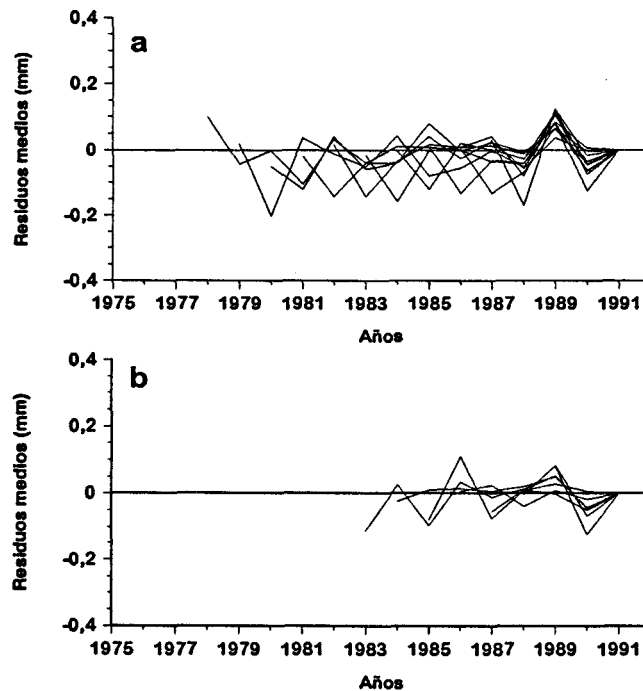


FIGURA 1.19. Residuos medios de los valores observados del crecimiento anual del otolito, según el modelo de la Tabla 17, para cada cohorte de las hembras (a) y de los machos en el arroyo de Bocaleones.

Bocaleones. En esta última población, se puede considerar que sólo en el año 1989 el modelo aditivo predice valores más bajos de los que realmente se observan, mientras que en 1990 los valores predichos son mayores a los observados. Esto ocurre en la población del río Guadalete en los años 1982 y 1990; y además en esta misma población, el modelo predice valores más bajos de los que realmente se observan para el año 1986. Los valores bajos encontrados en el año 1977 en el río Guadalete y en 1980 en el arroyo del Bocaleones se debe, como Boehlert et al (1989) sugieren, a la participación casi exclusiva de las primeras edades en las series temporales.

Discusión

La existencia de una marca periódica en la estructura seleccionada, la capacidad para identificar estas marcas con seguridad (lo cual incluye distinguir las de las marcas 'falsas') y la habilidad de convertir el número de marcas en una edad (resolver el problema de la interpretación del margen) son tres condiciones necesarias para una estima exacta de la edad (Francis *et al.* 1992; Francis 1995). Por tanto, para validar nuestro procedimiento debemos primero demostrar la periodicidad y después valorar por un lado, la exactitud de la identificación de la marca y por otro, la interpretación del margen.

Los resultados obtenidos de la observación de los otolitos (*lapillus*) enteros de *B. sclateri* confirman la presencia de una banda opaca y otra translúcida, y que la combinación de ambas se forma una vez por año. El annulus se definió como una zona que es subjetivamente localizada en el margen distal de la banda translúcida. Fue fácil identificar las escasas bandas translúcidas falsas encontradas, ya que al observar detenidamente la zona por encima y por debajo del núcleo no aparecían. Las bandas falsas, son similares a aquellas asociadas con los annuli, pero se encuentran sólo en una parte de la estructura (Casselman 1987).

Nosotros asumimos que la formación del annulus en los tejidos calcificados se completa cuando la zona translúcida, la cual se forma cada año, es seguida por material opaco (Casselman 1987). Esto corresponde con los mínimos valores de la tasa de crecimiento marginal encontrados en este estudio. Como además del crecimiento marginal, hemos incluido la interpretación periódica de la naturaleza óptica del margen del otolito (porcentajes opacos o translúcidos), podemos determinar el momento de la formación de las dos zonas (Beckman y Wilson 1995). La banda opaca se forma en ambas poblaciones de Julio a Enero y la translúcida de Febrero a Junio.

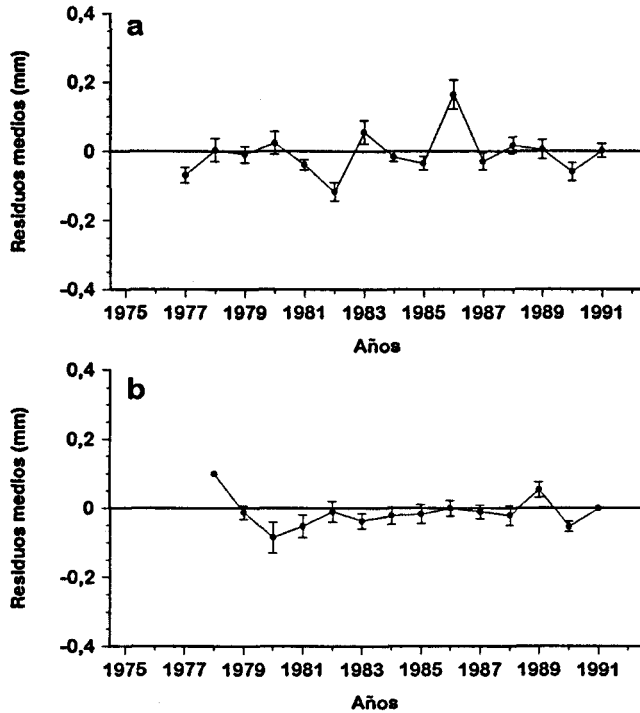


FIGURA 1.20. Residuos medios de los valores observados del crecimiento anual del otolito de *B. sclateri*, combinando las cohortes y los sexos en el río Guadalete (a) y en el arroyo de Bocaleones (b). Las barras de error corresponden a ± 2 el error estándar y proporcionan aproximadamente los intervalos de confianza al 95%.

Según esta periodicidad, la formación del annulus coincide con el momento biológico del nacimiento. Observaciones independientes de la reproducción natural de *B. sclateri* han sugerido que la estación anual de reproducción se extiende aproximadamente desde Febrero hasta Junio (Lucena y Camacho 1978; Herrera *et al.* 1988; Herrera 1992; Rodríguez-Ruiz 1992), periodo que también se describirá posteriormente en los siguientes capítulos. Pero no está claro que la causa de la deposición de los anillos translúcidos sea directamente la actividad reproductora, ya que hemos podido observar este mismo patrón en individuos que todavía no habían madurado. Podríamos pensar que la formación del annulus sea una respuesta a un factor exógeno más general, como por ejemplo, los cambios temporales en la temperatura del agua. Hay muchos estudios que correlacionan el annuli del otolito con el periodo de reproducción (Grossman 1979; Johnson *et al.* 1983; Morales-Nin y Ralston 1990; Gooley 1992; Hass y Recksiek 1995). Beckman y Wilson (1995) encuentran en su revisión, que aproximadamente el doble de los trabajos revisados presentan especies que frezan durante el periodo de formación de la zona translúcida. Pero hay otros ejemplos en los que el

periodo de freza corresponde precisamente con el de formación de la zona opaca (Beckman *et al.* 1990; Sturm y Salter 1990). Otros estudios relacionan un incremento en el crecimiento del pez con la formación de la zona translúcida (Buxton y Clarke 1989; Schramm 1989; Lecomte-Finiger 1992); otros que es la zona opaca la que se produce cuando el crecimiento es máximo (Reay 1972; Kimura *et al.* 1979). Pannella (1980) sugirió que las diferencias estructurales en las distintas zonas del otolito son un reflejo de los efectos fisiológicos de la variación ambiental. Él propuso que la temperatura es probablemente el factor más importante, seguido por la disponibilidad de alimento. Nosotros, con los resultados de este capítulo, no podemos resolver esta incógnita, aunque en principio podríamos compartir la idea de Pannella. En nuestros dos ríos, las temperaturas mínimas anuales se produjeron en los meses de Enero y Febrero, a partir de los cuales aumentó; y la mayor disponibilidad de alimento se registran en primavera y otoño (Prenda 1993). En un estudio sobre la energética del barbo en el río Guadalete, el mayor contenido energético del alimento consumido por esta especie, es mayor en primavera y otoño (Encina 1991)

Como se ha comentado anteriormente, Francis (1995) consideró que un factor de peso en la validación de la edad era la interpretación del margen. Así, es importante distinguir entre el momento del año cuando se forma la banda y cuando empieza a ser visible. En nuestro estudio, durante el periodo de máxima frecuencia de aparición de material opaco en el margen, encontramos siempre otolitos con márgenes translúcidos muy finos. Este fenómeno es lo que North (1988) llama margen pseudo-hialino (pseudo-translúcido), que sería parte del crecimiento del otolito el cual todavía no se ha diferenciado en zona opaca o translúcida. Ya Mina (1968) apuntó este problema de la identificación visual de una banda, '*...nosotros solamente podemos observar que una nueva zona ha sido depositada, cuando el cambio en la deposición de calcio ha sido suficiente como para producir un cambio en la densidad óptica del material y por tanto pueda ser detectada fácilmente...*'; este fenómeno también ha sido puesto de manifiesto por Lecomte-Finiger (1992). Esto puede ser potenciado por el hecho de que cuando trabajamos con otolitos enteros o con secciones, los anillos corresponden a capas tridimensionales (como las capas sucesivas en una cebolla), frente al uso de secciones finas que los anillos son esencialmente estructuras de dos dimensiones (Francis 1992a).

Desde Julio hasta Enero (momentos de las máximas frecuencias de márgenes opacos), nuestras observaciones sobre el margen del otolito clasificadas como translúcidas, fueron probablemente errores cometidos por la dificultad de discriminar entre la zona translúcida y la pseudo-translúcida. Por tanto, como no hubo aparente crecimiento de ese margen pseudo-translúcido durante este periodo y si hubo del opaco, la formación de esta última banda

tuvo lugar antes del invierno en el Guadalete, y antes de finales del invierno y principio de primavera en el Bocaleones; mientras que la banda translúcida se formó antes del verano en ambos ríos. En base a estos resultados nosotros recomendamos, para evitar el problema de la interpretación del margen, que la edad de *B. sclateri* en base a sus otolitos, sea el número de annuli contados que tengan a cada lado una banda translúcida y una banda opaca. Pero, teniendo en cuenta que si el otolito tiene el margen translúcido y procede de un pez capturado entre Enero y Junio se le tiene que sumar un año.

Por último, antes de entrar en la valoración de los procedimientos de retrocálculo, es importante que discutamos cual es la naturaleza de la relación entre el tamaño del pez y del otolito. Esto es un punto esencial, ya que esta relación puede influir en las longitudes finales retrocalculadas (Francis 1990) y está comprobado que existe un efecto del crecimiento sobre la relación entre el tamaño del pez y del otolito (Bradford y Geen 1987; Mosegard *et al.* 1988; Secor and Dean 1989; Wright *et al.* 1990; Francis *et al.* 1993; Moksness *et al.* 1995). En estos estudios se ha visto que peces de crecimiento lento parecen tener otolitos mayores y/o más pesados que los de crecimiento rápido. Si esto fuera correcto, evidentemente el tamaño relativo del otolito puede proporcionar un índice de la tasa de crecimiento relativo del pez. Es decir, como apuntan Reznick *et al.* (1989), las tasas de crecimiento relativo pueden ser valoradas con las comparaciones estadísticas de las regresiones entre el tamaño del pez y el tamaño del otolito. Nosotros utilizando este método hemos podido comprobar que efectivamente, cuando comparábamos individuos de igual tamaño pero de tasas de crecimiento distinta (diferencias significativas en la edad estimada), sus otolitos mostraron pesos significativamente distintos, aunque de igual tamaño si considerábamos sus medidas longitudinales (radio y diámetro). Por ejemplo, los peces de crecimiento lento (machos de ambas poblaciones o hembras del Bocaleones) tenían otolitos más pesados que los peces de crecimiento rápido (hembras del Guadalete). Estas diferencias tuvieron lugar entre individuos mayores a 115 mm de longitud estándar, pero no para los menores a los 115 mm, en estos el crecimiento del otolito estuvo acoplado al crecimiento del pez. La separación de los grupos (por encima y por debajo de aproximadamente 100 mm) fue necesario para poder comparar las intersecciones de la líneas de regresión, lo que hace pensar que sólo las hembras del río Guadalete seguirían creciendo substancialmente a partir de esta longitud aproximada, mientras el resto ralentizarían su crecimiento.

Como se ha comentado anteriormente, las medidas longitudinales del otolito están más asociadas al tamaño del pez que a la edad. Las observaciones que hemos realizado sobre los otolitos dentro de la cavidad ótica, muestran que sería de esperar que una vez se ralentiza el crecimiento somático del pez, y por tanto los huesos del cráneo apenas sufren

reestructuración; los otolitos tendrían más limitado su crecimiento sobre el eje cabeza-cola que sobre el eje dorso-ventral del pez, que es por donde existe más espacio libre. El otolito crecería proporcionalmente más en espesor, es decir en peso; el incremento en espesor está en función de la incorporación de los cristales de aragonito sobre la superficie interna del otolito (Boehlert 1985). Francis (1992b) encontró que el radio del otolito en peces adultos es una mala variable predictora de la edad.

Los resultados muestran que las desigualdades en el peso del otolito se producen cuando la diferencia de edad entre los grupos comparados es aproximadamente mayor o igual a 2 años; diferencia mínima, por tanto, necesaria para que podamos observar diferencias en las tasas de crecimiento. Esta conclusión está de acuerdo con el modelo propuesto por Secor y Dean (1989), el cual considera los efectos del tamaño del pez y de la edad sobre el tamaño del otolito. Este modelo, según sus autores, se basa en que al depender el crecimiento del otolito del periodo de deposición de CaCO_3 , así como de la amplitud de cada periodo de deposición, es evidente que existiría un efecto del tamaño y de la edad del pez sobre el tamaño del otolito. En el mes de Marzo de este año se abrió un debate en el "Foro Académico sobre Ecología de Peces" de la red Internet, a raíz de una cuestión sobre que problemas se pueden plantear en los estudios de otolitos, al utilizarlos éstos para el retrocálculo. Quedó claro que era muy importante asumir que el crecimiento del otolito es proporcional al crecimiento del cuerpo. El propio Dave Secor (Chesapeake Biological Laboratory; University of Maryland) señaló que puede existir un desacoplamiento de ambos, aunque Jim Cave (no indicó su procedencia) le rebatió, porque consideraba que este desacoplamiento sólo se produce cuando interpretamos el crecimiento en pequeños periodos de tiempo (pe. anillos de crecimiento diario). Nuestros resultados no confirman esto último y estarían en la línea de Dave Secor y de otros autores, que confirmaron la influencia del tamaño y de la edad del pez sobre el tamaño del otolito (Frost y Lowry 1981; Boehlert 1985; Radtke *et al.* 1985; Casselman 1990; Wilson *et al.* 1991)

Según lo anterior, podemos pensar que el tamaño del otolito y el tamaño del pez pueden ser usados como variables predictoras de la edad. Nuestros resultados así lo ponen de manifiesto, el análisis de regresión múltiple incluyó como variables independientes, según los casos, el peso y el radio del otolito y la longitud estándar del pez. Aunque como comentábamos en los Resultados, todas estas variables explicaron la mayoría de la variabilidad en la edad, existió una variabilidad no explicada considerablemente grande. Esto determina que los modelos no puedan ser usados para la estimación exacta de la edad del barbo, cuando se vayan a utilizar para determinar la estructura de las clases de años de la población. Sin embargo, podrían ser usados para aproximarnos a los patrones de

distribución de edad (Beckman *et al.* 1990). Nosotros recomendamos que para obtener edades exactas de peces individuales, es necesario contar los annuli de los otolitos.

Nuestros resultados muestran que existe una relación lineal entre el peso del otolito y la edad, lo que indica que el crecimiento del otolito es continuo para *B. sclateri*. Sin embargo, el tamaño del pez (longitud) tiende hacia una longitud asintótica, por tanto el crecimiento corporal no es continuo. Esto sugiere que los barbos de crecimiento rápido (los más jóvenes) tienen otolitos más livianos que los de crecimiento más lento (los más longevos) de igual tamaño, es decir, el crecimiento del otolito continua con la edad, independientemente del crecimiento del pez. Pero como la longitud del pez explica parte de la variabilidad en la edad después de considerar el peso del otolito, peces grandes tendrán otolitos mayores que los peces pequeños de similar edad, en otras palabras, el crecimiento del otolito está afectado por el crecimiento del pez. Estas dos aparentes contradicciones, vuelven a corroborar la proposición de Secor y Dean (1989) y todos nuestros resultados anteriores; no sólo el otolito crece continuamente, independiente del crecimiento del pez, sino que está acoplado de alguna manera al crecimiento somático.

Nuestros resultados también han mostrado que las longitudes retrocalculadas a partir de los annuli de peces de edad superior, se alejaban bastante de las longitudes observadas en la captura para cada una de las edades consideradas y de las longitudes retrocalculadas a partir de los annuli recientes. Esta última forma de conseguir las longitudes retrocalculadas, minimizaban posiblemente los efectos de la mortalidad selectiva o de las diferencias en el crecimiento anual, motivadas por cambios ambientales en determinados años. Esta conclusión coincide con la propuesta de Gutreuter (1987), el cual recomienda utilizar los annuli más recientes, porque los factores que afectan a la tasa de crecimiento, como las condiciones ambientales y el tamaño de la población, pueden variar en el tiempo. Un problema que conlleva este método es que no podemos retrocalcular longitudes únicamente con otolitos de peces de mayor edad, es decir que nuestras muestras deben abarcar casi todo el rango de edad que queramos estudiar. Por tanto sería lógico pensar que, en este caso, no tendríamos que utilizar los procedimientos de retrocálculo; esta afirmación es correcta siempre que las muestras se obtengan fuera de la época de crecimiento de la población (Ricker 1992). Pero aun así, los datos que nosotros obtendríamos estarían formados por una única medida del pez (la longitud y edad en la captura). Este tipo de datos no permitirán obtener información del crecimiento individual, sólo podremos cuantificar la media poblacional (Secor y Dean 1992). Es indispensable para evaluar las hipótesis sobre el crecimiento individual, realizar medidas repetidas sobre el mismo individuo, ya que con

una única medida encontraremos sesgos debido a probables mortalidades o a cierta selectividad del muestreo asociados al tamaño del pez (Chambers y Miller 1995). Estos autores apuntan que con un único dato por pez, encontraremos diferencias al estimar las tasas de crecimiento uniendo todas las observaciones de las cohortes en cada edad, de las tasas verdaderas. Cuando nosotros calculamos las tasas de crecimiento de la población o aparente y las tasas de crecimiento individual o verdadera (Tabla 1.11 y 12), encontramos grandes diferencias entre ellas. La tasa de crecimiento aparente se calcula utilizando sólo una medida del pez, mientras que la tasa de crecimiento verdadero se calcula utilizando dos, las longitudes retrocalculadas a partir de sus dos últimos annuli. Las diferencias entre estas dos tasas en nuestro estudio, sobre todo cuando las tasas de crecimiento verdadero son significativamente mayores, reflejan la existencia de severas mortalidades selectivas entre estos peces en determinadas edades (Ricker 1975).

Cuando hemos comparado los métodos de retrocálculo más utilizados, hemos comprobado que por el método de Monastyrsky y por el de Regresión Simple, un alto porcentaje de las longitudes retrocalculadas se desviaban de las longitudes observadas, por encima y/o por debajo de éstas. Cuando la relación entre la longitud del pez y del otolito es isométrica (pendiente igual a 1) el método de Monastyrsky se convertiría en la ecuación de Dahl-Lea (Francis 1990) y tal vez pudiera haber dado mejores estimas; en nuestro caso las pendientes fueron distintas a 1, para el Guadalete fue de 1,44 y para el Bocaleones de 1,14. En el caso de la Regresión, los barbos de crecimiento más rápido (los más jóvenes) mostraron una desviación positiva, las longitudes retrocalculadas fueron mayores a las observadas. Por el contrario, los de crecimiento más lento mostraron una desviación negativa, las longitudes retrocalculadas fueron menores (Figura 1.13). Los métodos de Regresión Simple, al utilizar la relación pez-otolito poblacional, no permiten ninguna desviación en las trayectorias individuales de crecimiento; de ahí, la preferencia de los métodos de Fraser-Lee o de Intersección Biológica sobre los métodos de regresión (Carlander (1981; Francis 1990; Campana 1990). En el caso de los dos métodos de Fraser-Lee, los resultados han sido bastante satisfactorios, siendo algo mejores en los de la Intersección Biológica. Estos dos métodos tienen en cuenta las trayectorias individuales de crecimiento y por tanto, calculan una pendiente separada para cada pez (Campana 1990). El método de Fraser-Lee corrige la intersección y cualquier desviación individual de la regresión lineal es mantenida proporcionalmente en el retrocálculo (Fitzhugh y Rice 1995). El método de la Intersección Biológica elimina los sesgos asociados con el cálculo de una intersección estadística y usa una intersección basada en medidas verdaderas. Además, Francis (1992) encontró que este método es capaz de obviar los efectos de la tasa de crecimiento somático. En el trabajo de Fitzhugh y Rice (1995) el

método de Intersección Biológica daba altos errores en las estimas retrocalculadas; nosotros pensamos que esto pudo ser debido, a que estos autores utilizaron juveniles y no larvas próximas a la eclosión, para calcular la intersección biológica. En nuestro caso, parece que la longitud del pez y del otolito en el momento de la eclosión obtenidas por Winkler para *B. barbatus*, son válidas para los procedimientos de retrocálculo en *B. sclateri*. Estos resultados deben considerarse importantes, aunque sería interesante en un futuro probar con los métodos de regresión múltiple, en los que se usa la edad como predictora de la longitud (Secor and Dean 1992).

La exactitud de los parámetros de crecimiento de von Bertalanffy determinados por los otolitos, es confirmada por la similitud de los obtenidos a partir de los datos de longitud observada y de la retrocalculada. Además las pequeñas diferencias entre las estimas de la L_{∞} y la longitud máxima observada indicó que los valores estimados de la L_{∞} fueron razonables (Moreau 1987; Chen *et al.* 1992). Los parámetros obtenidos en este estudio son semejantes a los obtenidos por Herrera (1992) para esta especie, aunque difieren de los de Rodríguez-Ruiz (1992); los mayores valores de L_{∞} estimados por esta última autora pueden ser debido a que no capturó ejemplares mayores de 6 años, igual que lo que ha ocurrido en este estudio con los machos del Bocaleones. Nuestros resultados han mostrado en general, que las curvas de crecimiento sugieren unas tasas de crecimiento bajas, incluso en las primeras edades. Esto evidentemente determina que la edad de la primera maduración se alcance después de varios años y determine que esta especie alargue su vida reproductora. Dentro de este modelo de crecimiento, por una parte, existió diferencias en los crecimientos entre sexos, las hembras alcanzan mayores longitudes asintóticas, y por otra, la población del río Guadalete muestra un crecimiento mayor que la del arroyo Bocaleones. Por tanto, las hembras, sobre todo en el río Guadalete, alcanzaron tamaños significativamente mayores que los machos, con sus curvas de crecimiento divergiendo al incrementar la edad y la madurez. Desde el punto de vista de la estrategia de vida de la especie, alcanzar tamaños mayores por parte de la hembra, incrementaría el potencial reproductor al incrementar la capacidad de producción de huevos (Roff 1983; Wootton 1990).

Entender este dimorfismo sexual entre los sexos en *B. sclateri*, puede ofrecernos la posibilidad de una mejor gestión de esta especie, ya que los modelos de crecimiento específico para cada sexo deberían ofrecer una información más precisa sobre las características de la población. Por ejemplo, en la pesca deportiva del barbo la longitud mínima de las piezas capturadas tiene que ser de 18 cm (Junta de Andalucía 1992), por lo que se pescan ejemplares maduros. Esto, por tanto, puede influir en el "sex-ratio" de la población y tendría efectos nocivos sobre el grupo reproductor.

Algunas hipótesis han sido propuestas para explicar estas diferencias de tamaño entre los sexos en otras especies (Wilson *et al.* 1991) y que pueden ser aplicadas para el barbo. Por ejemplo, que exista una mortalidad diferencial entre los sexos, otra posibilidad es que exista un crecimiento sexualmente distinto o incluso, una conducta distinta entre los machos y las hembras (pe. los grandes machos eluden ser capturados debido a aspectos de distribución espacial).

De estas hipótesis, el crecimiento y la mortalidad dimórfica parecen que son las más probables. Explicar el dimorfismo sexual en base a diferencias en la conducta, es una posibilidad lejana e incluso difícil de probar. El grupo de investigación al que pertenezco lleva desde 1987 estudiando el río Guadalete; este autor que ha trabajado desde ese año, ha participado en prácticamente todas las campañas de muestreo, que abarcaban distintas zonas del río (embalse, pozas, zonas de corriente, etc...) y por observación ha constatado, que los ejemplares de mayor tamaño por regla general son hembras.

En base a las edades estimadas y a la distribución de frecuencias de las mismas, las dos poblaciones de *B. sclateri*, mostraron una distribución semejante, y dentro de cada una, las hembras y los machos en este estudio también presentan una longevidad parecida. Esta conclusión es válida para el arroyo de Bocaleones, siempre que supongamos que no hemos capturado machos mayores a 10 años por problemas en el muestreo; como se ha visto en los modelos de crecimiento, la estima de la longitud asintótica ($L_{\infty} = 1789$ mm) puede apoyar esta hipótesis. Además, hemos encontrado que el peso del otolito es proporcional a la edad y por tanto, aunque las hembras de *B. sclateri* alcancen mayores tamaños que los machos, ambos sexos en las dos poblaciones se pueden considerar que muestran una longevidad parecida, en base a los pesos máximos observados en el otolito. Esto apoyaría la hipótesis de que las diferencias encontradas en el tamaño de cada sexo, son una consecuencia de un crecimiento dimórfico sexualmente y no de una mortalidad diferencial (longevidad). En general podemos decir que los machos ralentizan su crecimiento a partir de su primera maduración y las hembras aparentemente siguen creciendo a la misma tasa de crecimiento previa durante más tiempo, aunque muestran un descenso con el incremento de la edad. En ciprínidos, según Mann (1991), una vez que la hembra madura, por regla general más tarde que los machos, la selección natural favorece que sigan con tasas de crecimiento altas, lo que determina, como hemos apuntado anteriormente, un incremento en la fecundidad. Es interesante apuntar que las hembras del Bocaleones muestran un crecimiento parecido a los machos, es decir que la primera maduración influye más negativamente en ellas que en las del río Guadalete.

Pero donde el otolito se define como una herramienta de máxima utilidad es en los estudios de biocronología. La biocronología usa los registros

de crecimiento del otolito para inferir las condiciones ambientales a las que estuvo sujeto el individuo (Pereira *et al.* 1995). Nosotros no hemos analizado el crecimiento en longitud del pez calculado a partir de los crecimientos en el otolito, hemos estudiado directamente los crecimientos de este último. Esto nos permite obviar el riesgo en el retrocálculo (Francis 1990) y la dependencia ambiental de las relaciones entre el tamaño del pez y del otolito (Mosegard *et al.* 1988; Reznick *et al.* 1989; Secor and Dean 1989). Además, como hemos visto en este estudio, existe una influencia del sexo sobre esta relación, por lo que hemos realizado por separado el análisis en las hembras y en los machos.

Los resultados han mostrado que en el crecimiento del otolito influyen la edad y el año de crecimiento y que la influencia ambiental ha sido la misma para cada grupo de edad. Esto determina unas trayectorias de crecimiento similares para las cohortes de los machos y de las hembras en cada una de las poblaciones. Pero en general en todas las cohortes, en las primeras edades las trayectorias de crecimiento están más separadas y paralelas. Por el contrario a partir de cierta edad, que varía según el sexo y que aproximadamente coinciden con la edad de la primera maduración, las trayectorias son más coincidentes. Si aplicamos los que Weisberg y Frie (1987) deducen de este tipo de trayectorias (paralelas o coincidentes), en nuestro caso mientras que el pez se encuentra en su estado juvenil su crecimiento depende más de la edad que del ambiente; a partir de la primera maduración los efectos ambientales inciden en mayor grado sobre el crecimiento. Nosotros asumimos que la madurez sexual representa una transición crítica en la vida de un pez. Antes de la primera maduración, la distribución del tiempo y de los recursos se relacionan solamente con el crecimiento y la supervivencia; después, el pez tiene que tener en cuenta además las necesidades de la reproducción (Wootton 1990).

Independientemente de la edad del pez, desde 1977 a 1991, el modelo predice valores más altos de los observados en el año 1982 y 1990 en el río Guadalete, y en 1990 en el arroyo de Bocaleones. Es decir, que en un periodo de 15 años, sólo dos en el río Guadalete y uno en el arroyo de Bocaleones han sido años desfavorables para el crecimiento. Es difícil encontrar que parámetro o conjunto de parámetros son los causantes de que estos años sean los más desfavorables, ya que no todas las variables que quisiéramos contrastar se han medido en series de tiempo tan largas. En nuestro caso, sólo hemos podido recoger datos de precipitación y temperatura del aire en la estación que el Instituto Nacional de Meteorología tiene en Grazalema. En la Figura 1.21 se muestra la precipitación media anual desde 1976 a 1991, y se observa como el año 1982 fue el último año de un periodo dilatado de sequía; mientras que el año 1990 fue el de menor precipitación en este periodo de 15 años. Además en Marzo del año 1990 hubo una fuerte crecida que eliminó casi completamente a las comunidades

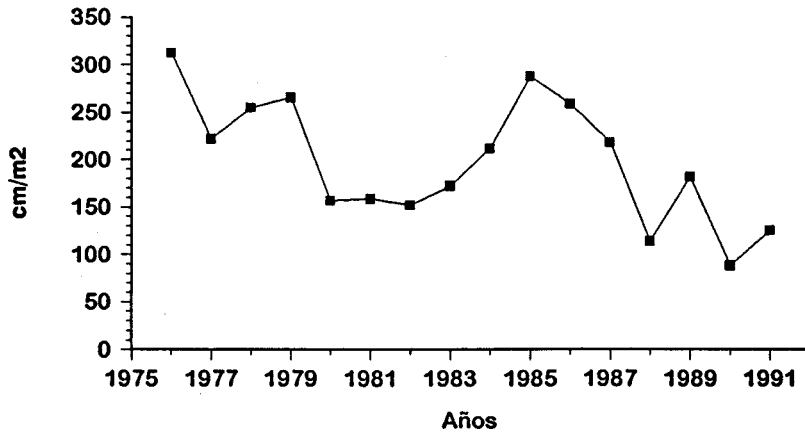


FIGURA 1.21. Precipitación media anual registrada en la estación meteorológica de Grazales. Datos cedidos por el Centro Meteorológico Territorial de Andalucía Occidental perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología (MOPTMA).

de macroinvertebrados y de algas bentónicas de las dos zonas de estudio (Prenda 1993). Por otro lado, los años de mejor crecimiento en ambas poblaciones coinciden con años donde aumentó considerablemente la precipitación respecto a los años anteriores (1986 y 1989).

En resumen, nuestros resultados constituyen una prueba de la potencialidad de los otolitos en estudios de biocronología, que pueden ser usados para identificar los cambios pasados en el ambiente al cual estuvo sujeto la población de peces. Como se ha visto, es necesario realizar el seguimiento de variables ambientales a largo plazo, para poder determinar con claridad que características del hábitat podemos descifrar de los registros del otolito. Esta metodología posee un amplia aplicación en la gestión de las poblaciones de peces en sistemas más controlados que los ríos, como pueden ser los embalses y en particular los de abastecimiento.

Estudio comparativo de la variación estacional del peso corporal, hepático y gonadal entre dos poblaciones de *Barbus sclateri*

Introducción

El estudio de las variaciones del peso corporal, del hígado y de la gónada se han usado como indicadores del crecimiento, alimentación, reproducción, etc... y por tanto como herramientas muy útiles en los estudios de biología en peces (Busacker et. al 1990; Çrim y Glebe 1990). Para cuantificar la variación de estos pesos, los investigadores han usado una gran variedad de índices con el fin de eliminar la dependencia del peso o de un órgano determinado, del tamaño del pez. Por un lado, para valorar la condición del pez se ha usado el factor de condición de Fulton (K) (Bagenal y Tesch 1978) o el de condición relativa (K_r) (Weatherley y Gill 1987), el peso relativo (W_r) (Murphy et. al. 1990; Neumann y Willis 1994), el índice hepatosomático (IHS) (Bulow et al. 1978; Adams y McLean 1985,) e incluso el peso relativo del hígado (L_r) (Brown y Murphy 1991). Por otro, para cuantificar la condición reproductora se ha utilizado el índice gonadosomático (IGS) o el índice gonadal relativo (IGR_i) (DeVlaming et. al. 1982; Erickson et. al. 1985). Pero ya Le Cren (1951) sugirió que el cálculo de los índices de condición no son necesarios, si fuera más fácil estimar los parámetros de la regresión del peso y la longitud, cosa que hoy en día es factible gracias a la implantación generalizada de los ordenadores. Cone (1989) propone esto y pone de manifiesto la necesidad de reconsiderar el uso de todos los índices de condición. Este trabajo abrió un debate sobre la validez de los índices, que se plasma en varios comentarios sobre el trabajo de Cone (1989) por parte de Springer, Murphy, Gutreuter, Anderson, Miranda, Jackson y el propio Cone

(1990). Pero después de leer este artículo, la sensación final es que los autores no llegaron y todavía hoy no llegan a ponerse de acuerdo sobre cual es el mejor método, incluso el mejor índice. Wootton (1990) señala muy claramente, que a pesar de que los índices son usados frecuentemente, es preferible el método de comparar la relación peso-longitud mediante el análisis de la covarianza, tanto para el peso corporal del pez, como para el de cualquier órgano interno.

Recientemente García-Berthou y Moreno-Amich (1993) ponen de manifiesto todas las dificultades estadísticas de los índices y proponen claramente el análisis multivariante de la covarianza (MANCOVA) en los estudios morfométricos, utilizando el peso total y somático del pez, el peso del hígado y el peso de la gónada. La aproximación de estos autores permite superar el problema central de los índices clásicos, es decir, como ambos parámetros de la regresión pueden cambiar, la interpretación de los resultados es difícil si sólo se considera un parámetro. Para superarlo, el MANCOVA analiza primero la homogeneidad de las pendientes; si ésta existe, para estudiar la variación del peso sólo habrá que tener en cuenta la variación de la intersección (García-Berthou y Moreno-Amich 1993).

En Abril de 1995, Chris Zogby (Suny College, USA) abrió de nuevo el debate en el *Foro Académico sobre Ecología de Peces* de la red Internet, al preguntar a que se debía que sus datos producían resultados diferentes al utilizar el índice de condición, que al utilizar el peso medio corregido por la longitud. Como en cualquier debate que se produce en este foro, muchos investigadores¹ de todo el mundo dieron su opinión sobre el problema que planteaba Zogby. De la lectura de sus comentarios podemos sacar, y el propio Zogby lo resume en una comunicación final a la red, que la mayoría de ellos piensan que el índice de condición es de poca confianza, principalmente porque no es probable que el 3 sea el *número mágico* en la relación peso-longitud y que el análisis del ANCOVA es un método más apropiado, siempre que los datos cumplan los requisitos de normalidad, homogeneidad de la varianza, etc...

Todos los trabajos realizados anteriormente sobre aspectos relacionados con el crecimiento y la reproducción en *Barbus sclateri* han sido desarrollados en base al índice de condición, nutrición y gonadosomático (Lucena *et al.* 1978; Castelló 1981; Lucena *et al.* 1983; Lucena 1984; Herrera *et al.* 1988; Herrera y Fernández-Delgado 1992; Encina 1991; Rodríguez-Ruiz 1992). Sólo en un trabajo de Lucena *et al.* (1979) se utilizó la variación del peso

¹Ray Newman (Univ. de Minnesota), David Schultz (Nicholls State Univ.), Ghisla Chouinard (Fisheries and Oceans, Moncton, N.B. Canada), Matt Wilson (NOAA/AFS Seattle, WA), George LaBar (Univ. de Vermont), Nicholas Collins (Univ. de Toronto, Erindale), Stephen Bowen (Michigan Tech. Univ.), Richard Dudley, Chris Martin y Irene Zweimueller (Univ. de Vienna).

total y somático, aunque no tuvieron en cuenta el posible efecto de las diferencias temporales en longitud.

El propósito de este capítulo es aplicar el análisis de la covarianza de las variables medidas directamente sobre cada pez (peso total, somático, del hígado y de la gónada), utilizando la longitud estándar como covariable. Esto nos permitirá trabajar con individuos de distintos tamaños, que es un problema habitual que encontramos en los trabajos de campo, a diferencia del control experimental que ejercemos cuando trabajamos en el laboratorio. Por tanto, con un grado mayor de confianza, podremos comparar la variación temporal de estas variables morfométricas en dos poblaciones naturales, aisladas entre sí, de *B. sclateri*. Y esto nos permitirá determinar si las distintas condiciones ambientales (abióticas y bióticas) a las que están sujetas ambas poblaciones, pueden afectar al crecimiento y a la reproducción de esta especie.

Material y métodos

Los ejemplares de *B. sclateri* fueron capturados mediante pesca eléctrica desde Enero a Diciembre de 1992, en las dos estaciones de muestreo descritas en la Introducción. Como comentábamos en esa parte de la memoria, la presencia de la presa no había influido todavía en las condiciones ambientales de la zona de estudio en el río, pero impedía que las dos poblaciones se mezclaran y de esta forma podremos comparar mejor la influencia del ambiente sobre ellas. La longitud total (L_t , precisión 0,1 mm) y estándar (L_{es} , precisión 0,1 mm), el peso total (precisión 0,01 g) y el peso somático (sin vísceras; precisión 0,01 g) fueron registrados para cada ejemplar. Todas las longitudes son dadas como longitud estándar. El hígado y la gónada fueron extraídos y pesados (precisión 0,01 g) y éstas últimas examinadas macroscópicamente para determinar el sexo. Como tuvimos muestras del periodo reproductivo se pudo determinar la talla media de maduración para cada sexo. Durante este periodo, las hembras inmaduras se caracterizaron por ovarios pequeños, de color rosa pálido, rojizo y algunas veces transparentes. Los machos inmaduros tenían los testículos formados por dos finos filamentos rodeados de grasa. En base a este reconocimiento encontramos que la mayoría de los machos alcanzaban el estado adulto a los 80 mm de longitud estándar y las hembras a los 120 mm. Esta longitudes coinciden con las encontradas para este especie en el mismo río por Rodríguez-Ruiz (1992) y en el arroyo Mascatomiza, dentro de la cuenca del río Guadalquivir, por Herrera (1991).

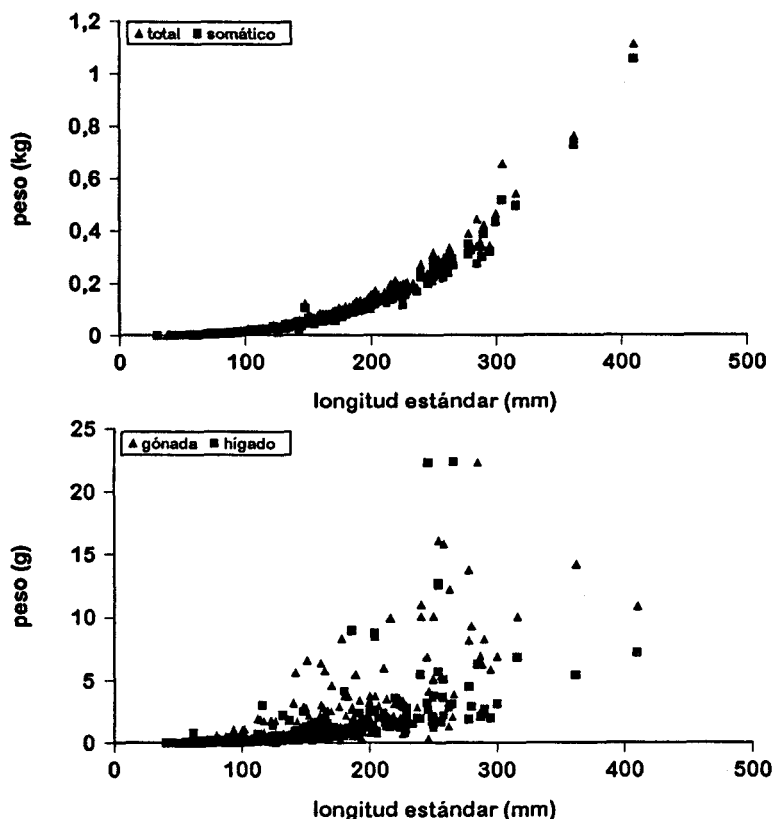


FIGURA 2.1. Relación entre el peso total, somático, del hígado y de la gónada, y la longitud estándar para la totalidad de los ejemplares capturados en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones.

Análisis estadísticos

Los datos se separaron en adultos y juveniles, aunque en el caso de estos últimos sólo fue posible analizar los capturados en el río Guadalete, ya que en el arroyo de Bocaleones no se capturaron suficientes individuos que permitieran realizar adecuadamente los análisis estadísticos. Como se ha comentado en la Introducción de este capítulo, la evolución temporal de las variables morfométricas han sido estudiadas estadísticamente mediante el análisis multivariante de la covarianza (MANCOVA). Este análisis permite evaluar los efectos, independientemente de cualquier diferencia en el tamaño de los individuos, del ambiente (mes) y del sexo sobre el peso total, peso somático, peso del hígado y peso de la gónada. Además, el MANCOVA a diferencia del ANCOVA, nos permite ahorrar tiempo, ya que si no hay ningún factor que influya significativamente sobre el conjunto de las variables, no es necesario realizar los análisis univariantes. El efecto del lugar, el mes y del

sexo se han considerado fijos. En el caso del lugar y el tiempo, que son los factores más difíciles de catalogar como fijos o aleatorios (Bennington y Thayne 1994), nos interesaba conocer si la variación en las condiciones ambientales de un lugar a otro y de mes a mes influían en la respuesta de las variables, más que estimar la magnitud de la variación asociada con ellas (efecto aleatorio).

Cuando el efecto de interacción entre ambos factores fue significativo, la interpretación de esta interacción se hizo a partir de un análisis de los efectos simples. Con esta técnica, las sumas de cuadrados relativas a las componentes simples del factor tiempo, coincidirán con las sumas de cuadrados que en el modelo original se atribuyen al factor tiempo y al factor interacción (Riba 1990). En nuestro caso, se analizó el efecto del tiempo dentro de cada uno de los niveles del factor sexo. Cuando existió diferencias significativas, tanto en el modelo original como en el de efectos simples, la variación temporal fue descrita usando las medias predichas por el modelo ajustadas al efecto de la covariable. Las diferencias entre estas estimas ajustadas fueron valoradas posteriormente con la comparación univariante de Bonferroni por el método de *repetición*; de esta forma se compara la media ajustada de un mes con la media del mes anterior. Esto nos permitió eludir la interpretación usualmente subjetiva de las variaciones temporales de las variables estudiadas, sobre la base de la teoría estadística (García-Berthou y Moreno-Amich 1993).

El logaritmo decimal de la longitud estándar fue utilizado como covariable y las demás variables fueron también transformadas mediante logaritmo decimal, ya que de esta forma se normalizaban y se conseguía homogeneizar las varianzas. Además, la transformación convirtió en lineal todas las relaciones alométricas entre las variables y la longitud (Figura 2.1). Se ha utilizado la longitud estándar como covariable, porque muestra menor coeficiente de variación (variable transformada) que el peso sómatico, 4,97 y 16,45 respectivamente, por lo que describe mucho mejor el tamaño del pez. Un nivel de significación del 0,05 fue aceptado para todos los análisis, los cuales fueron realizados mediante el paquete estadístico SPSS®.

Resultados

En un análisis preliminar realizado sobre los ejemplares adultos, combinando las dos poblaciones y por tanto utilizando como factores el lugar, el sexo y el tiempo, la interacción entre la covariable y el conjunto de los factores fue significativa (MANCOVA; $F_{172,624}=1,55$, $P<0,0005$). Esto muestra que sin realizar el análisis univariante, existió al menos una variable que no presentaba homogeneidad de sus pendientes para el total de peces adultos

TABLA 2.1. Diseño preliminar de la MANCOVA con los resultados del análisis multivariante para los ejemplares adultos de *B. sclateri*. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable. El estadístico *F* corresponde al lambda de Wilks y es exacto si sus grados de libertad son enteros. Las hipótesis del paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores.

	Multivariante					
	río Guadalete			arroyo Bocaleones		
	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>
Longitud	4,87	1364,51	<0,001	4,95	1922,23	<0,001
Sexo	4,87	7,28	<0,001	4,95	0,94	0,441
Mes	40,331,75	7,81	<0,001	44,365,40	2,61	<0,001
Mes x sexo	40,331,75	1,99	0,001	44,365,40	1,83	0,001
Longitud x factores	84,302,12	1,42	0,018	92,331	1,57	0,002

TABLA 2.2. Diseño preliminar de la MANCOVA con los resultados del análisis univariante para los ejemplares adultos de *B. sclateri*. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable. Las hipótesis del paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

	g.l.	Univariante							
		Peso total		Peso somático		Peso gonadal		Peso hepático	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>río Guadalete</i>									
Longitud	1,90	5443,62	<0,001	3136,56	<0,001	293,51	<0,001	609,08	<0,001
Sexo	1,90	8,98	0,004	0,85	0,357	6,16	0,015	19,48	<0,001
Mes	10,90	8,13	<0,001	4,99	<0,001	19,74	<0,001	13,54	<0,001
Mes x sexo	10,90	1,62	0,112	2,22	0,023	2,40	0,014	1,92	0,052
Longitud x factores	21,79	1,23	0,249	1,65	0,068	2,05	0,012	1,25	0,231
<i>arroyo Bocaleones</i>									
Longitud	1,98	6100,93	<0,001	7708,97	<0,001	148,73	<0,001	145,44	<0,001
Sexo	1,98	2,54	0,114	1,43	0,235	1,21	0,274	0,07	0,782
Mes	11,98	3,35	0,001	4,95	<0,001	4,11	<0,001	0,98	0,469
Mes x sexo	11,98	1,26	0,256	2,19	0,020	3,27	0,001	1,02	0,429
Longitud x factores	23,86	0,97	0,516	1,59	0,063	2,10	0,007	1,42	0,125

capturados. En efecto, de las cuatro variables estudiadas, tres presentaron heterogeneidad en sus pendientes: peso total ($F_{43,159}=1,13$, $P=0,084$), peso somático ($F_{43,159}=1,65$, $P=0,013$), peso del hígado ($F_{43,159}=2,05$, $P<0,001$) y peso de la gónada ($F_{43,159}=1,80$, $P=0,004$). Por tanto, creímos oportuno analizar todas las variables en cada una de las poblaciones por separado y que fueran las respuestas estacionales las que nos permitieran conocer las diferencias reales entre los dos ambientes.

En la Tabla 2.1 se muestra el resultado de la MANCOVA preliminar del efecto del sexo y el tiempo sobre el peso total, somático, del hígado y de la

TABLA 2.3. Diseño final de la MANCOVA con los resultados del análisis multivariante para los ejemplares adultos de *B. sclateri*. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable y el peso de la gónada no fue analizado. El estadístico *F* corresponde al lambda de Wilks y es exacto si sus grados de libertad son enteros.

	Multivariante					
	río Guadalete			arroyo Bocaleones		
	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>
Regresión	3,98	2570,49	<0,001	3,107	2924,54	<0,001
Sexo	3,98	8,35	<0,001	3,107	2,13	0,100
Mes	30,288,33	6,34	<0,001	33,315,95	3,44	<0,001
Mes x sexo	30,288,33	1,97	0,002	33,315,95	1,08	0,348

TABLA 2.4. Diseño final de la MANCOVA con los resultados del análisis univariante para los ejemplares adultos de *B. sclateri*. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable y el peso de la gónada no fue analizado.

	Univariante						
	g.l.	Peso total		Peso somático		Peso hepático	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>río Guadalete</i>							
Regresión	1,100	7667,16	<0,001	4330,40	<0,001	763,38	<0,001
Sexo	1,100	7,13	0,009	0,15	0,699	20,34	<0,001
Mes	10,100	1,48	0,157	3,18	0,001	14,09	<0,001
Mes x sexo	10,100	2,72	0,005	2,45	0,011	1,86	0,059
<i>arroyo Bocaleones</i>							
Regresión	1,109	7689,10	<0,001	8883,61	<0,001	166,89	<0,001
Sexo	1,109	6,47	0,012	5,47	0,021	0,99	0,321
Mes	11,109	4,02	<0,001	4,34	<0,001	3,02	0,002
Mes x sexo	11,109	0,82	0,621	0,49	0,906	2,03	0,032

gónada en cada población. Se observa como en el análisis multivariante existía una interacción significativa entre la longitud y los factores, debida, como muestra el análisis univariante al peso de la gónada (Tabla 2.2); por lo tanto el diseño final de la MANCOVA se realizó para el resto de las variables (Tabla 2.3 y 2.4).

El análisis realizado para estudiar la influencia del sexo y el tiempo sobre el peso total y somático, en los ejemplares capturados en el río Guadalete (Tabla 2.4), ha puesto de manifiesto la existencia de interacción significativa entre ambos factores. Asimismo, se ha constatado que globalmente el sexo influía sobre el peso total (hembra: $\mu_{adj}=89,90$ g; macho: $\mu_{adj}=85,03$ g) pero no sobre el somático (hembra: $\mu_{adj}=77,01$ g; macho: $\mu_{adj}=76,36$ g), mientras que las variaciones del peso total no fueron

TABLA 2.5. Diseño final de la MANCOVA con los resultados del análisis de los efectos simples para los ejemplares adultos de *B. sclateri* capturados en el río Guadalete. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable.

	g.l.	Peso total		Peso somático	
		F	P	F	P
Regresión	1,100	7667,16	<0,001	4330,40	<0,001
Sexo	1,100	7,13	0,009	0,15	0,699
Mes(macho)	10,100	2,82	0,004	0,68	0,739
Mes(hembra)	10,100	6,28	<0,001	4,62	<0,001

significativas y las del peso somático sí. La presencia de esta interacción pone de manifiesto que la diferencia de efectos entre combinaciones factoriales no es constante y puede enmascarar la correcta interpretación de los efectos principales; por lo tanto, la interpretación de los resultados la vamos a hacer a partir del análisis de los efectos simples (Tabla 2.5). Al comparar dichos resultados con los de la Tabla 2.4 se constata que la variabilidad explicada por ambos modelos es la misma, es decir, el modelo de efectos simples supone únicamente modificar la descomposición de la variabilidad explicada. Los resultados expresan la significación del factor tiempo dentro de los niveles del sexo hembra y macho. El peso total de ambos sexos varió significativamente a lo largo del periodo de estudio aunque con distinto patrón, como muestra el resultado de las comparaciones de Bonferroni (Figura 2.2a). Las hembras incrementaron su condición en Mayo y Octubre, y la disminuyeron en Noviembre. Los machos también mostraron una disminución en su condición en Noviembre, pero la mantuvieron sin variaciones durante la mayor parte del año. Esto explica la interacción significativa y que el efecto del sexo no sea constante a lo largo del tiempo, en concreto en el análisis de los efectos simples, las hembras eran mucho más pesadas que los machos en el mes de Octubre ($F_{1,100}=25,55$, $P<0,0005$), mientras que en el resto del año las diferencias no existieron ($P>0,05$). Del mismo modo, el efecto de la interacción sobre el peso somático se puede explicar por que los machos no cambiaron su peso a lo largo del año (Tabla 2.5), pero las hembras tuvieron una disminución significativa en Agosto, seguida de un incremento gradual hasta Octubre y una nueva disminución en Noviembre (Figura 2.2a). Además, en una gran parte del año no existió diferencias en la condición definida por el peso somático entre sexos ($P>0,05$), pero en Agosto las hembras fueron más livianas que los machos ($F_{1,100}=11,59$, $P=0,001$) y en Octubre ocurrió lo contrario ($F_{1,100}=9,70$, $P=0,002$). Estas diferencias entre sexos no aparecen en el análisis de los efectos principales porque las medias marginales compensan estas diferencias.

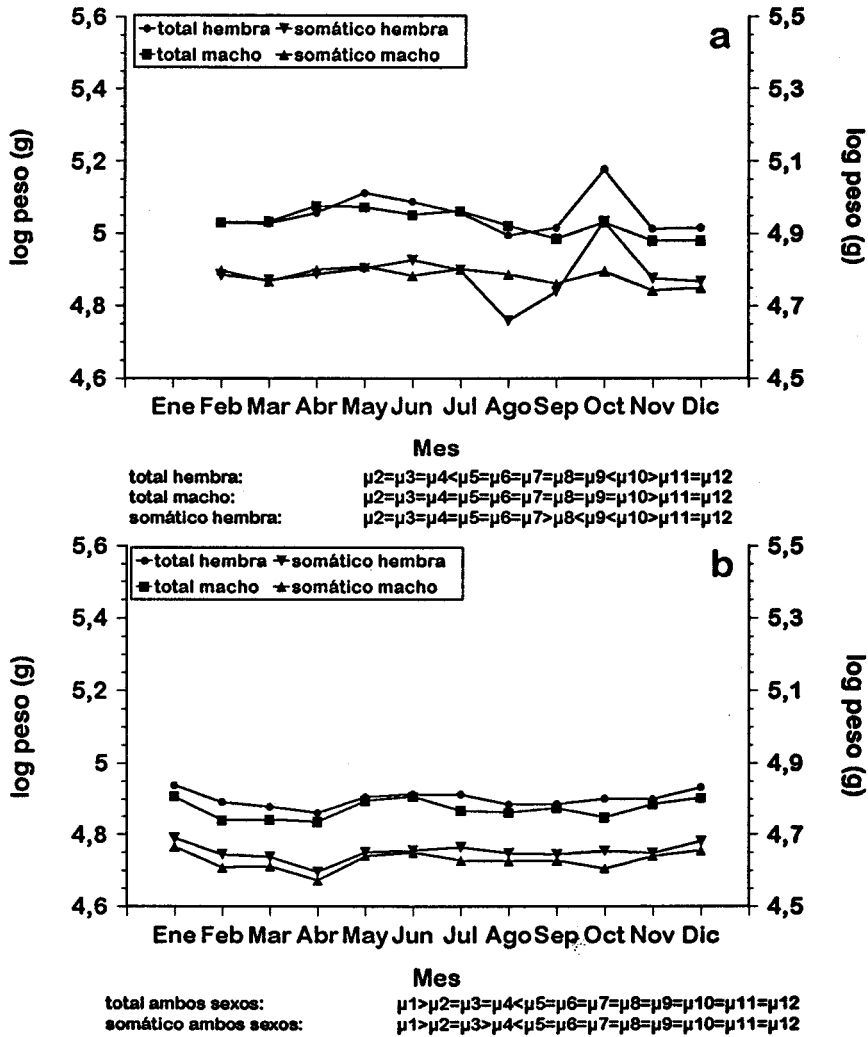


FIGURA 2.2. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable del peso total y somático transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del río Guadalete (a) y del arroyo de Bocaleones (b). El peso total se ajusta al eje de la izquierda. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa, corresponden al orden del momento de muestreo: μ_1 es la media de Enero, μ_8 es la media de Agosto.

En el arroyo de Bocaleones no existe interacción significativa entre el sexo y el tiempo sobre el peso total y somático de los ejemplares adultos; esto hace que la interpretación de los resultados se realice directamente a partir de los efectos principales (Tabla 2.4). El tiempo influyó significativamente sobre ambos pesos (Figura 2.2b), disminuyeron en Febrero y aumentaron en Mayo y además el peso somático tuvo otro descenso significativo en Abril. La ausencia de interacción dio lugar a que esta variación fuera prácticamente

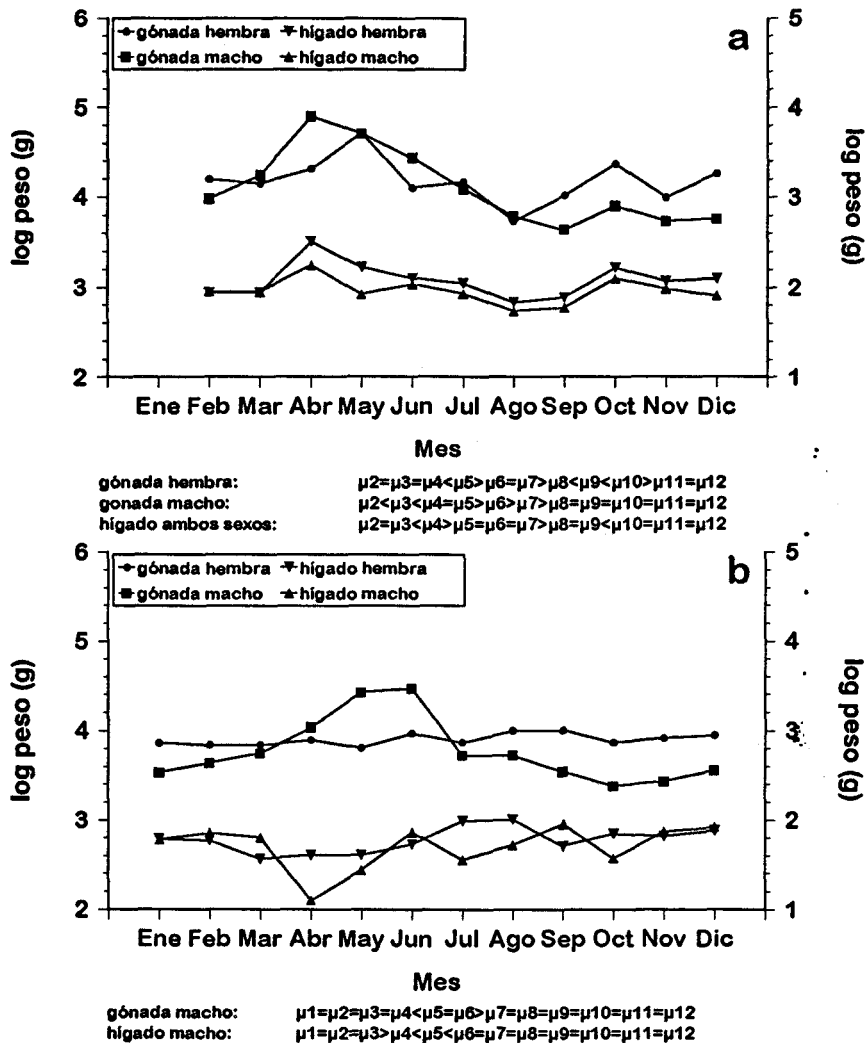


FIGURA 2.3. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable del peso del hígado y de la gónada transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del río Guadalete (a) y del arroyo de Bocaleones (b). El peso de la gónada se ajusta al eje de la izquierda. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa, corresponden al orden del momento de muestreo: μ_1 es la media de Enero, μ_8 es la media de Agosto.

paralela entre machos y hembras, es decir, la distancia entre medias fue constante a lo largo del año. Esta distancia fue lo suficientemente grande como para determinar que el efecto del sexo también fuera significativo; de hecho, las hembras mostraron un mayor peso que los machos de igual tamaño, tanto para el peso total (hembras: $\mu_{adj}=62,71$ g; machos: $\mu_{adj}=59,35$ g), como para el peso somático (hembras: $\mu_{adj}=56,30$ g; machos: $\mu_{adj}=53,70$ g).

El peso del hígado de los ejemplares capturados en el río Guadalete mostró una variabilidad temporal muy significativa; el sexo afectó al peso de este órgano y no existió efecto de la interacción entre ambos factores (Tabla 2.4). En la Figura 2.3a se observa como el patrón de variación es igual en ambos sexos y sobre todo en los meses de Abril y Mayo las hembras mostraron una mayor diferencia en el peso del hígado. Para el total del año el peso medio ajustado para las hembras fue de 12,04 g y para los machos de 9,01 g. Ambos sexos mostraron un incremento en los pesos de sus hígados en Abril, descendiendo rápidamente al mes siguiente; en Agosto y Septiembre mostraron un nuevo descenso y un aumento en el mes de Octubre.

La variación temporal en el peso del hígado de los ejemplares adultos capturados en el arroyo de Bocaleones fue muy significativa, no hubo diferencia entre los sexos y la interacción entre los factores también fue significativa (Tabla 2.4). En la valoración de los resultados debe tenerse en cuenta esta interacción significativa, por lo que la interpretación debemos hacerla a partir del análisis de los efectos simples. La descomposición de la variabilidad en el análisis de los efectos simples nos descubre que la interacción se debe por una parte, a que los pesos de los hígados en los dos sexos no muestran la misma respuesta al paso del tiempo (Figura 2.3b). Los machos mostraron una variación significativa en los pesos de sus hígados ($F_{11,109}=4,07$, $P<0,0001$), una disminución en el mes de Abril con un posterior aumento gradual hasta el mes de Junio. Las hembras mantuvieron prácticamente constante el peso a lo largo del año ($F_{11,109}=1,39$, $P=0,189$). Esto hace que éstas mostraran un peso del hígado mayor que los machos en Abril ($F_{1,109}=6,56$, $P=0,012$; hembras: $\mu_{\text{adj}}=0,40$ g; machos: $\mu_{\text{adj}}=0,12$ g) y Julio ($F_{1,109}=6,19$, $P=0,014$; hembras: $\mu_{\text{adj}}=0,97$ g; machos: $\mu_{\text{adj}}=0,36$ g), diferencias que no fueron detectadas en el análisis de los efectos principales, y un peso igual en el resto del año. Para el total del año el peso medio del hígado ajustado para las hembras fue de 0,59 g y para los machos de 0,51 g.

Como se apuntó anteriormente, la heterogeneidad de las pendientes en el análisis del peso de las gónadas determinó que no se pudiera construir un análisis de la covarianza completo para detectar los efectos del tiempo y el sexo. Así, se utilizó el modelo del análisis de la covarianza de un solo factor, el tiempo, para cada sexo dentro de cada población y de esta forma se logró la homogeneidad de las pendientes en todos los casos (Tabla 2.6). Los análisis muestran que sólo las hembras del arroyo de Bocaleones no presentaron variación del peso de sus gónadas durante el periodo de estudio. Las hembras del río Guadalete incrementaron el peso en el mes de Mayo, para descender gradualmente hasta Septiembre y volverlo a aumentar en Octubre (Figura 2.3a). Los machos de la misma población, aumentaron en Abril y Mayo, con un descenso progresivo hasta Agosto, y los machos del arroyo incrementaron el peso de sus gónadas en Mayo y Junio, disminuyéndolo al

TABLA 2.6. Resultados de la MANCOVA para el peso de la gónada de los ejemplares adultos de *B. sclateri* en cada una de las poblaciones. La longitud estándar fue utilizada como covariable. La variable dependiente y la covariable fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis del paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

Origen	Hembras			Machos		
	g.l.	F	P	g.l.	F	P
Diseño preliminar						
<i>río Guadalete</i>						
Longitud	1,39	129,67	<0,001	1,40	106,16	<0,001
Mes	10,39	0,96	0,492	10,40	1,55	0,158
Longitud x mes	10,39	0,99	0,469	10,40	1,65	0,127
<i>arroyo de Bocaleones</i>						
Longitud	1,46	142,81	<0,001	1,41	12,58	<0,001
Mes	11,46	2,77	0,008	11,41	1,02	0,445
Longitud x mes	11,46	1,75	0,092	11,41	0,99	0,468
Diseño final						
<i>río Guadalete</i>						
Regresión	1,49	288,19	<0,001	1,50	200,93	<0,001
Mes	10,49	5,68	<0,001	10,50	31,52	<0,001
<i>arroyo de Bocaleones</i>						
Regresión	1,57	128,70	<0,001	1,52	47,36	<0,001
Mes	11,57	0,50	0,897	11,52	5,73	<0,001

TABLA 2.7. Resultados del análisis univariante de la MANCOVA para los ejemplares juveniles de *B. sclateri* capturados en el río Guadalete. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. La longitud estándar fue utilizada como covariable. Las hipótesis del paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

	g.l.	Univariante							
		Peso total		Peso somático		Peso gonadal		Peso hepático	
		F	P	F	P	F	P	F	P
Diseño preliminar									
<i>hembras</i>									
Longitud	1,6	91,38	<0,001	76,46	<0,001	1,54	0,260	2,25	0,184
Mes	8,6	2,49	0,141	2,10	0,190	4,91	0,034	0,95	0,540
Longitud x mes	7,6	2,79	0,115	2,37	0,156	2,41	0,151	0,98	0,517
<i>machos</i>									
Longitud	1,3	130,08	0,001	115,99	0,002	1,67	0,284	0,71	0,459
Mes	6,3	5,48	0,095	4,20	0,070	6,98	0,070	4,17	0,134
Longitud x mes	4,3	3,60	0,160	4,04	0,061	7,98	0,061	5,42	0,098
Diseño final									
<i>hembras</i>									
Regresión	1,13	623,44	<0,001	511,29	<0,001	2,80	0,180	35,31	<0,001
Mes	8,13	8,13	0,099	2,14	0,107	1,81	0,163	2,93	0,041
<i>machos</i>									
Regresión	1,7	208,94	<0,001	174,17	<0,001	3,48	0,104	4,49	0,072
Mes	1,98	2,43	0,136	1,63	0,266	2,34	0,143	7,51	0,009

mes siguiente. Aunque no se pudo analizar las diferencias de peso gonadal entre los sexos para la totalidad del ciclo, si fue posible compararlos cuando estos fueron máximos durante el momento antes de la freza, Mayo en el río Guadalete y Junio en el arroyo de Bocaleones, en esos momentos existió homogeneidad de sus pendientes (río Guadalete: $F_{1,8}=0,04$, $P=0,853$; arroyo Bocaleones: $F_{1,5}=0,86$, $P=0,397$). Por un lado, en el río se obtuvieron diferencias en los pesos gonadales aunque no muy significativas ($F_{1,9}=0,51$, $P=0,492$); las hembras tuvieron pesos ajustados de 8,71 g y los machos de 7,28 g. Por otro lado, en el arroyo no hubo diferencias entre los pesos de las hembras ($\mu_{\text{adj}}=1,41$ g) y los machos ($\mu_{\text{adj}}=1,71$ g) ($F_{1,6}=0,08$, $P=0,793$).

El efecto de la covariable (regresión) fue muy significativa sobre la mayoría de las variables estudiadas, excepto para el peso de la gónada de los juveniles de ambos sexos y para el peso del hígado de los juveniles machos. En cuanto al peso de la gónada, parecen razonables estos resultados ya que las gónadas de los ejemplares juveniles son muy pequeñas y no incrementan el tamaño durante el crecimiento; además, tampoco presentan cambios durante el ciclo anual en ambos sexos (Tabla 2.7; Figura 2.4a). García-Berthou y Moreno-Amich (1993) explican que estos resultados encontrados con los ejemplares juveniles o inmaduros, demuestran que el uso del índice gonadosomático sería inapropiado, ya que el peso gonadal (\log_{10}) en estos casos es independiente de la longitud estándar (\log_{10}). También, estos resultados confirman que las edades y sobre todo los tamaños considerados como de primera maduración de *B. sclateri* en este estudio se aproximan mucho a la realidad. En la Tabla 2.7 también se muestra que los ejemplares juveniles de ambos sexos capturados en el río Guadalete, no cambian su peso total y somático en los meses que han sido capturados. Sólo sobre el peso del hígado se detectaron efecto significativo del tiempo y a partir de la variaciones de los dos sexos, podemos concluir que existieron dos periodos de incremento de peso hepático que fueron principios de primavera y otoño (Figura 2.4a, b).

Discusión

La comparación de los parámetros de la regresión entre el peso y la longitud, nos ha permitido eludir los grandes problemas estadísticos que conllevan los índices normalmente utilizados en estudios de crecimiento y reproducción. Pero, el uso de estos procedimientos hace necesario cuidar el muestreo y el procesamiento de los datos. Muchas veces el incumplimiento de algún requisito (normalidad, homecedasticidad, homogeneidad de las pendientes) para el uso de los análisis de la covarianza, no permite analizar al mismo tiempo los efectos de varios factores sobre las respuestas de las variables

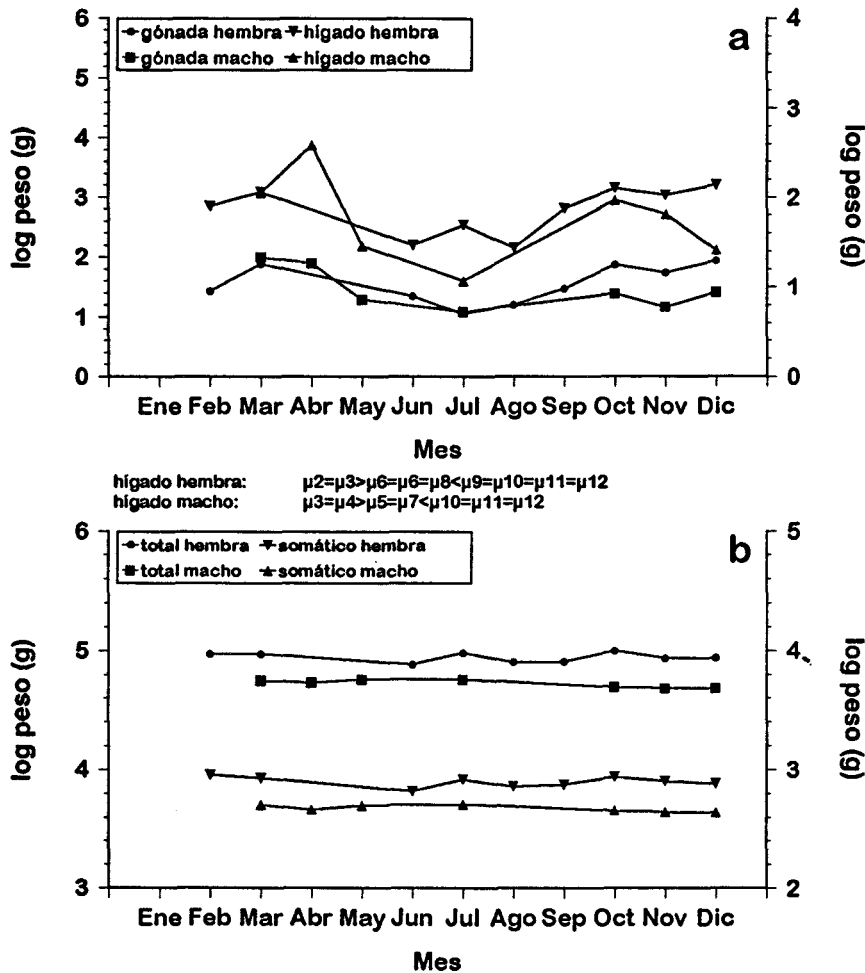


FIGURA 2.4. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable del peso del hígado y de la gónada (a), y del peso total y somático (b) transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares juveniles del río Guadalete. El peso del hígado y el peso total se ajustan al eje de la izquierda. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa, corresponden al orden del momento de muestreo: μ_1 es la media de Enero, μ_8 es la media de Agosto.

estudiadas. Ahí radica la principal característica y el valor de los diseños factoriales, investigar la influencia que pueden tener sobre las observaciones las interacciones entre dos o más factores (Riba 1990).

En este sentido, en nuestro estudio hemos podido conocer, en la mayoría de los casos, el efecto del sexo, del tiempo y de la interacción entre ambos factores. La excepción ha sido el peso de la gónada en los ejemplares adultos y la totalidad de las variables en el análisis de los juveniles. En el primer caso, como ha habido otras variables medidas sobre los mismos individuos que han cumplido el requisito previo para el análisis de la

covarianza (homogeneidad de las pendientes), no creemos que la imposibilidad de haber construido un diseño factorial para el peso gonadal sea debido a un problema en el diseño del muestreo. Es decir, no creemos que las muestras sean inadecuadas o haya habido grandes diferencias en el número de observaciones entre los grupos, más bien pensamos que sea debido a una posible diferencia en la dinámica de crecimiento entre los ovarios y los testículos. Por el contrario, en el análisis de los ejemplares juveniles, no sólo ha habido un tamaño de muestras muy distinto entre sexos, sino que no han existido observaciones en algunas combinaciones de los tratamientos (pe. en algunos meses).

El periodo de reproducción de la población del río Guadalete abarcó desde Febrero a Junio, con el momento de la freza posiblemente situado en el mes de Mayo. Estos periodos de reproducción y freza han sido similares a los encontrados en los estudios realizados por Encina (1991) y Rodríguez-Ruiz (1992) en el mismo río. Por el contrario, la reproducción más retrasada de la población del arroyo de Bocaleones, es la primera vez que se describe. También es importante, que independientemente del lugar, existió un desfase en el momento del máximo desarrollo gonadal entre los dos sexos. Los machos alcanzaron los máximos pesos de sus testículos un mes antes que las hembras el de sus ovarios. Este fenómeno podría estar relacionado con la conducta reproductora del barbo; Baras (1992) y Poncin (1993) han observado que existe una fuerte competencia a la hora de fertilizar los huevos por parte de los machos; estos necesitan estar antes en la zona de freza y preparados para cuando empiecen a llegar la primeras hembras.

La temperatura y el fotoperiodo son dos factores importantes que controlan el ciclo reproductivo en ciprínidos (Bye 1984; Mills 1991); por ejemplo en *Barbus barbus*, Poncin (1989) observó como el fotoperiodo no influye en el inicio del periodo de reproducción, sino en su duración y en su terminación. Por otro lado, también en *B. barbus* se ha comprobado que la temperatura óptima para la reproducción se sitúa por encima de los 14–15 °C (Hancock *et al.* 1976; Poncin 1988) y no sólo para la maduración de las gónadas, sino también para el desarrollo óptimo de los huevos (Absil 1989 en Baras 1992); Absil demuestra que para temperaturas inferiores a 14,7 °C el embrión del barbo no es capaz de desarrollarse. Las poblaciones de *B. sclateri* que hemos estudiado, han estado durante su periodo de reproducción en aguas con unas temperaturas de 18 °C. Estas temperaturas no superaron los 15 °C hasta el mes de Abril en el río Guadalete y hasta Mayo en el arroyo de Bocaleones, lo que explicaría el desfase en la reproducción que existe entre las dos poblaciones. Evidentemente la estrategia reproductora de la especie no sufre alteración, pero las diferencias entre las poblaciones se podrían explicar como un cambio en la táctica reproductora en respuesta a las variaciones ambientales (Wootton 1984).

Estas diferencias entre las dos poblaciones, no sólo se ve reflejado en el inicio del periodo de reproducción, sino también en la energía que dedica cada una a la formación de sus gónadas. Los resultados muestran que las dos poblaciones aumentan sus pesos gonadales a medida que crecen en longitud, aunque la del río Guadalete dedica mayor proporción de energía hacia sus gónadas que las del arroyo de Bocaleones (comparando individuos del mismo tamaño). Si partimos de la base de que por una parte, el barbo es una especie iterópara, que según Ware (1984) presentaría una mejor estrategia reproductora incrementando la fecundidad a una edad determinada por el aumento de la entrada de energía por el alimento; al contrario que una especie semépara, en la que la fecundidad a una edad determina está en función solamente del tamaño del pez a esa edad. Y por otra parte, en el arroyo de Bocaleones la disponibilidad de alimento es menor que en el río Guadalete (Prenda 1993), los individuos dedicarían menos energía hacia sus gónadas, para aumentar así su supervivencia y de esta forma tener más episodios reproductores a lo largo de su vida. Maximizar el número de reproducciones conlleva intercambios entre la reproducción del año y el mantenimiento, y la supervivencia para las reproducciones futuras (Stearns 1976; 1992; García *et al.* 1993).

No podemos dejar apartada la idea de que en el caso de los ovarios, los bajos pesos encontrados en el arroyo de Bocaleones, puede que hubieran sido el resultado de que esta población tuvo varias puestas durante la época de reproducción (Wootton 1990). Según Poncin (1988) en estudios sobre el barbo en cautividad y Baras (1992) en medio natural, el calor necesario para que una hembra pueda desarrollar otra tanda de huevos es de unos 253 días-grado. El agua del arroyo estuvo en los meses de reproducción a 18 °C, por lo que las hembras necesitarían aproximadamente 15 días para poder tener otra ovulación, es decir un tiempo inferior al muestreo mensual de nuestro estudio. Según los pesos de los testículos, estas ovulaciones debían haber tenido lugar en los meses de Mayo y Junio, ya que en Julio los machos del arroyo mostraron un descenso bastante fuerte del peso de sus gónadas. Aunque existe la posibilidad de que no hayamos detectado la maduración de los ovarios en ninguno de los muestreos mensuales, no nos parece que sea la explicación más adecuada. También los machos aunque mostraron variación significativa en los pesos de sus gónadas, éstos fueron mucho más bajos que los medidos en las gónadas de los machos del río Guadalete. Nosotros nos inclinamos a pensar, como se indicó en el párrafo anterior, que existe una menor inversión gonadal en la población del arroyo de Bocaleones, hipótesis que intentaremos probar posteriormente y en los siguientes capítulos.

La menor proporción de alimento disponible en el arroyo de Bocaleones que encontró Prenda (1993) y que hemos señalado anteriormente, puede estar relacionada con el menor peso encontrado en el

hígado de los peces capturados en el arroyo y su menor variación a lo largo del periodo de estudio. La valoración del tejido hepático ha sido utilizado como un indicador del crecimiento (Bulow *et al.* 1981; Adams y McLean 1985), de la entrada de alimento (Storebakken y Austreng 1987) o del almacenamiento de reservas de energía (lípidos y glucógeno) (Heindinger y Crawford 1977; Delahunty y de Vlaming 1980; Bastrop *et al.* 1992). El hígado juega un papel muy importante en el flujo de energía en los teleósteos (Jürss y Bittorf 1990), por lo que es esencial sobre todo en los momentos de mayor gasto energético como es la reproducción (Love 1980; Macfarlane *et al.* 1993). Se ha comprobado en este estudio, que en ambos sexos de la población del río Guadalete y en menor grado en los machos del arroyo de Bocaleones, el hígado juega un papel importante en la reproducción. En las hembras del río Guadalete, un mes antes de que las gónadas alcanzaran su máximo desarrollo, el pez almacenó reservas de energía en el hígado y a medida que el peso de la gónada aumentó, es decir los óvulos estaban siendo rellenos con vitelo, disminuyó el peso del hígado. Esta relación también fue encontrada por Lucena y Camacho (1978) en la misma especie y estaría relacionada con una mayor estimulación de la síntesis de proteína que ocurre en el hígado durante la vitelogenesis (Fauconneau *et al.* 1990). Además, las hembras mostraron mayores pesos de hígado que los machos de igual tamaño. En el caso de estos últimos, las reservas energéticas son utilizadas más para actividades relacionadas con la freza, que como se ha mencionado antes son muy importantes en los machos del barbo, pero que requerirían menor almacenamiento de energía.

Al estudiar la relación entre el peso corporal y la longitud del pez, se ha constatado que en cada una de las poblaciones los sexos han mostrado la misma forma entre ellos y la han mantenido igual durante todo el periodo de estudio. La *forma* no hay que confundirla con la *condición*, la definición clásica que dan Keys (1928), Hile (1936) y Le Cren (1951) (en Springer *et al.* 1990) es la de que *condición* se refiere a las diferencias en peso a una longitud dada y *forma*, la tasa a la cual el peso incrementa con la longitud. Esto es importante para entender nuestros resultados, ya que dos muestras que difieren en peso en todas sus longitudes pueden ser consideradas que tienen distinta condición. Por el contrario, dos muestras que difieren en forma no tienen porque considerarse que poseen diferencias en la condición, ya que éstas van a estar en función del rango de longitud que estemos comparando. Los resultados han mostrado que no hemos podido comparar la condición somática entre las dos poblaciones, porque éstas presentaban diferencias en sus formas. Pero hemos podido comparar los sexos en cada población porque mostraron la misma forma, es decir, pendientes iguales en la relación del peso total o somático con la longitud. Hemos detectado que los sexos no han

mostrado la misma condición entre ambos y que ésta cambió a lo largo del año en cada uno de ellos.

En las hembras capturadas en el río Guadalete (Figura 2.2a) el aumento del peso total en Mayo, incremento que no se detecta en el peso somático, podría indicar la maduración gonadal y la disminución del peso somático en verano, que no es acompañada por el peso total, podría indicar el desarrollo de grasa alrededor del tracto digestivo observado en esos meses. Pero esta disminución importante del peso somático en las hembras que ocurrió en verano y el gran aumento de peso que se produjo en otoño, fenómeno que no se detectó en los machos, determina una gran inversión somática por parte de éstas. Las hembras del río Guadalete llegan casi a doblar el peso somático a los machos, en Agosto el peso somático medio ajustado al tamaño de las hembras fue de 57,29 g y en Octubre de 108,13 g, mientras que en los machos el incremento fue insignificante, 77,25 g en Agosto y 78,75 g en Octubre. Estas grandes diferencias entre los sexos posiblemente estén relacionadas con el dimorfismo sexual en el crecimiento encontrado en esta especie y discutido anteriormente en el capítulo 1. Por el contrario, en el arroyo de Bocaleones no existió ningún periodo donde las hembras incrementaran tanto el peso, pero consiguieron un mayor crecimiento final teniendo una mejor condición a lo largo de todo el año.

Una cuestión importante es decidir cual de los dos pesos, el total o el somático reflejan mejor la condición del pez y sobre todo, para que queremos utilizar la condición. Desde hace ya muchos años, la condición ha sido usada en tres clases de análisis sobre la población (Weatherley 1972; Weatherley y Gill 1987): (i) en comparar poblaciones que viven bajo condiciones aparentemente similares, o aparentemente diferentes de alimento, temperatura, etc...; (ii) en determinar el momento y la duración de la maduración gonadal; y (iii) como un indicador del balance alimenticio durante alteraciones crónicas en la actividad o en los recursos tróficos. No hay que olvidar que el peso total es la suma del peso somático y de los órganos internos del pez, y por tanto, cambios en los pesos de las gónadas o del trato digestivo pueden influir en los resultados finales (Busacker *et al.* 1990). Por lo tanto, hay que tener mucha precaución en las valoraciones de los cambios en el peso total, sobre todo en estudios de crecimiento. Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto claramente, que si sólo hubiéramos tenido en cuenta el peso total en el caso de la población del río Guadalete, el aumento que se constató en Octubre lo hubiéramos achacado al aumento en el mismo mes del peso de las gónadas y del peso del hígado. Pero como se ha comprobado, fue originado por un importante crecimiento somático y no por las alteraciones en los depósitos de grasa, tamaño gonadal, alimentación, etc... Por el contrario, en la población del arroyo de Bocaleones al existir una mayor igualdad en los patrones de variación entre el peso total y somático,

debido a los bajos pesos hepáticos y gonadales, cualquiera de los dos nos hubiera servido para conocer los periodos de crecimiento de la población. Este fenómeno también ocurrió en los juveniles del río, en los cuales prácticamente no hubo diferencias en los patrones de variación de los dos pesos, aunque al igual que ocurrió en los adultos, el hígado presentó aumentos de peso en las épocas de mejor alimentación, primavera y otoño.

Como el barbo está ampliamente distribuido por toda la cuenca del río Guadalete y las poblaciones se encuentran diseminadas a lo largo de todo el río y de sus afluentes (Encina 1991; Rodríguez-Ruiz 1992; Prenda 1993; Mellado-Alvarez com. per.), al menos teóricamente, podemos asumir que las poblaciones estudiadas comparten el mismo genotipo. Como consecuencia de esto, las diferencias observadas en las variaciones del peso total, somático, gonadal y hepático se originarían más por la influencia ambiental. No creemos que esta influencia ambiental sea exclusiva de las diferencias en los regímenes térmicos o en el caudal que el río Guadalete y el arroyo de Bocaleones poseen. Pensamos que es probable que existan otros factores, igual de importantes que la temperatura y el caudal, que regulen la estrategia del barbo en estas dos poblaciones y que incluso la distinta amplitud térmica del agua entre los dos lugares no sea suficiente para explicar por sí sólo las diferencias encontradas. A esta misma conclusión, llegaron Rincón y Lobón-Cerviá (1989) al estudiar dos poblaciones de otro ciprínido, *Rutilus arcasii*, una de las cuales como en nuestro caso, se encontraba en un arroyo alimentado directamente por manantiales que mantenían también un flujo continuo de agua durante todo el año.

Si revisamos la literatura, se puede comprobar que existe una profunda influencia de la temperatura del agua, ya que ésta afecta a muchas funciones importantes del pez como son, la natación (Forstner y Wieser 1990), las tasas de digestión y asimilación del alimento (Elliot 1975a, b), el momento de la maduración de las gónadas y de la freza (Bye 1984). Pero es un error, como señalan Kock *et al.* (1992), aislar los efectos de la temperatura sobre el pez de los efectos de otros factores ambientales, que también varían estacionalmente o incluso de los programas internos determinados genéticamente, que permiten al organismo responder de diferentes formas a un mismo estímulo. En nuestras latitudes, los peces y en particular los ciprínidos, por un lado se adaptan a las condiciones extremas que prevalecen en invierno y verano, y por otro, los procesos de crecimiento, maduración de las gónadas y desarrollo embrionario se han ajustado a las mejores condiciones (particularmente la existencia de alimento) de otros momentos del año (Weiser 1991). Pero nosotros en este estudio aplicamos el término *condiciones ambientales* en el sentido etimológico, es decir, definimos lo *ambiental* como las circunstancias que rodean al individuo. Esto implica necesariamente considerar no sólo los factores abióticos sino los bióticos, los cuales también deben influir sobre las

respuestas que estamos encontrando en las dos poblaciones que han sido incluidas en nuestro estudio. Por ejemplo, en el río Guadalete existen otras dos especies aparte de *B. sclateri*, son *Leuciscus pyrenaicus* (cachuelo) y *Chodrostoma polylepis* (boga) (Encina 1991; Rodríguez-Ruiz 1992; Prenda 1993), esta composición taxonómica permanece en el arroyo de Bocaleones, donde además existen introducciones esporádicas de *Onchorhynchus mykiss* (trucha arco-iris) (Prenda 1993). Este último autor encontró que la abundancia (individuos/100 m²) de *B. sclateri* y de *Ch. polylepis* fue similar en las zonas estudiadas por nosotros del río Guadalete y del arroyo de Bocaleones, mientras que *L. pyrenaicus* es más abundante en la primera. A esto debemos añadir que en el río Guadalete, el barbo y la boga muestran una composición en su dieta muy parecida (Encina 1991). Si esta interacción entre ambas especies se mantiene en el arroyo de Bocaleones, donde además los recursos tróficos son escasos y por tanto pueden ser limitantes, es obvio que esta interacción sea un mecanismo más que influya sobre la reproducción, crecimiento y mortalidad de *B. sclateri*.

Contenido de los ácidos nucleicos en el músculo esquelético y en el hígado del Barbo (Ciprinidae: *Barbus sclateri*): Estudio de los efectos de la temperatura del agua en condiciones naturales

Introducción

Tres métodos básicos han sido usados para conocer si un pez está o no bien nutrido y por tanto determinar su crecimiento: el morfométrico, el histológico y el químico. Cada uno de ellos posee ciertos atributos y ventajas, pero como apuntan Robinson y Ware (1988), los métodos químicos son más sensibles; los cambios que se observan durante el crecimiento ocurrirían primero a nivel celular, después a nivel tisular y finalmente se verían reflejados a nivel orgánico. Pero, una de las mayores ventajas de los métodos químicos es que pueden estimar el crecimiento en el momento en el cual el pez es muestreado (Busacker *et al.* 1990) y por tanto, más preciso a la hora de determinar la influencia del ambiente sobre el crecimiento del individuo. Los métodos clásicos requieren cambios en el tamaño del pez, en la cantidad de material o en el contenido de energía a lo largo de un periodo de tiempo y reflejarían el crecimiento que ha tenido lugar en las semanas o meses anteriores a la captura.

Un método químico usado para medir el crecimiento es el contenido del ácido ribonucleico (ARN) respecto al contenido del ácido desoxirribonucleico (ADN) en distintos tejidos. El ADN es el constituyente básico de los cromosomas de la célula y como tal permanece relativamente constante, y esta cantidad aparentemente no se ve alterada por las condiciones ambientales (Dortch *et al.* 1983). El ARN es el organizador de la síntesis de proteínas y está presente en cantidades variables en el núcleo y en el citoplasma. Su concentración varía directamente con la síntesis proteínica, por

tanto, se esperaría que una mayor concentración en un tejido refleje un crecimiento rápido. La tasa ARN/ADN nos indicaría la cantidad de ARN por célula y es usualmente considerada un índice más preciso de la actividad de síntesis de proteínas que el ARN sólo, ya que no se ve afectada por las diferencias en el número de células (Bulow 1987).

Los efectos de la temperatura del agua sobre el contenido de los ácidos nucleicos en diferentes tejidos es de gran interés en los estudios de crecimiento en peces. En los trabajos de Goolish *et al.* (1984) con la carpa (*Cyprinus carpio*), y de Ferguson y Danzmann (1990) con la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) se muestra como los peces criados a temperaturas altas tienen valores más bajos en la concentración de ARN por peso de tejido y por unidad de ADN, comparando peces de igual tasa de crecimiento, que los que fueron aclimatados a temperaturas más frías. Este mismo fenómeno ocurre en el hígado, como por ejemplo revela Das (1967) en sus trabajos con el carpín dorado (*Carassius auratus*) o Jürss *et al.* (1987) con la trucha arco-iris. La recomendación más importante de estos autores es, que el uso de los ácidos nucleicos para estimar el crecimiento en peces muestreados en diferentes momentos del año o de diferentes hábitats, puede ser confundido por la heterogeneidad en la temperatura del agua.

Las investigaciones anteriores, que han intentado conocer los efectos de la temperatura sobre los ácidos nucleicos, se han desarrollado en ambientes artificiales, ya que se justificaba que los experimentos en laboratorio eran controlados y necesarios para interpretar los datos basados en poblaciones naturales, donde probablemente la temperatura variaba. Watt (1968) ya señalaba que en la naturaleza, un rango determinado de los valores de una variable independiente no produce un valor determinado de una variable dependiente, sino más bien un rango de valores, los cuales determinan una distribución de frecuencias de las respuestas. Esto evidentemente se produce porque la variable dependiente, puede estar asociada o correlacionada con muchas combinaciones de variables ambientales, por ejemplo en ríos, la anchura, la profundidad, el tipo de sustrato, rugosidad del fondo, porcentaje de refugio, la disponibilidad y calidad del alimento, la saturación de oxígeno, la contaminación. Además, en los sistemas fluviales, a diferencia del mar abierto, existen perturbaciones de efectos catastróficos (riadas) o graduales (sequías) que impiden, en algunos casos, aplicar de igual forma los resultados de laboratorio. Por ejemplo, Peterson y Brown-Peterson (1992) ponen de manifiesto como ciertas condiciones de estrés, propias de momentos de sequía en un río (baja concentración de oxígeno e infección bacteriana) influyen negativamente en el contenido de los ácidos nucleicos en el pez gato (*Ictalurus punctatus*). Por tanto, como proponen Waters y Erman (1990), es necesario diseñar estudios de campo, en nuestro caso en ríos, que nos proporcionen información básica para concebir y diseñar experimentos

controlados en el laboratorio, y nos ayuden a evaluar la relevancia de los resultados de esos experimentos controlados.

Nosotros investigamos la importancia de la temperatura sobre la concentración de los ácidos nucleicos en el músculo blanco y en el hígado del barbo (*Barbus sclateri*) en condiciones naturales. Para este propósito, diseñamos un estudio en dos ríos de la misma cuenca, donde las poblaciones no pudieran mezclarse, con diferentes regímenes térmicos y que esta diferencia de temperatura fuera bastante contrastada (en uno de ellos la temperatura fue prácticamente constante), a pesar de que ambos fueron muestreados en los mismos momentos del año.

Material y métodos

Las muestras de campo fueron tomadas en las dos estaciones de muestreo descritas en la Introducción de esta memoria. Los ejemplares maduros de *B. sclateri* fueron capturados con pesca eléctrica durante seis meses, desde Abril a Septiembre de 1992 (1 a 6 en el eje de abscisas en las gráficas), el mismo día en los dos ríos. Durante este periodo de tiempo la temperatura del agua, medida en el momento de la captura de los peces fue, para el río Guadalete de 15 °C (Abril), 18 °C (Mayo), 18 °C (Junio), 22 °C (Julio), 22 °C (Agosto) y 18 °C (Septiembre); mientras el arroyo Bocaleones mantuvo una temperatura de 18 °C durante los seis muestreos. Esta temperatura prácticamente constante es debido por un lado, a que gran parte de su caudal procede de unos manantiales próximos a la zona de estudio y por otro, que su pequeña cuenca de recepción presenta una cobertura vegetal arbórea de prácticamente el 100% (Prenda 1993).

La longitud estándar (precisión 0,1 mm) y el peso somático (sin vísceras; precisión 0,01 g) fueron registrados para cada pez. Las gónadas fueron examinadas macroscópicamente para determinar el sexo. El hígado y una porción de músculo epaxial izquierdo a nivel de la aleta dorsal, fueron separados para el posterior análisis de la concentración de ácidos nucleicos.

Análisis de los ácidos nucleicos

Las muestras de los tejidos (músculo blanco y hígado) fueron desengrasadas y secadas (DFFT, dry fat-free tissue) mediante dos extracciones de 12 horas con una solución de cloroformo-metanol al 2:1 y una de 24 horas con éter (Bulow 1970). Posteriormente fueron liofilizadas (Liofilizador Virtis FM-5 SL) y pulverizadas mediante nitrógeno líquido. El ADN y el ARN fueron extraídos juntos del DFFT con ácido tricloroacético (TCA) caliente por el método de Webb y Levy (1955), pero con una extracción previa con TCA frío (Bulow 1970). Esta modificación permite

retirar las posibles interferencias por sustancias cromógenas en la reacción del orcinol (ver más abajo). Siempre que fuera posible, 30 mg (DFFT) de hígado y 100 mg (DFFT) de músculo fueron usados en la extracción de los ácidos nucleicos. Las soluciones patrones de ADN y ARN y la de los reactivos fueron preparadas según Buckley y Bulow (1987) y guardadas en frío. La concentración de fósforo de los patrones de ADN y ARN se determinó por el método de Murphy y Riley (1962) modificado para el autoanalizador Technicon AAI por Technicon Industrial System, después de una digestión con persulfato (Prepas y Rigler 1982).

Para determinar la concentración de ARN-P se utilizó el método del orcinol de Lusena (1951), modificado por Schneider (1957) y descrito por Buckley y Bulow (1987). El método se basa en la formación, a 90 °C, de un compuesto verde entre el orcinol y el ARN hidrolizado en medio básico. La densidad óptica fue registrada a 660 nm con un espectrofotómetro HITACHI U-2000 contra un blanco y los valores de los ácidos nucleicos fueron determinados de la curva estándar. Los valores finales de μg ARN-P/ml fueron determinados restándoles el valor de ADN de cada muestra. Los valores finales de μg ARN/mg DFFT fueron determinados por la ecuación: μg ARN/mg = (μg ARN-P/ml \times 60)/mg DFFT usado en la extracción. La concentración de ADN-P fue determinada por el método de la difenilamina (Burton 1956) como lo describe Buckley y Bulow (1987). El método se basa en la reacción de la difenilamina con la 2-deoxirribosa del ADN en medio ácido que da lugar a la formación de un complejo de color violeta. La densidad óptica a 600 nm fue registrada contra un blanco y los valores de μg ADN-P/ml fueron determinados de la curva estándar. Los valores finales de μg ADN/mg DFFT fueron determinados por la ecuación: μg ADN/mg = (μg ADN-P/ml \times 60)/mg DFFT usado en la extracción.

Una explicación más detallada de los métodos de laboratorio en las determinaciones de los ácidos nucleicos se encuentra en el Apéndice.

Análisis estadísticos

Nosotros determinamos si los peces capturados en los dos ríos (factor 1) y en distintos momentos en el tiempo (factor 2), mostraron diferencias en sus pesos somáticos y en el del hígado, y en las concentraciones de los ácidos nucleicos, en cada uno de los sexos, machos y hembras, utilizando las técnicas del análisis de la covarianza (ANCOVA, SPSS[®]), para suprimir los posibles efectos del tamaño de los individuos. Se ha utilizado la longitud estándar como covariable, ya que describe mucho mejor el tamaño del pez. La separación de los sexos en los análisis se justifica porque, como señalan Wang *et al.* (1993), la tasa de crecimiento y la composición de los ácidos nucleicos cambian con la edad y con las características del ciclo de vida. Con anterioridad, se utilizó

el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad y el test de Barlett para la homogeneidad de las varianzas (Zar 1984). Estos mostraron que las distribuciones se alejaban de la normalidad, pero lo que era importante es que existió una ligera heterogeneidad en las varianzas, así que el ANCOVA fue aplicado sobre las variables y la covariable transformadas (logaritmo decimal), para las cuales las distribuciones fueron normales y las varianzas homogéneas. En ningún caso se detectó el rechazo a la hipótesis del paralelismo. Para comparar los lugares dentro de cada uno de los meses, se utilizó el análisis de los efectos simples, que permitió además entender mejor la interacción significativa entre los dos factores (Riba 1990). Este método utiliza la suma de los cuadrados del error para el total de la muestra, a la hora construir cada término de la F . Un nivel de significación del 0,05 fue usado para todos los análisis.

Resultados

Globalmente los pesos somáticos de las hembras, una vez que se eliminó el efecto del tamaño del pez, fueron significativamente iguales ($F_{1,55}=2,57$, $P=0,114$) en los dos ríos y variaron durante el periodo de estudio ($F_{5,55}=3,17$, $P=0,013$), aunque la interacción significativa de los dos factores ($F_{5,55}=3,22$, $P=0,012$) indica que el patrón de variación fue distinto. Este comportamiento diferente es debido a que, como podemos observar en la Figura 3.1a, las hembras capturadas en el río Guadalete tuvieron significativamente más peso en el primer mes y menos en el quinto mes que las capturadas en el arroyo de Bocaleones. En el caso de los machos, no existe interacción significativa ($F_{5,48}=1,88$, $P=0,115$) y esto facilita la interpretación de los efectos principales. El efecto del lugar es significativo para el peso somático ($F_{1,48}=10,36$, $P=0,002$), siendo globalmente los capturados en río Guadalete más pesados que los del arroyo de Bocaleones. Por el contrario, no existe efecto del tiempo ($F_{5,48}=1,98$, $P=0,097$), aunque si analizamos las diferencias mes a mes (Figura 3.1b), los machos capturados en el arroyo de Bocaleones aumentaron su peso en el segundo mes y los capturados en el río Guadalete lo aumentaron en el cuarto y lo disminuyeron en el quinto.

En los machos y las hembras, la concentración de ADN del músculo varió significativamente a lo largo del tiempo en ambos ríos (machos: $F_{5,48}=4,34$, $P=0,002$; hembras: $F_{5,55}=13,83$, $P<0,0005$), aunque el patrón dentro de cada sexo varió de un lugar a otro (machos: $F_{5,48}=4,43$, $P=0,002$; hembras: $F_{5,55}=3,86$, $P=0,005$). Esto se produjo porque, aunque en las hembras hubo diferencias entre los dos ríos ($F_{1,55}=6,50$, $P=0,014$), éstas se produjeron en el primer y quinto mes (Figura 3.2a), y aunque en los machos globalmente no

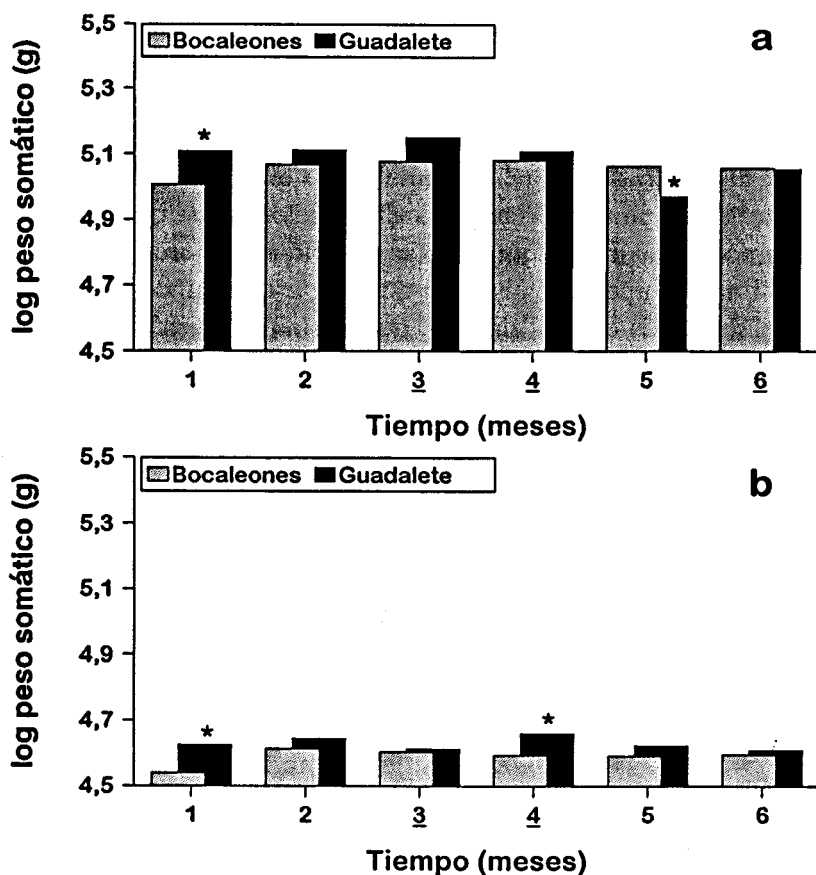


FIGURA 3.1. Medias ajustadas al efecto de la covariable, de los pesos somáticos (transformados mediante logaritmo decimal), para las hembras (a) y los machos (b) de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura del agua fue la misma.

hubo diferencias entre los capturados en el río de los capturados en el arroyo ($F_{1,48}=0,18$, $P=0,670$), si las hubo en el tercer y quinto mes (Figura 3.3a). En el caso de la concentración de ARN, la interacción encontrada en ambos sexos (machos: $F_{5,48}=6,33$, $P<0,0005$; hembras: $F_{5,55}=3,85$, $P=0,005$) impide la valoración por separado de los factores. En las hembras, aunque no hubo diferencias de una forma general entre las dos poblaciones ($F_{1,55}=2,81$, $P=0,099$), las capturadas en el río Guadalete tuvieron concentraciones mayores que las capturadas en el arroyo de Bocaleones (Figura 3.2b) en los dos primeros meses. En cuanto a los machos, hubo diferencias entre las dos poblaciones ($F_{1,48}=4,35$, $P=0,042$) debido a que los capturados en el arroyo de Bocaleones tuvieron concentraciones de ARN significativamente mayores en los dos últimos meses (Figura 3.3b). Por último, la concentración de ARN

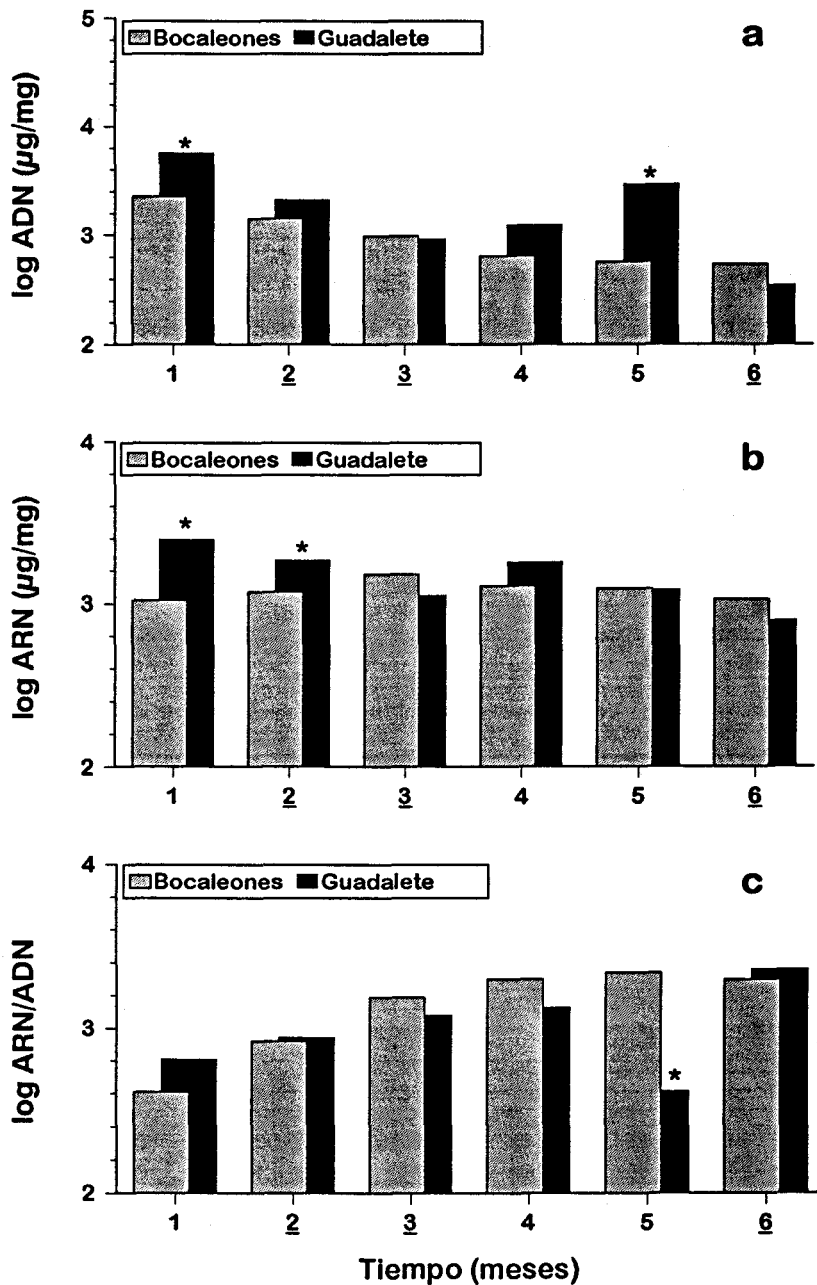


FIGURA 3.2. Medias ajustadas, al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y de la tasa de ARN/ADN (c) del músculo blanco (transformados mediante logaritmo decimal), para las hembras de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura fue la misma.

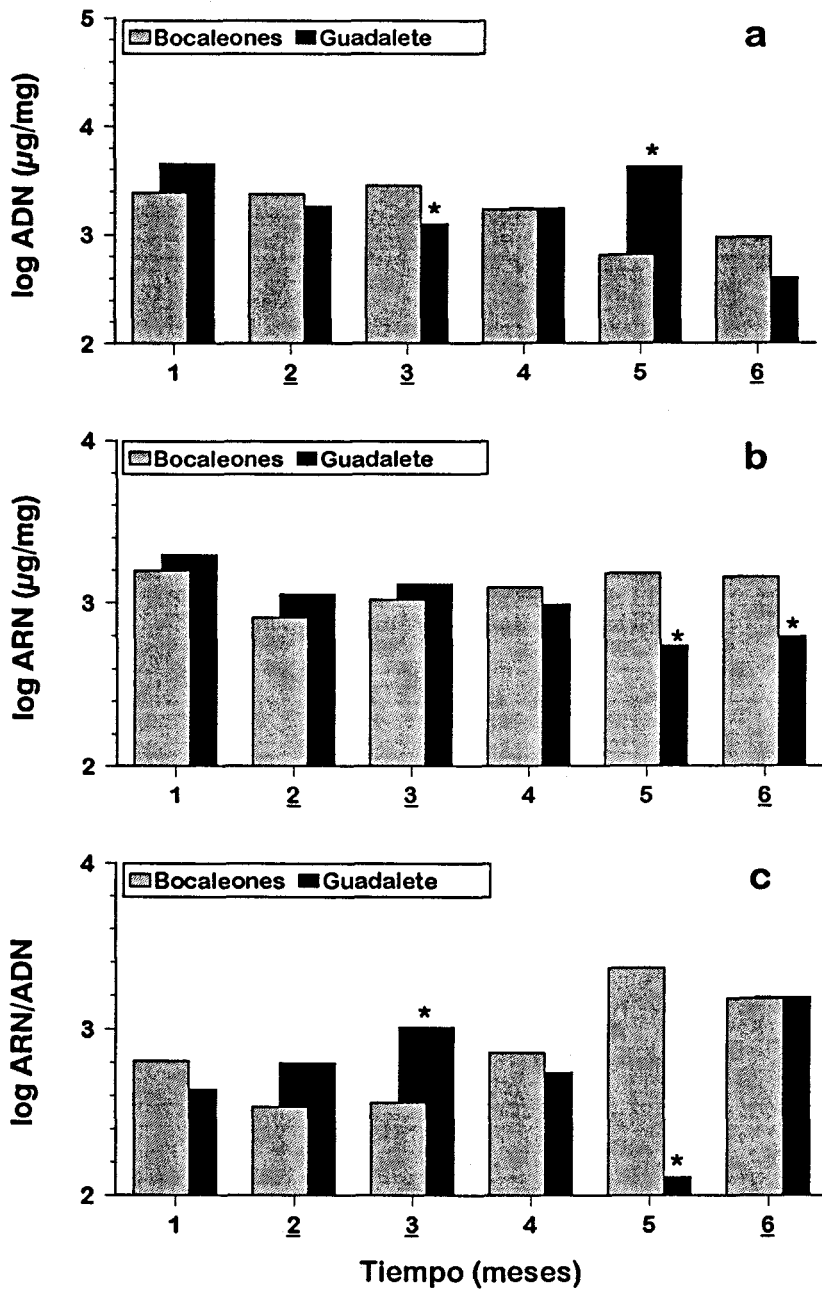


FIGURA 3.3. Medias ajustadas, al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y de la tasa de ARN/ADN (c) del músculo blanco (transformados mediante logaritmo decimal), para los machos de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura fue la misma.

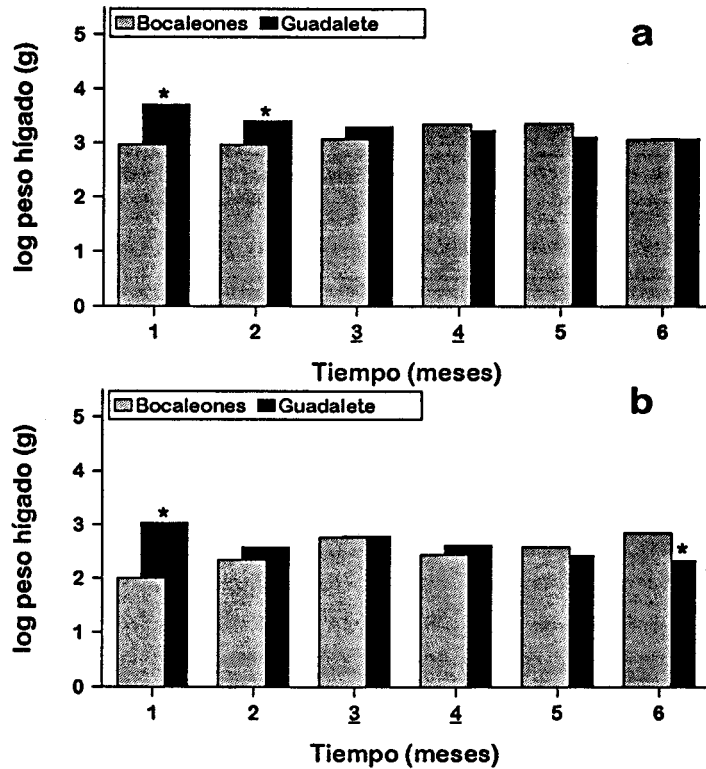


FIGURA 3.4. Medias ajustadas, al efecto de la covariable, de los pesos del hígado (transformados mediante logaritmo decimal), para las hembras (a) y los machos (b) de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura fue la misma.

del músculo por célula (ARN/ADN) también varió a lo largo del periodo de estudio en los dos sexos (machos: $F_{5,48}=8,27$, $P<0,0005$; hembras: $F_{5,55}=4,28$, $P=0,002$) y globalmente no hubo diferencias entre las dos poblaciones, tanto en machos ($F_{1,48}=2,01$, $P=0,162$) como en hembras ($F_{1,55}=2,49$, $P=0,120$). De nuevo existe interacción significativa entre los dos factores (machos: $F_{5,48}=8,27$, $P<0,0005$; hembras: $F_{5,55}=4,28$, $P=0,002$), debido a que en el caso las hembras, existen diferencias entre las dos poblaciones solamente en el quinto mes (Figura 3.2c), mientras que en los machos las diferencias estuvieron en el tercer y quinto mes (Figura 3.3c).

El análisis de la varianza del peso del hígado en las hembras, utilizando la longitud estándar como covariable, muestra que existe una fuerte interacción entre los dos factores ($F_{5,55}=6,18$, $P=0,0001$), un efecto significativo del lugar ($F_{1,55}=6,16$, $P=0,016$) y sin embargo no hubo efecto del factor tiempo ($F_{5,55}=1,52$, $P=0,198$). La fuerte interacción es debida, como se observa en la Figura 3.4a, a que en los dos primeros meses las

hembras capturadas en el río Guadalete tuvieron pesos del hígado muy superiores a las capturadas en el arroyo de Bocaleones, mientras que no hubo diferencias en el resto del periodo de estudio. En el caso de los machos, la interpretación del análisis es parecido, aunque los resultados muestran que no hubo efecto del lugar ($F_{1,48}=2,01$, $P=0,162$), ni del tiempo ($F_{5,55}=1,17$, $P=0,335$), la interacción significativa ($F_{5,48}=5,71$, $P=0,0003$) nos indica que el efecto de los factores principales no se puede generalizar. Así, si observamos la Figura 3.4b, durante la mayoría de los meses no hubo diferencias entre los pesos del hígado medidos entre los machos del río Guadalete y del arroyo de Bocaleones, pero en el primer mes y en el último si se encontraron diferencias muy significativas entre las dos poblaciones.

La concentración de ADN en el hígado de las hembras, no fue significativamente distinta ($F_{1,55}=3,45$, $P=0,069$) entre las capturadas en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones, además hubo una variación significativa durante el periodo de estudio ($F_{5,55}=6,12$, $P<0,0005$) y las dos poblaciones tuvieron el mismo patrón de variación ($F_{5,55}=0,58$, $P=0,712$; Figura 3.5a). Los machos también presentaron diferencias significativas a lo largo del estudio, en la concentración de ADN en el hígado ($F_{5,48}=5,01$, $P=0,001$), pero con una interacción marginalmente significativa ($F_{5,48}=2,39$, $P=0,059$). Esto hace que aunque globalmente, los machos capturados en el arroyo de Bocaleones presentaron concentraciones mayores que los capturados en el río Guadalete ($F_{1,48}=13,80$, $P=0,001$), sólo fueran encontradas diferencias en el primer y quinto mes (Figura 3.6a).

La concentración de ARN en el hígado de las hembras y de los machos, presentó patrones de variación muy distintos (machos: $F_{5,48}=6,19$, $P<0,0005$; hembras: $F_{5,55}=5,04$, $P=0,001$) entre las dos poblaciones, como se puede observar en la Figura 3.5b y 3.6b. Esto determina, que aunque en el análisis general la concentración no fue diferente entre las dos poblaciones (machos: $F_{1,48}=3,66$, $P=0,061$; hembras: $F_{1,55}=1,19$, $P=0,279$), en el análisis mes a mes, las hembras mostraron diferencias en el segundo y en el último mes, y los machos en los dos últimos meses.

La concentración de ARN en el hígado por célula (tasa ARN/ADN) de las hembras mostraron resultados parecidos a los encontrados cuando se analizó el ARN por miligramo de tejido. El patrón de variación fue distinto entre las capturadas en el río Guadalete y las del arroyo Bocaleones ($F_{5,55}=3,61$, $P=0,007$); no hubo diferencias globales entre ambas poblaciones ($F_{1,55}=10,62$, $P=0,120$) y en el análisis pormenorizado mes a mes, sólo en el segundo mes se encontraron diferencias significativas (Figura 3.5c). La tasa de ARN/ADN en el hígado de los machos cambió significativamente a lo largo del periodo de estudio ($F_{5,48}=4,15$, $P=0,003$), con el mismo patrón de variación en las dos poblaciones ($F_{1,100}=1,86$, $P=0,119$) y fue significativamente mayor en los capturados en el río Guadalete ($F_{1,48}=4,15$,

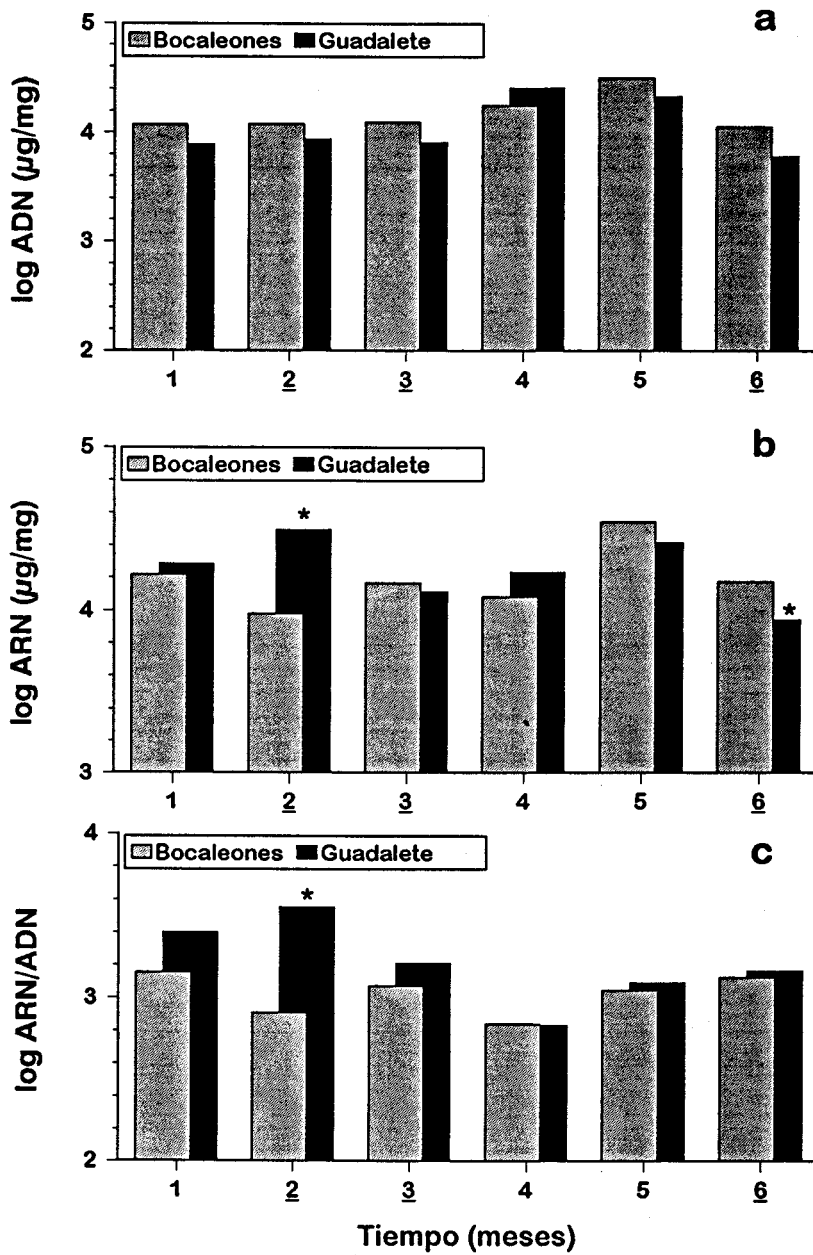


FIGURA 3.5. Medias ajustadas, al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y de la tasa de ARN/ADN (c) del hígado (transformados mediante logaritmo decimal), para las hembras de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura fue la misma.

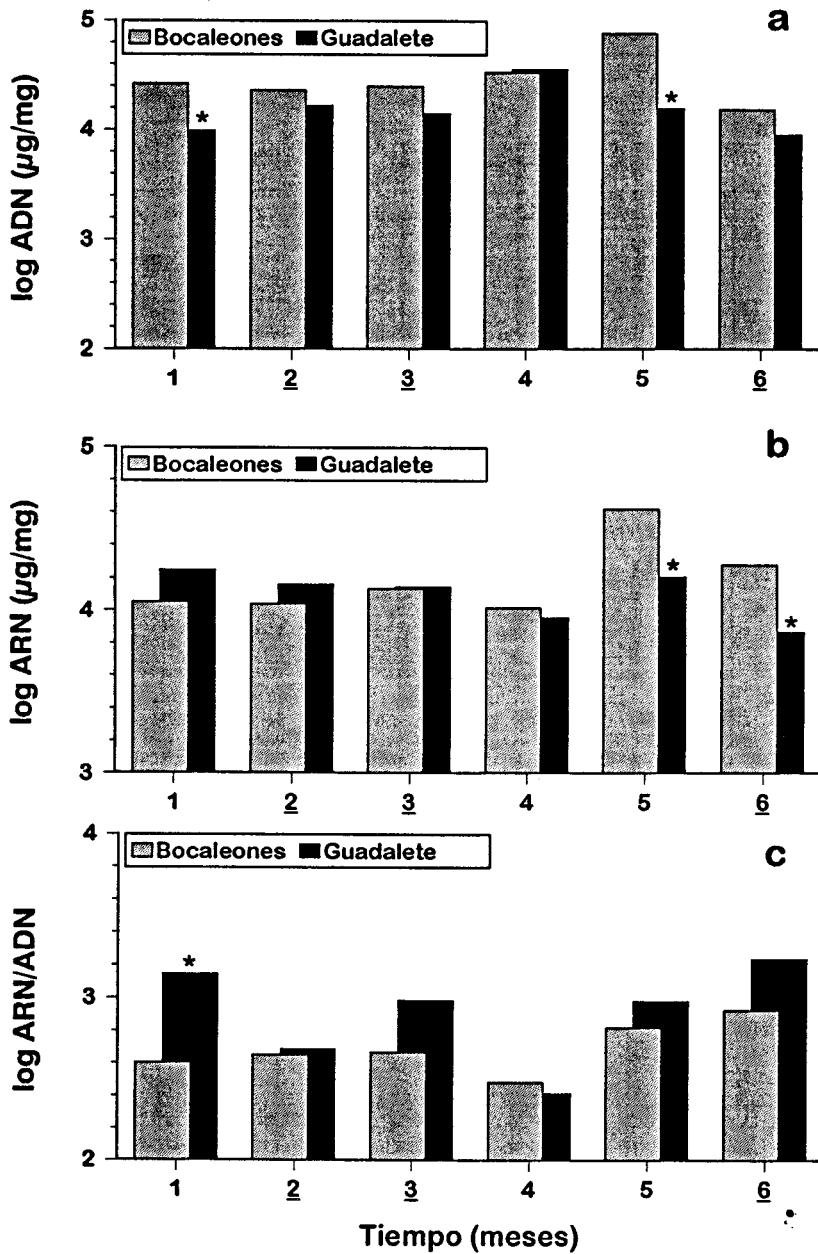


FIGURA 3.6. Medias ajustadas, al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y de la tasa de ARN/ADN (c) del hígado (transformados mediante logaritmo decimal), para los machos de *B. sclateri* durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la otra población dentro del mes ($P \leq 0,05$). En cada gráfica en los meses subrayados la temperatura fue la misma.

$P=0,045$). A pesar de que mostraron el mismo patrón, el análisis mes a mes detectó diferencia en el primer mes, mientras que en el resto del periodo la tasa fue similar en las dos poblaciones (Figura 3.6c).

Discusión

La concentración de ADN en el músculo blanco se incrementó claramente en el río Guadalete del cuarto al quinto mes, en ambos sexos y disminuyó sólo en los machos en el tercer mes. Love (1970) argumenta que, asumiendo que la concentración de ADN en el músculo blanco es constante por célula, un incremento de la concentración de ADN por peso, es el resultado de un aumento en el número de células. Este aumento es producido por una reducción del volumen celular (disminución del diámetro medio), acompañado por un incremento del fluido extracelular. Esta deplección del músculo puede ser debido, como indican Bulow *et al.* (1981), a procesos de maduración, freza, y a altos requerimientos energéticos para el mantenimiento asociado con las altas temperaturas del verano. En nuestro estudio, los machos en su tercer mes pueden estar afectados por la actividad reproductora, y ambos sexos en el quinto mes, Agosto, por las condiciones más desfavorables del río Guadalete.

La mayor tasa de ARN/ADN en el músculo blanco medida en el arroyo Bocaleones en el quinto mes, con una temperatura inferior a la del río Guadalete en 4 °C, no se debe a un aumento de la concentración de ARN/tejido, que sería lo esperado por la compensación de la temperatura, sino por el aumento considerable del número de células en los ejemplares del río Guadalete. Esto se ve corroborado, porque, por una parte la misma desigualdad debería haber sido encontrada el mes anterior, donde la diferencia de temperatura fue la misma y por otra, se encontró la misma diferencia en la concentración de ARN/tejido de los machos en el último mes a pesar de que la temperatura del agua fue la misma (18 °C). En las hembras, la disminución de la tasa de ARN/ADN en el río Guadalete (mejor expresado que el aumento de la tasa en el arroyo Bocaleones) durante el quinto mes, estuvo relacionada con una disminución en ese mes del peso somático relativo. En el caso de los machos, en el tercer mes hubo otra diferencia en la tasa de ARN/ADN, que en este caso tampoco se puede relacionar directamente por la compensación de la temperatura, que en los dos ríos fue la misma, sino más bien por el aumento al mes siguiente del peso somático. Este desfase encontrado en nuestros resultados muestra que la respuesta del peso somático puede variar con la encontrada en las medidas bioquímicas, sobre todo cuando la tasa de crecimiento se incrementa. La menor sensibilidad de los parámetros gravimétricos (pe. peso somático relativo) a los

cambios en el crecimiento frente a las medidas bioquímicas, fue también puesto de manifiesto por Mustafa *et al.* (1991), que concluyeron que la tasa de ARN/ADN muestra una respuesta más rápida a la variación de los factores ambientales. Esta consideración es importante tenerla en cuenta, porque de esta forma podemos comprender mejor los resultados y valorar la importancia real de la compensación de la temperatura, una vez eliminado el efecto del crecimiento, el cual en estudios de campo rutinarios no se puede controlar como en un diseño experimental de laboratorio.

Los ácidos nucleicos en el hígado son más difíciles de interpretar cuando lo relacionamos con el crecimiento somático, ya que como se indicó anteriormente pueden reflejar crecimientos que no están relacionados con él, como la maduración de las gónadas. Lo que si se ha demostrado, podemos citar el estudio de Bastrop *et al.* (1991), es que la tasa de ARN/ADN mide la actividad metabólica del hígado, y por tanto la actividad general del pez. En nuestro estudio para cada uno de los sexos, sólo en un mes se encontraron diferencias significativas entre las dos poblaciones en la tasa de ARN/ADN. En los machos, la mayor tasa observada en el primer mes, en los capturados en el río Guadalete, se debió más, al número de células que a una mayor concentración de ARN/tejido, que sería lo esperado por la compensación de la temperatura. La mayor tasa observada en las hembras del río Guadalete en el segundo mes, se debió más, por el contrario, a un aumento de la concentración de ARN/tejido, ya que no hubo diferencias en la concentración de ADN. El mayor contenido de ARN por peso de hígado tampoco sería debido principalmente a la temperatura, porque en este mes no hay diferencias entre los dos ríos. Las diferencias encontradas en la concentración de ADN por peso de hígado, son también debidas más a la actividad metabólica del hígado que al efecto de la temperatura directamente. Así en los machos, la diferencia encontrada en la población a 15 °C comparada con la que estuvo a 18 °C (primer mes), coincide con la misma diferencia en el peso del hígado, y atendiendo a las indicaciones de Jürss y Bittorf (1990), indicaría un mayor almacenamiento de energía en los machos del río Guadalete. En las hembras, los únicos meses donde la concentración de ARN por mg de hígado son distintas entre las dos poblaciones, son aquellos donde las temperaturas son iguales, por lo que las diferencias estarían más relacionadas con aspectos de nutrición. Igual que pasaba con los machos, en el primer mes donde la temperatura es diferente, los pesos de los hígados en las hembras capturadas en el río Guadalete son mayores, pero a diferencia de ellos la concentración de ADN es igual. Según Luquet y Hannequart (1971), el incremento del tamaño del hígado se debe tanto a la hipertrofia de los hepatocitos como, al incremento del número de células hepáticas. La concentración de ADN en el hígado no sólo es igual en el primer mes, sino durante todo el estudio y el peso del hígado sólo cambió en las hembras

capturadas en el río Guadalete, por lo que las diferencias en los pesos se debe más a una hiperplasia hepática (aumento del número de hepatocitos) que al aumento del tamaño celular. Pero es importante aclarar que, como demuestran los resultados de Bastrop *et al.* (1992), la cantidad de ARN por célula puede ser independiente del peso relativo del hígado, y por tanto ser utilizado para conocer la actividad metabólica general del pez.

Aunque el papel de la temperatura sobre la relación entre los ácidos nucleicos y el crecimiento es fácil de estimar en el laboratorio, es mucho más complicado valorar su importancia en condiciones de campo, ya que otros factores ambientales (pH, velocidad de corriente, turbidez, calidad y disponibilidad de alimentos etc.), ausentes en diseños experimentales, intervienen en la concentración final de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el quinto mes de nuestro estudio, Agosto, donde se han encontrado las diferencias más importante entre las dos poblaciones, el río Guadalete presentó unas condiciones ambientales estresantes, formación de pozas aisladas (disminución del espacio), aumento de la temperatura y la turbidez, y aunque no se analizó, las concentraciones de nitratos y fosfatos son altas en esta zona (Rodríguez-Ruiz 1992). Por el contrario, el arroyo de Bocaleones mostró durante el periodo de estudio, una menor temperatura, el caudal descendió pero sin llegar a cortarse, no disminuyó la transparencia del agua, y aunque tampoco se analizó, la concentración de nutrientes es indetectable Prenda (1993).

Por último, nosotros estamos de acuerdo con Bergeron y Boulhic (1994) de que habría que reconsiderar el uso de la tasa de ARN/ADN en el músculo blanco como un índice de crecimiento, ya que pensamos que los ácidos nucleicos reflejarían más la inversión somática. En otras palabras, un aumento de la tasa de ARN/ADN no tiene porque indicar un crecimiento neto (en peso o longitud), pero sí una mayor inversión en energía. Así, los resultados de Goolish *et al.* (1984) y de Ferguson y Danzmann (1990) podrían interpretarse en el sentido de que, a temperaturas más frías la concentración de ácidos nucleicos indicarían una mayor inversión en energía para compensar el descenso térmico y mantener la misma tasa de crecimiento, y eso si que es importante conocerlo para valorar el intercambio entre crecimiento, mantenimiento y reproducción. De todas formas, Wieser (1992) señala que principalmente (quizás incluso exclusivamente), las enzimas asociadas al metabolismo aerobio (músculo rojo), muestran una conducta de compensación a temperaturas frías; mientras que esta aclimatación parece que no tiene efecto sobre las enzimas del metabolismo anaerobio (músculo blanco). Además, en la naturaleza, como señala Wootton (1990), puede haber una termoregulación por cambio en la conducta, de tal forma que el pez se mueva a ambientes más deseables, lo cual no se puede producir en el laboratorio, porque teóricamente la temperatura es homogénea en todo el

volumen de agua. Baras (1992) encontró como *Barbus barbus* es capaz de buscar lo que él denomina *confort térmico*, mediante mecanismos de compensación consistentes en una mejor gestión del tiempo y del espacio, y en cambiar los patrones de conducta diarios dependiendo de la temperatura del río a lo largo del año. Por tanto, en los sistemas naturales y en algunos momentos, sólo las respuestas en la conducta son suficientes para obviar el cambio en la temperatura y esto no tiene porque influir en la concentración de ácidos nucleicos en el músculo blanco por si mismo. Sängner (1993) además señala que en la aclimatación a temperaturas frías, desde un punto de vista de la locomoción, se producen más cambios a nivel del músculo rojo (aerobiosis) que del músculo blanco (anaerobiosis), revirtiendo al final en un ahorro de energía.

De este modo, la aclimatación a regímenes de temperatura contralados en laboratorio, puede sacar a la luz elementos de la capacidad metabólica de los tejidos y de las células, que pueden ser suprimidos, compensados o alterados en peces que viven en condiciones naturales (Koch *et. al.* 1992). Por ejemplo, Kent *et al.* (1992) compararon los ácidos nucleicos del hígado en *Ictalurus punctatus* aclimatados artificialmente en laboratorio con otros que vivían en condiciones naturales; estos autores llegaron a la conclusión de que, si bien la temperatura jugaba un papel importante en las alteraciones observadas en la composición de los ácidos nucleicos y a menudo reflejaban patrones similares a aquellos observados en la aclimatación en laboratorio, había otros factores, particularmente la deficiencia en la dieta durante las temperaturas extremas, que modificaban substancialmente los patrones de variación observados en la naturaleza.

Pero independientemente de la influencia de otros factores, como señala Weiser (1991, 1992) las respuestas de ciertas variables al cambio de temperatura son distintas dependiendo de si la especie es, por ejemplo, euriterma caliente como la carpa común, o estenoterma fría como la trucha arco-iris, o incluso como el barbo que es mesoterma. Weiser (1991) señala que para *Rutilus rutilus*, que también sería una especie mesoterma, no se ha podido demostrar la compensación de la temperatura en el consumo de oxígeno; incluso Koch y Wieser (1983), y Koch *et. al.* (1992) para esta misma especie, llegan a la conclusión de que a nivel del animal como un todo, el pez se comporta como un poiquiloterma no compensador estricto (non-compensating poikilotherm), y las relaciones aparentemente complejas con la temperatura se resuelven como un simple patrón al considerar los aspectos temporales de la actividad reproductora de la población.

En resumen, las conclusiones de otros autores y las nuestras de este capítulo, nos permitirá comprender mejor los resultados del siguiente, y valorar con mayor certeza el uso de los ácidos nucleicos en la ecología de peces.

Variación temporal del contenido de los ácidos nucleicos en el músculo, hígado y gónada en dos poblaciones de Barbo (Ciprinidae: *Barbus sclateri*)

Introducción

Las medidas cuantitativas de los ácidos nucleicos en el músculo blanco, han sido usadas para estimar las tasas de crecimiento en peces (para una revisión, ver Bulow 1987). En general, tanto la concentración de ARN como la tasa de ARN/ADN están positivamente correlacionadas con el crecimiento. Sin embargo, la tasa de ARN/ADN se ha considerado, desde hace tiempo, como un índice más preciso que la concentración de ARN sólo (Haines 1973), ya que la tasa es independiente del número de células o del tamaño de la muestra de tejido. La concentración de ácidos nucleicos en el hígado no está tan relacionada con el crecimiento somático, debido a que su principal función es la de regular el metabolismo energético general; el contenido de ácidos nucleicos en él puede reflejar crecimientos orgánicos que no están relacionados con el somático, por ejemplo el desarrollo y maduración de las gónadas (Fauconneau *et al.* 1990).

En 1954, Gale y Folks presentaron la primera prueba de la relación entre el ARN y la síntesis de proteína. En los trabajos de Nasiri (1972) y Sable (1974), se encuentra una revisión exhaustiva de la literatura referente a estudios sobre ácidos nucleicos en diferentes tejidos y grupos animales. En ellos se señalan que la cantidad de ADN por núcleo es constante no sólo en el tejido somático, sino en otros órganos (hígado, bazo, riñón, etc.). También hacen referencia a que se ha encontrado abundante ARN en tejidos con alta

actividad fisiológica (crecimiento o secreción), en organismos con altas tasas de multiplicación (bacterias, levaduras), o células con altas tasas de síntesis de proteínas (glándula productora de seda en los gusanos de seda). A partir de aquí son muchos los trabajos en los que encuentran correlación entre la concentración de los ácidos nucleicos y el crecimiento (ver revisión de Bulow 1987, Mustafa *et al.* 1991, Bastrop *et al.* 1992, Wang *et al.* 1993).

Los cambios en las condiciones ambientales que causan descenso en el crecimiento en peces, también altera la razón ARN/ADN. Ésta desciende, por ejemplo, como resultado de la exposición a varios tóxicos en el foxino, *Pimephales promelas* (Barron y Adelman 1984), o por estrés nutrimental en la trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (Jürss *et al.* 1987) o en la carpa común, *Cyprinus carpio* (Bastrop *et al.* 1991), o incluso a ambientes degradados (baja concentración de oxígeno e infección bacteriana) en el pez gato, *Ictalurus punctatus* (Peterson y Brown-Peterson 1992).

Dentro de este capítulo, examinamos los ácidos nucleicos de diferentes tejidos durante un ciclo anual, de dos poblaciones de *B. sclateri* aisladas entre sí. También se comprueban las influencias del tamaño, el estado de madurez, el sexo y la edad sobre los ácidos nucleicos. Y por último, se valora la utilidad de esta técnica como herramienta para determinar la distribución de los recursos energéticos a corto plazo en las poblaciones naturales de esta especie y por tanto, precisar de una manera más fiable la posible influencia sobre el crecimiento y reproducción de las condiciones ambientales a las que está sujeta el pez.

Material y métodos

Los ejemplares de *B. sclateri* fueron recolectados desde Enero a Diciembre de 1992, en las estaciones de muestreo descritas en la Introducción de esta memoria. La longitud total (precisión 0,1 mm), la longitud estándar (precisión 0,1 mm), el peso total (precisión 0,01 g) y el peso somático (sin vísceras; precisión 0,01 g) fueron registrados para cada pez. Las gónadas fueron examinadas macroscópicamente para determinar el sexo. Para separar los ejemplares juveniles de los adultos, se siguió el mismo procedimiento descrito en el capítulo 2. El hígado, la gónada y una porción de músculo epaxial izquierdo a nivel de la aleta dorsal, fueron separados para el posterior análisis de la concentración de ácidos nucleicos, según se describe en el capítulo 3. El músculo fue liberado de la mayor cantidad de tejido conjuntivo posible. Para estimar la edad de cada ejemplar se utilizó la metodología descrita en el capítulo 1.

Análisis estadísticos

Como se trabajó con un amplio rango de tallas, se ha utilizado el análisis de la covarianza (ANCOVA) para evaluar los efectos, independientemente de cualquier diferencia en el tamaño de los individuos, del ambiente (mes) y del sexo en las concentraciones de los ácidos nucleicos. El efecto del mes y del sexo se han considerado fijos, ya que se estaba interesado en evaluar las diferencias potenciales entre distintos ambientes y entre los sexos. Cuando el efecto de interacción entre ambos factores fue significativo, la interpretación de esta interacción se hizo a partir de un análisis de los efectos simples, de esta forma las sumas de cuadrados relativas a las componentes simples del factor tiempo, coincidirán con las sumas de cuadrados que en el modelo original se atribuyen al factor tiempo y al factor interacción (Riba 1990). En nuestro caso, se analizó el efecto del tiempo dentro de cada uno de los niveles del factor sexo.

Para los casos en los que existió diferencias significativas, tanto en el modelo original como en el de efectos simples, la variación temporal fue descrita usando las medias predichas por el modelo ajustadas para el efecto de la covariable. Además, las diferencias entre estas estimas ajustadas fueron valoradas con la comparación univariante de Bonferroni por el método de repetición; de esta forma se compara la media ajustada de un mes con la media del mes anterior. Esto nos permitió, como en el capítulo 2, la interpretación usualmente subjetiva de las variaciones temporales de las variables estudiadas, sobre la base de la teoría estadística (García-Berthou y Moreno-Amich 1993). El logaritmo decimal de la longitud estándar fue utilizado como covariable y las demás variables fueron también transformadas mediante logaritmo decimal, ya que de esta forma se estabilizaba la varianza. Un nivel de significación del 0,05 fue aceptado para todos los análisis, éstos fueron realizados mediante el paquete estadístico SPSS®.

Resultados

Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en el músculo blanco

Si tenemos en cuenta el efecto de la variación ambiental (variación mensual) y del sexo sobre el ADN de las dos poblaciones por separado, nos encontramos que es difícil de valorar la contribución que cada uno de los efectos tiene para explicar la variación de las concentraciones, al existir interacción significativa entre la covariable y los factores en las dos poblaciones (Guadalete: $F_{21,117}=3,01$, $P<0,0005$; Bocaleones: $F_{23,109}=2,75$, $P<0,0005$). Esta heterogeneidad de las pendientes impidió ajustar los valores, para la variación mensual y para los sexos, al tamaño del pez e invalidó las

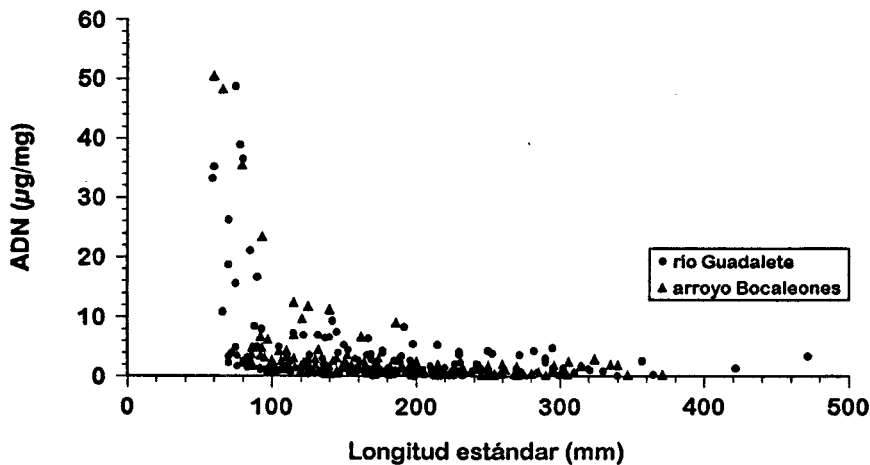


FIGURA 4.1. Relación entre la concentración de ADN del músculo y el tamaño del pez, definido por la longitud estándar, para el total de ejemplares capturados en el río Guadalete y en el arroyo de Bocaleones.

comparaciones de las intersecciones entre ellos. Si representamos la concentración de ADN por peso de tejido frente al tamaño del pez, utilizando la longitud estándar como variable que lo define, podemos observar en la Figura 4.1, como el ADN disminuye significativamente con la longitud, aunque de una manera más notable en las primeras etapas de la vida del pez. Esto nos hizo pensar en separar en el análisis los ejemplares juveniles de los adultos, ya que los primeros no fueron capturados todos los meses, ni de igual forma para cada sexo y pueden, por tanto, ser los responsables de la diferencia encontrada en el valor de las pendientes.

Si separamos los juveniles de los adultos en el río Guadalete, sólo en los últimos podemos aplicar un modelo completo de la varianza para el factor tiempo y sexo. Como se comentó anteriormente, no se capturaron juveniles de ambos sexos en todos los meses, por lo que éstos se separaron entre machos y hembras. Cuando los datos se vuelven a analizar mediante el ANCOVA (Tabla 4.1) y para todas las medidas de ácidos nucleicos, la heterogeneidad de las pendientes desaparece y ninguna variable varió significativamente con el tamaño del pez, a excepción de las concentraciones de ADN y ARN en las hembras juveniles. Los adultos no presentaron diferencias en las concentraciones de ADN entre sexos, aunque sí, una variación significativa entre meses, siendo el patrón de esta variación igual entre machos y hembras. En la Figura 4.2 se puede observar como hay tres momentos del año en los que la concentración de ADN en los adultos de ambos sexos aumentó significativamente; en los meses de Marzo y Abril, en Agosto y a partir de Octubre. La concentración de ARN también varió significativamente a lo largo del año y de la misma forma en ambos sexos,

TABLA 4.1. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre los ácidos nucleicos del músculo blanco para los ejemplares del río Guadalete, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
<i>Adultos</i>							
Longitud	1,100	1,09	0,297	0,51	0,472	2,33	0,129
Sexo	1,100	0,95	0,329	3,93	0,048	5,50	0,020
Mes	10,100	16,70	<0,0005	20,16	<0,0005	7,51	<0,0005
Mes x sexo	10,100	1,83	0,063	0,79	0,636	1,64	0,105
Long x factores	21,79	1,69	0,051	0,70	0,815	1,02	0,445
<i>Hembras juveniles</i>							
Longitud	1,13	9,98	0,008	11,32	0,005	0,06	0,805
Mes	8,13	3,89	0,015	3,65	0,019	15,58	<0,0005
Longitud x Mes	6,7	2,62	0,130	3,79	0,062	3,49	0,077
<i>Machos juveniles</i>							
Longitud	1,7	3,41	0,107	4,48	0,072	0,33	0,583
Mes	6,7	22,76	<0,0005	7,25	0,010	8,98	0,005
Longitud x Mes	3,4	0,71	0,637	0,08	0,983	0,83	0,586

con un aumento a partir del mes de Marzo. Las hembras presentaron mayores concentraciones que los machos, la concentración media ajustada de ARN en las hembras fue de 1,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y en los machos 0,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$. En el caso del ARN/ADN, las hembras (0,9) poseían significativamente mayores tasas que los machos (0,6) y en los dos sexos, varió de igual forma a lo largo del periodo de estudio. Hubo un aumento a partir de Mayo, para descender significativamente en el mes de Agosto, aumentar al mes siguiente y terminar descendiendo a partir de Octubre. Pero donde realmente se encuentran las diferencias entre sexos fue en Febrero, en Julio y en Agosto ($P < 0,05$)

En cuanto a los juveniles del río Guadalete (Tabla 4.1), de un forma general, las concentraciones de ADN y ARN disminuyeron a partir de principio de primavera en ambos sexos. Por otro lado, la tasa ARN/ADN de las hembras incrementó su valor a partir del verano, mientras que en los machos lo hizo a partir de primavera (Figura 4.3).

En el arroyo de Bocaleones debido a los pocos ejemplares juveniles capturados, es imposible analizar los datos de ellos al no poseer suficientes grados de libertad para el análisis estadístico. Pero eliminando éstos del análisis, encontramos como todavía sigue la heterogeneidad de las pendientes en los adultos ($F_{23,87} = 2,72$, $P < 0,0005$), por lo que se optó por separar en el análisis los sexos y de esta forma se consiguió la homogeneidad de las pendientes (Tabla 4.2). Esto impide una comparación global entre ellos, pero nos permite analizar temporalmente los datos. El análisis de la covarianza nos

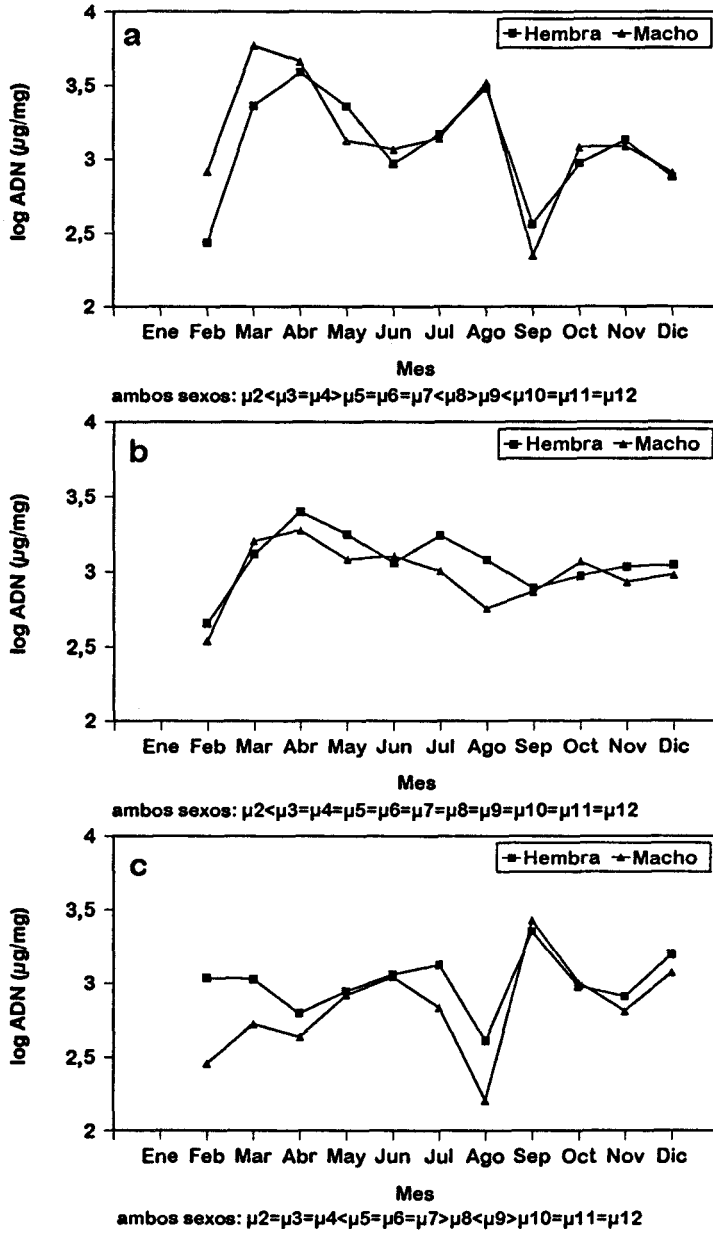


FIGURA 4.2. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del músculo blanco transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

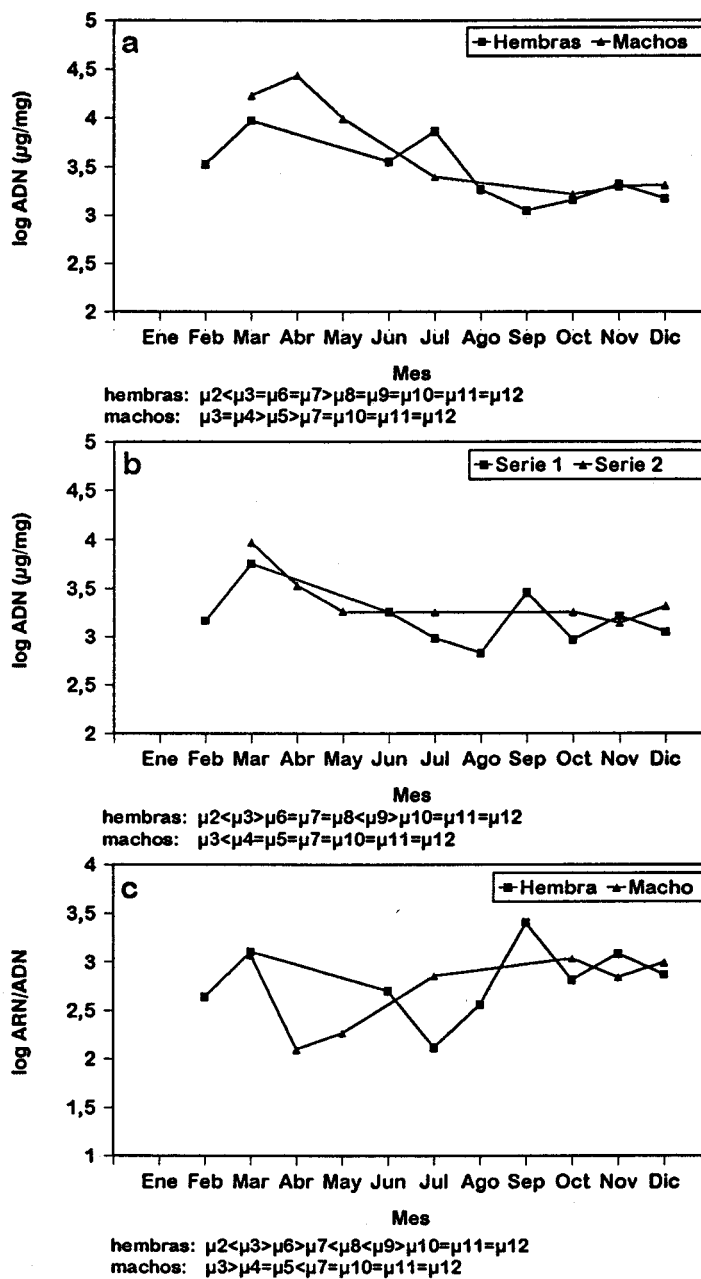


FIGURA 4.3. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del músculo blanco transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares juveniles del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

TABLA 4.2. Análisis de la covarianza para el efecto del mes sobre los ácidos nucleicos del músculo blanco para los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
Hembras							
Longitud	1,57	33,94	<0,0005	4,18	0,045	15,48	<0,0005
Mes	11,57	9,52	<0,0005	2,04	0,039	13,41	<0,0005
Long x mes	11,46	1,85	0,072	1,38	0,191	1,51	0,152
Machos							
Longitud	1,52	12,36	<0,0005	0,14	0,707	8,15	0,006
Mes	11,52	2,31	0,021	1,49	0,160	2,93	0,004
Long x mes	11,41	1,73	0,105	1,48	0,175	1,60	0,135

muestra como la longitud afecta significativamente a la concentración de ADN en ambos sexos, y existe una variación significativa de esta concentración a lo largo del año, con diferentes patrones de variación entre machos y hembras (Figura 4.4a). En estas últimas, hubo un aumento en los meses de Marzo y Abril, descendió paulatinamente desde finales de primavera hasta principio de otoño e incrementó su valor en otoño e invierno. En los machos, el ADN aumentó en el mes de Abril, se mantuvo con valores significativamente iguales hasta el mes de Julio, para descender a partir de Agosto. La concentración de ARN no varió significativamente durante el periodo de estudio en los machos, y las hembras tuvieron valores iguales durante la mayoría del año, a excepción de Noviembre en el que obtuvo su menor valor (Figura 4.4b). Hubo variación temporal en la tasa de ARN/ADN en ambos sexos, aunque el patrón de variación fue distinto. Mientras en los machos hubo solo un incremento en los meses de Agosto y Diciembre, en las hembras aumentó a principios de año, descendió en primavera, empezó a aumentar gradualmente a finales de esta estación para mantenerse con valores altos y significativamente iguales hasta que descendió en el mes de Noviembre (Figura 4.4c). Esta diferencia en el patrón de variación influyó en que durante los meses de Marzo, Mayo, Junio y Julio las hembras mostraran mayor tasa que los machos ($P < 0,05$), aunque las diferencias en las pendientes invalida en parte estos resultados.

Se analizó las diferencias en la concentración de ARN en ambas poblaciones añadiendo la concentración de ADN en la ANCOVA para los factores sexo y mes, como una segunda covariable. La hipótesis de paralelismo sólo fue violada en el arroyo de Bocaleones ($F_{46,36} = 1,73$, $P = 0,021$), mientras que en el río Guadalete se mantuvo la homogeneidad de las pendientes ($F_{42,57} = 0,48$, $P = 0,992$). En esta última población, las hembras

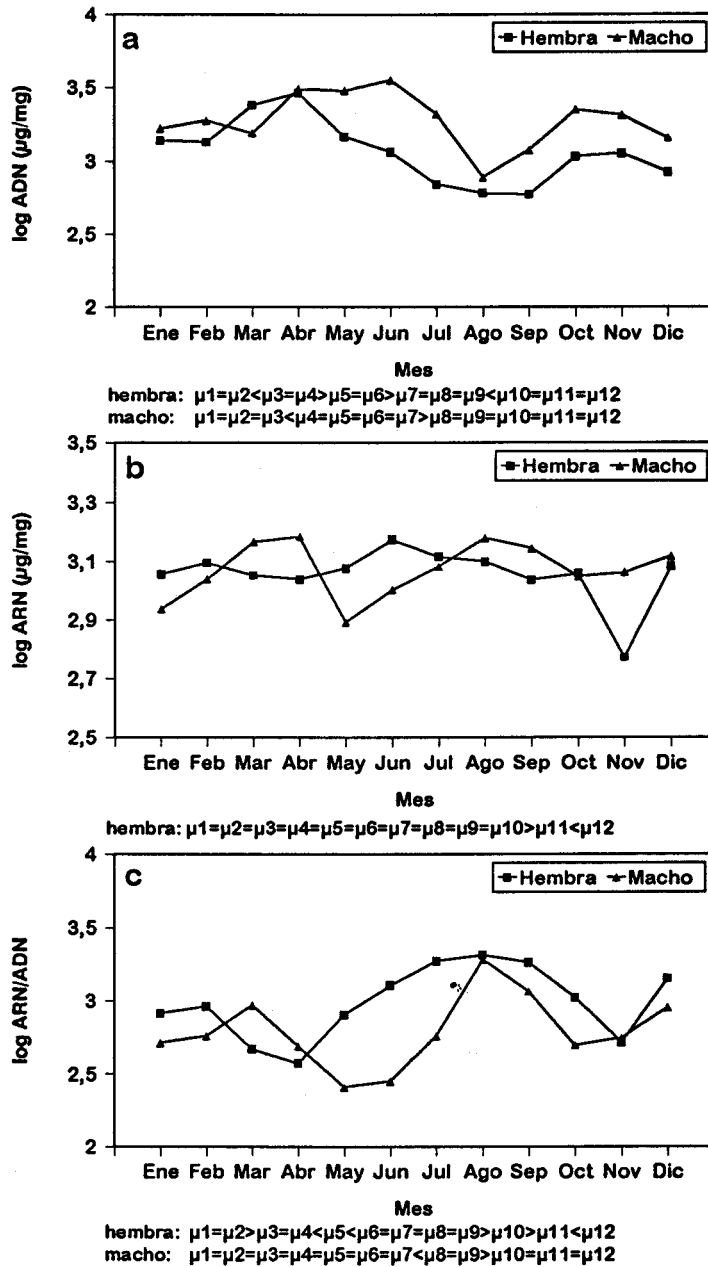


FIGURA 4.4. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del músculo blanco transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

TABLA 4.3. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre la concentración de ARN en el músculo blanco para los ejemplares adultos del río Guadalete, con la longitud estándar y la concentración de ADN como covariables.

	g.l.	F	P
Long-ADN	2,99	6,13	0,003
Sexo	1,99	5,80	0,017
Mes	10,99	11,98	<0,0005
Mes x sexo	10,99	0,82	0,610

Nota: Todas las variables (dependientes y covariables) fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

TABLA 4.4. Análisis de la covarianza para el efecto del mes sobre la concentración de ARN en el músculo blanco para los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar y la concentración ADN como covariables. Todas las variables (dependientes y covariables) fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

	Hembras			Machos		
	g.l.	F	P	g.l.	F	P
Long-ADN	1,56	12,04	<0,0005	1,51	0,09	0,912
Mes	11,56	4,08	<0,0005	11,51	2,40	0,018

presentaron concentraciones significativamente mayores que los machos (1,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ frente a 0,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$), ambos sexos presentaron diferencias significativas a lo largo del año y con los mismos patrones de variación (Tabla 4.3). Hubo un gradual incremento de Febrero a Abril; se mantuvo hasta un rápido descenso en Agosto, para aumentar otra vez a partir de Septiembre (Figura 4.5a). En el arroyo de Bocaleones para conseguir la homogeneidad de las pendientes, se tuvieron que separar por sexos (hembras: $F_{22,34}=1,42$, $P=0,120$; machos: $F_{22,29}=1,06$, $P=0,431$) y ambos presentaron diferencias a lo largo del periodo de estudio (Tabla 4.4), aunque con patrones distintos. Las hembras se mantuvieron con concentraciones altas, excepto en los meses de Marzo, Abril y Noviembre; mientras que los machos presentaron un descenso significativo a partir de Mayo, seguido de un aumento en Agosto, para terminar con un nuevo descenso en Octubre (Figura 4.5b).

Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en el hígado

En el río Guadalete el análisis de la covarianza para testar el efecto del sexo y el mes sobre las concentraciones de ADN y ARN en el hígado de los ejemplares adultos, mostró heterogeneidad de las pendientes (ADN: $F_{21,79}=2,22$, $P=0,005$; ARN: $F_{21,79}=1,95$, $P=0,018$), por lo que se optó por separar el análisis por sexos; de esta forma se consiguió la homogeneidad (Tabla 4.5) y por tanto la posibilidad de seguir con el análisis. Tanto la

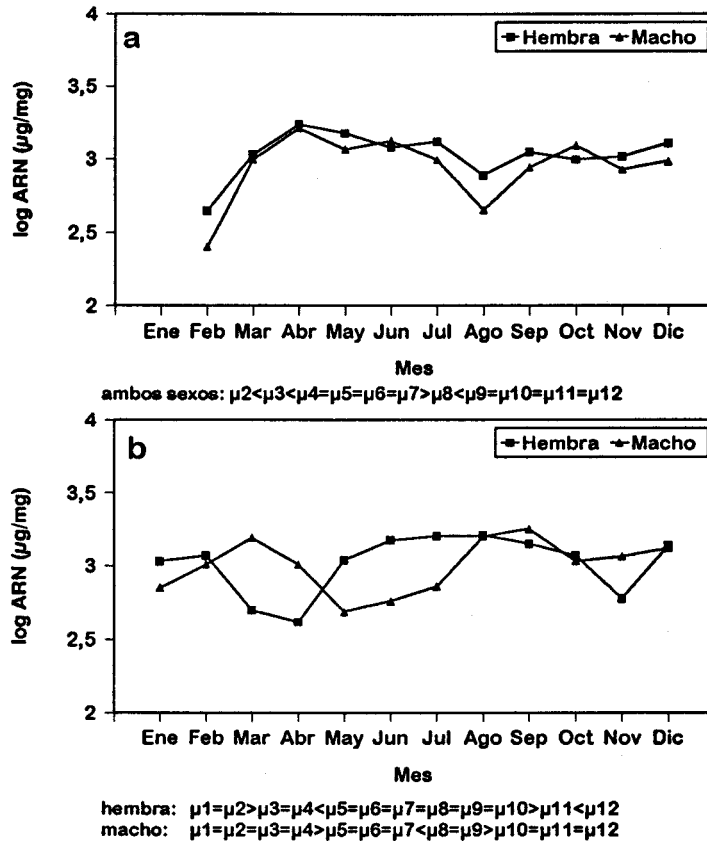


FIGURA 4.5. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de las covariables (longitud y ADN), de la concentración de ARN del músculo blanco transformados mediante logaritmo decimal, de los ejemplares adultos del río Guadalete (a) y del arroyo de Bocaleones (b). Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

concentración de ADN como de ARN variaron con la longitud en el caso de las hembras, las cuales presentaron correlaciones positivas entre ambas variables y la longitud (ADN: $R^2 = 0,21$, $N=50$, $P < 0,001$; ARN: $R^2 = 0,15$, $N=50$, $P = 0,005$), sin embargo el efecto del tamaño del pez no influyó en ambas concentraciones en los machos.

En ambos sexos, la concentración de ADN varió significativamente a lo largo del año y los patrones de variación fueron semejantes (Tabla 4.5). Hubo una disminución a partir de Abril, que se mantuvo hasta una subida significativa en Julio; en las hembras esta concentración alta duró hasta un nuevo descenso en Septiembre, mientras que en los machos descendió un mes antes (Figura 4.6a). La variación temporal en la concentración de ARN fue muy significativa en las hembras adultas (Tabla 4.5), hubo un incremento

TABLA 4.5. Análisis de la covarianza para el efecto del mes sobre los ácidos nucleicos del hígado para los ejemplares adultos del río Guadalete, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

	g.l.	ADN		ARN	
		F	P	F	P
<i>Hembras</i>					
Longitud	1,49	13,32	<0,001	8,32	0,005
Mes	10,49	3,81	<0,001	6,46	<0,0005
Longitud x Mes	10,39	1,87	0,079	0,99	0,460
<i>Machos</i>					
Longitud	1,50	0,92	0,342	1,39	0,243
Mes	10,50	4,92	<0,0005	1,98	0,055
Longitud x Mes	10,40	1,71	0,111	2,01	0,051

de la concentración en los meses de Abril, Mayo y Agosto, mientras que en los machos no existió ese efecto del tiempo (Figura 4.6b).

Existió homogeneidad de las pendientes para la tasa ARN/ADN del hígado, cuando se analizó conjuntamente los efectos del sexo y el mes en los adultos del río Guadalete ($F_{21,79}=1,65$, $P=0,058$). La tasa mostró una variación temporal significativa ($F_{10,100}=13,32$, $P<0,0005$), así como una fuerte interacción entre los factores ($F_{10,100}=3,50$, $P=0,0005$). En las hembras, la tasa aumenta gradualmente desde Febrero a Abril y Mayo (Figura 4.6c), con un valor medio ajustado en este último mes de 3,6, nueve veces la tasa media de 0,4 medida en Febrero. En los machos, el patrón de variación de Agosto a Diciembre fue casi idéntico al presentado por las hembras; sin embargo, a diferencia de éstas, no hubo prácticamente cambio de Febrero a Junio (1,5 Abril, frente a los 0,7 de Febrero) y presentó un descenso significativo en Julio. El sexo globalmente influyó significativamente sobre la tasa, las hembras presentaron concentraciones mayores que los machos ($F_{1,100}=8,63$, $P=0,004$), la tasa media fue de 1,3 para las primeras y de 1,0 para los segundos, pero es importante matizar el resultado anterior debido a la interacción entre el sexo y el mes, el efecto de primer factor cambia si lo analizamos mes a mes. Cuando el patrón de variación fue igual en los dos sexos, es decir de Agosto a Diciembre, la tasa fue casi idéntica, pero es de Febrero a Julio cuando las hembras mostraron la tasa de ARN/ADN mayor que el macho. La longitud no influyó en el valor del ARN/ADN, al contrario de lo que pasaba con las dos variables por separado.

La concentración de ARN, con la longitud y el ADN como covariables, presentó una variación temporal muy significativa ($F_{10,99}=13,32$, $P<0,0005$) y siguió un pauta similar al de la tasa de ARN/ADN. Como en aquel, los sexos mostraron distintos patrones de variación ($F_{10,99}=3,50$, $P=0,0005$), siendo la

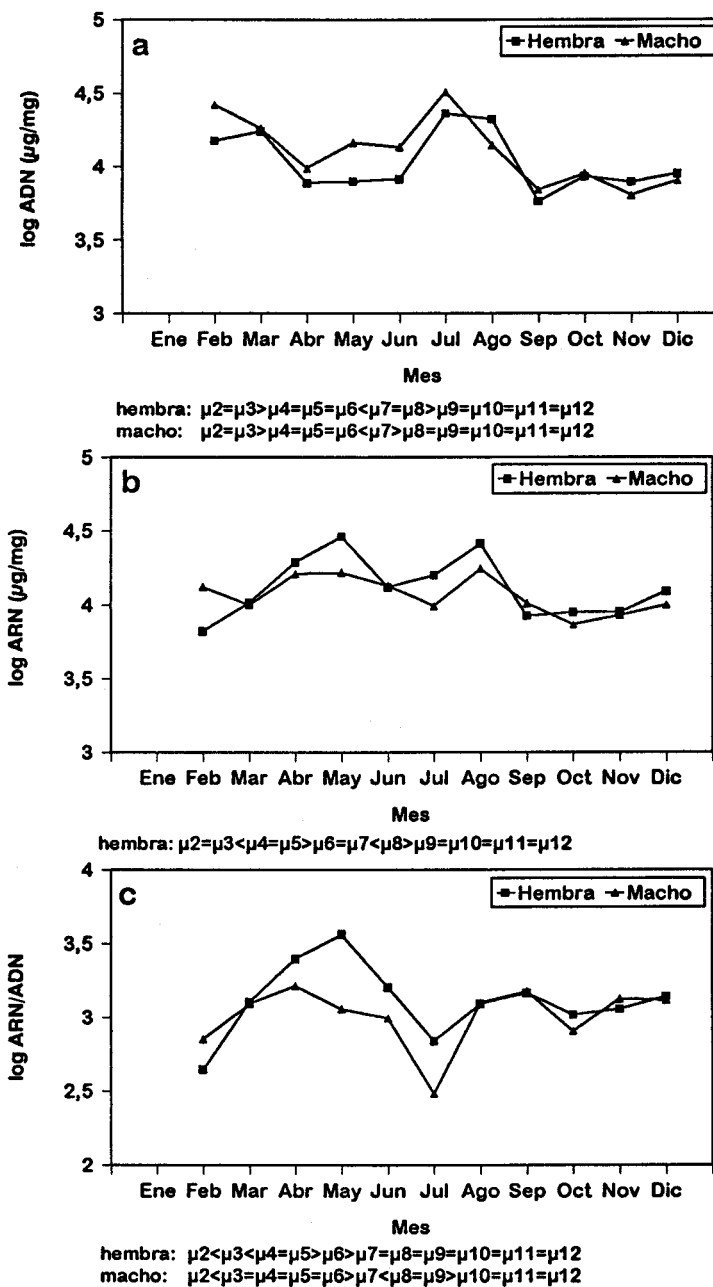


FIGURA 4.6. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del hígado transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

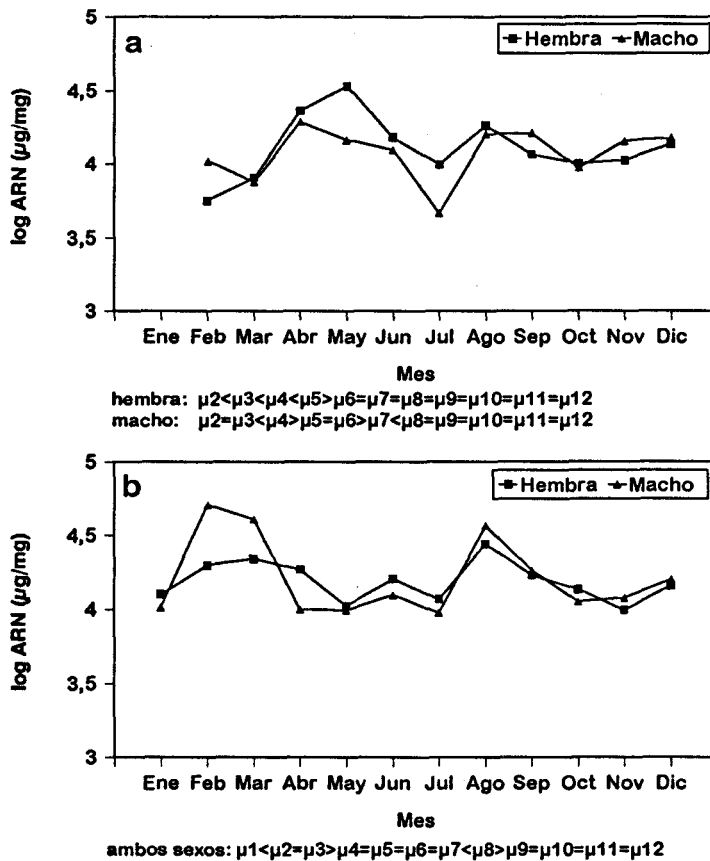


FIGURA 4.7. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de las covariables (longitud y ADN), de la concentración de ARN del hígado transformados mediante logaritmo decimal, de los ejemplares adultos del río Guadalete (a) y del arroyo de Bocaleones (b). Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

hembra la que alcanzaba los valores mayores en la primera mitad del año, con concentraciones similares en el resto (Figura 4.7a). En los machos, la variación de Agosto a Diciembre fue igual que en las hembras, presentó una caída significativa en Julio y no alcanzó valores tan elevados en la primavera. Este análisis no violó la hipótesis del paralelismo ($F_{42,57}=1,51$, $P=0,072$).

En el caso de los juveniles del río Guadalete, se separaron por sexo en el análisis de la covarianza para testar el efecto del mes sobre los ácidos nucleicos del hígado (Tabla 4.6). Las hembras mostraron variación significativa a lo largo del año en el ADN, ARN y en la tasa ARN/ADN (Figura 4.8); en las dos primeras variables hubo un descenso gradual a lo largo del año, mientras que la tasa incrementó al final del mismo. Por el contrario, los machos juveniles mostraron, en los meses donde fue posible capturarlos, unos

TABLA 4.6. Análisis de la covarianza para el efecto del mes sobre los ácidos nucleicos del hígado para los ejemplares juveniles del río Guadalete, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y el factor.

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
<i>Hembras</i>							
Longitud	1,13	9,73	0,008	14,92	0,002	0,41	0,532
Mes	8,13	9,13	<0,0005	8,39	<0,0005	3,85	0,016
Longitud x Mes	7,6	1,95	0,195	2,84	0,112	1,09	0,467
<i>Machos</i>							
Longitud	1,6	0,10	0,761	2,69	0,152	2,54	0,187
Mes	6,6	1,50	0,316	1,35	0,360	3,20	0,091
Longitud x Mes	3,3	1,43	0,387	0,45	0,731	7,26	0,069

TABLA 4.7. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre los ácidos nucleicos del hígado para los ejemplares del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
Longitud	1,110	10,90	0,001	0,41	0,521	5,51	0,020
Sexo	1,110	1,48	0,226	0,0004	0,983	1,11	0,291
Mes	11,110	4,22	<0,0005	8,69	<0,0005	4,95	<0,0005
Mes x sexo	11,110	1,06	0,400	1,45	0,161	2,27	0,015
Long x factores	23,87	1,31	0,185	1,61	0,059	1,24	0,234

valores en los contenidos de ácidos nucleicos hepáticos constantes (Figura 4.8).

A diferencia del río Guadalete, el análisis de la covarianza del contenido de los ácidos nucleicos en el hígado de los adultos del arroyo de Bocaleones, mostró homogeneidad de las pendientes en todos ellos (Tabla 4.7). En el caso de la concentración de ADN, la longitud fue una covariable muy significativa, y hubo también un fuerte efecto del factor tiempo. Por el contrario, no existió efecto del sexo y los patrones de variación fueron iguales para los machos y las hembras; hubo un descenso significativo en el mes de Febrero y en Agosto la concentración mostró los valores más altos (Figura 4.9a). La concentración de ARN por peso de hígado mostró las mismas respuestas a los factores que la concentración de ADN (Tabla 4.7), menos en el caso de la longitud que no influyó significativamente sobre la concentración y que además del pico observado en Agosto, mostró otros en los meses de Febrero y Marzo (Figura 4.9b). La tasa de ARN/ADN estuvo influida por la longitud, varió significativamente a lo largo del periodo de estudio y globalmente no hubo

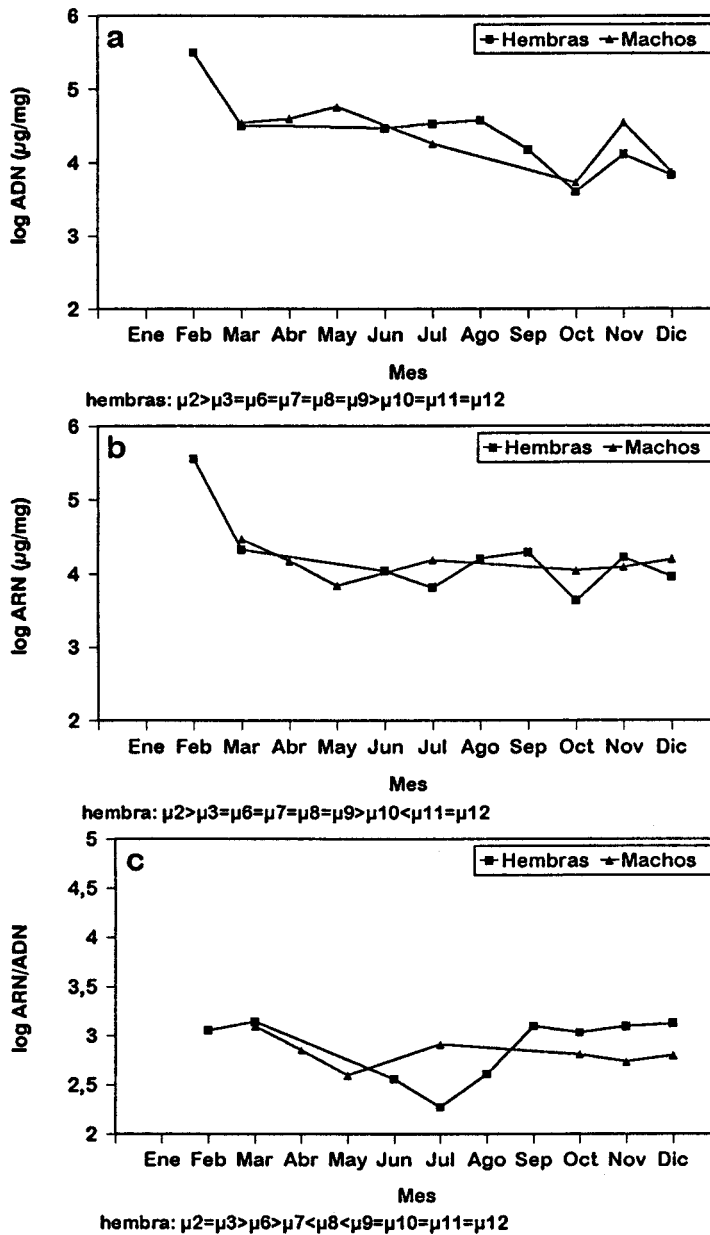


FIGURA 4.8. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del hígado transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares juveniles del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

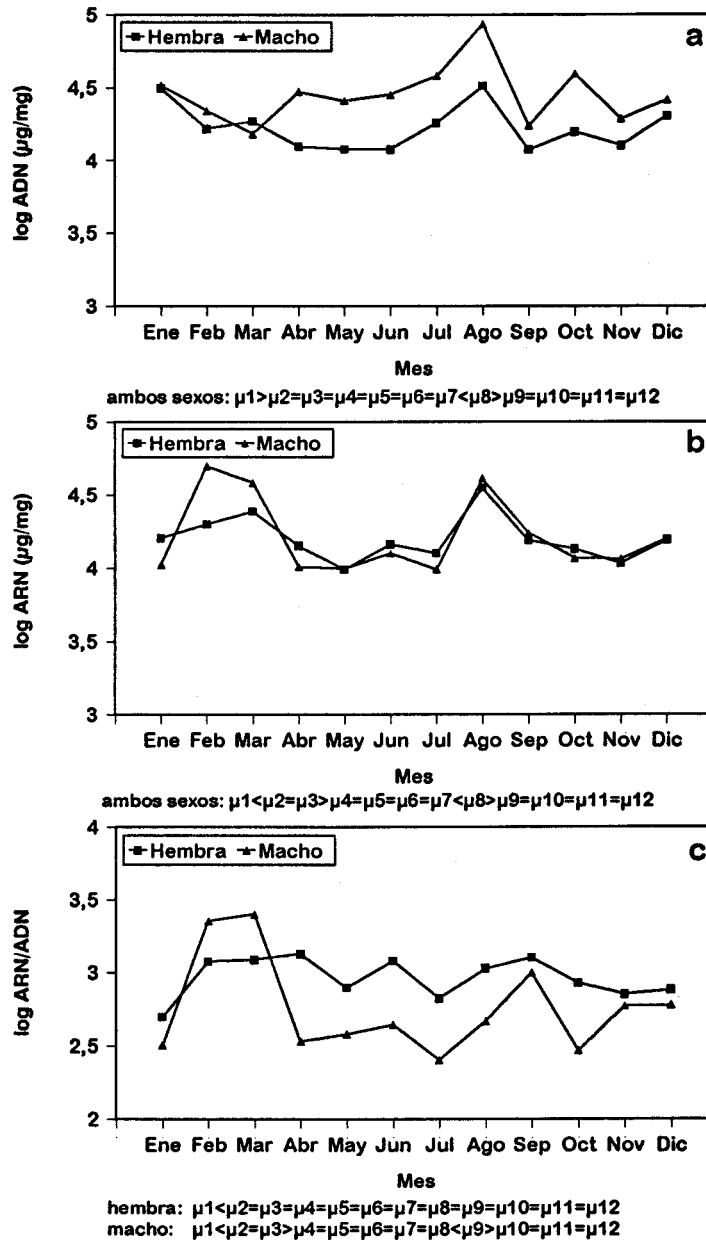


FIGURA 4.9. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) del hígado transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

diferencias entre sexos (Tabla 4.7). Pero la interacción significativa entre los factores impide una generalización de ambos por separado. Por un lado, las hembras poseen prácticamente igual tasa durante todo el año, mientras que los machos presentan dos momentos claramente diferenciados, Febrero y Marzo, y Septiembre (Figura 4.9c). Por otro lado, aunque globalmente no existieron diferencias entre sexos, sí las hubo en ciertos momentos del año. Por último, la concentración de ARN, cuando utilizamos el ADN como segunda covariable, mostró los mismos resultados que la concentración de ARN por peso de tejido (Tabla 4.8). No hubo efecto del sexo, pero si una variación significativa a lo largo del estudio y ésta fue de igual forma para machos y hembras (Figura 4.7b).

TABLA 4.8. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre la concentración de ARN en el músculo blanco para los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar y la concentración de ADN como covariables.

	g.l.	F	P
Long-ADN	2,109	3,18	0,045
Sexo	1,109	0,09	0,763
Mes	11,109	8,06	<0,0005
Mes x sexo	11,109	1,77	0,067

Nota: Todas las variables (dependientes y covariables) fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

Los ejemplares machos y hembras de ambas poblaciones se usaron independientemente para investigar cual era la relación entre la concentración de ácidos nucleicos en el hígado y la variación durante el periodo de estudio del peso de este órgano. Los residuos procedentes de la regresión entre el peso del hígado y la longitud estándar estuvieron correlacionados negativamente con la concentración de ADN del hígado en los machos ($r = -0,48$, $N=127$, $P<0,0005$), pero no lo estuvo en las hembras ($r = -0,13$, $N=131$, $P=0,125$). Por tanto, en el caso de los machos los hígados más pesados, en individuos de igual tamaño, mostraron concentraciones de ADN por mg de tejido hepático más bajas que los hígados que pesaban menos. Los residuos también estuvieron correlacionados en ambos sexos, pero ahora positivamente, con la concentración de ARN por mg de tejido (machos: $r = 0,23$, $N=127$, $P<0,01$; hembras: $r = 0,25$, $N=131$, $P<0,01$), y con la tasa de ARN/ADN (machos: $r = 0,57$, $N=127$, $P<0,0005$; hembras: $r = 0,35$, $N=131$, $P<0,0005$). Los residuos del peso del hígado son representados frente a la concentración de ácidos nucleicos en la Figura 4.10.

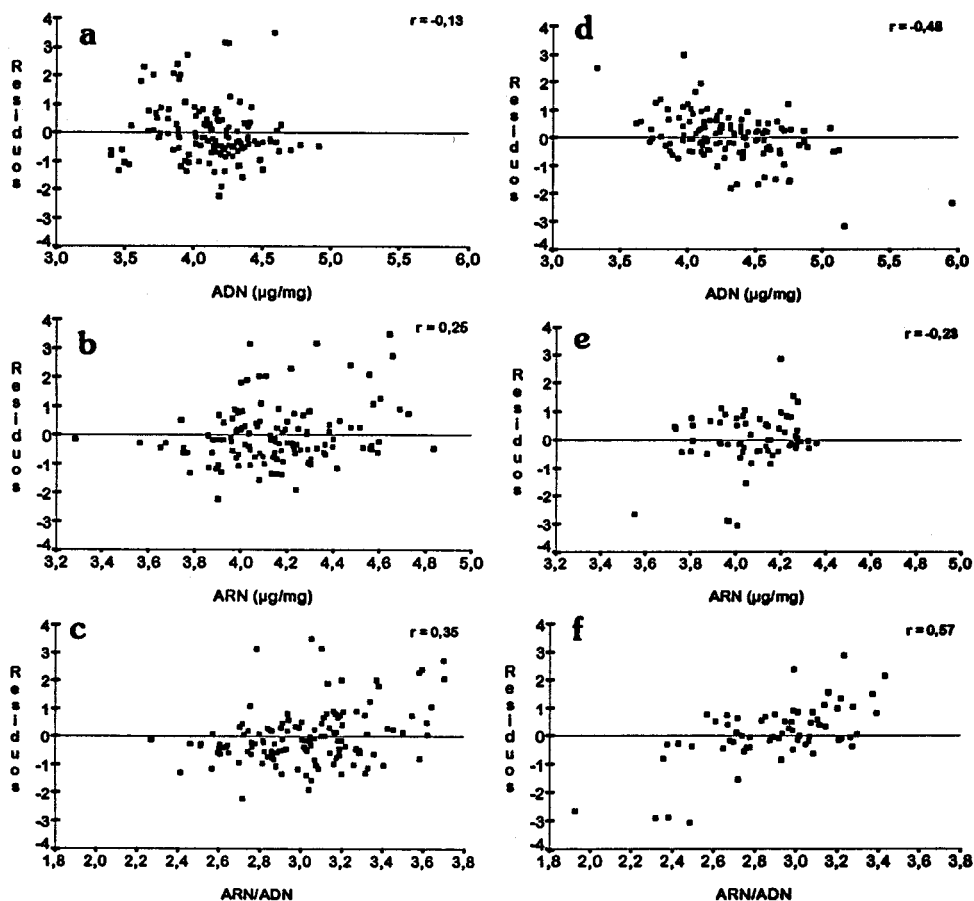


FIGURA 4.10. Residuos de la regresión entre el peso del hígado y la longitud estándar durante todo el periodo de estudio, representados frente a la concentración de ADN, de ARN y de la tasa de ARN/ADN del hígado en las hembras (a, b y c) y en los machos (d, e y f). Todas las variables se transformaron mediante \log_{10} . La unidad de medida de los residuos son gramos. r es el coeficiente de correlación

Variación temporal del contenido de ácidos nucleicos en la gónada

Cuando se analiza el conjunto de ejemplares, juveniles y adultos, en ambas poblaciones se observa como en todos los casos se viola la hipótesis del paralelismo (Tabla 4.9), por lo que se optó, como en los casos anteriores, por separar en el análisis ambos estados. De esta forma se consiguió la homogeneidad de las pendientes.

Para los adultos de las dos poblaciones, el contenido de los ácidos nucleicos, en las cuatro formas estudiadas, muestran los mismos resultados estadísticos (Tabla 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13). Hay un efecto significativo del sexo, del tiempo y de la interacción entre ambos. Pero aunque en los

TABLA 4.9. Análisis de la covarianza para comprobar la hipótesis del paralelismo en los contenidos de los ácidos nucleicos en ambas poblaciones, juveniles y adultos juntos. Los resultados muestran la interacción entre la covariable y los efectos (sexo y lugar) como origen de la varianza. Las variables y la covariable fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

	Guadalete			Bocaleones		
	g.l.	F	P	g.l.	F	P
ADN	21,114	2,16	0,005	23,106	2,04	0,007
ARN	21,114	2,34	0,002	23,106	2,38	0,001
ARN/ADN	21,114	1,90	0,017	23,106	1,95	0,011
ARN ^a	42,92	1,79	0,010	46,82	3,58	<0,0005

^a En este caso la concentración de ADN se usa como segunda covariable

TABLA 4.10. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre los ácidos nucleicos de la gónada para los ejemplares del río Guadalete, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
<i>Adultos</i>							
Longitud	1,100	0,004	0,945	1,39	0,240	0,77	0,379
Sexo	1,100	309,15	<0,0005	59,25	<0,0005	364,60	<0,0005
Mes	10,100	73,41	<0,0005	36,25	<0,0005	12,11	<0,0005
Mes x sexo	10,100	13,09	<0,0005	4,52	<0,0005	13,65	<0,0005
Long. x factores	21,79	1,58	0,076	1,21	0,266	0,98	0,496
<i>Hembras juveniles</i>							
Longitud	1,13	12,83	0,003	6,89	0,021	0,96	0,345
Mes	8,13	5,69	0,003	3,82	0,015	2,16	0,104
Longitud x Mes	6,7	1,65	0,279	0,18	0,979	0,65	0,708
<i>Machos juveniles</i>							
Longitud	1,6	2,14	0,194	2,72	0,150	0,10	0,766
Mes	6,6	1,01	0,496	1,27	0,386	1,87	0,232
Longitud x Mes	3,3	3,01	0,195	0,66	0,626	1,53	0,367

capturados en el río Guadalete, la longitud no influye significativamente sobre el contenido de los ácidos nucleicos, si lo hace en la concentración de ARN y ADN en los capturados en el arroyo de Bocaleones. La fuerte interacción encontrada entre los dos factores impide la valoración de cada factor por separado y en general se puede comentar, para las tres variables estudiadas, que ésta es debida a las diferencias de patrones de variación entre machos y hembras, lo que produce que en ciertos momentos del año existan diferencias significativas entre los sexos y que en el resto no aparezcan (Figura 4.11a, 4.12 a). Los patrones de variación de la concentración de ARN/tejido, utilizando la longitud como covariable o la longitud y la concentración de

TABLA 4.11. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre la concentración de ARN en el músculo blanco para los ejemplares del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar y la concentración de ADN como covariables. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores

	g.l.	F	P
<i>Adultos</i>			
Long-ADN	2,99	1,62	0,202
Sexo	1,99	25,00	<0,0005
Mes	10,99	12,42	<0,0005
Mes x sexo	10,99	4,62	<0,0005
Cov. x factores	42,57	0,91	0,622
<i>Hembras juveniles</i>			
Long-ADN	2,12	3,23	0,075
Mes	8,12	3,00	0,042
Coa x factor	7,6	0,31	0,924
<i>Machos juveniles</i>			
Long-ADN	2,5	1,34	0,340
Mes	6,5	1,06	0,481
Cov.x factor	3,3	5,64	0,097

Nota: La variable dependiente y las covariables fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

TABLA 4.12. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre los ácidos nucleicos de la gónada para los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar como covariable. Todas las variables (dependientes y covariable) fueron transformadas mediante logaritmo decimal. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores.

	g.l.	ADN		ARN		ARN/ADN	
		F	P	F	P	F	P
Longitud	1,10†	7,40	<0,005	6,39	0,01	0,05	0,820
Sexo	1,10†	191,46	<0,0005	35,83	<0,0005	295,46	<0,0005
Mes	11,10†	13,63	<0,0005	17,71	<0,0005	30,07	<0,0005
Mes x sexo	10,10†	3,91	<0,0005	21,33	<0,0005	15,10	<0,0005
Long x factores	21,77	1,63	0,062	1,09	0,372	1,69	0,053

ADN como covariables, fueron prácticamente iguales a los de la tasa de ARN/ADN, por lo que describiremos sólo la variación de la concentración de ADN por peso de gónada y la tasa de ARN/ADN. En el caso de la primera y en los ejemplares capturados en el río Guadalete, la interacción es debida a que, por una parte, los machos mantienen una concentración de ADN significativamente alta desde Abril hasta Julio, y las hembras sólo en el mes

TABLA 4.13. Análisis de la covarianza para los efectos del sexo y del mes sobre la concentración de ARN en la gónada para los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones, con la longitud estándar y la concentración de ADN como covariables. Las hipótesis de paralelismo (homogeneidad de las pendientes) es comprobada con la interacción entre la covariable y los factores.

	g.l.	F	P
Long-ADN	2,107	10,01	<0,0005
Sexo	1,107	44,36	<0,0005
Mes	11,107	20,78	<0,0005
Mes x sexo	11,107	22,45	<0,0005
Cov. x factores	46,61	1,46	0,087

Nota: Las variable dependiente y las covariables fueron transformadas mediante logaritmo decimal.

de Marzo y Abril; y por otra, que es durante este periodo donde la concentración de ADN fue significativamente más alta en los machos, mientras que fue prácticamente igual a las hembras en el resto del año (Figura 4.11a). La interacción encontrada en la tasa ARN/ADN es debido a una respuesta diferente de los sexos en la primera mitad del año. Así, las hembras capturadas en el río Guadalete, muestran una bajada en el mes de Febrero, que se mantiene hasta una subida significativa en el mes de Junio y una nueva bajada en Septiembre; los machos por el contrario, muestran una bajada gradual de Febrero a Junio y una subida también gradual hasta Agosto (Figura 4.11c). En el caso de los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones, los machos presentan concentraciones altas de ADN en sus testículos, desde Mayo a Julio y las hembras, en sus ovarios, desde Marzo a Mayo (Figura 4.12a). Respecto a la otra población, durante todo el año la concentración de ADN en la gónada de los machos capturados en el arroyo de Bocaleones, se mantiene con valores superiores a la de las hembras. También la interacción encontrada en la tasa de ARN/ADN en los ejemplares capturados del arroyo, es debida a una respuesta diferente de los sexos en la primera mitad del año. Las hembras capturadas en el arroyo de Bocaleones muestran una subida en el mes de Febrero y una bajada en el mes de Abril, para mantenerse prácticamente sin cambios en el resto del año; los machos muestran una bajada gradual de Febrero a Junio y una subida también gradual hasta Agosto (Figura 4.12c).

En el caso de los juveniles capturados en el río Guadalete, también se logró la homogeneidad de las pendientes al separarlos de los adultos (Tabla 4.10). Pero, sólo en la concentración de ADN y de ARN por peso de tejido y en el caso de las hembras juveniles, hubo efecto significativo del tiempo (Figura 4.13).

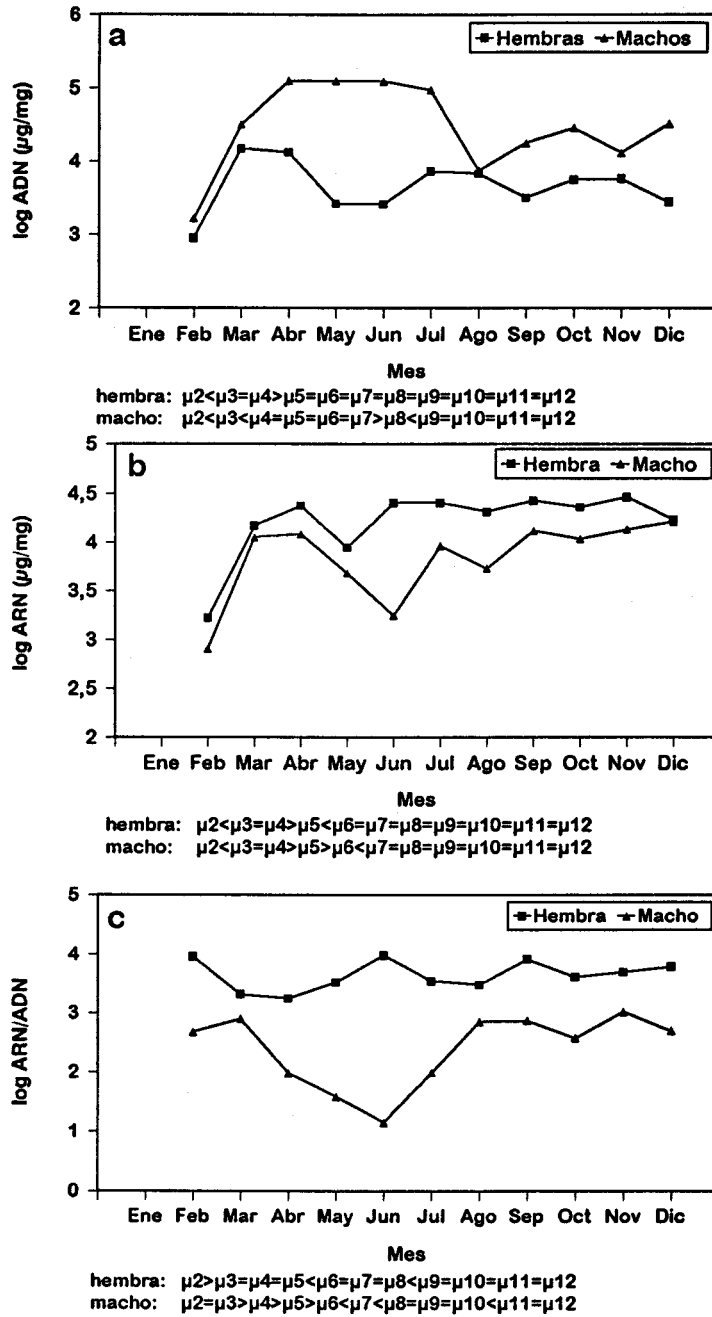


FIGURA 4.11. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) de la gónada, transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

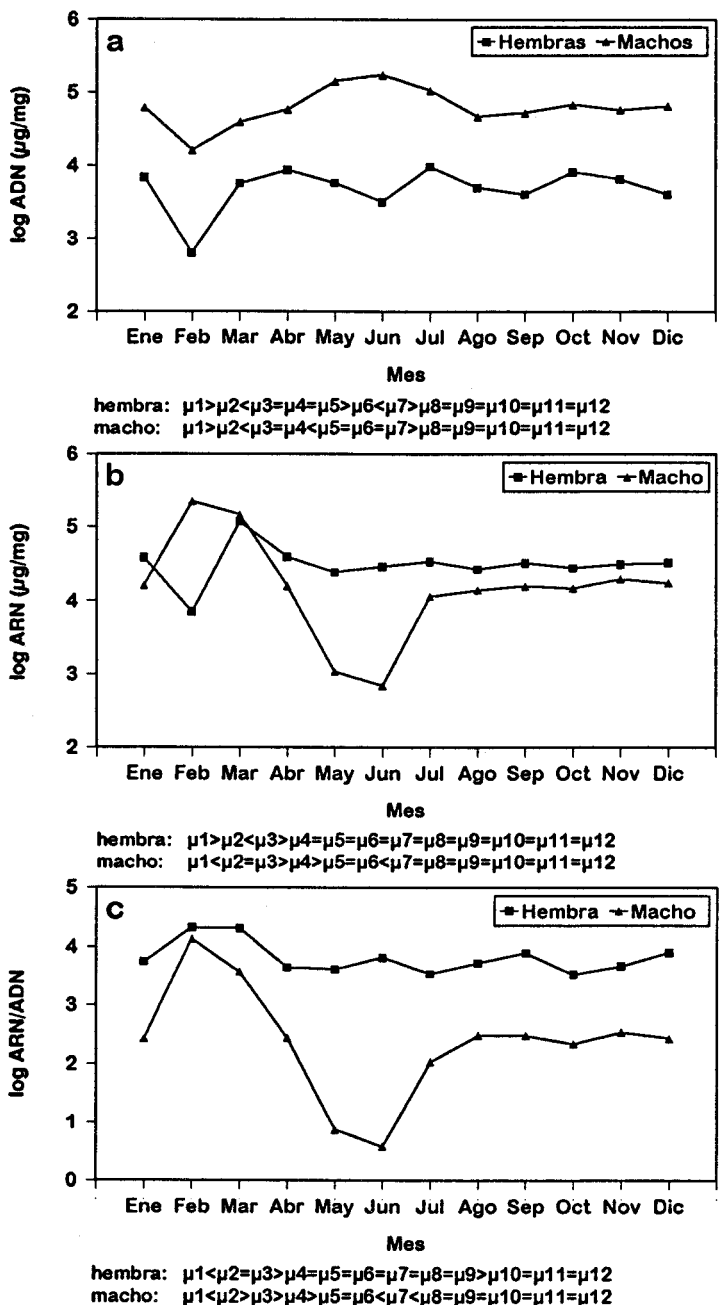


FIGURA 4.12. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) de la gónada, transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares adultos del arroyo de Bocaleones. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

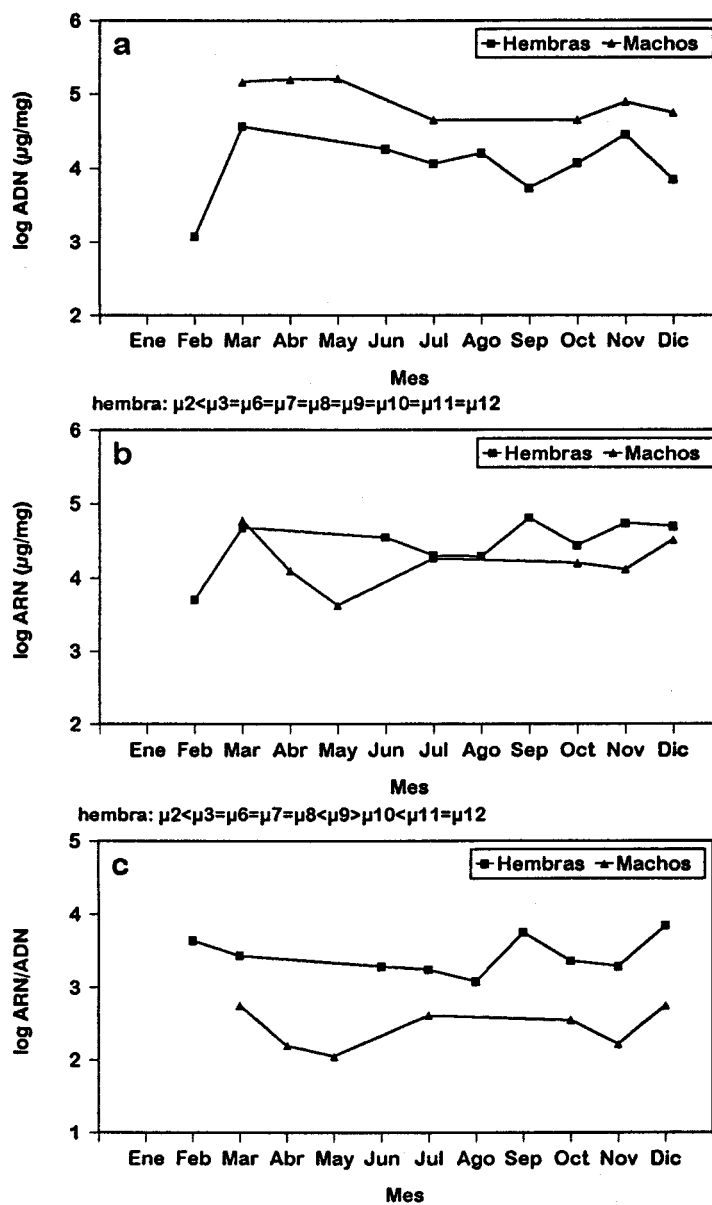


FIGURA 4.13. Variación temporal de las medias ajustadas al efecto de la covariable, de la concentración de ADN (a) y ARN (b), y la tasa de ARN/ADN (c) de la gónada, transformados mediante logaritmo decimal de los ejemplares juveniles del río Guadalete. Las comparaciones de Bonferroni ($\alpha=0,05$) para las variables con variación significativa corresponden al orden del momento de muestreo: μ_2 es la media de Febrero, μ_8 es la media de Agosto

TABLA 4.14. Coeficientes de correlación de Pearson entre los residuos de la regresión del peso de la gónada con la longitud estándar, y la concentración de ácidos nucleicos de la gónada. Los números entre paréntesis indican el tamaño de la muestra.

	ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	ARN/ADN
<i>río Guadalete</i>		
Hembras (14)	-0,68**	0,73**
Machos (29)	0,89***	-0,66***
<i>arroyo Bocaleones</i>		
Hembras (13)	-0,36	-0,35
Machos (22)	0,53*	-0,75***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Los ejemplares machos y hembras de cada una de las poblaciones se usaron independientemente para investigar cual era la relación entre la concentración de ácidos nucleicos en la gónada y la variación, durante el periodo de maduración gonadal, del peso de este órgano. Los residuos procedentes de la regresión entre el peso de la gónada y la longitud estándar estuvieron correlacionados negativamente con la concentración de ADN de la gónada en las hembras capturadas en el río Guadalete, pero no lo estuvieron en las hembras del arroyo Bocaleones (Tabla 4.14); por otro lado, hubo una correlación positiva en los machos de ambas poblaciones. Los residuos estuvieron correlacionados negativamente con la tasa de ARN/ADN en los machos y positivamente en las hembras del río Guadalete. Los residuos del peso de la gónada son representados frente a la concentración de ácidos nucleicos en la Figura 4.14 para las hembras y en la Figura 4.15 para los machos, se separan los meses para delimitar claramente el proceso de maduración gonadal representado por la evolución del peso relativo de la gónada a lo largo del tiempo.

En el momento antes de la freza, cuando las gónadas de las hembras mostraron sus mínimas concentraciones de ADN, las capturadas en el río Guadalete tuvieron menor concentración ($2,54 \mu\text{g}/\text{mg}$) que las capturadas en el arroyo de Bocaleones ($5,11 \mu\text{g}/\text{mg}$) (ANCOVA, $F_{1,7}=9,38$, $P=0,018$), teniendo en cuenta que las pendientes de las dos poblaciones fueron homogéneas ($F_{1,6}=0,30$, $P=0,604$). Para determinar si esta diferencia en la concentración de ADN de la gónada puede ser, en parte, responsable de las diferencias en los pesos de las gónadas de las hembras, las capturadas en el río Guadalete tuvieron pesos significativamente mayores ($11,85 \text{ g}$) que las del arroyo de Bocaleones ($1,93 \text{ g}$, $F_{1,7}=11,30$, $P=0,012$) antes de la freza, se realizó un análisis de correlación entre los residuos de la regresión del peso de la gónada y la longitud estándar, y la concentración de ADN gonadal. Como muestra la Figura 4.16a, se encontró una correlación negativa ($r = -0,76$, $N=10$, $P<0,001$), en la cual, las hembras que poseían una gónada mayor y

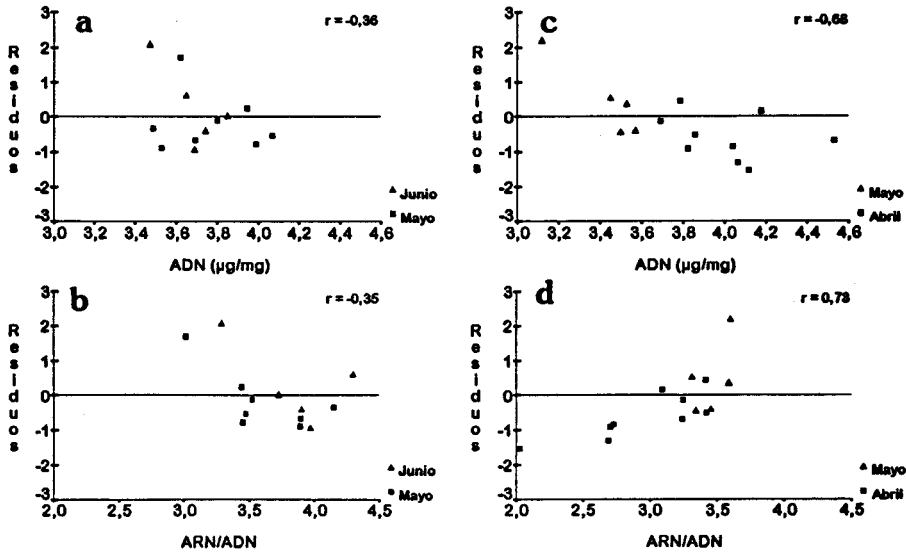


FIGURA 4.14. Residuos estandarizados de la regresión entre el peso de la gónada y la longitud estándar durante el final del periodo de maduración gonadal, representados frente a la concentración de ADN y a la tasa de ARN/ADN de la gónada en las hembras del arroyo de Bocaleones (a, b) y del río Guadalete (c, d). Todas las variables se transformaron mediante log₁₀. La unidad de medida de los residuos son gramos. *r* es el coeficiente de correlación.

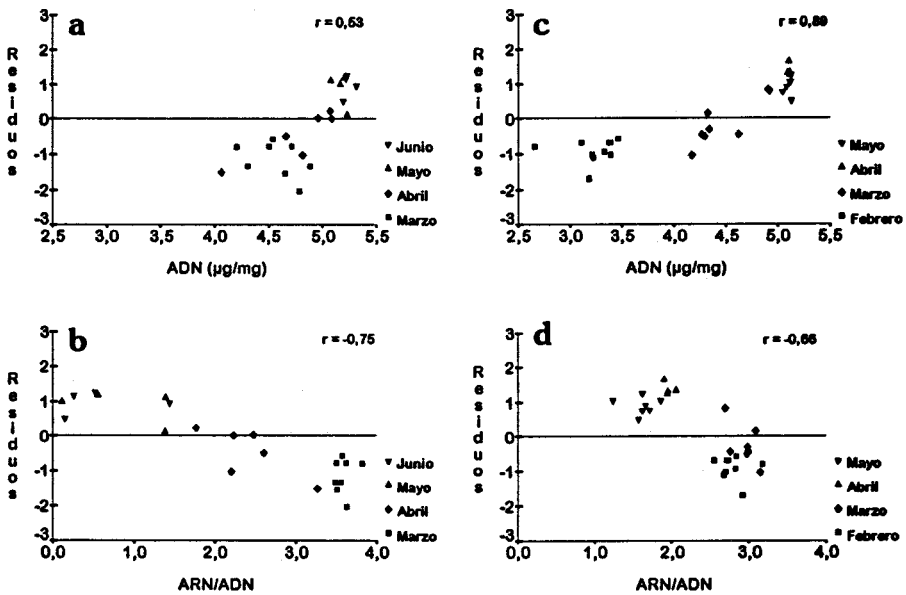


FIGURA 4.15. Residuos estandarizados de la regresión entre el peso de la gónada y la longitud estándar durante el final del periodo de maduración, representados frente a la concentración de ADN y a la tasa de ARN/ADN de la gónada en los machos del arroyo de Bocaleones (a, b) y del río Guadalete (c, d). Todas las variables se transformaron mediante log₁₀. La unidad de medida de los residuos son gramos. *r* es el coeficiente de correlación.

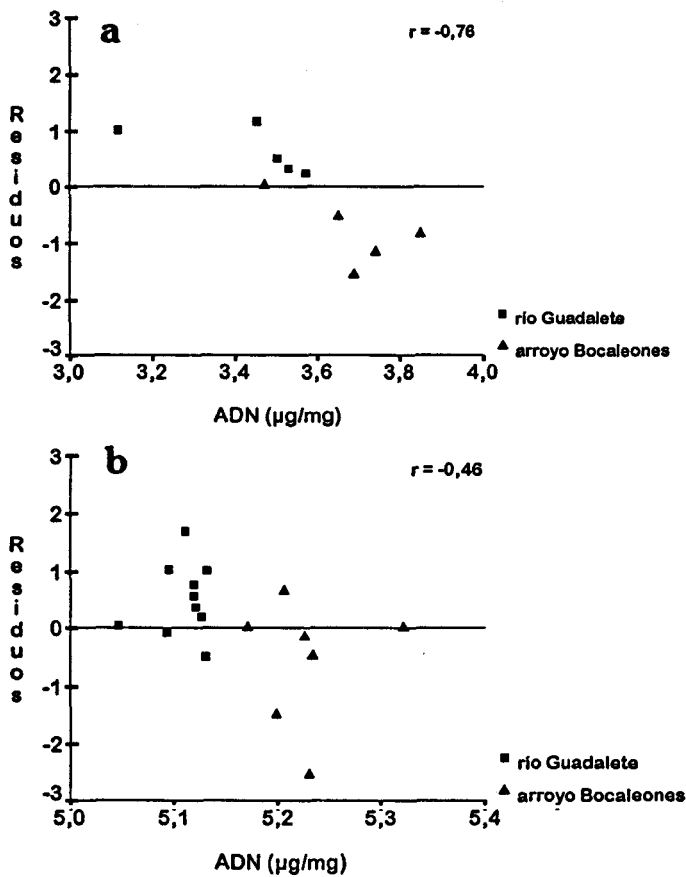


FIGURA 4.16. Residuos estandarizados de la regresión entre el peso de la gónada y la longitud estándar en el momento de máximo desarrollo gonadal, representados frente a la concentración de ADN de la gónada en el total de hembras (a) y de machos (b). Todas las variables se transformaron mediante \log_{10} . La unidad de medida de los residuos son gramos. r es el coeficiente de correlación.

más pesada, de una manera casi exclusiva las capturadas en el río Guadalete, tuvieron menor concentración de ADN que las hembras con gónadas más livianas, exclusivamente las capturadas en el arroyo de Bocaleones.

Entre los machos también existió diferencia en los pesos de las gónadas ($F_{1,16}=11,47$, $P=0,004$); los capturados en el río Guadalete tuvieron un peso medio ajustado a la longitud de 3,09 g, mientras que los capturados en el arroyo de Bocaleones de 1,76 g. Esta diferencia coincidió con el hecho de que los machos del arroyo de Bocaleones tuvieron mayor concentración de ADN en su gónada ($157,63 \mu\text{g}/\text{mg}$) que los del río Guadalete ($127,01 \mu\text{g}/\text{mg}$; $F_{1,16}=8,38$, $P=0,011$), lo que determinó una correlación negativa ($r=-0,46$, $N=19$, $P=0,045$) entre los residuos de la regresión del peso de la gónada frente a la longitud estándar, y la concentración de ADN de los testículos. En la Figura 4.16b se observa como en general, las gónadas de los machos

TABLA 4.15. Coeficientes de correlación de Pearson entre los ácidos nucleicos en los tres tejidos estudiados y la edad y la longitud estándar. Los números entre paréntesis indican el tamaño de la muestra.

	Arroyo Bocaleones		Río Guadalete	
	Hembras 2-12 ^a	Machos 3-8 ^a	Hembras 2-9 ^a	Machos 2-8 ^a
	<i>Edad</i>			
Músculo	(45)	(24)	(26)	(23)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	-0,347*	-0,431*	-0,344*	-0,717***
ARN/ADN	0,444**	0,416**	0,104	0,386*
Hígado	(38)	(48)	(52)	(42)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	-0,324*	-0,358*	0,149	-0,217
ARN/ADN	0,389	0,332*	0,203	0,269
Gónada	(5)	(8)	(5)	(11)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,236	-0,465	0,568	0,194
ARN/ADN	-0,382	0,296	-0,005	-0,368
	<i>Longitud estándar</i>			
Músculo	(45)	(24)	(26)	(23)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	-0,471***	-0,625***	-0,467*	-0,786***
ARN/ADN	0,616***	0,525***	0,156	0,591***
Hígado	(38)	(48)	(52)	(42)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	-0,315*	-0,520**	0,066	-0,434**
ARN/ADN	0,515***	0,475**	0,293*	0,484***
Gónada	(5)	(8)	(5)	(11)
ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,353	-0,506	0,656	-0,250
ARN/ADN	-0,388	0,234	0,072	-0,253

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. ^a Edad estudiada en cada sexo y lugar.

capturados en el arroyo Bocaleones son las de menor peso y mayor concentración de ADN.

Relación de los ácidos nucleicos con el tamaño y la edad del pez

En los análisis anteriores se ha podido observar como puede o no influir la longitud sobre el contenido de los ácidos nucleicos. Esto en algunos casos, puede ser consecuencia de que la variabilidad temporal mostrada por los ácidos nucleicos cambian la relación de ellos con el tamaño del pez y la edad, y no reflejan realmente cual es la relación entre ambos. Por tanto, hemos estudiado la relación entre el tamaño y la edad del pez, y el contenido de los ácidos nucleicos en los momentos de máximas concentraciones, separando los sexos en cada una de las poblaciones.

La concentración de ADN en el músculo está inversamente correlacionada con la longitud estándar y con la edad en ambos sexos dentro de cada una de las poblaciones (Tabla 4.15). En el caso de los ejemplares capturados en el río Guadalete, si los separamos entre juveniles y adultos, existe correlación negativa en las hembras juveniles ($r = -0,712$, $N = 8$,

$P < 0,05$) y en los machos juveniles ($r = -0,841$, $N = 6$, $P < 0,05$), pero tanto en las hembras adultas ($r = -0,324$, $N = 18$), como en los machos ($r = -0,373$, $N = 15$) la correlación no fue significativa ($P > 0,05$). En el caso de los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones, hubo correlación alta en los ejemplares juveniles (hembras: $r = -0,650$, $N = 4$; machos; $r = -0,659$, $N = 4$), aunque ésta no fue significativa ($P > 0,05$) debido al escaso número de capturas. Pero influyen de una manera importante en la relación total, ya que al separarlos de los adultos, para estos últimos no existe ya correlación significativa (hembras: $r = -0,247$, $N = 41$, $P > 0,05$; machos; $r = -0,346$, $N = 20$, $P > 0,05$).

La tasa de ARN/ADN del músculo está correlacionada positivamente en todos los grupos, excepto en las hembras capturadas en el río Guadalete. En el hígado de los machos y hembras capturados en el arroyo Bocaleones, la edad estuvo correlacionada significativamente con la concentración de ADN y con la tasa de ARN/ADN, de una forma negativa y positiva respectivamente, pero no así en los capturados en el río Guadalete. El tamaño del pez también mostró la misma relación con las dos variables en los ejemplares del arroyo y en los machos del río Guadalete. Cuando las gónadas alcanzaron sus máximos pesos, no hubo relación entre la edad y la longitud con la concentración de ADN y con la tasa de ARN/ADN en las gónadas de ningún grupo (Tabla 4.15).

Discusión

Dinámica del crecimiento muscular

Como la cantidad total de ADN por célula en el músculo blanco es constante dentro de una misma especie, y esta cantidad aparentemente no cambia por inanición o por otros fenómenos estresantes (Bulow 1987), la concentración de ADN se ha convertido en una referencia estándar para determinar el número total de células musculares por peso de tejido. Sin embargo, es necesario que cumpla unas determinadas condiciones para poder aplicarla, como señala Love (1970), la muestra de músculo esquelético debe ser siempre seleccionada de la misma parte del pez, ya que el tamaño celular disminuye en la dirección cabeza-cola, y además, como el tejido conjuntivo es muy rico en ADN la muestra debe ser cuidadosamente liberada de la mayor parte de éste. Como se detalló en la parte de Material y Métodos siempre se seleccionó el músculo epaxial izquierdo a nivel de la aleta dorsal, intentando limpiarlo lo más posible de tejido conjuntivo. La mayoría del tejido conjuntivo es fácil de separar con la muestra liofilizada, pero el tejido conjuntivo intracelular es más difícil de extraer, aunque como veremos posteriormente, nos ayudará a comprender mejor los resultados. Por tanto,

fuimos capaces de minimizar las influencias de la heterogeneidad anatómica y del tejido conjuntivo sobre la concentración de los ácidos nucleicos en el músculo blanco.

Los resultados muestran como a medida que avanza la edad y sobre todo el tamaño del cuerpo, disminuye la cantidad de ácido desoxirribonucleico por peso de tejido; las células serían cada vez más grandes, aunque donde verdaderamente se observa el descenso en el ADN es en el estado juvenil. Descensos similares en la concentración de ADN han sido también encontrados en otras especies (Luquet y Durand 1970, Love 1980, Ferguson *et al.* 1990). Una explicación al mayor descenso encontrado en el estado juvenil es la que dan Koumans *et al.* (1994). En un principio existiría el reclutamiento de las nuevas fibras musculares (hiperplasia), las cuales tienen muy poco citoplasma; en una etapa posterior habría un aumento del volumen citoplasmático (hipertrofia) de las nuevas fibras hasta que se alcanza una tasa núcleos/sarcoplasma mínima, por lo que la adición continuada de nuevas fibras podría explicar el descenso del contenido de ADN. Love (1970) indica que la proporción de fluido extracelular es mayor en peces jóvenes, que es cuando las células musculares están más en procesos de multiplicación, que de incremento en el tamaño. Es decir, que el descenso más pronunciado de los valores de ADN en el estado juvenil indicó que la mayoría del crecimiento en esta etapa fue por división celular más que por el incremento del tamaño celular. Esto sería lo que Weatherley *et al.* (1988) señalan como los dos procesos que comprende el crecimiento muscular: (1) aportación de nuevas fibras musculares (reclutamiento) y (2) ensanchamiento de estas fibras, al incrementar el diámetro y la longitud de las mismas.

El origen de las nuevas fibras no es debido a una simple división mitótica de las ya existentes, sino a la actividad de las células miogénicas (miosatélites) (Weatherley y Gill 1987a); si bien un estudio muy reciente de Koumans y Akster (1995), pone de manifiesto la posibilidad de que otro tipo de células miogénicas, distintas a las satélites, estén involucradas en el aumento del número de fibras musculares. En cuanto a la segunda etapa del crecimiento muscular, Weatherley (1990) indica que el incremento en el diámetro de las fibras musculares también tiene un máximo, que corresponde al momento en los que la tasa superficie/volumen de la fibra es menos favorable al intercambio metabólico. La dinámica de crecimiento del músculo hace que éste tienda a imponerse límites sobre su propio volumen y por tanto sobre el volumen total del pez, a diferencia de otros órganos o tejidos (hígado, piel, etc.) en los cuales la capacidad de crecer por divisiones celulares mitóticas, no limita ni su tasa de crecimiento ni su máximo tamaño, de la forma que lo hace el músculo (Weatherley y Gill 1989).

En este punto, es importante traer a colación una cuestión que ya Love (1970) puso de manifiesto y que ha sido investigada por muchos autores en

diferentes especies de peces (ver revisión en Kundu y Mansuri 1990), cual es el momento de la vida del pez en el que cesa la formación de nuevas fibras musculares, o por lo menos esa formación es insignificante, y el crecimiento se produce casi exclusivamente por hipertrofia (aumento del tamaño) de las fibras existentes, y como influye este proceso en el crecimiento total del organismo (tamaño final del pez). En un estudio sobre el crecimiento del músculo blanco axial en diez especies de teleósteos de agua dulce pertenecientes a cinco familias (Cyprinidae, Centrarchidae, Percidae, Salmonidae y Esocidae), que abarcaban un amplio rango de tasas de crecimiento y de tamaños finales, Weatherley *et al.* (1988) pusieron de manifiesto que el reclutamiento de nuevas fibras tiende a cesar cuando el pez alcanza aproximadamente el 44% de su tamaño máximo. Los resultados de estos últimos autores se basan en los tamaños máximos capturados, por lo tanto, si tenemos en cuenta este porcentaje como aproximativo y los tamaños máximos capturados para cada sexo por nosotros, que según los modelos de crecimiento descritos en el capítulo 1, se podrían considerar que están muy próximos al tamaño final del pez, tendríamos los siguientes resultados: Para las hembras del río Guadalete con una talla máxima de 410 mm, un descenso del reclutamiento de nuevas fibras a los 180 mm; para los machos con una talla máxima de 265 mm, de 116 mm; para las hembras del arroyo de Bocaleones con 316 mm, de 139 mm y para los machos con 246 mm de talla máxima, una parada a los 108 mm.

Los valores anteriores sobrepasan en muy poco a la talla alcanzada en la primera maduración, es decir, cuando los peces se convierten en adultos. En las hembras incluso, la hiperplasia persiste durante más tiempo en la etapa adulta, fenómeno que ocurre en ejemplares de gran tamaño y de un crecimiento rápido (Koumans y Akster 1995), siempre comparándolo con los machos de la misma especie. Aunque con nuestros resultados, a diferencia de los obtenidos con métodos histológicos, no podemos determinar con precisión el momento en el cual cambia el crecimiento muscular, si nos permiten diferenciar dos etapas muy claras en la dinámica de crecimiento (concentración de ADN) en esta especie y que el momento de cambio es diferente en el tiempo, y por tanto según el tamaño, entre las hembras y los machos.

Las hembras, de crecimiento más rápido y con una talla final mayor, poseen un intervalo más largo en su vida en los que el crecimiento del músculo se debe mayoritariamente al aumento de nuevas fibras musculares, mientras que en los machos el crecimiento muscular es debido más a la hipertrofia y ésta empieza cuando todavía son relativamente pequeños, si los comparamos con las hembras; esto mismo pero a nivel de especie fue encontrado por Weatherley y Gill (1985). En otras palabras, las hembras tendrán mayor número de fibras en sus miómeros en el momento que cesa o

se ralentiza el reclutamiento de nuevas fibras y todas ellas serán posteriormente capaces de incrementar su tamaño hasta el máximo diámetro permitido, lo que dará como resultado una mayor talla. Esta diferencia en la dinámica del crecimiento muscular, que es posible por la plasticidad de los peces (Weatherley 1990), se vería reflejado en el crecimiento somático total del individuo y por tanto, apoyaría la hipótesis planteada en el capítulo 1, en la cual nosotros proponíamos que el dimorfismo sexual se debía a un crecimiento dimórfico entre los sexos y no a una mortalidad diferencial. Otros autores, en una gran variedad de especies de distintas familias y tamaños, evidencian similares asociaciones entre tamaño, crecimiento y reclutamiento de sus fibras musculares (Weatherley y Gill 1987b).

Esta diferencia en la dinámica de crecimiento del músculo entre sexos, se ve potenciada por una mayor inversión en energía hacia el músculo por parte de la hembra, como se ve reflejado en la mayor concentración de ARN de éstas, medida en el músculo y en todas sus formas estudiadas, es decir, por peso de tejido y por célula. La medida del contenido en ARN por célula es mejor que la concentración sólo, porque la variación temporal del contenido de ADN hace necesario que la concentración de ARN sea relativizada al número de células. Pero esta mayor inversión somática por parte de las hembras, es distinta en el tiempo dependiendo de que población consideremos. Así, en la del río Guadalete las diferencias tienen lugar principalmente en verano e invierno, mientras que en la del arroyo de Bocaleones a finales de primavera y principio de verano, aunque cuando aparecen estas diferencias la inversión somática tiene distinta dirección entre las dos poblaciones. La población perteneciente al arroyo Bocaleones está incrementando su inversión, mientras que la del río Guadalete la está disminuyendo.

La variación temporal en la concentración de los ácidos nucleicos en el músculo blanco ha sido observada en las dos poblaciones en estudio, mostrando los sexos una dinámica más parecida en la población del río Guadalete que en la del arroyo de Bocaleones. Si se tiene en cuenta el número de células en el músculo blanco (concentración ADN/mg de peso), en los machos y las hembras adultas hubo un incremento gradual a principios de primavera y a principios de otoño en las dos poblaciones, y un incremento adicional en Agosto en los ejemplares capturados en el río Guadalete. Es probable que las altas concentraciones de ADN que hemos detectado, generalmente sean reflejo de un aumento del número de células por unidad de peso de tejido, debido a una disminución en el tamaño de las mismas (Nasiri 1972, Sable 1974, Ferguson 1990). Este descenso en el volumen celular contribuye a un aumento del espacio extracelular (mayor proporción de tejido conjuntivo rico en ADN) y a una disminución de algunos constituyentes celulares, hidratos de carbono, proteínas o lípidos musculares,

aunque en menor proporción en estos últimos (Love 1980). Es conveniente recordar que el *B. sclateri* se puede considerar un pez no graso; Lucena *et al.* (1983) encontraron en esta especie mayores concentraciones de proteínas que de lípidos corporales (≈ 16 g/100 g frente a ≈ 3 g/100 g). Por otro lado, Sanger *et al.* (1990) y Sanger (1992) en tres especies de ciprínidos descubrieron que los lípidos son muy escasos en el músculo blanco y se concentran más en el músculo rojo; por ejemplo en el *Rutilus rutilus* el músculo rojo presentó 2,7% de lípidos y el músculo blanco 0,01%. Esto es lógico si pensamos que el músculo blanco o anaerobio utiliza como combustible principal la glucosa, mientras que el músculo rojo o aeróbico utiliza la respiración, oxidando los ácidos grasos como combustible principal (Jobling 1995). En los trabajos de Sanger anteriormente citados, también se observó un mayor contenido de mitocondrias (mayor respiración) en el músculo rojo respecto al músculo blanco (en *R. rutilus* 27,7% frente al 1,4%). En general, la utilización de estos productos como fuente de energía producen como residuo agua (Lehninger 1982) y por tanto los recursos endógenos que los peces metabolizan son reemplazados por ella (Love, 1970, 1980, Sargent *et al.* 1989). A pesar de esto, los cambios del contenido húmedo no son evidentes si la demanda energética no es fuerte (Reid *et al.* 1993) o se redistribuyen mayoritariamente hacia otras parte del organismo en vez de catabolizarse y ocupar su lugar el agua (Von der Decken 1992). Encina (1991) realizó un estudio sobre la dinámica energética de *B. sclateri* en el río Guadalete y en el mismo lugar de este estudio, en la Figura V1.19 del estudio de Encina se observa, por un lado cambios muy débiles en el contenido de agua durante todo el año, a excepción de una elevación en Agosto, y por otro, un descenso del contenido energético desde principios de primavera (≈ 1.350 cal/g) al verano (≈ 1.100 cal/g).

Todo lo anterior nos permite aventurar que el aumento de la concentración de ADN en el músculo blanco, indicaría que el agotamiento muscular encontrado a principios de primavera, se debió más a las demandas energéticas de otras partes del organismo que del propio músculo, sobre todo, probablemente a la maduración gonadal (Mustafa 1977, Bulow *et al.* 1981, Iles 1984, Ware 1984, Montecchia *et al.* 1990). Wieser (1991) ha observado que durante el desarrollo gonadal, no durante la freza, existen muy pocos movimientos lineales espontáneos (musculatura blanca), que son los que consumen mayor energía en el músculo. En *R. rutilus*, Koch y Wieser (1983) demuestran como la actividad locomotora disminuye en proporción inversa a la maduración gonadal. Es decir, el barbo mostraría un cambio en la conducta al ralentizar sus movimientos, con el fin de economizar y por tanto, el pez disminuiría sus necesidades de mantenimiento. De esta forma, encauzaría la mayor parte de energía en la construcción de las gónadas, incluso como hemos visto utilizando la energía somática. Por el contrario, el agotamiento

muscular observado, en verano, de los ejemplares capturados en el río Guadalete, se debe mayoritariamente a las necesidades energéticas del músculo blanco. Estas necesidades estarían determinadas en gran parte por la alimentación, Encina (1991) encuentra como hay un aumento en el consumo de alimento por parte del barbo (*B. sclateri*) en el río Guadalete en verano, ya que éste es de peor calidad; por otro lado, Encina y Granado-Lorencio (1994) señalan que durante el verano el alimento permanece mucho más tiempo en el tubo digestivo. Es decir, las necesidades energéticas las podemos relacionar con una mayor actividad en la búsqueda del alimento y a un mayor consumo de energía en el tracto digestivo (mayor secreción enzimática). Esto último se ve potenciado por el incremento de la temperatura que se observa en verano en el río Guadalete, ya que según Love (1970) la secreción gástrica aumenta a mayor temperatura.

El agotamiento muscular es más puntual en los ejemplares capturados en el río Guadalete, es decir los cambios en el volumen celular son más drásticos, que en los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones. En esta última población se mantiene durante más tiempo el mismo tamaño celular en el músculo. Además, aunque se sigue produciendo un agotamiento muscular por la producción de las gónadas, el músculo se recupera gradualmente a partir de la reproducción hasta el invierno y no se interrumpe, como en el río Guadalete, durante el verano. Esto puede estar relacionado con la mayor estabilidad ambiental (menor variación de la temperatura, concentración de oxígeno, flujo del agua, anchura, profundidad, etc...) del arroyo de Bocaleones encontrada por Prenda (1993). En nuestro estudio, las condiciones del arroyo de Bocaleones durante el verano se pueden considerar mucho más favorables; por ejemplo, la temperatura del agua no sobrepasó los 18 °C y no hubo una disminución significativa del caudal, por lo que no se formaron pozas aisladas (disminución del espacio).

En general, las variaciones de la concentración de ADN y por tanto del número de células por peso de tejido, influyó en la concentración de ARN, ya que aunque la concentración por peso de tejido prácticamente no cambió durante el estudio, fue en estos periodos de incremento en el número de células, donde la inversión somática (ARN por célula) descendió significativamente. Es importante destacar que aunque la tasa de ARN/ADN disminuye a principio de la maduración gonadal, al tener en cuenta el periodo total de reproducción, la inversión somática parece que se incrementa durante y después de la freza, y que son las hembras las que presentan mayores valores, si bien nunca llegan en ningún caso a las tasas medidas en otoño en el río Guadalete y en verano en el arroyo de Bocaleones. Goolish *et al.* (1984) examinaron la relación entre la tasa de ARN/ADN, la tasa de crecimiento y la temperatura del agua en la carpa común (*Cyprinus carpio*).

La relación fue lineal ($R^2 = 0,760$) y definida como:

$$(1) \quad \text{ARN/ADN} = 3,85 + 0,707TC - 0,065Temp$$

donde TC es la tasa de crecimiento en peso fresco, $Temp$ es la temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$) y ARN/ADN es la concentración de ARN por célula. En el estudio de Goolish *et al.* se utilizó un rango de temperatura de 12 a 30°C , que incluye las medidas en este estudio durante primavera, verano y otoño. La ecuación (1) puede ser modificada estableciendo TC igual a cero y entonces reorganizada para dar como resultado:

$$(2) \quad \text{ARN/ADN} = T_{\text{crit}} = 3,85 - 0,065Temp$$

donde T_{crit} es lo que nosotros denominaremos tasa crítica, que podemos definir como la tasa de ARN/ADN teórica donde no hay inversión somática que produzca un crecimiento neto del pez a una temperatura específica. Este mismo procedimiento es el que utilizó Robinson y Ware (1988) aunque la definieron a partir de la relación con la tasa de crecimiento en proteínas.

Si utilizamos este valor crítico, en el periodo donde haya un incremento de la tasa de ARN/ADN pero con valores significativamente menores a él, no habría crecimiento neto del pez, sino más bien podemos considerar que existe un crecimiento de compensación. Esto es lo que se produciría a finales y después del periodo de reproducción; mientras que en los meses de mayores valores, es donde se puede considerar que se produce un crecimiento neto. En el caso del río Guadalete esto se produce en el mes de Septiembre ($\text{ARN/ADN} = 2,57$) y en el del arroyo de Bocaleones en los meses de Agosto y Septiembre ($\text{ARN/ADN} = 2,46$) para los dos sexos combinados, y en los cuales los valores son prácticamente iguales a la tasa crítica de 2,68, que es la que les corresponde por tener una temperatura de 18°C . Por el contrario durante la reproducción, por ejemplo para las hembras del río Guadalete la tasa de ARN/ADN en el mes de Mayo fue de 0,89 y en el mes de Junio de 1,17; mientras que en las del arroyo de Bocaleones en Mayo fue de 0,89 y en el mes de Junio de 1,44, siempre muy inferior a los 2,68 de la tasa crítica correspondiente a esos meses (la temperatura en Mayo y Junio de los dos lugares fue de 18°C). De todas formas estos resultados son simplemente indicativos, ya que Goolish *et al.* trabajaron con carpas de menos de un año, por lo que sería necesario determinar la tasa crítica a partir de una ecuación específica para la especie y para los distintos estados de su ciclo de vida (larva, juvenil, adulto). Pero la podemos utilizar para sentar las bases en el uso de los ácidos nucleicos en estudios de crecimiento de esta especie.

Se puede discriminar los momentos de compensación de crecimiento, con los verdaderos momentos en los que el pez invierte su energía sobrante

para el crecimiento somático. En el caso de los ejemplares del río Guadalete, tanto machos como hembras, presentan la misma dinámica y los mismos valores en el momento del año que podemos considerar de crecimiento neto, aunque los machos debido a que terminan la freza en peores condiciones el resultado sería de menor crecimiento. En los ejemplares del arroyo Bocaleones, hay diferencia en la duración, las hembras tendrían desde Junio a Septiembre un crecimiento neto, mientras los machos sólo en los meses de Agosto y Septiembre. Estas diferencias pueden explicar los tamaños alcanzados por cada sexo en cada una de las poblaciones. Si recordamos los capítulos anteriores, las hembras del río Guadalete son las que mayor tamaño final alcanzan, seguida en tamaños parecidos por los machos de esa misma población y las hembras del arroyo de Bocaleones y para terminar con los machos del arroyo de Bocaleones. Anteriormente se comentó que las hembras obtendrían mayor tamaño final, ya que la fase de reclutamiento de nuevas fibras musculares es más larga en éstas que en los machos, por lo que la igualdad en los tamaños finales entre machos del río Guadalete y hembras del arroyo Bocaleones, posiblemente se deba a la menor inversión en crecimiento de estas últimas. En general podemos determinar que en un río de régimen térmico mediterráneo, como es el caso del río Guadalete, el crecimiento neto se produce a principios de Otoño. Mientras que un cambio sustancial en las condiciones ambientales que produzcan una mayor estabilidad ambiental, como ocurre en el arroyo, produce un tiempo más amplio de crecimiento, aunque esto no suponga necesariamente un crecimiento final mayor.

Los ejemplares juveniles que no tienen porque dedicar energía para la maduración de sus gónadas, presentan un aumento de la inversión somática (ARN/ADN) a principios de primavera y otoño. Es importante destacar que no muestran el crecimiento de compensación en la época de reproducción, sino que incluso durante este periodo descienden su inversión hacia el soma. Posiblemente las larvas del año compitan por el espacio y por el alimento con los ejemplares juveniles. Aunque esto último necesita ser investigado en futuros estudios.

Dinámica del crecimiento del hígado

Igual que ha ocurrido con el músculo, es importante conocer como es la dinámica del crecimiento en el hígado. Los resultados muestran como los machos durante el ciclo anual, a medida que sus hígados ganaban peso, disminuía la concentración de ADN, o lo que es lo mismo las células hepáticas (hepatocitos) incrementaban su tamaño (hipertrofia). En las hembras por el contrario, el aumento de peso en el hígado no influyó en la concentración de ADN, por lo que el crecimiento de la masa hepática está determinada tanto

por hipertrofia como por un incremento en el número de células (Luquet y Hannequart 1971); esto permitirá a las hembras llegar a tener tamaños de hígado mayor y por tanto a un mayor almacenamiento de reservas. Por otro lado, en los machos la reducción de la masa hepática se debe principalmente a la disminución del tamaño celular y en las hembras a una reconstrucción celular, la cual probablemente incluya la reabsorción de la membrana y de los orgánulos celulares, con la consiguiente pérdida de células (Kent *et al.* 1992). Como el peso del hígado en las hembras del arroyo de Bocaleones cambia mucho menos y en menor cuantía que en los machos, pero a pesar de esto los cambios en peso se producen por hipertrofia, la forma de crecimiento del hígado estaría asociado genéticamente al sexo y no sería un resultado del almacenamiento *per se* que tengan cada uno en un momento determinado.

La variación temporal de los ácidos nucleicos en el hígado fue bastante diferente entre las dos poblaciones. Mientras los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones prácticamente no presentaban cambios en la concentración de ADN, a excepción de una subida en el mes de Agosto, los del río Guadalete mostraron claras diferencias en el ciclo anual, con incrementos en las concentraciones a finales de invierno y en pleno verano, es decir que las células hepáticas fueron más pequeñas en estos periodos del año. Si recordamos el capítulo 2, estas mismas diferencias entre las dos poblaciones ocurren a nivel de la masa hepática; los ejemplares del Bocaleones no presentan cambios relevantes en el peso del hígado durante el estudio, mientras que los peces del río Guadalete presentan aumentos fuertes del peso hepático en primavera y en otoño. Estas diferencias estarían relacionadas con el consumo de alimento, así en el río Guadalete es en primavera y otoño cuando el contenido energético del alimento consumido es mayor (Encina 1991) y esto se vería reflejado en un aumento de las reservas de glucógeno (Love 1979, 1980), lípidos (Nagai y Ikeda, 1971a,b) y proteínas (Bastrop *et al.* 1991) en el hígado. En el arroyo de Bocaleones la disponibilidad de alimento no cambia prácticamente durante todo el año, aunque es más baja que en el río Guadalete (Prenda 1993). Esto obliga a que el consumo de alimento se mantenga constante y bajo durante todo el año y no influya ni en el peso, ni en la concentración de ADN del hígado. Aunque esta conclusión estaría condicionada como es lógico, a un futuro estudio de alimentación de esta especie en el arroyo de Bocaleones. Sin embargo, esto concuerda con los resultados discutidos anteriormente sobre la constancia del tamaño celular en el músculo encontrados en los ejemplares del arroyo.

Igual que ocurrió en el músculo, la tasa de ARN/ADN del hígado es un parámetro más válido que la concentración de ARN por peso, debido a las fluctuaciones de la concentración de ADN. Los ejemplares capturados en el río Guadalete muestran también incrementos en el ARN por célula en primavera y otoño, pero aunque en este último periodo no hubo diferencias

entre machos y hembras, sí las hubo durante la primavera, donde las hembras presentaron mayores tasas de ARN/ADN. Aunque en este estudio hemos encontrado que la tasa de ARN/ADN del hígado está relacionada con el peso hepático en ambos sexos, Bastrop *et al.* (1992) señalan que también lo está con la capacidad metabólica de este órgano. Es decir, que aunque el hígado no gane en masa celular como resultado de un aumento de la ingesta alimenticia, los niveles de ARN/ADN nos indicarían los momentos en los que este órgano está siendo utilizado en el metabolismo general del pez, tanto por un aumento en la actividad (natación), como por procesos de crecimiento. Es importante destacar que estos procesos no tienen porque estar relacionados solamente con el crecimiento somático, por ejemplo pueden indicar crecimiento gonadal (Emmersen & Emmersen 1976, Buckley *et al.* 1985, Fauconneau 1990). La elevación del ARN en el hígado durante la primavera puede ser usado como una medida del esfuerzo reproductivo, que en el caso de las hembras del río Guadalete es mucho mayor durante la maduración de sus gónadas. Esto evidentemente está relacionado con la necesidad de una mayor inversión energética hacia los ovarios, cuando la comparamos con los testículos (Wooton y Evans 1976). Wooton (1990) indica que, en relación al esperma, cada huevo representa una mayor inversión citoplasmática y ya otros autores, Emmersen y Emmersen (1976), y más recientemente, Fauconneau (1990) han observado patrones similares y han discutido el papel del hígado en la producción de la proteína del huevo, la vitelogenina. La otra etapa del año donde se observa un incremento en la actividad del hígado es durante finales de verano y principio de otoño, esto correspondería con el crecimiento somático neto puesto de manifiesto anteriormente por la tasa de ARN/ADN del músculo. Del mismo modo, parte de la actividad del hígado durante la época de reproducción se dedica también a crecimiento somático, que en este caso particular se debe al crecimiento de compensación. De nuevo, como ocurrió con los niveles de ácidos nucleicos medidos en el músculo, los meses de verano e invierno producen una reducción de la actividad metabólica del hígado y por tanto del pez en general (Jürss y Bittorf 1990), fenómeno también observado por otros autores sobre todo durante el periodo estival, por ejemplo para *Lepomis macrochirus* por Bulow *et al.* (1978, 1981).

En cuanto a los ejemplares juveniles del río Guadalete, éstos muestran una mayor actividad del hígado a principios de primavera y en otoño, que también corresponden con los momentos de inversión somática medidos mediante la tasa de ARN/ADN del músculo. Las diferencias entre los dos estados del pez en su ciclo de vida (juveniles frente a maduros) indican que cuando el pez no necesita dedicar energía para las actividades reproductoras, no lo hace tampoco hacia el músculo como vimos anteriormente.

La actividad metabólica del hígado en los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones, es bastante diferente a la encontrada en los capturados en el río Guadalete. Las hembras prácticamente mantienen una actividad constante durante todo el año, no presentando diferencias durante la maduración gonadal, esto está unido también a que los pesos del hígado no cambian durante el año. Es decir, las hembras invertirían menos en sus gónadas que las del río Guadalete y utilizarían menos el hígado en sus actividades de crecimiento. Los machos del arroyo si muestran una actividad parecida a los del río Guadalete, con un incremento a principios de primavera y en otoño, que corresponden con los momentos de crecimiento somático observados anteriormente. En general, en los machos de ambas poblaciones la construcción de sus gónadas no incluye energía suplementaria. Parece probable que ellos usen sus almacenamientos de energía en actividades relacionadas con la freza. Poncin (1988) en cautividad y Baras (1992) en medio natural, han descrito la conducta reproductora en *Barbus barbus*, estos autores observaron como los machos invierten gran energía en la fase de prereproducción (desplazamiento, formación de agregados, competencia por la fertilización...) e incluso la gran cantidad de machos presentes en las áreas de freza determina que tengan limitado cuantitativamente el alimento; además esta fase de prereproducción dura bastante tiempo, ya que los machos maduran antes en el año para poder estar presentes y preparados en los frezaderos. En este sentido, Baras (*op. cit.*) señala que debido al alto coste que conlleva la reproducción en los machos, éstos intentan maximizar el éxito reproductivo, constituyendo agregados cortesanos (courting males) y agregados no cortesanos (non-courting males), que alternan durante la freza. El paso de una estrategia a otra, según Baras (*op. cit.*), es determinado por la capacidad energética del macho, dependiendo de la disminución progresiva de su estado de forma (fitness).

Aunque la temperatura juega un papel importante en la composición en proteínas, hidratos de carbono y lípidos del hígado, y en parte podría explicar las diferencias en el desarrollo y en la actividad de este órgano entre las dos poblaciones, otros factores, como indica Kent *et al.* (1992), particularmente las deficiencias en la dieta, pueden también influir en su actividad. El hígado muestra en este estudio una gran plasticidad en respuesta por una parte, a los cambios estacionales de múltiples factores ambientales y por otra, a las demandas de crecimiento propias de la especie y de cada sexo.

Dinámica del crecimiento de las gónadas

A la hora de utilizar el contenido de los ácidos nucleicos de las gónadas, se nos plantea el problema de que en éstas, a diferencia del músculo y del hígado, la cantidad de ADN por célula varía a lo largo de la formación del

tejido gonadal (gametogénesis). Como indica Torrey (1978), el núcleo del gametogonio (ovogonia o espermatogonia) contiene dos de cada uno de los tipos de cromosomas (al igual que cualquier célula ordinaria del cuerpo), y por tanto, dos de cada uno de los tipos de genes, pero en los núcleos de los gametos deben reducirse a sólo un representante de cada uno de los tipos. Esta reducción se lleva a cabo mediante una secuencia de dos divisiones, que se denominan divisiones *meióticas*, o de maduración (*meiosis*). Al final del proceso de maduración se obtienen cuatro gametos, que en el caso de la hembra sólo uno es funcional, el óvulo, puesto que los otros tres se convierten en los cuerpos polares (De Robertis *et al.* 1973, Jobling 1995). La descripción de la gametogénesis que hacen estos últimos autores, es la que vamos a seguir para poder entender nuestros resultados, sobre todo aquellos que se refieren a la concentración de ADN.

Los datos muestran claramente como a medida que aumenta el peso de la gónada de los machos en ambas poblaciones, aumenta la concentración de ADN por peso de ésta. Esto indica que la medida de la cantidad de ADN nos está dando información del almacenamiento de los espermatozoides en los conductos espermáticos y testiculares durante la espermatogénesis, ya que la creación de cada nuevo gameto se acompaña de la síntesis de la cantidad apropiada de ADN (Love 1970). Cuando los testículos alcanzaron su máxima maduración, los machos capturados en el arroyo de Bocaleones mostraron mayores concentraciones de ADN en sus gónadas, aunque los pesos de éstas fueron menores que las de los capturados en el río Guadalete. Esto indica que aunque el volumen del fluido seminal en los machos del arroyo fuera menor, posiblemente la concentración de espermatozoides fuera superior, como una forma de contrarrestar lo primero y aumentar la fertilidad. Pero no hay que olvidar que el fluido seminal es el responsable de la nutrición de los espermatozoides (Lahnsteiner *et al.* 1994a), y una disminución en el volumen podría influir en la calidad del esperma. A pesar de esto, independientemente de la población de donde procedan los machos, la concentración de ADN por peso no varía ni con la edad, ni con el tamaño del individuo. Además, como el peso de los testículos está correlacionado positivamente con el tamaño del pez (ver capítulo 2), quiere decir que los ejemplares mayores tendrán mayores testículos debido, no sólo al aumento del fluido seminal, sino también a la cantidad total de espermatozoides, en otras palabras, la calidad del esperma, medida por el número de espermatozoides por peso, no disminuye aunque aumente el peso de la gónada. Por otro lado en las dos poblaciones, cuando disminuye el peso de las gónadas de los machos después de la freza, todavía se mantiene igual de alta la concentración de ADN durante un par de meses más, indicando que esta medida es más precisa que el peso para estimar la potencialidad reproductora de los machos en la población. Por otro lado, durante el resto del año aunque la concentración baje, ésta se mantiene

relativamente alta. Zhukinsky y Bilko (1984) encontraron degeneración de los espermatozoides en la carpa una vez que terminó la freza, pero para Billard *et al.* (1986) sólo sería de células espermáticas que estuvieran en los conductos espermáticos, donde según Lahnsteiner *et al.* (1994b) se producirían procesos de auto y heterofagocitosis; por lo que podrían encontrarse espermatozoides durante todo el año (Saad *et al.* 1986).

En general, hemos encontrado que en los primeros momentos de la espermatogénesis hay un aumento de la concentración de ARN, pero a medida que el peso de la gónada aumenta hay una disminución en el contenido de ARN por peso de tejido y de la tasa de ARN/ADN. En los trabajos de Lahnsteiner *et al.* (*op. cit.*) sobre los conductos testiculares y espermáticos en tres especies de ciprínidos (*Alburnus alburnus*, *Leuciscus cephalus*, *Vimba vimba*), se señala que en estos conductos se sintetiza esteroides, proteínas y enzimas. Esto no estaría en contradicción con nuestros resultados, ya que la masa de esperma es mucho mayor y diluiría el ARN de los conductos. Además durante la espermatogénesis la síntesis de ARN cesa prácticamente (De Robertis *et al.* 1973), los espermatozoides reducen su citoplasma al máximo mediante las células de Sertoli (Guyton 1985), y entre las moléculas que pierden se encuentran las de ARN que ya no son necesarias en el crecimiento del gameto (De Pomerai 1970).

Hay una diferencia muy importante entre la espermatogénesis y la ovogénesis. En la primera, cuando termina la maduración se forman por completo los gametos y por tanto termina la meiosis, pero en la ovogénesis de la mayoría de los vertebrados el ovocito completa su primera división e inicia la segunda, en medio de la cual se detiene hasta que se presenta la fertilización (Torrey 1978). Esto ocurre también en los peces teleósteos, es decir, que cada ovocito maduro (huevo) contiene dos juegos de cromosomas maternos en el momento de la freza (Jobling 1995). En el caso concreto de los ciprínidos, Billard *et al.* (1986) señalan que el ovocito ovulado permanece en la metafase II de la meiosis hasta que se activa por dilución en el agua. Esto es un aspecto importante, porque cuando nosotros analizamos los ovarios, aún en su máximo desarrollo, no se ha producido la segunda división meiótica y como en la maduración del óvulo se adquiere gran cantidad de reservas alimenticias, sería lógico por tanto esperar una reducción en la cantidad de ADN por peso, no por la reducción de la dotación cromosómica del ovocito, sino por el aumento del tamaño de éste (dilución de la concentración de ADN). Los resultados de nuestro estudio muestran claramente este proceso en las dos poblaciones durante la maduración de los ovarios. Aunque en las hembras del río Guadalete, hay un descenso de la concentración de ADN por peso de tejido ovárico a medida que aumenta el peso de éste, en las hembras del arroyo de Bocaleones no existe esta correlación (ver más adelante). En el caso de esta especie, *B. sclateri*, el óvulo

aumenta desde los 0,79 mm (huevos opacos) hasta los 2,03 mm (huevos maduros) (Herrera y Fernández-Delgado 1992). La evolución temporal de la concentración de ADN en los ovarios, muestra que una vez que se termina la época de reproducción, aumenta la concentración y permanece así hasta un nuevo aumento en la próxima maduración. Esto puede ser explicado por la permanencia de ovocitos transparentes de un diámetro máximo igual o incluso menor a 0,5 mm durante el periodo de quiescencia de los ovarios (Herrera y Fernández-Delgado *op. cit.*) y por el aumento del tejido conjuntivo rico en ADN (Love 1980).

Al contrario de lo que pasaba en la espermatogénesis, durante la ovogénesis la concentración de ARN aumenta a medida que las gónadas maduran, aunque en las hembras capturadas en el arroyo de Bocaleones este aumento, aunque existe, no es significativo. En condiciones normales durante la ovogénesis, hay una síntesis intensa de las distintas formas de ARN y de proteínas (De Robertis *et al.* 1973), aún cuando estas últimas en forma más limitada, ya que provienen también de otras partes del organismo (Torrey 1978, Love 1980, Carragher y Sumpter 1991). Las altas concentraciones de ARN del huevo maduro, no sólo son necesarias para la elaboración del nuevo citoplasma, sino que se mantendrán hasta después de la fertilización para dirigir y regular los procesos claves que tendrán lugar en los primeros momentos de la embriogénesis (De Pomerai 1970). El aumento de la concentración de ARN después de la freza, a partir de Agosto o Septiembre, en los dos sexos y en cada una de las poblaciones, se mantiene hasta la próxima etapa de reproducción, lo que indica que existe actividad en los tejidos gonadales y por tanto la activación de la gametogénesis encontrada para esta especie por Herrera (1991).

Las hembras capturadas en el arroyo de Bocaleones presentan características peculiares en cuanto a su reproducción. Por una parte, como vimos en el capítulo 2, no presentan variación significativa del peso de sus gónadas, lo que explica que no exista correlación del peso con la concentración de los ácidos nucleicos gonadales (ADN, ARN), pero sí hace que obtengan menor concentración de ADN que las hembras capturadas en el río Guadalete. Esto podría indicar un menor esfuerzo reproductivo de las hembras del arroyo, ya que el número de huevos presumiblemente sería menor y estos serían además más pequeños, influyendo por tanto en la calidad de los mismos. Este fenómeno, estaría ligado con la dinámica en el funcionamiento del hígado que vimos anteriormente y que indicaba también un menor esfuerzo durante la reproducción de las hembras del arroyo. Este comportamiento de las gónadas, aunque utilizando el IGS, también fue encontrado por Rodríguez-Ruiz (1992) en otros lugares del río Guadalete, aguas abajo del punto de muestreo de este estudio, donde existía una menor calidad ambiental. Esta autora lo atribuía al bajo número de ejemplares

capturados, aunque la fecundidad encontrada por ella en estos ejemplares, no fue distinta a la que encontró en el punto de muestreo de nuestro estudio, por lo que también en estas partes del río las hembras podrían producir huevos de menor tamaño.

Al igual que pasaba con los machos, en las dos poblaciones no influye la edad ni el tamaño en la concentración de ADN de los ovarios cuando éstos alcanzan su máximo desarrollo, es decir, no hay diferencias en el tamaño del huevo a medida que aumenta la longevidad de la hembra. Estos mismos resultados son los encontrados por Herrera (1991), en su estudio, la longitud de la hembra explicaba sólo el 15,68% de la variabilidad en el diámetro de los ovocitos vitelados. Según Wootton (1990) esto sería lo esperado, ya que la talla del huevo no tiene porque depender del tamaño del pez, sino de las condiciones a las que deben enfrentarse el huevo y la larva. En condiciones extremas de calidad del hábitat, como las encontradas por Herrera y Fernández-Delgado (1992), la selección del tamaño óptimo del huevo en *B. sclateri* es posible gracias a que esta especie puede desovar una segunda vez y por tanto, eludir el conflicto entre número y calidad de los mismos.

Discusión general

Habida cuenta de la gran dificultad que tienen los estudios en medio natural, podemos considerar que hemos logrado cumplir con los dos importantes objetivos que se fijaron inicialmente: Demostrar que el otolito es una herramienta útil y necesaria para los estudios de edad y crecimiento en el *B. sclateri*, y que con los ácidos nucleicos podemos valorar la distribución de los recursos de esta especie hacia el crecimiento, la supervivencia y la reproducción. Nuestros resultados, basados en nuevas metodologías para esta especie, describen con más precisión ciertos aspectos de la biología del barbo, que nos ayudan a comprender mejor su ciclo de vida.

Comentábamos en la introducción de esta memoria, que las estrategias en los ciclos de vida de los peces son extraordinariamente complejas. Una evidencia de esta complejidad, es cuando por ejemplo nos preguntamos por qué una especie en un lugar determinado es de un tamaño; las respuestas típicas sugieren posibles razones climáticas, propiedades metabólicas, competencia interespecífica, interacciones depredador-presa, disponibilidad del alimento, etc... Pero como estas causas no son mutuamente excluyentes, no nos ayudan a determinar el tamaño óptimo de esa especie, o si el tamaño es el óptimo para ese lugar. Necesitamos enmarcar nuestros resultados en los modelos basados en la distribución óptima de los recursos, es decir, entender como se optimiza la distribución de recursos para el crecimiento, supervivencia y reproducción desde el nacimiento hasta la muerte del organismo. Por ejemplo, Kozłowski (1992) señala que un organismo es pequeño generalmente no porque esa pequeñez desarrolle fecundidades o mortalidades más bajas, sino porque necesita más

tiempo para alcanzar tamaños grandes; si este organismo presenta fuertes mortalidades, la inversión en crecimiento nunca sería compensada por un incremento en la fecundidad. Así, termina este autor, el tamaño óptimo depende en gran medida de la mortalidad, pero ésta depende del tamaño; esta relación recíproca es sin duda el origen de la gran variabilidad en las estrategias de vida que encontramos en la naturaleza.

Nuestros resultados han mostrado que *B. sclateri* es una especie de crecimiento lento y relativamente un pez de vida larga. Las dos poblaciones que hemos estudiado, presentaron diferencias en el crecimiento y por tanto en el tamaño final, aunque las dos mostraron una longevidad parecida. La edad estimada en este estudio, para las clases de longitud mayor, ha sido superior a la de todos los estudios realizados sobre esta especie (Lucena y Camacho 1978; Lucena *et al.* 1979; Lucena 1984; Herrera *et al.* 1988; Herrera y Fernández-Delgado 1992; Rodríguez-Ruiz 1992), por lo que las edades máximas encontradas aquí son las mayores. Casselman (1990) señala que cuando se interpreta la edad o el crecimiento a partir de una estructura calcificada, los resultados no tienen porque coincidir con los basados en otra estructura. Nuestro estudio es el único que ha utilizado el otolito para estimar la edad en *B. sclateri*. Aunque nosotros no hemos comparado varias estructuras, estas diferencias encontradas con los demás trabajos pueden haber sido también debidas a que por un lado, con las vértebras es difícil estimar la edad exacta en *B. sclateri* a partir de los ocho años (Lucena y Camacho 1978) y por otro, con las escamas se subestima la edad en los peces de crecimiento lento, es decir en los más viejos (Ombredane y Bagliniere 1992).

Independientemente del lugar, las diferencias en el tamaño entre los sexos (las hembras fueron más grandes que los machos de igual edad) se debió a una diferencia en el crecimiento ligada al sexo y no a una mortalidad diferencial. Roff (1983) clasificó a los peces de agua dulce de América del Norte en tres grupos. En el primer grupo incluye los machos que son territoriales pero no muestran cuidados parentales de los huevos y de la descendencia. El segundo grupo incluye a aquellas especies en las cuales los machos construyen y cuidan el nido. El tercer grupo consta de aquellas especies cuyos machos no poseen territorio y no cuidan su prole. Para este autor, hay una clara asociación entre el tamaño relativo del macho y su conducta reproductora. Los machos de las dos primeras categorías son mayores que las hembras, mientras que en la última son más pequeños. El macho de *B. sclateri* entraría a formar parte del tercer grupo, respecto a su conducta reproductora y a su diferencia en el tamaño. Este dimorfismo sexual lo hemos detectado a partir de la primera maduración, fenómeno que ocurre en muchas especies y sobre todo en ciprínidos (Mann 1991). Los machos de *B. sclateri* alcanzan su madurez sexual un año antes que las hembras, esto quiere decir que ellas poseen un año más donde el crecimiento sólo es somático. Pero, si por regla general se asume que la hembra gasta mucha más energía en la

maduración de sus gónadas que los machos (Wootton 1990), ¿Cómo se explica que éstos crezcan menos? ¿Es suficiente ese año extra de las hembras para producir el dimorfismo sexual en el tamaño?

Creemos que la conducta reproductora de los machos es en parte responsable de un mayor gasto energético de éstos en la reproducción; la formación de agregados cortesianos y no cortesianos, probablemente requieran un incremento en los costes energéticos, y además pueden limitar la entrada de alimento. Suponiendo que la conducta sea similar a la descrita para *B. barbatus* por Baras (1992) y Poncin (1993). Pero nosotros hemos podido descubrir con el estudio de los ácidos nucleicos, que efectivamente los machos invierten menos energía hacia sus gónadas, pero también hacia su músculo esquelético. Además, el año extra le permite a la hembra mantener mucho más tiempo el predominio del reclutamiento de nuevas fibras musculares, sobre el aumento del tamaño de estas fibras. Esto le confiere a la hembra un número mayor de fibras que pueden crecer, y si a esto le unimos que la hembra invierte más energía hacia el músculo esquelético, el resultado será que los tamaños que alcanzan son mayores.

Por otro lado, hemos confirmado la mayor sensibilidad de los métodos bioquímicos sobre los tradicionales. El uso de los ácidos nucleicos nos ha permitido detectar procesos de crecimiento que con los métodos gravimétricos no fueron detectados. Por ejemplo, el aumento de peso del hígado comparte temporalidad con los aumentos en la concentración de ARN por célula (ARN/ADN), pero de una manera puntual; ya que en otros momentos del año, se detectó actividad hepática que no producía variaciones en el peso del hígado. Esto último está relacionado, junto con los resultados de los ácidos nucleicos del músculo, con una de las más importantes novedades que creemos aporta nuestro estudio, el uso de los ácidos nucleicos nos permite descubrir que en general, el pico de productividad del sistema mediterráneo en primavera, lo utilizan los adultos para reproducirse y recuperarse de la reproducción, y el de otoño para crecer; mientras que los juveniles utilizan los dos picos para crecer.

El crecimiento neto que descubrimos a principios de otoño está unido al mayor crecimiento de la banda opaca del otolito, que detectamos con el análisis del incremento marginal. Esto apoya la idea de que la banda opaca en el otolito de *B. sclateri* corresponde con una zona de crecimiento rápido y que posiblemente estaría formado por incrementos diarios más anchos que la zona translúcida (Morales-Nin 1987, 1989; Morales-Nin y Ralston 1990). Además estos resultados indican que el crecimiento del otolito y la formación de las zonas, no están sólo bajo el control de la temperatura del agua, sino de la combinación de varios factores (Beckman y Wilson 1995). Por ejemplo, en un principio pensábamos que los otolitos de los ejemplares capturados en el arroyo de Bocaleones, podrían no mostrar una alternancia clara de anillos translúcidos y opacos, debido a la menor variación en el régimen térmico del arroyo. Pero los resultados han mostrado que no existen diferencias en la formación de los anillos

con respecto a la población del río Guadalete; los pequeños cambios diarios en la temperatura y en otros factores, son suficientes para influir en la microestructura y microquímica del otolito y por tanto influir en la formación y crecimiento macroestructural del mismo (Morales-Nin com. per.). Este mismo fenómeno ocurre en algunas especies de peces tropicales sujetos a ambientes constantes y no estacionales (Morales-Nin 1994; Fowler 1995).

La combinación de los ácidos nucleicos y del otolito ha sido usada en los estudios de crecimiento en peces (Kalish 1989; Hovenkamp 1990; Hovenkamp y Witte 1991), porque parece que el crecimiento diario del otolito y la tasa de ARN/ADN están afectados por los mismos mecanismos (Ueberschär y Clemmensen 1992). Esto determina que, por ejemplo, el uso conjunto de los dos sería un buen método para futuros estudios del reclutamiento de *B. sclateri*; ya que como señalan Moksness *et al.* (1995), por una parte, la técnica del ARN/ADN podría ser usada para identificar larvas moribundas, y por otra, las técnicas sobre la microestructura del otolito de las larvas de más edad, podrían ser usadas para retrocalcular sus tamaños en fechas anteriores. También con estas dos técnicas y con la utilidad potencial del otolito en los estudios de biocronología, que hemos puesto de manifiesto en este trabajo, nos permite planificar estudios más precisos en las relaciones entre los cambios diarios del ambiente y el crecimiento diario del pez.

El crecimiento de *B. sclateri* es un proceso plástico, tanto por las diferencias entre sexos como por las interpopulacionales, que puede cambiar considerablemente en respuesta a factores ambientales. Hemos visto que por una parte, las hembras del arroyo de Bocaleones aunque maduren un año antes que los machos, no muestran una diferencia de tamaño tan grande con éstos, como las del río Guadalete. El arroyo de Bocaleones posee una menor disponibilidad de alimento que el río Guadalete, a pesar de mostrar una estabilidad ambiental mayor (Prenda 1993). Pero aunque este crecimiento pueda ser modificado por el ambiente, no es del todo un cambio azaroso, sino que el pez muestra un alto grado de conservación de los patrones de crecimiento específicos de su especie (Weatherley 1992). Hemos visto que nuestros datos de crecimiento se han ajustado muy bien a la función de von Bertalanffy, la cual se basa en un modelo determinista del modo de crecimiento (Radtke y Hourigan 1990), pero los parámetros de la función varían entre sexos y entre poblaciones. Así, los individuos del mismo sexo (componente genético) muestran la misma k de la función de von Bertalanffy y distintas L_{∞} ; es decir, cada sexo muestra una misma tasa de desarrollo (Jobling 1995), y el ambiente es el que determina la longitud máxima, que en definitiva es una medida del crecimiento acumulado del pez durante el transcurso de su vida.

Todos nuestros resultados están en la línea de los modelos de distribución de recursos hacia el crecimiento y reproducción, propuestos por Roff (1983) y Kozlowki y Uchmanski (1987). Estos modelos asumen que existe una cantidad fija

de energía (surplus energy) que puede ser canalizada hacia el tejido somático y gonadal (Ware 1980). Este excedente es la energía que "sobra" después de que el pez utilice la energía neta obtenida del alimento para su metabolismo fundamental y para su movimiento (Hiyama y Kitahara 1993). En un trabajo reciente sobre las mismas poblaciones de nuestro estudio, Prenda y Granado-Lorencio (en prensa) encontraron una correlación positiva entre la tasa de movimiento y el crecimiento en la población del arroyo de Bocaleones, mientras que no encontraron tal correlación en la del río Guadalete; en esta última la correlación fue entre la tasa de movimiento y el tamaño del pez (metabolismo basal). Estos autores argumentan que por una parte, en la población del río Guadalete cualquier incremento de la tasa de movimiento que supere a las demandas metabólicas del tamaño, tenderá a producir una reducción en la ganancia neta; y que en la población del arroyo de Bocaleones el crecimiento del pez aumentará si éste incrementa su tasa de movimiento. Nuestros resultados muestran claramente, que la población del río Guadalete aumenta su excedente de energía (surplus energy), y por tanto el crecimiento y la reproducción, por lo que es capaz de controlar que su tasa de movimiento nunca exceda de los requerimientos metabólicos. También encontramos, que la población del arroyo de Bocaleones no es capaz de aumentar sus excedentes energéticos simplemente con los movimientos. De esta forma el arroyo de Bocaleones, aun mostrando una mayor estabilidad ambiental, influye más negativamente en el ciclo de vida de *B. sclateri*.

Podemos concluir, que aunque asumamos que la distribución de energía hacia el crecimiento, supervivencia y reproducción es un mecanismo fisiológico invariante (fijación filogenética), las estrategias del ciclo de vida de *B. sclateri* no pueden ser explicadas sólo desde este punto de vista. Las diferentes adaptaciones a las condiciones ambientales (bióticas y/o abióticas) encontradas en las dos poblaciones de *B. sclateri*, se pueden considerar como respuestas conducentes a optimizar el reparto de recursos a las tres funciones. Y conocer la relación entre este reparto y la Eficacia Reproductora resultante del mismo (*fitness*), nos ayuda a calcular el grado de optimización del ciclo de vida de la especie. Pero encontrar diferentes *fitness*, no significa necesariamente distintos grados de optimización (De Jong 1994). Nuestros resultados nos indican, que la población del arroyo de Bocaleones muestra un menor crecimiento y posiblemente, una menor eficacia reproductora; pero esto no significa que esta población optimice peor los recursos que la del río Guadalete, es que en este último lugar los recursos están menos limitados.

Conclusiones

1. El otolito, y en concreto el *lapillus*, es una estructura válida para los estudios de edad y crecimiento de *Barbus sclateri*. En este otolito, una banda opaca y una translúcida se forman en diferentes momentos del año y la combinación de una y otra es de naturaleza anual.
2. Las variables que definen el tamaño del otolito (radio, diámetro y peso) y del pez (longitud y peso) pueden usarse como estimadores de la edad individual. Pero para obtener mayor exactitud en la edad, es más recomendable contar los *annulli* del otolito. El peso del otolito es capaz de discriminar la edad cuando la diferencia de ésta entre los individuos, es igual o mayor a dos años.
3. En cuanto al retrocálculo, hemos podido comprobar que los métodos de Fraser-Lee dan resultados satisfactorios y en concreto, el de la Intersección Biológica. También la utilización de los *annulli* más recientes aumenta el grado de precisión del retrocálculo, ya que el crecimiento del pez y la edad influyen en el crecimiento del otolito.
4. El uso del otolito nos ha permitido conocer que el ciclo de vida de las poblaciones de *Barbus sclateri* estudiadas por nosotros, se caracteriza por un crecimiento lento y una vida relativamente larga. Los machos maduran entre los 4 y 5 años, y las hembras entre los 5 y 6 años. El dimorfismo sexual en el tamaño encontrado en esta especie, se debe a una diferencia en el crecimiento entre los sexos y no a una longevidad diferencial.

5. El estudio de los ácidos nucleicos es una técnica capaz de valorar la distribución de los recursos de *Barbus sclateri* hacia el crecimiento, la supervivencia y la reproducción. Con este método hemos podido detectar cambios en el crecimiento y la reproducción, no revelados con los métodos gravimétricos tradicionales.
6. La temperatura por si sólo no puede considerarse que influya en la concentración de los ácidos nucleicos. Por tanto, los mecanismos homeostáticos del pez frente a la variación estacional de la temperatura del agua, no es capaz de enmascarar las variaciones temporales e interpoblacionales, debidas a procesos de crecimiento, encontradas en los ácidos nucleicos.
7. El crecimiento en ambos sexos disminuye en el momento de la maduración sexual. En las hembras se debe principalmente a la mayor inversión detectada hacia las gónadas y en los machos, con una inversión gonadal menor, posiblemente se deba a un gasto mayor en las actividades asociadas a la freza.
8. La dinámica del crecimiento muscular y el momento de maduración influyen de una forma importante en las diferencias del tamaño entre sexos. En general, esta dinámica confiere a esta especie un crecimiento potencial, que tiene que ser acompañado por una entrada y una distribución óptima de los recursos, para que el crecimiento muscular consiga sus niveles máximos.
9. Hemos comprobado que la concentración de los ácidos nucleicos en el hígado nos permite interpretar mejor los procesos de crecimiento muscular. Pero además, es capaz de reflejar actividades de crecimiento que están teniendo lugar en otras partes del organismo, como por ejemplo, la maduración gonadal. En este caso, los ácidos nucleicos de las gónadas también nos ayudan en entender mejor su propia dinámica de crecimiento.
10. En un río de régimen térmico mediterráneo, como es el río Guadalete, el crecimiento neto se produce a principios de Otoño. Un cambio sustancial en las condiciones que produzca una mayor estabilidad ambiental, como ocurre en el arroyo de Bocaleones, produce un tiempo más amplio de crecimiento, aunque esto no suponga necesariamente un crecimiento final mayor.
11. En las dos poblaciones de *Barbus sclateri* estudiadas, la forma de distribuir los recursos hacia el crecimiento, la supervivencia y la reproducción, definido por la estrategia de la especie (fijación filogenética), es modificada por las características ambientales (factores bióticos y abióticos) del tramo fluvial donde se encuentre, con el fin de optimizar su ciclo de vida.

Referencias citadas

- Adams, S.M. y R.B. McLean. 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, 26:111-126.
- Allan, J.D. 1995. *Stream Ecology. Structure and function of running waters*. Chapman & Hall, London. 388 pp.
- Bagenal, T.B. 1974. Editor. *The ageing of fish*. Unwin, London, 234 pp.
- Bagenal, T.B. y F.W. Tesch. 1978. Age and growth. En T. Bagenal (De.). *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters*, IBP Handbook N° 3. 3rd edn. Blackwell: Oxford. pp. 101-130.
- Baillon, N. 1992. Otolithometrie: Revue et problemes. En J.L. Baglinière, J. Castanet, F. Conand, and F.J. Meunier (Ed.). *Tissues durs et âge individuel des Vertébrés*, Colloque National, Bondy, France, 4-6 mars 1991. Colloques et Séminaires ORSTOM-INRA, Paris. pp.21-52.
- Baltz, D.M. 1990. Autecology. En C.B. Shreck y P.B. Moyle (Ed.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 585-607.
- Baltz, D.M. y P.B. Moyle. 1982. Life history characteristics of tule perch (*Hysterocarpus traski*) populations in contrasting environments. *Environmental Biology of Fishes*, 7:229-242.
- Baras, E. 1992. Etude des stratégies d'occupation du temps et de l'espace chez le barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (L.). *Cahiers d'Ethologie*, 12(2-3):125-442.
- Bastrop, R., K. Jürss & R. Wacke. 1992. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 102(1):151-161.
- Bastrop, R., R. Spangenberg y K. Jürss. 1991. Biochemical adaptation of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) to food deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 98(1):143-149.
- Beamish, R.J. y G.A. McFarlane 1987. Current trends in age determination methodology. En R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 15-42.
- Beardall, C.H. y I.A. Johnston. 1982. Muscle atrophy during starvation in a marine teleost. *Journal Cell Biology*, 29:209-217.

- Beckman, D.W. y C.A. Wilson. 1995. Seasonal timing of opaque zone formation in fish otoliths. *En* Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 27-43.
- Beckman, D.W., A.L. Stanley, J.H. Render & C.A. Wilson. 1990. Age and growth of Black Drum in Louisiana Waters of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society* 119:537-544.
- Bennington, C.C. y W.V. Thyne. 1994. Use and misuse of mixed model analysis of variance in ecological studies. *Ecology*, 75(3):717-722.
- Bergeron, J.-P. y M. Boulhic. 1994. Rapport ARN/ADN et évaluation de l'état nutritionnel et de la croissance des larves de poissons marins: un essai de mise au point expérimentale chez la sole (*Solea solea* L.). *ICES Journal marine Sciences*, 51:181-190.
- Billard, R., J.L. Gatty, M.G. Hollebecq, J. Marcel y A. Saad. 1986. Biology of gametes, eggs and embryos. Páginas 151-164. *En* R. Billard et J. Marcel Editores. *Aquaculture of Cyprinids*, INRA, París.
- Boehlert, G.W. 1985 Using objective criteria and multiple regression models for age determination in fishes. *U.S. Fishery Bulletin* 83:103-117.
- Boehlert, G.W., M.M. Yoklavich y D.B. Chelton. 1989. Time series of growth in the genus *Sebastes* from the northeast Pacific ocean. *Fishery Bulletin* 87:791-806.
- Bradford, M.J. y G.H. Geen. 1987. Size and growth of juvenile chinook salmon back-calculated from otolith growth increments. *En* R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 453-462.
- Brown, M.L. y B.R. Murphy. 1991. Relationship of relative weight (W_t) to proximate composition of juvenile striped bass and hybrid striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 120:509-518.
- Buckley L.J. y F.J. Bulow. 1987 Techniques for the estimation of RNA, DNA, and protein in fish. Páginas 345-354 *en* R. C. Summerfelt & G. E. Hall, editores. *Age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames.
- Buckley, L. J., T. A. Halavik, G. C. Laurence, S. J. Hamilton & P. Yivich. 1985. Comparative swimming stamina, biochemical composition, backbone mechanical properties, and histopathology of juvenile striped bass from rivers and hatcheries of the eastern United States. *Transactions of the American Fisheries Society* 114:114-124.
- Bulow, F. J. 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. *Journal of Fisheries Resarch Board of Canada*, 27:2343-2349.
- Bulow, F. J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. Páginas 45-64 *en* R. C. Summerfelt & G. E. Hall, editores. *Age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames.
- Bulow, F.J., C.B. Coburn, JR. y C.S. Cobb. 1978. Comparisons of two bluegill populations by means of the RNA-DNA ratio and liver-somatic index. *Transactions of the American Fisheries Society*, 107(6):799-803.
- Bulow, F.J., M.E. Zeman, J.R. Winningham y W.F. Hudson. 1981. Seasonal variations in RNA-DNA ratios and in indicators of feeding, reproduction, energy storage, and condition in a population of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. *Journal of Fish Biology*, 18:237-244.
- Busacker, G.P., I.R. Adelman y E.M. Goolish. 1990. Growth. *En* Schreck, C.B. y P.B. Moyle (eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 363-387.

- Buxton, C.D. y J.R. Clarke. 1986. Age, growth, and feeding of the blue hottentot, *Pachumetopon aeneum* (Pisces: Sparidae), with notes on reproductive biology. *South African Journal of Zoology* 21:33-38.
- Bye, V.J. 1984. The role of environmental factors in the timing of reproductive cycles. En eds. G.W. Potts y R.J. Wootton, *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*, Academic Press, London, pp. 187-205.
- Carlender, K.D. 1981. Caution on the use of the regression method of back-calculating lengths from scale measurements. *Fisheries* 6(1):2-4.
- Carragher, J.F. y J.P. Sumpter. 1991. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to synthesize vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 99(1/2):169-172.
- Casselman, J.M. 1987. Determination of age and growth. En A.H. Weatherley y H.S. Gill (eds.), *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, London, pp. 209-242.
- Casselman, J.M. 1990. Growth and relative size of calcified structures in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 119:673-688.
- Castelló, V. 1981. Relación longitud-peso y condición del barbo de Sclater (*Barbus barbus sclateri* G.) en el río Guadiato, Córdoba, España. *Doñana, Acta Vertebrata*, 8:5-13.
- Collares-Pereira, M.J. y J.M. Madeira. 1990. Cytotaxonomic studies in Iberian cyprinids. III. Karyology of Portuguese populations of *Barbus* Cuvier, 1817, with some reconsiderations on the karyological evolution of the Cyprinidae. *Caryologia* 43(19):17-26.
- Crim, L.W. y B.D. Glebe. Reproduction. En eds. Schreck, C.B. y P.B. Moyle, *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 529-553.
- Das, A.B. 1967. Biochemical changes in tissues of goldfish acclimated to high and low temperatures: II. Synthesis of protein and RNA of subcellular fractions and tissue composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 21:469-485.
- De Jong, G. The fitness of fitness concepts and the description of natural selection. *The Quarterly Review of Biology*, 69(1):3-29.
- De Pomerai, D. 1970. From gene to animal. An introduction to the molecular biology of animal development. Cambridge University Press. London.
- De Robertis, E.D.P., W.W. Nowinski y F.A. Sáez. 1973. *Biología Celular*. Buenos Aires, Editorial El Ateneo.
- Delahunty, G. y V.L. de Vlaming. 1980. Seasonal relationships of ovary weight, liver weight and fat stores with body weight in the goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 16:5-13.
- DeVlaming, V.L., G. Grossman y F. Chapman. 1982. On the use of the gonosomatic index. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 73:31-39.
- Doadrio, I., B. Elvira y Y. Bernat. 1991. *Peces continentales españoles*. ICONA-CSIC, Madrid.
- Dortch, Q., T.L. Roberts, J.R. Clayton y S.I. Ahmed. 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Marine Ecology-Progress Series*, 13:61-71.
- Elvira, B. 1990. Iberian endemic freshwater fishes and their conservation status in Spain. *Journal of Fish Biology*, 37:231-232.
- Elliott, J.M. 1975a. Weight of food and time required to satiate brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biology*, 5:51-64.

- Elliott, J.M. 1975b. Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biology*, 5:287-303.
- Elvira, B. 1990. Iberian endemic freshwater fishes and their conservation status in Spain. *Journal of Fish Biology*, 37:231-232.
- Emmersen, B. K., & J. Emmersen. 1976. Protein, RNA and DNA metabolism in relation to ovarian vitellogenic growth in the flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Comparative Biochemmistry and Physiology* B, 55:315-321.
- Encina, L. 1991. Ecología trófica y dinámica energética de la comunidad íctica del Río Guadalete. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 327 pág.
- Encina, L. y C. Granado-Lorencio. 1994. Gut evacuation in barbel (*Barbus sclateri* G., 1868) and nase (*Chondrostoma willkommi* S., 1866). *Ecology of Freshwater Fish*, 3:159-166.
- Erickson, D.L., J.E. Hightower y G.D. Grossman. 1985. The relative gonadal index: an alternative index for quantification of reproductive condition. *Comparative Biochemmistry and Physiology* A, 81(1):117-120.
- Fauconneau, B., P. Aguirre y J.M. Blanc. 1990. Protein synthesis in different tissues of mature rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Influence of triploidy. *Comparative Biochemmistry and Physiology* C, 97(2):345-352.
- Ferguson, M. M., D. L. G. Noakes, S. Skúlason y S. S. Snorrason. 1990. Life-history styles and somatic allocation in iteroparous arctic charr and semelparous pink salmon. *Environmental Biology of Fishes*. 28:267-272.
- Ferguson, M.M. y R.G. Danzmann. 1990. RNA/DNA ratios in white muscle as estimates of growth in rainbow trout held al different temperatures. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 1494-1498.
- Fitzhugh, G.R. y J.A. Rice. 1995. Error in back-calculation of lengths of juvenile Southern Flounder, *Paralichthys lethostigma*, and implications for analysis of size-selection. *En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 227-246.
- Forstner, H. y W. Wieser. 1990. Patterns of routine swimming and metabolic rate in juvenile cyprinids at three temperatures: analysis with a respirometer-activity-monitoring system. *Comparative Biochemmistry and Physiology* B, 160:71-76.
- Fowler, A.J. Annulus formation in otoliths of coral reef fish — A review. *En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 45-63.
- Francis, M.P. 1992. Uncoupling of otolith and somatic growth in *Pagrus auratus* (Sparidae). *U.S. Fishery Bulletin* 91:159-164.
- Francis, R.I.C.C. 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. *Journal of Fish Biology*, 36:883-902.
- Francis, R.I.C.C. 1992a. Ageing of adult Snapper (*Pagrus auratus*) from otolith annual ring counts: Validation by tagging and oxytetracycline injection. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:1069-1089.
- Francis, R.I.C.C. 1992b. Otolith radius is a poor predictor of age in adult Snapper (*Pagrus auratus*). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:1199-1202.
- Francis, R.I.C.C. 1995. The analysis of otolith data — A mathematician's perspective (What, precisely, is your model?). *En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 81-95.

- Francis, R.I.C.C., L.J. Paul y K.P. Mulligan. 1992. Ageing of adult Snapper (*Pagrus auratus*) from otolith annual rings counts: Validation by tagging and oxytetracycline injection. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:1069-1089.
- Frost, K.J. y L.F. Lowry. 1981. Trophic importance of some marine gadids in Northern Alaska and their body-otolith size relationships. *U.S. Fishery Bulletin* 79:187-191.
- García, P.F.J., M.S. Merkle y R.M.R. Barclay. 1993. Energy allocation to reproduction and maintenance in mountain bluebirds (*Sialia currucoides*): a food supplementation experiment. *Canadian Journal of Zoology*, 71:2352-2357.
- García-Berthou, E. y R. Moreno-Amich. 1993. Multivariate analysis of covariance in morphometric studies of the reproductive cycle. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50:1394-1399.
- Gauldie, R.W., A. Kellermann, R. Radtke y S. Sharma. On the evolution of the crystalline structure of Catfish otoliths. *Cybium* 17(4):299-326.
- Gooley, G.J. 1992. Validation of the use of otoliths to determine the age and growth of Murray Cod, *Maccullochella peelii* (Mitchell) (Perchichthyidae), in Lake Charlegrark, Western Victoria. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:1091-1102.
- Goolish, E.M., M.G. Barron, y I.R. Adelman. 1984. Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. *Canadian Journal of Zoology*, 62: 2164-2170.
- Granado-Lorencio, C. en prensa. *Ecología de Peces*. Sevilla, Universidad de Sevilla (Ed.).
- Grossman, G.D. 1979. Demographic characteristic of an intertidal bay goby (*Lepidogobius lepidus*). *Environmental Biology of Fishes* 4:207-218.
- Gutreuter, S. 1987. Considerations for estimation and interpretation of annual growth rates. *En* R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 115-126.
- Guyton, A.C. 1985. *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders Company. 1263 páginas.
- Haas, R.E. y C.W. Recksiek. 1995. Age verification of Winter Flounder in Narragansett Bay. *Transactions of the American Fisheries Society* 124:103-111.
- Haines, T.A. 1973. An evaluation of RNA-DNA ratio as a measure of long-term growth in fish populations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30:195-199.
- Hancock, R.S., J.W. Jones y R. Shaw. 1976. A preliminary report on the spawning behaviour and the nature of sexual selection in the barbel, *Barbus barbus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 9:21-28.
- Heindinger, R.C. y S.D. Crawford. 1977. Effect of temperature and feeding rate on the liver-somatic index of the largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34:633-638.
- Herrera, M. 1991. Modelos en los ciclos de vida de una comunidad de ciprínidos en un arroyo de primer orden de la cuenca del río Guadalquivir. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Herrera, M. y C. Fernández-Delgado. 1992. The life-history patterns of *Barbus bocagei sclateri* (Günther, 1868) in a tributary stream of the Guadalquivir River basin, southern Spain. *Ecology of Freshwater Fish*, 1:42-51.
- Herrera, M., J.A. Hernando, C. Fernández-Delgado y M. Bellido. 1988. Age, growth and reproduction of the barbel, *Barbus sclateri* (Günther 1868), in a first-order stream in southern Spain. *Journal of Fish Biology* 33:371-381.

- Hiyama, Y. y T. Kitahara. 1993. Relationship between surplus energy and body weight of fish populations. *Research of Population Ecology*, 35:139-150.
- Hovenkamp, F. y J.I.J. Witte. 1991. Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 to 1989. *Marine Ecology Progress Series*, 70:105-116.
- Jobling, M. 1995. *Environmental biology of fishes*. London: Chapman & Hall. 455 pp.
- Johnson, A.G., W.A. Fable, M.L. Williams y L.E. Barger. 1983. Age, growth and mortality of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, from the southeastern United States. *U.S. Fishery Bulletin* 81:97-106.
- Johnston, I.A. 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flatfish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Research*, 214:369-386.
- Junta de Andalucía. 1992. Atlas agrario y pesquero de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, D.G.I.T.F.A.P. (de.). 426 pp.
- Jürss, K. y T. Bittorf. 1990. The relationship between biochemical liver status and growth in immature Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson). I. Effects of feeding and salinity. *Zoological Jb. Physiology*, 94:474-485.
- Jürss, K., T. Bittorf, T. Vokler y R. Wacke. 1987. Effects of temperature, food deprivation and salinity on growth, RNA-DNA ratio and certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 87:241-253.
- Kalish, J.M. 1989. Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 132:151-178.
- Kent, J., C.L. Prosser y G. Graham. 1992. Alterations in liver composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) during seasonal acclimatization. *Physiological Zoology*, 65(5):867-884.
- Kimura, D.K., R.R. Mandapat y S.L. Oxford. 1979. Method, validity, and variability in the age determination of yellowtail rockfish (*Sebastes flavidus*) using otoliths. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36:377-383.
- Koch, F. y W. Wieser. 1983. Partitioning of energy in fish: can reduction of swimming activity compensate for the cost of reproduction?. *Journal experimental Biology*, 107:141-146.
- Koch, F., W. Wieser y H. Niederstätter. 1992. Interactive effects of season and temperature on enzyme activities, tissue and whole animal respiration in roach, *Rutilus rutilus*. *Environmental Biology of Fishes*, 33:73-85.
- Koumans, J. T. y H. A. Akster. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish.). *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 110(1): 3-20.
- Koumans, J. T., H. A. Akster, A. Witkam y J. W. M. Osse. 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Biology*, 44:391-408.
- Kozłowski, J. 1992. Optimal allocation of resources to growth and reproduction: Implications for age and size at maturity. *Trends in Ecology and Evolution*, 7:15-19.
- Kozłowski, J. y J. Uchmanski. 1987. Optimal individual growth and reproduction in perennial species with indeterminate growth. *Evolution and Ecology*, 1:231-230.
- Kundu, R. y A. P. Mansuri. 1990. Growth dynamics of myotomal muscle fibres in a carangid, *Caranx malabaricus* (Cuv. et Val.). *Journal of Fish Biology*. 36:21-27.

- Lahnsteiner, F., R.A. Patzner y T. Weismann. 1994a. The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes—II. Composition of the seminal fluid. *Journal of Fish Biology*, 44:549–467.
- Lahnsteiner, F., R.A. Patzner y T. Weismann. 1994b. The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes—I. Morphology, fine structure and histochemistry. *Journal of Fish Biology*, 44:549–467.
- Lecomte-Finiger, R. 1992. The crystalline ultrastructure of otoliths of the eel (*Anguilla* L. 1758). *Journal of Fish Biology* 50:1627–1633.
- Lehninger, A.L. 1982. *Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Lentsch, L.D. y J.S. Griffith 1987. Lack of first-year annuli on scales: Frequency of occurrence and predictability in trout of the western United States. En R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 177-188.
- Linfield, R.S.J. 1974. The errors likely in ageing roach *Rutilus rutilus* (L.), with special reference to stunted populations. En T. Bagenal Ed. *The Ageing of Fish*. Unwin: Old Woking. pp. 167-172.
- Lomnicki, A. 1992. Population ecology from the individual perspective. En D.L. DeAngelis y L.J. Gross (ed.). *Individual-based models and approaches in ecology: populations, communities and ecosystems*, Routledge, Chapman and Hall, New York, pp. 3–17.
- Love, R. M. 1970. *The Chemical Biology of Fishes*. London: Academic Press.
- Love, R. M. 1980. *The Chemical Biology of Fishes* Vol. 2: *Advances 1968-1977*, pp. 67-133. London: Academic Press.
- Lozano Rey, L. 1935. Los peces fluviales de España. Memorias de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Madrid, 390 pp.
- Lucena, J. 1984. Etude comparative entre les peuplements de Barbeaux des barrages de Bermejales et Cubillas (Granada, Espagne). *Vie Milieu*, 34(2/3):105–108.
- Lucena, J. y I. Camacho. 1978. Variaciones estacionales de algunos parámetros biológicos en el barbo de Sclater (*Barbus barbus sclateri* Günther). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 76:243–251.
- Lucena, J., M. Blasco y I. Camacho. 1979. Estudio del crecimiento en peso y longitud del *Barbus barbus sclateri* Gthr. del embalse de Cubillas. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 77:479–488.
- Lucena, J., M.C. Fuentes y J.M. Rodríguez-Muñoz. 1983. Étude somatométrique de la composition corporelle du barbeau (*B. barbus sclateri* Gthr.), barrage de la Conception (Málaga). *Vie Milieu*, 33(1):17-24.
- Luquet, P. y G. Durant. 1970. Evolution de la teneur en acides nucléiques de la musculature épaxiale au cours de la croissance chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*); Rôles respectifs de la multiplication et du grandissement cellulaires. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 10:481-492.
- Luquet, P. y M.-H. Hannequart. 1971. Development in the trout. Changes in nucleic acid contents of different body fractions. *Annual Biology animal Biochemical and Biophysiology*, 11:657–668.
- Lusena, C.V. 1951. Estimation of ribonucleic acid with orcinol. *Canadian Journal of Chemistry* 29:107-108.
- Maceina, M.J. 1992. A simple regression model to assess environmental effects on fish growth. *Journal of Fish Biology* 41:557-565.

- MacFarlane, R.B., E.C. Norton y M.J. Bowers. 1993. Lipid dynamics in relation to the annual reproductive cycle in yellowtail rockfish (*Sebastes flavidus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(2):391-401.
- Machordom, A. 1990. Filogenia y evolución del género *Barbus* en la Península Ibérica mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral, 258 páginas. Universidad Complutense de Madrid.
- Mann, R.H.K. 1991. Growth and production. En: Winfield, I.J. y J.S. Nelson (Ed.). *Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation*. Chapman & Hall. London: pp. 456-482.
- Margalef, R. 1991. *Teoría de los sistemas ecológicos*. Barcelona, Universidad de Barcelona (Ed.), 290 pp.
- Mills, C.A. 1991. Reproduction and life history. En Winfield, I.J. y S.J. Nelson (editores), *Cyprinid Fishes: Systematics, biology and exploitation*. Chapman & Hall, London. pp. 483-508.
- Mina, M.V. 1968. A note on a problem in the visual qualitative evaluation of otolith zones. *J. Conse. perm. int. Explor. Mer.* 32(1):93-97.
- Moksness, E., K. Rukan, L. Ystanes, A. Folkvord y A. Johannessen. 1995. Comparison of somatic and otolith growth in North Sea Herring (*Clupea harengus* L.) larvae: Evaluation of growth dynamics in mesocosms. En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 119-134.
- Morales-Nin, B. 1987. Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of the sea bass. En R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 331-343.
- Morales-Nin, B. 1989. Growth determination of tropical marine fishes by means of otolith interpretation and length frequency analysis. *Aquatic Living Resources* 2:241-253.
- Morales-Nin, B. 1994. Growth patterns of the otoliths of *Stellifer rastrifer* (Pisces: Sciaenidae) from the Sergipe River estuary (Sergipe, Brazil). *Ecology of Freshwater Fish* 3:100-106.
- Morales-Nin, B. y S. Ralston. 1990. Age and growth of *Lutjanus kasmira* (Forsk.) in Hawaiian waters. *Journal of Fish Biology* 36:191-203.
- Moreau, J. 1987. Mathematical and biological expression of growth in fishes: Recent trends and further developments. En R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 81-113.
- Mosegard, H., H. Svedang y K. Taberman. 1988. Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45:1514-1524.
- Murphy, B.R., M.L. Brown y T.A. Springer. 1990. Evaluation of the relative weight (W_r) index, with new applications to Walleye. *North American Journal of Fisheries Management*, 10:85-97.
- Murphy, J. & J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta*. 27:31-36.
- Mustafa, S. J.-P. Lagardère y A. Pastoureaud. 1991. Condition indices and RNA:DNA ratio in overwintering European sea bass; *Dicentrarchus labrax*, in salt marshes along the Atlantic coast of France. *Aquaculture*, 96:367-374.
- Nagai, M. y S. Ikeda. 1971a. Carbohydrate metabolism in fish-I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and liver contents in carp. *Bulletin Japanese of Society Sciences and Fisheries*, 37:404-409.

- Nagai, M. y S. Ikeda. 1971b. Carbohydrate metabolism in fish—II. Effect of dietary composition on metabolism of glucose-6-¹⁴C in carp. *Bulletin Japanese of Society Sciences and Fisheries*, 37:410-414.
- Nasiri, S. 1972. Growth of carpsuckers, *Carpiodes* spp. as indicated by RNA:DNA ratios. Tesis Doctoral, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Neumann, R.M. y D.W. Willis. 1994. Relative weight as a condition index for Muskellunge. *Journal of Freshwater Ecology*, 9(1):13-18.
- Ombredane, D. y J-L. Bagliniere 1992. Les écailles et leurs utilisations en écologie halieutique. En: J.L. Baglinière, J. Castanet, F. Conand, and F.J. Meunier (Ed.). *Tissus durs et âge individuel des Vertébrés*, Colloque National, Bondy, France, 4-6 mars 1991. Colloques et Séminaires ORSTOM-INRA, Paris. pp.151-192.
- Pannella, G. 1974. Otolith growth patterns: An aid in age determination in temperate and tropical fishes. En T. Bagenal Ed. *The Ageing of Fish*. Unwin: Old Woking. pp. 28-39.
- Pannella, G. 1980. Growth patterns in fish sagittae. En: D.C. Rhoads and R.A. Lutz (Ed.), *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. Plenum Press, New York, pp. 519-560.
- Pereira, D.L., Ch. Bingham, G.R. Spangler, D.J. Conner y P.K. Cunningham. 1995. Construction of a 110-Year Biochronology from Sagittae of Freshwater Drum (*Aplodinotus grunniens*). En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 177-196.
- Peterson, M.S. y N. Brown-Peterson. 1992. Growth under stressed conditions in juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) as measured by nucleic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 103(2):323-327.
- Platt, C. 1977. Hair cell distribution and orientation in Goldfish otolith organs. *Journal of Comparative Neurology*, 172(2):283-298.
- Poncin, P. 1988. Le contrôle environnemental et hormonal de la reproduction du barbeau, *Barbus barbus* (L.), et du chevaine, *Leuciscus cephalus* (L.) (Pisces Cyprinidae), en captivité. *Cahiers d'Ethologie appliquée*, 8(2):179-330.
- Poncin, P. 1989. Effects of different photoperiods on the reproduction of the barbel, *Barbus barbus* (L.), reared at constant temperature. *Journal of Fish Biology*, 35:395-400.
- Poncin, P. 1993. La reproduction des poissons de nos rivières. *Cahiers d'Ethologie*, 13(3):317-342.
- Popper, A.N. y S. Coombs. 1982. The morphology and evolution of the ear in Actinopterygian fishes. *American Zoology*, 22:311-328.
- Prenda, J. 1993. Uso del hábitat en algunas poblaciones de animales acuáticos de un río del sur de España: Influencia de las interacciones bióticas. Tesis doctoral, 205 páginas. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Prenda, J. y C. Granado-Lorencio. en prensa. Movement patterns in the cyprinid assemblage of a mediterranean headwater stream: Habitat effects and consequences on growth. *Ecology*.
- Prepas, E.E. y F.H. Rigler. 1982. Improvements in quantifying the phosphorus concentration in lake water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39:822-829.
- Radtke, R.L., M.L. Fine y J. Bell. 1985. Somatic and otolithic growth in the oyster toadfish (*Opsanus tau* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 90:259-275.
- Reid, R.A., T.D. Durance, D.C. Walker y P.E. Reid. 1993. Structural and chemical changes in the muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during spawning migration. *Food Research International*, 26:1-9.

- Reznick, D., E. Lindbeck y H. Bryga. 1989. Slower growth results in larger otoliths: An experimental test with guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46:108-112.
- Riba i Lloret, M^a. D. 1990. *Modelo lineal de análisis de la varianza*. Monografías de bioestadística y psicología matemática n° 8. 320 páginas. Barcelona:Editorial Herder.
- Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of the biological statistics of fish populations. *Fisheries Resarch Board of Canada Bulletin*, 191:1-382.
- Ricker, W.E. 1992. Back-calculation of fish lengths based on proportionality between scale and length increments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49:1018-1026.
- Robinson, S.M.C. y D.M. Ware. 1988. Ontogenic development of growth rates in larval pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45:1422-1429.
- Rodríguez-Ruiz, D. 1992. Relación entre la comunidad íctica y la estructura del hábitat en un río de régimen mediterráneo. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Rodríguez-Ruiz, A. y C. Granado-Lorencio. 1992. Spawning period and migration of three species of cyprinids in a stream with mediterranean regimen (SW Spain). *Journal of Fish Biology*, 41:545-556.
- Roff, D.A. 1983. An allocation model of growth and reproduction in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40:1395-1404.
- Ross, J.L. y T.M. Stevens. 1995. Age, Growth, Mortality, and Reproductive Biology of Red Drums in North Carolina Waters. *Transactions of the American Fisheries Society* 124:37-54.
- Ruth, G.S. y T. Mitchell-Olds 1993. Anova for unbalanced data: an overview. *Ecology* 74(6):1638-1645.
- Saad, A. y R. Billard. 1986. Amount of collected sperm related to spermatogenetic production and the possibility of short-term storage in carp. En R.Billard et J. Marcel Editores. *Aquaculture of Cyprinids*, INRA, París.
- Sable, D. 1974. RNA-DNA ratios as indicators of short-term growth in channel catfish. Tesis Doctoral, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Saila, S.B., C.W. Recksiek y M.H. Prager. 1988. *Basic Fishery Science Programs. A compendium of microcomputer programs and manual of operation*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 18. Elsevier, Amsterdam. 230 pp.
- Samuel, M., C.P. Mathews y A.S. Bawazeer 1987. Age and validation of age from otoliths for warm water fishes from the Arabian Gulf. En R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.). *Age and growth of fish*, Iowa State Univ. Press, pp. 253-265.
- Sänger, A.M. 1993. Limits to the acclimation of fish muscle. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3:1-5
- Sänger, A.M., Z.S. Kim y H. Adam. 1990. The fine structure of muscle fibres of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and chub, *Leuciscus cephalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. *Journal of Fish Biology*, 36:205-213.
- Sargent, F., R. J. Henderson & D. R. Tocher. 1989. The Lipids. Páginas 153-217 En J. E. Halver editor. *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego.
- Schneider, W.C. 1957. Determination of nucleic acid in tissue by pentose analysis. En S.P. Colowick y N.O. Kaplan (editores), *Methods in enzymology*. Vol. 3. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

- Schramm, H.L. 1989. Formation of annuli in otoliths of bluegills. *Transactions of the American Fisheries Society* 118:546–555.
- Schramm, H.L., S.P. Malvestuto y W.A. Hubert. 1992. Evaluation of procedures for back-calculation of lengths of Largemouth Bass aged by otoliths. *North American Journal of Fisheries Management* 12:604–608.
- Secor, D.H. y J.M. Dean. 1989. Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46:113–121.
- Secor, D.H. y J.M. Dean. 1992. Comparison of otolith-based back-calculation methods to determine individual growth histories of larval Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49:1439–1454.
- Secor, D.H., J.M. Dean y E.H. Laban. 1991. *Manual for otolith removal and preparation for microstructural examination*. Electric Energy Research Institute and the Belle W. Baruch Institute for Marine Biology and Coastal Research, University of South Carolina, Columbia, South Carolina, 85 pp.
- Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana. 1995. Editores. Recent Developments in fish otolith research. University of South Carolina Press, 735 pp.
- Shaw, R.G. y T. Mitchell-Olds. 1993. Anova for unbalanced data: an overview. *Ecology*, 74(6):1638–1645.
- Sibly, R.M. y P. Calow (1986). *Physiological Ecology of Animals*. Blackwell, Oxford.
- Sokal, R.R. y E.J. Rolf 1981. *Biometry*. W.H. Freeman y Co., San Francisco, California. 776 p.
- Stearns, S.C. 1976. Life-history tactics: a review of the ideas. *Q. Review of Biology*, 51:3–47.
- Stearns, S.C. 1983. A natural experiment in life-history evolution: field data on the introduction of mosquito fish (*Gambusia affinis*) to Hawaii. *Evolution*, 37:601–617.
- Stearns, S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, 249 pp.
- Storebakken, T. y E. Austreng. 1987. Ration level for salmonids. II. Growth, feed intake, protein digestibility, body composition, and feed conversion in rainbow trout weighing 0.5–1.0 kg. *Aquaculture*, 60:207–221.
- Sturm, M.G.L. y P. Salter. 1990. Age, growth, and reproduction of the king mackerel, *Scomberomorus cavalla* (Cuvier), in Trinidad waters. *U.S. Fishery Bulletin* 88:361–370.
- Summerfelt, R.C. y G.E. Hall, 1987. Editores. *Age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, 544 pp.
- Thompson, K.R. y D.W. Beckman. 1995. Validation of age estimates from White Sucker otoliths. *Transactions of the American Fisheries Society* 124:637–639.
- Torrey, T.W. 1978. *Morfogénesis de los vertebrados*. México, Editorial Limusa.
- Ueberschär, B. y C. Clemmesen. 1992. A comparison of the nutrition condition of herring larvae as determined by two biochemical methods - Tryptic enzyme activity and RNA:DNA ratio measurements. *ICES Journal of Marine Science*, 49:245–249.
- Wang S.Y., J.L. Lum, M.G. Carls y S.D. Rice. 1993. Relationship between growth and total nucleic acids in juvenile pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, fed crude oil contaminated food. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50:996–1001.
- Wate, D.M. 1980. Bioenergetics of stock and recruitment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37:1012–1024.

- Ware, D.M. 1984. Fitness of different reproductive strategies in teleost fishes. *En* eds G.W. Potts y R.J. Wootton, . *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*, Academic Press, London, pp. 349–366.
- Waters, W.E. y D.C. Erman. 1990. Research methods: Concept and design. Páginas 529–554, *En* C.B. Schreck & P.B. Moyle, editores. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Watt, K.E.F. 1968. *Ecology and resource management*. McGraw–Hill, New York.
- Weatherley, A.H. 1972. *Growth and Ecology of Fish Populations*. London: Academic Press.
- Weatherley, A.H. 1990. Approaches to understanding fish growth. *Transactions of the American Fisheries Society*. 119:662-672.
- Weatherley, A.H. y H.S. Gill. 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia*, 41:353-354.
- Weatherley, A.H. y H.S. Gill. 1987a. *The Biology of Fish Growth*. London: Academic Press.
- Weatherley, A.H. y H.S. Gill. 1987b. Growth increases produced by bovine growth hormone in Grass Pickerel, *Esox americanus vermiculatus* (Le Sueur), and the underlying dynamics of muscle fiber growth. *Aquaculture*, 65:55-66.
- Weatherley, A.H. y H.S. Gill. 1989. The role of muscle in determining growth and size in teleost fish. *Experientia*, 45:875-878.
- Weatherley, A.H., H.S. Gill y A.F. Lobo. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleost and their relationship to somatic growth and ultimate size. *Journal of Fish Biology*, 33:851-859.
- Webb, J.M.& H.B. Levy. 1955. A sensitive method for the detrmination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, 213:107–117.
- Welleman, H.C. y F. Storbeck. 1995. Automatic Aging of Plaice (*Pleuronectes platessa* L.) Otoliths by Means of Image Analysis. *En* Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 271–282.
- Wieser, W. 1991. Physiological energetics and ecophysiology. Páginas 426–455. *En* I.J. Winfiel y Nelson Editores. *Cyprinid Fishes, Systematics, Biology and Exploitation*, Chapman & Hall, London.
- Wieser, W. 1992. Introduction to the environmental biology of European cyprinids. *Environmental Biology of Fishes*, 33:9–12.
- Wilson, C.A., J.M. Dean, E.D. Prince y D.W. Lee. 1991. An examination of sexual dimorphism in Atlantic and Pacific blue marlin using body weight, sagittae weight, and age estimates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 151:209–225.
- Williams, T. y B.C. Bedford 1974. The use of otoliths for age determination. *En* T. Bagenal Ed. *The Ageing of Fish*. Unwin: Old Woking. pp. 114-123.
- Winemiller, K.O. y K.A. Rose. 1992. Patterns of life-history diversification in North American fishes: implications for population regulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49:2196–2218.
- Wootton, R.J. 1984. Introduction: strategies and tactics in fish reproduction. *En* eds G.W. Potts y R.J. Wootton, *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*, Academic Press, London, pp. 1–12.
- Wootton, R.J. 1990. *Ecology of teleost fishes*. London: Chapman & Hall. 404 pp.
- Wootton, R. J. & G. W. Evans. 1976. Cost of egg production in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Fish Biology*, 8:385-395.

- Wright, P.J., N.B. Metcalfe, y J.E. Thorpe. 1990. Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L.: Evidence against coupling. *Journal of Fish Biology* 36:241-249.
- Yosef, T-G. y J.M. Casselman. 1995. A procedure for increasing the precision of otolith age determination of tropical fish by differentiating biannual recruitment. En Secor, D.H., J.M. Dean y S.E. Campana (eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*, University of South Carolina Press. pp. 247-269.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*, 2ª edición. Prentice-Hall, Englewood Hills, New Jersey.
- Zhukinskiy, V.N. y V.P. Bilko. 1984. Effect of semen pH on embryo viability in some cyprinid fishes. *Journal of Ichthyology*, 24:64-76.

Apéndice

Procedimiento para secar y desengrasar el tejido

Los pasos para este procedimiento fueron los seguidos por Bulow (1970).

1. El tejido fue sumergido en una mezcla de cloroformo-metanol al 2:1, tapados, y agitados automáticamente (Liofilizador Virtis FM-5 SL) durante 12 horas.
2. El líquido fue cambiado y las muestras agitadas otras 12 horas.
3. El líquido fue reemplazado con éter y agitado durante 24 horas.
4. El éter fue extraído y las muestras secadas al aire durante 24 horas
5. Las muestras fueron congeladas y posteriormente liofilizadas (nombre del liofilizador)
6. El tejido completamente seco y desengrasado fue pulverizado con nitrógeno líquido y guardados en tubos tapados y debidamente etiquetados.

Después de los pasos 5 y 6, las muestras pueden ser guardadas en un estado deshidratado y desengrasado (DFFT) por un largo periodo de tiempo.

Procedimiento para la extracción de los Ácidos Nucleicos totales

Los ácidos nucleicos fueron extraídos juntos del tejido seco y desengrasado (DFFT) por el método de Webb y Levy (1955), pero con una extracción previa con ácido Tricloroacético (TCA) frío (Bulow 1970).

1. Se mezcló 100 mg de DFFT de músculo, o 30 mg de DFFT de hígado o gónada (siempre que fue posible) con 3 ml de TCA frío al 5% en tubos de centrifuga.
2. Se enfrió durante 12 horas, se mezcló, centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, y se tiró el sobrenadante. Posteriormente se añadió otros 3 ml de TCA frío al 5%, se mezcló, centrifugó y se volvió a tirar el sobrenadante.
3. Se añadió 3 ml de TCA frío al 5%, se mezcló, se cubrieron los tubos con canicas e incubaron a 90 °C durante 30 minutos. Es preferible tapar los tubos con canicas para prevenir pérdidas por evaporación, pero permitir la expansión gaseosa.
4. Inmediatamente después de los 30 minutos, se pusieron los tubos en un baño de agua fría.
5. Después de enfriarlos, a cada tubo se le añadió 3 ml de TCA frío al 5% y se mezclaron.
6. Los tubos fueron centrifugados durante 15 minutos y se les retiró el sobrenadante con mucho cuidado, dejando el resto de tejido insoluble en el fondo.
7. El sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos combinados fueron guardados en tubos en condiciones de frío.

Preparación de los patrones de ARN y ADN

1. 100 mg de estándar de ADN (Esperma de salmón, Sigma Chemical), fueron puestos en un tubo largo de cristal con 5 ml de agua destilada y calentados hasta que se disolvió por completo.
2. Se añadió 10 ml de TCA al 5%, se calentó a 90 °C durante 60 minutos, tapando los tubos con canicas.
3. La solución fue enfriada y aforada a 200 ml con TCA al 5%.
4. Este procedimiento es similar para el ARN. Utilizando como estándar hígado de ternera (Sigma Chemical).
5. Estas soluciones patrones fueron guardadas en condiciones de frío.

Determinación del contenido de fósforo total de las soluciones patrones de ácidos nucleicos

1. Para establecer las concentraciones exactas de las soluciones patrones, se determinó el fósforo total por el método de Murphy y Riley (1962) modificado para autoanalizador Technicon AAI por Technicon Industrial System, después de una digestión con persulfato (Prepas y Rigler 1982).
2. En un tubo de pirex se le añadió a 2 ml de la solución patrón de los ácidos nucleicos, 2 gr de persulfato potásico y 2 ml de ácido sulfúrico 5N. 2 ml de TCA al 5% se utilizaron como blancos.
3. Se llevó a ebullición, agitándolo periódicamente bajo una campana extractora durante aproximadamente 20 minutos. Se le añadió agua destilada cuando lo necesitó y se tuvo mucho cuidado con los vapores.
4. Se neutralizó a pH 7 con NaOH y ácido sulfúrico. Se aforó con agua destilada a 50 ml.
5. Se utilizó un autoanalizador Technichon AAI para la determinación final de fósforo.

Determinación colorimétrica de la concentración de ARN-P

Para la determinación del ARN-P se siguió el método del orcinol de Lusena (1951), modificado por Schneider (1957) y descrito por Buckley y Bulow (1987).

Preparación del reactivo de orcinol

Inmediatamente antes de usarlo, se disolvió 1 g de orcinol puro en 100 ml de HCl que contenía 0,5 g de FeCl_3 .

Método para el desarrollo del color del ARN-P

1. Dos réplicas por muestra de 0,5 ml del extracto de ácidos nucleicos y de las soluciones patrones de ADN y ARN fueron puestos en tubos de cristal.
2. Se le añadió 1,5 ml de agua destilada y 2 ml del reactivo de orcinol.
3. Un blanco de 2 ml de agua destilada y 2 ml del reactivo de orcinol fueron también preparados.
4. Los tubos fueron cubiertos con canicas y calentados a 90 °C durante 60 minutos.
5. Después se enfriaron en un baño de agua fría y la densidad óptica fue registrada contra el blanco a 660 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (El color que se desarrolla es verde-amarillo). Se comprobó el ADN en la reacción del orcinol usando el patrón de ADN, para ver si hubo interferencias en el desarrollo del color con el ARN. Las densidades ópticas fueron registradas como la media entre las dos lecturas

Determinación colorimétrica de la concentración de ADN-P

Para la determinación del ADN-P se usó la modificación de Burton del método de la difenilamina (Burton 1956 en Buckley y Bulow 1987).

Preparación del reactivo de la difenilamina.

Se disolvió 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial y 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Inmediatamente antes de usarlo, 0,5 ml de acetaldehído acuoso (2,1 ml de acetaldehído por 100 ml de ácido acético) fue añadido a la mezcla de difenilamina. Este reactivo de difenilamina fue preparado justo antes de su uso.

Preparación del ácido perclórico (1 N)

Se añadió agua pura a 83,5 ml de ácido perclórico (70%) aforándolo a 1 litro.

Método para el desarrollo del color del ADN-P

1. Dos réplicas por muestra de 0,5 ml del extracto de ácidos nucleicos y de la solución patrón de ADN fueron combinados con 1 ml de ácido perclórico 1N y 2 ml del reactivo de difenilamina.
2. Un blanco fue preparado reemplazando el extracto de ácido nucleico por 1 ml de TCA al 5%.
3. Los contenidos fueron mezclados y los tubos calentados a 30 °C durante 18 horas.
4. La densidad óptica fue medida a 600 nm en contra de un blanco en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (El color que se desarrolla es azul claro). Las densidades ópticas fueron registradas como la media entre las dos lecturas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672226