

#### **4.8 Muestreo relacionado con la madurez**

El conocimiento sobre las pautas de reproducción de los grandes pelágicos, así como las características del crecimiento y mortalidad, definirán en general la capacidad de regeneración que tiene una población. Por ello son de extrema importancia en la ordenación y conservación y para el diseño de modelos fiables con vistas a una evaluación eficaz del stock.

Los grandes pelágicos son, por lo general, reproductores en aguas libres y por ello necesitan de una gran fecundidad a lo largo de su ciclo vital para asegurar el éxito en materia de reproducción. Esto se consigue por medio de una reproducción prolongada, en distintos grados, y una combinación de desoves frecuentes y una fecundidad por fracción de puesta, relativamente alta (Cayré y Farrugio, 1986; Schaefer, 2003). Esta característica biológica hace más complejos los estudios sobre madurez.

El enfoque principal en la evaluación de las pautas de madurez de túnidos y marlines se basa en la recolección de gónadas para hacer estudios histológicos con microscopio. Este método ha resultado ser preciso y además facilita información valiosa, pero es muy trabajoso, caro y letal para los peces. Además, con frecuencia las muestras de gónadas no se pueden obtener porque los túnidos se pueden vender intactos en subasta y los peces espada se evisceran en la mar. Recientemente se han desarrollado métodos químicos para determinar la madurez. Estos métodos se tratan aquí.

##### **4.8.1 Muestreo relacionado con el sexo y la madurez**

La situación y la hora del muestreo dependerán del objetivo del programa. Obteniendo muestras a lo largo de todo el año, se pueden confirmar las pautas temporales en relación con la madurez. Una cobertura temporal más detallada podría confirmar la existencia de ciclos diarios en el desove. Por ejemplo, ciertos estudios han indicado que el desove podría estar sincronizado con el anochecer en algunas especies. Una amplia cobertura espacial podría ayudar a averiguar cuáles son las zonas de desove. Estos factores se han de tener en cuenta al efectuar muestreo para obtener datos de madurez y como elementos necesarios antes de diseñar una campaña de marcado adecuado. La determinación del sexo y la recopilación de ovarios suele depender de que se consigan ejemplares que no hayan sido eviscerados. Esto suele ser difícil en el caso de especies de un alto valor comercial.

Las gónadas se encuentran en el vientre del pez. En peces sexualmente maduros, las gónadas, tanto femeninas como masculinas suelen llenar toda la zona disponible en la cavidad del cuerpo. Los ovarios suelen ser tubulares, rosados/rojizos y de textura granular, mientras que los testículos son aplanados, de color blanco/agrisado y los bordes ventrales suelen ser ondulados. En los marlines, las gónadas masculinas suelen tener una forma y apariencia bastante irregulares, con muchos nódulos en la superficie. El corte transversal de las gónadas masculinas muestra una forma rectangular característica y cuando han llegado a la madurez se ve el esperma. Las gónadas femeninas tienen por lo general una apariencia más pulida y en el corte transversal la gónada es ovalada y en ocasiones tiene un lumen (agujero) en el centro. El peso del pez es otro factor para determinar el sexo de un marlín, ya que los machos de la mayor parte de las especies son mucho más pequeños (como media) que las hembras. Por ejemplo, los machos de aguja azul atlántica rara vez sobrepasan los 100 kg (220 libras), mientras que las hembras pueden alcanzar un peso superior a los 400 kg (880 libras) y es corriente que pesen más de 125 kg (275 libras). En teoría, por lo tanto, no es fácil encontrar machos de aguja azul atlántica de más de 125 kg de peso eviscerado.

En la estimación de talla de madurez y fecundidad, el enfoque adecuado es el muestreo de talla estratificado. Se pueden aplicar gamas de talla comparables a las distribuciones de talla por edad esperadas o bien escalas de tallas inferiores. El plan de muestreo podría tener que modificarse debido a cuestiones financieras, ya que es necesario efectuar muestreo en diferentes temporadas, zonas y años.

Podría ser necesaria una estratificación adicional para compensar el comportamiento del pez, incluyendo la concentración o las migraciones de desove.

Sobre la recopilación de muestras (véase más adelante) conviene señalar los siguientes detalles:

Fecha, barco, especie, talla, peso, sexo, peso de las gónadas, peso de la submuestra de gónadas, situación de la captura (latitud y longitud), tipo de cardumen de túnidos y de asociación y un único número de muestra por pez, una muestra de dicho pez, incluyendo la zona de la gónada muestreada.

Para estimar las proporciones de individuos sexualmente maduros, se deben establecer criterios precisos para establecer el grado de madurez.

#### 4.8.2 Etapas de la madurez

La evaluación visual de ovarios para determinar su madurez se considera un indicador impreciso de la condición reproductora (West, 1990). Se recomienda el uso de métodos histológicos y/o químicos. En la siguiente tabla se presentan escalas (Tabla 4.8.1).

**Tabla 4.8.1.** Etapa de madurez para el examen visual de gónadas de grandes pelágicos.

Etapa	Criterios	
	Machos	Hembras
I	Gónadas pequeñas en forma de cintas, no se puede determinar el sexo a simple vista.	Gónadas pequeñas en forma de cintas, no se puede determinar el sexo a simple vista.
1	<b>Inmaduros;</b> testículos muy delgados, aplastados y en forma de cinta, pero se puede determinar el sexo a simple vista.	<b>Inmaduras;</b> gónadas alargadas, delgadas, pero se puede determinar el sexo a simple vista.
2	Testículos abultados, triangulares en corte transversal, sin esperma en canal central.	<b>Madurez precoz;</b> gónadas abultadas, pero no se observan los óvulos a simple vista.
3	<b>Madurando;</b> el esperma fluye si se presionan o pellizcan los testículos.	<b>Madurez tardía;</b> gónadas abultadas, pero se observan los óvulos a simple vista.
4	<b>Maduros;</b> testículos grandes, el esperma fluye con facilidad.	<b>Maduras;</b> ovarios muy abultados, óvulos translúcidos, que se sacan fácilmente de los folículos o libres en el lumen del ovario.
5	<b>Agotados;</b> testículos flácidos, inyectados de sangre, superficie rojo oscuro, esperma escaso o nulo en canal central.	<b>Agotadas;</b> incluye peces que han desovado recientemente y peces que han desovado antes, restos de óvulos maduros en varios grados de reabsorción y restos de óvulos maduros de 1,0 mm diámetro.

#### 4.8.3 Muestreo histológico y análisis

El muestreo histológico es el que suele aplicarse para comprobar el grado de madurez en las grandes especies pelágicas.

Inmediatamente, tras la captura del pez, se ha de extraer toda la gónada o, si es demasiado grande, secciones transversales de la misma (de 1 cm de grosor). Se meterán en una solución de Bouin, formalina neutral al 10% ó formalina al 4% en agua de mar, para su envío al laboratorio.

Las muestras se deshidratarán en concentraciones de etanol crecientes aclaradas con Histolemon e incrustadas en parafina. Las secciones (5-10 µm de grosor) se pueden tomar usando un microtomo. Las secciones se pueden teñir solo con hematoxilinaeosina (hematoxilina de Harris seguido de una contratinción con eosina), o complementado con una tinción tricrómica de Mallory y una reacción de ácido periódico Schiff (Pas), antes de observarlas con microscopio. Se debe especificar el aumento (ocular y objetivo).

Respecto a las hembras, se recomienda el esquema de clasificación de oocitos desarrollado por Hunter *et al.* (1986) (Tabla 4.8.2). Este tipo de clasificación incluye tanto la frecuencia del desove como la probabilidad de que una hembra continúe el desove (en el estado atréptico del ovario). Si se aplican esquemas alternativos (por ej. Corriero *et al.*, 2003, para el atún rojo) se deberán hacer referencias y se detallarán las interpretaciones de las situaciones de madurez e inmadurez.

**Tabla 4.8.2.** Etapas de madurez basadas en examen histológico de ovarios.

Etapa	Madurez	Condición oocitos	Atresia	Comentarios
1	Inmaduro	Mayoría de oocitos en la etapa tardía de diploteno o la etapa temprana perinuclear	Sin atresia	Oocitos densamente agrupados teñidos de oscuro con hematoxilina

2	Inmaduro	Mezcla de oocitos en etapa perinuclear temprana y tardía. No hay gránulos de vitelo presentes	Sin atresia o atresia menor de oocitos sin vitelo	Etapas tempranas de desarrollo
3	Inmaduro	Parcialmente vitelinos	Sin atresia o atresia menor de oocitos sin vitelo	Gránulos o globulos vitelinos rojizos evidentes desde la periferia de la célula hasta una distancia de $\frac{3}{4}$ de la zona perinuclear
4	Maduro	Posiblemente sin vitelo o parcialmente vitelinos	Atresia evidente de oocitos vitelinos	Se consideran totalmente vitelinos y reproductores en potencia pero han regresado a un estado de inactividad reproductiva
5	Maduro	Oocitos totalmente vitelinos pero no se observan folículos post-ovulatorios	Atresia cero o inferior al 50% atresia en oocitos totalmente vitelinos	Peces maduros o potencialmente reproductores
6	Maduro	Oocitos totalmente vitelinos. Los oocitos pueden estar en la etapa de núcleo migratorio o hidratados y/o presentar folículos postovulatorios	Atresia inferior al 50% , atresia en oocitos totalmente vitelinos, generalmente atresia cero o menor	Pez reproductor que nada activamente con atresia cero o menor
7	Maduro	Oocitos totalmente vitelinos. Los oocitos pueden estar en la etapa de núcleo migratorio o hidratados y/o presentar folículos postovulatorios	Atresia del 50% o mas de oocitos totalmente vitelinos	Pez activamente reproductor con atresia importante
8	Maduro	Algunos oocitos totalmente vitelinos pero ninguno en condiciones de núcleo migratorio o hidratación	Atresia del 50% o más de oocitos totalmente vitelinos	Pez potencialmente reproductor con importante atresia
9	Maduro	No hay oocitos totalmente vitelinos, pero es evidente la atresia de oocitos totalmente vitelinos	Atresia del 100% de oocitos totalmente vitelinos	Pez maduro en fase no reproductiva
10	Maduro	No hay oocitos totalmente vitelinos Los oocitos parecen estar en las etapas 1 ó 2	Oocitos en atresia avanzada	Pez maduro en fase atrética post-desove avanzada

Este esquema de clasificación se puede presentar como un simple sistema de clasificación de madurez (**Tabla 4.8.3**).

**Tabla 4.8.3.** Sistema de clasificación de madurez basada en Hunter *et al.* (1986).

<i>Categoría</i>	<i>Etapas</i>	<i>Hay oocitos totalmente vitelinos</i>	<i>POF presente</i>	<i>Comentarios</i>
Inmaduro	1, 2, 3	No	No	Oocitos que nunca han alcanzado la condición de totalmente vitelinos
Maduro	4 a 10	Si para Et. 5-8	Si para Et. 6, 7	Han desarrollado oocitos totalmente vitelinos
Reproductor activo	5, 6, 7	Si	Si para Et. 6, 7	Hay oocitos totalmente vitelinos
Desovando	6, 7, 5*	Si	Si para Et. 6, 7. No para Et. 5	Evidencia histológica de desove reciente o inminente
Reproductor inactivo/atrético/etapa posterior al desove	4, 8, 9, 10	Si para Et. 8	No	Han desarrollado oocitos totalmente vitelinos pero han regresado a la condición parcial o totalmente inactiva

\* se considera como desovando solo si se ven oocitos en núcleos migratorios o en condición de hidratación.

El diámetro de un cierto número de oocitos (por ej. 350-400 por sección) se debería medir en micrones para obtener las distribuciones de frecuencias de etapas seleccionadas del desarrollo de oocitos.

El momento del desove así como el lugar se pueden basar en ejemplares con oocitos hidratados en los ovarios, lo cual indica el desove inminente.

Respecto a los machos, Abascal *et al.* (2004) y Schaefer (1996) han establecido claves para el desarrollo de los testículos en diferentes especies de túnidos. La clave de Schaefer facilita una guía sobre la condición de desove de los machos, mientras que las descripciones de Abascal *et al.* se refieren a las etapas microestructurales e histológicas que se pueden encontrar en los testículos de los túnidos.

La clasificación de Schaefer (**Tabla 4.8.4**) para el *T. Albacares* en el Pacífico este, se basa en el tamaño del tubo seminífero (vas deferens), el grosor del tejido muscular que rodea el tubo, la cantidad de espermatozoides dentro del mismo, en qué grado era tortuoso el tubo, si el tejido vecino al tubo aparecía fuertemente nucleado y las características de tinción del tejido adyacente al conducto (con la tinción hematoxilina-eosina).

**Tabla 4.8.4.** Etapas de desarrollo basadas en examen microscópico de testículos.

<i>Etapas</i>	<i>Contenido del Vas deferens y estructura</i>	<i>Mancha epitelial del Vas deferens</i>
Pre-desove	Desprovisto de esperma, extremadamente tortuoso	Teñido de oscuro
Desovando o reciente desove	Lleno de esperma, conducto abierto redondeado en los bordes	No destaca el color oscuro

La evidencia de un desove reciente de un macho de *T. albacares* del Pacífico este, sólo se halló 12 horas después de que hubiese tenido lugar. Por lo tanto el muestreo debe tener en cuenta el factor temporal.

Abascal *et al.* (2004) observaron dos zonas distintas en el corte transversal de testículos de *T. thynnus*. En la región externa, los lóbulos seminíferos presentan una pared gruesa formada por el epitelio germinal donde las células germinales se desarrollan en asociación con las células de Sertoli. La luz de los lóbulos está llena de espermatozoides que han sido liberados tras el proceso espermiogénico. La liberación de esperma maduro de los espermatocitos en la luz del lóbulo provoca la discontinuidad del epitelio germinal. En la región central del testículo los lóbulos testiculares pierden el epitelio germinal y se convierten en conductos donde la función del lóbulo cambia de la producción del esperma a su almacenamiento. Solo los espermatozoides maduros se encuentran en esta región, llenando la hinchada luz de los lóbulos. Las fases de los gametos se incluyen en la **Tabla 4.8.5**.

**Tabla 4.8.5.** Etapas de desarrollo de espermatozoides, basado en un examen histológico y SEM

<i>Etapas</i>	<i>Descripción</i>	<i>Lugar</i>
Espermatogonia primaria	Células grandes, ovales, núcleo con cromatina difusa y un único nucleolo central. Gran número de cuerpos cromátidos en el citoplasma.	Distribuido a lo largo del epitelio germinal
Espermatogonia	Resultado de sucesivas mitosis de las espermatogonias primarias. Se encuentran en pequeños grupos. El núcleo contiene cromatina en grumos.	
Espermatocitos primarios	Grupos, con células interconectadas por puentes citoplásmicos. Núcleo de heterocromatina. El citoplasma contiene ribosomas libres.	
Espermatocitos secundarios	Rara vez se encuentra en muestras histológicas. Citoplasma reducido, el núcleo presenta cromatina difusa formando grumos moderadamente electrodensos.	
Espermatidas y espermatozoides	Encontrado en grupos con las cabezas hacia las paredes del lóbulo y los haces de flagelo dirigidos hacia el lumen del lóbulo seminífero. Las espermatidas redondas tienen un núcleo esférico con cromatina densa. La cromatina es más homogénea en las espermatidas alargadas. La cromatina se condensa en granulados en las espermatidas tardías. El núcleo asume también	Se mantienen dentro de los espermatocitos

	<p>una forma oval y presenta un indentado basal en el segmento proximal del axonema. El flagelo se alarga, la masa citoplásmica se reduce y las mitocondrias se unen en torno a la porción proximal del axonema. El flagelo se mantiene paralelo a la base del núcleo del espermatozoide.</p>	
--	---	--

#### 4.8.4 Métodos químicos

En muchas pesquerías los peces se descargan ya eviscerados o de lo contrario, el precio que alcanzan impide que se les abra el vientre y por tanto que se pueda determinar su sexo y grado de madurez. La ausencia de dimorfismos sexuales también dificulta una identificación externa. En estos casos, un estudio endocrino molecular permite averiguar el sexo y el grado de madurez, basándose en muestras de sangre y de tejido. La madurez según la talla se puede estimar obteniendo muestras de músculo de una amplia gama de individuos de cada una de las unidades de ordenación.

Se pueden obtener muestras de sangre y músculo para realizar análisis químicos en relación con las hormonas reproductoras. Obviamente, las muestras de individuos maduros presentan un gran interés. Se ha creado un sacabocados que permite tomar muestras de músculo de aproximadamente 100-150 mg sin dañar demasiado al pez. Estas muestras de sangre y músculo se han de congelar de inmediato tras su extracción.

Para obtener plasma la sangre se debe centrifugar (5000 g durante 15 minutos). El plasma resultante puede analizarse directamente. Las muestras de músculo tienen que ser homogeneizadas, extrayéndose los esteroides con diclorometano antes de proceder a la medición.

La evaluación se puede llevar a cabo por métodos estándar de inmunoanálisis ligado a enzimas o inmunoanálisis para hormonas sexuales (por ejemplo, 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), 17 $\alpha$ -20 $\beta$ - dihidroxi-4-pregnen-3-ona dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 $\beta$  P), 11-citotestosterona (11-KT)) y la lipoproteína vitelogenina (Vtg), que se sintetiza bajo la influencia de E<sub>2</sub>.

Los cambios en las hormonas esteroideas y vitelogenina se puede normalmente relacionar con el índice gonadosomático (IGS) y el diámetro de los oocitos. 17,20 $\beta$ -P se puede usar para determinar el tipo de flujo de espermatozoides y de ovulos. La relación entre la testosterona y 11 KT puede servir para identificar el sexo, mientras que varias proporciones esteroides sexuales pueden servir para definir tanto la madurez como el sexo de un pez (por ej., presencia o ausencia de Estradiol, vitelogenina).

Conviene señalar que si bien los esteroides permanecen estables a temperatura ambiente durante varias semanas, las muestras de vitelogenina han de ser almacenadas a temperaturas bajas.

#### 4.8.5 Estimación de características relacionadas con la madurez

El procedimiento estadístico para obtener una pauta de madurez requiere adecuar un modelo de regresión predictiva no lineal ponderada directamente a los datos de madurez. El modelo puede entonces aplicarse para predecir proporciones de peces sexualmente maduros a edades y/o tallas concretas. Con los datos se pueden también hacer evaluaciones de variación espacial y temporal en las funciones de madurez. La madurez a la talla se puede estimar por medio de una curva logística de la fórmula:

$$\%maduro = \frac{100}{1 + e^{-a(talla+b)}}$$

o en la fórmula lineal:

$$\ln\left[\frac{p}{1-p}\right] = \alpha + \beta * talla$$

donde  $p$  es la probabilidad de que el tünido sea maduro,  $\alpha$  y  $\beta$  son parámetros de regresión lineal del modelo, y talla es la talla del pez. Se deben calcular intervalos de confianza del 95%. Si no se ha realizado muestreo estratificado, el ajuste del modelo se ha de ponderar por el número de muestras de cada clase de talla, con el fin de asegurarse de que un tamaño limitado de las muestras en los extremos del rango de tallas muestreado no tienen excesiva repercusión sobre el ajuste del modelo.

Se puede calcular el índice gonadal (GI) de los marlines. Esta es la relación entre el peso del ovario ( $O_w$ ) y la talla. Se suele usar la longitud desde la mandíbula inferior a la horquilla (LJFL). GI es pues:

$$GI_{LJFL} = \frac{O_w}{LJFL^3} * 10^4$$

Más allá de un valor crítico del GI, particular de algunas especies, se acepta que el individuo estudiado se encuentra en estado de madurez sexual (Albaret, 1977; Cayré y Laloé, 1986). En el pez espada, GI superior o igual a 2.09 es una indicación *a priori* de hembras en una etapa de reproducción activa (García Cortés y Mejuto, 2003). Siempre que sea posible se deben calcular intervalos de confianza del 95% para GI.

El índice gonado-somático (GSI) es la proporción entre el peso gonadal y el peso del cuerpo y puede ser indicativo del grado de madurez:

$$GSI = \frac{W_G}{W} * 100$$

donde  $W_G$  es el peso gonadal y  $W$  es el peso del individuo sin gónadas. Si se calcula un índice gonado-somático, por ejemplo, por medio de histología, podría usarse para determinar las distribuciones espacio temporales del desove. Sin embargo, no es suficientemente preciso para aplicarlo a la clasificación de madurez o de actividad reproductora. Esto se basa en el análisis de datos histológicos detallados.

La estimación de la fecundidad anual en los túnidos requiere estimaciones de frecuencias de desove por clases de talla y estimaciones correspondientes de fecundidad por lotes en todo el rango de tallas de hembras maduras. Es necesario el conocimiento sobre la apariencia y longevidad de los folículos postovulatorios en los ovarios tras el desove para poder estimar la frecuencia de éste. La frecuencia con la cual los ovarios de hembras maduras contienen folículos postovulatorios puede entonces aplicarse para estimar la frecuencia del desove. Las hembras de mayor tamaño parecen capaces de mantener una mayor frecuencia.

Sólo en las etapas finales de la maduración de los ovocitos, empezando con la fase de migración del núcleo y seguida de hidratación existe una separación clara en la distribución de oocitos a partir de la cual se pueden hacer estimaciones de fecundidad por lotes. Esta, tan solo se estimará basándose en ovarios en condición hidratada pero de preovulación. Cualquier pérdida de oocitos falsearía las estimaciones de fecundidad. Teniendo en cuenta que muchos túnidos son reproductores en serie (Corriero *et al.*, 2003), las estimaciones de fecundidad basadas en ovarios no hidratados pueden sobreestimar en mucho la fecundidad por lotes ya que episodios sucesivos de desove no pueden ser claramente diferenciados hasta el inicio de la hidratación. La fecundidad por lotes se debe determinar usando el método gravimétrico que cuenta el número de oocitos hidratados presentes en una submuestra ponderada de tejido ovárico ( $O_w$ ). Se deben tomar secciones de láminas de las zonas anterior, media y posterior del ovario. Cada una de estas muestras se colocará en el portaobjetos del microscopio (una escala longitudinal en el portaobjetos puede ayudar a contar) saturada de una solución de glicerina y con una cubierta por encima. El número de oocitos hidratados presentes en cada muestra se contará tres veces, y la media numérica de oocitos hidratados se aplicará para calcular la fecundidad por lotes:

$$B_f = H_e * O_w$$

donde  $B_f$  es la fecundidad por lotes,  $H_e$  es el número de oocitos hidratados por unidad de peso en la muestra de tejido, y  $O_w$  es el peso del ovario. Las estimaciones basadas en las secciones anterior, media y posterior del ovario pueden después promediarse para obtener una estimación representativa de toda la muestra. Se deben conseguir múltiples muestras y ejemplares para lograr un cierto grado de variabilidad en las estimaciones de fecundidad por lotes.

La fecundidad por lotes por talla se suele describir por medio de una función de potencia de la fórmula:

$$B_f = cL^b$$

donde  $L$  es la talla del pez y  $c$  y  $b$  son parámetros estimados. Fecundidad por lotes por peso se suele describir por una relación lineal de la fórmula:

$$B_f = aW + b$$

donde W es el peso del pez.

La fecundidad anual puede estimarse entonces basándose en las estimaciones de fecundidad por lotes (número de oocitos liberados por desove) y frecuencia del desove.

#### 4.8.6 Bibliografía

- ALBARET, J.J. (1977). La reproduction de l'albacore (*Thunnus albacares*) dans le Golfe de Guinée. Cah. ORSTOM, Sér. Océanogr. 15(4): 389-419.
- ABASCAL, F.J., C. Megina and A. Medina (2004). Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean. Fish. Bull. 102, 407-417.
- AROCHA, F. (2002). Oocyte development and maturity classification of swordfish from the north-western Atlantic. J. Fish Biol. 60, 13-27.
- BRIDGES, C.R., P. Schröder, V. Susca, A. Corriero, M. Deflorio, G. De Metrio (2001). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fisheries. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 52(2): 752-758.
- CAYRÉ, P. and H. Farrugio (1986). Biologie de la reproduction du listao (*Katsuwonus pelamis*) de l'océan Atlantique. In: Symons, P.E.K., P.M. Miyake, G.T. Sakagawa (eds.), Proc. ICCAT Conference on the International Skipjack Year Program, Madrid, pp. 252-272.
- CAYRÉ, P. and F. Laloé (1986). Review of the gonad index (GI) and an introduction to the concept of its "critical value": Application to the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, in the Atlantic Ocean. Marine Biology 90:345-351.
- CORRIERO, A., S. Desantis, M. Deflorio, F. Acone, C.R. Bridges, J.M. De la Serna, P. Megalofonou and G. De Metrio (2003). Histological investigation on the ovarian cycle of the bluefin tuna in the western and central Mediterranean. J. Fish Biol. 63(1), 108-119.
- GARCÍA-CORTÉS, B. and J. Mejuto (2003). Sex ratio patterns and gonadal indices of the swordfish (*Xiphias gladius*) caught by the Spanish surface longline fleet in the Indian Ocean. IOTC Proceedings no 6, 287-299.
- HUNTER, J.R., B. Macewicz and J.R. Sibert (1986). The spawning frequency of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, from the South Pacific. Fish. Bull. 84, 895-903.
- SCHAEFER, K.M. (1996). Spawning time, frequency, and batch fecundity of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, near Clipperton Atoll in the eastern Pacific Ocean. Fish. Bull., 94, 98-112.
- SCHAEFER, K.M. (2003). Estimation of the maturity and fecundity of tunas. Report of the working group on modern approaches to assess maturity and fecundity of warm- and cold-water fish and squids. Fiskeri og Havet 12, 117-124.
- SUSCA, V., A. Corriero, C.R. Bridges and D. De Metrio (2001). Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterisation of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Fish Biol. 58, 815-831.
- WEST, G. (1990). Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aus. J. Mar. Freshwater Res. 41, 199-222.