



ARTÍCULO ORIGINAL

Características morfológicas del ovario de *Girardinus microdactylus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) en el río Pedernales, Artemisa, Cuba

Morphological characteristics of the ovary of Girardinus microdactylus (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in the Pedernales river, Artemisa, Cuba

Eglis Liel Torres Martínez ¹ , Ana Sanz Ochotorena ² , Yamilka Rodríguez Gómez ² 

1 Jardín Botánico de la Habana Quinta de los Molinos; 2 Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, Calle 25 N° 455, e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. C.P. 10400

*Autor para correspondencia:
eglistorres69@gmail.com

RESUMEN

La reproducción es de vital importancia para la continuidad de las especies y el adecuado manejo de sus poblaciones; sin embargo, son pocos los estudios que abordan la reproducción de las especies cubanas de poecílidos. Estos peces tienen una gran importancia para la salud humana y del ecosistema, al ser controladores biológicos e indicadores de la calidad de las aguas, por ello se necesita ampliar el conocimiento de su historia natural, especialmente de sus aspectos reproductivos. El objetivo de este trabajo es la descripción histológica de las gónadas femeninas de *Girardinus microdactylus*, poecílido endémico de la región occidental de Cuba. Para este estudio se recolectaron 24 hembras en los meses de diciembre a febrero. Las gónadas de seis ejemplares se sometieron a la técnica histológica clásica, se tiñeron con H-E y se analizaron al microscopio óptico de campo claro. Se encontró que el peso de la hembra depende del tamaño corporal y del peso gonadal, y este último del estado de desarrollo de los folículos ováricos. Las hembras más grandes tienen capacidad para un mayor número de crías. Se identificaron todas las etapas de desarrollo del ovocito: cromatina nucleólo, perinucleolar, alvéolos corticales, vitelogénesis, ovocito maduro y embriones en desarrollo dentro de los folículos ováricos. Las hembras en etapa de no gestación tuvieron numerosos espermatozoides en el gonoducto. El apareamiento ocurre, aunque los ovocitos no estén listos para la fecundación, lo que indica una posible separación temporal entre el apareamiento y la fertilización.

Palabras clave: gónada, hembra, peces dulceacuícolas, ovocito

ABSTRACT

Reproduction is vital for the continuity of the species and for the proper management of their populations; however, there are few studies that address the reproduction of Cuban species of poeciliids. These fish are of great

Recibido: 2023-02-20

Aceptado: 2020-06-23

importance for human and ecosystem health, as they are biological controllers and indicators of water quality, which is why it is necessary to broaden the knowledge of their natural history, especially their reproductive aspects. The objective of this work is the histological description of the female gonads of *Girardinus microdactylus*, a poeciliid endemic to the western region of Cuba. For this study, 24 females were collected in the months of December to February. The gonads of six specimens were subjected to the classical histological technique, stained with H-E and analyzed under a bright field optical microscope. It was found that the weight of the female depends on the body size and gonadal weight, and the latter on the state of development of the ovarian follicles. Larger females can accommodate a larger number of offspring. All stages of oocyte development were identified: chromatin nucleolus, perinucleolar, cortical alveoli, vitellogenesis, mature oocyte, and developing embryos within ovarian follicles. Non-pregnant females had numerous sperm in the gonoduct. Mating occurs even though the oocytes are not ready for fertilization, indicating a possible time gap between mating and fertilization.

Keywords: gonad, female, freshwater fish, oocyte

INTRODUCCIÓN

Cuba presenta la mayor diversidad y endemismo de peces de agua dulce del Caribe Insular (Rodríguez-Machado y Ponce de León, 2017). Históricamente la mayor parte de los estudios de los peces dulceacuícolas cubanos se han orientado a la taxonomía y la biogeografía (Poey, 1854; Eigenman, 1903; Rivas, 1969; Vergara, 1992; Poeser, 2005; Hulsey *et al.*, 2011; García-Machado *et al.*, 2011, 2020). En los últimos años ha devenido un aumento en las investigaciones de la ecología de estos vertebrados en Cuba (Ponce de León y Rodríguez, 2007; Ponce de León y Rodríguez, 2008; Ponce de León *et al.*, 2013; Rodríguez-Machado *et al.*, 2019), sin embargo, aún son escasos pues se desconocen aspectos importantes de su historia natural.

La Familia mejor representada en Cuba es Pociliidae con 4 géneros *Girardinus*, *Quintana*, *Gambusia* y *Limia*, los dos primeros endémicos. Existe debate en cuanto al número de especies, debido a la compleja taxonomía y a los recientes estudios moleculares (Fink, 1971; Rauchenberger, 1989; Doadrio *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2010; García-Machado *et al.*, 2020), pero por el momento sólo hay 12 especies reconocidas (Ponce de León y Rodríguez, 2010).

La reproducción es el proceso por el cual se forman nuevos individuos, lo que repercute de manera considerable en el estado de las poblaciones. Es precisamente este un aspecto distintivo de los poecílicos. Los machos tienen la aleta anal modificada en un órgano copulador alargado y delgado llamado gonopodio que permite la fertilización interna (Ponce de León y Rodríguez, 2010). Las hembras portan los embriones en el

ovario hasta el nacimiento, siendo un proceso exclusivo de este grupo, pues carecen de conductos de Müller (Wake, 1985), por lo que el ovario evolucionó para ser la única estructura reproductora (Uribe y Grier, 2018). También puede ocurrir almacenamiento de esperma dentro de este, lo que resulta en una posible separación temporal entre el apareamiento y la fertilización (Greven, 2010).

El conocimiento de las características reproductivas de las especies proporciona las bases para trazar estrategias adecuadas para su manejo y conservación. Sin embargo, en Cuba se conoce poco sobre la reproducción de los poecílicos. Ponce de León *et al.* (2011) describen, en 10 especies de poecílicos cubanos, la relación entre el tamaño del huevo y el tamaño de la cría, la longitud del recién nacido y longitud total de hembras. En Ponce de León y Uribe (2021) se refieren a la morfología de las estructuras embrionarias y maternas relacionadas con la nutrición (los sacos: vitelino y pericárdico). Por otro lado, Páez (2007) evaluó las alteraciones en la biología reproductiva de *Gambusia punctulata* provocadas por la contaminación. Aún se necesitan más trabajos que aporten información sobre la reproducción de estas especies, por ello que el objetivo de este estudio es describir la histología de la gónada femenina de *Girardinus microdactylus*, un poecílico endémico de la región occidental de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Girardinus microdactylus* utilizados en este estudio fueron recolectados en el río Pedernales, en la provincia Artemisa, Cuba en las coordenadas 22°84'00.79''N, 82°89'40.63''W (Fig. 1).

Las recolectas se realizaron en diciembre y febrero de 2020 y en enero de 2022. La temperatura del agua osciló entre los 18 y los 25°C, la más baja se registró en el mes de enero.

Se capturaron un total de 24 hembras adultas, las cuales se midieron y pesaron, con un pie de rey (0,01cm) y una balanza SARTORUS (0,01g) respectivamente. Para el estudio histológico se seleccionaron seis ejemplares, el resto fueron devueltos al medio. A cada hembra seleccionada se le extrajeron las gónadas, las cuales fueron rápidamente fijadas en para-formaldehído 4%. Se les aplicó la técnica histológica clásica y se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor. Estos se tiñeron con HE (Hematoxilina y Eosina de Harris) y se analizaron en un microscopio óptico de campo claro (objetivos de 4X, 5X, 10X, 40X y 100X y ocular de 10X).



Figura 1. Sitio de colecta, Río Pedernales, Artemisa, Cuba.

Figure 1. Collection site, Pedernales River, Artemisa, Cuba.

RESULTADOS

La temperatura del agua osciló entre los 18 y los 25°C, la más baja se registró en el mes de enero. El largo total y el peso total y gonadal promedio fue de 5,19 cm, 1,79 g y 0,18 g, respectivamente. De las 24 hembras siete estaban gestantes y se corresponden a la colecta de febrero. El largo promedio de las hembras gestantes fue de 5.20 cm y el peso promedio 2.07 g, mientras que el peso promedio de la gónada fue de 0.22 g. El peso de la gónada está en correspondencia con la fase del ciclo, ya que las hembras gestantes o con ovarios con ovocitos vitelogénicos presentaron los mayores valores

El ovario de *G. microdactylus* es un órgano único en forma de saco ovoide (Fig. 2). La pared ovárica es translúcida rodeada de grasa, con numerosos folículos en diferente estado de desarrollo (Fig.3). Los ovocitos en los estadios avanzados de madurez se pueden ver a simple vista. El epitelio germinal de la pared del ovario forma pliegues que están en contacto con un lumen central (Fig. 4). Se encontró asincronía en el estado de desarrollo de los ovocitos, es decir, coexisten ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y en estado de gestación.



Figura 2. Vista macroscópica del Ovario de *Girardinus Microdactylus*.

Figure 2. Macroscopic view of the Ovary of *Girardinus Microdactylus*.

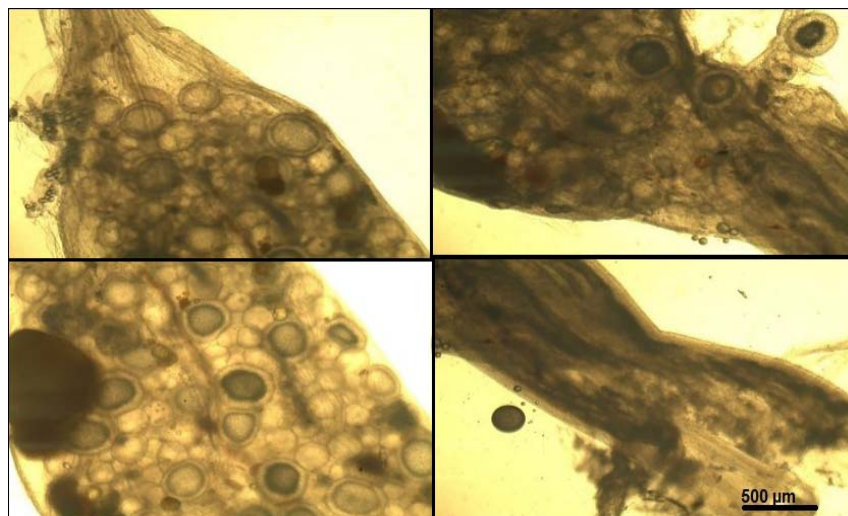


Figura 3. Vista por secciones del ovario de *Girardinus microdactylus* al microscopio óptico antes de la fijación 4X .

Figure 3. View by sections of the ovary of *Girardinus microdactylus* under an optical microscope before fixation 4X .

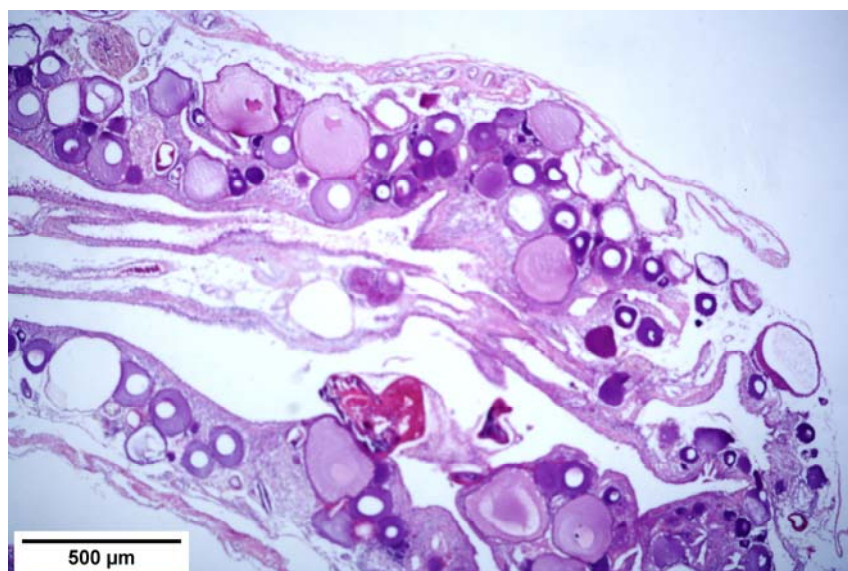


Figura 4. Corte longitudinal del ovario de *Girardinus microdactylus* H-E. 5X .

Figure 4. Longitudinal view of the ovary of *Girardinus microdactylus* H-E 5X .

Se encontraron ovocitos en etapa de crecimiento primario o previtelogénicos en sus tres fases: cromatina nucléolo, fase perinuclear y alvéolo cortical (Fig. 5). Los ovocitos en fase cromatina nucléolo (Fig.5A) son de pequeño tamaño, tienen escaso citoplasma fuertemente basófilo, dispuesto de forma homogénea. El núcleo es grande y esférico, en su interior se encuentra un nucléolo excéntrico y grande, en él también se observan cromosomas plumosos o *lamp brush*. Esta fue la fase más frecuente en los

cortes analizados de las hembras colectadas en enero (Fig. 5A). Cuando aumenta la cantidad de citoplasma del ovocito los nucléolos proliferan y se hacen más pequeños, entrando en la fase perinuclear y los cromosomas plumosos se mantienen (Fig. 5B). Los alvéolos corticales se evidencian como vesículas ovaladas en el interior del ovocito (Fig. 5 D), con poca afinidad por los colorantes, distribuidos alrededor del núcleo. Se observaron también algunos ovocitos previtelogénicos (Fig. 5C) y otros en vitelogénesis

temprana. Se encontraron pocos ovocitos en estado de atresia vitelogénica (Fig.6).

Las hembras colectadas en diciembre y enero se encontraban en etapa de no gestación, típico de esta época del año. Sin embargo, se observaron numerosos espermatozoides en lumen y en la parte no germinal

del ovario, “el gonoducto”. Mientras que de las hembras colectadas en febrero, algunas presentaron ovocitos en estado de vitelogénesis avanzada (Fig.7A), la mayoría estaban en gestación, donde los embriones tenían los ojos y el corazón ya formados (Fig. 7B). Otras estaban en estado de gestación avanzada,

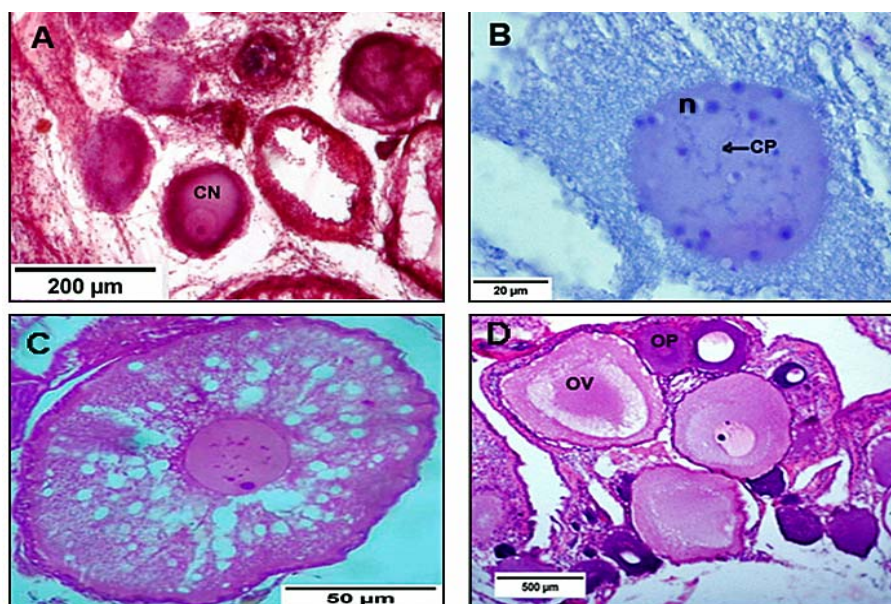


Figura 5. Ovocitos de *Girardinus microdactylus* en etapas tempranas de desarrollo. (A) fase de cromatina nucléolo 10X; (B) fase perinuclear 100X; (C) ovocito en fase de alvéolo cortical 40X; (D) ovocito previtelogénico 10X. Cromatina nucleolo (CN), nucléolo (n), cromosoma plumoso (CP), ovocito vitelogénico (OV), ovocito previtelogénico (OP). A,C,D: H-E; B: TBO .

Figure 5. *Girardinus microdactylus* oocytes in early stages of development. (A) nuclear chromatin phase 10X; (B) perinuclear phase 100X; (C) oocyte in cortical alveolus phase 40X; (D) previtellogenic oocyte 10X. Chromatin nucleolus (CN), nucleolus (n), feather chromosome (CP), vitellogenic oocyte (OV), previtellogenic oocyte (OP). A,C,D: H-E; B: TBO.

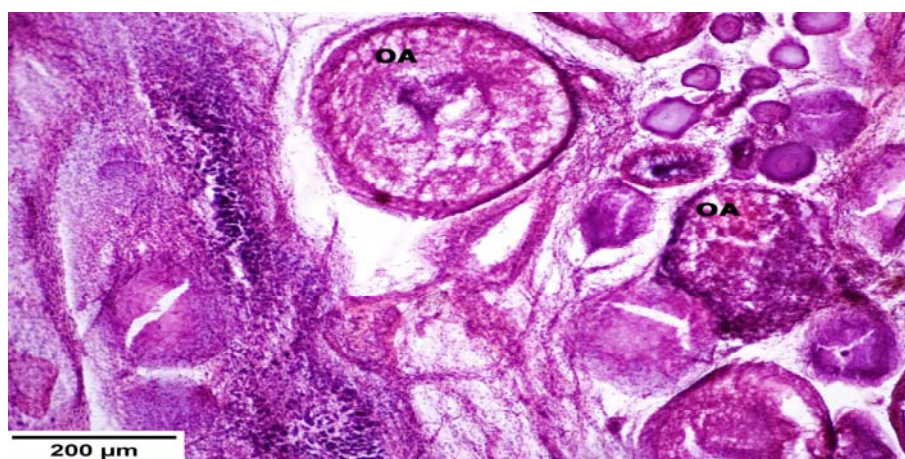


Figura 6. Ovocitos atrésicos de *Girardinus microdactylus*, se observa la licuefacción del vitelo. 10X

Figure 6. Percentage of incidence of the identified species with respect to the total areas.

donde los alevines se podían observar a simple vista y con capacidad de nadar, sin embargo, les quedaba abundante vitelo por reabsorber. Macroscópicamente el vitelo se observó de color amarillo (Fig. 7A), más oscuro en la etapa gestacional (Fig. 7B).

DISCUSION

El viviparismo como estrategia reproductiva conlleva una gran reducción de la fertilidad, en comparación con los peces con fertilización y ovoposición externas. La cantidad de alevines que produce cada hembra está

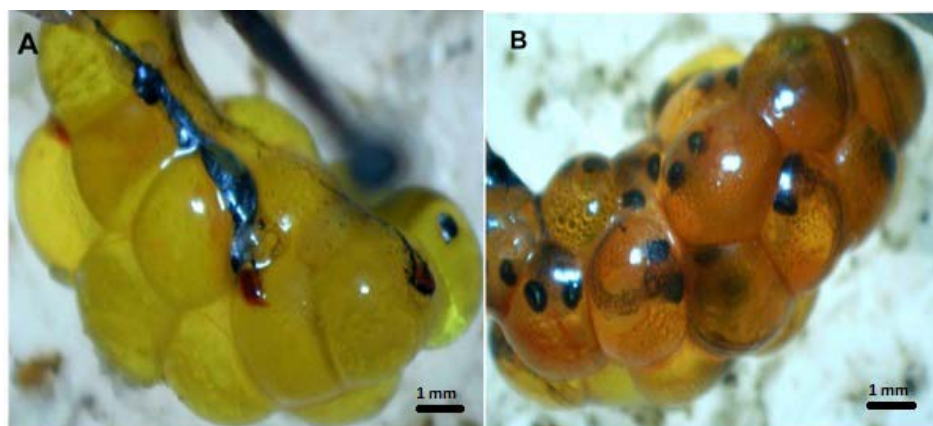


Figura 7. Vista macroscópica del Ovario de *Girardinus microdactylus*. (A) fase vitelogénica; (B) fase de gestación.

Figure 7. Macroscopic view of the Ovary of *Girardinus microdactylus*. (A) vitellogenic phase; (B) gestation phase

en correspondencia con el largo o ancho de esta y por el índice gonadosomático (Grier *et al.*, 2005). Los niveles de fecundidad aumentan con la edad y el tamaño de esta (Grier *et al.*, 2005, Ponce de León, 2011); esto se corresponde con la relación positiva entre el tamaño corporal y el peso gonadal de las hembras gestantes, encontrado en este estudio. Además, como era de esperar las gónadas en estado de desarrollo avanzado tenían mayor peso que las que se encontraban en etapas tempranas.

El ovario de *Girardinus microdactylus* se corresponde de manera general con lo descrito para otras especies de poecílidos (Grier *et al.*, 2005, Greven, 2010, Uribe y Grier, 2018), tiene forma ovoide con un lumen central en contacto con el epitelio germinal a través de las lamelas ovígeras. En esta especie como en todos los poecílidos, la fertilización y la gestación ocurren en el folículo ovárico (Wourms *et al.*, 1988, Ponce de León, 2011,). La comunicación del ovario con el exterior se establece por la parte posterior del ovario que carece de células germinales, llamada gonoducto. Los espermatozoides pasan por el gonoducto a la zona germinal del ovario donde fertilizan a los folículos

maduros y la gestación tiene lugar dentro de este (Uribe y Grier, 2018).

Según Koya (2008) los poecílidos carecen de micrópilo, característica que permite la entrada del espermatozoide al ovocito y la consiguiente fecundación en otros teleósteos. En cambio, el epitelio germinal que bordea al lumen del ovario presenta invaginaciones que desarrollan estructuras tubulares llamadas *Delle* que contienen el espermatozoide almacenado (Koya, 2008). El extremo distal del *Delle* puede terminar directamente en las células foliculares las cuales rodean a los ovocitos (Uribe y Grier, 2018). Kobayashi e Iwamatsu (2002) sugieren que el *Delle* permite la fertilización intra-folicular. En esta investigación no se pudo observar la estructura del *Delle*.

Existe una separación temporal entre el apareamiento y la fertilización, pues se observó gran cantidad de espermatozoides en el gonoducto de las hembras colectadas en enero. Esto indica que la cópula ocurre, sin embargo, los ovocitos no están preparados para la fecundación. Esto coincide con lo planteado por

Greven (2010) y puede estar relacionado con la conducta de los machos de poecílidos de perseguir constantemente a las hembras para la liberación de espermatozoides o al almacenamiento de este en el ovario como se ha descrito en otras especies (Burns y Weitzman, 2005, Koya, 2008, Uribe y Grier, 2018). También pudiera ocurrir el almacenamiento como mecanismo para garantizar la reproducción si escasean los machos o hasta que las condiciones ambientales y los recursos sean óptimos para la fertilización y posterior gestación.

La presencia de espermatozoides en el ovario durante todo el año permite que la fertilización de los ovocitos maduros pueda ocurrir durante todo el ciclo reproductivo anual, por lo que se ha evaluado a los poecílidos como reproductores continuos (Parzefall, 2001; Bussing, 2002). En especies como *Gambusia affinis* se ha determinado que están reproductivamente activos de marzo a octubre cuando las aguas son más cálidas. Los especímenes de *Heterandia formosa* colectados por Uribe y Grier (2018) estuvieron en estado de gestación durante primavera, verano y otoño, mientras que en enero se encontraban en etapa de no gestación. Cuba es un país tropical, cálido la mayor parte del año, donde se definen un período lluvioso de mayo a octubre, y uno menos lluvioso el resto del año (Mancina *et al.*, 2017).

Todos los peces analizados en este estudio corresponden a la estación menos lluviosa, donde se encontraron diferencias en cuanto al desarrollo de los ovarios entre un mes y otro. En el mes de enero, donde la temperatura del agua fue más baja, se encontraron ovocitos en fases primarias de desarrollo y previtelogénicos, mientras que ya en febrero estaban en gestación. Esto coincide con lo reportado para otras especies (Uribe y Grier, 2018), por lo que se puede afirmar que *G. microdactylus* posee un ciclo reproductivo continuo propio de especies de países tropicales sin estaciones del año marcadas, influenciado principalmente por la temperatura.

La presencia de varios nucléolos en etapa de crecimiento primario del ovocito evidencia la producción de ARN ribosomal, mientras que los cromosomas plumosos revelan un activo proceso de transcripción (ARN mensajero), lo que garantiza la síntesis proteica del futuro embrión. En otros poecílidos también se han encontrado este tipo de

cromosomas en esta etapa (Torres-Martínez *et al.*, 2017; Uribe *et al.*, 2019), asimismo en anfibios se han observado en la fase previtelogénica (Sanz-Ochotorena *et al.*, 2021).

La degeneración y eliminación de folículos ováricos se conoce como "atresia folicular" (Uribe *et al.*, 2006; Torres Martínez *et al.*, 2017). Esto incide en el índice de fertilidad, pues reduce la cantidad de ovocitos que maduran, incidiendo en el número de crías que se desarrollan (Bromage *et al.*, 1992). Según Patiño y Redding (2000) este proceso de apoptosis puede estar bajo control hormonal, por lo tanto, regulado genéticamente, y no dependiente de cambios ambientales. Esto mantendría estable el potencial reproductor de la especie. Por otro lado, existen autores que ven este proceso como posibles consecuencias de las condiciones ambientales. La disponibilidad de alimento (Bromage *et al.*, 1992) o la presencia de contaminantes pueden provocar un incremento de la atresia. Las especies que habitan en ambientes hostiles tienen la fecundidad reducida, sin embargo, el tamaño de la descendencia es mayor (Torres Martínez *et al.*, 2017).

Los folículos atrésicos encontrados en este estudio estaban en etapa temprana de crecimiento (en la fase de alveolo cortical), lo que coincide con lo reportado para *Poecilia mexicana* (Torres Martínez *et al.*, 2017). La principal característica observada fue una licuefacción del vitelo Rajalakshmi (1966), como uno de los signos tempranos de atresia. La eliminación de los ovocitos que no alcanzan su desarrollo permite recuperar parte de la energía, y los componentes invertidos durante la maduración folicular (Blazer, 2002). Este estado degenerativo en algunos casos podría ocurrir para impedir que los ovocitos no viables culminen su desarrollo.

En concordancia con lo observado por Ponce de León (2011), *Girardinus microdactylus* desarrolla una sola camada de embriones a la vez, por lo que esta especie no presenta superfecundación, lo anterior coincide con gran parte de los poecílidos estudiados por Pollux *et al.* (2009). En estadios de gestación avanzada se encontraron ovocitos en diferentes fases de desarrollo. Esto puede interpretarse como la preparación de los folículos para el próximo parto, lo que reduciría el tiempo entre camadas e incrementaría la cantidad de descendientes a lo largo

de la vida, como sugiere Ponce de León (2011). *Girardinus microdactylus* produce un huevo grande con gran cantidad de vitelo, lo que está acorde con lo reportado por Ponce de León (2011), lo cual corrobora a esta especie como primariamente lecitotrófica. Esto le confiere mayor éxito reproductivo en ambientes poco estables donde la disponibilidad de alimentos puede fluctuar durante el período de gestación.

Se necesita profundizar en el estudio de la reproducción en especies cubanas de poecílidos, e incluir en estas investigaciones al sexo masculino que indiscutiblemente juega un papel esencial en este proceso. El conocimiento de las características reproductivas permitirá trazar estrategias acertadas y con fundamento para el manejo de las poblaciones de estos peces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todos los que han colaborado de alguna forma en la realización de este trabajo. Reconocen especialmente a la Dra. María Caridad Rigaut Díaz y al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Pediátrico de Centro Habana; a Fernando Lucas Prats y Norma González Herrate del Centro de Investigaciones Pesqueras y a Yoanka por su contribución con las técnicas histológicas. A Lisandro García por asistencia en la recolección de ejemplares. A Reyna Lara Martínez del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UNAM y a Sául González Rosales por su ayuda con la toma y corrección de las imágenes. A Jairon Pérez Copa y Xochilt Ayón por sus comentarios sobre el documento.

LITERATURA CITADA

- Blazer, V.S. (2002) Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 85-101
- Bromage, N.R., J. Jones, C. Randall, M. Thrush et al. (1992) Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141-166
- Burns, J.R. y S.H. Weitzman (2005) Insemination in Ostariophysan Fishes. En: Uribe M. C. y H. J. Grier (Eds.): *Viviparous fishes*. pp: 105-132. New Life Publications, Homestead, Florida.
- Bussing, W. A. (2002) Peces de las aguas continentales de Costa Rica. *Freshwater fishes of Costa Rica*. 2da ed., 1 reimpr. San José, C. R., Editorial de la Universidad de Costa Rica. 504pp.
- Doadrio, I., S. Perea, L. Alcaraz y N. Hernández (2009) Molecular phylogeny and biogeography of the Cuban genus *Girardinus* Poey, 1854 and relationships within the tribe Girardinini (Actinopterygii, Poeciliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 50: 16–30
- Eigenmann, C. H. (1903) The fresh-water fishes of western Cuba. *Bull. US. Fish Commission* 22: 211-236
- Fink, W.L. (1971) A revision of the *Gambusia puncticulata* Complex (Pisces: Poeciliidae). *Publication of the Gulf Coast Research Laboratory Museum* 2: 11-46
- García-Machado, E., D. Hernández, A. García-Debrás, P. Chevalier-Monteagudo, et al. (2011). Molecular phylogeny and phylogeography of the Cuban cave-fishes of the genus *Lucifuga*: Evidence for cryptic allopatric diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61: 470 - 483. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.015>
- García-Machado, E., J.L. Ponce de León, M.A. Gutiérrez-Costa, A. Michel-Salzat, et al. (2020) Phylogeographic evidence that the distribution of cryptic euryhaline species in the *Gambusia punctata* species group in Cuba was shaped by the archipelago geological history. *Mol. Phylogenet. Evol.* 144, 106712 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106712>
- Greven, H. (2010) What do we know about reproduction of internally fertilizing halfbeaks (Zenarchopteridae)? En: Uribe M.C. y H.J. Grier (Eds.): *Viviparous fishes II*. pp: 121–141. Homestead, FL: New Life Publications.
- Grier, H. J., M. C. Uribe, L. R. Parenti, y G. De la Rosa-Cruz (2005). Fecundity, the germinal epithelium and folliculogenesis in viviparous fishes. En: Uribe M.C. y H.J. Grier (Eds.): *Viviparous fishes*. pp. 193–216. Homestead, FL: New Life Publications.
- Hulsey C.D., B. P. Keck y P. R. Hollingsworth (2011). Species tree estimation and the historical biogeography of heroine cichlids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58: 124–131
- Kobayashi, K. y T. Iwamatsu (2002). Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. *Zool. Sci.* 19(5): 545–555
- Koya, Y. (2008). Reproductive physiology in viviparous teleosts. En: Rocha M.J., A. Arukwe, y B.G. Kapoor (Eds.): *Fish reproduction*. pp. 245-275. Enfield, New Hampshire: Science Publisher
- Lara, A., J.L. Ponce de León, R. Rodríguez, D. Casane, et al. (2010) DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 421-430
- Mancina, C. A., R. Fernández de Arcila Fernández, D. D. Cruz Flores, M. A. Castañeira Colomé y A. González Rossell (2017): Diversidad biológica terrestre de Cuba. En: Mancina C. A. y Cruz D. D. (Eds.): *Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas*. Pp. 8-25. Editorial AMA, La Habana.
- Páez, Y. C. (2007) Alteraciones de indicadores biológicos de *Gambusia puncticulata* (Poey, 1854) en sitios muy contaminados del río Almendares. Tesis de Maestría. Centro De Investigaciones Marinas, Universidad De La Habana, Cuba.
- Patiño, R. y J.M. Redding (2000) Reproductive System. Microscopic functional anatomy; reproductive systems. En: G.K. Olander (Ed.): *Handbook of experimental animals. The laboratory fish*. Chapter 28, pp. 489-500. Academic Press. London, U.K.
- Parzefall, J. (2001) A review of morphological and behavioural changes in the cave molly, *Poecilia mexicana*, from Tabasco, Mexico. *Environ. Biol. Fishes* 62: 263–275
- Poeser, F.N. (2005) The evolution, taxonomy, and biogeography of *Poecilia* Bloch and Schneider, 1801, in Central America. En: Uribe, M. C y H. J. Grier (Eds.): *Viviparous fishes*. pp. 191-216. New Life Publications, Homestead, Florida.
- Poey, F. (1854) "Los guajacones, pececillos de agua dulce." *Mem Hist Nat de la Isla de Cuba* 1(32): 374-390.

- Pollux, B. J.A., M.N. Pires, A.I. Banet y D.N. Reznick (2009) Evolution of Placentas in the Fish Family Poeciliidae: An Empirical Study of Macroevolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40:271–89
- Ponce de León, J. L. (2011) Estrategias de historia de vida relacionadas con la reproducción de la familia Poeciliidae (Actinopterygii: Cyprinodontiformes) en Cuba: patrones opuestos en ambientes contrastantes. Tesis de Doctorado, Universidad de La Habana, Cuba.
- Ponce de León, J.L. y R. Rodríguez (2007) Dinámica poblacional de tres especies de Poeciliidae (Teleostei: Cyprinodontiformes) en Govea, un arroyo intermitente de Cuba. *Rev. Biol.* 21:1-2
- Ponce de León, J.L. y R. Rodríguez (2008) Riqueza y abundancia relativa de peces de agua dulce en dos localidades de la Isla de la Juventud, al final de la época de seca. *Rev. Cub. Cienc. Biol.* 1 (1):82-84
- Ponce de León, J. L. y R. Rodríguez (2010) Peces cubanos de la familia Poeciliidae. Guía de campo. Editorial Academia, La Habana. 38 pp.
- Ponce de León, J.L. y M. C. Uribe (2021) Morfología de los sacos vitelinos y pericárdicos en la nutrición lecitotrófica y matrotrofica de peces poecílidos. *J. Morphol* 282 (6):887-899
- Ponce de León, J. L., R. Rodríguez, M. Acosta y M. C. Uribe (2011) Egg size and its relationship with fecundity, newborn length and female size in Cuban poeciliid fishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Ecol. Freshwater Fish.* 20(2): 243–250.
- Ponce de León, J. L., R. Rodríguez, y G. León (2013) Life-History Patterns of Cuban Poeciliid Fishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zoo Biol.* 32: 251–256.
- Rajalakshmi, M. (1966) Atresia of oocytes and ruptured follicles in *Gobius giurus* (Hamilton-Buchanan). *General and Comparative Endocrinology* 6: 378-385
- Rauchenberger, M. (1989) "Systematics and Biogeography of the Genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)." *Am. Mus. Novit.* 74 pp.
- Rivas, L. R. (1969) A revision of the poeciliid fishes of the *Gambusia punctata* species group, with descriptions of two new species. *Copeia* (4): 778-795.
- Rodríguez-Machado, S., G. Hidalgo, L. Brito, M. Arrebola, et al. (2019) Partial trophic segregation in co-occurring *Gambusia* species (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in a natural wetland of Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 39(1):117-130
- Rodríguez-Machado, S. y J. L. Ponce de León (2017): Peces de agua dulce. En: Mancina C. A. y Cruz D. D. (Eds.): *Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas*. Pp. 326-347. Editorial AMA, La Habana.
- Sanz Ochotorena, A. C., Y. Rodríguez Gómez, M.L. Segura Valdéz, L. F. Jiménez García, et al. (2021) Contributions to the knowledge of microscopic morphology of the gonads of Cuban amphibians and reptiles. *An. Acad. Cub. Cienc.* 11(3) e1043. Epub 01 de diciembre de 2021. Recuperado en 19 de julio de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062021000300007&lng=es&tlng=en.
- Torres-Martínez, A., A. Hernández-Franyutti, M. C Uribe y W.M. Contreras-Sánchez (2017) Ovarian structure and oogenesis of the extremophile viviparous teleost *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) from an active sulfur spring cave in Southern Mexico. *J. Morphol.* 278 (12): 1667-1681
- Uribe Aranzábal, M. C., G. De la Rosa-Cruz, A. García-Alarcón, S. Guerrero-Estévez, et al. (2006) Características histológicas de los estados de atresia de folículos ováricos en dos especies de teleosteos vivíparos: *Ilyodon whitei* (Meek, 1904) y *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880) (Goodeidae). *Hidrobiológica* 16 (1): 67-73
- Uribe, M.C. y H. Grier (2018) Insemination, intrafollicular fertilization and development of the fertilization plug during gestation in *Heterandria formosa* (Poeciliidae). *J. Morphol* 00:1–11. <https://doi.org/10.1002/jmor.20827>
- Uribe, M.C., G. De la Rosa Cruz, A. García Alarcón, J. C. Campuzano Caballero, et al. (2019) "Structures Associated with Oogenesis and Embryonic Development during Intraovarian Gestation in Viviparous Teleosts (Poeciliidae)" *Fishes* 4(2) 35. <https://doi.org/10.3390/fishes4020035>
- Vergara, R. (1992) Principales características de la ictiofauna dulceacuicola cubana. Editorial Academia, Ciudad Habana, 27 pp.
- Wake, M.H. (1985) Oviduct structure and function in non-mammalian vertebrates. *Fortschr. Zool.* 30: 427-435
- Wourms, J. P., B. D. Grove y J. Lombardi (1988) The maternal embryonic relationship in viviparous fishes. En: Hoar W.S. y D.J. Randall (Eds.): *Fish physiology Vol. XI: The physiology of developing fish. B. Viviparity and posthatching juveniles*. pp. 2–134. San Diego: Academic Press