



## Determinación de dimorfismo sexual usando técnicas morfométricas en *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae) cultivados en cautiverio

### Determination of sexual dimorphism using morphometric techniques in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae) cultivated in captivity

Roy González G.<sup>1</sup>, Adriana Bermúdez Tobón<sup>1,2</sup> y Gabriel R. Navas-S.<sup>2\*</sup>

0000-0001-8727-4773

0000-0002-5247-4561

0000-0001-9554-6345

1. University of Cartagena, Faculty of Exact and Natural Sciences, Biology Program, Applied and Descriptive Biology Research group, Campus San Pablo, Carrera 49B No. 50-230, Barrio Zaragocilla, Cartagena de Indias, Colombia. [rgonzalezg1@unicartagena.edu.co](mailto:rgonzalezg1@unicartagena.edu.co), [abermudezt@unicartagena.edu.co](mailto:abermudezt@unicartagena.edu.co)

2. University of Cartagena, Faculty of Exact and Natural Sciences, Biology Program, Hydrobiology Research group, Campus San Pablo, Carrera 49B No. 50-230, Barrio Zaragocilla, Cartagena de Indias, Colombia. [gnavass@unicartagena.edu.co](mailto:gnavass@unicartagena.edu.co)\*

\* Autor de correspondencia

#### RESUMEN

*Rachycentron canadum* es un pez con importancia económica en la acuicultura debido a su resistencia a variaciones ambientales, factibilidad de cultivo en confinamiento, altas tasas de crecimiento y buena aceptación de los consumidores. La rentabilidad de su cultivo en jaulas se ve afectada negativamente por la dificultad de implementar cultivos monosexo debido a la aparente semejanza entre los sexos. En este estudio se utilizaron técnicas morfométricas para determinar el dimorfismo sexual mediante el análisis de medidas y la forma de los peces. Se encontraron diferencias entre sexos en la posición de los ojos, labios, aleta pectoral y aleta ventral, y en la forma general del cuerpo. La precisión del sexado de los individuos fue de 75,4 % con distancias y 82,7 % con morfometría geométrica.

**PALABRAS CLAVE:** Cobia, Morfometría geométrica, Morfometría de distancias, Caribe colombiano.

#### ABSTRACT

*Rachycentron canadum* is an economically important fish in aquaculture due to its resistance to environmental variations, the feasibility of culture in confinement, high growth rates, and good acceptance by consumers. The profitability of their cage culture is negatively affected by the difficulty of implementing monosex cultures due to the apparent similarity between sexes. In this study, morphometric techniques were used to determine sexual dimorphism by analyzing measurements and the fish's shape. Differences were found between the sexes in the position of the eyes, lips, pectoral fin and ventral fin, and the body's general shape. The sexing precision of the individuals was 75.4 % with distances and 82.7 % with geometric morphometry.

**KEYWORDS:** Cobia, Geometric morphometry, Distances morphometrics, Colombian Caribbean.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura marina ha crecido constantemente y puede suplir parte de la demanda creciente de peces. Particularmente, las especies marinas en ambientes controlados han sido una alternativa efectiva para pesca puramente extractiva. Cada año se estudia un número cada vez mayor de especies con usos potenciales en la industria de la acuicultura, y *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), comúnmente conocido como cobia, es uno de ellos (Franks *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007; Mosqueira *et al.*, 2011).

Esta especie ha ganado importancia debido a la viabilidad de su producción, dadas características como la tolerancia a un amplio rango de temperaturas (entre 16,8 y 32,2 °C) y salinidad (entre 5,0 y 44,5 ups), una buena adaptación a espacios cerrados (por ejemplo, a cultivos en jaulas flotantes), tasas altas de crecimiento (peso promedio de 6 kg en el primer año de cultivo), una tasa excelente de conversión de alimentos, carne de buena calidad nutricional y buena recepción de parte de los consumidores dadas su apariencia y características organolépticas, así como una reproducción relativamente fácil a los dos años de edad (Flores, 2017; Carmona *et al.*, 2019).

En comparación con cuerpos de agua cerrados, el cultivo en jaulas flotantes es respetuoso con el medio ambiente, dado que el mar abierto puede asimilar cargas altas de contaminantes y tiene una gran disponibilidad de agua de buena calidad y bien oxigenada. Asimismo, una vez que la estructura ha sido implementada, en muchos casos, esta permite una reducción en los costos de comida y transporte, por lo cual ha habido diferentes experiencias de cultivo en países del Caribe como Colombia y Cuba (Flores, 2017; Carmona *et al.*, 2019).

En cultivos en jaula, donde los animales están muy cerca unos de otros, la implementación de cultivos de un solo sexo es ampliamente utilizada en la industria de la acuicultura (Franks *et al.*, 1999; Franks y Brown-Peterson, 2002; Dutney *et al.*, 2017). Budd *et al.* (2015) resumen algunas de las ventajas de este tipo de cultivo, que permite lo siguiente: usar tasas de crecimiento y/o valores económicos diferenciales entre sexos para maximizar ganancias; reducir la variación en el tamaño de los peces al momento de cosechar; lograr una tasa de crecimiento promedio más alta reduciendo el comportamiento sexual/territorial; reducir el impacto en la calidad del producto, dado, por ejemplo, que a medida que las hembras alcanzan la madurez sexual, desvían la energía (e.g., lípidos); incrementar la estabilidad de sistemas de apareamiento; y reducir el riesgo

## INTRODUCTION

Marine aquaculture has grown steadily and can meet an important part of the increasing demand for fishes. In particular, marine species in controlled environments have been an effective alternative to purely extractive fishing. Every year an increasing number of species with potential use in the aquaculture industry are studied, and *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), commonly known as cobia, is one of them (Franks *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007; Mosqueira *et al.*, 2011).

This species has gained importance due to its economically feasible production due to characteristics such as tolerance to a wide range of temperature (between 16.8 – 32.2 °C) and salinity (between 5.0 – 44.5 ups), good adaptation to confined spaces (e.g., floating cage culture), high growth rates (average weight of 6 kg in the first year of culture), excellent food conversion rate, meat of good nutritional quality and good acceptance by consumers due to its appearance and organoleptic characteristics, and reproduction relatively easy at two years of age (Flores, 2017; Carmona *et al.*, 2019).

Compared to closed water bodies, floating cage culture is friendly to the environment since the open sea can assimilate high pollutant loads and have high availability of good quality and well-oxygenated water. Likewise, once the infrastructure is implemented, in many cases, it allows for a reduction in the costs of food and its transport, which is why different cultivation experiences have been carried out in Caribbean countries such as Colombia and Cuba (Flores, 2017; Carmona *et al.*, 2019).

In cage cultures, where the animals are very close together, the implementation of monosex cultures is widely used in the aquaculture industry (Franks *et al.*, 1999; Franks and Brown-Peterson, 2002; Dutney *et al.*, 2017). Budd *et al.* (2015) summarize some of the advantages of this type of cultures, they allow: the use of differential growth rates and/or economic value between sexes to maximize profits; reduce variation in fish size at harvest time; achieve a higher average growth rate by reducing sexual/territorial behavior; to reduce the impact on the product quality, for example, as the females reach sexual maturity they divert energy (e.g., lipids); increase the stability of mating systems; and to reduce the risk of environmental impact resulting from the escape of exotic species. Special mention needs the reduction of precocious

de impacto ambiental que resulta del escape de especies exóticas. La reducción en la maduración precoz merece especial mención, pues lleva a un crecimiento lento, dado que la energía es desviada hacia la reproducción; crea una gran variación en el tamaño del producto cosechado; y resulta en la sobrepoblación de jaulas y, por lo tanto, en la inhabilidad de controlar las densidades y tasas de alimentación de los animales (Budd *et al.*, 2015).

El desarrollo sexual en peces es un proceso complejo, resultado de la interacción entre los genes involucrados en el desarrollo sexual (características genéticas y epigenéticas) y los mecanismos por medio de los cuales los modificadores ambientales pueden inducir cambios fenotípicos. Esto a menudo depende de procesos particulares de las especies y del sistema de cultivo. Por lo tanto, las innovaciones tecnológicas que controlan con éxito el sexo de una especie no tienen garantías de funcionar con otra. Por consiguiente, la primera aproximación es la detección manual o automática del sexo y la remoción selectiva de individuos. El segundo paso es la investigación subsiguiente de varios enfoques tecnológicos para producir poblaciones para cultivo de un solo sexo (e.g., tratamiento hormonal exógeno, manipulación de ploidía de cromosomas, herramientas moleculares o hibridación) (Budd *et al.*, 2015).

No se ha descubierto un dimorfismo sexual evidente en cultivos de cobia, y la maduración sexual precoz en jaulas flotantes es un problema, puesto que reduce la tasa de conversión de alimento y genera un costo adicional (Fontaine *et al.*, 1997; Leclercq *et al.*, 2010; Cerviño, 2014). En esta especie, y en otras que aún no han alcanzado la producción a escala industrial, elucidar la diferenciación del sexo sigue siendo un área clave de la investigación aplicada (Budd *et al.*, 2015).

La morfometría es la descripción, el análisis y la interpretación cuantitativa de la forma y su variación entre muestras (Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004), cuyos resultados pueden interpretarse en términos de geometría, morfología, dimorfismo sexual, medio ambiente, diferencias genéticas y/o microevolución, entre otros (Hammer, 2002; van de Wouw *et al.*, 2003).

La morfometría tradicional es el estudio de la forma basado en longitudes y ángulos de especímenes individuales, mientras que la morfometría geométrica está basada en referentes anatómicos. Un referente anatómico es un punto de referencia que puede ser reconocido en todos los especímenes a comparar. Estos están ubicados de manera que son fáciles

de maduración, which leads to slow growth as energy is diverted into reproduction, creates a large variance in product size at harvest, and results in overpopulation of cages and, therefore, an inability to control animal densities and feeding rates (Budd *et al.*, 2015).

Sexual development in fishes is a complex process result of the interaction between genes involved in sexual development (genetic and epigenetic characteristics) and the mechanisms by which environmental modifiers can induce phenotypic changes. It often depends on species-specific processes and the culture system. Therefore, technological innovations that successfully control sex in one species are certainly not guaranteed to work in another. As a result, the first approach is manual or automatic sex detection and selective removal of individuals. The second step is the successive research on various technological approaches to produce monosex populations for culture (e.g., exogenous hormone treatment, chromosome ploidy manipulation, molecular tools, or hybridization) (Budd *et al.*, 2015).

None evident sexual dimorphism has been discovered in the cobia culture, and early sexual maturation in floating cages is a problem as it reduces the feed conversion rate and generates an additional cost (Fontaine *et al.*, 1997; Leclercq *et al.*, 2010; Cerviño, 2014). In this species, and in others that are yet to reach industrial-scale production, elucidation of sex differentiation remains a key area of applied research (Budd *et al.*, 2015).

Morphometry is the description, analysis, and quantitative interpretation of the shape and its variation between samples (Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004), whose results can be interpreted in terms of geometry, morphology, sexual dimorphism, environment, genetic differences, and/or microevolution, among others (Hammer, 2002; van de Wouw *et al.*, 2003).

Traditional morphometric is the study of shape based on lengths and angles on individual specimens, whereas geometric morphometric is based on anatomical landmarks. An anatomical landmark is a reference point that can be recognized in all the specimens to be compared. They are located in a way that is easy to recognize (e.g., on the juxtaposition of tissues, demarcating conspicuous internal structures, or maximums of curvature), and describe the shape of the structure to be compared, avoiding the overinfluence of any of them (Bookstein, 1991). Morphological landmarks are placed on digitalized

de reconocer (e.g., en la yuxtaposición de tejidos, demarcando estructuras internas conspicuas o máximos de curvatura) y describen la forma de la estructura a comparar, evitando la sobreinfluencia de cualquiera de ellos (Bookstein, 1991). Los referentes morfológicos se ubican en imágenes digitalizadas de especímenes y se transforman en coordenadas en un plano bidimensional usando algoritmos matemáticos. Por ende, cualquier variación relacionada con la posición, orientación y escala de la imagen se elimina por medio de software de computadora. Se pueden encontrar diferencias en lo que respecta a la forma de los organismos o entre promedios de grupos diferentes (Kendall, 1989; Rohlf, 1990; Marcus *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2008). Esta investigación tuvo como objetivo determinar el dimorfismo sexual de *R. canadum* usando morfometría tradicional y geométrica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico creció en el Centro Colombiano de Investigación en Acuicultura (CENIACUA), ubicado en el departamento de Bolívar, Colombia (10°34'16.7"N 75°30'40.6"W). En total, se usaron 57 peces sanos del cultivo, seleccionados al azar. Fueron sacrificados por asfixia, removiendo la fuente de oxígeno del tanque en el que estaban almacenados, y después fueron preservados en un refrigerador a -20 °C. La longitud de horquilla promedio fue de 45,78 cm (mín = 28,4 cm; máx = 71,9 cm), con edad mínima de cuatro meses y máxima de 12 meses. Se excluyeron cuatro muestras debido a que la forma se vio comprometida por factores externos.

### Morfometría tradicional

Las variables morfométricas utilizadas se basaron en Gandhi *et al.* (2013) y fueron escaladas dividiendo cada una entre la longitud estándar de cada pez. Las variables medidas (Figura 1) fueron: longitud de horquilla (*Fl*), longitud estándar (*Sl*), longitud de aletas ventrales (*Vf*) y pectorales (*Pf*), diámetro de los ojos (*Ed*), separación de fosas nasales (*nn*), distancia entre la hendidura del labio superior (*uL*) y la inserción de la aleta caudal (*Cf*), distancia entre *uL* y el extremo anterior de la boca (*Ma*), separación entre *uL* y la inserción inferior de la aleta pectoral (*iPF*), distancia entre *uL* y la inserción superior de la aleta pectoral (*sPF*), distancia entre *iPF* y *sPF* (*isPF*), distancia entre la fosa nasal (*n*) y *uL*, longitud desde *Vf* hasta *Ma*, distancia entre las inserciones posteriores de la aleta ventral (*ppVF*), distancia entre las inserciones (posteriores y anteriores) de una *Vf* (*paVF*), distancia entre

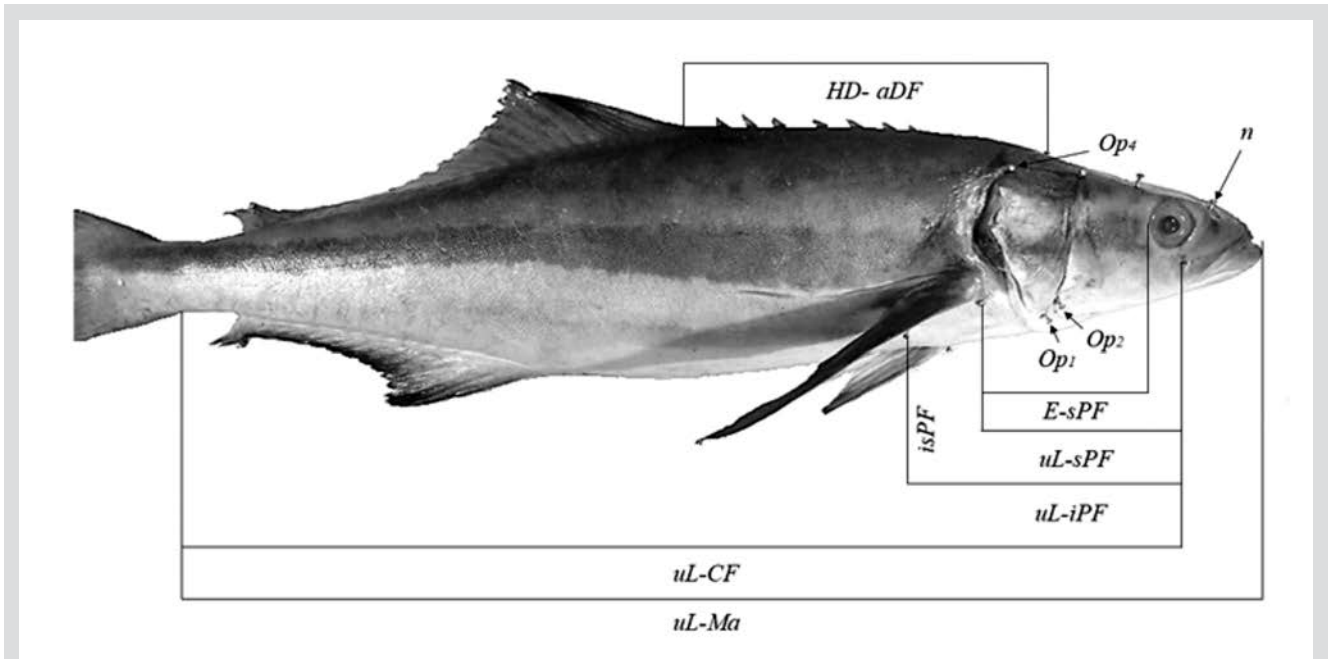
images of specimens and transformed into coordinates in a two-dimensional plane using mathematical algorithms. Hence, any variation related to the position, orientation, and scale of the image, is eliminated by computer software. Differences can be found with regards to the shape of the organisms or between averages of different groups (Kendall, 1989; Rohlf, 1990; Marcus *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2008). This research aimed to determine the sexual dimorphism of *R. canadum* using traditional and geometric morphometry.

## MATERIALS AND METHODS

The biological material was growing at the Colombian Center of Investigation for Aquaculture (CENIACUA), located in the Bolivar department, Colombia (10°34'16.7"N 75°30'40.6"W). In total, 57 healthy fish randomly selected from the culture were used. They were sacrificed by asphyxia, removing the oxygen supply from the tank in which they were being kept, and then were preserved in a refrigerator at -20° C. The average fork length was 45.78 cm (Min = 28.4 cm; Max = 71.9 cm.), with a minimum age of four months and a maximum of twelve months. Four samples were excluded due to shape compromised by external factors.

### Traditional morphometric

The morphometric variables used were based on Gandhi *et al.* (2013) and escalated by dividing each variable by the standard length of each fish. The variables measured were (Figure 1): fork length (*Fl*), standard length (*Sl*), length of ventral (*Vf*) and pectoral (*Pf*) fins, eye diameter (*Ed*), separation of nostrils (*nn*), distance between the cleft of the upper lip (*uL*) and insertion of the caudal fin (*Cf*), distance between *uL* and the mouth anterior end (*Ma*), separation between *uL* and the inferior insertion of the pectoral fin (*iPF*), distance between *uL* and superior insertion of the pectoral fin (*sPF*), distance between *iPF* and *sPF* (*isPF*), distance between the nostril (*n*) and *uL*, length from *Vf* to *Ma*, distance between posterior insertions of the ventral fin (*ppVF*), distance between the insertions (posterior and anterior) of one *Vf* (*paVF*), distance between the head dorsal insertion (*Hd*) and anterior insertion of the dorsal fin (*aDF*), and distance between the eye (*E*) and *sPF*. In the operculum, three anatomical semi-landmarks were selected, *Op<sub>1</sub>*, *Op<sub>2</sub>* and *Op<sub>4</sub>*. Based on these, the distances between *Op<sub>4</sub>* and *uL*,



**Figura 1.** Siete de las 24 medidas y cuatro puntos tomados de los especímenes utilizados en este estudio. En la figura, las abreviaciones son *uL*: hendidura de labio superior; *Ma*: extremo anterior de la boca; *CF*: aleta caudal; *iPF*: inserción inferior de la aleta pectoral; *sPF*: inserción superior de la aleta pectoral; *E*: ojo; *PF*: distancia entre *iPF* y *sPF*; *Op1*, *2*, *4*: hendidura cerca al opérculo; *n*: fosas nasales, *HD*: inserción dorsal de la cabeza, *aDF*: inserción anterior de la aleta dorsal.

**Figure 1.** Seven of the 24 measurements and four points taken from the specimens used in this study. In the figure the abbreviations are *uL*: cleft of the upper lip; *Ma*: mouth anterior end; *CF*: Caudal fin; *iPF*: inferior insertion of the pectoral fin; *sPF*: superior insertion of the pectoral fin; *E*: eye; *PF*: distance between *iPF* and *sPF*; *Op1*, *2*, *4*: cleft near to the operculum; *n*: nostrils, *HD*: head dorsal insertion, *aDF*: anterior insertion of dorsal fin.

la inserción dorsal de la cabeza (*Hd*) y la inserción anterior de la aleta dorsal (*aDF*), y la distancia entre el ojo (*E*) y *sPF*. En el opérculo, se seleccionaron tres semi-referentes anatómicos: *Op1*, *Op2* y *Op4*. Basado en estos, se analizaron las distancias entre *Op4* y *uL*, *Op4* y *sPF*, *Op4* y *Hd*, *Op2* y *uL*, *Op1* y *uL*, *Op1* y *sPF* y *Op1* y *iPF*.

### Morfometría geométrica

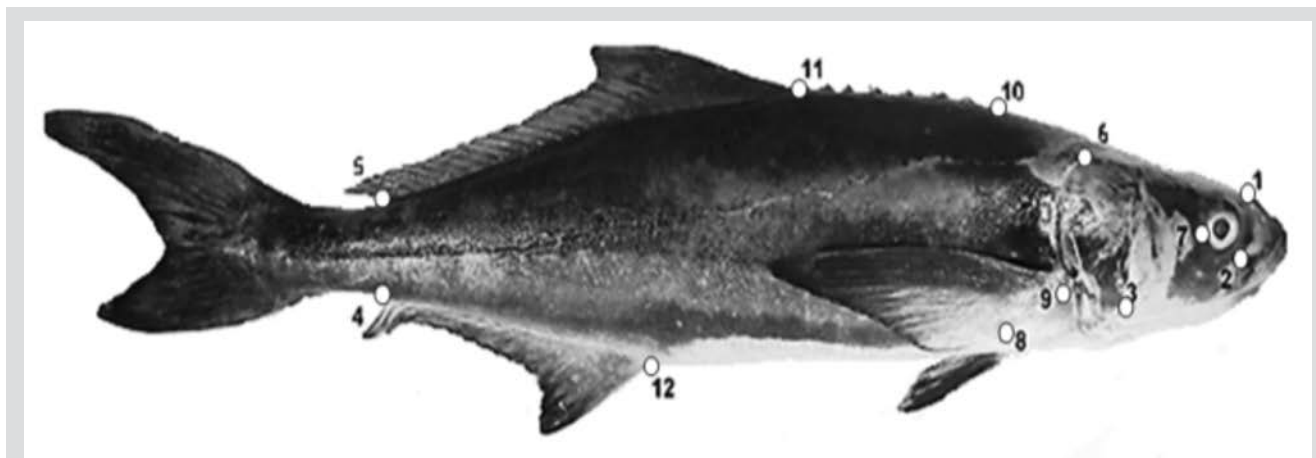
Los referentes anatómicos se escogieron siguiendo los criterios de Corti y Crosetti (1996) y Zelditch *et al.* (2004). En total, se colocaron doce referentes en las fosas nasales ( $L_1$ ), la hendidura del labio superior ( $L_2 = uL$ ), la segunda hendidura cerca al opérculo ( $L_3 = Op_2$ ), la inserción posterior de la aleta anal ( $L_4$ ), la inserción posterior de la aleta dorsal ( $L_5$ ), la cuarta hendidura cerca al opérculo ( $L_6 = Op_4$ ), la inserción de la aleta ventral ( $L_8$ ), la inserción superior de la aleta pectoral ( $L_9 = sPF$ ), la primera vértebra de la región dorsal ( $L_{10}$ ) y la inserción anterior de las aletas dorsales y anales ( $L_{11}$ ,  $L_{12}$ ). Un pseudo-referente se ubicó en la intersección entre margen posterior del ojo y la línea transversal entre  $L_1$  y  $L_3$  ( $L_7$ ) (Figura 2). Estos referentes fueron digitalizados y convertidos a coordenadas en un plano bidimensional usando el software *tpsDig* de Rohlf (disponible en <https://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>).

*Op4* and *sPF*, *Op4* and *Hd*, *Op2* and *uL*, *Op1* and *uL*, *Op1* and *sPF* and *Op1* and *iPF* were analyzed.

### Geometric morphometric

The anatomical landmarks were chosen following the criteria of Corti and Crosetti (1996) and Zelditch *et al.* (2004). In total, 12 landmarks were placed on: the nostrils ( $L_1$ ), cleft of the upper lip ( $L_2 = uL$ ), second cleft near to the operculum ( $L_3 = Op_2$ ), posterior insertion of anal fin ( $L_4$ ), posterior insertion of dorsal fin ( $L_5$ ), fourth cleft near the operculum ( $L_6 = Op_4$ ), insertion of the ventral fin ( $L_8$ ), superior insertion of pectoral fin ( $L_9 = sPF$ ), first spine of the dorsal region ( $L_{10}$ ), and anterior insertion of dorsal and anal fins ( $L_{11}$ ,  $L_{12}$ ). A pseudo-landmark was located on the intersection between the posterior margin of the eye and the cross-line between  $L_1$  and  $L_3$  ( $L_7$ ) (Figure 2). These landmarks were digitalized and converted to coordinates on a two-dimensional plane using *tpsDig* software by Rohlf (available in <https://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>).

For images, specimens were fixed using pins and positioned on the same side so that all fins were extended and the mouth was closed. Approximately ten pictures were



**Figura 2.** Referentes anatómicos (círculos abiertos) establecidos para el análisis de morfometría geométrica.

**Figure 2.** Anatomical landmarks (open circles) established for the geometric morphometric analysis.

Para la toma de imágenes, los especímenes fueron fijados usando pines y ubicados en el mismo lado, de manera que todas las aletas estuvieran extendidas y la boca cerrada. Se tomaron aproximadamente 10 fotos por espécimen, únicamente con cambios pequeños en la posición de las aletas y la inclinación de la cabeza y el abdomen. Todas las imágenes del mismo individuo fueron comparadas y se eligieron para inclusión aquellas que demostraban posiciones idénticas.

Se utilizó un Análisis de Procrustes Generalizado (APG) para procesar la matriz de coordenadas de los referentes, superponiendo las configuraciones de todos los individuos ajustadas al tamaño del centroide (raíz cuadrada de la suma de distancias, al cuadrado, desde cada referente hasta el centroide). El APG utiliza los criterios de cuadrados mínimos para obtener la superimposición óptima, evitando variaciones no relacionadas con la forma. Las superimposiciones se usaron para calcular los componentes de deformación relativa utilizados en los análisis estadísticos. El APG también calcula una configuración de consenso (promedio) que resume las configuraciones de todos los referentes, permitiendo describir y comparar la forma promedio del espécimen y/o sus grupos (Rohlf, 1990; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2008). Este análisis se llevó a cabo usando el software TpsRelw de Rohlf (disponible en <https://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>).

#### Determinación del sexo

Los especímenes fueron sexados por observación directa de las gónadas (Holden y Raitt, 1974). Se realizó una incisión en forma de L entre el ano y las aletas ventral y pectoral; el tejido se estiró hasta que se observaron las gónadas desde la inserción de la aleta dorsal y sobre el intestino. Los

taken per specimen, with only small changes in fin position and the head and abdomen's inclination. All images of the same individual were compared, and those demonstrating identical positioning were chosen for inclusion.

A Generalized Procrustes Analysis (GPA) was used to process the coordinates matrix of the landmarks, superimposing all individuals' configurations adjusted to the size of the centroid (square root of the sum of the distances, squared, from each landmark to the centroid). The GPA uses the minimal squares criteria to obtain the optimal superimposition, avoiding the variations not related to the form. The superimpositions were used to calculate the relative warps components used in the statistical analyzes. GPA also calculate a consensus (average) configuration that resume all landmarks configurations', allowing to describe and compare the average form of the specimen and/or groups of them (Rohlf, 1990; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2008). This analysis was performed using Rohlf's TpsRelw software (available on <https://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>).

#### Sex determination

The specimens were sexed by direct observation of the gonads (Holden and Raitt, 1974). An L-shaped incision was cut between the anus and ventral and pectoral fin; the tissue was stretched up until the gonads were observed from the insertion of the dorsal fin and over the intestine. Fish with small gonads and tubular appearance were considered male, and those with larger, wide, and flat ones were considered females.

peces con gónadas pequeñas y apariencia tubular fueron considerados machos, y aquellos con gónadas más grandes, anchas y planas fueron considerados hembras.

### Análisis estadístico

En el caso de la morfometría tradicional, para cada sexo, la *distribución normal* de los datos fue probada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ); la independencia de variables, trazando cada variable hasta su pareja; y la homogeneidad de variaciones, por medio de la prueba de Levene ( $p > 0,05$ ). Se usó una prueba t de Student para muestras independientes ( $p \leq 0,05$ ) con el objetivo de determinar diferencias significativas entre sexos. Cada variable biométrica se consideró como independiente, y cada sexo como variable dependiente. Se calculó una correlación lineal, y se hizo un análisis discriminante usando las variables con diferencias significativas y sin correlación cruzada. El análisis discriminante se validó de forma cruzada, y se calcularon las funciones lineales discriminantes, el cuadrado de la distancia entre grupos y el porcentaje de clasificación adecuada.

En la morfometría geométrica, los datos del APG se utilizaron para identificar cuáles referentes anatómicos daban más información sobre la forma de la cobia y para hacer un segundo análisis discriminante por medio de las deformaciones relativas como variables independientes. Se calculó el porcentaje de clasificación adecuada, y cada coordenada de los referentes se transformó en un único valor, multiplicándolos unos con otros. Se calculó, además, la correlación entre la función discriminante y los referentes transformados, y aquellos que tenían la correlación más alta con la función fueron analizados. El dimorfismo sexual se expresó como una ecuación lineal de variables biométricas y una imagen de los vectores de las geométricas.

## RESULTADOS

### Morfometría tradicional

Con base en la observación directa de las gónadas, 56,14 % de los individuos fue identificado como hembras y 43,86 % como machos. Después de corroborar la independencia de las variables, la normalidad, y la homocedasticidad ( $p > 0,05$ ), la prueba t de Student mostró que  $E - sPF$ ,  $paVF$ ,  $uL - sPF$ ,  $n - uL$ ,  $sPF - Op_i$  y  $paVF$  eran significativamente diferentes entre sexos ( $p < 0,05$ ; Tabla 1). Estas variables resumen la información sobre los ojos, boca, opérculo y las aletas ventral y pectoral, y no estaban correlacionadas las unas con las otras ( $p < 0,05$ ), lo cual las hace aptas para el análisis discriminante.

### Statistical Analysis

In the case of traditional morphometry, for each sex, the data's *normal distribution* was proved by Kolmogorov-Smirnov's test ( $p < 0.05$ ), the independence of variables by plotting each pair of variables to each other, and the *homogeneity of variances* were verified by Levene's test ( $p > 0.05$ ). A Student's t-test for independent samples ( $p \leq 0.05$ ) was used to determine significant differences between sexes. Each biometric variable was deemed as independent, and sex as a dependent variable. A linear correlation was calculated, and discriminant analysis was made using the variables with significant differences and without cross-correlation. The discriminant analysis was cross-validated, and the discriminant linear functions, the squared distance between groups, and the percentage of proper classification were calculated.

In geometric morphometry, the GPA data were used to identify which anatomical landmarks give more information on Cobia's form and make a second discriminant analysis using the relative warps as independent variables. The percentage of proper classification was calculated, and each coordinate of the landmarks was transformed into a single value multiplying them to each other. A correlation between the discriminant function and landmarks transformed was calculated, and the landmarks with the highest correlation with the function were analyzed. The sexual dimorphism was expressed as a linear equation of biometric variables and an image of the geometric ones' vectors.

## RESULTS

### Traditional Morphometry

Based on direct observation of gonads, 56.14 % of individuals were identified as females and 43.86 % as males. After corroborating the independence of variables, normality, and homoscedasticity ( $p > 0.05$ ), the Student's t-test showed that  $E - sPF$ ,  $paVF$ ,  $uL - sPF$ ,  $n - uL$ ,  $sPF - Op_i$ , and  $paVF$  were significantly different between sexes ( $p < 0.05$ ; Table 1). These variables summarize information about the eyes, mouth, operculum, pectoral, and ventral fins, and did not correlate with each other ( $p < 0.05$ ), being eligible for the discriminant analysis.

**Tabla 1.** Estadísticas descriptivas de probabilidades de la prueba t de Student (n = 57). Ver Figura 1 para la descripción completa de las variables.

**Table 1.** Descriptive statistics and probabilities from Student's t-test (n = 57). See Figure 1 for the full description of the variables.

| Variables        | Sexo / Sex      | Media / Mean | Desviación estándar / Standard deviation | Valor t / t-value | FD. / DF. | Valor p / P-value |
|------------------|-----------------|--------------|--|-------------------|-----------|-------------------|
| <i>E - sPF</i>   | Macho / Male    | 12.23        | 1.20                                     | 4.11              | 55        | 0.00              |
|                  | Hembra / Female | 11.02        | 0.94                                     |                   |           |                   |
| <i>uL - sPF</i>  | Macho / Male    | 15.98        | 0.86                                     | 3.10              | 55        | 0.00              |
|                  | Hembra / Female | 15.25        | 0.88                                     |                   |           |                   |
| <i>Op1 - sPF</i> | Macho / Male    | 6.24         | 0.75                                     | 3.11              | 55        | 0.00              |
|                  | Hembra / Female | 5.64         | 0.69                                     |                   |           |                   |
| <i>paVF</i>      | Male            | 4.49         | 0.76                                     | 2.17              | 55        | 0.03              |
|                  | Female          | 4.08         | 0.63                                     |                   |           |                   |

Este análisis discriminante validado de forma cruzada con variables biométricas agrupó correctamente a 75,4 %. Tiene un cuadrado de la distancia entre grupos de 2,18. Mientras el valor de la primera función discriminante (I) sea más bajo que el segundo (II), el individuo será clasificado como macho. Si I es más alto que II, el individuo es considerado como hembra.

**Funciones discriminantes:**

**I.  $5,41 (E-sPF) + 18,08 (uL-sPF) - 0,52 (sPF-Op_i) + 8,79 (paVF) - 195,63$**

**II.  $4,42 (E-sPF) + 18,02 (uL-sPF) - 1,29 (sPF-Op_i) + 7,63 (paVF) - 173,78$**

**Morfometría geométrica**

El APG calculó 20 deformaciones relativas de variación de forma. Los referentes 7, 2 y 9 contribuyeron más a las deformaciones relativas: 29 % de la contribución para el referente 7, 22 % de la contribución para el referente 2 y 15 % para el referente 9. El análisis discriminante validado de forma cruzada con base en ejes principales de variación de forma (*deformaciones relativas*) agrupó a 82,7 % de los individuos (Figura 4). Las variables transformadas (el producto de las coordenadas bidimensionales de cada referente) explicaron el  $97,6 \pm 0,01$  % de su variación.

Los referentes 9 y 7 tuvieron correlaciones intragrupal combinadas más altas con la función discriminante que los otros referentes. Si se alinean el consenso de los machos con el de las hembras y se analiza la variación de forma,  $L_9$  es el referente con la mayor diferencia entre sexos (Figura 3). Las hembras tienen un ángulo de

The discriminant analysis cross-validated with biometric variables correctly grouped 75.4 %, it has a squared distance between groups of 2.18. As long as the value of the first discriminant function (I) is lower than the second one (II), the individual will be classified as male, and if it is greater than II, as a female.

**Discriminant functions:**

**I.  $5.41 (E-sPF) + 18.08 (uL-sPF) - 0.52 (sPF-Op_i) + 8.79 (paVF) - 195.63$**

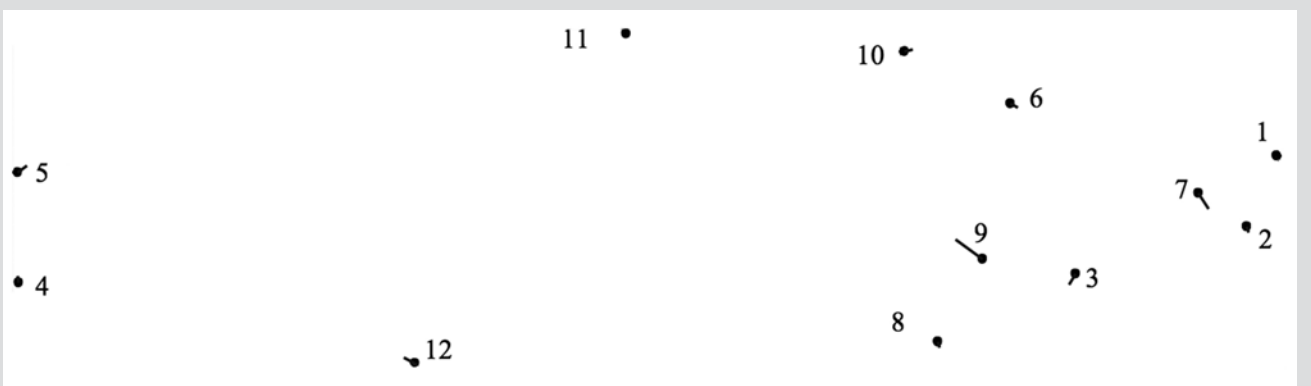
**II.  $4.42 (E-sPF) + 18.02 (uL-sPF) - 1.29 (sPF-Op_i) + 7.63 (paVF) - 173.78$**

**Geometric morphometry**

Generalized Procrustes analysis calculated 20 relative warps of shape-variation. The landmarks 7.2, and 9 contributed higher to relative warps: 29 % of the contribution for the landmark 7.22 % for landmark 2, and 15 % for landmark 9. The discriminant analysis cross-validated based on the principal axes of shape variation (*relative warps*) grouped 82.7 % of individuals correctly (Figure 3). The transformed variables (the product of each landmark's two-dimensional coordinates) explained the  $97.6 \pm 0.01$  % of its variation.

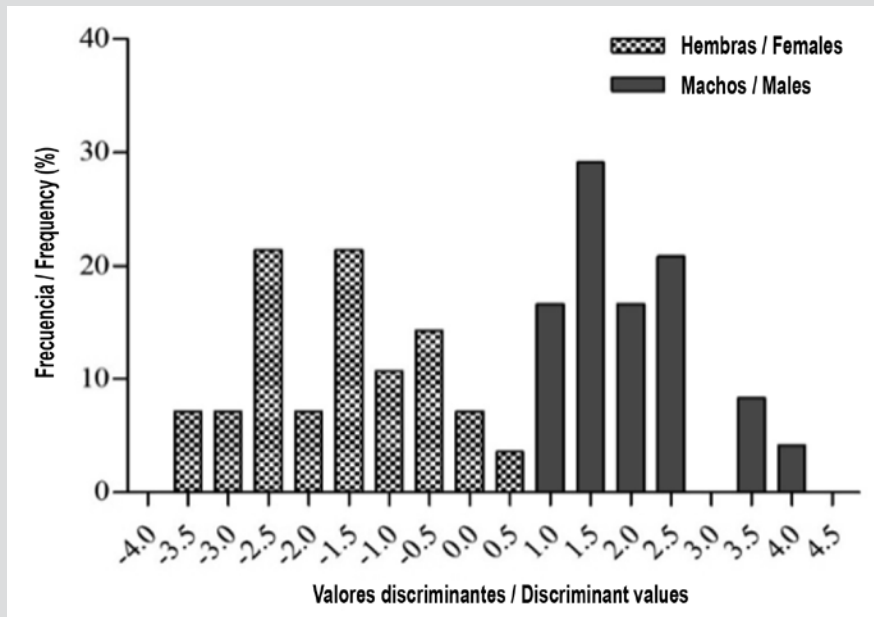
Landmarks 9 and 7 had higher combined intragroup correlations with the discriminant function than the other landmarks. Aligning the males' consensus with the females' and analyzing the variation of shape,  $L_9$  is the landmark with a higher difference between sexes (Figure 4). Females have an angle of  $135.35 \pm 7.01$  ° and males  $141.92 \pm 8.60$  ° between  $L_9$  and  $L_7$  with origin in  $L_3$ . The





**Figura 3.** Variación de los vectores de la forma de las hembras con respecto al consenso de la configuración de los machos. Las líneas representan la posición de los referentes en el consenso de la configuración de las hembras.

**Figure 3.** Variation vectors' of females' shape with respect to the consensus configuration of males. Lines represent the position of the landmarks in the consensus configuration of females.



**Figura 4.** Histograma de valores discriminantes para cada sexo basado en deformaciones relativas (barras llenas para machos y barras abiertas para hembras).

**Figure 4.** Histogram of Discriminant Values for each sex based on relative warps. Filled bar for males and Open bar for females.

135,35 ± 7,01 ° y los machos de 141,92 ± 8,60 ° entre L9 y L7 con origen en L3. La diferencia entre estos ángulos es significativa (p = 0,004), lo cual indica que las posiciones del ojo y la aleta pectoral son importantes para el dimorfismo sexual en la cobia.

### DISCUSIÓN

Las relaciones morfológicas estudiadas permitieron asignar correctamente los sexos en 75 % de los especímenes analizados. Existen individuos en poblaciones naturales

difference between these angles is significant (p = 0.004), indicating that the eye and pectoral fin positions are important for sexual dimorphism in Cobia.

### DISCUSSION

The studied morphological relations allowed to assign the sexes correctly in 75 % of the analyzed specimens. There are individuals in natural populations whose characteristics are very similar to the opposite sex, or there are little differences between sexes, causing

cuyas características son muy similares a las del sexo opuesto, o hay pocas diferencias entre sexos, lo que hace que el porcentaje de asignación correcta en análisis discriminantes rara vez alcance 100 %. Esto puede deberse a que el fenotipo de los individuos depende de su sexo y de factores ambientales, genéticos y sociales (Márquez, 1995; Sanabria *et al.*, 2011; Peckmann *et al.*, 2015; U-Yong *et al.*, 2015; Jónsdóttir *et al.*, 2016).

En los análisis de morfometría geométrica, el 23 % cuyo sexo no fue determinado puede ser también el resultado de un error en el posicionamiento de los peces al momento de tomar imágenes. Sin embargo, dado que la covarianza/matriz de varianzas es igual en todos los grupos, el análisis no pierde validez. Los porcentajes de asignación correcta en el análisis discriminante basado en distancias (75,4 %) y en morfometría geométrica (82,7 %), además de la carencia de los efectos perturbadores de la edad usados en esta investigación (4-12 meses), hacen que esta técnica sea útil en la acuicultura de cobia y otras especies (Bonino y Donadio, 2010; Peckmann *et al.*, 2015; U-Yong *et al.*, 2015; Jónsdóttir *et al.*, 2016).

Los referentes ubicados en la cobia pueden ser usados para sexar individuos con base en algoritmos de reconocimiento en peces. Actualmente se está desarrollando un método para determinaciones en peces como *Sebastes constellatus*, *S. levis*, *S. miniatus*, *S. rubrivinctus*, y *Prognathodes falcifer* por medio del análisis automatizado de capturas fotográficas. Sin embargo, aún no es claro cuáles algoritmos son los mejores, y no hay ninguna base de datos con información suficiente para hacerlos (Dujardin *et al.*, 2010; Matai *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; NOAA, 2013; Dujardin *et al.*, 2014). La cantidad necesaria de información para diferenciar especies es más grande que la que se necesita para distinguir entre los sexos de una. Por lo tanto, desarrollar este tipo de técnica para sexar individuos es ciertamente alcanzable y no debería ser complicado.

El nivel de distinción de sexo obtenido en este estudio podría incrementar la eficiencia de la acuicultura marina de cobia en un solo sexo en jaulas en el Caribe colombiano, lo cual incrementaría su rentabilidad.

## CONCLUSIÓN

Las variables biométricas que pueden usarse como dimorfismo sexual son  $E - sPF$ ,  $VF$  y  $Op_4 - Hd$ . Los referentes en el ojo y la aleta pectoral son las fuentes más precisas para extraer información sobre el sexo. Visualmente, la diferencia entre sexos puede verse en cabezas más pequeñas y un

the percentage of correct assignation in discriminant analyses rarely reach 100 %. This could be because of the phenotype of the individuals being dependent on their sex and environmental, genetic, and social factors (Márquez, 1995; Sanabria *et al.*, 2011; Peckmann *et al.*, 2015; U-Yong *et al.*, 2015; Jónsdóttir *et al.*, 2016).

In geometric morphometrics analyses, the 23 % not accounted for by sex could also result from an error in the position of the fish when taking the images. However, because the covariance - variance matrix is equal through the groups, the analysis does not lose validity. The percentages of correct assignation in the discriminant analysis based on distances (75.4 %) and geometric morphometrics (82.7 %), in addition to the lack of a disturbing effect of age used in this research (4 – 12 months), makes this technique useful in the aquaculture of cobia and other species (Bonino and Donadio, 2010; Peckmann *et al.*, 2015; U-Yong *et al.*, 2015; Jónsdóttir *et al.*, 2016).

The landmarks located on the cobia can be used for sexing individuals based on recognizing algorithms in fish. Currently, a way to determine a certain fish like *Sebastes constellatus*, *S. levis*, *S. miniatus*, *S. rubrivinctus*, and *Prognathodes falcifer* is being developed the automatized analysis of photographic capture. However, it is not yet clear which algorithms are best, and there is no database with enough information to make it (Dujardin *et al.*, 2010; Matai *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; NOAA, 2013; Dujardin *et al.*, 2014). The amount of information necessary to differentiate species is larger than that needed to separate one species' sexes. Therefore, developing this type of technique for sexing individuals is certainly achievable and should not be complicated.

The level of sex separation obtained in this study could increase the efficiency of monosex marine aquaculture of cobia in cages in the Colombian Caribbean, increasing their profitability.

## CONCLUSION

The biometric variables that can be used as sexual dimorphism are  $E - sPF$ ,  $VF$ , and  $Op_4 - Hd$ . Landmarks on the eye and pectoral fin are the most accurate sources to extract information about the sexes. Visually the difference between sexes can be seen as narrower heads and larger space and the narrower angle between the eyes and pectoral fin for females.



espacio mayor, así como en un ángulo más estrecho entre los ojos y la aleta pectoral para las hembras.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Gobernación de Bolívar los proyectos del Sistema General de Regalías, a la Universidad Metropolitana de Manchester, a través del proyecto *Improving Local Management of Tropical Coastal Resources in The Face of Climate Change for Economic Wellbeing of Local and Vulnerable Communities* [Mejorando la gestión local de recursos costero-tropicales ante el cambio climático para el bienestar económico de comunidades locales y vulnerables]; y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Cartagena por el proyecto con acta de compromiso N° 136-2018.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Gobernación de Bolívar and the projects from the Sistema General de Regalías. To the Manchester Metropolitan University through the project *Improving Local Management of Tropical Coastal Resources in The Face of Climate Change for Economic Wellbeing of Local and Vulnerable Communities.* And to the Vice-chancellor of Research of Universidad de Cartagena for the project with Acta de Compromiso N° 136-2018.

## BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Adams, D.C., F.J. Rohlf and D.E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'Revolution'. *Ital. J. Zool.*, 71: 5–16. doi: 10.1080/11250000409356545.
- Bonino, N. y E. Donadio. 2010. Parámetros corporales y dimorfismo sexual en el conejo silvestre europeo (*Oryctolagus cuniculus*) introducido en Argentina. *Mastozool. Neotrop.*, 17(1): 123–127.
- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology*. Cambridge University Press, New York, 435 p.
- Budd A.M., Q.Q. Banh, J.A. Domingos and D.R. Jerry. 2015. Sex control in fish: Approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.*, 2015, 3, 329–355. doi:10.3390/jmse3020329
- Calle, D.A., M.L. Quiñones, H.F. Erazo y N. Jaramillo. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles (Nyssorhynchus)* presentes en Colombia. *Biomédica*, 28(3): 371–385. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.75>.
- Carmona J.C., E. R. Flores, R. Castelo, Y. Armas, M. F. Hoyum, R. Engelsen y B. T. Lunestad. 2019. Factibilidad del engorde y comercialización de la cobia (*Rachycentron canadum*) en la provincia de Matanzas, Cuba. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 36 (2), 38–42.
- Cerviño, S. 2014. Estimating growth from sex ratio-at-length data in species with sexual size dimorphism. *Fish. Res.*, 160: 112–119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.11.010>.
- Corti, M. and D. Crosetti. 1996. Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using partial warp scores. *J. Fish Biol.*, 48: 255–269.
- Dujardin, J.P., A.B. Henry and D. Kaba. 2010. The exchangeability of shape. *BMC Res. Notes*, 3(266): 1–7. doi: 10.1186/1756-0500-3-266.
- Dujardin, J., D. Kaba, P. Solano, M. Dupraz, K.D. McCoy and N. Jaramillo-O. 2014. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies?. *Infect. Genet. Evol.*, 28: 704–714. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.035.
- Dutney, L., A. Elizur and P. Lee. 2017. Analysis of sexually dimorphic growth in captive reared cobia (*Rachycentron canadum*) and the occurrence of intersex individuals. *Aquaculture*, 468(1): 348–355. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.044>.
- Flores E.R. 2017. La cobia (*Rachycentron canadum*). *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 34(2): 74–83.
- Fontaine, P., J.N. Gardeur, P. Kestemont and A. Georges. 1997. Influence of feeding level on growth intraspecific weight variability and sexual growth dimorphism of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. reared in a recirculation system. *Aquaculture*, 157: 1–9. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00092-6).
- Franks, J.S. and N.J. Brown-Peterson. 2002. A review of age, growth and reproduction of cobia, *Rachycentron canadum* from U.S. waters of the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. *Gulf Carib. Fish. Inst.*, 53: 553–569.
- Franks, J.S., J.R. Warren and M.V. Buchanan. 1999. Age and growth of cobia, *Rachycentron canadum*. from the northeastern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.*, 97(3): 459–471.
- Gandhi, V., V. Venkatesan and P. Zacharia. 2013. Biometry analysis, length-weight relationship and sexual dimorphism of the Spotted Scat, *Scatophagus argus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes: Scatophagidae) from Gulf of Mannar southeast coast of India. *J. Mar. Biol. Assoc. India*, 55(1): 12-16. doi: 10.6024/jmbai.2013.55.1.01743-02.
- Hammer, Ø. 2002. Morphometrics - brief notes. *Paläont. Inst. Mus., Zürich*, 49 p.

- Holden, M. and D. Raitt. 1974. Manual of fisheries science, Part 2 - Methods of resource investigation and their application. FAO, Rome. Available at <http://www.fao.org/3/f0752e/F0752E00.HTM#toc> [Accessed 27 11 2020].
- Holt, G.J., C.K. Faulk and M.H. Schwarz. 2007. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture*, 268: 181–187. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.039>.
- Jónsdóttir, I.G., A.K. Gudlaugsdóttir and H. Karlsson. 2016. Morphometric differences between sub-populations of northern shrimp (*Pandalus borealis*). A case study from two adjacent fjords in Iceland. *Reg. Stud. Mar. Sci.*, 3: 42–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.04.002>.
- Kendall, D.G. 1989. A survey of the statistical theory of shape. *Stat. Sci.*, 4(2): 87–120.
- Leclercq, E., J.F. Taylor, D. Hunter and H. Migaud. 2010. Body size dimorphism of sea-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Implications for the management of sexual maturation and harvest quality. *Aquaculture*, 301: 47–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.029>.
- Liao, I.C., H. Ting-Shih., T. Wann-Sheng, H. Cheng-Ming., C. Su-Lean and E.M. Leño. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*, 237: 155–165. doi: [10.1016/j.aquaculture.2004.03.007](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.007).
- Marcus, L.F., M. Corti, A. Loy, G.J.P. Naylor and D.E. Slice. 1993. Advances in morphometrics. Tuscany, Italy: NATO ASI Series. Series A. Life Sci., 284: 588. doi: [10.1007/978-1-4757-9083-2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9083-2).
- Márquez, C. 1995. Historia natural y dimorfismo sexual de la tortuga *Kinosternos scorpioides* en Palo Verde Costa Rica. *Rev. Ecol. Lat.*, 2(1-3): 37–44.
- Matai, J., R. Kastner, G.R. Cutter and D.A. Demer. 2012. Automated techniques for detection and recognition of fishes using computer vision algorithms. Available at: <https://swfsc.noaa.gov/publications/CR/2012/2012Matai.pdf> [Accessed 26 10 2015].
- Mosqueira, J.R., P. Pinzón, H. Calderón y R. Vieira. 2011. Producción de alevines de cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) en el centro de investigación, educación y recreación - Ceiner - (Cartagena. Colombia). *AquaTic*, 35: 35–42.
- NOAA. 2013. Facial recognition technology and the future of fisheries management. Available at: [http://www.nmfs.noaa.gov/stories/2013/06/6\\_5\\_13video\\_monitoring.html](http://www.nmfs.noaa.gov/stories/2013/06/6_5_13video_monitoring.html) [Accessed 26 10 2015].
- Peckmann, T.R., K. Orr, S. Meek and S.K. Manolis. 2015. Sex determination from the talus in a contemporary Greek population using discriminant function analysis. *J. For. Leg. Med.*, 33: 14–19. Doi: [10.1016/j.jflm.2015.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.03.011).
- Rohlf, F.J. 1990. Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 21: 299–316. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.001503>.
- Sanabria C., L.C. Polo y M.C. Botella. 2011. Dimorfismo sexual en primera vértebra cervical en una muestra de población colombiana. *Rev. Españ. Med. Leg.*, 37 (4): 140–145.
- Sun, L., H. Chen and L. Huang. 2006. Effect of temperature on growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 261: 872–878. doi: [10.1016/j.aquaculture.2006.07.028](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.028).
- U-Yong, L., K. In-Beom and K. Dai-Soon. 2015. Sex determination using discriminant analysis of upper and lower extremity bones: New approach using the volume and surface area of digital model. *For. Sci. Int.*, 253: 135. e1–4. doi: [10.1016/j.forsciint.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.017).
- Williams, K., C. Rooper and J. Harms. 2012. Photographic and videographic imagery collection and analysis activities at the coral reef ecosystem division of the NOAA Pacific Islands Fisheries Science Center. *Rep. Nat. Mar. Fish. Serv. Automated Imaged Processing Workshop*, 18–20.
- van de Wouw, M., N. Maxted N. y B.V. Ford-Lloyd. 2003. A multivariate and cladistic study of *Vicia* L. ser. *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of morphological characters. *Plant System. Evol.*, 237:19–39.
- Zelditch M., D. Swiderski, D. Sheets and W. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. Academic. 437 p.

RECIBIDO/RECEIVED: 09/03/2020

ACEPTADO/ACCEPTED: 24/12/2020