UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
Y DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGIA MARINA

Análisis comparativo de la morfometría y micro-estructura de los otolitos sagitta, lapillus y asteriscus en la anchoveta *Engraulis ringens* (Jenyns 1842)

TESIS

M
B268a
2018

Claudia Elvira Barra Gálvez

2018

Reg. 104.042

M
B268a
2018

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

Análisis comparativo de la morfometría y micro-estructura de los otolitos sagitta, lapillus y asteriscus en la anchoveta *Engraulis ringens* (Jenyns 1842)

TESIS

CLAUDIA ELVIRA BARRA GÁLVEZ

2018

CLAUDIA ELVIRA BARRA GÁLVEZ

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título profesional de Biólogo Marino

COMISIÓN DE TÍTULO:



Dr. Guido Plaza Pasten

Director

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Alejandra Hernández Saso

Miembro de la Comisión

Subsecretaria de Pesca y Acuicultura



Dr. Mauricio Landaeta Díaz

Miembro de la Comisión

Universidad de Valparaíso

2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a mis padres: Elvira Gálvez y Gumercindo Barra, por todo el apoyo incondicional que me brindaron en todo este largo proceso. Gracias por ser los mejores padres y por estar conmigo en cada decisión tomada. Los amo infinito.

A mi hermano Christián, a mi cuñada Geraldine y a mi sobrina Meredith por estar siempre preocupados de mí, alentándome a seguir adelante. Gracias por todo su cariño.

A Raúl Contreras. Gracias por acompañarme en este último gran paso. Gracias por tu infinita paciencia y por cada muestra de cariño y de amor realizada hacia mí. Te amo mucho.

A mis amigas Tamara, Fernanda y Tiare. Gracias por ser las mejores amigas, por ayudarme y por estar siempre conmigo en cada momento. Las quiero mucho.

A mis compañeros de Universidad: Gissella y Miguel, con los cuales compartí largas tardes y noches de estudio. Gracias por la amistad de todos estos años.

A las chiquillas del laboratorio: Paula, Grechel y Alejandra. Gracias por cada momento vivido y por las risas interminables.

Finalmente al profesor Guido Plaza. Gracias por orientarme en cada paso y por corregirme cada vez que fue necesario. Gracias por todos los conocimientos y por toda la experiencia entregada en esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS i
ÍNDICE DE CONTENIDO iii
ÍNDICE DE TABLAS vi
ÍNDICE DE FIGURAS viii
RESUMEN xii
INTRODUCCIÓN 1
1.1. Antecedentes 5
1.1.1. De la especie 5
1.1.2. De la pesquería 6
1.1.3. Del otolito 8
2. HIPÓTESIS 12
2.1. H_1: Rasgos micro-estructurales 12
2.2. H_2: Asimetría fluctuante 13
3. OBJETIVOS 14
3.1.Objetivo General 14
3.2.Objetivos Específicos 14
4. METODOLOGÍA 15
4.1. Muestreo 15
4.2 Trabajo en Laboratorio 16
4.2.1 Almacenamiento y tratamiento de muestras 16

4.2.2. Extracción de otolitos 17
4.2.3. Preparación de otolitos..... 17
4.2.3.1. Sagittas..... 17
4.2.3.2. Lapillus y asteriscus..... 18
4.2.4 Caracterización de la micro-estructura y proceso de pulido..... 20
4.2.5 Digitalización y morfometría de los otolitos 20
4.2.6. Obtención de descriptores básicos de forma 21
4.2.7. Simetría de los otolitos 22
4.2.8. Diferencias en rasgos micro-estructurales 23
4.2.9. Lectura de los micro-incrementos primarios 23
4.2.10. Reproducibilidad e Índice de porcentaje de error promedio 25
5. RESULTADOS 26
5.1. Micro-estructura 26
5.1.1. Sagittas 26
5.1.2. Lapillus 28
5.1.3. Asteriscus 30
5.2. Morfometría 33
5.2.1. Sagittas y lapillus..... 33
5.2.2. Crecimiento somático sagitta..... 34
5.2.3. Crecimiento somático lapillus..... 38
5.3. Simetría de otolitos 40
5.3.1. Sagittas 40
5.3.2. Lapillus 47
5.4. Reproducibilidad de las lecturas 53

5.5. Índice de porcentaje de error promedio 56

6. DISCUSIÓN..... 58

6.1. Micro-estructura y rasgos micro-estructurales 58

6.2. Simetría de los otolitos..... 62

6.3 Edad..... 65

7. CONCLUSIONES 69

9. LITERATURA CITADA..... 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las medidas morfométricas obtenidas a partir de los otolitos sagittas y lapillus izquierdos y derechos. Prom= promedio, DS= desviación estándar.....34

Tabla 2. Resumen de los parámetros del modelo lineal simple de los otolitos sagittas entre la longitud total del pez (LT) versus las variables morfométricas (diámetro, radio, perímetro y área) de *Engraulis ringens*. α= intercepto, β= pendiente, EE= error estándar.....35

Tabla 3. Resumen de los parámetros del modelo lineal simple de los otolitos lapillus entre la longitud del pez (LT) versus las variables morfométricas (diámetro, radio, perímetro y área) de *Engraulis ringens*. α= intercepto, β= pendiente, EE= error estándar.....38

Tabla 4. Correlación de Spearman ente la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos sagittas de la anchoveta *Engraulis ringens*. 41

Tabla 5. Datos morfométricos de otolitos sagittas en *Engraulis ringens*. Se muestra valor de p-valio, sesgo y curtosis para cada variable analizada.....44

Tabla 6. Correlación de Spearman ente la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos lapillus de la anchoveta *Engraulis ringens*.....47

Tabla 7. Datos morfométricos de otolitos lapillus en *Engraulis ringens*. Se muestra valor de p-valio, sesgo y curtosis para cada variable analizada..... 50

Tabla 8. Resumen de las estadísticas básicas efectuadas en un ejercicio de reproducibilidad de lecturas de otolitos sagittas y lapillus de juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens*, recolectados en la zona norte de Chile. 53

Tabla 9. Análisis de varianza (ANDEVA) multifactorial para evaluar la hipótesis de diferencias significativas en las lecturas promedios en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens*, recolectadas en el norte de Chile. (a) ANDEVA incluyendo los cuatro lectores: (b) excluyendo uno de los lectores principiantes (LP1). SCE: suma de cuadrados del error, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios; F: estadístico; F-Fisher; P: probabilidad de cometer error Tipo I. 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar de anchoveta *Engraulis ringens*. 5

Figura 2. Desembarque histórico de la anchoveta *Engraulis ringens* (1984-2008). 7

Figura 3. Ilustración de la ubicación de los otolitos en el oído interno de un pez. 8

Figura 4. Ilustración mediante microscopio óptico de la micro-estructura de los otolitos de peces juveniles (1) otolito sagitta; (2) zona D y zona L; (3) región del primordio de un otolito sagitta del clupeido *Etremeus teres*; (4-5) secciones frontales y sagitales de un *Sebastes inermis*. P= primordio; me= marca a la eclosión; pa= marca a la primera alimentación; CSC= centros secundarios de crecimiento. (Extraído desde Plaza *et al.* 2012) 11

Figura 5. Mapa de los sitios de muestreo de juveniles de *Engraulis ringens* en la zona norte de Chile..... 15

Figura 6. Fotografías ilustrativas del proceso de almacenamiento y tratamiento de otolitos de *Engraulis ringens*..... 16

Figura 7. Fotografías ilustrativas del proceso de extracción y montaje de otolitos de *Engraulis ringens*. 19

Figura 8. Fotografías ilustrativas del proceso de digitalización y morfometría de los tres pares de otolitos de anchoveta *Engraulis ringens*. (A) sagitta; (B) lapillus y (C) asteriscus.. 21

Figura 9. Ilustración del proceso de conteo de los micro-incrementos en un otolito sagitta (A) y lapillus (B) de la anchoveta *Engraulis ringens*. 24

Figura 10. Ilustración de los criterios descritos por Cermeño *et al.* (2008) para identificar los micro-incrementos primarios; línea azul: GBR; línea negra: IMR (Extraído desde Plaza *et al.* 2012) 24

Figura 11. Vista interna de un otolito sagitta (A) y sus diversas estructuras (B). Mp= marca prominente, Pr= primordio. Aumento: A: 40x, B: 400x 26

Figura 12. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de otolitos sagittas ilustrando las tres zonas características (A-B-C). Ad= anillo doble, Pr= primordio, Asd= anillo subdiario. Aumento: A-B-C: 400x 27

Figura 13. Vista externa de un otolito lapillus y sus diversas estructuras (A). MA= margen anterior, MP= margen posterior (B). Pr= primordio, Mp= anillo prominente.. 28

Figura 14. Presencia de primordios en otolito lapillus (A-B-C). Pr= primordio. Aumento: A-B-C: 400x. 29

Figura 15. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de otolito lapillus ilustrando las tres zonas características (A) y sus diversas estructuras (B-C). Ad= anillo doble, Pr= primordio, Af= anillo fino. Aumento: A-B-C: 400x. 30

Figura 16. Vista externa de un otolito asteriscus y sus diversas regiones (A). MD= margen dorsal, MA= margen anterior, MV= margen ventral, MP= margen posterior, (B). Zd= zona difusa, Pr= primordio, Ac= anillo concéntrico. Aumento: A: 100x, B: 400x.....31

Figura 17. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de los otolitos asteriscus ilustrando la presencia de anillo dobles (A-B) y las tres zonas características (C). Ad= anillo doble, Af= anillo fino. Aumento: A-B-C-D-E: 400x, D: 100x. 32

Figura 18. Presencia de primordios en otolito asteriscus (A-B). Pr= primordio. Aumento: A-B: 400x. 33

Figura 19. Relaciones morfométricas entre la longitud total (cm) versus los descriptores básicos (diámetro, radio, perímetro y área) de otolitos sagittas derecho e izquierdo de *Engraulis ringens.* 37

Figura 20. Relaciones morfométricas entre la longitud total (cm) versus los descriptores básicos (diámetro, radio, perímetro y área) de los otolitos lapillus derecho e izquierdo de *Engraulis ringens.* 40

Figura 21. Correlación de rangos de Spearman entre la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos sagittas de *Engraulis ringens*..... 43

Figura 22. Histogramas de frecuencias representando asimetría direccional con curtosis leptocurtica en otolitos sagittas de la *Engraulis ringens*..... 46

Figura 23. Correlación de rangos de Spearman entre la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos lapillus de *Engraulis ringens*..... 49

Figura 24. Histogramas de frecuencias representando asimetría direccional con curtosis leptocurtica en otolitos lapillus de la *Engraulis ringens*..... 52

Figura 25. Ilustración de los cambios en la lectura media de edad en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens* recolectadas en el norte de Chile. Las lecturas fueron efectuadas por cuatro lectores con diferente grado de experticia..... 57

Figura 26. Ilustración del Porcentaje de Error en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens* para el criterio GBR (A-C) e IMR (B-D): IAPE: Índice del Porcentaje de Error promedio..... 57

RESUMEN

El desarrollo de la otolitometría a nivel diario ha experimentado un notorio incremento en los últimos años en donde se ha reflejado la extraordinaria capacidad de los otolitos para registrar información en su micro-estructura y de esta manera reconstruir la historia de organismos vivos, debido a que estas estructuras presentan una alta especificidad morfológica. Los micro-incrementos, además de registrar información de edad y crecimiento diario, también registran transiciones ontogenéticas que ocurren durante las fases tempranas de su desarrollo. No obstante, los otolitos no sólo permiten obtener información registrada en su micro-estructura si no que también en su forma, la cual puede permitir el estudio de otros rasgos de la historia de vida, como por ejemplo la simetría bilateral (rasgos del cuerpo bilateralmente simétricos), donde se diferencian tres tipos: asimetría fluctuante (AF; desviaciones aleatorias de la simetría en rasgos bilateralmente simétricos), asimetría direccional (AD; distribución normal distinta de cero) y antiasimetría (distribución bimodal con promedio cero). Sin embargo, en la mayoría de los casos los estudios sólo utilizan un par de otolitos, particularmente el sagitta, debido a su mayor tamaño, pero que también requiere el mayor esfuerzo de preparación para el análisis micro-estructural. Adicionalmente, en la mayoría de las especies de crecimiento rápido se han descrito micro-incrementos dobles y triples en la fase juvenil, que dificultan la determinación de edad a nivel diario. En este contexto el objetivo de este estudio es desarrollar un análisis comparativo exhaustivo de la morfometría y de la micro-estructura de los tres pares de otolitos en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens*.

En el presente trabajo se extrajeron y caracterizaron otolitos sagittas, lapillus y asteriscus de ejemplares de entre 7 y 15 cm de longitud total (LT) obtenidos en Arica y

Antofagasta entre los años 2015 y 2016, los cuales fueron posteriormente procesados y analizados en laboratorio. Se realizó un análisis morfométrico en el programa Image Pro Plus con la utilización de descriptores básicos (diámetro, radio, perímetro y área) para luego determinar a través de un ANCOVA, potenciales diferencias significativas entre ellos.

Uno de los primeros hallazgos fue la existencia de proporcionalidad entre el crecimiento del otolito y el crecimiento del pez en sagittas y lapillus. Con respecto a la simetría, se calculó para cada medida de los otolitos la media entre la medición del otolito derecho (D) y el otolito izquierdo (I) de cada ejemplar (tamaño del rasgo; (D+I)/2) y la diferencia obtenida entre ambas mediciones (simetría del rasgo; |D-I|). Luego se aplicaron correlaciones entre ambas variables (tamaño y simetría del rasgo), además de obtener y describir el sesgo y la curtosis. Los resultados demostraron la inexistencia de asimetría fluctuante y la presencia de asimetría direccional hacia la izquierda con una curtosis leptocurtica para los otolitos sagittas y lapillus, presumiblemente ligada a la genética y no a cambios ambientales.

De forma complementaria se caracterizó cada una de las tres zonas (A, B, C) presentes en cada uno de los otolitos. Se determinó que cada zona estaba bien caracterizada, ya sea por la resolución y grosores en los micro-incrementos (A-C), así como también por la presencia de anillos dobles (B). La morfología en sagittas fue elíptica, en lapillus angular alargada y en asteriscus discoide o de semi luna. Los otolitos asteriscus presentaron una zona nuclear irregular con varios primordios difusos en su constitución, a diferencia del otolito sagitta que mostró un área nuclear distintiva con primordios únicos, circundados por una marca de eclosión prominente.

Un rasgo característico de la micro-estructura del asteriscus fue la presencia de micro-incrementos muy finos e irregulares; mientras que los anillos dobles difusos, también presentes en los tres pares de otolitos, estuvieron restringidos principalmente al sagitta. Se llevó a cabo un conteo para la determinación de la reproducibilidad de lecturas mediante los criterios GBR e IMR en 21 otolitos sagittas y lapillus por medio de lectores (experto, experiencia media y principiantes). Mediante un Análisis de Varianza multifactorial se evaluó si existieron diferencias significativas en la edad media. La reproducibilidad fue determinada a través del Índice del porcentaje de error promedio para sagittas y lapillus con los respectivos criterios. El porcentaje de reproducibilidad de las lecturas para sagittas fue de un 4,8% (GBR) y un 15% (IMR) y en lapillus de un 6,2% (GBR) y un 8,5% (IMR). En este sentido el análisis de precisión de la lectura entre lectores (reproducibilidad) mostró un bajo error utilizando el criterio GBR, el cual ha resultado ser el más confiable en la interpretación. Sin embargo es recomendable que en futuros estudios se utilice el otolito lapillus en vez del sagitta, ya que ha quedado demostrado ser una alternativa para la determinación de la edad en la anchoveta, debido a que su menor cantidad de perturbaciones y su pequeño tamaño facilitan la preparación técnica y la posterior interpretación de la edad.

1. INTRODUCCIÓN

La esclero-cronología de peces es una disciplina que tiene como objetivo reconstruir la historia de organismos vivos a partir de sus estructuras calcificadas, tales como otolitos, escamas, huesos operculares, vértebras, esqueletos calcáreos, dientes, etc. (de Pontual *et al.* 2001, Araya & Cubillos 2002). Un caso particular en el estudio de las estructuras calcificadas es el análisis de otolitos de peces (i.e., otolitometría) (de Pontual *et al.* 2001). Los otolitos aparecen muy tempranamente en la vida de un pez (Leta & Keim 1982, Panfili *et al.* 2001) y su función es actuar como receptor mecánico de las señales transmitidas por el nervio auditivo, a fin de mantener el balance del pez en el medio acuático (Gauldie 1988). Estos constituyen una parte muy importante del oído interno de los peces óseos, en donde se reconocen tres pares de otolitos: sagitta, lapillus y asteriscus (Luque & Ramírez 1996, Wright *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2007).

El otolito crece por deposición de capas concéntricas (denominados anillos de crecimientos) de carbonato de calcio y proteínas, las cuales son depositadas a intervalos regulares que pueden ser diarios o estacionales (Morales-Nin 1992). Los anillos de crecimiento estacionales están formados a su vez por una zona translúcida y otra opaca (Campana & Jones 1992) constituyendo entre ambas un anillo anual (denominado anulo), cuyo crecimiento registra la cronología histórica desde el nacimiento hasta la fecha de muerte del pez (Casselman 1990). Los anillos de crecimiento diario o micro-incrementos (Panella 1971) son solamente visibles a través de un microscopio durante el primer año de vida del pez, debido a que su crecimiento es mayor durante dicho período.

El desarrollo de la otolitometría a nivel diario ha experimentado un notorio incremento, donde se ha dejado de manifiesto la extraordinaria capacidad que poseen los otolitos para registrar información en su micro-estructura (Brothers *et al.* 1976). Así por ejemplo, edad, crecimiento, patrones de movimientos, y/o interacción de hábitat son registrados a diferentes escalas temporales. Dicha información puede ser interpretada a nivel poblacional en términos de ecología, demografía y/o historia de vida de una especie dada, con el fin de asegurar su manejo y conservación (Leta & Keim 1982, Fiuman 2002). Por otra parte, la estructura de los micro-incrementos, además de registrar la edad y crecimiento diario también registran transiciones ontogenéticas que ocurren durante las fases tempranas de su desarrollo, tornándose en una herramienta potencial para estudios ecológicos de peces marinos y dulceacuícolas (Viera 2011).

El otolito más utilizado en la determinación de la edad en los estadios tempranos de peces teleósteos es el sagitta, debido a su mayor tamaño, mayor facilidad en la extracción y mejor resolución de su macro y micro-estructura (Leta & Keim 1982, Viera 2011, Contreras 2013). No obstante, según Campana & Neilson (1985), consideran al lapillus como el otolito más efectivo para análisis micro-estructural debido a la resolución de los micro-incrementos. Por el contrario, el asteriscus no ha sido utilizado en estudios de historia de vida a nivel diario, presumiblemente porque se infiere que este par se forma con posterioridad al tiempo de eclosión y por consiguiente la información de edad que debiese contener puede estar sub-estimada, aunque no hay evidencias empíricas reportadas aún para poner a prueba esta hipótesis.

La determinación de la edad a nivel diario es un proceso que requiere de la identificación de los micro-incrementos primarios (potencialmente diarios) y también de otras estructuras presentes en los otolitos, tales como: los incrementos sub-diarios, el primer anillo, los micro-incrementos primarios, el primordium, las discontinuidades, los centros secundarios de crecimiento y los anillos dobles (Geffen 1982, Mann *et al.* 1983, Campana & Neilson 1985, Plaza *et al.* 2012). Estas últimas estructuras bi y tripartitas son las que generan el mayor problema en la interpretación, porque su ocurrencia se ha visto asociada al proceso de transición de larva a juvenil y también al inicio de la migración vertical en el caso de los micrófitos (Plaza *et al.* 2012). Por lo tanto, se debe destacar que la presencia de incrementos múltiples con la aparición de bandas dobles o bandas de crecimiento rítmicos hacen difícil la interpretación de la lectura de anillos (Cermeño *et al.* 2008, Plaza *et al.* 2012).

Una forma de comprender la naturaleza detrás de la ocurrencia de las estructuras micro-estructurales que dificultan el proceso de determinación de edad a nivel diario, es a través de un estudio comparativo acucioso de la micro-estructura en los tres pares de otolitos de manera simultánea, que hasta la fecha no ha sido abordado en la disciplina de la otolitometría. Un análisis comparativo de los tres pares de otolitos no sólo permite obtener información registrada en su micro-estructura si no que también en su morfometría, la cual es altamente especie-específica (Martínez *et al.* 2007). La morfometría permite investigar a fondo los cambios morfológicos cuantificando geométricamente el borde de la estructura para determinar variaciones de forma (Cadrin & Friedland 1999), la cual ha sido extensamente estudiada como un marcador de estructura poblacional de peces teleósteos (Campana & Casselman 1993).

Además, la morfometría permite el estudio de la simetría bilateral (SB) en donde los rasgos del cuerpo bilateralmente simétricos de su lado izquierdo debiera ser una imagen especular de su lado derecho. Se han descrito diferentes tipos de simetría bilateral como: la asimetría fluctuante (AF) que corresponde a las desviaciones aleatorias de la simetría en rasgos bilateralmente simétricos, la asimetría direccional (AD) que ocurre cuando el valor de un lado del rasgo es siempre más grande que el otro (distribución normal distinta de cero), y la antiasimetría (AS) que corresponde al caso en que los rasgos presentan una distribución bimodal, y donde el rasgo de uno de los lado es mayor que el otro, pero puede ser izquierdo o derecho (Lemberget & McCormick 2009).

Un estudio comparativo de este tipo puede ser llevado a cabo en cualquier especie, sin embargo, es altamente recomendable realizarlo en peces pelágicos pequeños, debido a la gran importancia que tiene como base en la trama trófica y la mantención de los ecosistemas costeros (Pikitch *et al.* 2012). Por consiguiente, la presente tesis propone efectuar un estudio comparativo macro y micro-estructural de los tres pares de otolitos en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns, 1842, la cual es considerada uno de los recursos con la mayor importancia económica, ecológica y social de la zona norte de Chile (Cerna *et al.* 2011, Díaz *et al.* 2013). *Engraulis ringens* es una especie pelágica y teleóstea (Subpesca 2008) que se caracteriza por ser un recurso de corta vida con una longevidad de 4 años, de rápido crecimiento llegando a alcanzar los 12 cm de longitud total en donde su distribución espacial, biomasa y reclutamiento son fuertemente influidos por factores ambientales y parentales (Aliaga *et al.* 2001, Medina *et al.* 2015).

1.1. Antecedentes

1.1.1. De la especie

La anchoveta se distribuye desde la costa hasta 160 kilómetros mar afuera. Ésta posee una extensa distribución geográfica en el Pacífico Suroriental, ubicándose desde Punta Aguja (6°00' L.S.) en el norte del Perú, hasta la XI Región (44°00' L.S.) en Chile (Subpesca 2008). Es una especie pelágica y teleóstea de pequeño tamaño, la cual puede llegar a alcanzar unos 20 cm de longitud total (LT) (Subpesca 2008). Se caracteriza por tener un cuerpo alargado, poco comprimido, presentando una cabeza larga con ojos muy grandes. Su color varía del azul oscuro al verdoso en la parte dorsal, siendo de color plateado el vientre (Instituto del Mar del Perú 2008) (Figura 1).

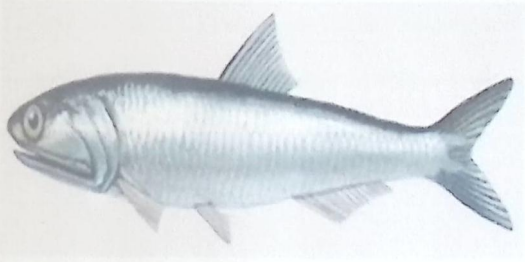


Figura 1. Ejemplar adulto de anchoveta *Engraulis ringens*.

Engraulis ringens presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Filo	: Chordata
Clase	: Actinopterygii
Orden	: Clupeiformes
Familia	: Engraulidae
Género	: *Engraulis*

Nombre científico : *Engraulis ringens*
Nombre común : Anchoveta

La anchoveta posee un crecimiento rápido con una longevidad de 4 años, donde la primera madurez sexual se alcanza al primer año de vida (Subpesca 2008). Es una especie que desova a lo largo de todo el año, aunque concentra su actividad reproductiva entre julio y diciembre, siendo en agosto donde se produce su máximo desove (Díaz *et al.* 2013).

Este recurso presenta hábitos gregarios creando grandes y extensos cardúmenes (Subpesca 2008) los cuales se desplazan en las aguas superficiales de hasta 50 m de profundidad en el día, subiendo durante la noche. Habita las aguas superficiales frías, por lo tanto no se la encuentra ni cercana a la costa, ni mucho menos en las playas o en aguas profundas (Aliaga *et al.* 2001). Es una especie que está condicionada por factores ambientales (tanto bióticos como abióticos) en todas las etapas de su ciclo vital (Díaz *et al.* 2013).

1.1.2. De la pesquería

La anchoveta ocupa un importante lugar en la trama trófica (Passuni 2009) del sistema demersal y pelágico en el Pacífico Suroriental, debido a que sustenta la pesquería pelágica con más del 25% de los desembarques nacionales (Aliaga *et al.* 2001, Ferrada 2002, Subpesca 2008).

Se han registrado 800 mil toneladas anuales promedio de desembarque pelágico desde el año 1984, lo que refleja la gran importancia económica regional (Subpesca 2018).

Las anchovetas son objeto de una intensa explotación pesquera alrededor del mundo desde hace décadas. A inicios de los años 70 se lograron capturar unas 13.059.900 t observándose grandes fluctuaciones en los años posteriores. En los años 80 se produjo una drástica reducción de las capturas originada por el evento El Niño (1982-1983), aunque en los años 90 las capturas se recuperaron nuevamente alcanzando un máximo de 12.520.611 t. durante el año 1994. Posterior a esta fecha se observa una alta variación entre los años 2002-2004, seguido de una tendencia decreciente de las capturas hasta el año 2010, para luego mostrar una recuperación en el año 2011 con un registro de 1,020 millones de t que declina nuevamente a partir del año 2012. Finalmente en el año 2017 se observa un repunte en las capturas alcanzando cerca de 520 mil t de anchovetas desembarcadas (Figura 2) (Subpesca 2018).

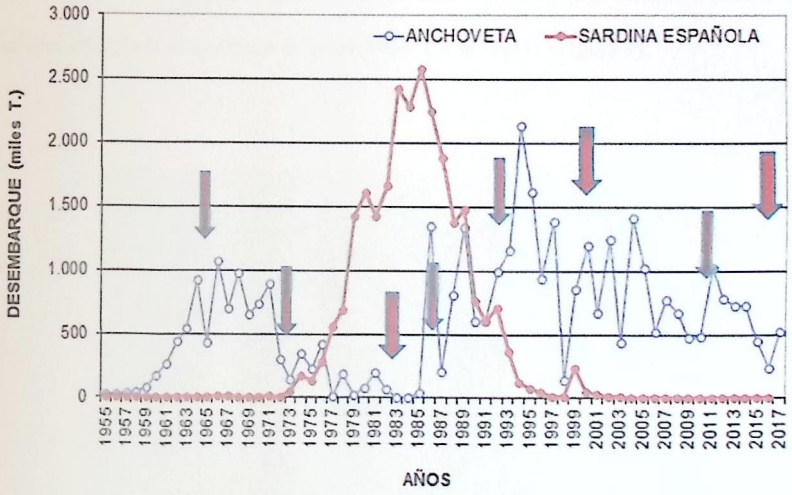


Figura 2. Desembarque histórico de la anchoveta *Engraulis ringens* (1955-2017).

Actualmente la pesquería se encuentra en un estado no definido. El manejo de la pesquería se lleva a cabo mediante la: cuota biológicamente aceptable (CBA), y

anteriormente se realizaba por medio de la: cuota global anual de captura y el límite máximo por armador (LCM) (Subpesca 2018).

1.1.3. Del otolito

Los otolitos son unas estructuras calcáreas (Panfili *et al.* 2001) que están compuestas mayoritariamente por cristales de carbonato de calcio precipitados en forma de aragonita (Degens *et al.* 1969, Campana & Neilson 1985, Morales-Nin 1989, Panfili *et al.* 2001). Dichos cristales se disponen concéntricamente sobre un núcleo central, los cuales se encuentran unidos por una matriz orgánica formada por una proteína fibrosa del tipo colágeno llamada otolina (Viera 2011). Estos difieren en tamaño y forma, que a medida que crece ira dejando marcas alternas, unas más oscuras y otras más claras, de manera similar a la de un tronco de árbol (Panfili *et al.* 2001) (Figura 3).

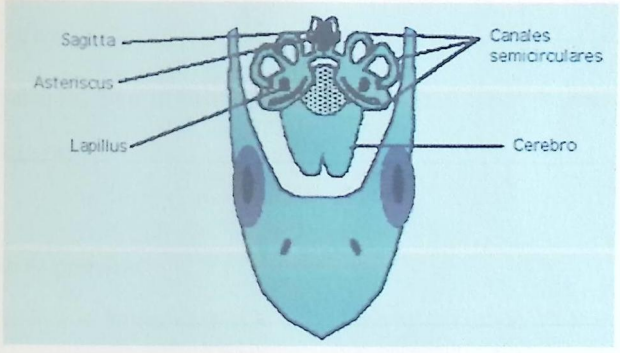


Figura 3. Ilustración de la ubicación de los otolitos en el oído interno de un pez.

Micro-incrementos primarios

Los micro-incrementos primarios están formados por una deposición de una capa de carbonato de calcio y una capa de proteína, las cuales son denominadas como zonas L y D, observándose como una zona clara y oscura bajo microscopio respectivamente. El grosor de los micro-incrementos primarios fluctúa desde menos de 1 µm a los 15 µm. Estos se siguen formando durante la vida del pez, sin embargo su periodicidad diaria es difícil de evaluar, debido a que el grosor comienza a disminuir. Hay algunos incrementos sub-diarios que pueden ocurrir en aquellos períodos en donde el crecimiento es rápido. A pesar de esto, estas estructuras son menos regulares y uniformes que los incrementos primarios, por lo tanto pueden ser distinguidos más fácilmente por un lector experimentado (Plaza *et al.* 2012).

Primordium

Los otolitos se desarrollan de una o más estructuras calcificadas denominada "primordio" exocitados por las células del epitelio en el oído interno. El primordio puede ser circular, elongado o múltiple, dependiendo de la especie. Para el caso de los primordios múltiples, éstos se fusionan para poder formar el centro del otolito (Plaza *et al.* 2012) (Figura 4).

El primer anillo primario

Los otolitos se forman durante la última fase de formación del huevo. Durante cierto tiempo después de su formación, los otolitos crecen continuamente y en la mayoría de los casos sin producir capas concéntricas. El comienzo de la formación del primer incremento primario difiere de una especie a otra, pero en la mayoría de las especies estudiadas, el primer incremento parece estar bien definido. En algunas

especies la formación del primer incremento coincide con la eclosión pero en otras con la primera alimentación (Plaza *et al.* 2012).

Centros secundarios de crecimiento (CSC)

En algunas especies se pueden apreciar centros secundarios de crecimiento los cuales son análogos al primordio, del cual emanan nuevas estructuras concéntricas. Estos CSCs son encontrados más comúnmente en el otolito más grande sagitta. Se han planteado diversas hipótesis para poder explicar el origen de estos CSCs, entre las cuales se pueden nombrar: cambio de hábitat, cambios ontogenéticos en la dieta y por último cambios fisiológicos asociados a la metamorfosis (Plaza *et al.* 2012) (Figura 4).

Estructuras discontinuas (ED)

Las estructuras discontinuas (ED) son elementos sobresalientes o irregulares que ocurren a través de los incrementos primarios, los cuales pueden interrumpir la sucesión de estos, ya sea en forma cíclica o acíclica. Éstas pueden ser distinguidas bajo magnificaciones altas o bajas, las que requieren que el otolito sea previamente preparado. Además estas estructuras son comunes en todas las especies y posiblemente son productos del estrés ambiental al que las especies están sujetas. Algunas están relacionadas a eventos tales como asentamiento y/o metamorfosis apareciendo como drásticos cambios en el grosor del incremento (Plaza *et al.* 2012).

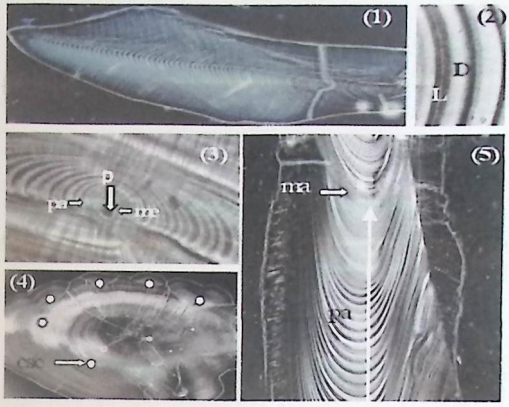


Figura 4. Ilustración mediante microscopio óptico de la micro-estructura de los otolitos de peces juveniles (1) otolito sagitta; (2) zona D y zona L; (3) región del primordio de un otolito sagitta del clupeido *Etremeus teres*; (4-5) secciones frontales y sagitales de un *Sebastes inermis*. P= primordio; me= marca a la eclosión; pa= primer anillo; CSC= centros secundarios de crecimiento, ma= marca de alimentación. (Extraído desde Plaza *et al.* 2012).

2. HIPÓTESIS

2.1. H_1: Rasgos micro-estructurales

Se ha descrito que los otolitos registran no sólo información de edad y crecimiento, sino también de eventos ontogenéticos como cambios de hábitats y cambios fisiológicos, reflejados en la transformación de larva a juvenil (Plaza *et al.* 2012). Muchos de estos cambios, sin embargo, han sido descritos utilizando sólo un tipo de otolito, generalmente el sagitta por ser el de mayor tamaño. En el caso de juveniles de engráulidos la micro-estructura de otolitos se subdivide en tres zonas distintivas: la primera de ellas (Zona A) muestra un patrón de depósito de micro-incrementos relativamente homogénea y está relacionada a la etapa larval (Plaza *et al.* 2012, Gómez 2013). La segunda (Zona B) comprende un periodo de transición donde existe una mayor cantidad de perturbaciones, anillos dobles y otras discontinuidades (Morales-Nin & Aldebert 1997, Plaza *et al.* 2012). La tercera (Zona C) presumiblemente vinculada a la etapa juvenil, retoma un proceso de depósito, donde puede existir una disminución y/o un aumento en el grosor de los micro-incrementos, dependiendo de las condiciones ambientales (Plaza *et al.* 2008). Hasta la fecha no existe evidencia si la existencia de los anillos dobles es un rasgo micro-estructural real y/o es producto artificial derivado del proceso de preparación del otolito. Por consiguiente, es razonable hipotetizar que si la existencia de micro-incrementos dobles es un registro de un evento fisiológico y/o ambiental, entonces estas estructuras debiesen ser visibles también en cada uno de los tres pares de otolitos. Similarmente, si la existencia de las zonas micro-estructurales son efectivamente un registro de los procesos ontogenéticos en estas especies, el patrón debe ser consistente entre los tres pares de otolitos.

2.2. H_2: Asimetría fluctuante

Dos de los factores principales que causan la asimetría fluctuante (AF) en los rasgos morfológicos son la tensión ambiental y el estrés genético, por lo que estudios recientes han sugerido que la AF en los otolitos puede servir como un indicador de estrés en las larvas de peces (Alados *et al.* 1993, Lemberget & McCormick 2009). La AF es definida como desviaciones aleatorias de simetría perfecta, la cual se ha convertido en una herramienta popular con el fin de examinar los efectos del estrés durante el desarrollo de los organismos bilateralmente simétricos. Ha sido considerada como la medida más utilizada en cuanto a la estabilidad del desarrollo de los organismos (Somarakis *et al.* 1997), lo cual refleja la incapacidad de un individuo para producir un fenotipo regular debido a las perturbaciones genéticas y ambientales durante la ontogenia (Lemberget & McCormick 2009). Además puede ser utilizada para revelar las poblaciones de larvas severamente disminuidas en alimento y probablemente también aquellas poblaciones que han sido sometidas a condiciones de alimentación sub-óptimas (Gronkjaer & Sand 2003). Actualmente la asimetría fluctuante ha sido estudiada en estadios tempranos de desarrollo larval, que es en donde ocurre la mayor mortalidad natural. En estas condiciones de alta vulnerabilidad es razonable inferir que la asimetría fluctuante pueda ser más evidente. Contrariamente la AF aún no ha sido cuantificada en juveniles, los cuales corresponden a los sobrevivientes. Por lo tanto, es razonable hipotetizar que en condiciones ambientales uniformes (óptimas) no debiese existir asimetría fluctuante (condición fisiológica sub-óptima) en ninguno de los tres pares de otolitos de juveniles de peces teleósteos, considerando como especie de análisis a *Engraulis ringens*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar un análisis comparativo de la morfometría y micro-estructura de los otolitos sagitta, lapillus y asteriscus en juveniles en la anchoveta *Engraulis ringens.*

3.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar un análisis de los descriptores básicos de forma de los otolitos sagitta, lapillus y asteriscus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens.*

- Cuantificar la existencia de asimetría fluctuante o asimetría direccional en los tres pares de otolitos, utilizando información de los descriptores básicos de forma en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens.*

- Determinar potenciales diferencias en rasgos micro-estructurales registrados en los 3 pares de otolitos (sagitta, lapillus y asteriscus).

- Establecer potenciales diferencias en el número de micro-incrementos registrados en los 3 pares de otolitos (sagitta, lapillus y asteriscus) utilizando los dos criterios de lectura: Criterio de bandas y Criterio de cuantificación individual.

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestreo

Las muestras del presente estudio fueron otorgadas por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), las cuales se obtuvieron de un muestreo realizado en la zona norte de Chile, específicamente en las regiones de Arica y Antofagasta durante 2015 y 2016. Una vez adquiridas, fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Esclerocronología de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso a cargo del Dr. Guido Plaza (Figura 5).

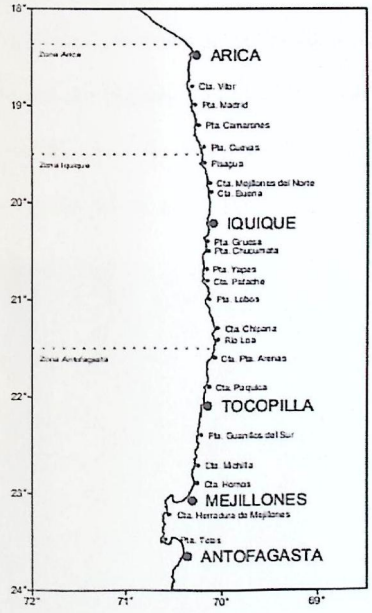


Figura 5. Mapa de los sitios de muestreo de juveniles de *Engraulis ringens* en la zona norte de Chile.

4.2 Trabajo en Laboratorio

4.2.1 Almacenamiento y tratamiento de muestras

Se contó con un total de 100 muestras de *Engraulis ringens* previamente congeladas. Al momento de trabajar las muestras, estas fueron descongeladas y luego distribuidas en bandejas indicando en cada una de ellas: nombre de la especie, lance, ID, fecha y zona (Figura 6 A). Esto se realizó principalmente para poder mantener la trazabilidad de las muestras. A cada anchoveta se le midió su longitud total (LT; distancia entre la punta del hocico y el término de la aleta caudal) y estándar (LE; distancia entre la punta del hocico y el término del pedúnculo caudal) mediante un ictiómetro digital con una precisión de ±0,01 mm y se pesaron con una pesa analítica (marca y modelo) con una precisión de ±0,1 mg. Posterior a esto se le cortó la cabeza del resto del cuerpo del ejemplar, conservando la primera parte en un frasco (previamente rotulado) fijado con una pequeña solución de etanol entre el 90 y 95 % (Figura 6 B). Esto se llevó a cabo para su conservación y para obtener una mejor manipulación al momento de la extracción de sus otolitos.



Figura 6. Fotografías ilustrativas del proceso de almacenamiento y tratamiento de otolitos de *Engraulis ringens*.

4.2.2. Extracción de otolitos

A cada uno de los ejemplares se les efectuó una incisión ovalada en la parte dorsal del cráneo utilizando un bisturí, de manera de extraer el cerebro por completo (con delicadeza debido a que se puede traer adherido a él alguna porción de los sacos óticos). Este corte permitió remover con facilidad el cerebro mediante micro-pinzas y posteriormente se extrajo de forma cuidadosa los otolitos sagittas de sus respectivas cavidades y además los canales semi-circulares que contienen los otolitos lapillus y asteriscus. (Figura 7 C-D-E).

4.2.3. Preparación de otolitos

4.2.3.1. Sagittas

Los otolitos sagittas al ser de mayor tamaño fueron rápidamente removidos (con ayuda de micro-pinzas), y se depositaron en una cápsula petri en una pequeña fracción de alcohol. Se les limpió el tejido adherido utilizando finas agujas de disección, para luego ser almacenados en micro-tubos de centrífugas debidamente rotulados para análisis posterior. El procedimiento de extracción de los otolitos se llevó a cabo utilizando una lupa estereoscópica Leica EZ 4D (Figura 7 F-G).

Para una mejor visualización de los micro-incrementos estos fueron montados utilizando resina epóxica. Primero se colocó una pequeña fracción residual de cera termoplástica en un portaobjeto con la ayuda de un mechero. En un recipiente distinto se mezclaron ambos componentes de la resina en fracciones similares, procurando que la mezcla sea lo más lenta y cuidadosa posible, para así evitar la formación de burbujas. Posteriormente el otolito fue embebido en una pequeña fracción de resina depositada

sobre el residuo de cera mediante la ayuda de pequeñas agujas de disección (Figura 7 K-L-M-N).

4.2.3.2 Lapillus y asteriscus

Los otolitos lapillus y asteriscus fueron extraídos desde los canales semi-circulares de forma muy cuidadosa para no remover restos de tejido adheridos a ellos. La extremada delgadez de los otolitos lapillus y asteriscus hizo imposible generar un sistema de almacenamiento en recipientes individualizados, debido a que la probabilidad de pérdida de las estructuras al momento del montaje fue elevada. Es por esto que fueron almacenados temporalmente en una pequeña fracción de esmalte cosmetológico transparente. Para ello, una vez que los otolitos fueron separados se extrajeron desde la placa petri con el extremo de una aguja de disección y luego fueron transferidos a una gota de esmalte depositada sobre un portaobjeto (Figura 7 I-J).

Para obtener una mayor visibilidad de los micro-incrementos y facilitar procedimientos posteriores de pulido de los otolitos, se traspasaron a una pequeña porción de Cristal Bond. Para ello los otolitos fueron removidos del esmalte utilizando una pequeña alícuota de acetona y posteriormente fueron traspasados a una pequeña fracción de Cristal Bond, previamente diluido.

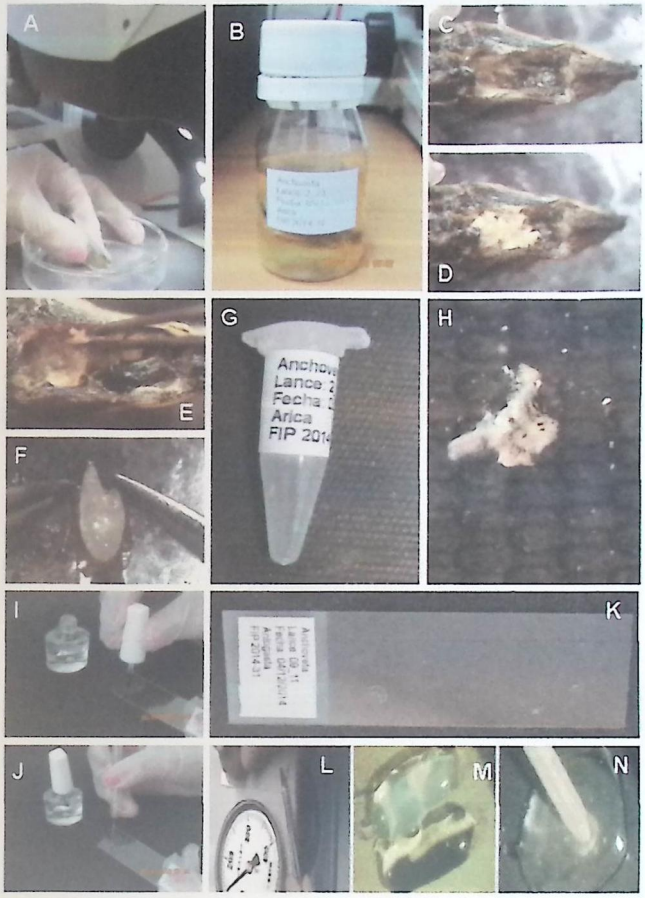


Figura 7. Fotografías ilustrativas del proceso de extracción y montaje de otolitos de *Engraulis ringens*.

4.2.4 Caracterización de la micro-estructura y proceso de pulido

Para la caracterización de la micro-estructura se utilizó el otolito ya traspasado previamente a resina epóxica (sagittas) y a cristal bond (lapillus y asteriscus). Cada uno de los otolitos (sagitta, lapillus y asteriscus) fueron pulidos manualmente utilizando lijas de diferente graduación: 2000-2500 en sagittas y lijas finas de limpieza de 1 µm en lapillus y asteriscus. Los otolitos fueron pulidos en posición sagital por ambas caras, hasta obtener la mejor resolución del primordio en la cara cóncava, teniendo cuidado en no sobre-pulir los bordes de los otolitos de manera de no perder la resolución de los mismos.

4.2.5 Digitalización y morfometría de los otolitos

Los otolitos sagittas, lapillus y asteriscus fueron depositados en agua en cápsulas pretris y posteriormente observados sobre un fondo de color negro, en una lupa Leica EZ 4D a un aumento de 16x (otolitos sagittas) y a un aumento de 35x (otolitos lapillus y asteriscus). Luego fueron digitalizados mediante el programa Leica LAS Image Analysis (Análisis de imágenes). Las imágenes fueron retocadas utilizando el programa Microsoft Paint 5.1 para eliminar imperfecciones o partículas de las imágenes capturadas al momento de la digitalización de los otolitos (Figura 8).

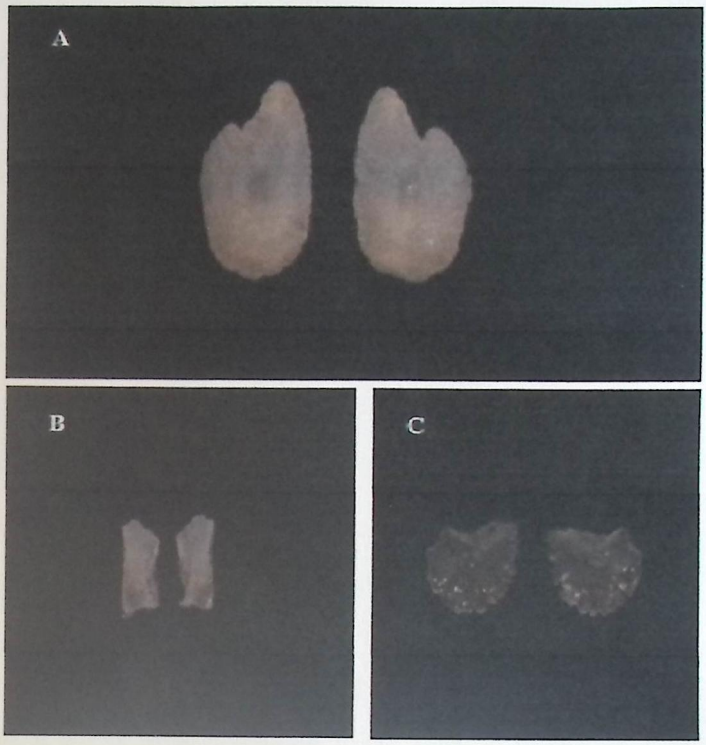


Figura 8. Fotografías ilustrativas del proceso de digitalización y morfometría de los tres pares de otolitos de anchoveta *Engraulis ringens*. (A) sagitta; (B) lapillus y (C) asteriscus.

4.2.6. Obtención de descriptores básicos de forma

Una vez que los otolitos fueron digitalizados, se analizaron mediante el programa Image Pro Plus 6.0, en donde a cada imagen se le realizó un análisis morfométrico, determinando los siguientes descriptores básicos de tamaño por cada talla (LT) del pez obtenida: área (AO), diámetro (DO), radio (RO) y perímetro (PO).

Para determinar si existieron diferencias significativas en los descriptores básicos de forma entre los otolitos derecho e izquierdo se realizó un test de Wilcoxon, debido a que

los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedastididad (Shapiro-Wilk, $p<0,05$), utilizando el software estadístico STATISTICA 7.

Se examinó si existió proporcionalidad entre el tamaño del otolito y la longitud del pez, utilizando cada uno de los índices básicos de forma. Para ello se ajustó una regresión lineal por mínimos cuadrados entre la longitud total del pez (LT), el perímetro, el diámetro y el radio de los otolitos izquierdos y derechos, además de un modelo exponencial entre la LT y el área de los otolitos utilizando el programa estadístico STATISTICA 7. Luego se realizó un ANCOVA para comparar si existieron diferencias significativas entre las pendientes de los modelos, entre el sagitta derecho e izquierdo.

4.2.7. Simetría de los otolitos

Para el análisis de la simetría del otolito sagitta y lapillus se utilizó la morfometría de ambos otolitos. Se calculó la media entre la medición del otolito derecho (D) y el otolito izquierdo (I) de cada ejemplar (tamaño del rasgo; (D+I)/2) y la diferencia obtenida entre ambas mediciones (simetría del rasgo; |D-I|). Luego se aplicaron correlaciones entre ambas variables (tamaño y simetría del rasgo) además de realizar para cada rasgo, histogramas de frecuencia entre el tamaño del rasgo y rasgo simétrico.

Posteriormente, se calculó el valor de la simetría de cada rasgo mediante la siguiente fórmula (Palmer &Strobeck 2003):

$$|D-I|/((D+I)/2)$$

La distribución de frecuencia fue evaluada para verificar el nivel de desviación de la distribución normal mediante el test Shapiro-Wilk, en el programa estadístico STATISTICA 7, además de obtener y describir el sesgo y la curtosis.

4.2.8. Diferencias en rasgos micro-estructurales

La caracterización micro-estructural de las tres zonas: Zona A (Zona larval), Zona B (Zona de la metamorfosis) y Zona C (Zona del crecimiento juvenil) se llevó a cabo en los tres pares de otolitos, para evaluar la consistencia ontogenética. Por otra parte, se determinó si existieron diferencias en cuanto a anillos dobles y otras perturbaciones en las tres zonas teniendo en cuenta el tipo de otolito. Esto se llevó a cabo de manera digital, mediante un microscopio óptico a distintos tipos de aumento, hasta obtener la mejor resolución. Además, se caracterizó la micro-estructura de los tres pares de otolitos mediante la descripción de sus rasgos más distintivos.

4.2.9. Lectura de los micro-incrementos primarios

Los micro-incrementos fueron contados desde el núcleo hacia la periferia del otolito, mediante el analizador de imágenes Image Pro-plus utilizando la herramienta "Manual Tag". Las fotografías fueron tomadas a magnificaciones de 400X. Para el caso de los otolitos de mayor tamaño, fue necesario combinar varias imágenes para obtener la ilustración completa, utilizando el programa Microsoft Excel, el cual permitió mantener las dimensiones originales de la muestra. Se tomaron fotografías secuenciales con el progreso del pulido, lo que permitió obtener una secuencia completa de los incrementos desde el núcleo hasta el borde de los otolitos (Figura 9).

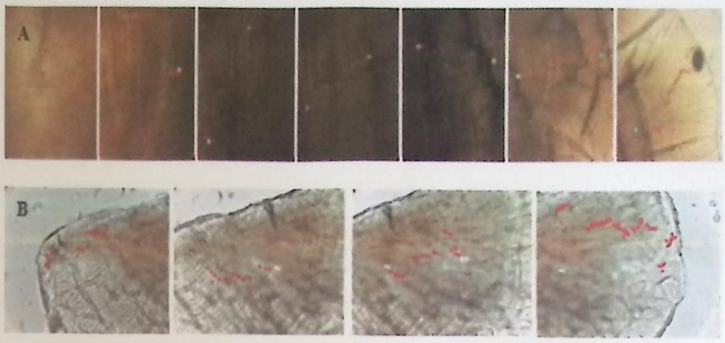


Figura 9. Ilustración del proceso de conteo de los micro-incrementos en un otolito sagitta (A) y lapillus (B) de la anchoveta *Engraulis ringens*.

Los conteos se realizaron mediante los criterios GBR e IMR mediante lectores que fueron clasificados en tres tipos: (1) lector experimentado en análisis de la micro-estructura de otolitos (LE), (2) lector con experiencia media (LM) y (3) lector principiante (LP). Se realizó un Análisis de Varianza multifactorial para evaluar si existieron diferencias significativas en la edad media considerando 3 efectos fijos: el método (GBR vs IMR), tipo de otolito (sagitta, lapillus y asteriscus) y lector (LE, LM y LP) (Figura 10).

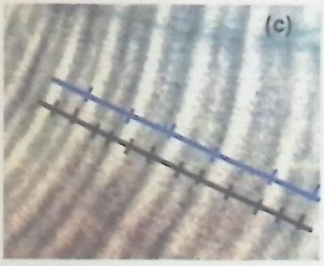


Figura 10. Ilustración de los criterios descritos por Cermeño *et al.* (2008) para identificar los micro-incrementos primarios; línea azul: GBR; línea negra: IMR (Extraído desde Plaza *et al.* 2012).

4.2.10. Reproducibilidad e Índice de porcentaje de error promedio (IAPE)

Para evaluar de mejor manera la confiabilidad de la precisión de las lecturas (número de incrementos que identifica cada lector) se calculó el índice de error de acuerdo a la expresión de Beamish & Fournier (1981), entendiéndose como precisión de las lecturas la repetitividad de una medida individual:

$$IAPE = \frac{100}{N}\sum_{j=1}^{N}\left[\frac{1}{R}\sum_{i=1}^{R}\frac{|X_{ij} - X_j|}{X_j}\right]$$

Donde:

N: Número de peces que se les asignó edad

R: Número de veces que fue leída la muestra

Xij: i-ésima determinación de edad del j-ésimo pez

Xj: Edad promedio calculada para el j-ésimo pez

5. RESULTADOS

5.1. Micro-estructura

5.1.1. Sagittas

Los otolitos sagittas poseen una estructura elíptica agudizada que se va afinando hacia el borde para conformar el rostro de manera pronunciada y terminando de forma ovoide hacia el cauda. La totalidad de los otolitos analizados presentaron un primordio único compacto de forma circular en la parte central del otolito, los cuales fueron visibles mediante un pulido previo. El primordio midió en promedio 11,23 ± 4,07 µm en sagittas derechos y 11,24 ± 1,25µm en sagittas izquierdos. Se observó una marca prominente luego del primordio, la cual puede hacer referencia a un primer anillo o marca de eclosión, presentándose de forma clara y definida, formada a los 8,24±0.69 µm. En otros casos se apreció además una marca de primera alimentación de manera notoria (Figura 11).

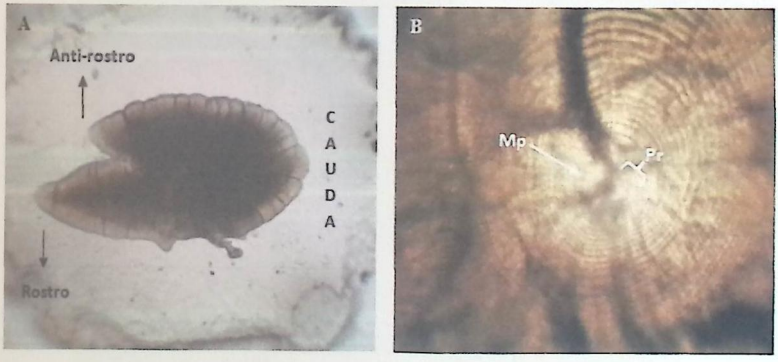


Figura 11. Vista interna de un otolito sagitta (A) y sus diversas estructuras (B). Mp= marca prominente, Pr= primordio. Aumento: A: 40x, B: 400x.

Debido a las características y resolución que presentan los micro-incrementos se observaron 3 zonas: una Zona A, la cual se forma después de la zona difusa rodeando al primordio central y opaco, caracterizada por presentar micro-incrementos definidos, finos, de baja resolución y sin mucha presencia de anillos sub-diarios. Una Zona B en la cual se aprecia un patrón de formación más irregular con presencia de anillos dobles, sub-diarios y otras discontinuidades del crecimiento, en la cual no se logran visualizar de manera clara los anillos generando dificultades en la interpretación y en muchos casos se impidió distinguir los micro-incrementos diarios en un eje de medición única.

Una Zona C caracterizada por anillos más finos de mejor resolución seguido de una notoria disminución en el grosor de los micro-incrementos, que dificultó la lectura en áreas con exceso de pulido (Figura 12).

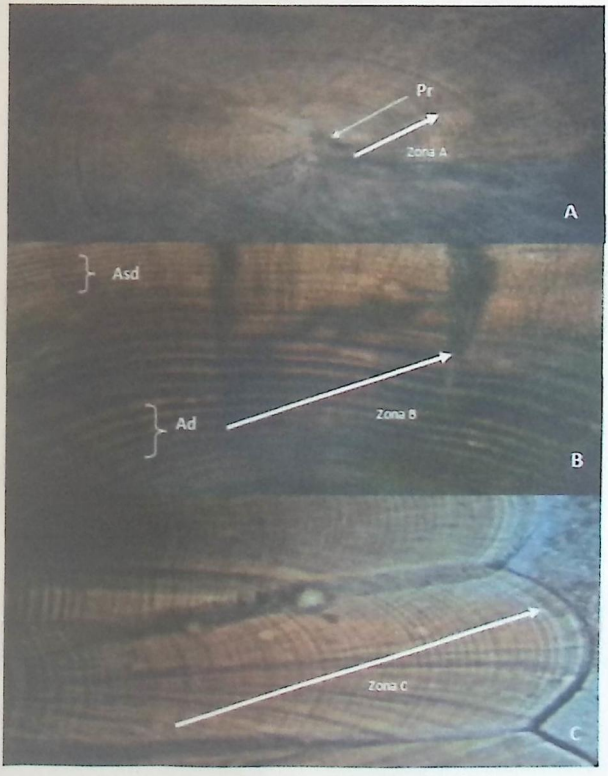


Figura 12. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de otolitos sagittas ilustrando las tres zonas características (A-B-C). Ad= anillo doble, Pr= primordio, Asd= anillo sub-diario. Aumento: A-B-C: 400x.

5.1.3. Lapillus

Presentaron una forma angular alargada con la presencia de un único primordio bien demarcado en uno de sus extremos conformando el rostro, rodeado por una zona difusa en donde no se apreciaron micro-incrementos. Se observó de manera clara la presencia del primer anillo concéntrico (marca prominente) alrededor del primordio, conformando el núcleo del otolito. En estos el promedio registrado que presentó el núcleo fue de 17, 40 ± 1,46 µm en lapillus derechos y de 16,96 ± 1,27 µm en lapillus izquierdos (Figura 13).

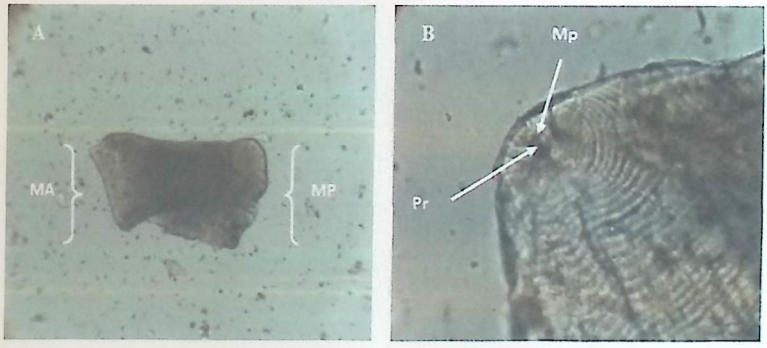


Figura 13. Vista externa de un otolito lapillus y sus diversas estructuras (A). MA= margen anterior, MP= margen posterior (B). Pr= primordio, Mp= anillo prominente.

En la mayoría de los otolitos hubo presencia de un único primordio cuya forma es circular, situado en el extremo del margen anterior. En algunos casos hubo presencia de dos o tres primordios situados de forma adyacente en la parte central del otolito. El diámetro promedio que presentó el primordio fue de 6,43 ± 0,92 µm en lapillus derechos y de 6,34 ± 1,14 µm en lapillus izquierdos (Figura 14).



Figura 14. Presencia de primordios en otolito lapillus (A-B-C). Pr= primordio. Aumento: A-B-C: 400x.

El patrón de micro-incrementos primarios fue relativamente homogéneo observándose anillos bien definidos y finos con una buena resolución en una primera instancia (Zona A). Luego de la presencia del primordio y del anillo concéntrico predominante se observaron anillos dobles, además de micro-incrementos de mayor contraste y grosor (Zona B).

Hacia los bordes los micro-incrementos se apreciaron con una mejor resolución, observándose solo anillos finos, los cuales tienden a ser gruesos con el cambio de foco tornándose en anillos falsos los que confunden la lectura de micro-incrementos dificultando el conteo correspondiente (Zona C) (Figura 15).

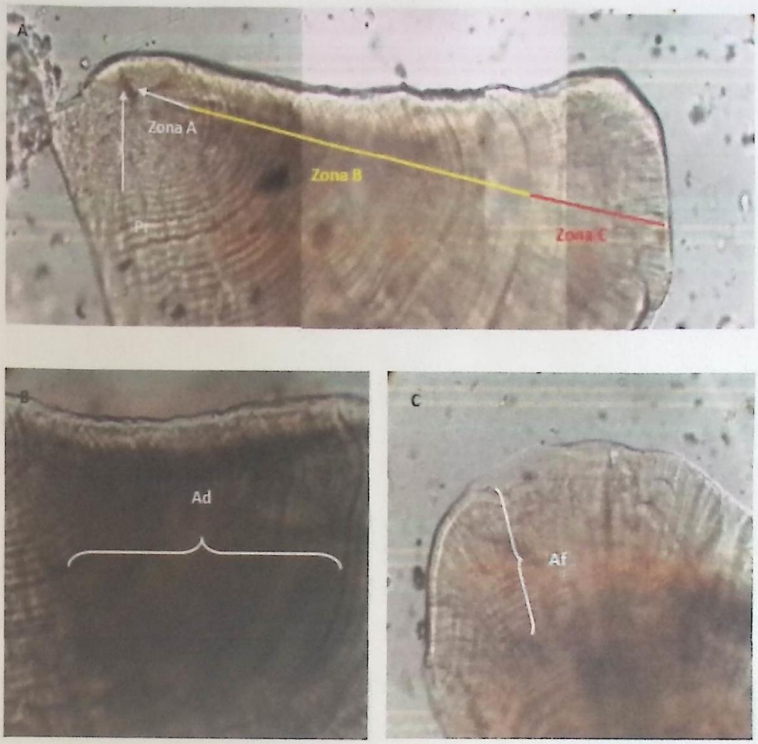


Figura 15. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de otolito lapillus ilustrando las tres zonas características (A) y sus diversas estructuras (B-C). Ad= anillo doble, Pr= primordio, Af= anillo fino. Aumento: A-B-C: 400x.

5.1.2. Asteriscus

Estos presentaron una forma semi-discoide o de media luna, con un extremo de mayor tamaño formando el rostro, siendo el otro extremo más redondeado dando lugar al cauda. Se presentó alrededor del primordio una zona difusa con una alta discontinuidad micro-estructural, cuya forma era bastante irregular. A pesar de esto se observó de manera clara en casi toda la totalidad de las muestras la presencia del primer anillo concéntrico, denominado como la primera marca alrededor del primordio,

conformando el núcleo del otolito. En estos el promedio registrado que presentó el núcleo fue de 35,63 ± 8,34 µm en asteriscus derechos y de 43,03 ± 4,71 µm en asteriscus izquierdos (Figura 16).

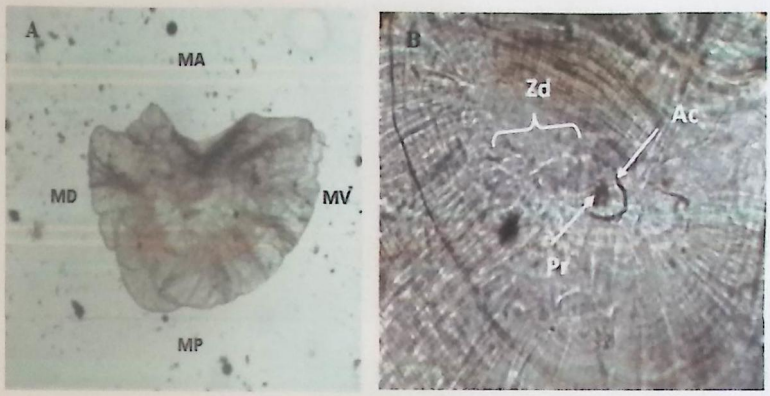


Figura 16. Vista externa de un otolito asteriscus y sus diversas regiones (A). MD= margen dorsal, MA= margen anterior, MV= margen ventral, MP= margen posterior, (B). Zd= zona difusa. Pr= primordio. Ac= anillo concéntrico. Aumento: A: 100x. B: 400x.

Se observaron cerca del primordio, anillos bien definidos y finos con una buena resolución (Zona A). Luego de la zona difusa se observó la presencia de anillos dobles siendo de menor cantidad en comparación con el sagitta y el lapillus, además de micro-incrementos de mayor grosor pero de baja resolución (Zona B). Hacia los bordes se visualizaron aquellos anillos finos que se caracterizaron por tener una mejor resolución, lo cual se pudo apreciar al realizar un cambio de foco en el microscopio (Zona C). Sin embargo fue difícil realizar una lectura de los otolitos en su totalidad debido a la dificultad que se presenta en la Zona B por distintas irregularidades y estructuras discontinuas (Figura 17).

Un rasgo distintivo fue la presencia de microincrementos muy finos e irregulares, los cuales se pudieron distinguir en ciertas regiones del otolito, a diferencia del marcado grosor que presentaron los micro-incrementos regulares.

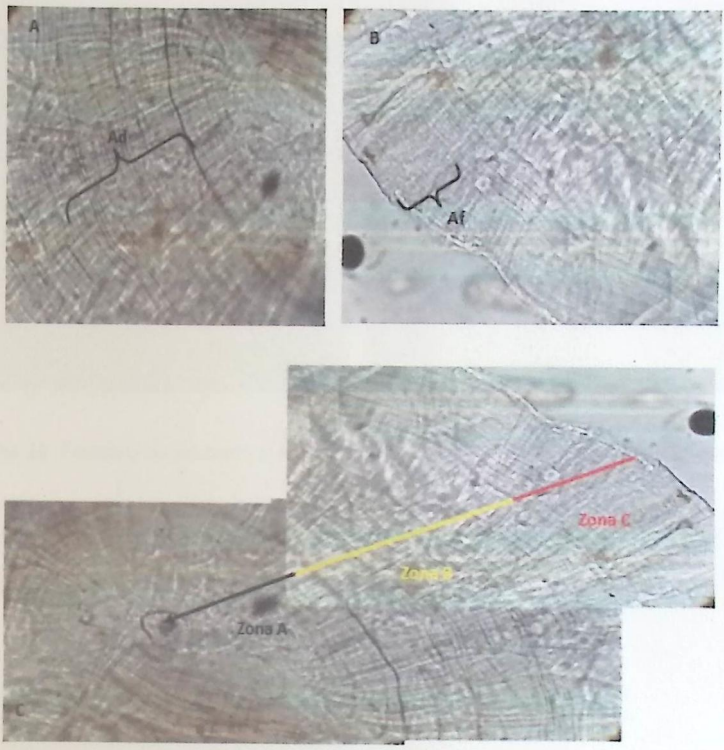


Figura 17. Fotografías bajo luz transmitida de análisis micro-estructural de los otolitos asteriscus ilustrando la presencia de anillo dobles (A-B) y las tres zonas características (C). Ad= anillo doble, Af= anillo fino. Aumento: A-B-C-D-E: 400x, D: 100x.

En la mayoría de las muestras se observó un único primordio cuya forma era circular u ovalado situado al centro del asteriscus. En algunos casos hubo presencia de dos primordios difusos situados unos al lado del otro también en la parte central del

otolito. El diámetro promedio que presentó el primordio fue de 13,30 ± 4,84 μm en asteriscus derechos y de 14,08 ± 3,69 μm en asteriscus izquierdos (Figura 18).

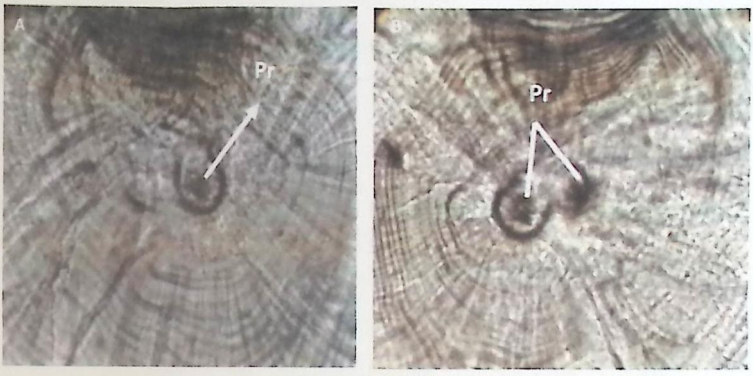


Figura 18. Presencia de primordios en otolito asteriscus (A-B). Pr= primordio. Aumento: A-B: 400x.

5.2. Morfometría

5.2.1 Sagittas y lapillus

No se encontraron diferencias significativas al relacionar el otolito sagitta derecho con el izquierdo en diámetro, perímetro y radio ($p > 0,05$; test Wilcoxon, diámetro= 0,44; radio= 0,10; perímetro= 0,20), pero no así con respecto al área (test Wilcoxon, $p=0,00001$). En cuanto al lapillus no se encontraron diferencias significativas al relacionar el otolito derecho con el izquierdo en diámetro y área (test Wilcoxon, diámetro= $p= 0,247$; área= 0,43), no presentándose el mismo caso para el perímetro y el radio (test Wilcoxon, perímetro= $p= 0,08$; radio=0,06). Cabe destacar que los otolitos

sagittas y lapillus derechos en relación a los izquierdos presentaron valores similares en sus descriptores básicos (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las medidas morfométricas obtenidas a partir de los otolitos sagittas y lapillus izquierdos y derechos. Prom= promedio, DS= desviación estándar.

	Sagitta					
Variable	Derecho			Izquierdo		
morfométrica	N	Prom ± DS	Rango	n	Prom±DS	Rango
Diámetro (mm)	100	2,60 ± 0,32	1,78-4,03	100	2,60 ± 0,33	1,85-4,08
Radio (mm)	100	1,42 ± 0,16	1,00-2,14	100	1,41 ± 0,16	1,03-2,15
Area (mm^2)	100	2,05 ± 0,48	1,23-4,48	100	2,07 ± 0,48	1,24-4,19
Perímetro (mm)	100	6,77 ± 0,87	4,79-11,45	100	6,79 ± 0,92	4,99-11,83
	Lapillus					
Diámetro (mm)	20	0,57 ± 0,04	0,43-0,62	100	0,57 ± 0,04	0,43-0,62
Radio (mm)	20	0,31 ± 0,02	0,24-0,134	100	0,31 ± 0,02	0,23-0,135
Area (mm^2)	20	1,55 ± 0,02	0,09-0,19	100	0,15 ± 0,02	0,09-0,19
Perímetro (mm)	20	1,69 ± 0,13	1,34-1,88	100	1,72 ± 1,55	1,30-2,02

5.2.2. Crecimiento somático sagitta

Al comparar las medidas morfométricas de los otolitos mediante el modelo de regresión lineal se observó que el diámetro, radio, perímetro y área se relacionaron positiva y significativamente con la longitud total de los peces (diámetro= r^2 0,63; radio= r^2 0,63; perímetro= r^2: 0,64; área= 0,66), por lo tanto se deduce una proporcionalidad entre el crecimiento del otolito y el crecimiento somático del pez. Al observar el valor de las pendientes se infiere que por cada centímetro que aumenta el

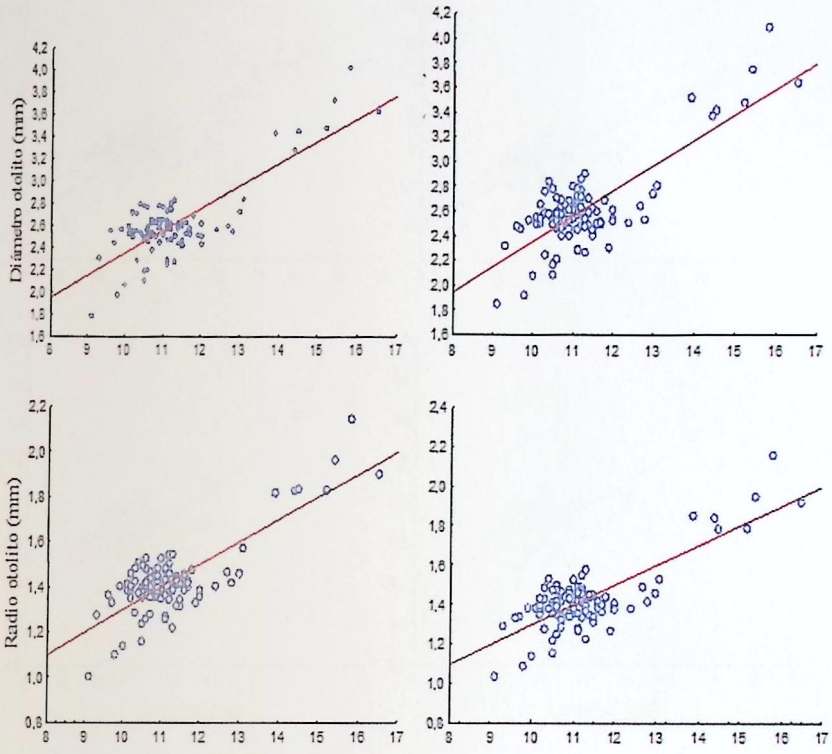
pez los otolitos derechos aumentan en 0,20 mm su diámetro, 0,09 mm su radio, 0,54 mm su perímetro y 0,12 mm su área, mientras que los otolitos izquierdos aumentan en un 0,20 mm su diámetro, 0,09 mm su radio, 0,56 mm de perímetro y 0,12 mm su área (Tabla 2, Figura 19).

Tabla 2. Resumen de los parámetros del modelo lineal simple de los otolitos sagittas entre la longitud total del pez (LT) versus las variables morfométricas (diámetro, radio, perímetro y área) de *Engraulis ringens*. α= intercepto, β= pendiente, EE= error estándar.

Modelo	Sagitta	N	α	EE	β	EE	R^2	F	P
Diámetro v/s LT	Derecho	100	0,339	0,172	0,201	0,015	0,642	175,89	<0,001
Radio v/s LT		100	0,299	0,087	0,099	0,007	0,630	167,15	<0,001
Perímetro v/s LT		100	0,649	0,462	0,544	0,040	0,645	178,28	<0,001
Area v/s LT		100	-0,684	0,099	0,123	0,008	0,665	194,61	<0,001
Diámetro v/s LT	Izquierdo	100	0,312	0,178	0,204	0,015	0,631	167,69	<0,001
Radio v/s LT		100	0,296	0,087	0,099	0,007	0,629	166,32	<0,001
Perímetro v/s LT		100	0,412	0,490	0,567	0,043	0,636	171,69	<0,001
Area v/s LT		100	-0,668	0,102	0,122	0,009	0,650	182,80	<0,001

Sagitta derecho

Sagitta izquierdo



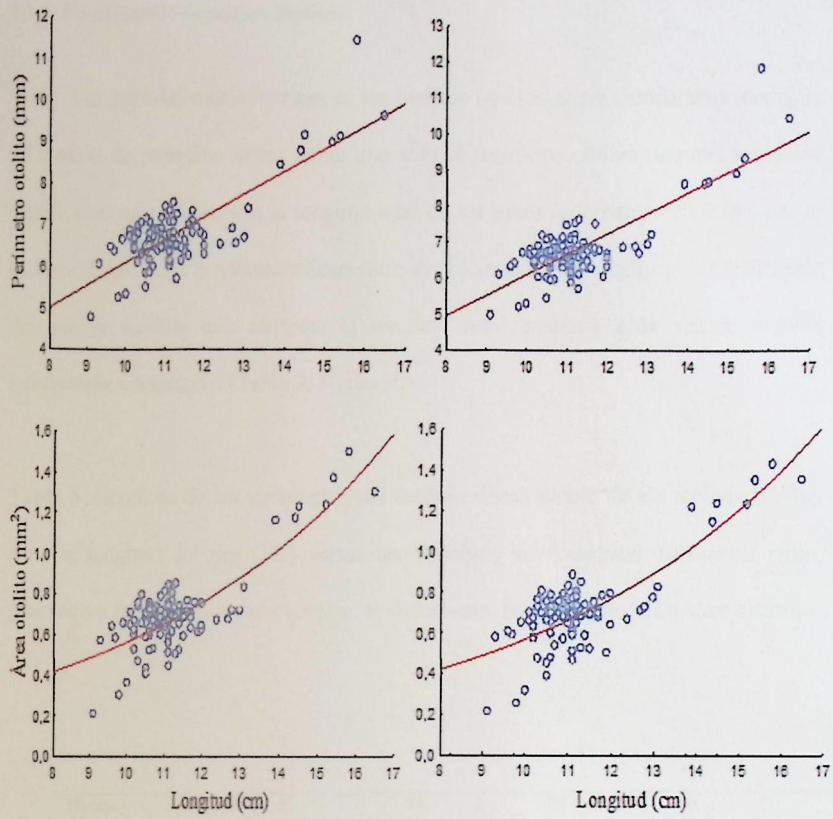


Figura 19. Relaciones morfométricas entre la longitud total (cm) versus los descriptores básicos (diámetro, radio, perímetro y área) de otolitos sagittas derecho e izquierdo de *Engraulis ringens*.

5.2.3. Crecimiento somático lapillus

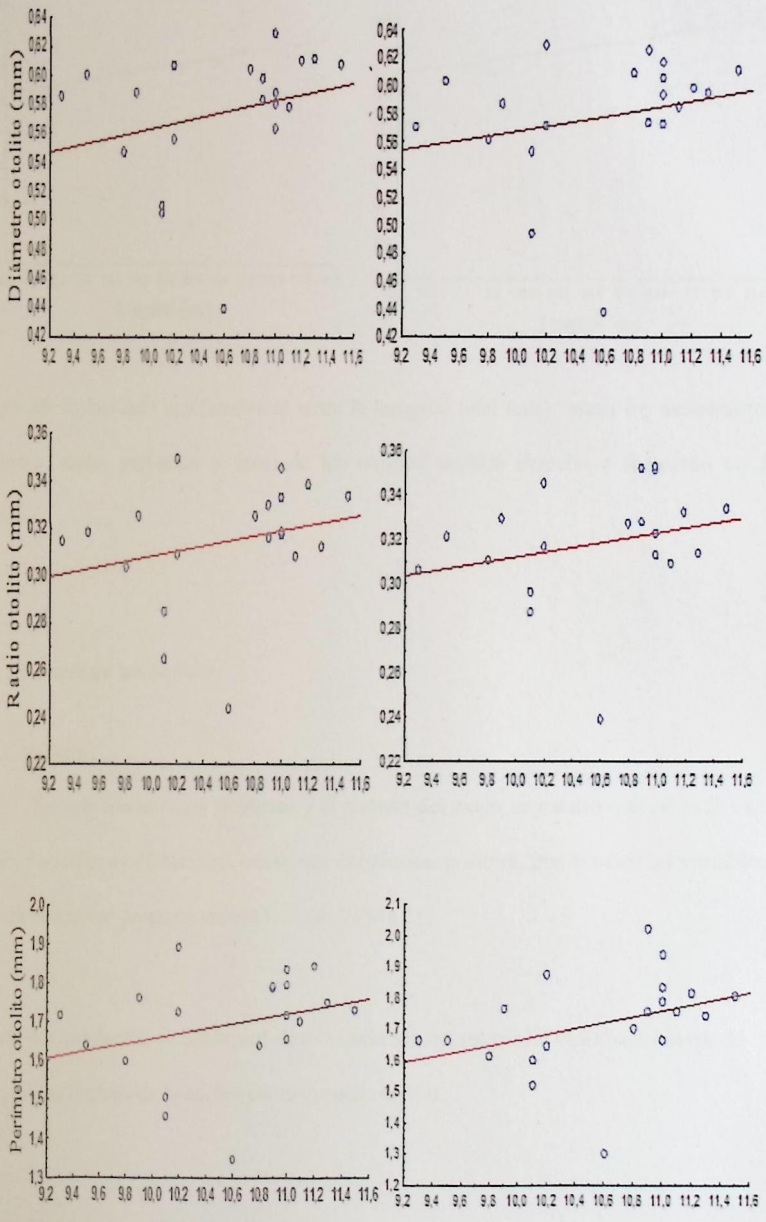
Las medidas morfométricas de los otolitos lapillus al ser comparadas mediante un modelo de regresión lineal arrojo que sólo el perímetro obtuvo una alta regresión significativa en relación con la longitud total de los peces (perímetro= r^2: 0,14), por lo tanto se deduce una proporcionalidad entre el crecimiento del otolito y el crecimiento del pez (a medida que aumenta la longitud total aumenta a la vez la medida morfométrica estudiada) (Tabla 3, Figura 20).

Tabla 3. Resumen de los parámetros del modelo lineal simple de los otolitos lapillus entre la longitud del pez (LT) versus las variables morfométricas (diámetro, radio, perímetro y área) de *Engraulis ringens*. α= intercepto, β= pendiente, EE= error estándar.

Modelo	Lapillus	N	α	EE	β	EE	R^2	F	P
Diámetro v/s LT	Derecho	20	0,362	0,172	0,020	0,016	0,077	1,5138	<0,001
Radio v/s LT		20	0,198	0,097	0,010	0,009	0,072	1,3996	<0,001
Perímetro v/s LT		20	1,025	0,511	0,063	0,048	0,086	1,7106	<0,001
Área v/s LT		20	-2,61	0,619	0,070	0,058	0,074	1,4491	<0,001
Diámetro v/s LT	Izquierdo	20	0,393	0,172	0,017	0,016	0,060	1,1634	<0,001
Radio v/s LT		20	0,203	0,098	0,010	0,009	0,071	1,3825	<0,001
Perímetro v/s LT		20	0,727	0,564	0,094	0,053	0,148	3,1313	<0,001
Área v/s LT		100	-2,508	0,582	0,061	0,055	0,064	1,2380	<0,001

Lapillus derecho

Lapillus izquierdo



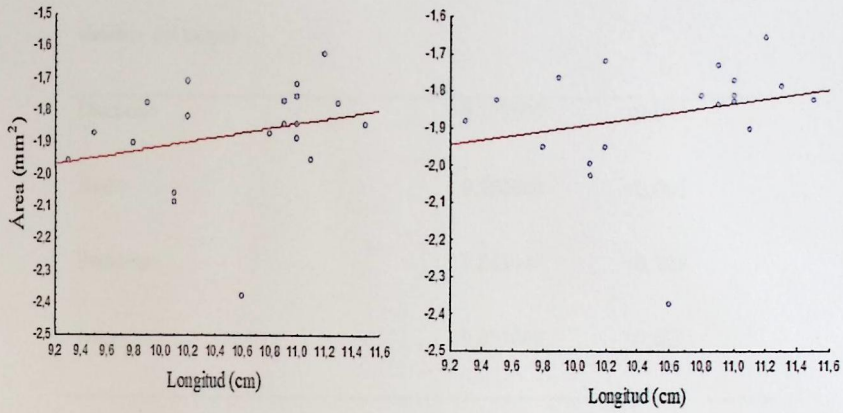


Figura 20. Relaciones morfométricas entre la longitud total (cm) versus los descriptores básicos (diámetro, radio, perímetro y área) de los otolitos lapillus derecho e izquierdo de *Engraulis ringens*.

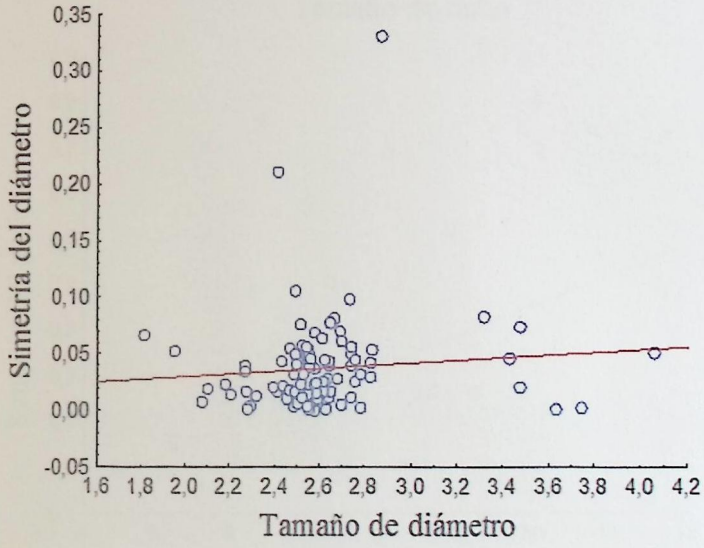
5.3. Simetría de los otolitos

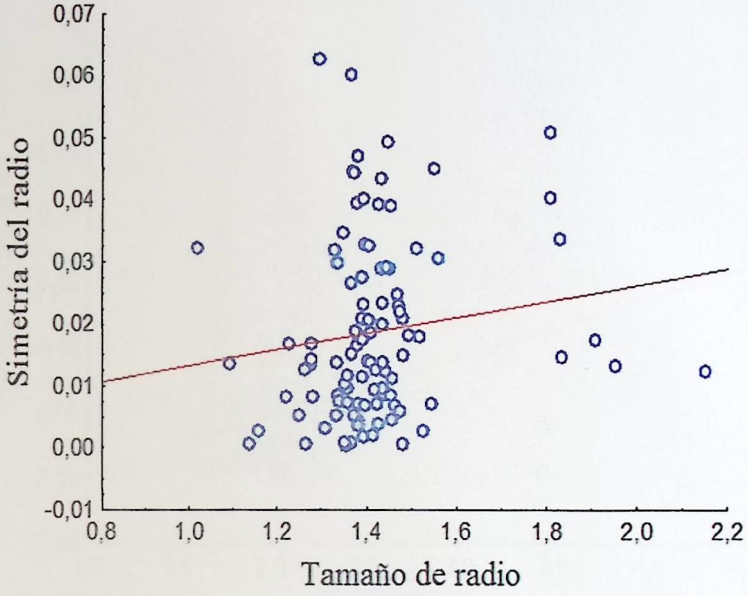
5.3.1. Sagittas

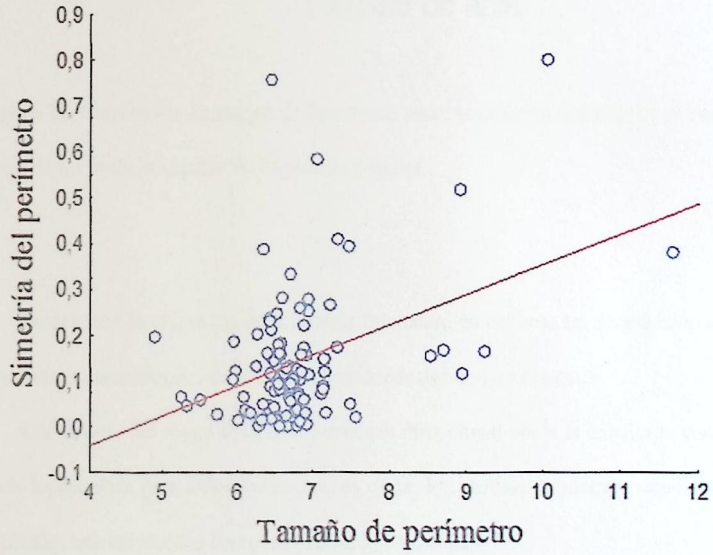
En relación al rasgo simétrico y el tamaño del rasgo se mostró que en cada una de las variables morfométricas existe una correlación positiva, por lo tanto las variables son directamente proporcionales (Tabla 4, Figura 21).

Tabla 4. Correlación de Spearman ente la asimetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos sagittas de la anchoveta *Engraulis ringens*.

Correlación (tamaño del rasgo v/s simetría del rasgo)	Spearman	P
Diámetro	0,177690	<0,005
Radio	0,202088	<0,005
Perímetro	0,243444	<0,005
Área	0,053069	<0,005




Simetría del radio
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
-0,01
0,8
1,0
1,2
1,4
1,6
1,8
2,0
2,2
Tamaño de radio


Simetría del perímetro
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Tamaño de perímetro

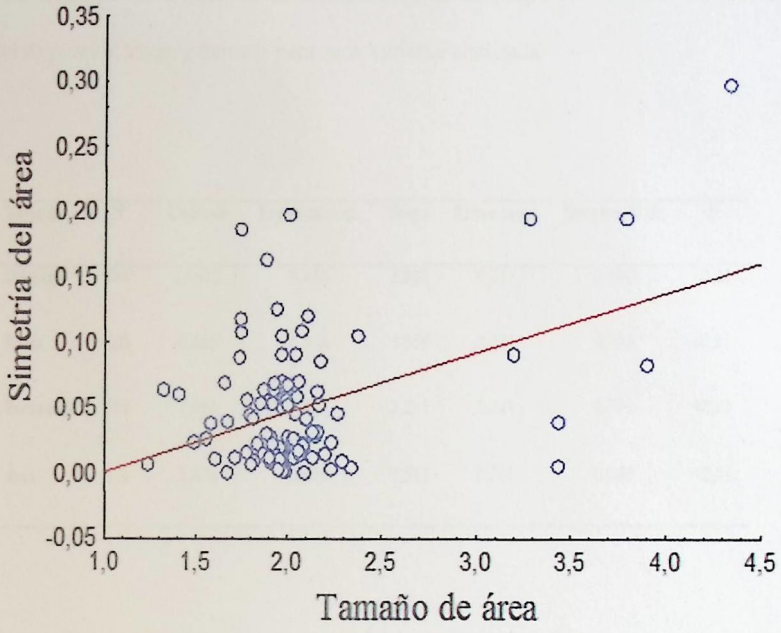


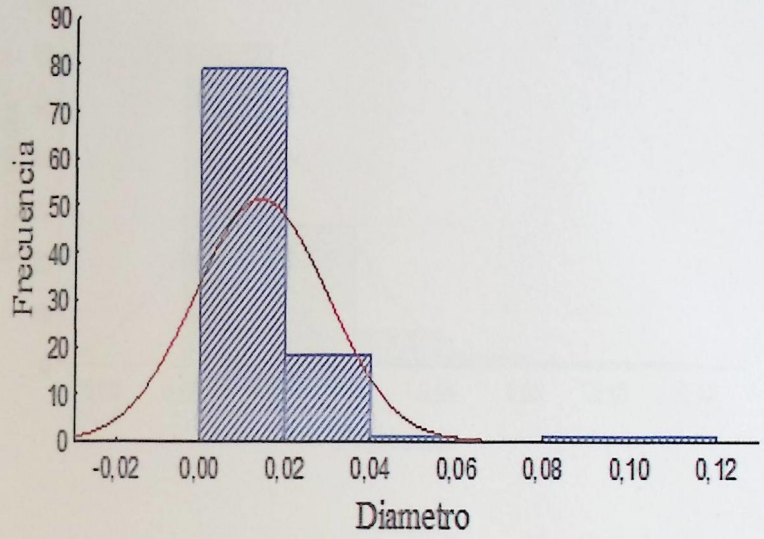
Figura 21. Correlación de rangos de Spearman entre la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos sagittas de *Engraulis ringens*.

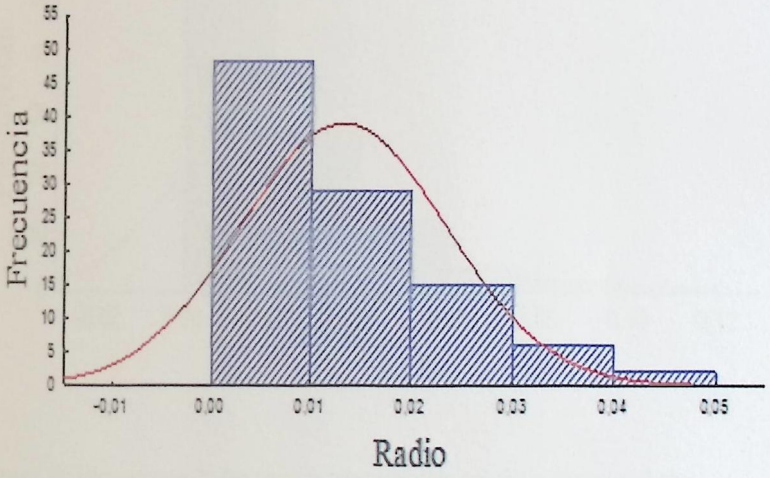
Se descartó la existencia de asimetría fluctuante en otolitos sagittas debido a que los valores no presentaron normalidad ni homocedastididad en los datos.

Los valores del sesgo indicaron asimetría direccional hacia la izquierda con una curtosis leptocurtica para todos los rasgos, es decir, los otolitos izquierdos tienden a ser más grandes que los otolitos derechos (Tabla 5, Figura 22).

Tabla 5. Datos morfométricos de otolitos sagittas en *Engraulis ringens*. Se muestra valor de p-valor, sesgo y curtosis para cada variable analizada.

Variable	N	Curtosis	Error curtosis	Sesgo	Error sesgo	Shapiro-Wilk	P
Diámetro	100	21,922	0,478	3,988	0,241	0,799	<0,01
Radio	100	0,845	0,478	1,059	0,241	0,799	<0,01
Perímetro	100	7,094	0,478	2,211	0,241	0,799	<0,01
Área	100	2,476	0,478	1,512	0,241	0,799	<0,01


Frecuencia
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-0,02
0,00
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
Diametro


Frecuencia
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-0.01
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
Radio

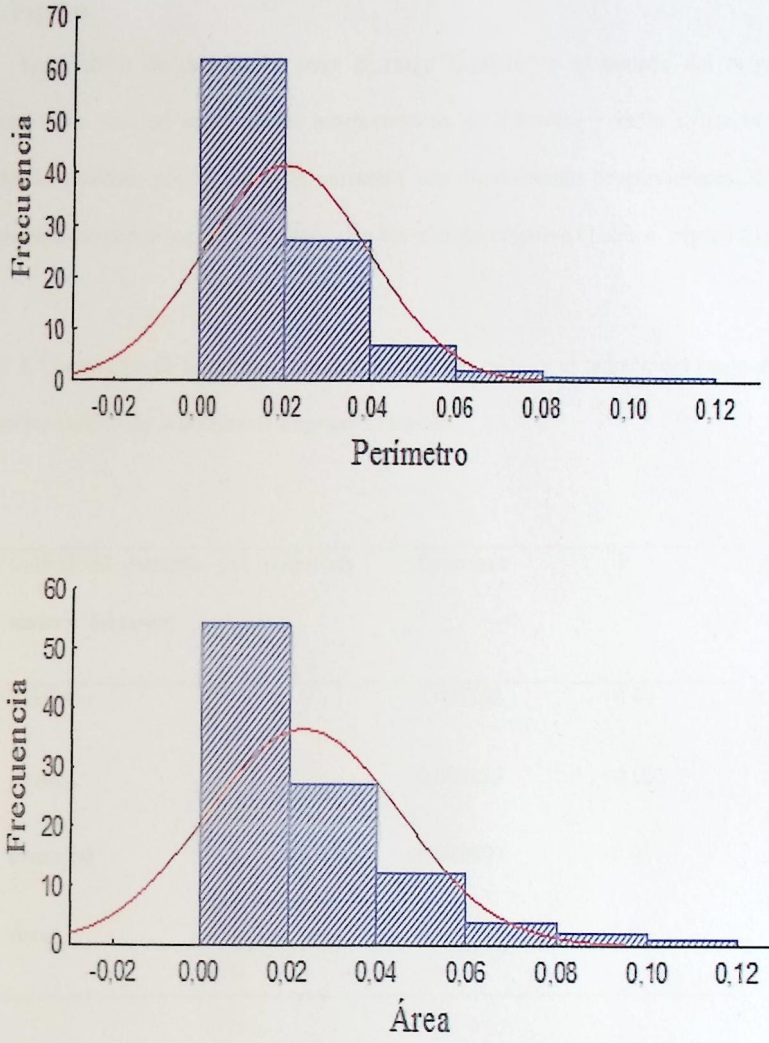


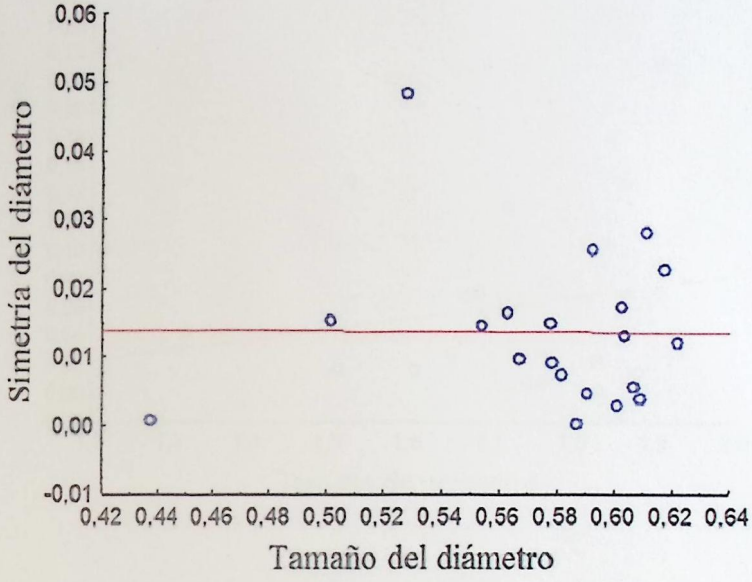
Figura 22. Histogramas de frecuencias representando asimetría direccional con curtosis leptocurtica en otolitos sagittas de la *Engraulis ringens*.

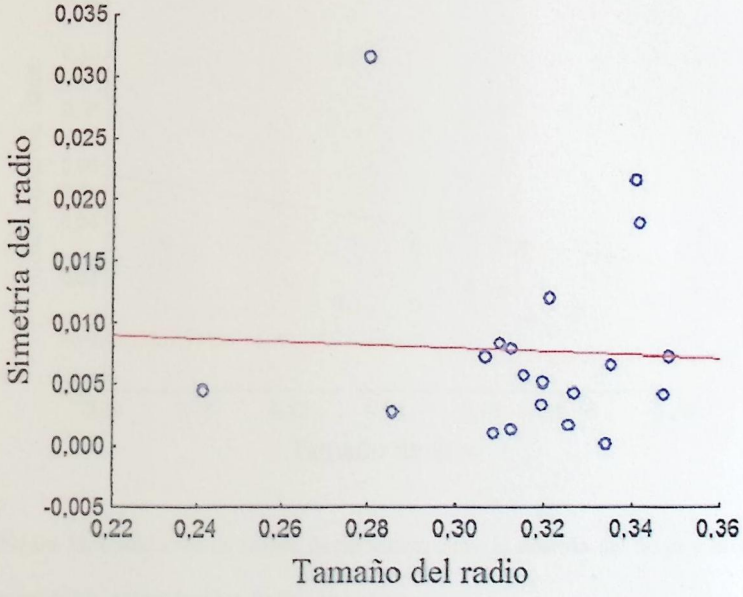
5.3.2. Lapillus

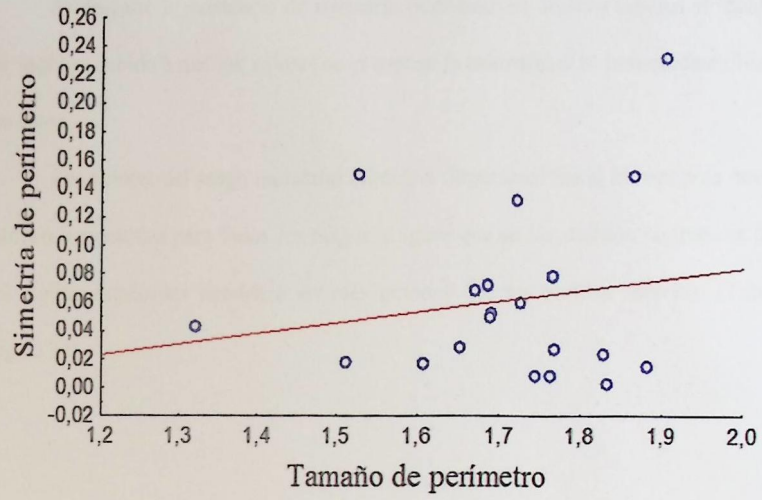
Los análisis de correlación entre el rasgo simétrico y el tamaño del rasgo mostraron que solo en las variables morfométricas de diámetro y radio existe una correlación positiva, por lo tanto las variables son directamente proporcionales. En cambio en el perímetro y en el área existe una correlación negativa (Tabla 6, Figura 23).

Tabla 3. Correlación de Spearman ente la asimetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos lapillus de la anchoveta *Engraulis ringens*.

Correlación (tamaño del rasgo v/s simetría del rasgo)	Spearman	P
Diámetro	0,027068	<0,05
Radio	0,093233	<0,05
Perímetro	-0,040602	<0,05
Área	-0,434586	<0,05


0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
-0,01
Simetría del diámetro
0,42 0,44 0,46 0,48 0,50 0,52 0,54 0,56 0,58 0,60 0,62 0,64
Tamaño del diámetro


0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
-0,005
Simetría del radio
0,22 0,24 0,26 0,28 0,30 0,32 0,34 0,36
Tamaño del radio



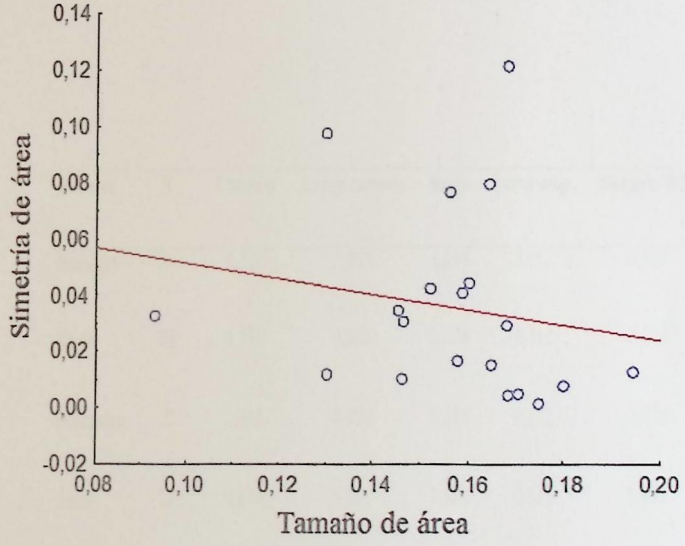


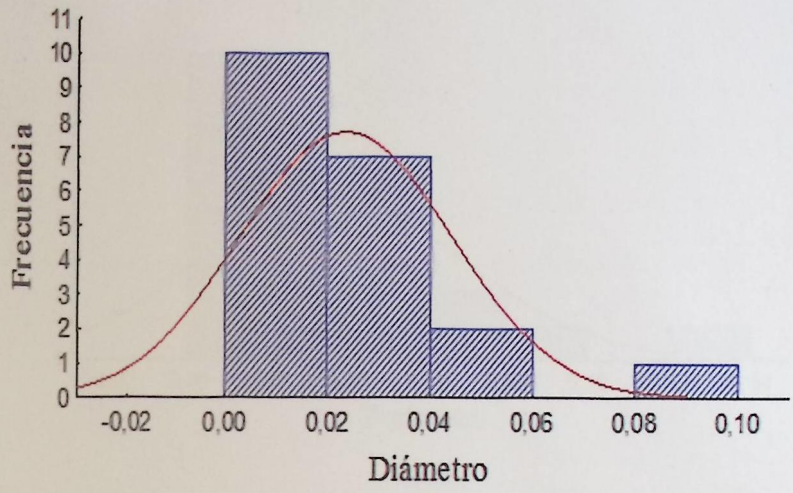
Figura 23. Correlación de rangos de Spearman entre la simetría del rasgo y el tamaño del rasgo de los otolitos lapillus de *Engraulis ringens*.

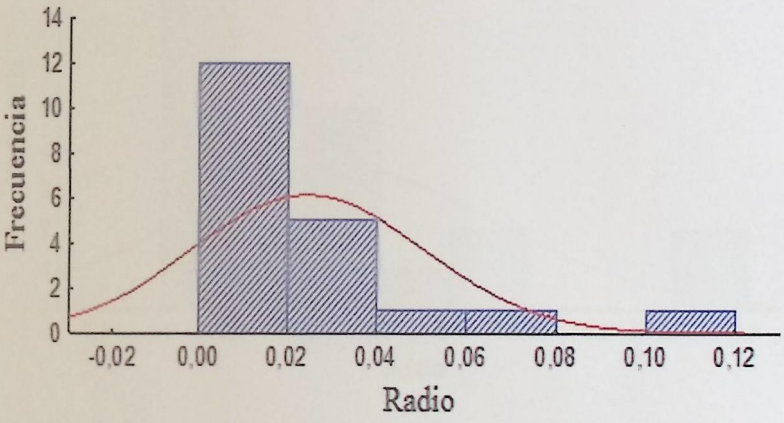
Se descartó la existencia de asimetría fluctuante en otolitos lapillus al igual que en sagittas, debido a que los valores no presentaron normalidad ni homocedastididad en los datos.

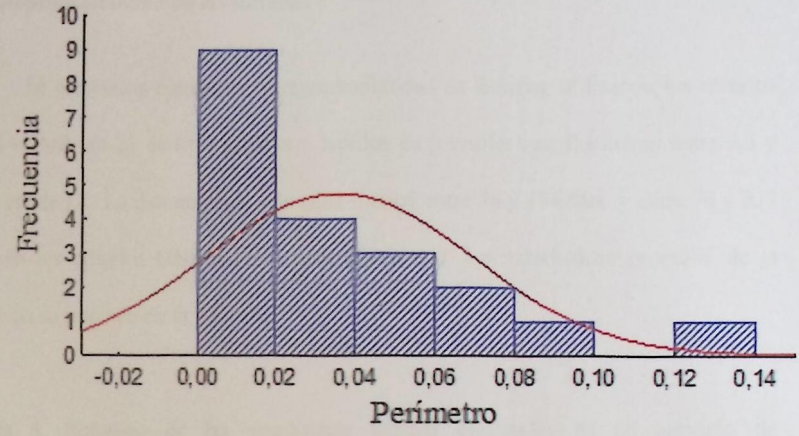
Los valores del sesgo indicaron asimetría direccional hacia la izquierda con una curtosis leptocurtica para todos los rasgos al igual que en los otolitos sagittas, es decir, los otolitos izquierdos tienden a ser más grandes que los otolitos derechos (Tabla 7, Figura 24).

Tabla 4. Datos morfométricos de otolitos lapillus en *Engraulis ringens*. Se muestra valor de p-valor, sesgo y curtosis para cada variable analizada.

Variable	N	Curtosis	Error curtosis	Sesgo	Error sesgo	Shapiro-Wilk	P
Diámetro	20	5,202	0,992	1,883	0,512	0,932	<0,01
Radio	20	6,370	0,992	2,338	0,512	0,884	<0,01
Perimetro	20	1,043	0,992	1,296	0,512	0,926	<0,01
Área	20	0,694	0,992	1,190	0,512	0,972	<0,01


Frecuencia
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-0,02
0,00
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
Diámetro


Frecuencia
14
12
10
8
6
4
2
0
-0,02
0,00
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
Radio



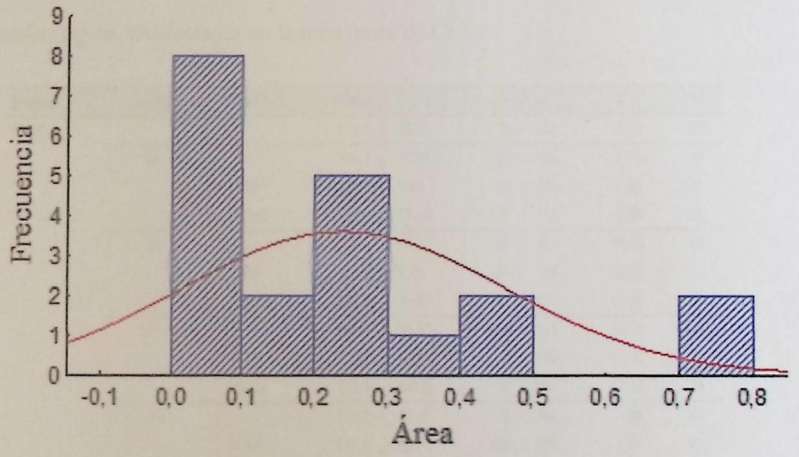


Figura 24. Histogramas de frecuencias representando asimetría direccional con curtosis leptocurtica en otolitos lapillus de la *Engraulis ringens*.

5.4. Reproducibilidad de las lecturas

Se efectuaron ejercicios de reproducibilidad de lecturas, utilizando los criterios GBR e IMR, en 21 otolitos sagittas y lapillus de juveniles que fluctuaron entre 9,5 y 11,8 cm de LT. La determinación de edad fluctuó entre 76 y 154 días y entre 76 y 337 días en los criterios GBR e IMR, respectivamente. Las estadísticas generales de la datación se resumen en la Tabla 8.

Tabla 5. Resumen de las estadísticas básicas efectuadas en un ejercicio de reproducibilidad de lecturas de otolitos sagittas y lapillus de juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens*, recolectados en la zona norte de Chile.

Método	Lector	Otolito	Media ± DE	Rango	CV	N
GBR			118,8 ± 16,05	76 - 154	13,51	168
	LE		124,1 ± 10,81	93 - 150	8,71	42
		LAP	121,1 ± 9,44	93 - 133	7,80	21
		SAG	127,2 ± 11,44	107 - 150	9,00	21
	LM		121,9 ± 13,77	101 - 151	11,30	42
		LAP	114,8 ± 7,89	102 - 129	6,87	21
		SAG	129,0 ± 14,86	101 - 151	11,52	21
	LP1		108,4 ± 20,13	76 - 151	18,57	42
		LAP	93,7 ± 12,48	76 - 120	13,32	21
		SAG	123,1 ± 14,90	98 - 151	12,10	21
	LP2		120,8 ± 13,57	100 - 154	11,24	42
		LAP	112,0 ± 8,67	100 - 134	7,74	21
		SAG	129,6 ± 11,85	112 - 154	9,14	21
IMR			152,8 ± 35,09	109 - 337	22,97	168
	LE		140,7 ± 15,12	112 - 174	10,75	42
		LAP	131,7 ± 8,08	112 - 146	6,14	21
		SAG	149,8 ± 15,22	112 - 174	10,16	21
	LM		138,5 ± 17,42	112 - 198	12,58	42
		LAP	131,7 ± 8,08	112 - 146	6,14	21
		SAG	145,3 ± 21,43	118 - 198	14,75	21
	LP1		188,3 ± 49,16	121 - 337	26,11	42
		LAP	154,7 ± 15,96	121 - 185	10,32	21
		SAG	221,9 ± 48,31	140 - 337	21,77	21
	LP2		143,5 ± 18,14	109 - 181	12,64	42
		LAP	133,6 ± 11,95	109 - 155	8,94	21
		SAG	153,4 ± 18,06	115 - 181	11,77	21
Total general			135,8 ± 32,11	76 - 337	23,65	336

El ANOVA multifactorial demostró que tanto los efectos principales de cada factor como sus interacciones fueron significativas (Tabla 9a), no obstante se observó que los registros de uno de los lectores principiantes (LP1) en el método IMR en sagitta se escapó notoriamente del patrón general, lo que pudo afectar un diseño multifactorial balanceado. Al reducir la data sólo a tres lectores se observaron diferencias significativas sólo en el método (GBR vs IMR) y entre el tipo de otolito (Sagita vs Lapillus), donde la edad en otolitos sagittas fueron significativamente mayores en un promedio de 13 días que en lapillus cuando se utilizó el criterio GBR y entre 17 días cuando se utilizó el criterio IMR, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en todos lectores en ambos métodos (Tabla 9b; Figura 25; Interacción triple), sobre todo cuando la experticia aumentó. Es importante destacar que las diferencias entre el criterio GBR vs IMR tendieron a disminuir en un promedio de 5 días cuando se utilizó lapillus en vez de sagitta.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANDEVA) multifactorial para evaluar la hipótesis de diferencias significativas en las lecturas promedios en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens*, recolectadas en el norte de Chile. (a) ANDEVA incluyendo los cuatro lectores: (b) excluyendo uno de los lectores principiantes (LP1). SCE: suma de cuadrados del error, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios; F: estadístico; F-Fisher; P: probabilidad de cometer error Tipo I.

Source (a)	SCE	GL	CM	F	P
Método	96.764,30	1	21.858,77	311,20	<0,001
Tipo de Otolito	45.360,76	1	13.980,67	145,88	<0,001
Lector	17.934,20	3	125,194	19,23	<0,001
Método X Tipo de Otolito	3.471,43	1	326,861	11,16	<0,001
Método X Lector	59.627,16	3	266,194	63,92	<0,001
Tipo de Otolito X Lector	18.021,07	3	243,861	19,32	<0,001
Método x Tipo de Otolito x Lector	4.798,88	3	228,575	5,15	<0,001
Error	99.499,91	320	167,412		

Source (b)	SCE	GL	CM	F	P
Método	21.858,77	1	21.858,77	130,57	<0,001
Tipo de Otolito	13.980,67	1	13.980,67	83,51	<0,001
Lector	250,389	2	125,194	0,75	0,474
Método X Tipo de Otolito	326,861	1	326,861	1,95	0,164
Método X Lector	532,389	2	266,194	1,59	0,206
Tipo de Otolito X Lector	487,722	2	243,861	1,46	0,235
Método x Tipo de Otolito x Lector	457,151	2	228,575	1,37	0,257
Error	40.178,95	240	167,412		

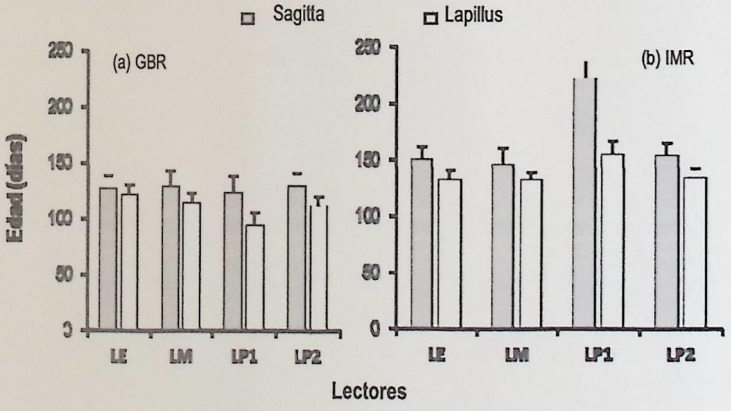


Figura 25. Ilustración de los cambios en la lectura media de edad en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens* recolectadas en el norte de Chile. Las lecturas fueron efectuadas por cuatro lectores con diferente grado de experticia.

5.5. Índice de porcentaje de error promedio

La reproducibilidad de las lecturas en 21 otolitos sagittas para la estimación de la edad mostró un índice de variación promedio (APE) de 4,8 %, con un coeficiente de variación (CV) de 6,4% dentro de un rango de edades de 98 y 160 días (conteo GBR) y un APE de de 15,0 % con un CV de 20,6% dentro un rango de edades de entre 112 y 337 días (conteo con IMR) (Figura 26).

Para el caso de la lectura de micro-incrementos en 21 otolitos lapillus entre los mismos cuatro lectores se presentó un APE de 6,2 % con un CV de 11,8% dentro de un rango de edades 71 y 148 días (conteo GBR) y un APE de de 8,5 % con un CV de 11,6% dentro de un rango de edades de 84 y 185 días (conteo IMR). (Figura 26). Para ambos otolitos (sagitta y lapillus) el método GBR arroja un menor porcentaje de error en cuanto a la estimación de la edad.

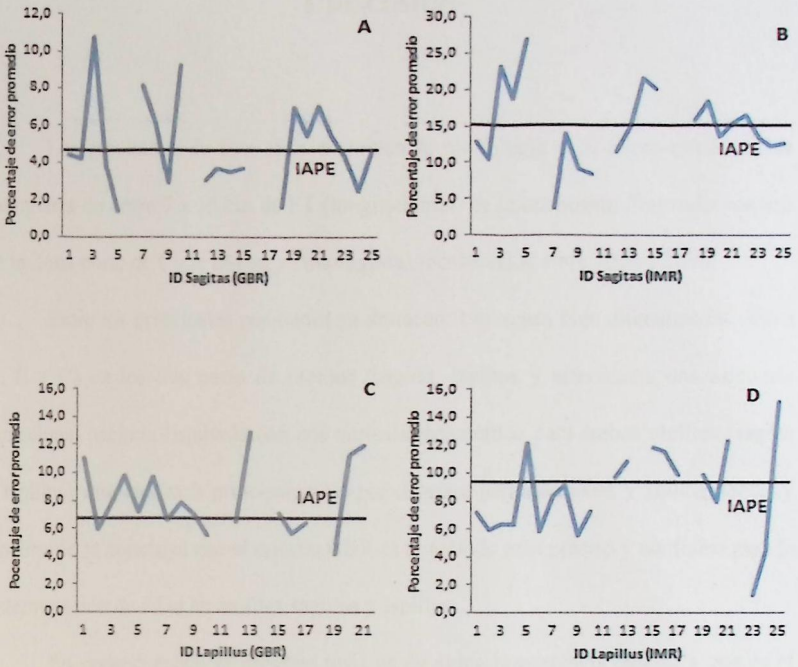


Figura 26. Ilustración del Porcentaje de Error en otolitos sagittas y lapillus en juveniles de la anchoveta *Engraulis ringens* para el criterio GBR (A-C) e IMR (B-D): IAPE: Índice del Porcentaje de Error promedio.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis describen la morfología y la micro-estructura de ejemplares de entre 7 a 15 cm de LT (longitud total) de la anchoveta *Engraulis ringens* de la Zona norte de Chile (Arica y Antofagasta) recolectados entre 2015 y 2016.

Entre los principales resultados se destacan: tres zonas bien diferenciadas (Zona A, B y C) en los tres pares de otolitos (sagitta, lapillus y asteriscus), una asimetría direccional hacia la izquierda con una curtosis leptocurtica para ambos otolitos (sagitta y lapillus), caracterizada principalmente por diversas perturbaciones y anillos dobles y finalmente se concluye que el criterio GBR es el método más preciso y confiable para la determinación de edad en otolitos sagittas y lapillus.

En consecuencia, la presente tesis es de suma importancia debido a que es el único trabajo realizado en Chile en base a otolitos lapillus en peces teleósteos, reportando de esta manera, la primera caracterización de este recurso pesquero del país.

6.1. Micro-estructura y rasgos micro-estructurales

La caracterización de los tres pares de otolitos de *Engraulis ringens* presentó los siguientes rasgos distintivos: (i) elevada resolución de la micro-estructura en sagitta y lapillus, (ii) presencia de micro-incrementos primarios desde el primordio hasta el borde del otolito, (iii) disminución de la resolución de los micro-incrementos en zonas con perturbaciones y anillos dobles y (iv) un claro y definido anillo diario o marca de eclosión.

Los resultados obtenidos en la presente tesis son similares a los descritos por diversos autores en estudios de morfología de los otolitos sagittas de juveniles y adultos de anchoveta (*Engraulis ringens*) (Cerna *et al.* 2011, Plaza *et al.* 2012, Gómez 2013), ya sea en la parte externa del otolito (morfología) como en la parte interna del mismo (anillos de crecimiento).

En el otolito sagitta se encontraron micro-incrementos visualizados como anillos concéntricos alrededor del núcleo avanzando hacia la periferia, lo cual concuerda con lo registrado por Morales –Nin (1992) para peces óseos. Asimismo, se distinguió la marca de eclosión que coincidió con la formación del primer incremento y la marca de primera alimentación que en algunos casos se presentó como primer anillo diario. Iguales características concuerdan con las identificadas por el estudio de Geffen (1982) en las larvas de arenque (*Clupea harengus*) y rodaballo (*Psetta maxima*) producidas en cautiverio desde la eclosión hasta la metamorfosis.

Semejantes características expuestas anteriormente, se apreciaron en otolitos asteriscus y lapillus.

Por otro lado, debido a la dificultad que presentaron los anillos, no fue posible describir y observar los microincrementos de los otolitos (sagitta y lapillus) a lo largo de todo el eje de crecimiento. Misma situación fue descrita por Morales-Nin (1989) en donde los otolitos sagittas de peces marinos tropicales presentaron un recurrente patrón de anillos de crecimiento de manera difusa y por Plaza & Cerna (2013) en donde la resolución de los micro-incrementos de los sobrevivientes de la anchoveta *Engraulis ringens* no siguió un patrón claro, sino más bien una estructura compleja, con abundantes perturbaciones, dificultando así el proceso de lectura y de interpretación. No obstante, la dificultad descrita anteriormente, difiere a lo descrito por Plaza *et al.* (2012) para *E. ringens* en donde la resolución de los otolitos sagittas fue elevada, por lo que el

patrón de depósito distintivo de los micro-incrementos fue evidente en años con condiciones ambiéntales diferentes.

Con respecto a la micro-estructura de los otolitos sagittas, lapillus y asteriscus analizados en el presente estudio, se observó que en general presentaron una resolución muy baja, dificultando así la lectura de sus anillos. Dicha situación fue descrita previamente por Plaza & Cerna (2013), en donde la resolución de los micro-incrementos primarios en los otolitos sagittas de ejemplares de *Engraulis ringens* de tallas de 7 a 12 cm (juveniles), presentaron una evidente disminución de la resolución. De acuerdo a Plaza & Cerna (2013), esta disminución se debería a que el patrón de depósito complejo que es observado en los juveniles sobrevivientes pareciera estar más asociado a una condición ambiental que a la ontogenia de la especie.

En cuanto a la micro-estructura de los otolitos (sagittas, lapillus y asteriscus) se distinguieron claramente tres zonas bien diferenciadas, denominadas A, B y C. La primera zona (A), para los otolitos sagittas y lapillus, se extendió desde la primera marca de eclosión hasta los primeros 28 días (aproximadamente). Aquí los otolitos presentaron un núcleo central rodeado por micro-incrementos finos al igual que la anchoveta europea *Engraulis encrasicolus* (Cermeño *et al.* 2008). Además el núcleo aparece como una zona circular homogénea rodeado por una discontinuidad débil seguido de incrementos de crecimiento más gruesos (Cermeño *et al.* 2008).

La segunda zona (B), se extendió desde los 28 a los 60 días (aproximadamente) en donde los micro-incrementos primarios son más difíciles de apreciar debido a la presencia de anillos dobles, sub-diarios y perturbaciones que hacen compleja la lectura. Lo anterior, coindice con lo expuesto por Cermeño *et al.* (2008) para *Engraulis*

encrasicolus, en donde encontró una mayor amplitud en los micro-incrementos, haciendo difícil distinguir un patrón de incrementos de crecimiento rítmicos. De acuerdo a lo descrito por este autor, las zonas de dobles incrementos hacen complicada la interpretación, dando lugar a una posible sub-estimación de la edad, además pueden corresponder a altas tasas de crecimiento durante el proceso de metamorfosis (transición de larva a juvenil) que por ende trae un mayor crecimiento y por consiguiente una mayor existencia de micro-incrementos sub-diarios (Plaza *et al.* 2012). La existencia de anillos dobles también fue reportada recientemente para la anchoveta en la zona norte de Chile, tanto para ejemplares silvestres (Cerna *et al.* 2011) como en condiciones experimentales (Plaza & Cerna 2014). Igualmente, fue descrita en otolitos sagittas de la anchoveta *Engraulis encrasicolus* (Cermeño *et al.* 2008).

La existencia de estos anillos dobles correspondería a anillos diarios que debiesen ser considerados para obtener cuantificaciones confiables de edad diaria. Esto es sumamente importante a nivel larval o durante el periodo de transición de larva a juvenil en donde se puede llegar a sub-estimar la edad en un promedio de 11 días (Plaza *et al.* 2012).

En cuanto a la formación de los anillos sub-diarios identificados en el presente estudio, Panella (1971) describe que son causados por periodicidades variables ya sea por la ingesta de alimento, por variaciones en el medio o a causa del estrés. Por lo demás, los primeros casos de anillos sub-diarios reportados en especies de engraulidos se observaron en larvas de *Engraulis japonicus* y en la pre-metamorfosis de *Engraulis encrasicolus* (Cermeño *et al.* 2008).

Finalmente, la tercera zona (C), se extiende desde los 60 días (aproximadamente) en donde los micro-incrementos son muy regulares y distintivos, presentando una disminución en el grosor, haciendo así más compleja su identificación

y lectura. Esta disminución pudo haber ocurrido por el desgaste en el proceso de pulido (tendiendo a sobre-pulir las muestras), aunque algunos autores han reportado que factores como el nivel de alimentación, periodicidad de la alimentación y la temperatura también pueden influir en este proceso (Geffen 1982).

En base a lo expuesto anteriormente, se apoya la hipótesis planteada inicialmente debido a que es posible identificar microincrementos dobles en los 3 pares de otolitos (sagittas, lapillus y asteriscus), es decir, que estas estructuras no son meramente un resultado asociado a la preparación de los otolitos. Similarmente, la existencia de tres zonas micro-estructurales, independiente del tipo de otolito es una evidencia sustantiva de la capacidad que tienen estas estructuras de registrar, tanto los eventos ontogenéticos asociados al crecimiento somático, como otras perturbaciones presumiblemente gatilladas por factores fisiológicos y/o ambientales.

6.2. Simetría de los otolitos

La inestabilidad del desarrollo puede definirse como la incapacidad de un organismo para ajustar su desarrollo a un patrón ideal, viéndose afectada por el estrés, el cual está relacionado con las condiciones ambientales o genéticas. (Fey & Hare 2008, Palmer *et al.* 2010). Sin embargo aún no se ha descrito cuál de las asimetrías (fluctuante o direccional) refleja la inestabilidad del desarrollo (Briones & Guiñez 2008).

Las mediciones de la asimetría fluctuante (AF) se han convertido en una técnica de referencia para examinar de forma rápida el estrés (Allenbach 2011), sin embargo todavía existe mucha controversia sobre los rasgos apropiados para dicha medición (Kenney & von Hippel 2014). Es considerada como la medida más ampliamente usada para la inestabilidad del desarrollo, tornándose importante en los estadios tempranos, debido a que se ha demostrado que la existencia de asimetría se ha visto vinculada a una

condición fisiológica (Lemberget & McCormick 2009). En cambio la asimetría direccional (AD) ha recibido considerablemente menor atención por ende ha sido menos estudiada que la asimetría fluctuante (Palmer *et al.* 2010).

Los resultados de este estudio no presentaron asimetría fluctuante sino más bien asimetría bilateral hacia la izquierda con una curtosis leptocurtica para ambos otolitos (sagitta y lapillus). Misma situación fue reportada por Briones & Guiñez (2008) en moluscos bivalvos, en donde los individuos pueden presentar una valva con la que se adhieren al sustrato más pequeña o de mayor tamaño, generándose una asimetría direccional visible. Asimismo, en *Perumytilus purpuratus* (Chorito maico) se ha encontrado evidencia de asimetría direccional de forma más sutil en donde se aprecia que la valva derecha es consistentemente más elongada que la izquierda (Briones & Guiñez 2008). Además, Somarakis *et al.* (1997) expone que los otolitos de peces planos son un ejemplo extremo de asimetría direccional (dependiendo de la familia, los otolitos de un lado en particular son siempre más grandes que los otolitos del otro lado). Igualmente se ha demostrado la asimetría direccional en los diversos esqueletos del zorro plateado y en un diverso número de taxones (Kharlamova *et al.* 2010).

Los resultados de Kenney & von Hippel (2014) también apoyan lo obtenido en esta tesis, ya que indican que el espinoso de tres espinas (*Gasterosteus aculeatus*) para la mayoría de los rasgos demostró AD significativa, por lo tanto esto sugiere que la AF en este caso, no es buen indicador de la contaminación acústica, ya que no se logró encontrar una relación entre AF en *Gasterosteus aculeatus* y los factores estresantes del desarrollo. La explicación de la existencia de la asimetría direccional puede deberse a una base genética significativa y no ambiental (Somarakis *et al.* 1997, Palmer & Strobeck 1986, Palmer 2004) por lo que no es considerada una eficiente medida de la

inestabilidad del desarrollo (Palmer *et al.* 2010), pero si para la estimación de los procesos adaptativos (Briones & Guiñez 2008)

La AD puede ser indicadora de procesos de cambio ontogénico evolutivo de la AF, pero de cuyas causas se conoce muy poco (Palmer 2004, Lemberget & McCormick 2009). Entre las pocas causas conocidas se han sugerido mecanismos genéticos, que ocurren cuando se rompen o se desacoplan los sistemas co-adaptativos de genes que regulan la canalización de los rasgos bilaterales (Palmer & Strobeck 1986, Briones & Guiñez 2008).

Con respecto a lo expuesto anteriormente se apoya la hipótesis planteada inicialmente, ya que no fue posible encontrar AF en condiciones ambientales uniformes (óptimas) en los tres pares de otolitos de juveniles de *Engraulis ringens*.

No obstante, no se puede inferir que la asimetría direccional registrada para la anchoveta *Engraulis ringens* realmente tenga un componente genético. Para esto se deben considerar varios caracteres y no sólo uno, por ende esto sugiere que se deben realizar más estudios para identificar qué caracteres podrían ser más útiles y a su vez incorporar nuevos métodos y herramientas de estudio. De esta manera se puede probar si la asimetría direccional se mantiene durante la ontogenia (Servia *et al.* 2002). Por lo tanto, se recomienda que en futuros estudios de asimetría bilateral y de inestabilidad del desarrollo, se trabaje simultáneamente con las tres formas de asimetría, o al menos con las dos más comunes (asimetría fluctuante y asimetría direccional) de tal modo de generar un mayor conocimiento sobre las interconexiones entre ambas asimetrías (Briones & Guiñez 2008).

Es importante destacar que se han propuesto varios índices, con sus respectivas justificaciones, para evaluar la asimetría fluctuante, los cuales fueron revisados por Palmer (2004). En el presente estudio se utilizó el índice FA2, recomendado cuando

existe evidencia de que el rasgo medido cambia con la longitud del individuo, que es el caso característico del otolito que crece proporcionalmente con el tamaño del pez (Panfili *et al.* 2001), y recientemente usado también en una especie litoral central (Castillo 2016). No obstante, es muy recomendable que un estudio futuro se realice un análisis comparativo de la asimetría fluctuante, utilizando varios índices, a fin de verificar la consistencia en las conclusiones alcanzadas.

6.3 Edad

Ambos criterios de lectura de micro-incrementos en *E. ringens* han sido utilizados con controversia, ya que existe una ausencia de validación en esta especie, debido a dificultades en la determinación de métodos provenientes de la zona B, donde la presencia de incrementos múltiples con la aparición de bandas dobles o bandas de crecimiento rítmico hacen difícil la interpretación. Por lo tanto, en este escenario, es importante proveer de información necesaria para resolver esta controversia.

Los resultados del presente estudio, demostraron que la reproducibilidad en otolitos sagittas y lapillus medida a través del IAPE fue menor cuando se utilizó el criterio GBR (sagita: 4,8 %; lapillus: 6,2 %) en comparación al IMR (sagita: 15,0 %; lapillus: 8,5 %). Misma situación fue reportada por Plaza (2012) en el otolito sagitta para la anchoveta *Engraulis ringens*, indicando que el método GBR es el más confiable para la determinación de la edad.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Cermeño *et al.* (2008) y de Plaza & Cerna (2017), quienes demuestran que el mejor criterio para la determinación de la edad en esta especie corresponde al GBR, debido a que es el que recoge de mejor forma el proceso de formación diaria de micro-incrementos en otolitos y presenta

resultados consistentes, siendo un criterio más sólido y confiable para la determinación de edad.

De igual forma, es semejante a lo descrito por Arneri *et al.* (2011), quien concluyó que el método GBR fue el procedimiento más fiable en la determinación de la edad para los juveniles de *E. encrasicolus.*

Diversos autores (Plaza & Cerna 2017, Cermeño *et al.* 2008, Arneri *et al.* 2011) describen que el criterio GBR es el método más preciso y robusto, ya que permite interpretar el patrón rítmico de las bandas alternas de crecimiento como micro-incrementos sub-diarios generados en las fases posteriores de las larvas y durante la metamorfosis, además de producir altas tasas de crecimiento compatibles con incrementos de crecimiento de larvas y con otros estudios para el mismo género a temperaturas similares. En definitiva es el criterio más recomendado por la literatura para la mayoría de las especies de peces. No obstante, la manera de contar los micro-incrementos diarios aún está en controversia debido a la ausencia de un método estandarizado para la validación (Campana & Jones 1992).

Por otra parte, al comparar el criterio IMR con el GBR, resultó que el primero de estos arrojó diferencia significativa, la cual se asocia a la mayor cantidad de anillos contados en relación al criterio GBR. De acuerdo a Cermeño *et al.* (2008) una mayor cuantificación de los anillos estaría relacionada al proceso de metamorfosis, ya que es en dicho periodo donde se expresa la máxima presencia de bandas rítmicas dobles de crecimiento, causando así una discrepancia entre los dos métodos, y en consecuencia una sub-estimación de la edad.

Si bien, la anchoveta comienza a depositar micro-incrementos diarios al tercer día después de la eclosión, éstos debiesen ser muy delgados y prácticamente indetectables una vez que el otolito crece en el material calcáreo en la etapa juvenil

(Plaza & Cerna 2017). Aunque diversos autores describen que la deposición de micro-incrementos puede usarse con seguridad para la determinación de la edad, la validación suele ser necesaria para demostrar la interpretación correcta de los incrementos (Begg 2005).

Hoy en día esta disyuntiva es parte de un profundo debate, debido al potencial impacto que puede provocar para el proceso de la evaluación de stock de este recurso (Arneri *et al.* 2011). No obstante, sólo un experimento controlado de anchoveta, que permita la caracterización micro-estructural de sus otolitos de larvas hasta juveniles, podría verificar definitivamente si las interpretaciones de GBR del patrón de crecimiento de otolitos, durante la etapa de metamorfosis, son correctas.

Por otra parte, a pesar de que la mayoría de los autores prefieran utilizar el otolito sagitta para estudios de micro-estructura, usar el otolito lapillus en la determinación de la edad, mediante la utilización de criterio GBR, trae consigo diversas ventajas. Entre ellas se encuentran: (1) el bajo costo (tiempo) que presenta y (2) una menor presencia de zonas micro-estructurales o diversas perturbaciones (anillos dobles), lo que facilita la interpretación.

A pesar de que aún no se han reportado estudios que utilicen el otolito lapillus en la estimación de la edad de la anchoveta *E. ringens*, existen diversos estudios para otras especies en que si lo han utilizado; un caso en particular, fue descrito por Alonso & Fabré (2014) para el pez dorado (*Brachyplatystoma rousseauxii*) de la cuenca Amazónica, donde se realizaron cortes transversales de 0.07mm a los otolitos lapillus, los cuales pasaban por el núcleo de la estructura de manera de facilitar el proceso de lectura de los anillos para su posterior conteo de edad. Igualmente Ojeda (1994) para determinar crecimiento y edad del Robalo *Centropomus undecimalis* de Puerto Rico

utilizó la lectura de otolitos lapillus. En consecuencia, ambos autores demuestran que este otolito es un buen indicador para la estimación de la edad de diversas especies.

Finalmente, la ausencia de resultados de asimetría fluctuante y determinación de edad con el otolito asteriscus, se debe principalmente a su fragilidad ya que al extraerlo de los sacos óticos se desprendían partes de sus bordes y por ende se perdía su forma original dificultando la determinación de los descriptores básicos (área, diámetro, perímetro y área). En cuanto a la edad, al presentar una forma semidiscoide, no facilitaban el conteo ya que los anillos se interconectaban y se perdían en la Zona B.

7. CONCLUSIONES

1. El crecimiento somático de juveniles de *Engraulis ringens*, se reflejó en la micro-estructura de sus otolitos, presentando relaciones significativas entre la longitud corporal de los ejemplares y las medidas de sus otolitos.

2. Los otolitos sagittas, lapillus y asteriscus de *Engraulis ringens* presentaron micro-incrementos distintivos a través de toda su estructura, desde el primordio al borde del otolito.

3. La micro-estructura de los otolitos sagittas, lapillus y asteriscus estuvo caracterizada por la presencia de tres zonas bien definidas, ya sea por la resolución y grosores en los micro-incrementos, así como también por la presencia de anillos dobles o diversas perturbaciones.

4. Actualmente aún existen muchos desacuerdos con respecto a la determinación de la edad tanto de peces pelágicos pequeños (larvales- juveniles) como en adultos.

5. Es recomendable que en estudios futuros se utilice el otolito lapillus, ya que ha quedado demostrado ser una alternativa para la determinación de la edad en la anchoveta, debido a que su pequeño tamaño facilita la preparación técnica y la posterior interpretación de la edad.

9. LITERATURA CITADA

Alados CL, J Escos & JM Emlen. 1993. Development instability as an indicator of environmental stress in the Pacific hake (*Merluccius product*us). Fishery Bulletin 91(4): 587-593.

Aliaga B, D Gómez & S Neira. 2001. Análisis bio-económico de la pesquería de sardine (*Sardinop sargax*) y anchoveta (*Engraulis ringens*) de la zona norte de Chile. Investigaciones Marinas 29(2): 15-23.

Alonso JC & NN Fabré. 2014. Definición del stock pesquero del dorado (*Brachyplatystoma rousseauxii*) en la Cuenca Amazonica a través de su estructura por edades, 11pp. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. Lima, Perú.

Allenbach DM. 2011. Fluctuating asymmetry and exogenous stress in fishes: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21: 355-376.

Araya M & L Cubillos. 2002. El análisis retrospectivo del crecimiento en peces y sus problemas asociados. Gayana 66(2): 161-179.

Arneri E, P Carpi, F Donato & A Santojanni. 2011. Growth in small pelagic fishes and its implications in their population dynamics. Biología Marina Mediterranea 18(1): 106-113.

Beamish RJ & DA Fourier. 1981. A method for comparing the precision of a set of age determinations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 38(8): 982-983.

Begg GA, SE Campana, AJ Fowler & IM Suthers. 2005. Otolith research and application: current directions in innovation and implementation. Marine and Freshwater Research 56: 477-483.

Briones C & R Guiñez. 2008. Una revisión de la asimetría bilateral en bivalvos. Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(1): 1-6.

Brothers EB, CP Mathews & R Lasker. 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. Fishery Bulletin 74(1): 1-8.

Cadrin SX & KD Friedland. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. Fisheries Research 43(1-3): 129-139.

Campana SE & JD Neilson. 1985. Microstructure of fish otoliths. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42: 1014–1032.

Campana SE & CM Jones. 1992. Analysis of Otolith Microstructure Data. In: Stevenson DK & SE Campana (eds). Otolith microstructure examination and analysis, pp.73-100. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa.

Campana SE & JM Casselman. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50(5): 1062-1083.

Casselman JM. 1990. Growth and relative size of calcified structures of fish. Transactions of the American Fisheries Society 119: 673-688.

Cermeño P, A Uriarte, B Morales-Nin, U Cotano & P Alvarez. 2008. Setting up interpretation criteria for ageing juvenile European anchovy otoliths. Scientia Marina 72(4): 733- 742.

Cerna F, C Machuca, A López, R Serra, V Ojeda, G Plaza, G Moyano & D Carreño. 2011. Revisión de la asignación por grupo de edad en la anchoveta de la zona norte, 248 pp. Informe Final Proyecto FIP 2009-17.

Contreras J. 2013. Variabilidad en el crecimiento larval de los pejesapos *Gobiesox marmoratus* y *Sicyases sanguineus* (Gobiesocidae), utilizando microestructura de otolitos, en bahía El Quisco. Tesis de Biología Marina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 99 pp.

Degens ET, WG Deuser & RL Haedrich. 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. Marine Biology 2(2): 105-113.

de Pontual H, J Panfili, PJ Wright & H Troadec. 2001. Introducción. En: Panfili J, H de Pontual, H Troadec & PJ Wright (eds). Manual of fish sclerochonology, pp. 17-27. Ifremer-IRD, Brest.

Díaz J, N Alegría, P Escobar, L Herrera, C Merino, J Oliva & L Bustos. 2013. Evaluación hidroacústica de reclutas de anchoveta (*Engraulis ringens*) en la zona norte de Chile. Informe de crucero, Instituto de Investigaciones Pesqueras del Norte, Universidad Arturo Prat, Facultad de Recursos Naturales Renovables. 34 pp.

Ferrada S, K Hernández, R Montana & R Galleguillos. 2002. Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1842) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de ADN. Gayana 66(2): 243- 248.

Fiuman LA. 2002. Special considerations of fish eggs and larvae. In: L. A. Fuiman & RG. Wener (eds). The unique contributions of early life stages, pp 340. Fishery Science, USA.

Fey DP & JA Hare. 2008. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) – a condition indicator? Journal of Fish Biology 72(1): 121-130.

Gauldie RW. 1988. Microscopic growth increments in the otolith of orange *roughy Hoplostethus atlantieusand* their potential use in studies of growth, recruitment and otolith structure. (Un-published manuscript held at Fisheries Research Centre, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries, Wellington).

Geffen AJ. 1982. Otolith ring deposition in relation to growth rate in herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Marine Biology 71(3): 317-326.

Gómez M. 2013. Caracterización de los patrones de edad y crecimiento de la zona norte de chile asociados a eventos El Niño y La Niña". Tesis de Ingeniería Pesquera, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 63 pp.

Gronkjaer P & MK Sand. 2003. Fluctuating asymmetry and nutritional condition of Baltic cod (*Gadus morhua*) larvae. Marine Biology 143(1):191-197.

Instituto del Mar del Perú. 2008. Anchoveta. [en línea] < http://www.imarpe.pe/imarpe/index.php?id_detalle=0000000000000000302>.

Kenney LA & FA von Hippel. 2014. Morphological asymmetry of insular freshwater populations of threespine stickleback. Environmental Biology of Fishes 97: 225-232.

Kharlamova AV, LN Trut, K Chase, AV Kukekova & KG Lark. 2010. Directional asymmetry in the limbs, skull and pelvis of the Silver fox (*V. vulpes*). Journal of Morphology 271(12):1501-1508.

Lemberget T & MI McCormick. 2009. Replenishment success linked to fluctuating asymmetry in larval fish. Oecologia 159(1): 83-93.

Leta HR & A Keim. 1982. Lectura de edades en otolitos de peces teleósteos. 36 pp. FAO Instituto Nacional de Pesca, Uruguay.

Luque A & T Ramírez. 1996. Otolitos: una introducción a su potencial uso para el estudio de la biología de los peces. [http://www.encuentros.uma.es/encuentros32/otolit.html] Revisado: 5 de agosto del 2014.

Mann S, SB Parker, MD Ross, AJ Skarnulis & RJP Williams. 1983. The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ears. Ann ultra-high resolution electron microscopy study. Proceeding of the Research Society of London 218: 415-424.

Martínez JA, MM Chávez, JL Tello & AA Morales. 2007. Utilización de otolitos como herramienta en la determinación de especies. Revista de Zoología 18: 13-18.

Medina M, L Herrera, J Castillo, J Jaque & N Pizarro. 2015. Alimentación de la anchoveta (*Engraulis ringens*) en el norte de Chile (18°25'-25°40'S) en diciembre de 2010. Latin American Journal of Aquatic Research 43 (1): 46-58.

Morales-Nin B. 1989. Growth determination of tropical marine fishes by means of otolith interpretation and length frequency analysis. Aquatic Living Resources Nantes 2:241-253.

Morales-Nin B. 1992. Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. 51 pp. FAO Fisheries Technical Paper 322. Roma.

Morales-Nin B & Y Aldebert. 1997. Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length–frequency analysis. Fisheries Research 30(1-2):77-85.

Ojeda E. 1994. Crecimiento y edad del Robalo *Centropomus undecimalis* (Bolch), por medio de lecturas de otolitos en aguas costeras de Puerto Rico. Tesis en Ciencias Marinas. Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 61 pp.

Palmer R & C Strobeck. 1986. Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. Annual Revie of Ecology and Systematics 17: 391-421.

Palmer AR & C. Strobeck. 2003. Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. In: Michael Polak (ed). Developmental Instability (DI): Causes and Consequences, pp: 279-319. Oxford University Press, New York.

Palmer RA. 2004. Symmetry Breaking and the Evolution of Development. Science 306: 828-833.

Palmer M, M Linde & B Morales-Nin. 2010. Disentangling fluctuating asymmetry from otolith Shape. Marine Ecology Progress Serie (399): 261-272.

Panella G. 1971. Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns. Science 173:1124-1127.

Panfili J, H Puntual, H Troadec & P J Wright. 2001. Manual of fish sclerochronology, 464 pp. Institut de recherche pour le developpement. Brest, France.

Passuni, G. 2009. Distribución de la anchoveta (*Engraulis ringens*, Jenyns 1842) en relación a parámetros biogeoquímicos. Tesis de Biólogo con mención en Zoología, Escuela Académico- Profesional de Ciencias Biológicas, Perú, 71 pp.

Pikitch E, PD Boersma, IL Boyd, DO Conover, P Cury, T Essington, SS Heppell, ED Houde, M Mangel, D Pauly, É Plagányi, K Sainsbury & RS Steneck. 2012. Little Fish, Big Impact: Managing a Crucial Link in Ocean Food Webs, 108 pp. Lenfest Ocean Program. Washington, DC.

Plaza G, M Ishida & D Aoyama. 2008. Temporal patterns of growth in larval cohorts of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus* in a coastal nursery area. Journal of Fish Biology 73: 1284-1300.

Plaza G, F Cerna & J Legua. 2012. Validación de formación de anillos primarios y macroanillos de crecimiento de otolitos de anchoveta de la zona norte, 149 pp. Informe Final Proyecto FIP 4728-31.

Plaza G & F Cerna. 2013. Caracterización de la historia de vida de anchoveta, sardina común y sardina austral de la zona centro sur, 221 pp. Informe Final Proyecto FIP 2013-19.

Plaza G & JF Cerna. 2014. Validation of daily microincrement deposition in otoliths of juvenile and adult Peruvian anchovy *Engraulis ringens*. Journal of Fish Biology 86 (1): 203-16.

Plaza G & F Cerna. 2017. Revisión experta de la estimación y asignación de edad de la anchoveta XV-II Región, 176 pp. Informe Final Proyecto FIP 2014-31.

Servia M, T Cobo & M González. 2002. Multiple-trait analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: a case study using *Chironomus riparius* meigen, 1804 larvae. Environmental Monitoring and Assessment 90: 101-112.

Somarakis S, I Kostikas, N Peristekari & N Tsimenides. 1997. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval anchovy *Engraulis encrasicolus* and the use of developmental instability as an indicator of condition in larval fish. Marine Ecology Progress Series 151:191-203.

Subpesca. 2008. Ficha Pesquera. Anchoveta III- IV Regiones (*Engraulis ringens*). Subsecretaria de Pesca. Chile [en línea] < www.subpesca.cl >.

Subpesca. 2018. Plan de manejo para la pesquería de anchoveta y sardina española XV a II regiones. Subsecretaria de Pesca. Gobierno de Chile, 66 pp. [en línea] < www.subpesca.cl >.

Viera M. 2011. Características eco-morfométricas de los otolitos sagitta de *Genypterus blacodes* y *Genypterus brasiliensis* provenientes de la zona común de pesca argentino-uruguaya. Tesis de Ciencias Biológicas, Universidad de la república, Uruguay, 30 pp.

Wright PJ, J Panfili, B Morales-Nin & AJ Geffen. 2001. Tipos de estructuras calcificadas: otolitos. En: Panfili J, H de Pontual, H Troadec & PJ Wright (eds). Manual of fish sclerochonology, pp 31-57. Ifremer-IRD, Brest.

Universidad de Valparaíso
Chile
00401226