



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Departamento de Desarrollo de Tecnologías

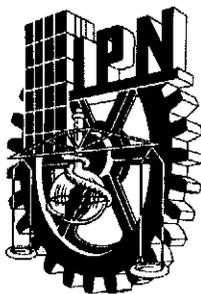
**VALIDACIÓN DE LA EDAD EN LARVAS DE TRES ESPECIES DE SARDINA  
DE LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR *Sardinops caeruleus*,  
*Opisthonema libertate* y *Harengula thrissina* (Pisces:CLUPEIDAE).**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
Con especialidad en Ciencias Pesqueras presenta:

**RODOLFO ENRIQUE MARTÍNEZ PECERO**

La Paz, Baja California Sur, México.

Diciembre, 2003.



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

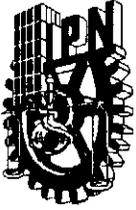
En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 8 del mes Diciembre del año 2003, el (la) que suscribe RODOLFO ENRIQUE MARTÍNEZ PECERO alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN CIENCIAS PESQUERAS con número de registro 830781 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELAZQUEZ y cede los derechos del trabajo titulado: **“VALIDACIÓN DE LA EDAD EN LARVAS DE TRES ESPECIES DE SARDINA DE LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR *Sardinops caeruleus*, *Opisthonema libertate* Y *Harengula trissina* (Pisces:CLUPLEIDAE)”** al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: rpecero@yahoo.com.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**RODOLFO ENRIQUE MARTÍNEZ PECERO**

*nombre y firma*



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 12 del mes de Noviembre del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"VALIDACIÓN DE LA EDAD EN LARVAS DE TRES ESPECIES DE SARDINA DE LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR *Sardinops caeruleus, Opisthonema libertate Y harengula thrissina (Pisces: CLUPEIDAE)*"**

Presentada por el alumno:

**MARTINEZ**  
Apellido paterno

**PECERO**  
materno

**RODOLFO ENRIQUE**  
nombre(s)

Con registro: 

	8	3	0	7	8	1
--	---	---	---	---	---	---

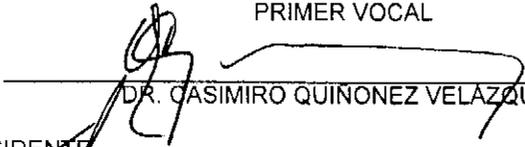
Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN CIENCIAS PESQUERAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

  
DR. CASIMIRO QUINONEZ VELAZQUEZ

PRESIDENTE

  
DR. DANIEL LLUCH BELDA

SECRETARIO

  
DR. ROGELIO GONZALEZ ARMAS

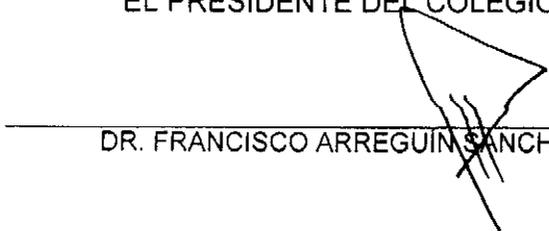
SEGUNDO VOCAL

  
MC. JOAQUÍN ARVIZU MARTÍNEZ

TERCER VOCAL

  
MC. ARACELI AVILÉS QUEVEDO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ



**I. P. N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCION**

A la memoria de mis padres que me  
heredaron todo, pero más que nada  
su pasión para disfrutar la vida

A mi hijo Luis Miguel que quizá me  
está enseñando más de la vida que  
nadie

A mis hermanos Rocío, Marité, José  
Luis y Aurorita que me estimulan  
para superarme

## AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por todo lo que me ha prodigado en mi vida, primordialmente por mi familia, mis amigos y personajes que influyen en mi vida; eternamente al gran corazón de la gente que de alguna forma me acompañó durante el proceso de mi rehabilitación. Al maestro Joaquín Arvizu Martínez, que confió en mí, y como siempre adelantado a sus tiempos, me iniciara en el estudio de la edad en otolitos de larvas de peces marinos, para mi tesis de grado. De la misma manera, con cariño, respeto y admiración, a mis compañeros del grupo de Biología Experimental: Dora Esther Hernández Ceballos, Bárbara González Acosta, Rodolfo Ramírez Sevilla, Eloísa Matus Nivón y José Luis Ortíz Galindo; quienes aprendimos mucho en poco tiempo y gozamos del esfuerzo en equipo, cosechando frutos en el trabajo científico desde lo básico hasta las últimas consecuencias, haciendo orgullosamente aportes a las ciencias marinas y a la formación de recursos humanos, particularmente dentro del piscicultivo marino, siendo ésta tesis producto de ese esfuerzo conjunto. Finalmente, agradezco tener tan elegante comité revisor, que gracias a su sabiduría me fue relativamente fácil terminar el documento. Particularmente a mi director de tesis, Dr. Casimiro Quiñónez Velázquez, quien hizo cambios sustanciales descubriendo la esencia de éste trabajo, asimismo agradezco al Dr. Daniel Lluch Belda, “patriarca de CICIMAR”, el gran honor que me brindó siendo parte de mi comité revisor, igualmente agradezco a mi amigo el Dr. Rogelio González Armas por su detalladísima revisión y acertados comentarios; por otro lado, a la M. en C. Araceli Avilés Quevedo, a quien admiro por sus aportes al desarrollo del piscicultivo marino nacional y nuevamente al “maestro de doctores” a quien no se podría omitir para la culminación de ésta tesis, al M. en C. Joaquín Arvizu Martínez. Agradezco al CICIMAR y al Instituto Politécnico Nacional, el haberme dado la oportunidad de terminar mi tesis, y también al CONACyT por su apoyo financiero al proyecto “Biología de Larvas” PCECBNA-021252, donde se realizó este trabajo.

## INDICE

	Pagina
<b>GLOSARIO</b> .....	i
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1.0 INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2.0 ANTECEDENTES</b> .....	3
<b>3.0 JUSTIFICACION</b> .....	6
<b>4.0 HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	11
<b>4.1 OBJETIVO</b> .....	11
<b>5.0 MATERIAL Y METODOS</b> .....	12
5.1 Fuente de Información Biológica .....	12
5.2 Recolecta .....	12
5.3 Transporte .....	15
5.4 Cultivo .....	15
5.4.1 Desarrollo Larvario .....	16
5.5 Muestreo de Larvas .....	17
5.6 Preparación de los Otolitos .....	18
5.6.1 Extracción .....	18
5.6.2 Montaje .....	19
5.6.3 Lectura y Mediciones .....	19
5.7 Validación de las Marcas de Crecimiento .....	20
5.7.1 Diseño del Cultivo .....	20
<b>6.0 RESULTADOS</b> .....	21
<b>6.1 COMPORTAMIENTO GENERAL DURANTE EL DESARROLLO</b> .....	21
6.1.1 Embrión .....	23
6.1.2 Eleuteroembrión .....	23
6.1.3 Protopterygiolarva .....	25
6.1.4 Inanición .....	27
6.1.5 Etapa Previa a la Transformación Pterygiolarva .....	27

	Página
6.1.6 Velocidad de nado .....	29
6.1.7 Ectoparásitos en larvas .....	29
6.2 <b>VALIDACIÓN</b> .....	30
6.2.1 <i>Sardinops caeruleus</i> .....	30
6.2.2 <i>Opisthonema libertate</i> .....	34
6.2.3 <i>Harengula thrissina</i> .....	39
7.0 <b>DISCUSION</b> .....	43
8.0 <b>CONCLUSIONES</b> .....	49
9.0 <b>RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS POSTERIORES</b> .....	50
10.0 <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	53

## GLOSARIO

**ALIMENTACIÓN ENDÓGENA.** Nutrición del embrión, aportada por el vitelo.

**ALIMENTACIÓN EXÓGENA.** Alimentación sustentada del medio exterior. En condiciones de laboratorio la alimentación Exógena (AE) está integrada principalmente por invertebrados cultivados (rotíferos, copépodos, nauplios de artemia).

**AMPLITUD DE INCREMENTO.** La medición lineal de incrementos, comprende una zona de acreción más una zona discontinua. Usualmente medido a lo largo del eje de crecimiento mayor del otolito. Distancia entre marcas de crecimiento del otolito.

**ARTEMIA.** Nombre propio para el “camarón de salina” (Brine shrimp) crustáceo usado en estadio de nauplio como alimento para larvas de crustáceos y peces.

**COHORTE.** Un grupo de peces que inicia su vida casi al mismo tiempo y son producto de un periodo de desove relativamente corto. Este término es difícil de aplicar a peces que se reproducen a lo largo del año.

**COHORTE MENSUAL.** Peces producto de un desove o nacidos en un mes dado; dentro de los meses que ocupa la época reproductiva de un desovante parcial. En otra forma no se puede emplear clase-anual cuando la reproducción ocurre mensualmente o con alguna otra periodicidad.

**CONDICIÓN LARVAL** (óptima-subóptima) Estadio fisiológico de los organismos, como resultado de una alimentación suficiente o deficiente.

**DEPREDACIÓN DIFERENCIAL.** Al ataque más activo que pueden estar sujetas larvas exhaustas por inanición, contrario en larvas en condiciones óptimas de desarrollo.

**EDAD.** Periodo de tiempo que puede ser expresado o medido en años, meses, días u otras unidades.

**EJE DE CRECIMIENTO.** Eje dentro del otolito a lo largo del cual se encuentran proporcionalmente distribuidas las marcas de crecimiento (Pannella, 1974). Eje dentro de la micro-estructura donde la amplitud de los incrementos es mayor. Los otolitos pueden tener más de un eje de crecimiento, casos en los cuales algunas veces se refiere al mayor o al menor.

**ELEUTEROEMBRIÓN.** Fase del desarrollo embrionario que comienza con la eclosión, termina con la absorción del vitelo e inicio de la alimentación exógena.

**EMBRIÓN.** Fase de intensa órgano génesis dentro del huevo hasta la eclosión del mismo (Balon, 1975b).

**ENCOGIMIENTO.** Se refiere al proceso de reducción en talla que se produce a causa de la fijación de la larva con cualquier fijador (formaldehído-alcohol).

**EXACTITUD.** La proximidad de la estimación de la edad al valor real.

**ÉXITO ALIMENTICIO.** Se refiere básicamente a la alimentación exógena, se expresa en términos de condición de desarrollo.

**FOCO** (origen). El punto real o hipotético, usado como un punto de referencia, que el lector elige para iniciar un conteo de marcas de crecimiento.

**FOTOPERIODO NATURAL.** Referido a la duración del día y la noche.

**GRUPO DE EDAD.** Grupo de peces de una edad dada (días, meses, años). No es sinónimo de clase anual.

**INANICIÓN.** Estadio fisiológico que caracteriza a algunos individuos tanto morfológicamente como conductualmente por su extrema desnutrición debida a la falta de alimento.

**INCREMENTO.** Anillo concéntrico bipartito, consta de zonas alternadas predominantemente de carbonato de calcio **zona de acreción** y **zonas discontinuas** predominantemente orgánicas. Mugiya (1987a) verificó la depositación en etapas de carbonato de calcio y matriz orgánica sobre un periodo diario. Los intervalos tienen una composición alternada bipartita e indican el paso de una unidad de tiempo.

**LAPILUS.** Segundo par mayor de los huesos del oído interno.

**LARVA ANESTESIADA.** Larva que se encuentra bajo la influencia de algún tranquilizante, en este caso se empleó quinaldina, para atenuar al máximo sus sentidos, medirla y disectarla.

**MARCA DE CRECIMIENTO.** Marca más o menos concéntrica al núcleo, en otolitos de larvas de peces.

**MARCA DE SACO VITELINO.** Discontinuidad abrupta que se correlaciona con la absorción total del vitelo.

**MARCA DIARIA.** Estructura característica que se relaciona con un evento diario.

**NÚCLEO.** Área puntual que consiste en el primordio (punto brillante) rodeada por una zona concéntrica.

**OTOLITO.** Estructura ósea del oído interno que presentan las larvas de peces desde el estadio embrionario. Hay tres pares de ellas. En este caso, se empleará el término al referirse al par mayor denominados saggitae.

**PRECISIÓN.** Es una medida de consistencia, del conteo de marcas concéntricas o de otras estructuras relacionadas con la edad sobre la misma estructura esquelética. Provee una medida de la variabilidad asociada con una edad estimada.

**PRIMORDIO.** Está contenido dentro de la misma zona que representa el punto (o puntos) del crecimiento inicial de un otolito. Ópticamente es una fase de crecimiento dentro del núcleo el cual es más opaco que el área que le rodea.

**PROTOPTERYGIOLARVA.** Intervalo entre la alimentación exógena y el comienzo de la diferenciación del pliegue de las aletas impares (anal y dorsal) con respecto a la aparición de lepidotriquios (Balon, 1975).

**PTERYGIOLARVA.** Es la etapa final de la diferenciación de aletas impares hasta su total definición.

**PUNTO DE NO-RETORNO.** Estadio larvario de inanición que se presenta en los últimos días de vida, caracterizado porque aunque la larva encuentre alimento su debilidad física no le permite acceder a él.

**QUINALDINA.** Anestésico comúnmente empleado para el manejo en laboratorio que se hace con peces y anfibios para: medir, pesar, sexar, marcar, etc.

**SAGGITAE.** Par mayor de las estructuras esqueléticas del oído interno de los peces, que se presentan a partir del estadio embrionario en huevo.

**SALINIDAD.** Es la medida de la cantidad de sales disueltas en el agua de mar. las unidades por mucho tiempo usadas eran partes por mil (ppm). Actualmente se calcula indirectamente midiendo la conductividad eléctrica y comparándola con una muestra estándar. Las nuevas unidades numéricamente iguales que las anteriores se denominan unidades prácticas de salinidades (ups)

**ups.** Abreviación de Unidades Prácticas de Salinidad. Unidades de una nueva definición de salinidad (UNESCO, 1978) basada en la razón entre la conductividad eléctrica de la muestra y de una muestra estándar. Se conocen como unidades prácticas porque fueron definidas de tal manera que la nueva escala coincida con la

antigua de partes por mil (ppm) . la salinidad en ups es adimensional (Amador-Buenrostro, A. 2003).

**VALIDACIÓN.** La confirmación de la medida del tiempo de un incremento. Es empleada para definir la exactitud de una determinación de edad. Este término es frecuentemente confundido con verificación; que es la repetición de la interpretación de un valor numérico que puede ser independiente, de la edad.

**ZONA DE ACRECION.** Zona componente del incremento diario, consta predominantemente de aragoníta (carbonato de calcio) como lo demostraron Dunkelberg *et al.* (1980), Watabe *et al.* (1982) y Mugiya (1987a). El examen de la ultra estructura mostró grandes cristales en esta zona los cuales son perpendiculares a la periferia del otolito. La matriz intralamelar también se encuentra en esta zona (Dunkelberg *et al.* 1980, Watabe *et al.* 1982) asimismo Wilson *et al.* (1987) emplean **zona incremental.**

**ZONA DISCONTINUA.** Zona componente de incremento diario compuesta predominantemente de matriz orgánica como demostró Mugiya (1987a). Zona que se disuelve cuando se aplican ácidos ligeros (Ej. bajas concentraciones de HCl o EDTA) resultando ranuras estrechas las cuales son visibles por medio SEM (Microscopía Electrónica de Barrido).

## INDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Localización geográfica de las zonas de recolecta de huevecillos fecundados de <i>Sardinops caeruleus</i> , <i>Opisthonema libertate</i> y <i>Harengula thrissina</i> en Baja California Sur .....	13
<b>Figura 2</b>	Metodología generalizada para la extracción de otolitos .....	18
<b>Figura 3</b>	Embrión (huevo) cerca de la eclosión de sardina crinuda <i>Opisthonema libertate</i> .....	23
<b>Figura 4</b>	Eleuteroembrión de sardina crinuda <i>Opisthonema libertate</i> .....	25
<b>Figura 5</b>	Protopterygiolarva de sardina crinuda <i>Opisthonema libertate</i> .....	27
<b>Figura 6</b>	Pterygiolarva de sardina crinuda <i>Opisthonema libertate</i> .....	29
<b>Figura 7</b>	Relación lineal entre la edad (días) y el número de marcas (NM) en otolitos de larvas de sardina Monterrey <i>Sardinops caeruleus</i> .	32
<b>Figura 8</b>	Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey <i>Sardinops caeruleus</i> .....	33
<b>Figura 9</b>	Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey <i>Sardinops caeruleus</i> .....	33
<b>Figura 10</b>	Relación entre la edad (días) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey <i>Sardinops caeruleus</i> . La línea es el ajuste del modelo de Gompertz .....	34
<b>Figura 11</b>	Relación entre la edad (días) y número de marcas (NM) en otolitos de larvas de sardina crinuda, <i>Opisthonema libertate</i> .....	37
<b>Figura 12</b>	Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) de larvas de sardina crinuda, <i>Opisthonema libertate</i> .....	37
<b>Figura 13</b>	Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) de las larvas de sardina crinuda, <i>Opisthonema libertate</i> .....	38
<b>Figura 14</b>	Relación entre la edad (días) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina crinuda <i>Opisthonema libertate</i> . La línea es el ajuste del modelo de Gompertz .....	38

Página

<b>Figura 15</b>	Relación entre la edad (días) y número de marcas (NM) en otolitos de larvas de sardina escamuda <i>Harengula thrissina</i> .....	41
<b>Figura 16</b>	Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina escamuda <i>Harengula thrissina</i> .....	41
<b>Figura 17</b>	Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) de larvas de sardina escamuda <i>Harengula thrissina</i> .....	42
<b>Figura 18</b>	Relación entre la edad (días) y la longitud estandar (LE) de larvas de sardina escamuda <i>Harengula thrissina</i> . La línea es el ajuste del modelo de Gompertz.....	42

## INDICE DE TABLAS

	Pagina
<b>Tabla 1</b> Datos de la recolecta de huevecillos fecundados de las tres especies de sardinas, por temperatura, fecha y localidad .....	13
<b>Tabla 2</b> Condiciones de recolecta de huevos, desarrollo en laboratorio y datos generales de las muestras .....	21
<b>Tabla 3</b> Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para <i>Sardinops caeruleus</i> .....	32
<b>Tabla 4</b> Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para la sardina <i>Opisthonema libertate</i> .....	35
<b>Tabla 5</b> Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para la sardina <i>Harengula thrissina</i> .....	40

**VALIDACIÓN DE LA EDAD EN LARVAS DE TRES ESPECIES DE SARDINA DE LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR: *Sardinops caeruleus*, *Opisthonema libertate* y *Harengula thrissina* (Pisces:CLUPEIDAE)**

**RESUMEN.** Para validar el patrón diario de formación de las marcas de crecimiento en los otolitos, las larvas de la sardina Monterrey *S. caeruleus*, la sardina crinuda *O. libertate* (crinuda), y la sardina escamuda *H. thrissina* se cultivaron en laboratorio desde huevo hasta 24, 48 y 15 días después de la eclosión a temperaturas de 21, 24 y 26 °C, respectivamente; el fotoperiodo fue natural y el alimento consistió en rotíferos *Brachionus plicatilis*, zooplancton (nauplios y copepoditos <200 micras) y *Artemia salina* recién nacida. Los huevos fueron recolectados con red de plancton en Bahía Magdalena (La Bocana) para la sardina Monterrey en febrero de 1986, en Bahía Almejas para la crinuda y en la Bahía de La Paz para la escamuda durante, julio de 1985 y mayo de 1986 respectivamente. Se hicieron observaciones del comportamiento en todos los estadios del desarrollo durante el periodo de cultivo. Las longitudes promedian al nacer fueron: 4.2 mm longitud estándar (LE), 3.0 mm LE y 4.6 mm LE respectivamente. Se obtuvieron 386 sagitas entre 49 y 235 micras de radio promedio, pertenecientes a 236 larvas entre las tallas 2.9 mm LE y 22.7 mm LE, de las cuales 35% pertenecen a la sardina Monterrey, 31% a la sardina crinuda y el 34% a la sardina escamuda. En las tres especies se comprobó la formación diaria de una marca de crecimiento en los otolitos, iniciándose el proceso con la absorción del saco vitelino. El patrón inicial fue tres o cuatro marcas muy cercanas entre sí, reflejando un lento crecimiento, cambio de alimentación y aprendizaje en la captura de presas. El número de marcas de crecimiento (NM) correspondió a la edad cronológica de las larvas ( $R^2= 0.99$ ,  $P<0.001$ ) y la relación entre el crecimiento del

otolito y de la larva fue significativa ( $R^2 > 0.99$ ,  $P < 0.001$ ) en todos los casos. Lo significativo de estas relaciones justifica la utilización de la micro-estructura y el tamaño del otolito para la determinación de la edad y para describir el crecimiento de las larvas estudiadas. El modelo de Gompertz describió adecuadamente el patrón de crecimiento larval ( $R^2 > 0.81$ ,  $P < 0.001$ ). Las tasa de crecimiento observada para *S. caeruleus* fue 0.40 mm, para *O. libertate* fue 0.49 mm, y para *H. thrissina* fue 0.54 mm por día hasta la talla de 12 mm LE. Se concluye que las especies de sardinas estudiadas forman una marca de crecimiento en los otolitos por día a partir de la absorción del vitelo.

**LARVAE AGE VALIDATION OF THREE SPECIES OF SARDINE FROM THE COASTS OF BAJA CALIFORNIA SUR: *Sardinops caeruleus*, *Opisthonema libertate* and *Harengula thrissina* (Pisces:CLUPEIDAE)**

**ABSTRACT.** To validate the daily pattern formation of the otolith growth increments larvae of the Pacific sardine *S. caeruleus*, the thread herring *O. libertate*, and the flatiron herring *H. thrissina* were raised in laboratory from egg up to 24, 48 and 15 days after hatching at 21, 24 and 26 °C, respectively; the photoperiod was natural and the food consisted in the rotifer *Brachionus plicatilis*, zooplankton (naupliie and copepodites < 200 microns) and newly born *Artemia saline*. The eggs were collected by plankton net in Bahía Magdalena (La Bocana) for the Pacific sardine, in Bahía Almejas for the thread herring and in Bahía de La Paz for the flatiron herring during January 1986 July 1985 and May 1986. Behavioral notes were made in all the development stages observed during the raising period. The average hatching length were: 4.2 mm standard length (SL), 3.0 mm SL and 4.6 mm SL respectively. Three hundred eighty six saggitae were obtained rangin from 4 to 235 microns of average radi, belonging to 236 larvae between 2.9 mm SL and 22.7 mm SL of which 35% belongs to Pacific sardine, 31% to thread herring and 34% to flatiron herring. The daily growth increment formation in their otoliths was tested in the three species, beginning with the yolk sac absorption. The initial patterns were three or four very close increments, reflecting a slow growth period associated with the feeding change and the prey capture learning process. The number of growth increments (NI) corresponded to the larval chronological age ( $R^2 = 0.99$ ,  $P < 0.001$ ) and the relationship between the otolith growth and larval growth was significant ( $R^2 > 0.99$ ,  $P < 0.001$ ) in all the cases. The level of significance of these relationships justifies the

use of the otolith microstructure for age determination and to describe the larval growth. The Gompertz model described appropriately the larval growth pattern ( $R^2 > 0.81$ ,  $P < 0.001$ ). The average growth rate observed were: 0.40 mm for *S. caeruleus*; 0.49 mm for *O. libertate*; and 0.54 mm for *H. thrissina* until 12 mm SL. Concluding that the sardine species studied form a growth increment per day starting from the yolk sac absorption.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Una de las metas más importantes de la Biología Pesquera es conocer los procesos responsables de la variación anual del reclutamiento. La fuerza de la clase anual en peces marinos es probablemente determinado durante la etapa de larva (Hjort, 1914). Lasker (1985) discute varias causas relacionadas a la supervivencia durante la vida temprana en clupeidos; argumenta que la alta mortalidad durante las primeras etapas del desarrollo es por inanición causada por una reducida disponibilidad de presas planctónicas resultado de cambios ambientales. Para abordar esta problemática Lasker planteó el uso de la información contenida en la microestructura del otolito (Pannella 1971), porque además de obtener la edad de la larva en días, será posible conocer la relación entre la fecha de eclosión y la tasa de crecimiento. Este método requiere validar el patrón diario en la formación de incrementos en los otolitos y evaluar la relación entre el crecimiento somático y el del otolito (Geffen, 1987). Existen evidencias de la presencia de marcas de crecimiento y patrones de formación diaria en los otolitos de una gran diversidad de especies de peces de hábitat tropical y templado (Pannella, 1971, 1974; Jones, 1986; Victor, 1986; Quiñónez-Velázquez, 1999). El número de publicaciones sobre estudios relacionados con otolitos ha crecido exponencialmente (Jones, 1992). Se reconocen estudios en 50 familias y más de 300 especies de peces y calamares (Secor *et al.*, 1992).

Aunque los incrementos diarios suceden en la mayoría de las especies estudiadas, la validación de la temporalidad de formación es un prerrequisito necesario para los

estudios de edad y crecimiento que emplean incrementos diarios como indicadores de la edad en larvas de peces (Geffen, 1992). Para validar la formación diaria de incrementos en los otolitos, Geffen (1987) recomendó criar las larvas a lo largo del periodo de desarrollo, y muestrear un número razonable de individuos a intervalos frecuentes. Esta técnica ha sido empleada en muchas especies de peces incluyendo al bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Radke y Waiwood 1980) y al arenque del Pacífico *Clupea pallasii* (Moksness y Wespestad 1989).

La determinación de edad y crecimiento utilizando los incrementos diarios en los otolitos, se ha iniciado como un proceso rutinario en muchos laboratorios del mundo (Campana, 2001). Diversos trabajos confirman la presencia de incrementos diarios de crecimiento (Struhsaker y Uchiyama, 1976; Bolz y Lough, 1983; Methot, 1983; Radtke, 1983, 1984a,b; Ré, 1983 a,b; Jones, 1986; Wild, 1986) en los cuales se aprecian las posibilidades de este descubrimiento en el estudio de la dinámica durante las etapas tempranas del desarrollo en peces marinos.

## 2.0 ANTECEDENTES

Las marcas de crecimiento contenidas en escamas (Carlander, 1987), otolitos (Reibisch, 1899, citado en Ricker, 1975) y vértebras (Hederström, 1959, citado en Ricker, 1975) han sido usadas desde hace mucho tiempo para la determinación de la edad en peces. Sin embargo, las marcas anuales de crecimiento en los otolitos no han sido útiles para el estudio de la dinámica durante la vida juvenil de los peces, de zonas tropicales, mesopelágicas y abisales en los cuales el crecimiento es relativamente constante y la depositación de anillos anuales no es evidente.

Pannella (1971) observó por vez primera en los otolitos de *Merluccius bilinearis* y *Gadus morhua*, especies templadas, la presencia de marcas de crecimiento que postularia como diarias y posteriormente también las detectó en peces tropicales y señaló patrones de formación que coincidían con los periodos lunares (Pannella, 1974). Este descubrimiento ha sido útil en la determinación de la edad en días y en la descripción del crecimiento en larvas y juveniles de peces (Brothers *et al.* (1976); Struhsaker y Uchiyama (1976).

En esos primeros años se encontraron muchas aplicaciones; Struhsaker y Uchiyama (1976) describieron el crecimiento de larvas y juveniles del engráulido hawaiano *Stolephorus purpureus* y compararon las tasas de crecimiento de organismos provenientes de diferentes áreas. Simultáneamente Brothers *et al.* (1976) determinaron la edad en larvas y juveniles de varias especies de peces (*Engraulis mordax*, *Leuresthes tenuis*, *Morone saxatilis*, *Clevelandia ios*, *Ilypnus gilberti*, *Quietula y-cauda*, *Merluccius angustimanus* y *Merluccius sp.*). Por otro lado, Methot y

Kramer (1979) ajustaron el modelo de Gompertz al crecimiento de *Engraulis mordax* para obtener *in situ* tasas de crecimiento.

La aplicación de la técnica se incrementó rápidamente estableciendo secciones de edad en muchos laboratorios del mundo (Jones, 1992; Moskness, 1992). La incorporación de la técnica de determinación de edad en otolitos dentro de la investigación en ecología del mismo modo se incrementó (Townsend y Graham, 1981; Víctor, 1982; Methot, 1983; Rice *et al.*, 1985; Fortier y Quiñónez-Velázquez, 1998). La determinación de la edad en peces por medio de marcas diarias de crecimiento es una herramienta muy útil en el estudio de la dinámica poblacional (Watanabe *et al.*, 1988). En años recientes técnicas más depuradas han sido utilizadas en el análisis de la estimación del crecimiento. En ellas se encuentran el análisis de series de tiempo; modelos edad-temperatura-crecimiento (Campana y Hurley, 1989) y técnicas de rastreo de cohortes (Fortier y Quiñónez-Velázquez, 1998) entre otras. La agrupación en intervalos de fechas de nacimiento durante la estación de reproducción permitió a Crecco y Savoy (1985, 1987) mostrar la significancia de eventos meteorológicos e hidrográficos de corto tiempo sobre el crecimiento y la supervivencia de *Alosa sapidissima*. Savoy y Crecco (1988) fueron capaces de separar el crecimiento denso-dependiente del denso-independiente, y estimar el tamaño de la clase anual el cual fue definido durante los estadios de huevo y larva. Su análisis demostró las bondades de la técnica de los incrementos diarios en otolitos para examinar las relaciones entre stock y reclutamiento.

Geffen (1987) señaló que los experimentos de validación son diseñados para probar que la formación de los incrementos de crecimiento en los otolitos es constante o predecible en el tiempo; que el número de incrementos refleja la edad de la larva; que la formación es independiente de la tasa de crecimiento y de la alimentación; y que es controlada por los mismos factores en toda la población; también señala que los experimentos de validación son una actividad esencial de cualquier estudio que utilice la microestructura de los otolitos.

Wilson *et al.* (1983) definieron validación como “la confirmación del significado temporal, de un incremento” y usaron para la determinación de la exactitud de una designación de edad.

### 3.0 JUSTIFICACION

La pesquería de sardinas en México en la región del Pacífico Norte está compuesta por un complejo de especies; siendo las más importantes la sardina Monterrey *Sardinops caeruleus* (Girard), el género *Opisthonema* representado principalmente por la sardina crinuda *O. libertate* (Gill), la sardina japonesa *Etrumeus teres* (Dekay), la macarela *Scomber japonicus* (Houttuyn) y la sardina bocona *Cetengraulis mysticetus* (Gunther) (Casas-Valdéz, 1983; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 1996).

La sardina Monterrey se distribuye en el Océano Pacífico nororiental, desde el sur del Golfo de California (23° N) hasta el sureste de Alaska (57°N) (Parrish *et al.*, 1989). Explotada en las costas de California, EAU. con volúmenes cercanos a 800,000 t anuales durante 1936-1937, en la década de los 50as la captura disminuyó considerablemente, lo cual provocó que el gobierno estadounidense impusiera una moratoria a la pesca de la sardina en 1967 (Radovich, 1982). En México la explotación se inició en 1929 en el área de Ensenada BC., y al igual que en California en esta zona la pesquería se colapsó lo que provocó que a partir de 1952 se buscaran nuevas áreas de pesca, expandiéndose a Isla de Cedros BC. y posteriormente a Bahía Magdalena, B.C.S. (Quiñónez-Velázquez *et al.*, 2002). La sardina Monterrey representa más del 60% de las capturas en la zona, su explotación se realiza en Bahía Magdalena y en Ensenada con una producción que oscila alrededor de 60,000 t en los últimos años (Morales-Bojorquez *et al.*, 2003; Jacobson *et al.*, 2001).

El recurso sardina crinuda está compuesto por el complejo de especies del género *Opisthonema*, este recurso pesquero se distribuye tanto en la zona tropical como en la subtropical del Pacífico oriental. La crinuda representa el 38% de las capturas, con tendencia a disminuir. Por otro lado la sardina escamuda (*H. thrissina*) es un recurso poco abundante, que se usa ocasionalmente como carnada, capturándose con atarraya; se distribuye más en zonas tropicales que subtropicales del Pacífico oriental. Esta especie constituye solo una pequeña proporción (menos del 1%) de la captura comercial de sardinas en México, la cual se pesca principalmente en zonas aledañas a los puertos de Guaymas y Yavaros, Sonora donde constituye aproximadamente el 2% de la captura total de sardina en este estado, mientras que su proporción es despreciable o nula en Sinaloa y B.C.S. Usualmente sus capturas se reportan mezcladas con otras especies. Se distribuye desde la Jolla, California E.U.A. hasta Perú, es una especie pelágica costera que ha sido capturada en ambientes completamente marinos y también de salinidades ligeramente menores, aunque es más común a las primeras.

Estudios previos sobre la determinación de edad en sardina Monterrey se han realizado en E.U.A. y México por Kimura y Blunt (1971) estudios basados en lectura de escamas sin aplicación de pruebas de validación; Alvarado-Castillo y Félix-Uraga (1986) encuentran que las marcas periódicas opacas y hialinas de los otolitos de sardina Monterrey tienen una periodicidad semestral, relacionando la primera marca hialina con la talla de primera madurez-desove y reclutamiento a la pesquería (Félix-Uraga, 1990; 1992). Probablemente sólo Quiñónez-Velázquez *et al.*, (2000) hayan aplicado las técnicas de marcas diarias para conocer edad en organismos silvestres

de sardina Monterrey. En general se tiene retraso en el conocimiento de sus estadios larvarios y de su ciclo de vida, particularmente sobre su edad y crecimiento. A la fecha la investigación sobre edad y crecimiento se ha enfatizado en adultos utilizando análisis de frecuencias de tallas como alternativa, porque los intentos para determinar edad tanto en otolitos como en escamas han sido menos exitosos por la gran complejidad de marcas que no permiten hacer interpretaciones lógicas con los métodos tradicionales empleados.

Existen antecedentes sobre la sardina *Sardinops sagax* por Butler y Rojas-De Mendiola (1985) sobre sus primeros estadios larvarios, en los casos de las sardinias crinuda y escamuda no existe información.

El uso de incrementos diarios de crecimiento en otolitos de peces adultos también aumenta la resolución de la estimación de la edad y promete proveer a la Biología Pesquera un nuevo nivel de información.

El término validación frecuentemente es confundido con el de verificación es decir, la repetibilidad de una interpretación numérica que puede ser independiente de la edad. Por ejemplo, si dos lectores concuerdan con el número de zonas presentes en una parte dura, o si dos diferentes estructuras de determinación de edad son interpretadas como teniendo el mismo número de zonas, la verificación ha sido realizada. Así, la validación de la formación de anillos diarios puede ser realizada con o sin la verificación de los conteos de incrementos. Inversamente, los conteos pueden ser verificados sin validar su tasa de formación. La precisión en los estudios de otolitos, se refiere a la medición de la repetibilidad cuando la verificación de los

conteos se define en el contexto como la cercanía de la estimación de la edad a la verdadera edad (Campana y Neilson, 1982).

Los estudios de otolitos en larvas se dividen en validación y aplicación. La mayoría de los estudios de aplicación presuponen, previa validación, que la tasa de formación es diaria. Muchos estudios, sin embargo, continúan siendo publicados sin validación, principalmente por falta de tiempo, dinero y tecnología de cultivo.

Los primeros estudios publicados sobre validación se centraron sobre el tiempo de formación inicial de anillos (edad en la cual todas las larvas tienen por lo menos un anillo, edad promedio de la larva con un anillo, edad en la cual el 50% de las larvas depositaron su primer anillo) y el promedio de la tasa de formación de anillos para poblaciones de larvas cultivadas (Brothers *et al.*, 1976; Taubert y Coble, 1977; Barkman, 1978; Methot y Kramer, 1979; Laroche *et al.*, 1982).

El método más frecuente de validación de tasas de formación de anillos es cultivar larvas desde huevo hasta la metamorfosis, recolectando un número razonable de individuos a diferentes intervalos a través de todo el periodo. (Geffen, 1982; Radtke y Dean, 1982). Cuando la validación se ha hecho los resultados pueden ser aplicados a poblaciones (Rice, 1987).

Los otolitos de los embriones pueden ser revisados para observar la presencia de anillos (Geffen, 1983; Mcgurk, 1984) y hacer un muestreo más intenso durante el periodo entre la eclosión y la absorción del vitelo para identificar el tiempo y la variabilidad de la formación del anillo inicial, grupos de anillos asociados con

metamorfosis y cambios en hábitat (Brothers y McFarland, 1981), que pueden afectar la asignación de edad.

Como lo señala Geffen (1992), se debe ser cuidadoso en suponer que los resultados de un estudio de validación en laboratorio podrían extenderse al campo. Además, el crecimiento de los otolitos puede variar a través del ciclo de vida de los peces; en consecuencia, los estudios de validación no pueden ser estrictamente extrapolados más allá del intervalo de edades incluidas en el experimento.

#### **4.0 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Ho- Los otolitos de las larvas de sardina Monterrey, crinuda y escamuda presentan marcas diarias de crecimiento a partir del día que absorben el saco vitelino.

Ha- Los otolitos de las larvas de sardina Monterrey, crinuda y escamuda no presentan marcas diarias de crecimiento a partir del día que absorben el saco vitelino.

#### **4.1 OBJETIVO**

1- Aplicar las metodologías descritas para determinar edad y crecimiento en larvas de sardinas Monterrey, crinuda y escamuda en condiciones de laboratorio.

2- Validar la formación diaria de marcas de crecimiento en otolitos de las larvas de sardinas; Monterrey, crinuda y escamuda.

3- Conocer algunos aspectos de la biología temprana de las especies estudiadas, bajo condiciones de laboratorio.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 FUENTE DE INFORMACIÓN BIOLÓGICA

Los huevecillos fertilizados de las tres especies de sardinas fueron recolectados del medio natural y desarrollados en el laboratorio. Los clupeidos poseen huevos flotantes, esféricos, con diámetro  $>1$  mm que desovan durante la fase de oscuro lunar, aproximadamente entre las 20:00 y las 24:00 horas (Ahlstrom, 1943). Las zonas de recolección de los huevecillos se seleccionaron con base a la experiencia de los grupos de investigación en CICIMAR (Anónimo, 1984a; Anónimo, 1984b; Félix-Uraga *et al.*, 1996; Hernández-Vázquez, 1983; Torres-Villegas *et al.*, 1985; Torres-Villegas *et al.*, 1986) que han abordado desde 1981 la biología, ecología y pesquería del recurso sardina en el complejo lagunar Bahía Magdalena y Bahía de La Paz. Los huevecillos se recolectaron mediante arrastres superficiales con red de plancton, a media noche o al amanecer después de un oscuro lunar que es cuando se intensifica el desove (Torres-Villegas *et al.*, 1985, Ramírez-Sevilla *et al.*, 1992). La recolecta para las tres especies se llevó a cabo básicamente con las mismas técnicas, materiales y equipos, habiendo diferencias exclusivamente en tiempo y espacio como se observa en la (**Tabla 1**) y en la (**Fig. 1**).

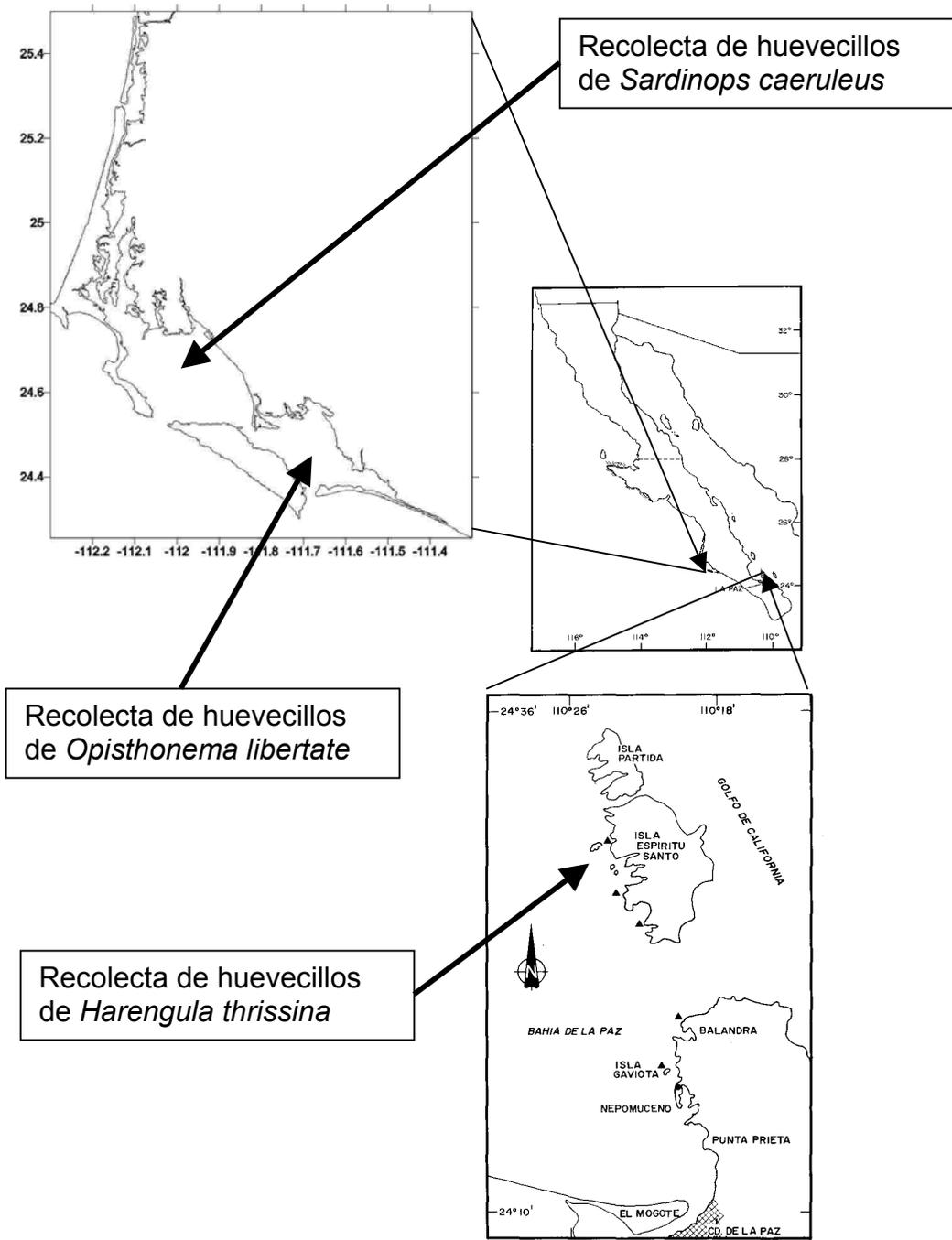
### 5.2 RECOLECTA

Para la recolecta de los huevos se empleó una red cilindro-cónica con boca de 70 cm de diámetro y malla para zooplancton de 500 micras efectuando arrastres superficiales con duración máxima de 5 min., con trayectoria circular y a baja

velocidad para no dañar al material, los arrastres se repetían en la zona si se localizaba un “parche”, con la idea de asegurar el mayor número de huevos. La recolecta de huevos de sardina Monterrey fue el 15 de enero de 1986 y se hizo en La Bocana de Bahía Magdalena entre las 20:00 y las 23:00 horas en oscuro lunar. La temperatura superficial del mar fue de 16°C . En el caso de la sardina crinuda los huevos se recolectaron el 12 de julio de 1985 en Bahía Almejas entre las 6:00 y las 9:00 horas con de temperatura superficial del mar de 24°C. Finalmente, para la sardina escamuda el 14 de mayo de 1986 en la Bahía de La Paz, entre el Islote de la Ballena y la Isla del Espíritu Santo, al amanecer entre las 6:00 y las 9:00 horas con temperatura superficial del mar de 26°C (**Tabla 1**).

**Tabla 1** Datos de la recolecta de huevecillos fecundados de las tres especies de sardinas, por temperatura, fecha y localidad

<b>ESPECIE</b>	<b>FECHA</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>AREA</b>
<i>Sardinops caeruleus</i>	15-enero-1986	16 °C	BAHÍA MAGDALEN
<i>Opisthonema libertate</i>	12-julio-1985	24 °C	BAHÍA ALMEJAS
<i>Harengula thrissina</i>	14-mayo-1986	26 °C	ISLA ESPIRITU SANTO



**Figura 1** Localización geográfica de las zonas de recolecta de huevecillos fecundados de *Sardinops caeruleus*, *Opisthonema libertate* y *Harengula thrissina* en Baja California Sur.

### **5.3 TRANSPORTE**

Después de cada arrastre la muestra se tamizó a través de una malla de 1 mm para eliminar a los organismos indeseables que pudieran perjudicar tanto a los huevecillos como a la calidad del agua durante el transporte de los huevecillos al laboratorio. Posteriormente, se resuspendió la muestra en agua de mar tamizada por 100 micras utilizando cinco termos de 12 L cada uno, colocándolas dentro de una hielera para asegurar el mantener igual y constante la temperatura durante el transporte. La duración del traslado para las sardinas crinuda y Monterrey, fue de dos horas en lancha más tres horas vía terrestre hasta el laboratorio en CICIMAR en la ciudad de La Paz. En el caso de la sardina escamuda, dos horas en lancha desde la Isla Espíritu Santo y menos de una hora vía terrestre.

### **5.4 CULTIVO**

En el laboratorio los huevos se separaron del plancton, eligiendo sólo aquellos que no presentaron alteraciones en su anatomía. En general el método de captura, transporte de huevecillos y manejo de las muestras, provocaron pocas alteraciones en los mismos (menor a un 10%) que consistieron en abolladuras del corion y muerte del embrión. Los huevecillos se contaron utilizando goteros y un estéreo-microscopio con aumentos entre 20X y 50X; posteriormente se distribuyeron en acuarios rectangulares de acrílico (89 X 49 X 37 cm) de 80 L de capacidad, conteniendo agua de mar filtrada por tamiz de 35 micras, acondicionada con

microalgas de la especie *Nannochloris* sp. ( $200 \times 10^3$  cel/ml) y el rotífero *Brachionus plicatilis* (2 rot/ml) (Ramírez-Sevilla *et al.*, 1991).

#### **5.4.1 DESARROLLO LARVARIO.**

Los huevecillos fecundados por especie se distribuyeron en cinco acuarios de 80 L de capacidad a razón de 400 huevos/acuario. Sólo en cuatro acuarios se añadió alimento suplementario desde el primer día (rotíferos, inicialmente 2 rot/ml), después del día diez se empleó plancton silvestre a una concentración de 1 a 3 organismos/ml (copepoditos y nauplios de diferentes especies correspondientes a la fracción del tamizado que pasa a través de 200 micras y se retiene en 100 micras). Esta dieta fue proporcionada tanto para la sardina *Sardinops caeruleus* como para *Opisthonema libertate*. A partir del día 18 y hasta el día 24 para *S. caeruleus* y día 49 para *O. libertate*, la dieta estuvo representada por nauplios de artemia recién nacida. Durante el desarrollo larval se intentó mantener una densidad de rotíferos de 1 y 3 rot/ml, y una densidad de microalgas acordada en  $200 \times 10^3$  cel/ml, al quinto acuario sólo se le agregaron microalgas en la misma densidad, lo que representó condiciones teóricas de inanición (Theilacker, 1986). La temperatura del agua durante los respectivos desarrollos larvales fue constante y la salinidad se mantuvo entre  $33 \pm 3$  ups (unidades prácticas de salinidad). El primer recambio de agua se efectuó a la semana del inicio del cultivo, posteriormente éste se realizó con una frecuencia de cada tercer día. El recambio de agua se efectuó sifoneando aproximadamente el 10% del volumen total por acuario, utilizando para ello una varilla de vidrio de 5 mm de diámetro conectada a una manguera del mismo

diámetro. Los criterios visuales fueron determinantes para definir la frecuencia de los cambios de agua y las cantidades de alimento, tanto rotíferos como artemia.

## **5.5 MUESTREO DE LARVAS**

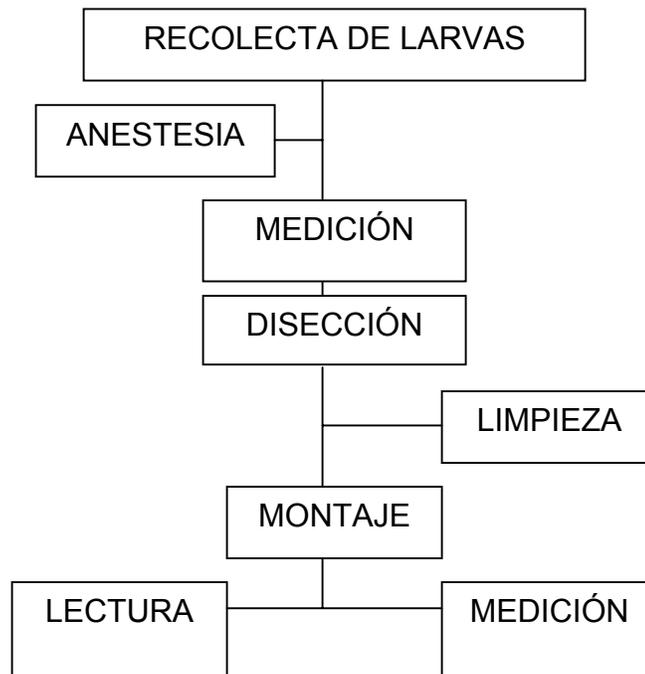
Las larvas para análisis se recolectaron con una varilla de vidrio y goteros, efectuando vacío se pescaron, en tres niveles: superficie, media columna y fondo de los acuarios. El número de larvas muestreadas fue al menos de tres larvas y no más de cinco. Los muestreos se efectuaron al momento de procesos como eclosión, absorción del vitelo, flexión notocordal, aparición de aletas; después de esos procesos la recolecta de larvas se hizo con menor frecuencia, sobre todo por el relativamente bajo número de organismos. Después de la captura, las larvas fueron anestesiadas con una solución de quinaldina, preparada con un ml de quinaldina comercial y 250 ml de etanol al 70% diluido con agua destilada. De esta solución se emplearon de tres a cinco gotas en 10 ml de agua de mar para anestesiarse a las larvas. Para evitar errores taxonómicos se contaron los miómeros en las larvas para verificar la identificación antes de efectuar la disección. La biometría se hizo usando un estéreo-microscopio adaptado con micrómetro ocular se midió la longitud previa a la flexión (LN) y longitud de postflexión (LP) a 20X ó 50X aumentos, según fuese más práctico. Los criterios empleados para la nomenclatura durante el proceso de flexión (LN) y posflexión (LP) fueron los definidos por Balon (1975b). En algunos casos las larvas se fotografiaron usando una cámara adaptada a un microscopio compuesto a 100X y 400X y posteriormente se disectaron para la extracción de los otolitos.

## 5.6 PREPARACIÓN DE LOS OTOLITOS

En la literatura se ha dado poca atención a describir las técnicas usadas en extracción y preparación de los otolitos, aunque algunos autores describen detalladamente sus técnicas específicas (Pannella, 1974; Wild y Foreman, 1980; Brothers, 1984; Secor *et al.*, 1992).

### 5.6.1 EXTRACCIÓN

Con la ayuda de microscopio estereoscópico a 50X y agujas entomológicas calibre 00 se extrajeron los otolitos. La mecánica de obtención de las muestras y su procesamiento se hizo como se esquematiza en la **Fig. 2**.



**Figura 2** Metodología generalizada para la extracción de otolitos.

## **5.6.2 MONTAJE**

Los otolitos se limpiaron con agua destilada para eliminar tejido conjuntivo adherido y se montaron sobre portaobjetos con resina sintética. En algunos casos se cubrieron con cubreobjetos del No.1 como lo señalan Struhsaker y Uchiyama (1976). Se dejaron secar por un día y se guardaron en cajas para preparación histológica. En general la limpieza es con el fin de lograr la adecuada observación y evitar posteriores efectos destructivos por acción de hongos o bacterias. La alta densidad de la resina requiere en ocasiones adelgazarse con Xilol, si se emplea un exceso de solvente será necesario un mayor tiempo de secado.

## **5.6.3 LECTURA Y MEDICIONES**

Se inician eligiendo a los porta-objetos al azar. Las lecturas de las marcas de crecimiento se hicieron en la sagita derecha, salvo en los casos en que no fue posible. Se hicieron dos conteos por el mismo lector, empleando para tal fin un contador manual para evitar errores, la segunda lectura se efectúa con un tiempo de separación de tres meses. Para asignar la edad se utilizó el promedio de las dos lecturas.

Ulteriormente a cada otolito se le midió el radio mayor (RM), utilizando un micrómetro ocular ( $\pm 1$  micra) en un microscopio compuesto a 400X. Todas las mediciones de la longitud estándar (LE) se efectuaron en larvas vivas, por lo tanto no se considera ningún tipo de corrección por encogimiento.

## **5.7 VALIDACIÓN DE LAS MARCAS DE CRECIMIENTO**

Geffen (1992) señala que la validación en estos estudios se considera como un medio para establecer la interrelación temporal entre el número de anillos y la edad. Dentro de los requerimientos para una adecuada validación están el monitorear una población de edad conocida desde la eclosión hasta la metamorfosis.

### **5.7.1 DISEÑO DEL CULTIVO**

Para demostrar que los incrementos observados en los otolitos de las tres especies fueron depositados diariamente, se diseñó el siguiente experimento. Los huevos fueron monitoreados hasta observar la eclosión, colectándose en ese momento los embriones, anestesiándose y disectándose inmediatamente. Posteriormente las colectas tuvieron una frecuencia casi diaria y durante el proceso de captura, se trató de obtener un promedio de la longitud del día; se recolectaban al menos tres larvas, procurando muestrear en tres niveles en los acuarios: superficial, medio y cerca del fondo.

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 COMPORTAMIENTO GENERAL DURANTE EL DESARROLLO

En general, el comportamiento de las tres especies durante su crianza en el laboratorio fue similar, por lo que se tomó como modelo el desarrollo larval de la sardina crinuda *O. libertate* que fue la especie que presentó mayor supervivencia (Tabla 2).

**Tabla 2.** Condiciones de recolecta de huevos, desarrollo en laboratorio y datos generales de las muestras.

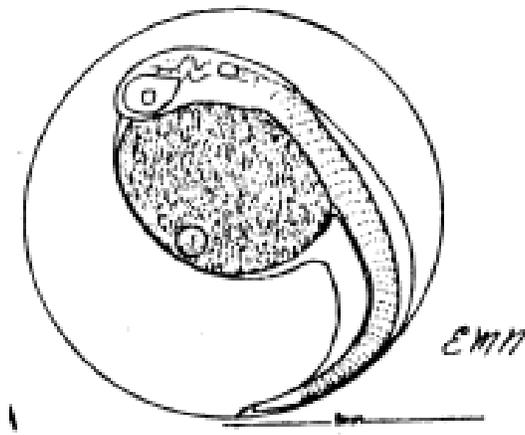
ESPECIE	MONTERREY	CRINUDA	ESCAMUDA
EDAD (días)	24	48	15
LONGITUD ESTÁNDAR (mm)	4 - 12.7	2.9-22.7	4.2-16.3
RADIO OTOLITO (micras)	5.3-30.9	3.9 -235	7.3-51.2
Número sagitas	130	122	134
Número larvas	83	73	80
<b>RECOLECTA</b>			
AREA	A	B	C
FECHA	15-01-85	12-07-85	14-05-86
HORA	22:00	08:00	08:00
TEMPERATURA (°C)	16	24	26
No. HUEVOS/ACUARIO	5,000	10,000	1,500
No. DE ACUARIOS	5	5	4
<b>DESARROLLO</b>			
TEMPERATURA (°C)	21	24	26
FOTOPERIODO	NATURAL	NATURAL	NATURAL
ALIMENTACION	Rotíferos, zooplancton y artemia	Rotíferos, zooplancton y artemia	Rotíferos y zooplancton

AREA DE RECOLECTA: **A)** BAHÍA MAGDALENA; **B)** BAHÍA ALMEJAS; **C)** BAHÍA DE LA PAZ.

Previo a la eclosión se observaron movimientos violentos del embrión. Después de la eclosión, existió poca actividad, sólo movimientos mínimos de huida los cuales se incrementaron con el desarrollo y la absorción del vitelo. Al final de la etapa de eleuteroembrión (absorción del vitelo) se presenta la primera marca de crecimiento o "marca de saco vitelino" (MSV) en los otolitos (Brothers *et al.*, 1976; Butler y Rojas-De-Mendiola, 1985; Castillo *et al.*, 1985; Radtke, 1983) incrementándose la actividad asociada con los periodos de iluminación y búsqueda de alimento. En este momento se presentan, tres o cuatro marcas de crecimiento muy cercanas entre sí, evidencia de un lento crecimiento emparentado con el cambio de alimentación (exógena = rotíferos) y el aprendizaje para la captura de presas. A partir del día 10 después de la eclosión, se suministró plancton silvestre (nauplios y copepoditos); se observó un aumento mínimo en la amplitud entre marcas. Posteriormente, en el día 18 después de la eclosión se suministraron nauplios de artemia, observándose un considerable incremento en el crecimiento, el cual fue tres veces al observado durante la alimentación con rotíferos. Posteriormente el crecimiento se hace muy regular, hasta alcanzar el periodo de transformación cuando se presenta otro periodo crítico, que ha sido comentado en condiciones naturales (Lo *et al.*, 1989) a una talla de 23 a 25 mm (LE). A esa talla del organismo la aleta dorsal sufre una brusca migración de cinco miómeros (Matus, 1994) en este proceso se advierte una reducción en el crecimiento.

### 6.1.1 EMBRIÓN

El embrión estando muy cerca del nacimiento presenta notable actividad, efectuando movimientos violentos, que incluso cambian totalmente su posición dentro del huevo. La eclosión se realiza en la superficie del agua y el corión se deposita al fondo del acuario. Cuando la frecuencia de eclosión fue máxima se observó una ligera capa aceitosa en la superficie del agua. En este momento ya fueron evidentes los primordios de los otolitos (Fig. 3) y al nacimiento de la larva se observan lisos sin marcas y con el núcleo bien representado.

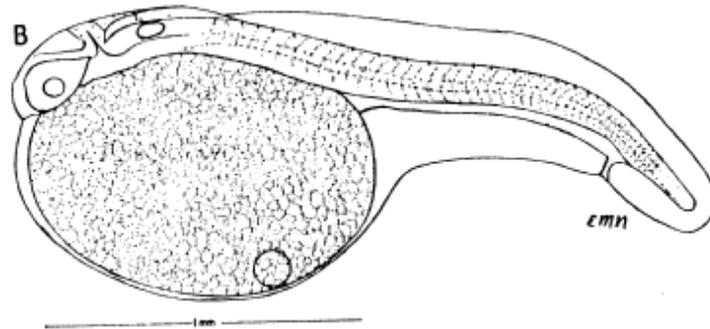


**Figura 3.** Embrión (huevo) cerca de la eclosión de sardina crinuda *Opisthonema libertate*.

### 6.1.2 ELEUTEROEMBRIÓN

Después de la eclosión se observa al eleuteroembrión flotando y la posición que guarda con respecto a la horizontal de la superficie, es determinada por la posición del glóbulo de aceite en el vitelo. En este estadio se observaron diferencias entre las

especies, en cuanto a posición y color del glóbulo de aceite; en *Opisthonema* el color fue amarillo claro y se localizó en posición anterior; en *Sardinops* el color fue amarillo claro y se ubicó en posición media y en *Harengula* el color fue amarillo oscuro y se localizó en posición posterior de tal forma que los embriones se mantienen con la cabeza hacia arriba en la sardina crinuda; con la cabeza hacia abajo en la sardina Monterrey y en posición horizontal en la sardina escamuda. El primer comportamiento relacionado con el empleo de los otolitos se demuestra precisamente con la huida asociada posiblemente para evitar la depredación. Estos movimientos involucran sistemas ya desarrollados o funcionales como: neuromastos que unidos al sistema del oído interno (otolitos) permiten ubicar al embrión en la columna de agua (hacia dónde es el fondo); asimismo facultan localizar al depredador y definir la dirección de huida, la cual invariablemente será en dirección contraria y hacia el fondo. Estos movimientos pueden ser muy rápidos e intermitentes con desplazamientos de hasta 15 cm o más, eventualmente son repetibles antes de producir cansancio en el embrión, por lo que se puede concluir que existe un geotactismo positivo al escape (May, 1974). Esto puede constatarse acercando una varilla de vidrio a la larva o succionar agua cercana a la misma, siendo la respuesta en sentido contrario de la varilla y a la succión, siempre con dirección hacia abajo. Al concluir esta etapa del desarrollo se observó la primera marca de crecimiento en los otolitos, asociada a la absorción del vitelo por lo que también se le conoce como "marca de saco vitelino" (MSV). También es importante señalar que en este periodo el crecimiento es máximo logrando alcanzar en 42 horas de 2.4 mm LE hasta 4.4 mm LE en la sardina crinuda (Figs. 4 y 5).



**Figura 4.** Eleutheroembrión de sardina crinuda *Opisthonema libertate* .

### 6.1.3 PROTOPTERYGIOLARVA

Sucesiva a la absorción del vitelo, es la terminación del glóbulo de aceite, el cual aparentemente provee de energía para el indispensable rastreo de la comida, de tal forma que la capacidad de movimiento se acentúa en relación muy estrecha con la búsqueda de alimento. Los registros que se presentan, en los otolitos, durante esta etapa de crecimiento son tres o cuatro marcas muy cercanas, significando ello que en tres o cuatro días hubo poco crecimiento debido a la adaptación lenta al cambio de alimentación endógena por exógena. Este es el periodo en el que la larva aprende a capturar su alimento, siendo un proceso crítico (May, 1964).

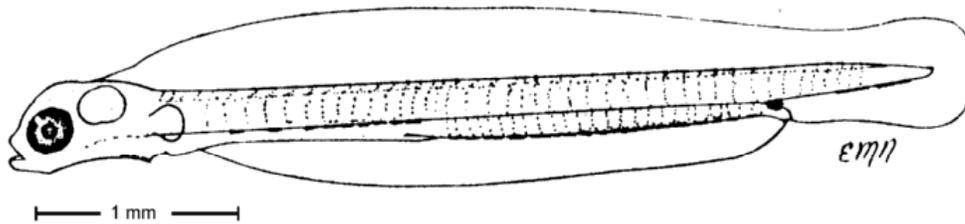
El rastreo de presas mantiene a la larva en un incesante movimiento, el cual se suspende para colocarse en posición de ataque en forma de "S", y lanzarse como muelle (Lasker, 1981). El éxito depende de la cantidad de presas y de manera muy

fundamental de la experiencia propia de la larva. Independientemente del éxito en la captura de la presa, el movimiento sigue y se repite durante las horas de iluminación, en una búsqueda permanente de alimento. Aparentemente la larva nunca se sacia ni pierde la oportunidad de comer.

Se determinó por medio de conteos de ataques a rotíferos durante las horas de mayor y menor iluminación, que existe una relación directa entre la intensidad luminosa y la frecuencia de ataques.

Las capacidades sensitiva y motora de la larva, la densidad de la presa y los patrones de comportamiento de ambas son factores importantes que influyen en la alimentación y por lo tanto en la supervivencia y crecimiento de la larva (Lasker, 1981). Cuando existe un retraso en disponer de la densidad y calidad adecuadas de alimento inmediatamente después de la absorción del vitelo, disminuye su supervivencia y su tasa de crecimiento; de esta manera aumenta su probabilidad de ser depredados (Booman *et al.*, 1991). La capacidad de movimiento y estrategias de alimentación aumentan su eficiencia con el desarrollo.

De tal forma que en los otolitos se marca este periodo de postabsorción del vitelo por marcas muy cercanas entre sí, o sea un crecimiento mínimo los primeros tres o cuatro días y después de un periodo de aprendizaje se observa mayor amplitud entre las marcas, o sea un crecimiento mayor (Fig. 5).



**Figura 5.** Protopterygiolarva de la sardina crinuda  
*Opisthonema libertate*.

#### **6.1.4 INANICIÓN**

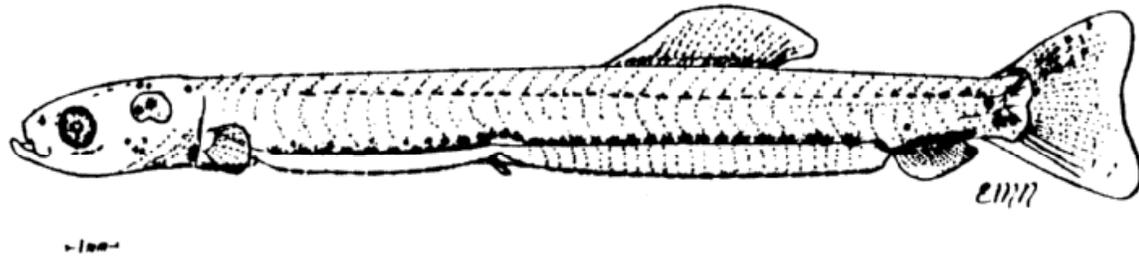
En la fase experimental en la que se desarrollaron larvas hasta su muerte por inanición, se observó un desarrollo mínimo, muriendo la totalidad de las larvas al quinto día después de la eclosión; asimismo, en los otolitos se advirtió gran dificultad para efectuar las cuentas de marcas de crecimiento, no se utilizaron en el análisis posterior.

#### **6.1.5 ETAPA PREVIA A LA TRANSFORMACIÓN PTERYGIOLARVA**

Ya se han descrito los comportamientos más básicos, el de escape y el alimenticio pero hay otro que es necesario distinguir pues es tan o más trascendental que los anteriores en sus respectivas etapas, se presenta durante la transformación a juvenil (Fig. 6) cuando la larva alcanza la talla de 21 mm (LE). El movimiento consiste en un nado más activo, con una gran insistencia, aparentemente queriendo salir del acuario, este movimiento se relaciona con la ecología de juveniles aunado a un periodo de anorexia y a una deformación del hocico. En un principio, considerando

que la luz natural que incide por un costado del acuario provocaba ese comportamiento anómalo, los acuarios se transfirieron a un cuarto con fotoperiodo controlado, con luz incidente sobre la superficie del agua, sin obtener cambio en el comportamiento de nado y alimenticio. Incluso algunas larvas que saltaban se quedaron pegadas a la pared interior del acuario y otras se mostraban exhaustas, esas larvas fueron fijadas para no perder la muestra.

Probablemente sea un comportamiento ecofisiológico relacionado con un cambio a juvenil, etapa en que el organismo ha de formar cardumen y será más evidente a los depredadores. Este comportamiento quizá esté asociado en alejar a los prejuveniles de zonas de gran iluminación hacia zonas más profundas y/o lejos de la costa donde puedan encontrar refugio, protección y alimento más adecuado lejos de depredadores potenciales (peces y aves). De tal forma que durante esta etapa de gran actividad las postlarvas ni se alimentan ni intentan huir de la varilla de vidrio, posiblemente después de lograr alejarse de zonas desprotegidas su instinto más básico de alimentarse será satisfecho, pero sólo después al haber encontrado un lugar protegido. Obviamente este proceso tan interesante requiere de experimentación para poderlo conocer mejor.



**Figura 6.** Pterygiolarva de sardina crinuda *Opisthonema libertate*.

#### **6.1.6 VELOCIDAD DE NADO**

Se observa un fuerte incremento en la velocidad de nado y mayor movilidad en el acuario entre los 7 y 9 mm (LE) que es cuando se presenta la flexión notocordal.

#### **6.1.7 ECTOPARASITOS EN LARVAS**

Uno de los problemas relacionados con la alimentación para organismos en cautiverio a base de plancton silvestre, es la depredación por copepoditos que son ingresados al sistema de cultivo como nauplios (Lillelund y Lasker, 1971; Bailey, 1984). En este caso se observó en larvas de 10 mm LE la presencia del copépodo parásito del género *Oithona* localizándose a la altura de la base de la aleta dorsal; fue común en las tres especies en tallas muy similares. También ha sido observado en larvas de sardinas en condiciones naturales (Palomares-García y Vera-Alejandre, 1995).

## 6.2 VALIDACIÓN

### 6.2.1 *Sardinops caeruleus*

Se colectaron aproximadamente 5,000 huevecillos, de los cuales se separaron 2000 y se distribuyeron en cinco acuarios a una densidad de cinco huevos por litro. Se añadió por primera vez alimento al tercer día después de la eclosión, consistente en 2 rot/ml después del día diez se empleó plancton silvestre 1 naup/ml (copepoditos y nauplios) con tamaño menor a 200 micras y del día 18 después de la eclosión, la dieta estuvo representada por nauplios de artemia (1 naup/ml) hasta el día 26. La temperatura de desarrollo fue de  $21^{\circ}\text{C}\pm 1$ .

Se obtuvieron 83 larvas y 130 otolitos en un lapso de 25 días, de las cuales el 77% fueron menores de 10 mm (LE) y el 1% midieron por arriba de 15 mm (LE). El 22% de las larvas entre 10 y 15 mm (LE) (Tabla 3). La talla promedio de las larvas a la eclosión fue  $4.2 \text{ mm LE} \pm 0.1 \text{ mm}$ , los otolitos estuvieron presentes con un promedio de  $5.3 \text{ micras de radio} \pm 0.4 \text{ micras}$ , no se apreciaron marcas de crecimiento. El primer incremento de crecimiento en los otolitos fue observado a los 2 días después de la eclosión posterior al agotamiento del saco de vitelo.

El número de marcas de crecimiento (NM) correspondió a la edad cronológica (EDAD) de las larvas (Fig. 7). La regresión entre (NM) y (EDAD) fue altamente significativa ( $R^2= 0.99$ ,  $P<0.001$ ) y la pendiente no difirió significativamente de 1 ( $t\text{-test}=1.20$ ,  $n=82$ ,  $p>0.05$ ).

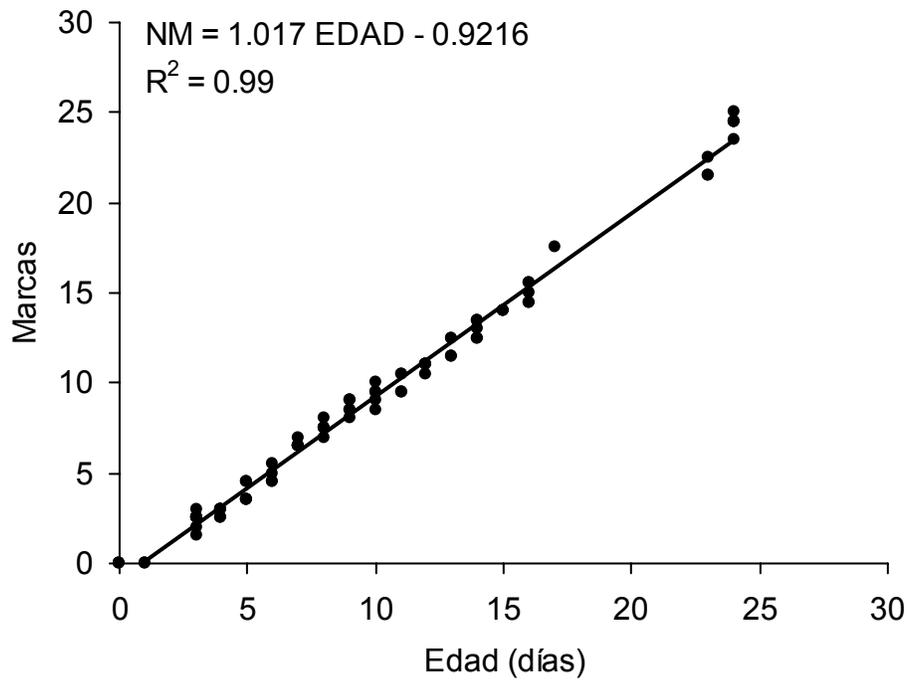
**Tabla 3** Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para la sardina *Sardinops caeruleus*

EDAD (días)	n	P R O M E D I O		
		LONGITUD ESTÁNDAR (mm)	RADIO OTOLITO (micras)	NÚMERO MARCAS
0	2	4.2	5.3	0.0
1	2	5.4	8.1	0.0
3	9	5.6	8.8	2.4
4	7	5.6	9.2	2.8
5	5	6.2	9.2	3.9
6	4	5.8	9.5	4.9
7	5	8.5	16.0	6.6
8	5	8.1	16.0	7.5
9	5	8.8	16.6	8.6
10	5	8.6	17.7	9.3
11	4	10.6	20.5	10.0
12	4	9.8	17.6	10.9
13	4	9.7	20.4	12.0
14	5	10.4	23.3	13.0
15	3	10.5	25.7	14.0
16	5	11.5	27.3	15.0
17	1	12.0	30.7	17.5
23	3	11.8	30.9	21.8
24	5	11.2	27.9	24.4

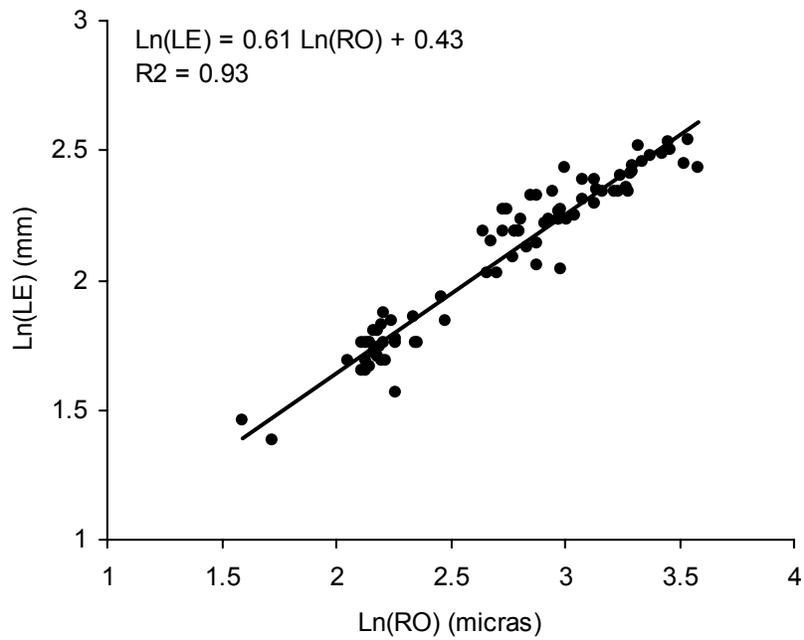
n = número de larvas

Para evaluar la relación entre el tamaño del otolito y el tamaño de la larva (LE) se utilizó el diámetro (DO) y el radio del otolito (RO) (Figs. 8 y 9). En ambos casos la relación fue lineal y significativa ( $R^2 > 0.90$ ,  $P < 0.001$ ) mejor descrita por la regresión Ln-Ln. Lo significativa de estas relaciones justifica la utilización de la microestructura y el tamaño del otolito para la determinación de la edad y describir el crecimiento de la larva (Fig. 10). El modelo de Gompertz describe adecuadamente el patrón de

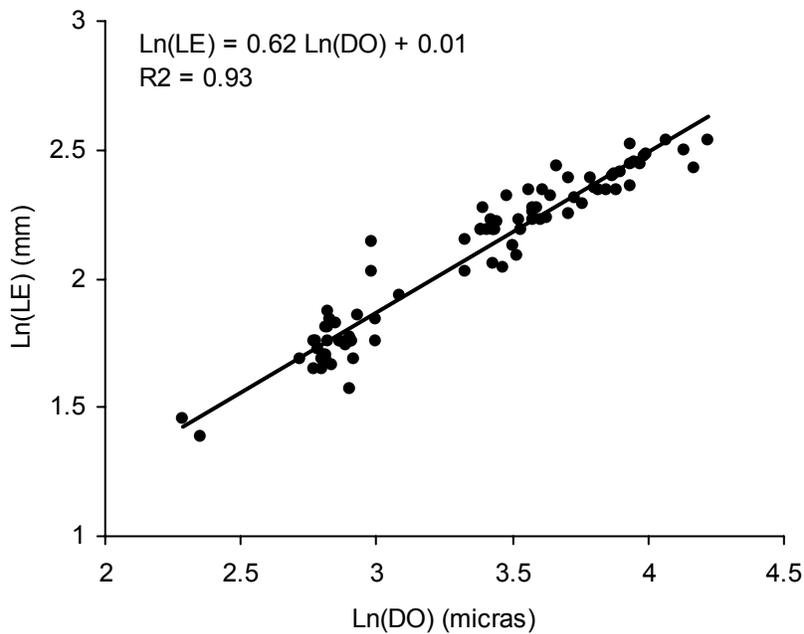
crecimiento larval de la sardina Monterrey y se ajustó significativamente a los datos de EDAD-LE ( $R^2=0.86$ ,  $P<0.001$ ) (StatSoft, 1995).



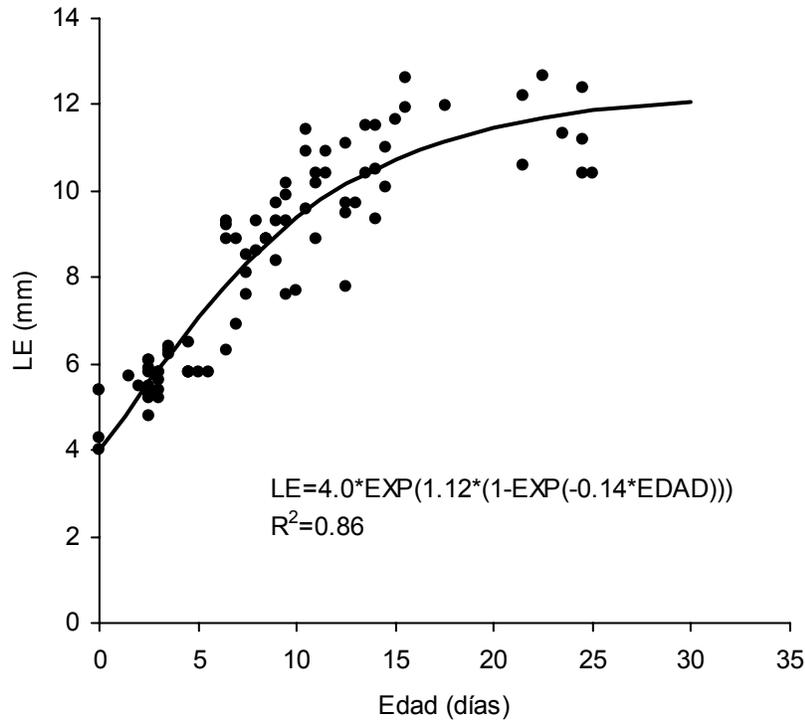
**Figura 7.** Relación entre la edad (días) y número de marcas (NM) en otolitos de las larvas de sardina Monterrey *Sardinops caeruleus*.



**Figura 8.** Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey *Sardinops caeruleus*.



**Figura 9.** Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey .



**Figura 10.** Relación entre la edad y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina Monterrey *Sardinops caeruleus*. La línea es el ajuste del modelo de Gompertz

### 6.2.2 *Opisthonema libertate*.

Se separaron aproximadamente 3000 huevecillos fecundados de sardina crinuda, de los cuales se cultivaron 2000 huevecillos a una densidad de cinco huevos por litro, distribuidos en cinco acuarios de acrílico de 80 l de capacidad, aproximadamente 400 h/acuario. Solo en cuatro acuarios se añadió alimento suplementario, desde el primer día (rotíferos, 2 rot/ml) después del día diez se empleó plancton silvestre de talla <200 micras a una densidad de 1 a 3/ml (nauplios y copepoditos). Finalmente, del día 18 hasta el día 49, la dieta estuvo representada por nauplios de artemia recién nacida. La temperatura del agua durante el desarrollo larval fue de 24°C±1 y la salinidad fluctuó entre 33±3 ups.

En un lapso de 49 días, se recolectaron un total de 73 larvas de *O. libertate*, y de ellas se obtuvieron 122 otolitos (Tabla 4). El 75% de las larvas fueron menores a 10 mm de LE, el 8% por arriba de 15 mm de LE y 4.5% por arriba de 20 mm de LE, estando el 12.5% de las larvas entre 10 y 15 mm LE.

**Tabla 4.** Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para la sardina crinuda *Opisthonema libertate*.

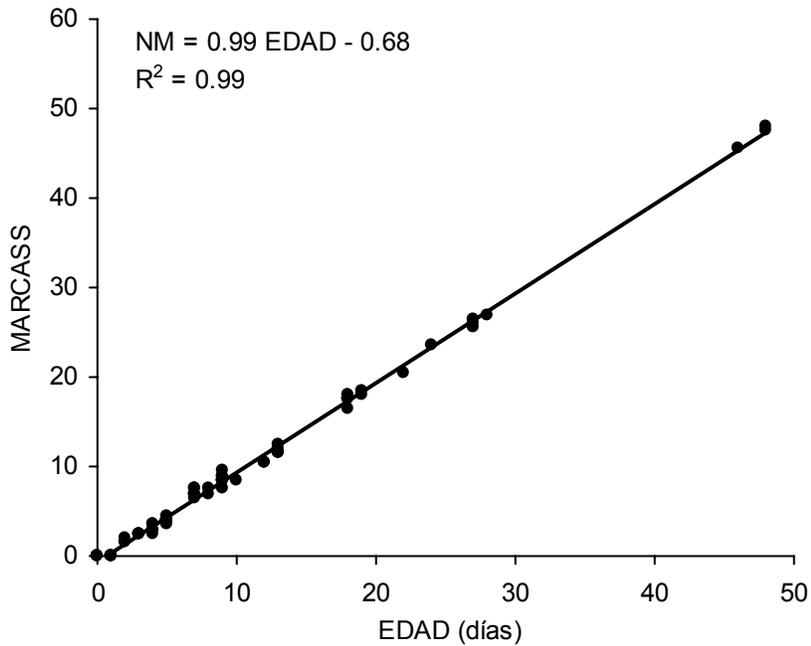
EDAD (días)	n	P R O M E D I O		
		LONGITUD ESTÁNDAR (mm)	RADIO OTOLITO (micras)	NÚMERO MARCAS
0	3	3.0	3.9	0.0
1	5	4.2	7.6	0.0
2	3	4.5	10.1	1.7
3	4	5.1	11.4	2.5
4	6	4.7	14.0	3.1
5	8	6.2	16.8	4.0
7	6	9.6	26.7	7.1
8	2	7.2	20.9	7.3
9	8	9.9	34.1	8.6
10	1	10.0	32.9	8.5
12	3	7.9	26.6	10.5
13	6	8.4	30.8	11.8
18	7	10.7	42.5	17.5
19	2	12.2	47.6	18.3
22	1	12.1	44.8	20.5
24	1	8.1	29.9	23.5
27	3	15.4	86.7	26.0
28	1	12.3	57.1	27.0
46	1	22.7	235.1	45.5
48	2	19.0	138.8	47.8

n = número de larvas

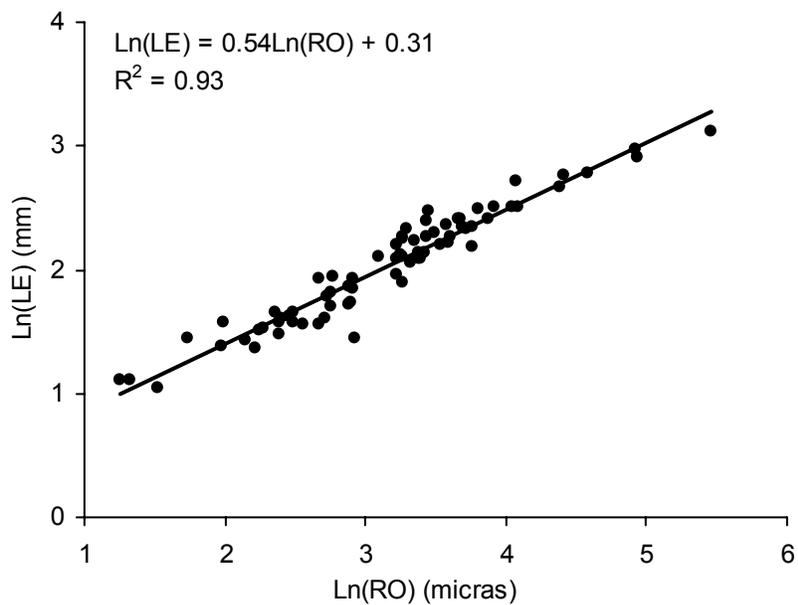
La talla promedio de las larvas a la eclosión fue 3.0 mm LE  $\pm$  0.1 mm, los otolitos estuvieron presentes con un promedio de 3.9 micras de radio  $\pm$  0.5 micras, no se apreciaron marcas de crecimiento. El primer incremento de crecimiento en los otolitos fue observado a los 2 días después de la eclosión posterior al agotamiento del saco de vitelo.

El número de marcas (NM) correspondió a la edad cronológica (EDAD) de las larvas (Fig. 11). La regresión entre (NM) y (EDAD) fue altamente significativa ( $R^2=0.99$ ,  $P<0.001$ ) y la pendiente no difirió significativamente de 1 (t-test=1.12,  $n=72$ ,  $P>0.05$ ).

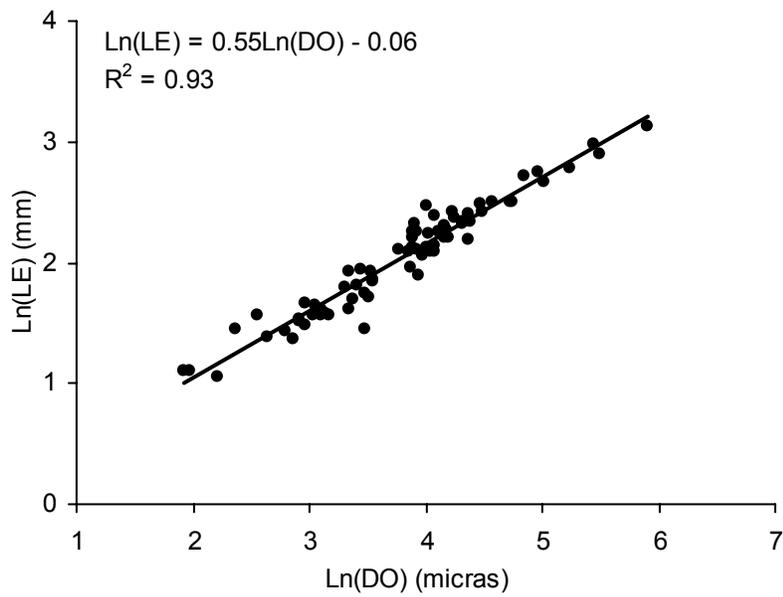
Para evaluar la relación entre el tamaño del otolito y el tamaño de la larva (LE) se utilizó el diámetro (DO) y radio del otolito (RO) (Fig. 12 y 13). En ambos casos la relación fue lineal y significativa ( $R^2>0.90$ ,  $P<0.001$ ) mejor descrita por una regresión Ln-Ln. Lo significativo de estas relaciones justifica la utilización de la micro-estructura y el tamaño del otolito para la determinación de la edad y describir el crecimiento de la larva (Fig. 14). El modelo de Gompertz describe adecuadamente el patrón de crecimiento larval de *O. libertate* y se ajustó significativamente a los datos de EDAD-LE ( $R^2=0.81$ ,  $P<0.001$ ) (StatSoft, 1995).



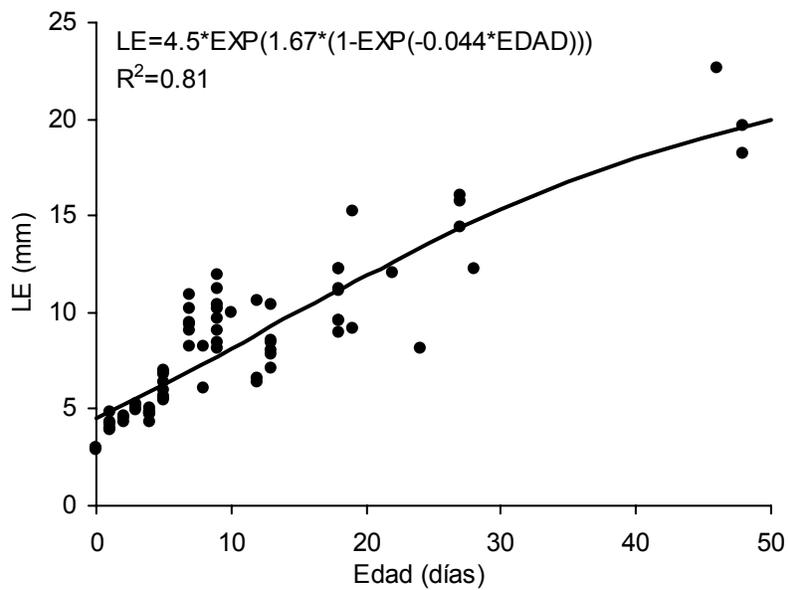
**Figura 11.** Relación entre la edad (días) y número de marcas (NM) en otolitos de las larvas de sardina crinuda *Opisthonema libertate*.



**Figura 12.** Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) de las larvas de sardina crinuda *Opisthonema libertate*



**Figura 13.** Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) de las larvas de sardina crinuda *Opisthonema libertate*.



**Figura 14.** Relación entre la edad (días) y la longitud estándar (LE) en larvas de sardina crinuda *Opisthonema libertate*. La línea es el ajuste del modelo de Gompertz.

### 6.2.3 *Harengula thrissina*

Para esta especie se recolectó una menor cantidad de huevecillos, 1500 aproximadamente. Los huevecillos se distribuyeron en cuatro acuarios con 80 l de agua de mar y temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El cultivo se desarrolló a una densidad aproximada de 4h/l. Los huevecillos eclosionaron al día siguiente, cuando los embriones inician la pigmentación de los ojos. Se alimentó desde el primer día (rotíferos, inicialmente 2 rot/ml), después del día diez se empleó plancton silvestre 1 a 3/ml (copepoditos y nauplios) con tamaño menor a 200 micras hasta el día 15, concluyendo el desarrollo larvario.

Se hizo un muestreo de larvas periódicamente obteniéndose 80 larvas y 134 otolitos en un lapso de 15 días, de las cuales el 55% fueron menores de 10 mm (LE) y el 4.5% por arriba de 15 mm (LE). Teniendo el 40.5% de las larvas entre 10 y 15 mm (LE) (**Tabla 5**). La talla promedio de las larvas a la eclosión fue  $4.6 \text{ mm LE} \pm 0.4 \text{ mm}$ , los otolitos estuvieron presentes con un promedio de 7.3 micras de radio  $\pm 1.0$  micras, no se apreciaron marcas de crecimiento. El primer incremento de crecimiento en los otolitos fue observado un día después de la eclosión posterior al agotamiento del saco de vitelo.

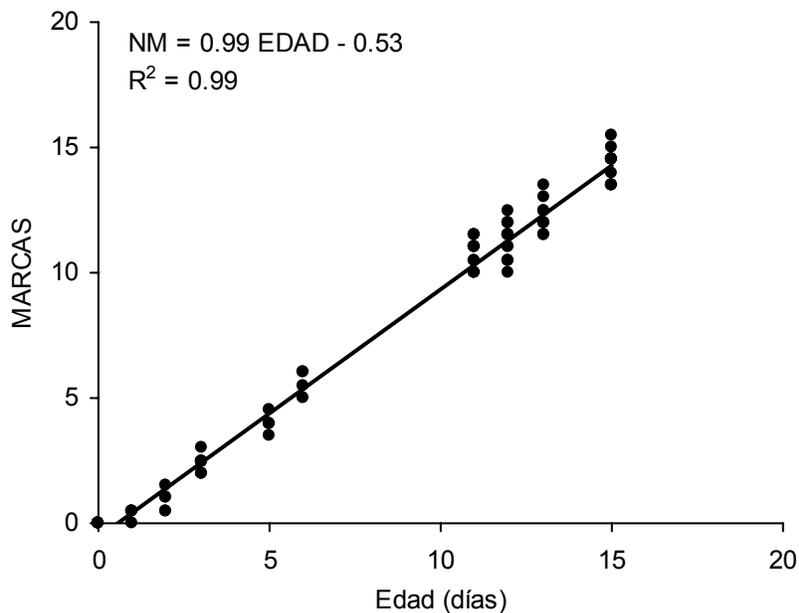
El número de marcas de crecimiento (NM) correspondió a la edad cronológica (EDAD) de las larvas (Fig. 15). La regresión entre (NM) y (EDAD) fue altamente significativa ( $R^2=0.99$ ,  $P<0.001$ ) y la pendiente no difirió significativamente de 1 (t-test = 1.62,  $n=79$ ,  $P>0.05$ ).

**Tabla 5** Número de larvas por edad y promedio: de la longitud estándar, del radio del otolito y del número de marcas para la sardina escamuda *Harengula thrissina*.

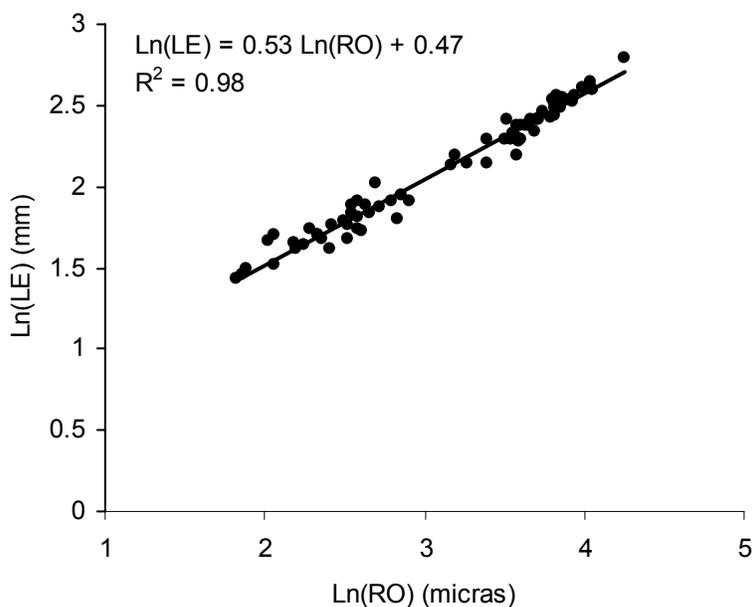
<b>P R O M E D I O</b>				
<b>EDAD</b>	<b>n</b>	<b>LONGITUD ESTÁNDAR</b>	<b>RADIO OTOLITO</b>	<b>NÚMERO MARCAS</b>
(días)		(mm)	(micras)	
0	6	4.6	7.3	0.0
1	4	6.1	12.2	0.4
2	5	5.7	12.2	0.9
3	10	6.3	14.3	2.4
5	5	5.9	11.5	4.0
6	4	7.0	17.9	5.6
11	10	10.0	35.7	10.7
12	15	11.1	40.7	11.3
13	9	11.9	44.5	12.3
15	12	13.0	51.2	14.3

n = número de larvas

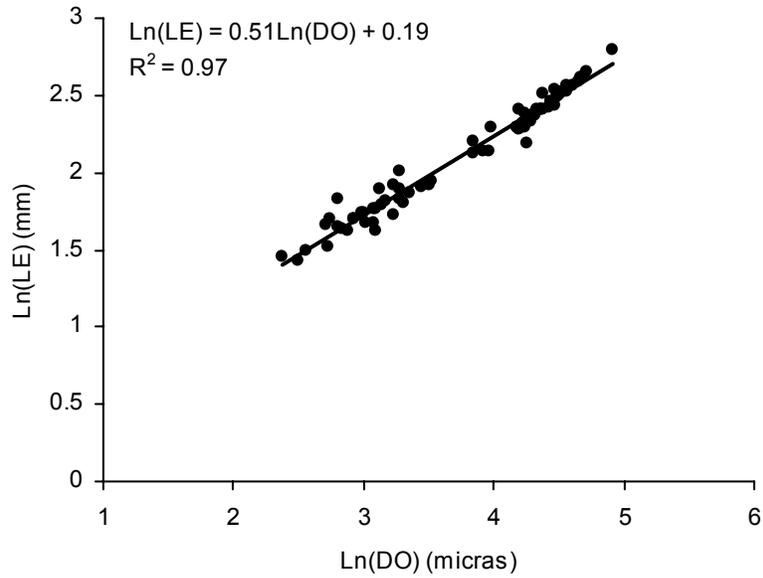
Para evaluar la relación entre el tamaño del otolito y el tamaño de la larva (LE) se utilizó el diámetro (DO) y radio del otolito (RO) (Fig. 16). En ambos casos la relación fue lineal y significativa ( $R^2 > 0.90$ ,  $P < 0.001$ ) y mejor descrita por una regresión Ln-Ln. Lo significativo de estas relaciones justifica la utilización de la micro-estructura y el tamaño del otolito para la determinación de la edad y describir el crecimiento de la larva (Fig. 18). El modelo de Gompertz describe adecuadamente el patrón de crecimiento larval de sardina escamuda y se ajustó significativamente a los datos de EDAD-LE ( $R^2 = 0.86$ ,  $P < 0.001$ ) (StatSoft, 1995).



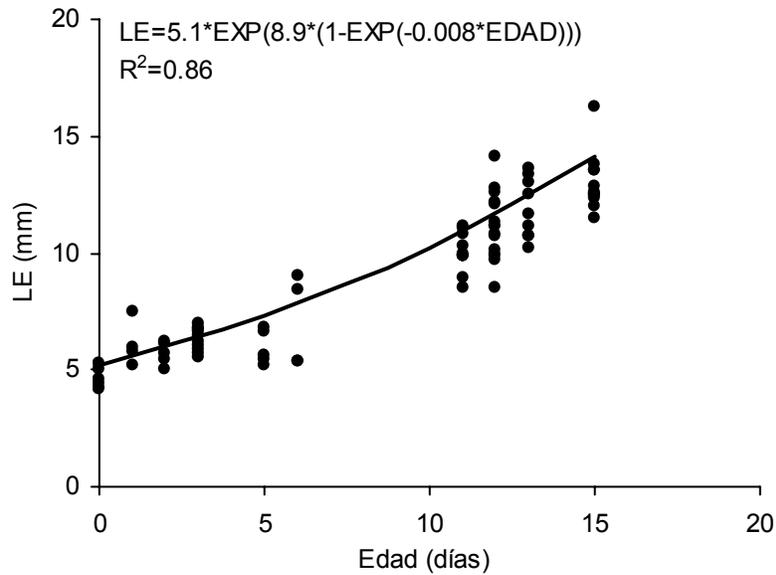
**Figura 15.** Relación entre la edad (días) y número de marcas (NM) en otolitos de larvas de sardina escamuda *Harengula thrissina*



**Figura 16.** Relación Ln-Ln entre el radio del otolito (RO) y la longitud estándar (LE) en las larvas de sardina escamuda *Harengula thrissina*.



**Figura 17.** Relación Ln-Ln entre el diámetro del otolito (DO) y la longitud estándar (LE) de larvas de sardina escamuda *Harengula thrissina*.



**Figura 18.** Relación entre la edad (días) y la longitud estándar (LE) de larvas de sardina escamuda *Harengula thrissina*. La línea es el ajuste del modelo de Gompertz.

## 7.0 DISCUSIÓN

En éste trabajo se validó el patrón diario de formación de las marcas de crecimiento en otolitos de larvas de la sardina Monterrey, de la sardina crinuda y de la sardina escamuda. Geffen (1992) estipula que dentro de los requerimientos para una adecuada validación, está el monitorear una población de edad conocida desde la eclosión hasta la metamorfosis. En este estudio las larvas de las tres especies de sardina se mantuvieron desde 15 a 48 días después de la eclosión, no siendo posible alcanzar la etapa juvenil. Sin embargo, las larvas de la sardina crinuda lograron el estadio de transformación, previo a la metamorfosis.

El primer incremento de crecimiento regular en los otolitos se formó al agotamiento del saco vitelino en las tres especies y de ahí en adelante un incremento diario se añadió hasta el día 24 para la sardina Monterrey, 48 para la sardina crinuda y 15 en la sardina escamuda. Los otolitos estuvieron presentes al momento de la eclosión pero no se observaron marcas de crecimiento, similar a lo detectado en *Gadus morhua* (Radtke y Waiwood, 1980) y en *Pollachius virens* (Quiñónez-Velázquez, 1999). En algunas especies de peces se forman algunas marcas de crecimiento durante el desarrollo del embrión, ese es el caso de *Fundulus heteroclitus* y *Tilapia nilotica* (Watanabe *et al.*, 1982), de *Melanogrammus aeglefinus* (Quiñónez-Velázquez, 1999), de *Engraulis encrasicolus* (Palomera *et al.*, 1988) entre otras especies (Brothers *et al.*, 1976; Struhsaker y Uchiyama, 1976; Townsend y Graham, 1981; Geffen, 1982; Lough *et al.*, 1982; Ré, 1983a; Bolz y Lough, 1983; McGurk, 1984; Butler y Rojas-De Mendiola, 1985; Moksness, 1992).

Para varias especies de clupeiformes el primer incremento periódico es depositado en los otolitos al agotamiento del saco vitelino, cuando los ojos están pigmentados y la mandíbula es funcional (Brothers *et al.*, 1976; Butler y Rojas de-Mendiola, 1985; Castillo *et al.*, 1985). Lasker (1964) comenta que las larvas de la sardina Monterrey *Sardinops caeruleus* desarrollo mandíbulas funcionales y ojos pigmentados a los tres días después de la eclosión a 20 °C, en el presente estudio para la misma especie esas características de observaron a los dos días después de la eclosión a una temperatura de 21 °C.

La validación se considera como un medio para establecer la interrelación temporal entre el número de incrementos de crecimiento y la edad; y permite además evaluar la relación entre el crecimiento somático y del otolito (Geffen, 1987). La talla promedio de las larvas de sardina Monterrey a la eclosión fue 4.2 mm (LE) y de los otolitos de 5.3 micras de radio; el primer incremento de crecimiento en los otolitos fue observado a los 2 días después de la eclosión, coincidiendo con el agotamiento del saco de vitelino, con 5.4 mm (LE) en promedio. A ese momento del desarrollo, las larvas ya tenían los ojo pigmentados, y la boca y el tubo digestivo funcionales (Lasker, 1964). El crecimiento entre el nacimiento y la absorción del vitelo fue de más del 25%. La talla promedio de las larvas de crinuda en la eclosión fue 3.0 mm (LE), y de los otolitos 3.9 micras de radio, al momento del agotamiento del vitelo las larvas tenían en promedio 4.5 mm (LE) y se observó la primera marca de crecimiento. El otolito presentó 10.1 micras de radio, a ese momento las larvas presentaron los ojos pigmentados, y la boca y el tubo digestivo funcionales. El crecimiento entre el nacimiento y la absorción del vitelo fue del 15% y en 10 días alcanzaron 10 mm (LE).

Finalmente, la talla promedio de las larvas de la sardina escamuda a la eclosión fue 4.6 mm (LE), de los otolitos fue 7.3 micras de radio. El primer incremento de crecimiento en los otolitos fue observado un día después de la eclosión posterior al agotamiento del saco de vitelo, a la longitud de 6.1 mm (LE) y las larvas presentaban pigmentación de los ojos, boca y tubo digestivo funcionales. El crecimiento entre el nacimiento y la absorción fue más del 33%, el incremento en longitud mayor de las tres especies durante el periodo de saco vitelino.

La primera marca de crecimiento, la cual Radtke (1983) denominó “marca de saco vitelino” (**MSV**), se relaciona con la absorción de vitelo. Los incrementos de crecimiento formados inmediatamente después de la marca de saco vitelino representan un lapso corto, reflejando un período crítico en el proceso del cambio de alimentación endógena por exógena. Brothers (1981) señaló que estos períodos afectan la micro-estructura del otolito en cambios en la amplitud y densidad óptica en los incrementos de crecimiento pudiendo estar relacionados a una variedad de cambios en el inicio del ciclo de vida del pez. La eclosión, absorción del vitelo, cambio en la alimentación, habitat, transformación larval, pueden todos influir en el arreglo y establecimiento del patrón de formación de los incrementos de crecimiento. Existiendo patrones amplios de ciclo de vida que consistentemente difieren entre taxa, es posible esperar encontrar en la microestructura del otolito evidencias de eventos al principio del ciclo de vida lo cual es de valor sistemático.

Por otro lado Uchiyama *et al.* (1986) establecen que la calidad de las condiciones del laboratorio no son usualmente cuestionables si las evidencias de formación de

incrementos diarios pueden ser representadas. Las condiciones de cultivo y alimentación durante el presente trabajo se consideraron adecuadas y consideramos que los resultados no fueron influenciados de manera negativa. Otros autores, en las mismas instalaciones y similares condiciones, han desarrollado larvas de otras especies de peces, Matus-Nivón *et al.* (1990) presentan los resultados con 22 especies de larvas y juveniles de peces marinos, durante 1984 a 1989. Las condiciones de alimentación en cuanto al tipo de presa, sucesión y densidades varían dependiendo de la especie; al respecto se tienen diversas referencias: sobre la curvina *C. parvipinnis* (Ramírez-Sevilla, 1988; Contreras-Olguín, 1994) del mojarrón *Calamus brachysomus* y la sardina *Opisthonema libertate* (Matus-Nivón *et al.*, 1989 a y b), del peluquero *Chaetodipterus zonatus* (Martínez-Pecero *et al.*, 1990), del sol mexicano *Achirus mazatlanus* (Ortíz-Galindo *et al.*, 1990) y de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* (Ortíz-Galindo, 1991).

Moksness (1992) señaló que la microestructura del otolito ha demostrado ser altamente útil en estimaciones de edad, fechas de nacimiento, estimación de tasas diarias de crecimiento en longitud y en peso, en la estimación de tasas de mortalidad, verificar o descartar hipótesis sobre el reclutamiento, identificar cohortes de larvas, identificar de qué parte del periodo de reproducción provienen los reclutas y su patrón de crecimiento. Las fechas de eclosión de juveniles de la anchoveta norteña fueron calculadas por primera vez por Methot (1983) a partir de la edad en días y fechas de captura, y él mostró que estas fechas podrían ser empleadas para identificar periodos de altas sobrevivencias durante los desoves de peces pelágicos.

En el presente trabajo el modelo de Gompertz se ajustó adecuadamente ( $r^2 > 0.80$ ) a los datos de edad-talla de las tres especies de sardina. La tasa de crecimiento diaria obtenida para las tres sardinias *S. caeruleus* 0.40; *O. libertate* 0.49; y *H. thrissina* 0.54, son comparables a las obtenidas por otros autores en clupeidos que van desde: 0.41 mm/día hasta los 12 mm de LE en la sardina Pilchard (Ré, 1983b), 0.7 mm/día para la sardina del Japón (Zenitani *et al.*, 1996) hasta 0.8 mm/día para *Sardinops sagax* (Butler y Rojas-de Mendiola, 1985).

En los 1980s la incorporación de la técnica de determinación de edad en otolitos dentro de la investigación biológico-pesquera ha sido útil para conocer mejor la dinámica poblacional de las poblaciones explotadas (Watanabe *et al.*, 1988). El análisis de la micro-estructura del otolito se ha depurado para la estimación del crecimiento somático. En ellos se encuentran el análisis de series de tiempo; modelos edad-temperatura-crecimiento (Crecco y Savoy, 1985, 1987; Campana y Hurley, 1989) y técnicas de rastreo de cohortes entre otras (Fortier y Quiñónez-Velázquez, 1998). La agrupación en intervalos de fechas de nacimiento durante la estación de reproducción permitió mostrar la significancia de eventos meteorológicos e hidrográficos en la supervivencia y separar el crecimiento denso-dependiente del denso-independiente (Savoy y Crecco 1988).

Existen antecedentes sobre la determinación de edad y descripción del crecimiento larval (Butler y Rojas-De Mendiola, 1985) y juvenil (Quiñónez-Velázquez *et al.*, 2000) para la sardina Monterrey *S. caeruleus*, pero en esos trabajos se asumió una periodicidad diaria en la formación de los incrementos de crecimiento. Para las

sardinas crinuda (*O. libertate*) y escamuda (*H. thrissina*) no existen antecedentes al respecto. Los resultados permiten validar la formación diaria de los incrementos de crecimiento en los otolitos durante la etapa de larva temprana hasta previo a la metamorfosis de las sardinas Monterrey, crinuda y escamuda.

## 8.0 CONCLUSIONES

- a) Los embriones de las sardinas: monterrey, crinuda y escamuda presentan al nacer otolitos sin marcas de crecimiento.
- b) Posteriormente, al absorber el vitelo, forman la primera marca de crecimiento, la cual se denomina asimismo “marca de saco vitelino”, este crecimiento depende del vitelo y el aporte lo hace la madre.
- c) Se presenta un grupo de 4 a 5 marcas de crecimiento muy cercanas, el crecimiento es mínimo comparado al crecimiento que aporta la absorción de vitelo. Estas marcas representan un periodo crítico, relacionado con el cambio de alimentación endógena por exógena cuando “aprenden a comer”, y en el cual es evidente que se adquiere eficiencia para capturar a las presas.
- d) Posteriormente presentan una marca regular promedio por día y también se observan los cambios de crecimiento provocados por el cambio de dieta, particularmente al día 18 (nauplios de artemia recién nacida) cuando crecen aproximadamente el triple (las amplitudes, entre marcas de crecimiento se observan de una a tres micras), principalmente al aportar mayor biomasa y porcentaje de proteínas en los casos de las sardinas monterrey y crinuda.
- e) En México se tiene la infraestructura técnica y humana desde mediados de los 1980s para continuar haciendo estudios de validación de edad en laboratorio sobre marcas de crecimiento en otolitos, con larvas de peces marinos.

## 9.0 RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS POSTERIORES

Continuar este tipo de estudios con especies de peces pelágicos, dado que ellas poseen otolitos planos, los cuales sin ningún tratamiento adicional pueden ser interpretados.

En la recolecta de huevecillos por medio de arrastres superficiales de plancton se recomienda conocer la distribución de los desoves en el tiempo y el espacio, sobre todo el intervalo en horas cuando se presentan los desoves. De tal forma que la recolecta de desoves planctónicos permite encontrar "parches de huevos" (muy abundantes) que normalmente se encuentran "limpios" (casi sin plancton).

Cuando se obtienen huevos por medio de la captura de adultos maduros, los cuales se desovan mecánicamente se obtienen mayores cantidades de huevecillos, de la misma especie y en el mismo estadio de desarrollo lo que permite resultados más rigurosos. Particularmente en este procedimiento los desoves así obtenidos se enjuagan en tamices, los huevos aún no están totalmente hidratados su diámetro es menor y no corresponde al conocido para cada especie y sin el cuidado correspondiente al "limpiarlos" se pueden perder, en estos casos se recomienda enjuagar el desove en tamices con luz de malla 50% menor al diámetro del huevo hidratado, porque la hidratación se lleva a cabo aproximadamente en un 60% fuera del ovario de la hembra. La malla de 350 micras podría captar a la mayoría de los huevos que se pueden obtener de esta forma.

En los casos de extraer muestras de organismos desarrollados en laboratorio es recomendable extraer los otolitos de larvas vivas dado que se facilita notablemente el proceso de extracción, sobre todo en los primeros días de edad.

Se aconseja emplear timol en agua o glicerina para prevenir el crecimiento de hongos, antes de fijar con resina como lo señalan Chilton y Beamish (1982). Porque después de 10 años, se empezó a perder material por crecimiento de hongos en la matriz orgánica de los otolitos. En el Almacén de Muestras del Laboratorio de Biología Experimental al revisar las muestras en 1999 (obtenidas en 1985-86) se observó que el 40% de los otolitos menores de 80 micras se perdieron por acción bacteriana o fúngica. Actualmente existen sistemas de digitalización de imágenes (microscopio enlazado a una computadora por medio de una cámara de video) los cuales permiten almacenar imágenes de las muestras en Disco-Compacto, hacer mediciones y conteos más fácilmente, lo que evitará la pérdida de información de muestras defectuosamente preparadas o almacenadas.

La alta densidad de la resina requiere en ocasiones adelgazarse con xilol, si se emplea un exceso de solvente será necesario un mayor tiempo de secado. Struhsaker y Uchiyama (1976) recomiendan el uso de cubreobjetos del No.1 lo cual puede ser un verdadero problema, sobre todo al usar resina muy diluida (muy líquida), al evaporarse el solvente, el cubre-objetos podría hacer presión sobre el otolito y provocarle una o más fracturas, corriendo el riesgo de perder la muestra. Con el tiempo después de no haber hecho una limpieza correcta de los otolitos, la resina inadecuada podría afectar la muestra.

Durante la etapa previa a la transformación (en las págs. 29-30) se describe un comportamiento muy particular que termina con la muerte de los organismos. Este comportamiento se señala en Matus-Nivón (1994) como otro probable segundo periodo crítico. Lo *et al.*, (1989) también encuentran un segundo periodo crítico (altas mortalidades) en organismos silvestres con longitud semejante. Particularmente para estas especies, en estudios de laboratorio y durante ésta etapa sugiero experimentar: con volúmenes de agua mayores, densidades de organismos más altas, recipientes circulares, con colores diferentes y asimismo distintos niveles de iluminación.

Después de efectuar la validación, en la que se observa cuándo se presenta y la magnitud del primer anillo (más relacionados con la temperatura y la herencia materna) los subsiguientes anillos así como la amplitud entre las marcas, se recomienda experimentar en laboratorio con el efecto de la cantidad y calidad del alimento, así como la temperatura y el fotoperiodo, sobre la frecuencia y amplitud de las marcas, formación del primer anillo de crecimiento, así como de las subsiguientes marcas y su relación con los parámetros medioambientales así como de procesos fisiológicos: desarrollo de estructuras (aletas, escamación, cambios de larva a juvenil) y posteriormente cambios relacionados con cambio de nicho, hábitat, incluidos reclutamiento reproductivo y migraciones.

## 10.0 BIBLIOGRAFIA

- Ahlstrom, E. H. (1943). Studies of the pacific pilchard or sardine (*Sardinops caerulea*). 4. Influence of temperature on the rate of development of pilchard eggs in nature. Chicago, Fish and Wildlife Service: 23-26.
- Alvarado Castillo, R; Felix Uruga, R. 1996. Age and growth of the Pacific sardine *Sardinops caeruleus* (Pisces:Cleupeidae) at Isla de Cedros, Baja California, Mexico, during 1985 and 1986. Bol. Invest. Mar. Cost. Vol. 25, pp. 77-86.
- Amador-Buenrostro, A. 2003. Glosario de Términos Oceanográficos (Oceanografía Física). Departamento de Oceanografía Física Desarrollado en CICESE UNIDAD LA PAZ . <http://bcs.cicese.mx/glosario-OceFis/glosario-u.pdf>.
- Anónimo, 1984a. Atlas de distribución y densidad de huevos y larvas de clupeidos y engraulidos en la costa occidental de Baja California Sur 1982-1984. Atlas CICIMAR 1. pp 1-56.
- Anónimo, 1984b. Atlas de distribución y densidad de huevos y larvas de clupeidos y engraulidos en el complejo Bahía Magdalena-Bahía Almejas 1981-1983. Atlas CICIMAR 2. pp 1-121.
- Bailey, K.M. 1984. Comparison of laboratory rates of predation on five species of marine fish larvae by three planktonic invertebrates: effects of larval size on vulnerability.- Marine Biology 79:303-309.
- Balon, E.K. 1975b. Terminology of intervals in the fish development. J. Fish. Res. Board Can. 32: 1663-1670.

- Barkman, R.C. 1978. the use of the otolith growth rings to age young Atlantic silversides, *Menidia menidia*. Trans. Am. Fish. Soc. 107: 790-792.
- Bolz, G. R., and R. G. Lough. 1983. Growth of larval Atlantic cod, *Gadus mohrua*, and haddock *Melanogrammus aeglefinus*, on Georges Bank, spring 1981. Fish. Bull., U.S., 81:827-836.
- Booman, C; A. Folkvord; J.R. Hunter. 1991. Responsiveness of starved northern anchovy *Engraulis mordax* larvae to predatory attacks by adult anchovy. Fishery Bulletin 89(4):707-711.
- Brothers, E.B. 1984. Otolith studies. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication 1:50-57.
- Brothers, E. B., C. Matthews and R. Lasker. 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. Fish. Bull. U. S. 74:1-8.
- Brothers, E. B., and W. N. McFarland. 1981. Correlation between otolith microstructure, growth, and life history transitions in newly recruited French grunts [*Haemulon flavolineatum* (Demarest), Haemulidae], p. 369-374. In R. Lasker and K Sherman (eds.), The early life history of fish. Rapp. R.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer, 178.
- Butler, J. L. and B. Rojas De Mendiola. 1985. Growth of larval sardines of Peru. CalCOFI Rep., Vol. XXVI. 1985.
- Campana, S. E. 1989. Otolith microstructure of three larval gadids in the Gulf of Maine, with inferences on early life history. Can. J. Zool. 67:1401-1410.

- Campana, S.E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods *Journal of Fish Biology* 59(2):197-242.
- Campana, S. E., and P. C. F. Hurley. 1989. An age-and-temperature-mediated growth model for cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae on the Scotian Shelf. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46:603-613.
- Campana, E. S. and D. J. Neilson. 1982. Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 937-942.
- Carlander, K.D. 1987. A history of scale age and growth studies of North America freshwater fish, p.3-14. *In*: R.C. Summerfelt and G.E. Hall [ed.]. *Age and growth of fish*. Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa.
- Casas-Valdéz, M. 1983. Distribución en tiempo y espacio de las especies de sardina y macarela en Bahía Magdalena, B.C.S., México. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), I.P.N. La Paz, B.C.S. México: 176p.
- Castillo, G., E. Aguilera, G. Herrera, P. A. Bernal, J. L. Butler, J. Chong, H. Gonzalez, C. Oyarzun, C. Veloso. 1985. Larval growth rates of the Pacific sardine *Sardinops sagax* off central Chile, determined by daily ring counts in otoliths. *Biol. Pesquera, Chile* 14: 3-10.
- Chilton, D.E., and R.J. Beamish. 1982. Age determination methods for fishes studied by the groundfish program at the Pacific Biological Station. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 60:102p.

- Contreras-Olguin, M. 1994. Crecimiento, sobrevivencia y manejo de los estadios iniciales de desarrollo de la curvina *Cynoscion parvipinnis* ayres (pisces: sciaenidae). Tesis Maestría. CICIMAR. 76 pp.
- Crecco, V.A., and T.F.Savoy.1985. Effects of biotic and abiotic factors on growth and relative survival of young American shad. *Alosa sapidissima*, in the Connecticut River. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 1640-1648.
- Crecco, V.A., and T.F. Savoy. 1987. Review of recruitment mechanisms of the American shad: the critical period and match-mismatch hypotheses. Am. Fish. Soc. Symp. 1 : 455-468.
- Félix-Uraga, R. 1990. Growth of *Sardinops sagax caerulea* in Magdalena Bay, Mexico. Investigaciones Marinas CICIMAR, 5(1): 27-31.
- Félix-Uraga, R. 1992. Age composition of Pacific sardine *Sardinops caeruleus* caught in Bahia Magdalena, Baja California Sur, Mexico from 1981 to 1991. Investigaciones marinas CICIMAR, 7(1): 9-13.
- Felix-Uraga, R; Alvarado-Castillo, RM; Carmona-Pina, R. 1996. The sardine fishery along the western coast of Baja California, 1981 to 1994. CALCOFI Rep., 37: 188-192.
- Fortier, L., and C. Quiñónez-Velázquez. 1998. Dependence of survival on growth in larval pollock *Pollachius virens* and haddock *Melanogrammus aeglefinus*: a field study based on individual hatchdates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 174: 1-12.
- Geffen, A.J. 1982. Otolith ring formation in relation to growth rate in herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Mar. Biol. 71: 317- 326.

- Geffen, A. J. 1983. The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., embryos. *J. Fish Bol.* 23: 467-474
- Geffen, A. J. 1987. Methods of validating daily increment deposition in otoliths of larval fish, p. 223-240. *In* : The age and growth of fish. R. C. Summerfelt and G. E. Hall (eds.), Iowa State University press, Ames, Iowa.
- Geffen, A.J. 1992. Validation of otolith increment deposition rate, p. 101-113. *In* D.K. Stevenson and S.E. Campana [ed.] Otolith microstructure examination and analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117.
- Hederström, H. 1959. Observation on the age of fishes. *Rep. Inst. Freshwater Res. Drottingholm*, 40: 161- 164.
- Hernández-Vázquez, S. 1983. Análisis y normalización del esfuerzo pesquero de la flota sardinera de Bahía Magdalena, B.C.S., México (1972-1981). Tesis Maestría. CICIMAR. 142 pp.
- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of the North Europe viewed in the light of the biological research. *Cons. Perm. Int. Explor. Mer. Rapp. and Proc. Verb.* 20, 228 p.
- Jacobson, L. D.; J.A.A. De Oliveira; M. Barange; M.A. Cisneros-Mata; R. Felix-Uraga; J.R. Hunter; J.Y. Kim; Y. Matsuura; M. Niquen; C. Porteiro; B. Rothschild; R.P.Sanchez; R. Serra; A. Uriarte; T. Wada. 2001. Surplus production, variability, and climate change in the great sardine and anchovy fisheries. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58(9): 1891-1903.
- Jones, C. 1986. Determining age of larval fish with the otolith increment technique. *Fish. Bull., U. S.* 84: 91-103.

- Jones, C. 1992. Development and application of the otolith increment technique. In: Stevenson, D.K. Campana, S.E. (Eds.), Otolith Microstructure Examination and Analysis. Can. Fish. Aquat. Sci., 117: 1-11.
- Kimura, M. and C. Blunt. 1971. Age composition of sardine landings on the Pacific coast of the United States and Mexico in 1964-1965. Calif. Fish Game, 57(2):107-112.
- Laroche, J.L., S.L. Richardson, and A.A. Rosenberg. 1982 . Age and growth of a pleuronectid, *Parophrys vetulus*, during the pelagic larval period in Oregon coastal waters. Fish. Bull. U.S. 80:93-104.
- Lasker, R. 1964. An experimental study of the effect of temperature on the incubation time, development, and growth of Pacific sardine embryos and larvae. Copeia 1964:399-405.
- Lasker, R. 1981. Marine Fish Larvae - Morphology, Ecology, and Relations to Fisheries. Nat. Mar. Fish. Serv., WASHINGTON SEA GRANT PROGRAM, SEATTLE, WA (USA), , 144 pp.
- Lasker, R. 1985. What limits clupeoid production?. Proceedings Of The Symposium On The Biological Characteristics Of Herring And Their Implication For Management., CAN. J. AQUAT. SCI., 42(no. suppl. 1): 31-38.
- Lillelund, K., and R. Lasker. 1971. Laboratory studies of predation by marine copepods on fish larvae. Fish. Bull. USA 69:655-667.

- Lough, R. G., M. Pennington, G. R. Bolz., Y A. A. Rosenberg. 1982. Age and growth of larval Atlantic herring, *clupea harengus* L., in the Gulf of Maine-Georges bank based on otolith growth increments. *Fis. Bull.* 80(2): 187-199.
- Lo, N.C.H., J.R. Hunter, and R.P. Hewitt .1989. Precision and bias of estimates of larval mortality . *Fish. Bull. U.S.* 87:399-416.
- Martínez-Pecero, R.; Matus-Nivón, E.; Ramírez-Sevilla, R.; Hernández-Ceballos, D.E.; Contreras-Olguín, M . 1990 . Eggs, larvae and juveniles of the spadefish *Chaetodipterus zonatus* (Girard) (Pisces: Ehippididae). *Revista de biologia tropical. San Jose [REV. BIOL. TROP.]*, vol. 38, no. 1, pp. 71-78.
- Matus-Nivón, E.; Ramírez-Sevilla, R.; Martínez-Pecero, R.; Ortíz-Galindo, J.L. 1989a. Description of larval and juvenile of Pacific porgy *Calamus brachysomus*. *Investigaciones marinas CICIMAR. La Paz [INVEST. MAR. CICIMAR]*, vol. 4, no. 2, pp. 141-150.
- Matus-Nivón, E.; Ramírez-Sevilla, R.; Ortíz-Galindo, J.L.; Martínez-Pecero, R.; González-Acosta, B. 1989b. The egg and larvae of the Pacific sardine *Opisthonema libertate* (Gunther). *Revista de biologia tropical. San Jose [REV. BIOL. TROP.]*, vol. 37, no. 2, pp. 115-125.
- Matus-Nivón, E; Ramírez-Sevilla, R; Martínez-Pecero, R; Ortíz-Galindo, J.L. Assessment of the aquaculture potential of eight marine fish species from the Mexican Pacific, based on their early life stages. 1990 . Lanza Espino, Gde la; Arredondo Figueroa, J (eds). (THE AQUACULTURE IN MEXICO: FROM CONCEPTS TO PRODUCTION.), LA ACUICULTURA EN MEXICO: DE LOS CONCEPTOS A LA PRODUCCION., 1990, 316 pp.

- Matus-Nivón, E. 1994. Primeras fases de vida de la sardina crinuda *Opisthonema libertate* (Günther) (Clupeidae). Tesis Maestría. CICIMAR. 88 pp.
- May, R.C. 1974. Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. *In* The Early Life History of Fish ( ed. J.H.S. Blaxter), Springer-Verlag, NY, 765 pp.
- McGurk, M. D. 1984. Ring deposition in the otoliths of larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. Fish. Bull. U. S. 82:113-120.
- Methot, R.D., Jr. 1983. Seasonal variation in survival of larvae northern anchovy, *Engraulis mordax*, estimated from the age distribution of juveniles. Fish. Bull. U.S. 81:741-750.
- Method, R.E., and D. Kramer. 1979. Growth of northern anchovy *Engraulis mordax*, larvae in the sea. Fish. Bull. U.S., 77:413-423.
- Moksness, E. 1982. Food uptake, growth and survival of capelin larvae (*Mallotus villosus* Muller) in an outdoor constructed basin. Fisk. Dir. Skr. Ser. Havunders., 17: 267-285.
- Moksness, E. 1992. Validation of daily increments in the otolith microstructure of Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus*). ICES J. mar Sci., 49: 231-235.
- Moksness, E., and V. Wespestad. 1989. Ageing and backcalculating growth rate of Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*) larvae by reading daily otolith increments. Fish. Bull. U.S., 87: 509-518.
- Morales-Bojorquez, E; , V.M. Gómez-Muñoz; R. Félix-Uraga; R.M. Alvarado-Castillo. 2003. Relation between recruitment, sea surface temperature, and density-

- independent mortality of the Pacific sardine (*Sardinops caeruleus*) off the southwest coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Sci. Mar.* 67(1):25-32.
- Mugiya, Y. 1987a. Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish. Bull. U.S.*, 87: 395-401.
- Ortiz-Galindo, J. L. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis Maestría. CICIMAR. 65 pp.
- Ortiz-Galindo, J.L.; Matus-Nivón, E.; Ramírez-Sevilla, R.; González-Acosta, B. 1990. Embryo, larvae, and pre-juvenile of the Mexican soleid *Achirus mazatlanus* (Pisces: Soleidae). *Revista de biología tropical. San Jose [REV. BIOL. TROP.]*, vol. 38, no. 2A, pp. 195-204.
- Palomares-Garcia, J.R. and R. Vera-Alejandre. 1995. Predation upon larvae of the Pacific sardine *Sardinops sagax* by cyclopoid copepods. *J. Crust. Biol.* 15(1):196-201.
- Palomera, I., B. Morales-Nin and J. Leonard. 1988. Larval growth of anchovy *Engraulis encrasicolus*, in the western Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 99:283-291.
- Pannella, G. 1971. Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173: 1124-1127.
- Pannella, G. 1974. Otolith growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. *In* T. B. Bagenal (editor), *The ageing of fish*, p. 28-39. Unwin Brothers, Ltd. Surrey.

- Parrish, R.H., R. Serra and W.S. Grant. 1989. The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: Their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46(11):2019-2036.
- Quiñónez-Velázquez, C. 1999. Age validation and growth of larval and juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, and pullock, *Pollachius virens*, on the Scotian Shelf. *Fish. Bull.* 97:306-319.
- Quiñónez-Velázquez, C., M.O. Nevarez-Martinez and M.G. Gluyas-Millan. 2000. Growth and hatching dates of juvenile pacific sardine *Sardinops caeruleus* in the Gulf of California. *Fish. Res.* 2: 99-106.
- Quiñónez-Velázquez, C., Alvarado-Castillo y R; R. Felix-Uraga. 2002. Relación entre el crecimiento individual y la abundancia de la población de la sardina del Pacífico *Sardinops caeruleus* (Pisces:Cleupeidae) (Girard 1856) en Isla de Cedros, Baja California, Mexico. *Rev. de Biol. Mar. y Ocean.* 37 (1): 1-8.
- Radovich, J. 1982. The collapse of the California sardine fishery: What have we learned?. *CALCOFI Rep.*, vol. 23, pp. 56-78,
- Radtke, R. L. 1978. The formation and growth of otoliths in the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*. Ph. D. Thesis, University of South Carolina, Columbia, South Carolina. 57 p.
- Radtke, R.L. 1983. Otolith formation and increment deposition in laboratory reared spikjack tuna, *Euthynnus pelamis*, larvae. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 8:49-59.
- Radtke, R. L. 1984a. Formation and structural composition of larval striped mullet otoliths. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 113:186-191.

- Radtke, R.L. 1984b. Scanning electron microscope evidence for yearly growth zones in giant Bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, otoliths from daily increments. Fish. Bull., U.S. 82:434-440.
- Radtke, R. L. and K. G. Waiwood. 1980. otolith formation and body shrinkage due to fixation in larval cod (*Gadus morhua*). Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 929: iii + 10 p.
- Radtke, R. L. and J. M. Dean. 1982. Increment formation in the otoliths of embryos, larvae and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclinus*. Fish. Bull. U.S. 80(2): 201-215.
- Ramírez-Sevilla, R. 1988. Biología del desarrollo temprano de *Cynoscion parvipinnis* Ayres (Pisces: Sciaenidae) y sus implicaciones acuaculturales. Tesis Maestría, ENCB – IPN. México, D.F. 87 pp.
- Ramirez-Sevilla, R., R. Rueda-Jasso, J.L. Ortiz-Galindo y B. Gonzalez-Acosta. 1991. Metodología para el cultivo experimental del rotífero *Brachionus plicatilis*. Inv. Mar. CICIMAR. 6(2):287-290
- Ramirez-Sevilla, R., R.E. Martínez-Pecero, E. Matus-Nivon, J.L. Ortiz-Galindo y M. Contreras-Olguin. 1992. Tasas de desarrollo de *Sardinops sagax caeruleus* de 19.6 a 27°C. Inv. Mar. CICIMAR. 7(2):123-125
- Ré, P. 1983a. Daily growth increments in the sagitta of Pilchard larvae *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) (Pisces: Clupeidae). Cybium, 7(3):9-15.
- Ré, P. 1983b. Growth of pilchard larvae, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) in relation to some environmental factors. Investigación Pesquera, 47(2):277-283.

- Reibisch, J. 1899. Über die Eizahl de Pleuronectes platessa und die Alterbestimmung dieser form aus den Otolithen. *Wiss. Merres. Ab. Kiel [N. F.]* 4: 231- 248.
- Rice, J.A. 1987. Reliability of age and growth-rate estimates derived from otolith analysis, p. 167-176. *In* R.C. Summerfelt and G.E. Hall [ed.]. *Age and growth of fish.* Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa.
- Rice, J. A., Crowder, B. and Binkowski, F. P. 1985. Evaluating Otolith Analysis for Bloater *Coregonus hoyi*: Do Otoliths Ring True? *Transactions of the American Fisheries Society* 114: 532-539.
- Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 191:382p.
- Rodriguez-Sánchez, R., S. Hernandez, D. Lluch B., R Felix U., S. Ortega G., A Villa A., G. Ponce D y D.B. Lluch C. 1996. Pesquería de pelágicos menores (Sardinas y Anchovetas), *in*: Casas V.,M. & G Ponce D. (eds.) *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur.* Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno del Estado de Baja California Sur, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN y Centro de Estudios Tecnológicos del Mar de La Paz, SEP. Vol. 1: 317-350
- Savoy T.F., and V.A. Crecco. 1988. The timing and significance of density-dependent and density-independent mortality of American shad, *Alosa sapidissima*. *Fish. Bull. U.S.* 86:467-482.

- Secor, D.H, J.M. Dean and E.H. Laban. 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination. *In*: Stevenson, D.K. Campana, S.E. (Eds.), Otolith Microstructure Examination and Analysis. Canada, Fish. Aquat. Sci., 117:19-57.
- Sokal, R.R.. Rohlf, J.J. 1995. The principles and practice of statistics in biology research. Biometry. 2nd Edition. Freeman. San Francisco, 673 PP
- StatSoft, Inc., 1995. STATISTICA for Windows (Computer program manual). StatSoft Inc. Tulsa, OK, 1878 pp.
- Struhsaker, P., and J. H. Uchiyama. 1976. Age and growth of the nehu, *Stolephorus purpureus*, from the Hawaiian Islands as indicated by daily growth increments of sagittae. Fish. Bull., U. S., 74: 9-17.
- Taubert, B. D. and D. W. Coble. 1977. Daily rings in otoliths of three species of *Lepomis* and *Tilapia mossambica*. J. Fish. Res. Board Can. 34:332-340.
- Theilacker, G. H. 1980. Changes in body measurements of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other fishes due to handling and preservation. Fish. Bull. U. S. 78: 685-692.
- Theilacker, G. H. 1986. Feeding ecology and growth energetics of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. MS.
- Torres-Villegas, J.R., C.G. García-Melgar, R. I. Ochoa-Báez y V.A. Levy-Pérez. 1985. Parámetros reproductivos de las poblaciones de *Opisthonema libertate* (Günther) (Pisces: Clupeidae) y discusión sobre su evaluación por producción de huevos, en Bahía Magdalena, B.C.S., México. Inv. Mar. CICIMAR, 2: 45-58.

- Torres-Villegas, R., R. Reiniecke, y R. Rodríguez-Sánchez. 1986. Ciclo reproductor de sardina ( *Sardinops sagax*) en el Golfo de California. Cien. Mar. CICIMAR 3, 52-68.
- Townsend, D.W., and J.J. Graham.1981. Growth and age structure of larval Atlantic herring, *Clupea harengus harengus*, in the Sheepscot River estuary, Maine as determined by daily growth increments in otoliths. Fish. Bull. U.S. 79:123-130.
- Victor, B.C.1982. Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses, *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus*. Mar. Biol. 71 : 203-208.
- Victor, B.C. 1986. Duration of the planktonic larval stage of one hundred of Pacific and Atlantic wrasses (family: Labridae) Mar. Biol., 90:317-326
- Watabe, N., K. Tanaka, J. Yamada, and J.M. Dean. 1982. Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the teleost fish *Fundulus heteroclinus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 58(1): 127-134.
- Watanabe, Y., J. L. Butler, and T. Mori. 1988. Growth of Pacific saury, *Cololabis saira*, in the northeastern and northwestern Pacific Ocean. Fish. Bull. 86: 489-498.
- Wild, A. 1986. Growth of yellowfin tuna , *Thunnus albacares*, in the Eastern Pacific Ocean based otolith increments. Inter. Am. Trop. Tuna Comm., 18(6):423-482.
- Wild, A. and T. J. Foreman. 1980. The relationship between otolith increments and time for yellowfin and skipjack tuna marked with tetracycline. Inter-Am. Trop. Tuna Comm. 17: 509-597.

- Wilson, C.A., E.B. Brothers, J.M. Casselman, C.L. Smith, and A. Wild. 1983. Glossary, P 207-208. In E.D. Prince and L.M. Pulos [ed.]. Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: tunas, billfishes, and sharks. NOAA. Nat. Mar. Fish. Serv. Tech. Rep. 8.
- Zenitani, H., K. Nakata, and D. Inagare. 1996. Survival and growth of sardine larvae in the offshore side of the Kuroshio. *Fish. Oceanogr.* 5: 56-62.