

VALIDACIÓN DE MICROINCREMENTOS EN OTOLITOS DE *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) CULTIVADO EN LABORATORIO

VALIDATION OF OTOLITH MICROINCREMENTS IN LAB-CULTURED *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867)

Carlos Goicochea¹Lili Carrera²Noemí Cota²

RESUMEN

GOICOCHEA C, CARRERA L, COTA N. 2020. Validación de microincrementos en otolitos de *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) cultivado en laboratorio. *Bol Inst Mar Perú*. 35(1): 80-87.- Se validó la periodicidad de formación de los microincrementos en otolitos de *Paralichthys adspersus* cultivado en laboratorio. A través de la inducción hormonal se obtuvieron huevos que fueron incubados en tanques cónicos de 150 L. Las larvas fueron recolectadas en bolsas de polipropileno de 9 x 19 cm y como preservante se usó alcohol etílico al 96%. La muestra inicial estuvo constituida por 110 ejemplares y solo a 59 se les extrajo los otolitos (sagita) utilizando pinzas y un microscopio estereoscópico, fueron lavados con agua destilada, secados y almacenados en cartones otoliteros con fondo negro. En láminas portaobjeto se montaron los otolitos sobre una gota de cristal bond, se pulieron con una lija número 1200 hasta visualizar el núcleo y los microincrementos, después se aplicó un abrasivo de 0,3 micras de grano para los acabados. Los recuentos de los microincrementos (tres lecturas) se realizaron a partir del primer anillo formado después del núcleo, se utilizó un microscopio con aumento de 400X. Se obtuvo el grado de precisión de los conteos. Se utilizó una ecuación lineal para determinar la periodicidad de formación de los microincrementos donde se relacionaron las variables: "Edad conocida versus número de microincrementos" y un test estadístico para la pendiente. Se concluye que el periodo de formación de los microincrementos es diario.

PALABRAS CLAVE: *Paralichthys adspersus*, sagita, validación, microincrementos

ABSTRACT

GOICOCHEA C, CARRERA L, COTA N. 2020. Validation of otolith microincrements in lab-cultured *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867). *Bol Inst Mar Peru*. 35(1): 80-87.- In *Paralichthys adspersus* cultivated in the laboratory, the periodicity of formation of the microincrements in their otoliths was validated. Eggs were obtained through hormonal induction and incubated in conical tanks of 150 L. The larvae were collected in 9 x 19 cm polypropylene bags and preserved in 96% ethyl alcohol. The initial sample consisted of 110 specimens and otoliths (sagittal) were extracted from only 59 specimens by using tweezers and a stereoscopic microscope; then, they were washed with distilled water, dried, and stored in black-bottomed cardboard boxes. The otoliths were mounted in slides on a drop of bonded glass, polished with a 1200 grade sandpaper until the nucleus and microincrements were visible, then a 0.3-micron grit abrasive was applied for the finishes. The microincrement counts (three readings) were made from the first ring formed after the nucleus, using a 400X microscope. The degree of accuracy of the counts was obtained. A linear equation was used to determine the periodicity of the microincrement formation where the variables: "known age versus the number of microincrements" and a statistical test for the slope was related. It is concluded that the period of microincrement formation is daily.

KEYWORDS: *Paralichthys adspersus*, sagittal, validation, microincrements

1. INTRODUCCIÓN

Paralichthys adspersus (Steindachner, 1867) "lenguado" es una especie bentónica, se le encuentra sobre fondo arenoso, areno-fangoso y arena gruesa y se distribuye en el Pacífico Sur desde Ecuador hasta Chile (CHIRICHIGNO y CORNEJO, 2001). En el Perú esta especie es una de las que sustentan la pesquería artesanal, su importancia radica en la preferencia del consumidor debido a su exquisitez y desde un punto de vista socio-económico pues su precio en playa es alto (SAMAMÉ y CASTAÑEDA, 1999).

1. INTRODUCTION

Paralichthys adspersus (Steindachner, 1867) "fine flounder" is a benthic species, found on sandy, muddy-sandy, and coarse sandy bottoms, which is distributed in the South Pacific from Ecuador to Chile (CHIRICHIGNO & CORNEJO, 2001). This species is one of those supporting the Peruvian artisanal fisheries. Its importance lies in the consumer's preference due to its exquisiteness and from a socio-economic point of view because its price on the beach is high (SAMAMÉ & CASTAÑEDA, 1999).

1 IMARPE, Laboratorio Costero de Huanchaco. Av. La Rivera 805 Huanchaco. cgoicochea@imarpe.gob.pe

2 IMARPE, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura

La observación preliminar de patrones de crecimiento en los otolitos *sagita* de los peces que viven a diferentes profundidades y climas, parece apoyar la idea de que el crecimiento diario puede ser una característica universal de los otolitos (PANNELLA, 1971), la formación diaria de las microestructuras está regulada por un ritmo endógeno circadiano. Este ritmo circadiano de depósito de carbonato de calcio está, casi sin duda, bajo un control endocrinológico (SIMKISS, 1974) por esta razón varios autores asumieron la formación diaria de los incrementos en otolitos de larvas y juveniles (CAMPANA & NEILSON, 1985; SPONAUGLE, 2009; PANFILI *et al.*, 2009). Es así que los incrementos de crecimiento periódicos en estas estructuras son útiles para la determinación de la edad en la escala anual o diaria (CAMPANA, 2001). Otra utilidad de estas estructuras es que, a partir del conteo de los anillos diarios y la información del ancho del anillo, se puede estimar la fecha de nacimiento y retrocalcular las tallas del pez para definir su crecimiento. En ese sentido, el análisis de la microestructura de otolitos se ha utilizado en muchas pesquerías y estudios ecológicos (NOICHI *et al.*, 1994; BAILEY *et al.*, 1995; MEEKAN & FORTIER, 1996).

Se conoce como microincrementos a los anillos que se observan alrededor del núcleo del otolito y anillos diarios a los que se demuestre su formación diaria.

La base de todo estudio de edad en peces, es saber la periodicidad de formación de los anillos de crecimiento (estacionales) marcados en los otolitos *sagita* y otras estructuras duras, esto se resuelve, validando el tiempo de formación de los microincrementos que se encuentran dentro de cada anillo de crecimiento o anillo estacional. El conocimiento de esta información servirá para poder hacer mejores estimaciones de la edad y por ende una mejor evaluación de la especie para su manejo sostenible.

El objetivo de este estudio es validar la periodicidad de formación de los microincrementos en otolitos de *Paralichthys adspersus* "lenguado" cultivados en laboratorio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en dos Sedes del IMARPE. La manipulación de los peces y preparación de las muestras y obtención de larvas se hizo en los laboratorios de acuicultura de la Sede Central y la obtención de otolitos, lectura y evaluación de microincrementos, en el laboratorio de Edad y Crecimiento de la Sede Huanchaco, Región La Libertad.

The preliminary observation of growth patterns in the sagittal otoliths of fish living at different depths and in different climates seems to support the idea that daily growth may be a universal characteristic of otoliths (PANNELLA, 1971), the daily microstructure formation is regulated by an endogenous circadian rhythm. This circadian rhythm of calcium carbonate deposition is under endocrine control (SIMKISS, 1974). Therefore, several authors have assumed the daily otolith formation in larvae and juveniles (CAMPANA & NEILSON, 1985; SPONAUGLE, 2009; PANFILI *et al.*, 2009). Periodic growth increments in these structures are useful in determining an age on the annual or daily scale (CAMPANA, 2001). Another use of these structures is that, from counting the daily rings and the information on the width of the ring, the date of birth can be estimated and the sizes of the fish can be recalculated to define its growth. The analysis of the microstructure of otoliths has been used in many fisheries and ecological studies (NOICHI *et al.*, 1994; BAILEY *et al.*, 1995; MEEKAN & FORTIER, 1996).

It is known as micro increments to the rings that are observed around the nucleus of the otolith, and daily rings to which its daily formation is demonstrated.

The basis of any study on fish age is to know the periodicity of formation of the growth rings (seasonal) marked in the sagittal otoliths and other hard structures. This is resolved by validating the time of formation of the microincrements found within each growth ring or seasonal ring. The knowledge of this information will be useful to make better estimates of age and therefore a better evaluation of the species for its sustainable management.

This study aims to validate the periodicity of the otolith microincrement formation in lab-cultured *Paralichthys adspersus*.

2. MATERIAL AND METHODS

The work was carried out at two IMARPE sites. The handling of the fish, the preparation of the samples, and the obtaining of larvae were done in the aquaculture laboratories at the Headquarters and the obtaining of otoliths, reading, and evaluation of microincrements, in the Age and Growth Laboratory at the Huanchaco Coastal Laboratory in La Libertad Region.

En los ambientes de acuicultura se indujo al desove a hembras adultas de *P. adspersus* con una dosis única de 0,1 ml/kg de la hormona GnRHa, a partir de ello, los ovarios presentaron ovocitos maduros con diámetro promedio mayor a 500 μm . Luego de 48 horas, las hembras que mostraron hinchazón del vientre fueron removidas del tanque y anestesiadas para aplicarles presión abdominal o *stripping* a fin de obtener los ovocitos; en el caso de los machos no fue necesaria la inducción hormonal, con ellos también se realizó el *stripping* para la extracción del semen. Se mezcló el semen con los ovocitos y se transfirieron los huevos viables (huevos flotantes) a tanques cónicos para su incubación. Después de 48 horas, las larvas eclosionadas fueron sembradas en tanques de 150 L de capacidad a densidad de 20 larvas/L. La alimentación exógena se inició a partir del tercer día post-eclosión. Se usó como primer alimento rotíferos (rot) a una densidad de 3 rot/mL aumentando progresivamente hasta llegar a 10 rot/mL. A partir del día 18 se inició el cambio gradual de rotíferos a artemia (art), comenzando con densidad de 1 art/mL hasta llegar a 10 art/mL. Al día 43 se inició el destete (cambio de alimento vivo a inerte), utilizando micropellets de la marca Otohime, con un cambio gradual hasta retirar la artemia. Los promedios de temperatura, oxígeno disuelto y pH durante el cultivo fueron de $18,56 \pm 0,61$ °C, $7,65 \pm 0,16$ mg/L y $8,05 \pm 0,20$ ppm, respectivamente.

A partir del día 50 después de la eclosión se extrajeron, al azar, 10 individuos que se colocaron en bolsas de polipropileno de 9 x 19 cm, que fueron rotuladas en papel Canson con fecha de eclosión y día de colecta; se utilizó etanol al 96% como preservante. En el laboratorio de Edad y Crecimiento de Huanchaco se extrajeron los otolitos sagita utilizando pinzas finas y un microscopio estereoscópico. La muestra estuvo constituida por 110 ejemplares de lenguados juveniles, a 59 de ellos se les extrajo los otolitos (sagita) para el análisis de su microestructura (Tabla 1). Los otolitos fueron montados en una gota de cristal bond sobre una lámina porta objeto, para luego ser pulidos con una lija número 1200 hasta poder visualizar el núcleo y los microincrementos, luego se aplicó un abrasivo de 0,3 micras de grano para los acabados (Fig. 1); los pulidos se hicieron por ambos lados (Buratti, 2003 c.p. GOICOHEA *et al.*, 2013).

Adult female *P. adspersus* were induced to spawn in aquaculture environments with a single dose of 0.1 ml/kg GnRHa, from which the ovaries presented mature oocytes with a mean diameter greater than 500 μm . After 48 hours, the females that showed swelling of the belly were removed from the tank and anesthetized to apply abdominal pressure or stripping to obtain the oocytes; in the case of the males it was not necessary the hormonal induction, the stripping was also performed with them for the extraction of the semen. The semen was mixed with the oocytes and the viable eggs (floating eggs) were transferred to conical tanks for incubation. After 48 hours, the hatched larvae were seeded in 150 L capacity tanks at a density of 20 larvae/L. Exogenous feeding was started by the 3rd day post-hatching (dph). Rotifers (roti) were used as first feed at a density of 3 rot/mL increasing progressively until reaching 10 rot/mL. By 18th dph, the gradual change from rotifers to artemia (art) began, starting with a density of 1 art/mL until reaching 10 art/mL. By 43rd dph, weaning (change from live to inert feed) was initiated, using Otohime micro-pellets, with a gradual change until the artemia was removed. The averages of temperature, dissolved oxygen, and pH during culture were 18.56 ± 0.61 °C, 7.65 ± 0.16 mg/L, and 8.05 ± 0.20 ppm, respectively.

By 50th dph, a total of 10 individuals were randomly extracted and placed in 9 x 19 cm polypropylene bags, which were labeled with the date of hatching and day of collection on Canson paper; 96% ethanol was used as a preservative. The sagittal otoliths were extracted at the Age and Growth Laboratory in Huanchaco using fine tweezers and a stereoscopic microscope. The sample consisted of 110 juvenile flounders, with 59 of them having their otoliths (sagittal) extracted for analysis of their microstructure (Table 1). The otoliths were mounted in a drop of bonded glass on a slide and then polished with a 1200 grade sandpaper until the nucleus and microincrements could be seen, then a 0.3-micron grit abrasive was applied for the finishes (Fig. 1); the polishing was done on both sides (Buratti, 2003 cited by GOICOHEA *et al.*, 2013).

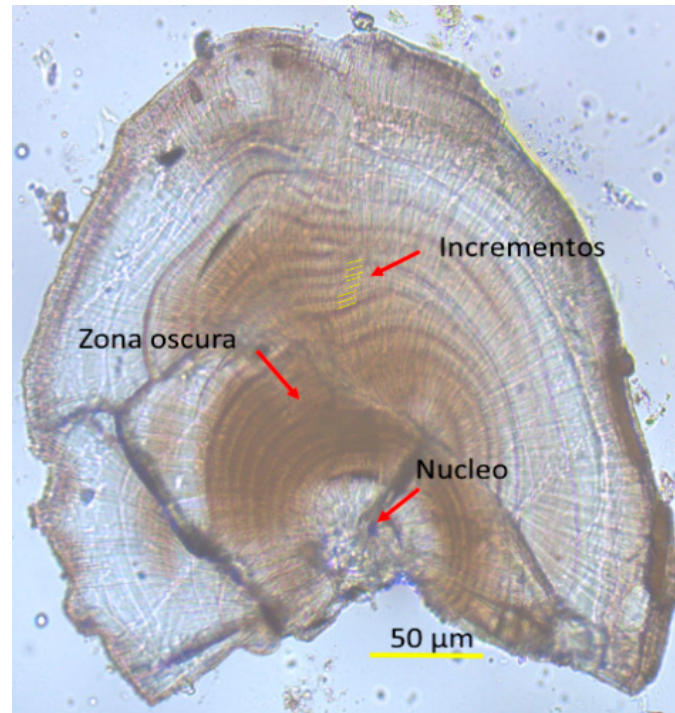


Figura 1.- Microfotografía de otolito de lenguado juvenil de 113 días de edad. 100X

Figure 1. Microphotography of 113-day-old juvenile fine flounder otolith. 100X

Los microincrementos fueron contados en un microscopio compuesto con analizador de imágenes a 400X. Los recuentos de los microincrementos se realizaron a partir del primer anillo formado después del núcleo (CAMPANA & NEILSON, 1985; MOSEGAARD *et al.*, 1988). La medida del grado de precisión (coeficiente de variación CV) de los conteos, se realizó a partir de tres recuentos (GOICOCHEA *et al.*, 2013), se utilizó un contador manual para evitar errores.

La periodicidad de formación de los microincrementos se obtuvo utilizando una ecuación lineal donde se relacionaron las variables: "Edad conocida versus número de microincrementos" (WEXLER *et al.*, 2001; REGNER & JACOV, 1994)

$$I = a + b (d)$$

Donde: I = número de incrementos, d = edad en días, b = periodicidad de formación de los microincrementos en días, a= el intercepto como la formación del primer microincremento.

Se utilizó el programa *Table curve* V5.01. Asimismo, Se hizo un test estadístico de la pendiente para determinar si este es igual a 1.

The microincrements were counted in a 400X compound microscope. The microincrement counts were made from the first ring formed after the nucleus (CAMPANA & NEILSON, 1985; MOSEGAARD *et al.*, 1988). The measurement of the degree of accuracy (coefficient of variation CV) of the counts, was made from three counts (GOICOCHEA *et al.*, 2013), a manual counter was used to avoid errors.

The periodicity of the microincrement formation was obtained through a linear equation where the variables: "Known age versus the number of microincrements" were related (WEXLER *et al.*, 2001; REGNER & JACOV, 1994)

$$I = a + b (d)$$

Where: I = number of microincrements, d = age in days, b = periodicity of the microincrement formation in days, a= the intercept as the formation of the first microincrement.

The *Table curve* V5.01 software was used. Also, a statistical test of the slope was done to determine if it is equal to 1.

Tabla 1.- Conteo de microincrementos en otolitos de *Paralichthys adspersus* cultivados en laboratorioTable 1. Otolith microincrement count in lab-cultures *P. adspersus*

Edad (días)	Incremento	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	CV %
52	49	47	50	49	48,7	3,1
52	50	48	50	51	49,7	3,1
52	49	49	47	50	48,7	3,1
93	92	90	93	93	92,0	1,9
93	91	89	93	91	91,0	2,2
93	92	90	94	91	91,7	2,3
93	90	88	92	89	89,7	2,3
94	93	93	91	94	92,7	1,6
94	92	91	93	93	92,3	1,3
94	93	95	93	92	93,3	1,6
95	93	90	94	94	92,7	2,5
95	91	91	90	93	91,3	1,7
95	93	95	92	92	93,0	1,9
96	93	93	91	94	92,7	1,6
96	93	94	91	94	93,0	1,9
99	97	100	98	94	97,3	3,1
99	95	92	97	96	95,0	2,8
99	97	94	99	98	97,0	2,7
99	96	93	99	97	96,3	3,2
101	98	102	94	97	97,7	4,1
101	99	98	103	97	99,3	3,2
101	98	100	96	98	98,0	2,0
101	97	97	95	99	97,0	2,1
101	96	95	95	98	96,0	1,8
104	102	106	102	98	102,0	3,9
104	102	99	104	103	102,0	2,6
104	101	103	100	99	100,7	2,1
105	103	101	102	106	103,0	2,6
105	102	100	103	102	101,7	1,5
105	102	104	101	102	102,3	1,5
108	106	102	108	109	106,3	3,6
108	105	104	107	104	105,0	1,6
108	106	108	106	104	106,0	1,9
108	105	102	108	105	105,0	2,9
113	111	108	110	114	110,7	2,8
113	109	112	111	105	109,3	3,5
113	111	114	112	107	111,0	3,2
124	121	125	123	116	121,3	3,9
124	123	122	119	128	123,0	3,7
124	119	124	117	116	119,0	3,7
130	128	132	127	124	127,7	3,2
130	127	124	126	130	126,7	2,4
130	127	123	132	125	126,7	3,7
134	132	137	133	125	131,7	4,6
134	131	133	125	136	131,3	4,3
134	130	131	126	134	130,3	3,1
138	136	133	134	140	135,7	2,8
138	137	141	135	134	136,7	2,8
138	136	135	133	139	135,7	2,3
140	139	134	140	144	139,3	3,6
140	138	142	134	137	137,7	2,9
140	136	140	133	134	135,7	2,8
144	139	136	138	142	138,7	2,2
144	141	145	141	136	140,7	3,2
144	143	150	138	140	142,7	4,5
160	158	153	166	154	157,7	4,6
160	157	163	160	149	157,3	4,7
161	157	149	159	162	156,7	4,3
161	158	166	153	155	158,0	4,4

Hipótesis:

Ho: $b \neq 1$

$$S_b = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left[\frac{S_y^2}{S_x} - b^2 \right]}$$

Hi: $b = 1$

$$t_{cal} = (b-1)/s_b$$

$$t_{tab} = (1-\alpha/2; n-2)$$

Regla de decisión:

Si $|t_{cal}| \leq t_{tab} (1-\alpha/2; n-2)$ se acepta Ho

Si $|t_{cal}| > t_{tab} (1-\alpha/2; n-2)$ se acepta Hi

Donde: b = pendiente, S = error estándar, n-2= grados de libertad.

3. RESULTADOS

El rango de tamaños de la muestra estuvo entre 10 y 36 mm de longitud total y las edades estuvieron entre 52 y 161 días.

Asimismo, la relación entre la edad conocida y el número de incrementos correspondió a una regresión lineal altamente significativa ($R^2 = 0,99$; $P < 0,001$) y la pendiente no difirió significativamente de 1 (Fig. 2).

Hypothesis:

Ho: $b \neq 1$

$$S_b = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left[\frac{S_y^2}{S_x} - b^2 \right]}$$

Hi: $b = 1$

$$t_{cal} = (b-1)/s_b$$

$$t_{tab} = (1-\alpha/2; n-2)$$

Decision rule:

If $|t_{cal}| \leq t_{tab} (1-\alpha/2; n-2)$ Ho is accepted

If $|t_{cal}| > t_{tab} (1-\alpha/2; n-2)$ Hi is accepted

Where: b = slope, S = standard error, n-2= degrees of liberty.

3. RESULTS

Sample sizes ranged from 10 to 36 mm in total length and ages ranged from 52 to 161 days.

The relationship between known age and number of increments corresponded to a highly significant linear regression ($R^2 = 0.99$; $P < 0.001$) and the slope did not differ significantly from 1 (Fig. 2).

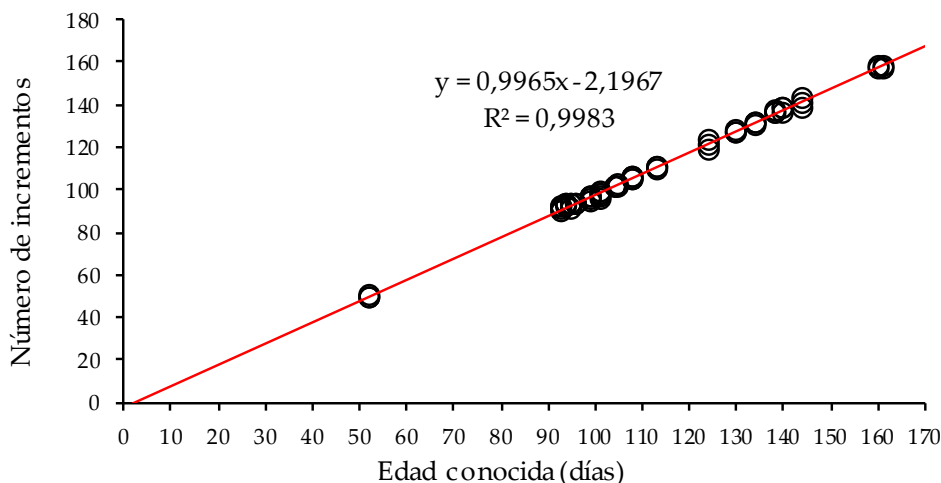


Figura 2.- Relación de la edad conocida y número de anillos en otolitos de *Paralichthys adspersus*

Figure 2. Relationship of known age and number of rings in *Paralichthys adspersus* otoliths

La aplicación del test estadístico a partir del valor de la pendiente de la regresión lineal para determinar si la formación de los microincrementos se realiza diariamente se presenta a continuación.

Hipótesis:

Ho: $b \neq 1$ día

Hi: $b = 1$ día $t_{cal} = -0,6371$
 $t_{tab} = (1-\alpha/2; 59-2) = 2,002$

Regla de decisión:

$t_{call} = -0,6371 < t_{tab} = 2,002 \Rightarrow$ Se acepta la Hi

4. DISCUSIÓN

El ambiente del laboratorio rara vez es capaz de imitar entornos naturales, debido a sus fotoperiodos artificiales, ciclos de temperatura, alimentación y espacio limitado para las migraciones verticales diurnas (CAMPANA, 2001); sin embargo la cría en cautiverio es un medio confiable para evaluar la formación del anillo, generando utilidad en el nivel diario.

La relación lineal entre el número de microincrementos en los otolitos sagita y la edad conocida de juveniles de *Paralichthys adspersus* coinciden con los realizados en larvas de *Thunnus albacares* "atún aleta amarilla" (JEANE *et al.*, 2001), de *Dicentrarchus labrax* (Gutiérrez y Morales-Nin 1986 citados por REGNER & DULCIÉ, 1994), de *Sardinops caeruleus* "sardina monterrey" (MARTÍNEZ, 2003) en los que además, demuestran que la formación de los microincrementos es diario y empiezan a formarse a partir del segundo día después de la eclosión. Sin embargo, el tiempo de la formación del primer anillo diario puede diferir, como lo encontrado en los otolitos sagita de *Pseudopleuronectes yokohamae* "suela de mármol" investigados por JOH *et al.* (2005) quienes concluyeron que el primer anillo se formó a partir de 5,7 días de edad. Otro caso importante es el de PEÑAILILLO y ARAYA (1996) quienes determinaron que los otolitos sagita ya contaban con 6 anillos diarios al momento de la eclosión en *Austromenidia regia* "pejerrey".

5. CONCLUSIÓN

La periodicidad de la formación de microincrementos en otolitos de juveniles de *Paralichthys adspersus* "lenguado" fue diaria a partir del segundo día después de la eclosión.

The use of statistical test from the value of the slope of the linear regression to determine if the microincrement formation is carried out daily is presented below.

Hypothesis:

Ho: $b \neq 1$ day

Hi: $b = 1$ day $t_{cal} = -0.6371$
 $t_{tab} = (1-\alpha/2; 59-2) = 2.002$

Decision rule:

$t_{call} = -0.6371 < t_{tab} = 2.002 \Rightarrow$ Hi is accepted

4. DISCUSSION

The laboratory environment is rarely capable of replicating natural environments, given its artificial photoperiods, temperature cycles, feeding, and limited space for vertical daytime migrations (CAMPANA, 2001); nevertheless, captive breeding is a reliable means of assessing ring formation, providing utility at the daily level.

The linear relationship between the number of microincrements in sagittal otoliths and the known age of juveniles *Paralichthys adspersus* is consistent with those in larvae of *Thunnus albacares* "yellowfin tuna" (JEANE *et al.*, 2001), *Dicentrarchus labrax* (Gutiérrez & Morales-Nin 1986 cited by REGNER & DULCIÉ, 1994), *Sardinops caeruleus* "Pacific sardine" (MARTÍNEZ, 2003) in which they also show that the microincrement formation is daily and these begin to form from the 2nd dph. Nevertheless, the time of formation of the first daily ring may differ, as found in the sagittal otoliths of *Pseudopleuronectes yokohamae* "marbled flounder" researched by JOH *et al.* (2005) who concluded that the first ring formed from 5.7 days of age. A further important case is that of PEÑAILILLO & ARAYA (1996) who determined that the sagittal otoliths already had 6 rings a day at the time of hatching in *Austromenidia regia* "silverside".

5. CONCLUSION

The periodicity of the otolith microincrement formation in juvenile *Paralichthys adspersus* "fine flounder" was daily from the second day after hatching.

REFERENCIAS / REFERENCES

- BAILEY K M, CANINO M F, NAPP J M, SPRING S M, BROWN A L. 1995. Contrasting years of prey levels, feeding conditions and mortality of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the western Gulf of Alaska. *Mar Ecol Prog Ser.* 119: 11-23.
- 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: 197-242
- CAMPANA S E, NEILSON J D. 1985. Microstructure of fish otoliths. *Can. J fish Aquat. Sci.* 42: 1014-1032.
- CHIRICHIGNO N, CORNEJO M. 2001. Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Inst Mar Perú. Publicación Especial. 314 pp.
- GOICOCHEA C, MOSTACERO J, MOQUILLAZA P, DIOSOS T, TOPIÑO Y, GUEVARA-CARRASCO R. 2013. Validación del ritmo de formación de los anillos de crecimiento en otolito del jurel *Trachurus murphyi* Nichols 1920. *Revista peruana de Biología.* 20(1): 53-60.
- JOH M, TAKATSU T, NAKAYA M, HIGASHITANI T, TAKAHASHI T. 2005. Otolith microstructure and daily increment validation of maybled sole (*Pseudopleuronectes yokohamae*). *Marine Biology.* 147: 59-69.
- MARTINEZ R. 2003. 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). Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marianas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias; Ciencias Pesqueras. 86 pp.
- MEEKAN M G, FORTIER L. 1996. Selection for fast growth during the larval life of Atlantic cod *Gadus morhua* on the Scotian Shelf. *Mar Ecol Prog Ser.* 137: 25-37.
- MOSEGAARD H, SVED-ING H, TABERMAN K. 1988. Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Can J Fish aquat Sciences.* 45: 1514-1524.
- NOICHI T, MATSUO T, SENTA T. 1994. Hatching dates of the Japanese flounder settling at Yanagihama Beach in Nagasaki prefecture, Japan. *Fish Sci (Tokyo).* 60: 369-372.
- PANFILI J, TOMAS J, MORALES-NIM B. 2009. Otolith microstructure in tropical fish. In: B.S Green et al. (eds). *Tropical fish otolith: information for assessment, management and ecology. Reviews: Methods and Technologies in fish Biology and Fisheries.* 11: 212-248.
- PANNELLA G. 1971. Fish Otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science (Wash., DC).* 173: 1124-1127.
- PEÑAILILLO J, ARAYA M. 1996. Momento de formación y periodicidad de los microincrementos de crecimiento en otolitos de larvas de pejerrey (*Austromenidia regia*) mantenidas en laboratorio. Departamento Ciencias del Mar, Universidad Arturo Prat. *Invest. Mar., Valparaíso.* 24: 31-38.
- REGNER S, JACOV D. 1994. Growth of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larval and juvenile stages and their otoliths under quasi-steady temperature conditions. *Marine Biology.* 119: 169-177.
- SAMAMÉ M, CASTAÑEDA J. 1999. Biología y Pesquería del lenguado *Paralichthys adspersus* con especial referencia al área norte del litoral peruano. Departamento de Lambayeque. *Bol Inst Mar Perú.* 18(1): 15-48.
- SIMKISS K. 1974. Calcium metabolism of fish in relation to ageing. P. 1-12 In: TB Bagenal (ed.) *Ageing of fishes.* Umwin Bros. Ltd. London. 234 pp.
- SPONAUGLE S. 2009. Daily otolith increments in the early stages of tropical fish. In: B.S Green et al. (eds). *Tropical fish otolith: Information for assessment, management and Technologies in Fish Biology and Fisheries.* 11: 93-132.
- WEXLER J B, MARGULIES D, MASUMA S, TEZUKA N, TERUYA K, OKA M, KANEMATSU M, NIKAIDO H. 2001. Age validation and growth of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, larvae reared in the laboratory. Interamerican Tropical Tuna Commission. La Jolla California. *Bulletin.* 22(1): 52-91.