

BOLETÍN

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

ISSN 0458-7766

VOLUMEN 33, Número 1



Enero - Junio 2018
Callao, Perú



PERÚ

Ministerio
de la Producción

CARACTERIZACIÓN DE FOLÍCULOS POST-OVULATORIOS DE LA ANCHOVETA PERUANA *Engraulis ringens* EN CAUTIVERIO

CHARACTERIZING POSTOVULATORY FOLLICLES OF ANCHOVETA *Engraulis ringens* IN CAPTIVITY

Betsy Buitrón¹
Javier Sánchez¹

Ángel Perea¹
Carlos Espinoza²

RESUMEN

BUITRÓN B, PEREA A, SÁNCHEZ J, ESPINOZA C. 2018. Caracterización de folículos post ovulatorios de la anchoveta peruana *Engraulis ringens* en cautiverio. *Bol Inst Mar Perú*. 33(1): 13-24.- En este estudio se caracterizó la edad de los folículos post-ovulatorios (FPO) de anchoveta peruana al inducir el desove en cautividad, esto permitirá la validación de los datos obtenidos en campo, además de hacer más confiable las estimaciones de frecuencia de desove en el ambiente natural. Las características morfológicas de los FPO de *E. ringens* fueron similares a las descritas para *E. mordax*. Los FPO del día 0 se observan como una cuerda larga con numerosos pliegues, células foliculares ordenadas y bien definidas, poco o ningún grado de degeneración, teca delgada y lumen del folículo evidente. Seis horas después del desove, los FPO presentan primeros signos de degeneración, con aparición de núcleos picnóticos en la granulosa y en la luz del folículo, algunos linfocitos y vacuolas en las células de la granulosa. Después de 12 horas, los folículos están muy contraídos y reducidos, con células de la granulosa muy irregulares, la teca más adherida a la granulosa y mayor presencia de núcleos picnóticos, que evidencian la progresiva degeneración celular. Los FPO de 24 horas ya están degenerados, tienen forma irregular, con células de granulosa desordenadas y lumen reducido, restos de gránulos eosinofílicos. Después de 36 horas, los FPO son muy pequeños y pueden confundirse con ovocitos atrésicos avanzados.

PALABRAS CLAVE: folículos post-ovulatorios, anchoveta peruana, *Engraulis ringens*, desove, reproducción

ABSTRACT

BUITRÓN B, PEREA A, SÁNCHEZ J, ESPINOZA C. 2018. Characterizing postovulatory follicles of anchoveta *Engraulis ringens* in captivity. *Bol Inst Mar Peru*. 33(1): 13-24.- The present study characterized the ages of POFs of anchoveta, by inducing spawning in captivity. This will allow the validation of the data obtained in the field, which in turn makes the estimates of spawning frequency of this species in the natural environment more reliable. Morphological characteristics of POFs of *E. ringens* were similar to those described for *E. mordax*. Day 0 POFs appeared as a long cord with numerous folds, with ordered and well-defined follicular cells, with little, if any, degree of degeneration, a thin theca, and a visible follicle lumen. Six hours after spawning, POFs present the first signs of degeneration, with the appearance of pyknotic nuclei in the granulosa and the follicle lumen, some lymphocytes and vacuoles in the granulosa cells. After 12 hours, follicles look very contracted and reduced, with very irregular granulosa cells, the theca is more attached to the granulosa, and there is a greater presence of pyknotic nuclei, therein, evidence that cellular degeneration is in progress. POFs of 24 hours are already degenerated, irregularly shaped, with cluttered granulosa cells and small lumen, with remains of eosinophilic granules. After 36 hours, POFs are very small and, at this level, can be confused with advanced atretic oocytes.

KEYWORDS: postovulatory follicles, anchoveta, *Engraulis ringens*, spawning, reproduction

1. INTRODUCCIÓN

La anchoveta peruana *Engraulis ringens* Jenyns, es la especie que sustenta la pesquería peruana, debido a sus grandes volúmenes de pesca y la demanda de sus productos en el mercado internacional. Por tal motivo, el IMARPE realiza monitoreos continuos de su biomasa y estado reproductivo en forma anual en el litoral peruano, asegurando un manejo sustentable de su pesquería. Uno de los parámetros técnicos importantes para dicho manejo es la biomasa desovante, para lo cual es necesario determinar las edades y tasas de reabsorción de los folículos post-ovulatorios (FPOs) que evidencian el desove de un pez.

1. INTRODUCTION

Anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns, is the species that sustains the Peruvian fishery, due to its large fishing volumes and the demand for its products in the international market. For this reason, IMARPE carries out continuous monitoring of its biomass and reproductive status on an annual basis along the Peruvian coast, ensuring the sustainable management of its fishery. One of the important technical parameters for such management is the spawning biomass, for which it is necessary to determine the ages and rates of reabsorption of the postovulatory follicles (POFs) that evidence the spawning of a fish.

1 Instituto del Mar del Perú (IMARPE), Callao, Perú, bbuitron@imarpe.gob.pe, aperea@imarpe.gob.pe, jsanchez@imarpe.gob.pe

2 ALICORP. CEspinozaP@alicorp.com.pe

Al final de la maduración gonadal se produce la ovulación, es decir la ruptura de la capa folicular que contiene el ovocito y su liberación al lumen del ovario. Los folículos remanentes se denominan folículos post-ovulatorios (FPO) (SAIDAPUR 1982, LOWERRE-BARBIERI *et al.* 2011). Los FPO se identifican fácilmente a las pocas horas de ocurrida la ovulación, pero degeneran rápidamente dependiendo de la temperatura, ocurriendo en unos pocos días en peces pelágicos (HUNTER y GOLDBERG 1980) o en varias semanas como en *Pleuronectes flesus* Linnaeus (JANSSEN *et al.* 1995), bacalao del Atlántico *Gadus morhua* Linnaeus (SABORIDO y JUNQUERA 1998) y *Dexistes rikuzenius* Jordan y Starks (NARIMATSU *et al.* 2005). En algunos casos, los FPOs no son fáciles de distinguir de los ovocitos atrésicos en estadios avanzados de degeneración, por lo que es necesario efectuar minuciosas observaciones.

La correcta estimación de la edad de los FPO y su tasa de reabsorción dentro del ovario, permiten determinar la fracción de hembras desovantes en un stock de peces (método de folículos post-ovulatorios: HUNTER y GOLDBERG 1980), parámetro necesario para el cálculo de la producción total de huevos en un evento reproductivo determinado, aplicando el método de producción diaria de huevos (PARKER 1980, ALHEIT 1993, STRATOUDAKIS *et al.* 2006, BERNAL *et al.* 2012, DICKEY-COLLAS 2012, MELIÁ *et al.* 2012, ARMSTRONG y WITTHAMES 2012), que ha sido ampliamente aplicado para estimar la biomasa desovante de anchoveta (ALHEIT *et al.* 1984, ARMSTRONG *et al.* 1988, SANZ *et al.* 1992, PALOMERA y PERTIERRA 1993, WARD *et al.* 2001, KIM y LO 2001, MELIÁ *et al.* 2002, SOMARAKIS *et al.* 2002, SOMARAKIS *et al.* 2004, CUBILLOS *et al.* 2007, PÁJARO *et al.* 2009, SOMARAKIS *et al.* 2012) así como de otras especies (LOCKWOOD *et al.* 1981, SOMARAKIS *et al.* 2006, CUBILLOS *et al.* 2007, MURUA *et al.* 2010, BERNAL *et al.* 2011, JACKSON *et al.* 2012, KRAUS *et al.* 2012, PÁJARO *et al.* 2013). También se ha utilizado en muchos trabajos científicos desde la década de 1980, con un promedio de más de 20 artículos por año publicados en la literatura científica primaria durante los últimos años (BERNAL *et al.* 2012).

Este método es muy importante en los estudios y estimaciones de reclutamiento de peces con reproducción indeterminada o desovadores parciales, como es el caso de la anchoveta peruana *E. ringens*. A pesar de su popularidad, el uso de la clasificación de la degeneración de los FPO puede ser impreciso si se aplican criterios de identificación de otras especies sin haber realizado una validación previa (STRATOUDAKIS *et al.* 2006, GANIAS 2012).

Es necesario comprender los procesos de degeneración de los FPO para poder clasificarlos por edades, lo cual se requiere para estimar la frecuencia de desove. La clasificación de edades de FPO en *E. ringens*, tanto en Perú como en Chile (CUBILLOS 2005) se

Ovulation is produced at the end of the gonadal maturation, i.e. the rupture of the follicular layer containing the egg, and its release to the ovarian lumen. These remaining follicles are then called postovulatory follicles (POFs) (SAIDAPUR 1982, LOWERRE-BARBIERI *et al.* 2011). POFs are easily identified within hours after ovulation occurs, but they degenerate fast depending on the temperature, usually for a few days in pelagic fishes (HUNTER & GOLDBERG 1980) or several weeks in the case of *Pleuronectes flesus* Linnaeus (JANSSEN *et al.* 1995), Atlantic cod, *Gadus morhua* Linnaeus (SABORIDO & JUNQUERA 1998), and *Dexistes rikuzenius* Jordan and Starks (NARIMATSU *et al.* 2005). In some cases, POFs are not easy to be distinguished from atretic oocyte in advanced stages of degeneration, thus a much closer observation is necessary.

The correct estimation of the age of POFs and their resorption rate within the ovary allow to determine the fraction of spawning females in a fish stock (postovulatory follicles method: HUNTER & GOLDBERG 1980), a parameter needed for estimating the total egg production in a given reproductive event, by applying the daily egg production method (PARKER 1980, ALHEIT 1993, STRATOUDAKIS *et al.* 2006, BERNAL *et al.* 2012, DICKEY-COLLAS 2012, MELIÁ *et al.* 2012, ARMSTRONG & WITTHAMES 2012), which has been widely applied for estimating the spawning biomass of anchoveta (ALHEIT *et al.* 1984, ARMSTRONG *et al.* 1988, SANZ *et al.* 1992, PALOMERA & PERTIERRA 1993, WARD *et al.* 2001, KIM & LO 2001, MELIÁ *et al.* 2002, SOMARAKIS *et al.* 2002, SOMARAKIS *et al.* 2004, CUBILLOS *et al.* 2007, PÁJARO *et al.* 2009, SOMARAKIS *et al.* 2012), as well as of other species (LOCKWOOD *et al.* 1981, SOMARAKIS *et al.* 2006, CUBILLOS *et al.* 2007, MURUA *et al.* 2010, BERNAL *et al.* 2011, JACKSON *et al.* 2012, KRAUS *et al.* 2012, PÁJARO *et al.* 2013). It has also been used in many scientific papers since the 1980's, with a mean of more than 20 articles per year published in the primary scientific literature for the last three years (BERNAL *et al.* 2012).

Moreover, its importance is significant for studying and estimating fishing recruitment of fishes with undetermined reproduction or which are partial spawners, as in the case of anchoveta *Engraulis ringens*. Despite the popularity of this method, the use of the POFs degeneration classification could be quite inaccurate if identification criteria are applied to other species without carrying out a preliminary validation (STRATOUDAKIS *et al.* 2006, GANIAS 2012).

In order to classify them by age, which is required for estimating the spawning frequency, it is necessary to understand the processes of POFs degeneration. Up to the present, age classification for POFs of *E. ringens*, both in Peru and Chile (CUBILLOS 2005),

basó en el modelo de clasificación propuesto para la anchoveta del norte *Engraulis mordax* Girard (HUNTER y GOLDBERG 1980, HUNTER y MACEWICZ 1985). Sin embargo, aunque *E. mordax* es una especie filogenética o taxonómica similar a *E. ringens*, es necesario ajustar o validar dichas edades, ya que de lo contrario podrían producirse desviaciones en la estimación de la biomasa desovante.

La mejor manera para realizar un seguimiento adecuado de las edades de los folículos post-ovulatorios y por lo tanto mejorar los cálculos de biomasa desovante en peces, es de forma experimental en ambientes controlados (HUNTER y GOLDBERG 1980, HUNTER y MACEWICZ 1985, PÉREZ *et al.* 1992, DRUMMOND *et al.* 2000). Esto permite conocer la hora exacta en la que cada hembra desova y determinar la edad precisa de los FPO, así como su tiempo de degeneración dentro del ovario. Para ello, las técnicas de inducción al desove en peces en cautiverio utilizadas en acuicultura son muy útiles. Se han desarrollado pocos trabajos experimentales con el objeto de describir el proceso de degeneración de los FPO y clasificarlos por edades (PÉREZ *et al.* 1992, FITZHUGH y HETTLER 1995, ALDAY *et al.* 2005).

El presente trabajo explica los resultados del experimento que tuvo como finalidad caracterizar diferentes edades de los FPO, lo cual permitió validar los datos obtenidos en campo haciendo confiables las estimaciones de frecuencia de desove en el medio natural (ALHEIT *et al.* 1984).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó ejemplares adultos de anchoveta peruana (13,7 cm de talla promedio) recolectados en la bahía del Callao en julio de 2006, mediante el sistema de red izada y con luces de atracción, según la metodología descrita por ESPINOZA *et al.* (2008).

Los peces correspondientes al stock Norte-Centro del mar peruano pasaron por un período de acondicionamiento en tanques de fibra de vidrio de 10 m³ de capacidad, conectados a un sistema de recirculación de agua de mar (ESPINOZA *et al.* 2010). Durante este período se administró *ad libitum* alimento micro encapsulado LARVAL AP100 de 250-450 µm de diámetro, que fue reemplazado gradualmente por alimento extruido comercial de 0,8-2,0 mm de diámetro.

Diariamente se revisó el nivel de PH, oxígeno disuelto y concentraciones de nitrógeno amoniacal total. La temperatura se mantuvo constante en 16,5 °C y el fotoperiodo de 10 horas de luz (8:00 horas - 18:00 horas) - 14 horas de oscuridad. En estas condiciones, las anchovetas desarrollaron sus gónadas hasta estadios maduros, lo que fue validado semanalmente

was based on the classification pattern proposed for the northern anchovy, *E. mordax* Girard (HUNTER & GOLDBERG 1980, HUNTER & MACEWICZ 1985). However, even though *E. mordax* is a phylogenetic species or taxonomically similar to *E. ringens*, it is necessary to adjust or validate the resulting age classification, otherwise deviations could occur when estimating spawning biomass.

The best way to conduct a proper monitoring of the age of postovulatory follicles and therefore improve the estimation of spawning biomass in fishes is on an experimental basis in controlled environments (HUNTER & GOLDBERG 1980, HUNTER & MACEWICZ 1985, PÉREZ *et al.* 1992, DRUMMOND *et al.* 2000). This allows to know the exact time each female spawns and to determine the exact age of POFs as well as its time of degeneration within the ovary. To do so, the techniques for spawning induction of captive fishes used in aquaculture are very useful. Little experimental work has been made for describing the process of POFs degeneration and classifying them by age (PÉREZ *et al.* 1992, FITZHUGH & HETTLER 1995, ALDAY *et al.* 2005).

The present study explains the results obtained from the experiment aimed at characterizing POFs at different ages, validating in this way the data obtained in the field, and therefore making reliable the estimations of spawning frequency in their natural environment (ALHEIT *et al.* 1984).

2. MATERIAL AND METHODS

This investigation used adult specimens of anchovy (mean size of 13.7 cm) collected in the Callao bay during the month of July 2006, using stationary lift nets system with attraction lights, according to the methodology described by ESPINOZA *et al.* (2008). Fishes corresponding to the Northern-Central stock of the Peruvian sea went through a period of preparation in fiberglass tanks of 10 m³ of capacity, connected to a recirculation system of seawater, as designed by ESPINOZA *et al.* (2010). During this period, food was administered *ad libitum* using microencapsulated larval feed Larval AP100 of 250-450 µm in diameter, which was gradually replaced by commercial extruded feed of 0.8-2.0 mm in diameter.

PH level, dissolved oxygen, and total ammonia nitrogen concentrations in the water were monitored in a daily basis. Temperature remained constant at 16.5 °C, and photoperiod in 10 hours of light (8:00 hours - 18:00 hours) - 14 hours of darkness. Under these conditions, anchovetas developed their gonads to mature stages; this was validated on a weekly basis

mediante análisis histológico de gónadas de 10 ejemplares.

Una vez que llegaron a la fase de vitelogenesis máxima se efectuó la inducción al desove. Se utilizó de 0,005 a 0,010 µg de acetato de buserelina, siguiendo la metodología descrita por ESPINOZA *et al.* (2009) y las hembras desovaron entre 12 y 24 horas después de la inyección. Se registró el tiempo de desove y los peces se mantuvieron vivos durante 0, 6, 12, 24 y 36 horas post desove, luego fueron sacrificados y se realizó el análisis histológico de las gónadas. El proceso utilizado fue la técnica de infiltración de parafina (HUMASON 1979) y se colorearon con hematoxilina-eosina. Para la caracterización, se evaluaron al menos 25 FPO por cada edad (en horas).

3. RESULTADOS

Se da a conocer las características de los FPOs de 0, 6, 12, 24 y 36 horas de ejemplares desovados y mantenidos en cautiverio a 16 °C de temperatura promedio.

FPO-0 horas

Se observa una cuerda larga con numerosos pliegues y longitud aproximada de 1000 µm. Las células foliculares aparecen ordenadas, con formas bien definidas, sin ningún o poco grado de degeneración. Las células de la granulosa se observan cilíndricas (Figs. 1a, 1b, ANEXO), mientras que las células de la teca se observan como una delgada capa, más notorias que cuando rodeaban al ovocito hidratado (Fig. 1b). Se manifiestan grandes núcleos de la capa granulosa, generalmente en el ápice de las células (Fig. 1b). El lumen del folículo post-ovulatorio es evidente y puede contener algunos gránulos eosinófilicos (Figs. 1a, 1b).

FPO-6 horas

Se observan los primeros indicios de degeneración temprana del folículo, como la aparición de núcleos picnóticos en las células de la granulosa, mientras que los bordes celulares ya no se ven de manera tan definida (Fig. 1c, ANEXO). Es común observar presencia de algunos linfocitos en el lumen del folículo (Fig. 1d, ANEXO) mientras que en las células de la granulosa empiezan a aparecer algunas vacuolas.

FPO-12 horas

Folículo muy contraído y de tamaño más reducido (Fig. 1e, ANEXO). Las células de la granulosa se observan de forma irregular. La teca aparece más adherida a la granulosa (Fig. 1f, ANEXO). Mayor presencia de núcleos picnóticos en la granulosa indican que la degeneración celular está en progreso; el lumen del folículo es visible y con presencia de linfocitos (Fig. 1f).

through the histological analysis of gonads of 10 fishes that were sacrificed.

Once the maximum vitellogenesis stage was reached, spawning induction was carried out. From 0.005 to 0.010 µg of buserelin acetate was used, following the methodology described by ESPINOZA *et al.* 2009; this stimulated the spawning in females, 12 to 24 hours post-injection. Spawning time was registered, and fishes were kept alive for 0, 6, 12, 24, and 36 hours post-spawning, then they were sacrificed, and their gonads were histological analyzed. The process used was the technique of paraffin infiltration (HUMASON 1979) and stained with hematoxylin-eosin. In order to ensure a correct characterization, at least 25 POFs were evaluated for each age (in hours).

3. RESULTS

Below are listed the characteristics of POFs of ages 0, 6, 12, 24, and 36 hours of anchoveta specimens, spawned and kept in captivity at an average temperature of 16 °C.

POF-0 hours

It appears as a long cord with numerous folds, and an approximate length of 1000 µm. Follicular cells appear arranged orderly, with well-defined forms, without any or little degree of degeneration. The granulosa cells are cylindrical (Fig. 1a, 1b, Annex), while the theca cells appear as a thin layer, more visible than when they surrounded the hydrated oocyte (Fig. 1b). There are large nuclei on the granulosa layer, usually at the apex of the cell (Fig. 1b). The lumen of the post-ovulatory follicle can be observed, and it may contain some eosinophilic granules (Fig. 1a, 1b).

POF-6 hours

The first signs of early degeneration of the follicle are visible, such as the presence of pyknotic nuclei in the granulosa cells, while cell edges do not appear much-defined (Fig. 1c). It is common to observe the presence of some lymphocytes in the follicle lumen, (Fig. 1d), while a few vacuoles begin to appear in the granulosa cells.

POF-12 hours

The follicle appears greatly shrunken and smaller (Fig. 1e). The granulosa cells are irregular in shape. The theca appears more attached to the granulosa (Fig. 1f). Greater presence of pyknotic nuclei in the granulosa, indicating that cellular degeneration is in progress; the follicle lumen is visible, with presence of lymphocytes (Fig. 1f).

FPO-24 horas

Folículo claramente degenerado e irregular; las células de la granulosa presentan un patrón más desordenado y de manera discontinua (Figs. 2a, 2b, ANEXO). El lumen es más reducido y puede contener pocos restos de gránulos eosinófilos (Fig. 2b). La teca es más difícil de distinguir por su adosamiento a la granulosa.

FPO-36 horas

Folículos son de tamaño muy pequeño y debido a la gran presencia de vacuolas, producto de la autólisis celular, se pueden confundir con ovocitos atresicos avanzados (Fig. 2c, ANEXO). El lumen del folículo es muy reducido o no es visible. Las paredes celulares son difíciles de distinguir (Fig. 2d, ANEXO).

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La degeneración de los FPO se ha utilizado por más de 30 años para el cálculo de la frecuencia del desove. Aunque la estimación se puede hacer con el material recolectado en el campo, teniendo en cuenta el tiempo de muestreo y el momento del pico de desove de la población (GANIAS 2012), lo más recomendable es hacer desovar a los peces en laboratorio y muestrearlos en intervalos de tiempo precisos.

En nuestro caso no se observó mayor diferencia entre las edades de los FPO de *E. ringens* que desovaron en cautiverio a 16 °C (con edad de FPO conocida) y la catalogación efectuada en ejemplares de anchoveta peruana obtenidas del seguimiento pesquero en base a la descripción realizada por HUNTER y MACEWICZ (1985) en *E. mordax*, a pesar que la temperatura del agua en la que se encontraron las anchovetas en cautiverio no fue similar al ambiente natural, donde las anchovetas viven a diferentes temperaturas durante todo el día. Además, las características estructurales de los FPO de *E. ringens* se muestran semejantes a las de *E. mordax* (HUNTER y MACEWICZ 1985) y *E. japonicus* Temminck y Schlegel (AHMED y OZAWA 2002) y posiblemente también a los de otros engráulidos, debido a la semejanza de ellos con los FPO de *E. mordax* como lo mencionaron HUNTER y MACEWICZ (1985).

Al igual que para la anchoveta en el Golfo de Biscay (ALDAY *et al.* 2010) las características tales como aparición de vacuolas, crecimiento de la granulosa en las células y ruptura de las paredes celulares son determinantes para describir el proceso de degeneración de los FPO. Cabe mencionar además, los cambios en la forma de los FPO, los que durante los primeros estadios son muy grandes, con muchos pliegues, pasando por una forma más cuadrada y terminan por tener forma triangular, muy similar a las características en la sardina *Sardina pilchardus* (Walbaum) descritas por GANIAS *et al.* (2007)

POF-24 hours

The follicle appears clearly degenerated and irregular; the granulosa cells present a more disorganized pattern, in a discontinuous way (Fig. 2a, 2b, Annex). The lumen is smaller and may contain few remnants of eosinophilic granules (Fig. 2b). The theca is less distinct because it is attached to the granulosa.

POF-36 hours

The follicle is very small and due to the large presence of vacuoles as a product of cellular autolysis, it may be confused with advanced atretic oocyte (Fig. 2c, Annex). The follicle lumen is either very small or not visible. Cell walls are difficult to be distinguished (Fig. 2d, Annex).

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

POFs degeneration has been used for more than 30 years for calculating the frequency of spawning. Although the estimation can be made base on the material collected in the field, taking into account the sampling time and the peak time of the spawning stock (GANIAS 2012), it is recommended to make fishes spawn in the laboratory and sample them at identified and defined intervals. In our case, no great differences were observed between the ages of POFs of *E. ringens* that spawned in captivity at 16 °C (with known age of spawning POF), and those of anchoveta specimens obtained from fishery monitoring, based on the description made by HUNTER & MACEWICZ (1985) for *E. mordax*, although the water temperature in which the anchovetas were found in captivity was not similar to their natural environment, since they normally live at different temperatures throughout the day. Moreover, the structural characteristics of POFs of *E. ringens* are similar to the classifications developed for *E. mordax* (HUNTER & MACEWICZ 1985) and *E. japonicus* (AHMED & OZAWA 2002), and maybe for other engraulids, due to their similarity with POFs of *E. mordax*, as mentioned by HUNTER & MACEWICZ (1985).

As with the anchovy in the Bay of Biscay (ALDAY *et al.* 2010), characteristics such as the appearance of vacuoles, the growing of granulosa cells and the rupture of cell walls, are determinant to describe the process of POFs degeneration. It is also worth mentioning the changes in the form of POFs, which during the early stages are very large, with many folds, then they are more square-shaped, and end up having a triangular form, very similar to the characteristics described by GANIAS *et al.* (2007) for the sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum), who

quienes indican que la evolución de la forma de los FPO es alométrica.

Otro criterio que se tiene en cuenta para caracterizar los FPO es la medida de su eje mayor, parámetro utilizado por ROUMILLAT y BROUWER (2004) en el pez estuarino *Cynoscion nebulosus* (Cuvier). Ellos observaron ejes de 200 a 300 μm entre las 0 y 4 horas post desove, disminuyendo progresivamente a 250-180 μm entre las 5 y 8 horas y 175-130 μm entre las 13 y 24 horas. Sin embargo, este es un parámetro muy variable dependiendo de la ubicación del corte histológico, y tomando en cuenta que la forma del ovocito de *E. ringens* es ovoidal, se prefirió no usarlo en este estudio.

La degeneración de los FPO es un proceso apoptótico, es decir una muerte programada, al igual que la atresia folicular. En estos últimos estadios, ambos tienen características morfológicas muy parecidas de acuerdo a MIRANDA *et al.* (1999). En algunas especies, como por ejemplo *S. pilchardus*, los FPO son muy distinguibles de todos los tipos de atresia, lo que no ocurre en *E. ringens*, en que los estadios avanzados de FPO se podrían confundir fácilmente con estadios avanzados de atresia de ovocitos vitelogénicos. Los FPO de *E. ringens* obtenidos en aguas a 16 °C, podrían ser confundidos con ovocitos atrésicos en estadios tardíos a partir de las 36 horas de edad, tiempo que podría disminuir conforme se incrementa la temperatura del agua en que habita (HUNTER y MACEWICZ 1985) lo que podría conducir a subestimaciones de la tasa de degeneración de los FPO (GANIAS *et al.* 2007). Según ALHEIT *et al.* (1984) en el caso de la anchoveta peruana los FPO pueden ser identificados hasta 50 horas después del desove. Otras anchovetas, como la japonesa *E. japonicus*, desovan en aguas más cálidas, entre 15 y 25 °C y la degeneración de sus folículos ocurre entre las 21 y 34 horas (FUNAMOTO y AOKI 2002); en el caso de *E. encrasicolus* (Linnaeus) los FPO se terminan de reabsorber entre 55 y 60 horas después del desove (ALDAY *et al.* 2005); la reabsorción ocurre más rápido en el caso de los túnidos (HUNTER *et al.* 1986; McPHERSON 1991). En el caso del pez vela, se produce en menos de 24 horas después del desove (CHIANG *et al.* 2006).

La validación de las etapas de degeneración de los FPO para *E. encrasicolus* en base a muestras del medio ambiente y de medio controlado, dio como resultado que la degeneración de los FPOs tenían 7 etapas (ALDAY *et al.* 2008, ALDAY *et al.* 2010), mostrando un proceso de degeneración más rápido que lo esperado, por lo tanto, la fracción del desove sería mayor a las que se habían estimado (URIARTE *et al.* 2012). En el caso de la anchoveta peruana, los procesos degenerativos de los FPO fueron descritos en 5 etapas y no se observaron cambios en su velocidad. El principal factor principal que podría ocasionar diferencias en la tasa de degeneración de los FPO es la temperatura (FITZHUGH y

state that the evolution of the shape of POFs is allometric.

Another criterion taken into account to characterize POFs is the measure of its major axis, parameter used by ROUMILLAT & BROUWER (2004) in the estuarine fish *Cynoscion nebulosus* (Cuvier). They observed axes of 200 to 300 μm between 0 and 4 hours post-spawning, which decreased gradually to 250 - 180 μm between 5 and 8 hours, and 175 - 130 μm between 13 and 24 hours. However, this is a very variable parameter depending on the location of the histological section, and, since the oocyte of *E. ringens* is ovate, we preferred not to use it in the present study.

Degeneration of post-ovulatory follicles is an apoptotic process; that means a programmed death, as it is the follicular atresia. In the last stages, both have very similar morphological characteristics, according to MIRANDA *et al.* (1999). In some species such as *S. pilchardus*, POFs are very visible from all types of atresia, which does not happen in *E. ringens*, where the advanced stages of POFs may be easily confused with advanced stages of atresia of vitellogenic oocytes. POFs of *E. ringens* presented in the water at 16 °C, could be confused with atretic oocytes in late stages, from 36 hours of age, time that could decrease depending if water temperature increases (HUNTER & MACEWICZ 1985). This may lead to underestimations of the degeneration rate of POFs (GANIAS *et al.* 2007). In the case of anchoveta, as mentioned by ALHEIT *et al.* (1984), POFs can be identified up to 50 hours after spawning. Other anchovies, such as the Japanese *Engraulis japonicus* spawn in warmer waters, between 15 and 25 °C and follicles degeneration occurs between 21 and 34 hours (FUNAMOTO & AOKI 2002); in the case of *E. encrasicolus* (Linnaeus), POFs are partially reabsorbed between 55 and 60 hours after spawning (ALDAY *et al.* 2005); resorption occurring even faster in the case of tuna (HUNTER *et al.* 1986, McPHERSON 1991). In the case of sailfish it occurs less than 24 hours after spawning (CHIANG *et al.* 2006).

The validation of POFs degeneration stages for *E. encrasicolus*, based on samples in natural and controlled environments, resulted in 7 stages of POF degeneration, and they were staged according to them (ALDAY *et al.* 2008, ALDAY *et al.* 2010), showing a faster degeneration process of POFs than what they expected, and therefore, spawning fraction was bigger than what they had estimated (URIARTE *et al.* 2012). In the case of anchoveta, the degenerative processes of POFs were described in 5 stages and no changes in their speed were observed. Since temperature is the main factor that could cause differences in the rate of POFs

HETTLER 1995, GANIAS *et al.* 2003; ROUMILLAT y BROUWER 2004). GANIAS *et al.* (2007) consideraron que el aumento de 1 °C en la temperatura ambiental aceleraría la tasa de reabsorción por más del 3%; entonces un aumento de 4 a 5 °C lo aceleraría de 12 a 15%, lo que equivale a 8 horas de aceleración. Esto implica que diferencias de temperatura entre sub-áreas de muestreo no introducirían desviaciones significativas en la correcta clasificación de los FPO y en el subsecuente efecto en las estimaciones de edades de los FPO. Según CLARAMUNT *et al.* (2007) cambios más drásticos en la temperatura, como eventos El Niño, produciría una aceleración más evidente en el proceso de degeneración de los FPOs.

Es necesario verificar los valores de diferencia térmica que podrían afectar significativamente las tasas de absorción de los FPO en *E. ringens*, considerando que stocks desovantes pueden ser encontrados a temperaturas que van de 14 a 22 °C (según datos de los cruceros oceanográficos del Instituto del Mar del Perú). Que según CUBILLOS *et al.* (2007) las temperaturas bajas también afectarían la tasa de reabsorción de los FPO, ellos observaron que en el rango de temperatura de 11 - 12 °C se estaría afectando la precisión en la asignación del grado de envejecimiento de los FPOs. Si existiesen diferencias significativas en las tasas de reabsorción, se deberían utilizar diferentes patrones para identificar los estadios de reabsorción de acuerdo a la temperatura de la zona de muestreo. La tasa de reabsorción de los FPO es baja en comparación a la de los ovocitos atrésicos y depende de la temperatura ambiente (SANTOS *et al.* 2005). Según GANIAS (2012) no se espera que la variabilidad en la temperatura inserte sesgo en la clasificación de los FPO. Sin embargo, el mismo autor menciona que, en casos en los que el número de clases de FPO se ve influenciado por la temperatura del ambiente, es necesario desarrollar claves para estudiar los estadios de los FPO a diferentes temperaturas.

Con respecto a la posibilidad de interpretaciones erróneas en las lecturas de las láminas histológicas conteniendo FPO, GANIAS (2012) menciona, y lo muestra con fotografías, que se obtiene diferentes resultados en la histomorfometría de los FPO según se utilice resina o parafina para la infiltración del tejido o se use diferentes tipos de fijador. En nuestro caso, utilizamos parafina para la infiltración de todas las muestras y formol bufferado al 10% como fijador, por lo que no habría problemas de confusión en la caracterización de la degeneración de los FPO. El tiempo de fijación post-mortem también es importante y es requisito indispensable que sea el mínimo para evitar problemas en las lecturas. Otro aspecto que GANIAS (2012) menciona con respecto al posible origen de error en la identificación de FPO es el tamaño de éste en relación a los ovocitos. Lo que podría ayudar, en este caso, es tener varias secciones de tejido que permitan comparar los cortes de estas estructuras a diferentes niveles. En nuestro caso, en una sola lámina

degeneración (FITZHUGH & HETTLER 1995, GANIAS *et al.* 2003, ROUMILLAT & BROUWER 2004). GANIAS *et al.* (2007) consider that, if an increase of 1 °C in the ambient temperature would accelerate the rate of resorption by more than 3%; then an increase from 4 to 5 °C would accelerate it from 12 to 15%, which is equivalent to 8 hours of acceleration. This implies that differences in the temperature among sampling sub-areas would not introduce significant deviations in the correct classification of POFs, and in the subsequent effect on POFs ages. According to CLARAMUNT *et al.* (2007) more drastic changes in the temperature, such as the El Niño event, would produce a more evident acceleration in the POFs degeneration process.

It is imperative to verify the values of thermal difference that could significantly affect the absorption rates of POFs in *E. ringens*, considering that spawning stocks can be found at temperatures from 14 °C to 22 °C (according to the data provided by the oceanographic cruises of the Peruvian Marine Research Institute). As reported by CUBILLOS *et al.* (2007), low temperatures would also affect the resorption rate of POFs, since they observed that at a temperature range of 11 - 12 °C the accuracy for assigning the degree of ageing of POFs would be affected. If there are significant differences in the resorption rates, different patterns should be used to identify the stages of resorption depending on the temperature of the sampling area. The resorption rate of POF is low compared to that of the atretic oocytes, and depends on the ambient temperature (SANTOS *et al.* 2005). According to GANIAS (2012), the variability in the temperature is not expected to insert bias into the correct classification of POFs. However, the same author mentions that, in those cases where the number of types of POF is influenced by the ambient temperature, it is necessary to develop keys that help staging POFs at different temperatures.

Regarding the possibility of misinterpretations in the readings of the histological glass slides containing POFs, GANIAS (2012), with the help of pictures, states that different results are obtained on POF histomorphometry, depending if the tissue is infiltrated with resin or paraffin, or on the type of fixative used. In our study, we used paraffin to infiltrate all samples with 10% buffered formaldehyde as fixative; this would prevent confusion when characterizing POFs degeneration. Post-mortem fixing time is also crucial and it has to be minimum in order to avoid problems in the readings. Another aspect mentioned by GANIAS (2012) that could lead to errors is the size of POF, in relation to oocytes. What could help is having several sections of tissue, which allow to compare the cuts of these structures at different levels. In our case, we include up to 12 or

podemos tener 12 o más secciones de tejido gonadal ya que se colocan dos filas de corte de tejido. Esto permite hacer un mejor análisis y se puede hacer porque las gónadas de anchoveta son relativamente pequeñas, pero para gónadas de mayor tamaño se requeriría un mayor número de láminas.

En el caso de *E. ringens*, se ha observado que los FPO recientes son sobreestimados debido a un sesgo en la captura de las hembras en el momento del desove (ALHEIT 1993); por lo tanto, las hembras desovantes Día 0 (menos de 24 horas) se excluyen de la estimación de la frecuencia de desove en la aplicación del método de producción de huevos. Para corregir este sesgo, el número de hembras desovantes Día 0 se iguala al número de hembras desovantes Día 1, ya que los FPO entre 24 y 36 horas no son sobreestimados y su identificación es más sencilla, ya que la degeneración de las células no es avanzada, por lo que no hay problema en ser confundidas con ovocitos atrésicos, como ocurre con los FPO de más de 36 horas después del desove, a diferencia de los estimado para *E. anchoita* Hubbs y Marini, donde se utiliza el promedio de los FPO día 1 y día 2 (PÁJARO *et al.* 1997) así como para *Brevoortia aurea* (Spix y Agassiz) (MACCHI y ACHA 2000). Como menciona GANIAS (2012), para asignar la edad de los FPO deben considerarse algunas características adicionales tales como la cantidad de FPO y el tamaño de ovocitos de más avanzado desarrollo. Los FPO más avanzados se presentan en menor número en la lámina y con ovocitos más grandes en la fase más avanzada de desarrollo.

Aunque hay pocos estudios de este tipo, es necesario hacer comparaciones de los resultados a diferentes temperaturas del agua, considerando el amplio rango latitudinal y de temperatura donde la anchoveta peruana desova, y la dependencia de la tasa de reabsorción de los FPO con respecto a la temperatura (PÉREZ *et al.* 1992, FITZHUGH y HETLER 1995, MACCHI *et al.* 2003, ALDAY *et al.* 2008).

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al colega Enrique Mecklenburg S. por su apoyo y trabajo en el proceso de construcción de las instalaciones donde se realizaron los experimentos en el edificio Humboldt en el Instituto del Mar del Perú.

more sections of gonadal tissue in a single slide since we set two rows of tissue sections. This enables to do a much better analysis since the gonads of anchoveta are relatively small, but for bigger gonads, a larger number of slides would be required.

In the case of *E. ringens*, it has been observed that young POFs are overestimated due to a bias in the capture of females at spawning time (ALHEIT 1993); therefore spawning females Day 0 (less than 24 hours) are excluded from the estimation of the spawning frequency when applying the method of egg production. In order to correct this bias, the number of spawning females Day 0 is equated to the number of spawning females Day 1, since POFs between 24 and 36 hours are not over-estimated and their identification is simpler because cells degeneration is not in progress, and they are not likely to be confused with atretic oocytes, as it happens with POFs older than 36 hours of age. This does not occur in the case of *Engraulis anchoita* Hubbs & Marini, where the mean of POF Day 1 and Day 2 is used (PÁJARO *et al.* 1997), and *Brevoortia aurea* (Spix y Agassiz) (MACCHI & ACHA 2000). As mentioned by GANIAS (2012), some additional characteristics, such as the amount of POFs and the size of oocytes with more advanced development, should be considered when determining the age of POFs. Most advanced POFs appear on the slide in a reduced number, and with bigger oocytes in the most advanced stage of development.

Although there are few studies of this type, it is necessary to make comparisons of the results at different water temperatures, considering the wide latitudinal and temperature range where anchoveta spawns, and the dependence of the reabsorption rate of the FPOs regarding the temperature (PÉREZ *et al.* 1992, FITZHUGH & HETLER 1995, MACCHI *et al.* 2003, ALDAY *et al.* 2008).

Acknowledgments

The authors would like to thank our colleague Enrique Mecklenburg S. for his support and his work in the process of building the installations where the experiments have taken place in the Humboldt building at Peruvian Marine Research Institute.

5. REFERENCIAS

- AHMED Z, OZAWA T. 2002. Annual eggs production of seasonal population of Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) in Kagoshima Bay, Southern Japan. Pakistan Journal of Biological Sciences. 5(6): 728-732.
- ALDAY A, URIARTE A, SANTOS M, MARTIN I, MARTINEZ DE MURGUIA A, MOTOS L. 2005. Staging and ageing the degeneration of postovulatory follicles for the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus*). ICES CM/Session Q: 25. 25 pp.
- ALDAY A, URIARTE A, SANTOS M, MARTIN I, MARTINEZ DE MURGUIA A M, MOTOS L. 2008. Degeneration of postovulatory follicles of the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). Sci. Mar. 72: 565-575.
- ALDAY A, SANTOS M, URIARTE A, MARTÍN I, MARTINEZ U, MOTOS L. 2010. Revision of criteria for the classification of postovulatory follicles degeneration, for the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). Revista de Investigación Marina. 17(8): 165-171.

- ALHEIT J, ALARCÓN V H, MACEWICZ B J. 1984. Spawning frequency and sex ratio in the Peruvian anchovy, *Engraulis ringens*. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report. 25: 43-52.
- ALHEIT J. 1993. Use of the daily egg production method for estimating biomass of clupeoid fishes: A review and evaluation. Bulletin of Marine Science. 53(2): 750-767.
- ARMSTRONG M, SHELTON P, HAMPTON I, JOLLY G, MELO Y C. 1988. Egg production estimates of anchovy biomass in the Southern Benguela System. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report. 29: 137-156.
- ARMSTRONG M J, WITTHAMES P R. 2012. Developments in understanding of fecundity of fish stocks in relation to egg production methods for estimating spawning stock biomass. Fisheries Research. 117-118: 35-47.
- BERNAL M, STRATOUDAKIS Y, WOOD S, IBAIBARRIAGA L, VALDÉS L, BORCHERS D. 2011. A revision of daily egg production estimation methods, with application to Atlanto-Iberian sardine. 2. Spatially and environmentally explicit estimates of egg production. ICES Journal of Marine Science. 68(3): 528-536.
- BERNAL M, SOMARAKIS S, WITTHAMES P R, VAN DAMME C J G, URIARTE A, LO N C H, DICKEY-COLLA M. 2012. Egg production methods in marine fisheries: An introduction. Fisheries Research. 117-118: 1-5.
- CHIANG W C, SUN C L, YEH S Z, SU W C, LIU D C. 2006. Spawning frequency and bath fecundity of the sailfin (*Istiophorus platypterus*) (Istiophoridae) in waters off Eastern Taiwan. Zoological Studies. 45(4): 483-490.
- CLARAMUNT G, SERRA R, CASTRO L R, CUBILLOS L. 2007. Is the spawning frequency dependent on female size? Empirical evidence in *Sardinops sagax* and *Engraulis ringens* off northern Chile. Fisheries Research. 85: 248-257.
- CUBILLOS L. 2005. Biología pesquera y evaluación de stock. Evaluación de poblaciones marinas y análisis de pesquerías. Departamento de Oceanografía, UDEC, Concepción. 198 pp.
- CUBILLOS L A, RUIZ P, CLARAMUNT G, GACITÚA S, NÚÑEZ S, CASTRO L R, RIQUELME K, ALARCÓN C, OYARZÚN C, SEPÚLVEDA A. 2007. Spawning, daily egg production, and spawning stock biomass estimation for common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central southern Chile in 2002 Fisheries Research. 86: 228-240.
- DICKEY-COLLAS M. 2012. Where do egg production methods for estimating fish biomass go from here? Fisheries Research. 117-118: 6-11.
- DRUMMOND C, BAZZOLI N, RIZZO E, SATO Y. 2000. Postovulatory follicle: A model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. Journal of Experimental Zoology. 287(2): 176-182.
- ESPIÑOZA C, PEREA A, CALDERÓN J, SALAZAR C, BUITRÓN B, VERA V, MECKLENBURG E, ROJAS P. 2008. Captura y acondicionamiento en cautiverio de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). Inf. Inst. Mar Perú. 34(3): 269-277.
- ESPIÑOZA C, VERA V, PEREA A, BUITRÓN B, ROJAS P, KJESBU O S. 2009. Efecto de la ración alimenticia sobre la maduración gonadal y acumulación de grasa de anchoveta peruana (*Engraulis ringens* Jenyns, 1842) en cautiverio. Lat. Am. J. Aquat. Res. 37(2): 181-190.
- ESPIÑOZA C, PEREA A, BUITRÓN B, CISNEROS P, CATCOPARCO C, ROMERO L, ALBERRO A, ROJAS P, VIZZIANO D. 2010. Inducción del desove y espermiación de anchoveta peruana *Engraulis ringens* en cautiverio, mediante la inyección de un análogo de GnRH. Lat. Am. J. Aquat. Res. 38(2): 234-24.
- FITZHUGH R, HETTLER F. 1995. Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. Fish. Bull. 93: 568-572.
- FUNAMOTO T, AOKI I. 2002. Reproductive ecology of Japanese anchovy off the Pacific coast of eastern Honshu, Japan. Journal of Fish Biology. 60: 154-169.
- GANIAS K. 2012. Thirty years of using the postovulatory follicle method: Overview, problems and alternatives. Fisheries Research. 117-118: 63-74.
- GANIAS K, SOMARAKIS S, MACHIAS A, THEODOROU A. 2003. Evaluation of spawning frequency in a Mediterranean sardine population (*Sardina pilchardus* sardine). Mar. Biol. 142: 1169-1179.
- GANIAS K, NUNEZ C, STRATOUDAKIS Y. 2007. Degeneration of postovulatory follicles in the Iberian sardine *Sardina pilchardus*: structural changes and factors affecting resorption. Fish. Bull. 105: 131-139.
- HUMASON G. 1979. Animal tissue techniques. Fourth edition. W. H. Freeman Co. San Francisco. 661 pp.
- HUNTER J, GOLDBERG S. 1980. Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish. Bull. 77: 641-652.
- HUNTER J, MACEWICZ B. 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. En: An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *E. mordax*. R. Lasker (editores). 79-94.
- HUNTER J, MACEWICZ B, SIBERT H. 1986. The spawning frequency of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, from the South Pacific. Fish. Bull. 84: 895-903.
- JACKSON G, CHENG Y W, WAKEFIELD C B. 2012. An evaluation of the daily egg production method to estimate spawning biomass of snapper (*Pagrus auratus*) in inner Shark Bay, Western Australia, following more than a decade of surveys 1997-2007. Fisheries Research. 117-118: 22-34.
- JANSSEN P, LAMBERT G, GOOS H. 1995. The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*. J. Fish. Biol. 47: 509-523.
- KIM J, LO N C H. 2001. Temporal variation of seasonality of egg production and the spawning biomass of Pacific anchovy, *Engraulis japonicus*, in the southern waters of Korea in 1983-1994. Fish. Oceanogr. 10 (3): 297-310.
- KRAUS G, HINRICHSSEN H H, VOSS R, TESCHNER E, TOMKIEWICZ J, Köster F W. 2012. Robustness of egg production methods as a fishery independent alternative to assess the Eastern Baltic cod stock (*Gadus morhua callarias* L.) Fisheries Research. 117-118: 75-85.
- LOCKWOOD S J, NICHOLS J, DAWSON W A. 1981. The estimation of a mackerel (*Scomber scomber* L.) spawning stock size by plankton survey. J. Plankton Res. 3: 217-233.
- LOWERRE-BARBIERI S, BROWN-PETERSON N, MURUA H, TOMKIEWICZ J, WYANSKI D, SABORIDO-REY F. 2011. Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive. Biology Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science. 3: 32-51.
- MACCHI G J, ACHA E. 2000. Spawning frequency and batch fecundity of Brazilian menhaden, *Brevoortia aurea*, in the Rio de la Plata estuary off Argentina and Uruguay. Fish. Bull. 98: 283-289.

- MACCHI G J, ACHA E M, MILITELLI M I. 2003. Seasonal egg production of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) in the Rio de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Fish. Bull.* 101: 332-342.
- McPHERSON G R. 1991. Reproductive biology of yellowfin tuna in the eastern Australian fishing zone, with special reference to the north-western Coral Sea. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 42: 465-477.
- MELIÁ P, CASAVOLA N, GATTO M. 2002. Estimating daily egg production of European anchovy in the Adriatic Sea: A critical appraisal. *Marine Ecology.* 23(1): 272-279.
- MELIÁ P, PETRILLO M, ALBERTELLI G, MANDICH A, GATTO M. 2012. A bootstrap approach to account for uncertainty in egg production methods applied to small fish stocks. *Fisheries Research.* 117- 118: 130- 136.
- MIRANDA A, BAZZOLI N, RIZZO E, SATO Y. 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue and Cell.* 31(5): 480-488.
- MURUA H, IBAIBARRIAGA L, ALVAREZ P, SANTOS M, KORTA M, SANTURTUN M, LOTOS L. 2010. The daily egg production method: A valid tool for application to European hake in the Bay of Biscay? *Fisheries Research.* 104: 100-110.
- NARIMATSU Y, KITAGAWA D, HATTORI T. 2005. Reproductive biology of female Rikuzen sole (*Dexistes rikuzenius*). *Fish. Bull.* 103: 635-647.
- PÁJARO M, MACCHI G J, R.P. SÁNCHEZ R P. 1997. Fecundidad y frecuencia reproductiva de las poblaciones bonaerense y patagónica de anchoíta argentina (*Engraulis anchoita*). *Rev. Invest. Des. Pesq.* 11: 19-38.
- PÁJARO M, MACCHI G J, LEONARDUZZI E, HANSEN J E. 2009. Spawning biomass of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) from 1996 to 2004 using the Daily Egg Production method. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 89(4): 829-837.
- PÁJARO M, HANSEN J E, LEONARDUZZI E. 2013. Applying a non-parametric bootstrap technique to assess the accuracy of biomass estimates of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) northern stock (34°S-41°S) with the Daily Egg Production Method. 1993-2008 period. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP).* 23: 69-86.
- PALOMERA I, PERTIERRA J P. 1993. Anchovy spawning biomass estimate by the daily egg production method in 1990 in the Western Mediterranean Sea. *Scientia Marina.* Vol. 57: 243-251.
- PARKER K. 1980. A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fish Bull.* 78: 541-544.
- PÉREZ N, FIGUEIREDO I, MACEWICZ. B J. 1992. The spawning frequency of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb.), off the Atlantic Iberian coast. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8: 175-189.
- ROUMILLAT W, BROUWER M. 2004. Reproductive dynamics of female spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) in South Carolina. *Fish. Bull.* 102: 473-487.
- SABORIDO-REY F, JUNQUERA S. 1998. Histological assessment of variations in sexual maturity of cod (*Gadus morhua* L.) at the Flemish Cap (north-west Atlantic). *ICES J. Mar Sci.* 515-521.
- SAIDAPUR K S. 1982. Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 75: 243-285.
- SANTOS B, RIZZO E, BAZZOLI N, SATO Y, MORO L. 2005. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the Sao Francisco Basin. *K. Fish Biol.* 67: 1446-1459.
- SANZ A, L. MOTOS L, URIARTE A. 1992. Fecundidad diaria de la población de anchoa, *Engraulis encrasicolus* (L.) del golfo de Vizcaya en 1987. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8(1): 203-214.
- SOMARAKIS S, KOUTSIKOPOULOS C, MACHIAS A, TSIMENIDES N. 2002. Applying the daily egg production method (DEPM) to small stocks in highly heterogeneous seas. *Fisheries Research.* 55: 193-204.
- SOMARAKIS S, PALOMERA I, GARCÍA A, QUINTANILLA L, KOUTSIKOPOULOS C, URIARTE A, MOTOS L. 2004. Daily egg production of anchovy in European waters. *ICES Journal of Marine Science.* 61: 944-958.
- SOMARAKIS S, GANIAS K, SIAPATIS A, KOUTSIKOPOULOS C, MACHIAS A, PAPAConstantinou C. 2006. Spawning habitat and daily egg production of sardine (*Sardina pilchardus*) in the eastern Mediterranean. *Fish. Oceanogr.* 15(4): 281-292.
- SOMARAKIS S, SCHISMENOU E, SIAPATIS A, GIANNOULAKI M, KALLIANIOTIS A, MACHIAS A. 2012. High variability in the Daily Egg Production Method parameters of an Eastern Mediterranean anchovy stock: Influence of environmental factors, fish condition and population density. *Fisheries Research.* 117- 118: 12- 21.
- STRATOUDAKIS Y, BERNAL M, GANIAS K, URIARTE A. 2006. The daily egg production method: Recent advances, current applications and future challenges. *Fish and Fisheries.* 7: 35-57.
- URIARTE A, ALDAY A, SANTOS M, MOTOS L. 2012. A re-evaluation of the spawning fraction estimation procedures for Bay of Biscay anchovy, a species with short interspawning intervals. *Fisheries Research.* 117-118: 96-111.
- WARD T M, HOEDT F, McLEAY L, DIMMLICH W F, KINLOCH M, JACKSON G, McGARVEY R, ROGERS P J, JONES K. 2001. Effects of the 1995 and 1998 mass mortality events on the spawning biomass of sardine, *Sardinops sagax*, in South Australian waters. *ICES Journal of Marine Science.* 58: 865-875.

ANEXO

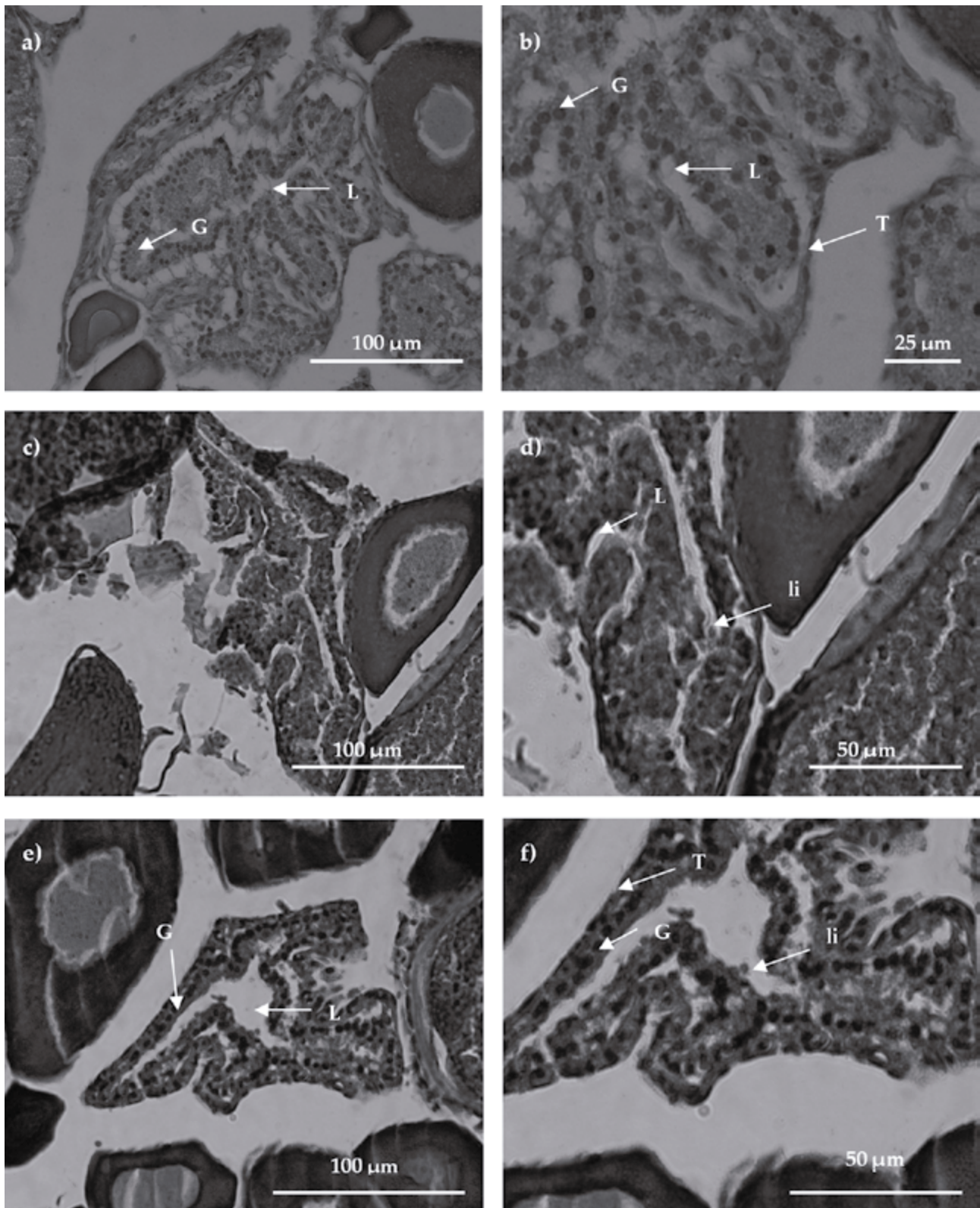


Figura 1.- Folículos post-ovulatorios de 0 a 12 horas en anchoveta peruana, *E. ringens* desovada en cautiverio a través de la inducción hormonal. a-b) FPO-0 horas. c-d) FPO-6 horas. e-f). FPO-12 horas. G: las células de la granulosa folicular, T: las células de la teca folicular, L: lumen folicular, li: linfocitos en el lumen folicular. La barra indica la escala de la fotografía

Figure 1. Post-ovulatory follicles from 0 to 12 hours in anchoveta, *E. ringens* spawned in captivity through hormonal induction. a-b) POF-0 hours. c-d) POF-6 hours. e-f) POF-12 hours. G: cells of the follicular granulosa, T: cells of the follicular theca, L: follicular lumen, li: lymphocytes in the follicular lumen. The bar indicates the scale of photography

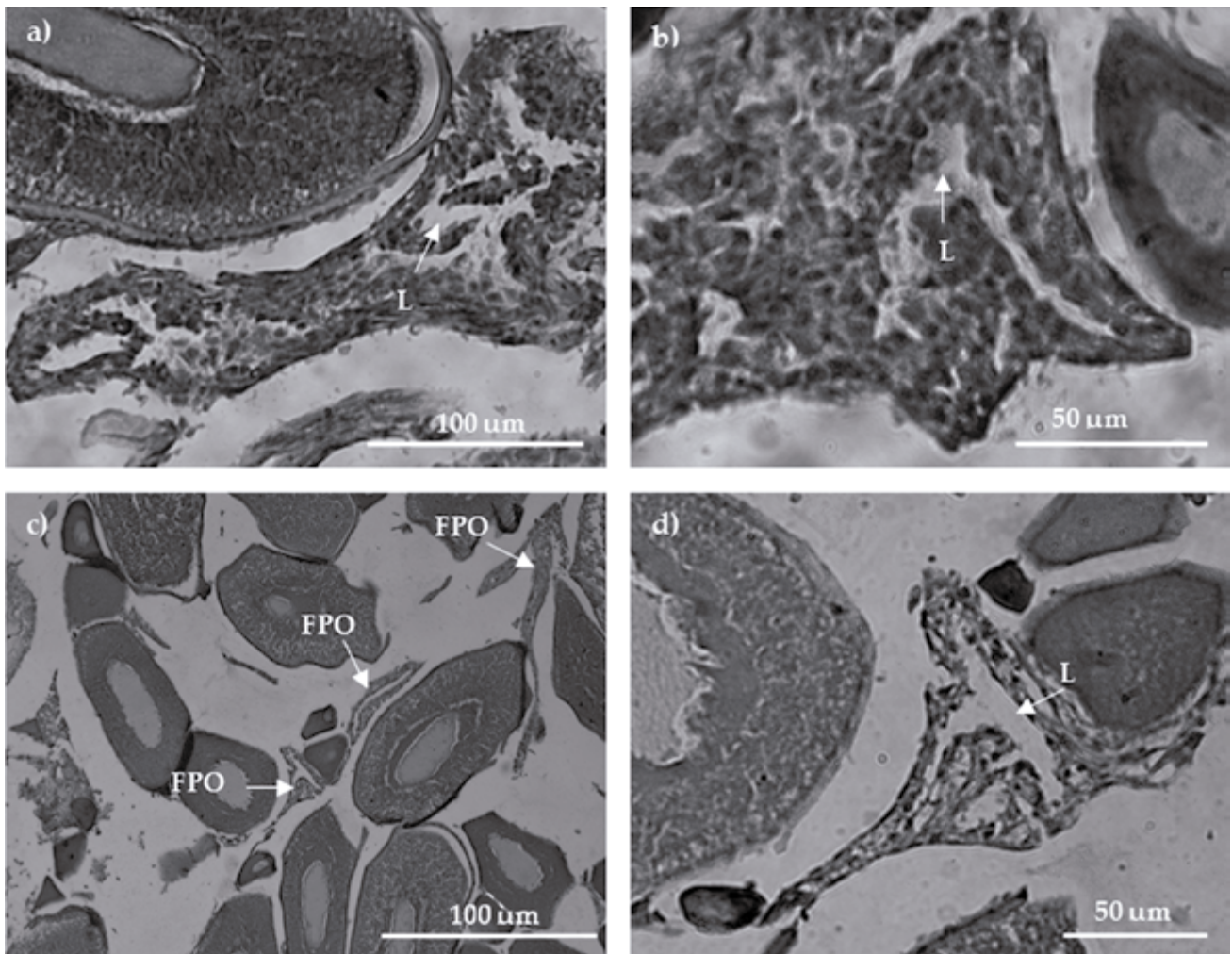


Figura 2.- Folículos post-ovulatorios de 24 a 36 horas, de la anchoveta peruana, *E. ringens* desovada en cautiverio a través de la inducción hormonal. a-b) FPO-24 horas. (c-d) FPO-36 horas. L: lumen del folículo, FPO: folículo post-ovulatorio

Figure 2. Post-ovulatory follicles at 24 to 36 hours, of anchoveta, *E. ringens* spawned in captivity through hormonal induction. (a - b) POF-24 hours. (c - d) POF-36 hours. L: follicle lumen, POF: post-ovulatory follicle