

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

Determinación del crecimiento durante los estadios tempranos de Trucha café (*Salmo trutta*) en hatchery, mediante análisis de la micro-estructura de sus otolitos.

Proyecto para optar al título de Ingeniero Acuicultor
Por
Omar Esteban Olguín Caroca

Valparaíso
2014

Comité de Titulación:

Profesor Guía : Sr. Guido Plaza Pasten.

Profesora : Sra. María Isabel Toledo D.

Profesor : Sr. José Gallardo M.

AUTORIZACIÓN DE USO

Al presentar este Proyecto como último requisito para la obtención del título de Ingeniero Acuicultor, autorizo a la biblioteca de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, para que disponga libremente de ella. Autorizo además reproducciones parciales o totales de este Proyecto sólo con fines académicos.

Omar Esteban Olguín Caroca

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis Padres Augusto y Flora por todo el cariño y comprensión en este largo proceso y ser fundamentales en cada logro de mi vida, a mis hermanos Diego, Bernardita y Cristian por su comprensión y su estimulación a seguir adelante, y a ti Carina por todo el apoyo incondicional entregado en los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Al terminar este proceso de investigación agradezco a mi profesor guía Sr. Guido Plaza, por su constante ayuda y por su gran apoyo en la elaboración de la presente tesis, además, por sus largas y constantes conversaciones en el laboratorio ecología marina aplicada, que me sirvieron para distraerme y pasar momentos agradables, así como también por responder constantemente las dudas que surgían a medida que avanzaba en este proyecto, además a mis compañeras de laboratorio Yacolen cerpa y Alejandra Hernández por su ayuda y buena onda.

Así también un especial agradecimiento al encargado de la piscicultura Sr. Germán Olivares por todas las facilidades entregadas para poder realizar y obtener muestras desde la Piscicultura de Río Blanco, como también a don Sergio y a la señora Adriana por la ayuda brindada en la toma de muestras.

A mis compañeros de universidad Yacolen, Javier, Marco, Gonzalo, Pilar, José, Iván, Natalia por todos los gratos momentos vividos en esta etapa universitaria.

A cada uno de los profesores de la escuela de ciencias del mar, que me brindaron su conocimiento para poder desarrollarme profesionalmente y lograr alcanzar mis metas.

Y finalmente a toda mi familia que estuvo presente en todo momento haciendo posible que este largo proceso llegará a su fin de una manera exitosa.

CONTENIDO

	Pág.
Portada	
Comisión de titulación	i
Acta de revisión de proyecto de título	ii
Autorización de uso	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivo específicos.....	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 De la especie.....	4
3.1.1 Descripción biológica.....	4
3.1.2 Alimentación.....	5
3.1.3 Distribución.....	5
3.1.4 Ciclo reproductivo en medio natural.....	5
3.1.5 Ciclo reproductivo en piscicultura y parámetros del lugar de cultivo.....	6
3.2 De los otolitos.....	7
3.2.1 Forma de aposición y micro-incrementos.....	8
3.2.2 De su forma.....	10
3.2.3 Micro-estructura.....	10
3.2.4 Conteo de incrementos.....	11
3.3 Retro-cálculo.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Patrones de crecimiento.....	14
4.1.1 Condiciones de cultivo.....	14
4.1.2 Muestreo.....	15
4.1.3 Procedimiento de extracción, toma de fotografía y análisis de otolitos.....	16
4.1.4 Pulido de otolitos.....	18
4.2 Validación de la periodicidad de formación de micro-incrementos.....	19
4.3 Análisis estadístico.....	20
4.3.1 Diferencias entre otolito derecho e izquierdo.....	20
4.3.2 Validación de la marca de Eclosión.....	20
4.3.3 Validación periodicidad de micro-incrementos.....	21
4.3.4 Determinación de las tasas de crecimiento.....	22
4.3.5 Método intercepto biológico.....	22

5. RESULTADOS	24
5.1 Micro-estructura de otolitos de alevines de Trucha café.....	24
5.1.1 Caracterización de los aspectos generales de la micro-estructura de otolitos de larvas y alevines de Trucha café.....	24
5.2 Análisis de diferencia entre el otolito izquierdo y derecho.....	26
5.3 Determinación del número de micro-incrementos antes de la eclosión.....	27
5.4 Procedimientos de validación.....	28
5.4.1 Validación de la marca de eclosión.....	28
5.4.2 Validación de la periodicidad de formación de los micro-incrementos.....	28
5.4.3 Validación de la periodicidad diaria.....	29
5.5 Determinación de las tasas de crecimiento.....	31
5.5.1 Relación lineal entre longitud total (LT) del alevín y la longitud antero-posterior (LAP) del otolito.....	31
5.5.2 Longitudes retro-calculadas.....	32
5.5.3 Tasas de crecimiento.....	32
5.6 Grosor promedio de los micro-incrementos en otolitos.....	34
6. DISCUSIÓN	35
6.1 Micro-estructura de los otolitos.....	35
6.2 Validación de la marca de eclosión.....	36
6.3 Periodicidad diaria de formación de micro-incrementos.....	37
6.4 Determinación de tasas de crecimiento a través de retro-calculo.....	38
6.4.1 Relación longitud alevín-otolito.....	38
6.4.2 Tasa de crecimiento.....	38
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFIA	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Trucha café (<i>Salmo rutta</i>).....	4
Tabla 2. Parámetros productivos óptimos para la especie <i>Salmo trutta</i>	6
Tabla 3. Tiempo de duración de las etapas de incubación medido en grados días (GD).....	6
Tabla 4. Parámetros de calidad del agua del Río Blanco en períodos estacionales, que ingresan a la piscicultura.....	7
Tabla 5. Toma de muestras de ovas y alevines de Trucha café (2012).....	16
Tabla 6. Variación de la longitud de alevines en la toma de muestras (2012).....	24
Tabla 7. Análisis estadístico para evaluar diferencias en el número de micro-incrementos entre el otolito izquierdo y derecho de alevines con saco absorbido de <i>Salmo trutta</i>	27
Tabla 8. ANOVA de un factor para validar la marca de eclosión.....	28
Tabla 9. Parámetros de la Regresión lineal para validación de periodicidad.....	30
Tabla 10. Prueba t-student para validar periodicidad de formación de los micro-incrementos.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trucha café (<i>Salmo trutta</i>).....	4
Figura 2. Ciclo de vida de la trucha café (<i>Salmo trutta</i>) en la piscicultura Río Blanco...	7
Figura 3. Ubicación de los otolitos en el oído de los peces teleósteos.....	8
Figura 4. Descripción de los micro-incrementos encontrados en los otolitos. a) Otolitos de larva de sardina (<i>Sardina pilchardus</i>), b) Otolito de trucha arcoíris.....	9
Figura 5. Vista de otolito de Trucha café (<i>Salmo trutta</i>) de 2 años, (bajo lupa).....	10
Figura 6. Incrementos encontrados en los otolitos, a) Anillos anuales y discontinuidades de merluza (<i>Merlucciusmerlucciushubsi</i>), b) Anillos sub-diarios en otolitos de merluza (<i>Merlucciushubbsi</i>).....	12
Figura 7. Relación entre el crecimiento del pez y su escama.....	13
Figura 8. Piscicultura de Río Blanco.....	14
Figura 9. Temperaturas promedio mensuales en la batea de incubación registradas en la mañana (—●—) y la tarde (—■—), correspondiente a los meses de Junio-Diciembre del año 2012, Piscicultura de Río Blanco.....	15
Figura 10. Batea de incubación horizontal para el periodo de incubación y alevinaje de Trucha café (Fotografía referencial).....	15
Figura 11. Equipos utilizados para extracción y análisis de otolitos. a) Lupa estereoscópica, b) Microscopio óptico Leicca ICC50, c) Microscopio óptico Labomed DIGI2, d) Ilustración del analizador de imágenes Image-pro plus midiendo radios de otolito de <i>Salmo trutta</i> , aumento 40x.....	17
Figura 12. Otolitos de alevines de Trucha café. a) sin pulir, b) correctamente pulido, donde se puede observar los micro-incrementos, c) Sobre-pulido, d) Sobre-pulido y fraccionado por un mal procedimiento. Muestras vistas bajo microscopio en zoom de 40x.....	18
Figura 13. Mantenimiento de alevines. a) Alevines recién eclosionados de Trucha café (<i>Salmo Trutta</i>), mantenidos en sobre una cuna de malla, b) Medidor multi-parámetro HACH.....	19

Figura 14. Procedimiento realizado en otolitos de Trucha café para validar la marca de eclosión. a) Otolitos recién eclosionado, b) otolitos de alevines post-eclosión.....	21
Figura 15. Estructura de otolitos alevines de Trucha café. a-b) pulidos y vistos al microscopio (con zoom de 10x), c-d) pulidos y visto en zoom de 40x, e) Sección del otolito que muestra P: primordio, ME: Marca de eclosión, MAS: Marca de absorción del saco, f) vista general del otolito en zoom de 40x, donde: PR: Post-rostrum, R: Rostrum, P: Primordio, N: Núcleo.....	25
Figura 16. Diferentes morfologías de otolitos de larvas en ovas y recién eclosionados de Trucha café. Vistos al microscopio en zoom de 20x (a-b-c-d) y en 100x (e-f).....	26
Figura 17. Diferentes resoluciones encontradas en los otolitos de Trucha café. a) Otolito de alevín mantenido en el LEDA (Laboratorio Experimental de Acuicultura); b) Otolito de alevín mantenido en la piscicultura de Río Blanco.....	29
Figura 18. Regresión lineal entre el n° de anillos en los otolitos (sagita) y el n° de días transcurridos post-eclosión de alevines de <i>Salmo trutta</i> . Ec: $y: 1.056x + 1.21$. ($r^2: 0.829$).....	30
Figura 19. Verificación de la relación longitud pez-otolito. a) Relación lineal entre la longitud del alevín y la longitud del otolito, b) Error de mínimos cuadrados. (Residuos vs radio de los otolitos a la captura).....	31
Figura 20. Longitudes medias retro-calculadas para alevines de trucha café.....	32
Figura 21. Tasas de crecimiento retro-calculadas, considerando desde la marca de eclosión hasta 50 días post eclosión.....	33
Figura 22. Relación entre la tasa de crecimiento y la longitud media retro-calculada.....	33
Figura 23. Curva que refleja las tasas de crecimiento encontrada para el periodo previo a la eclosión y post-eclosión en mm/d.....	34
Figura 24. Grosor promedio de los micro-incrementos en otolitos de alevines post-eclosión.....	34

RESUMEN

El presente trabajo de proyecto de título tuvo como objetivo efectuar un análisis retrospectivo del crecimiento somático de alevines de Trucha café (*Salmo trutta*), mediante análisis de la micro-estructura de sus otolitos sagitales. El estudio se llevó a cabo en alevines mantenidos en condiciones de confinamiento sujetos a fluctuaciones naturales de temperatura del agua y fotoperiodo en la piscicultura de Rio Blanco (Los Andes, V Región). Para cumplir con este propósito se desarrollaron los siguientes objetivos específicos: **(a)** caracterización de la micro-estructura de otolitos de alevines recién eclosionados y juveniles con saco absorbido; **(b)** validación de la marca de eclosión; **(c)** validación de la periodicidad de formación de los micro-incrementos; y **(d)** determinación de los patrones de crecimiento utilizando retro-cálculo.

La micro-estructura de los otolitos sagitales durante los estadios tempranos de esta especie presentó los siguientes rasgos característicos: (i) micro-incrementos distintivos versus micro-incrementos difusos para alevines provenientes de la Piscicultura de Rio Blanco y del laboratorio Experimental de Acuicultura, respectivamente; (ii) formación de una multiplicidad de primordios al interior del núcleo en la zona central del otolito, (iii) la existencia de una cantidad considerable de micro-incrementos previos a la eclosión, (iv) ocurrencia de marcas distintivas en los anillos de crecimiento, correspondientes a la marca de eclosión y a la absorción del saco vitelino.

Para validar la marca de eclosión se realizó un análisis de varianza de un factor entre longitud del otolito de alevines recién eclosionados y la de aquellos sacrificados con posterioridad a la eclosión, midiendo la longitud total de la marca más prominente encontrada, que se pudo seguir por todo el contorno del otolito. Se demostró que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambas longitudes, lo que fue indicativo de que la marca de eclosión fue correctamente identificada.

La validación de la periodicidad diaria de los micro-incrementos se llevó a cabo mediante la comparación de los días transcurridos post-eclosión versus los micro-incrementos encontrados en los otolitos de alevines mantenidos en condiciones experimentales, en Laboratorio Experimental de Acuicultura (LEDA) de la escuela de Ciencias del Mar, PUCV. Para validar la periodicidad se utilizó un t-test, que verificó que la pendiente fue significativamente igual a uno.

En este estudio se demostró que la relación entre la longitud del alevín y el tamaño del otolito fue significativamente lineal, demostrando proporcionalidad, permitiendo la reconstrucción de los patrones de crecimiento individual. Para este propósito se utilizó el

método del intercepto biológico que permitió posteriormente estimar las Tasas de Crecimiento Diarias (TCD). Durante los primeros 50 días de vida la TCD promedio fue 0,25 mm/d, con una tendencia decreciente después de la absorción del saco vitelino.

Finalmente, en este trabajo se demostró que los otolitos de Trucha Café (*Salmo trutta*) registraron con gran eficacia eventos de la historia de vida los primeros 50 días de vida, tales como el tiempo de eclosión, el momento de absorción del saco vitelino, así como también la reconstrucción de los patrones del crecimiento temprano. Este último hallazgo permite reducir el manejo en hatchery en un estadio de desarrollo tremendamente vulnerable, al mismo que se obtienen estimaciones precisas del crecimiento en dicho periodo. Adicionalmente, se demostró que los micro-incrementos depositados en condiciones de confinamiento en la Piscicultura de Río Blanco presentaron una elevada resolución y homogeneidad. Esta característica convierte a la micro-estructura de los otolitos en un marcador natural que puede ser usado para evaluar potenciales planes de repoblamiento de esta especie.

Palabras clave: Otolitos, Micro-estructura, Trucha café (*Salmo trutta*), Validación, Tasa de crecimiento.

ABSTRACT

The current research aimed to perform a retrospective analysis of somatic growth of alevins brown trout (*Salmo trutta*), by using otolith microstructure analysis. The study was conducted in yolk-sac alevins and fry kept in rearing conditions in the Rio Blanco (Los Andes, V Región) fish farming under natural fluctuations in both water temperature and photoperiod. To fulfill with this purpose the following specific objectives were developed: (a) characterization of the otolith microstructure otoliths of alevins and newly hatched fry; (b) validation of the brand in hatching trout fry coffee; (c) validation of the periodicity of formation of otolith micro-increment, and (d) determination of growth patterns.

The microstructure of the sagittal otoliths during the early stages of this species showed the following characteristic features: (i) micro-increments distinctive versus diffuse micro-increments for fry from Rio Blanco fish farming and from the Experimental Laboratory of Aquaculture (ELA), respectively; (ii) occurrence of a multiplicity of primordia in the nucleus in the central area of the otolith, (iii) the existence of a considerable amount of micro-increments before hatching, (iv) occurrence of two distinctive marks in otoliths corresponding to the hatching time and yolk sac absorption.

To validate the hatch check an analysis of variance was performed to compare the otolith length of newly hatched fry and the otolith length of those alevin sacrificed after hatching by measuring the total length of the most prominent concentric mark found, which could be followed around the otolith. Results showed no significant difference ($P > 0.05$) between the two otolith lengths, which was indicative that hatch check in otolith indeed corresponded to hatch time for this species.

Validation of daily periodicity of micro-increments was carried out by comparing the elapsed days post-hatching versus the numbers of micro-increments found in the otoliths of juveniles kept under experimental conditions in Experimental Laboratory of Aquaculture (ELA) of the school of Marine Sciences. To validate the periodicity of formation a t-test was used to verify the slope of the regression was significantly equal to one.

This study showed that the relationship between the alevin length and otolith size was significantly linear, demonstrating proportionality, and allowing the reconstruction of individual growth patterns. For this purpose the biological intercept method was used to estimate Daily Growth Rates (DGR). During the first 50 days of alevin life the average TCD was 0.25 mm / d, with a decreasing trend after absorption of the yolk sac.

Finally, this study showed that otoliths of the Brown Trout Café (*Salmo trutta*) recorded with high efficiency early life history events during the first 50 days of life, such as time of hatching, the time of yolk sac absorption as well as early growth patterns. The capacity of otoliths to reconstruct growth patterns can be used to reduce hatchery management in a development stage extremely vulnerable whereas at the same time accurate estimates of growth can be obtained in that period. Additionally, it was demonstrated that the micro-increments of otolith from reared alevins Río Blanco fish farming presented a high resolution and homogeneity. This feature becomes a natural tag that can be used to evaluate potential plans of stock enhancement of this species in further studies.

Keywords: Otoliths, Microstructure, Brown trout (*Salmo trutta*), Validation, Growth rate.

1. INTRODUCCIÓN

La trucha café o común (*Salmo trutta*) es una especie introducida en el país proveniente de Europa, que ha sido ampliamente utilizada para efectuar siembras en los cuerpos de agua desde fines del siglo XIX, en conjunto con la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el Salmon del Atlántico (*Salmo salar*). Estas fueron las tres primeras especies salmónidas en ingresar con este fin, principalmente en beneficio de potenciar la industria recreativa (Golusda, 1907). Esta especie no ha sido cultivada a gran escala en el país, debido principalmente a su baja tasa de crecimiento (Quillet *et al.*, 1992, Estay *et al.*, 2004), aspecto que la torna menos competitiva en términos productivos respecto a otros salmónidos. Sin embargo, *S. trutta* es cultivada en (algunas) pisciculturas y/o centros de investigación para apoyar planes de repoblamiento en ríos y/o tributarios. Esta especie es también muy valorada por los pescadores deportivos debido a su instinto acechador, constituyéndose en un recurso importante, principalmente en el sur de Chile, donde esta actividad se ha identificado como una de las con mayor proyección para la zona Austral (turismoaltpalena, 2012), atrayendo tanto al turista nacional como extranjero.

El repoblamiento consiste en liberar una cantidad significativa de alevines y/o juveniles producidos en cautiverio a un medio natural, con el fin de recuperar una determinada población; sin embargo, es necesario evaluar el nivel de eficacia de los planes de liberación (Wada *et al.*, 2012; Tanaka, 2013). Para este propósito los procedimientos más utilizados son las técnicas de marcajes mecánicos (Brennan *et al.*, 2007) y/o genéticos (Tringali *et al.*, 2008) a gran escala, que permiten determinar la proporción de ejemplares sobrevivientes que fueron producidos en cautiverio. No obstante, los procedimientos de marcaje son extremadamente costosos y muchas veces invasivos para el propio ejemplar, lo que dificulta su aplicación. Una técnica que podría contribuir a soslayar esta situación es la evaluación del repoblamiento a través la micro-estructura de los otolitos (MO), que ha tenido un desarrollo sustantivo en las últimas décadas con diversas aplicaciones (Methot & Kramer, 1979; Victor, 1982; Jones, 1992; Crecco & Savoy, 1985; Neilson *et al.*, 1985; Bolles y Begg, 2000), particularmente en salmónidos, específicamente en aquellas especies que tienen un potencial productivo y/o recreativo (Heard, 2012).

Los micro-incrementos diarios encontrados en la micro-estructura de los otolitos de peces permiten realizar diversas estimaciones como el retro-cálculo, el cual permite reconstruir el patrón de crecimiento individual con gran exactitud de individuos en diferentes etapas de desarrollo (Francis, 1990; Araya & Cubillos, 2002). Por ejemplo, ésta técnica puede ser aplicable de manera óptima para realizar análisis retrospectivos del crecimiento somático durante las etapas de larvas, primera alimentación y posteriores (Bustos & Landaeta, 2005; Ramirez & Marín, 2006; Carreño, 2010; Moyano *et al.*, 2012; Herrera-Reveles *et al.*, 2012). Su utilidad puede ser especialmente importante durante el periodo de absorción del saco vitelino en aquellas especies que posean un tiempo largo de

absorción como es el caso de las distintas especies de salmónidos (Carreño, 2010), para caracterizar su crecimiento. En confinamiento también es esperable que el patrón de formación de los micro-incrementos sea homogéneo debido a la regularidad del proceso de alimentación, en contraposición a lo que sucede en condiciones naturales. Por consiguiente, es fundamental evaluar el patrón de formación de los micro-incrementos en cautiverio en una especie determinada para verificar su potencial aplicabilidad como marcador natural para planes de repoblamiento.

Es en este contexto, que el presente estudio propone evaluar y caracterizar la micro-estructura de los otolitos en larvas y alevines de Trucha café (*Salmo trutta*) provenientes de la piscicultura de Río Blanco, en Chile central. Para ello se pretende describir, interpretar y determinar los patrones de crecimiento en la micro-estructura de los otolitos, así como también validar su periodicidad de formación, entre otros ítems. La ventaja de utilizar otolitos es que estos son las únicas estructuras que graban consistentemente los eventos diarios en los estadios tempranos de la vida, permaneciendo esta información inalterada a lo largo del tiempo (Campana & Nielson, 1985; Jones, 1992). Este estudio es una aproximación que permitirá favorecer las labores de monitoreo, para posteriormente evaluar en investigaciones futuras la contribución de las Truchas Café que son producidas en la piscicultura de Río Blanco, y mediante esta técnica establecer si existen poblaciones naturales que se estén reproduciendo. Comprender la situación de las distintas poblaciones es esencial para la gestión y conservación (Elliott, 1993).

2. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar los patrones de crecimiento durante los estadios tempranos de Trucha café (*Salmo trutta*) en hatchery, mediante análisis de la micro-estructura de sus otolitos.

2.2 Específicos

- Caracterizar la micro-estructura de otolitos de alevines recién eclosionados y con saco absorbido de Trucha café derivadas de cultivo.
- Validar la marca de eclosión en otolitos de alevines de Trucha café.
- Validar la periodicidad de formación de los micro-incrementos en otolitos de alevines de Trucha café.
- Determinar patrones de crecimiento de alevines de Trucha café derivadas de cultivo.

3. ANTECEDENTES

3.1 De la especie.

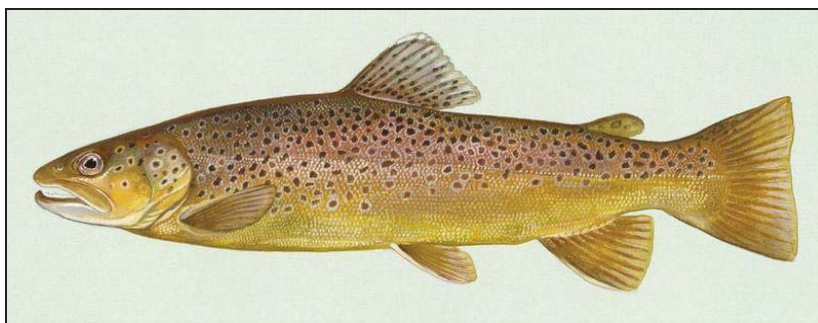


Figura 1. Trucha Café (*Salmo trutta*)

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la Trucha café (*Salmo trutta*)

Clasificación Taxonómica	
Clase	Actinopterygii
Subclase	Teleosteo
Orden	Salmoniforme
Familia	Salmonidae
Genero	Salmo
Especie	Salmo trutta (Linnaeus, 1758)
Nombre Común	Trucha café, Marrón o Común

3.1.1 Descripción Biológica.

Es un pez de cuerpo alargado y ligeramente aplanado en los laterales. La cabeza es grande y termina en una boca de gran apertura (el ángulo del maxilar llega al aplomo posterior del ojo). Los maxilares, la lengua y los huesos de la boca (vómer y huesos palatinos) dirigen los dientes hacia atrás. El extremo de la cola es generalmente recto. El cuerpo está cubierto de pequeñas escamas (120 a 130 sobre la línea lateral) (Breton, 2007). Un carácter común a toda la familia Salmónida es la presencia de una aleta adiposa situada entre la dorsal y la caudal, y más próxima a esta última (Alonso *et al.*, 2012).

La coloración marrón-amarillo del dorso se aclara en los flancos, marcados con puntos marrones y rojos, estos últimos a veces están ausentes y otras rodeados de blanco (ocelos). El vientre puede ser blanco o amarillo, y los colores varían mucho en función de las regiones, los cursos de agua y los refugios de los peces. (Breton, 2007). El color de la carne varía entre blanco y rosado, y dependerá del régimen alimenticio. Habita en aguas

someras, presenta tamaños entre 20 a 30 cm, con un promedio de vida de 6 años. Presenta una fuerte competición intra-específica, siendo el tamaño del individuo el que impone la jerarquía (Heggenes, 1988).

3.1.2 Alimentación.

Son depredadores oportunistas, en estado natural una vez absorbido el saco vitelino, los juveniles se alimentan de plancton, mientras que los adultos de zooplancton, invertebrados acuáticos y terrestres, pequeños peces y ranas, alimentándose en todos los niveles de agua (Daff, 2013). En sistema de cultivo se alimenta mediante pellets, de diversos calibres y componentes nutricionales, dependiendo del tamaño que presente. En la Piscicultura de Río Blanco se alimenta con productos Biomar.

3.1.3 Distribución.

La trucha está muy expandida por Europa y Asia, como también en las montañas del Atlas. En España, existen los grupos de trucha común del Cantábrico, el Miño, el Duero, el Tajo, el Guadalquivir y los linajes mediterráneos (Breton, 2007). En Chile se introdujeron exitosamente a fines del siglo XIX, gracias a las acciones de repoblamiento por parte del gobierno de la época, inicialmente en el criadero de Río Blanco (provincia de Aconcagua), que comenzó en 1904 con huevos de salmón del Atlántico, de trucha arco iris y marrón importados de Hamburgo (Alemania). Los alevines se liberaron en ríos desde Aconcagua hasta el Río Toltén (regiones V a IX). También se repoblaron los Ríos Maule, Cautín, Calle Calle y Bueno, y posteriormente, cuando se construyó un criadero en el Río Maullín, esas mismas especies se introdujeron en los Ríos Rahue, Petrohue y Puelo (Goludsa, 1907). Por lo que esta especie se puede encontrar en la zona centro y sur del país, en distintos grados de abundancia. Hoy en día, la piscicultura de Río Blanco mantiene estos programas de repoblamiento apoyadas por la empresa Colbun en sectores del Río Juncal.

3.1.4 Ciclo reproductivo en medio natural.

En ambiente natural en la zona sur del país, más específicamente en la décima región los periodos reproductivos de la Trucha café (*Salmo Trutta Fario*) presentan el máximo de madurez entre junio-agosto (Soto, 2002). Durante esta época los machos no comen y presentan el labio inferior en forma de gancho. La trucha alcanza la madurez sexual a los 2 ó 3 años de vida (Breton, 2007). Los huevos tienen un diámetro considerable (5 mm) y un peso de 0,03 gr, que limita la cantidad de 2000 a 3000 huevos por kg de hembra. Las abundantes reservas de vitelo permiten un desarrollo embrionario largo (40

días a 10°C). En el interior del desovadero, el huevo y a continuación el alevín se mantienen al abrigo de los depredadores (Vibert, 1981), y cuando el saco vitelino está prácticamente reabsorbido (tras 10 a 20 días), el alevín emerge (Breton, 2007).

3.1.5 Ciclo reproductivo en piscicultura y parámetros del lugar de cultivo.

Tabla 2. Parámetros productivos óptimos para la especie *Salmo trutta* (Liu & Sun 2004)

Variable	Parámetro
temperatura (°C)	0-24
pH	6,5-9,0
Oxígeno disuelto	60 a 80% de saturación de oxígeno
Dureza	5-15 mg/l
Nitrato	0-2 mg/l
Turbiedad	0,1 a 12 NTU
Amoníaco	< 0,1 ppm
Fosfato	0-0,2 mg/l
Sólidos disueltos	< 30 ppm
CO2	< 2 ppm

En cultivo intensivo se requiere de ciertos parámetros tolerables (Tabla 2) para el buen estado de los peces. Este ciclo reproductivo no difiere mucho de otro salmónidos en cuantos a los manejos que se realizan, pero sí varía en los meses que están maduros los gametos para el desove y generar la fertilización de las ovas. La duración de cada una de las etapas de incubación (Tabla 3) en grados días (GD: t° x n° días) extraída de Breton (2007), depende de las temperaturas del agua que ingresa a las bateas en la piscicultura. El ciclo que cumple la Trucha Café en la piscicultura de Rio Blanco es completo y va desde la obtención de las ovas hasta los individuos maduros (Fig. 2)

Tabla 3. Tiempo de duración de las etapas de incubación medido en Grados días (GD) (Breton 2007).

Especies de Salmónidos	Formación del embrión	Eclosión	Reabsorción del saco
Trucha Fario	300	390-460	220
Trucha Arco-iris	200	290-330	180

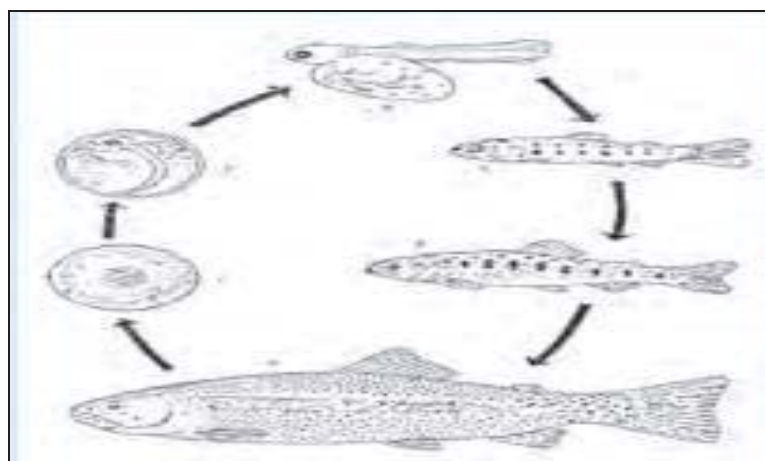


Figura 2. Ciclo de vida de la Trucha café (*Salmo trutta*) en la Piscicultura Río Blanco (Mariscal, 2010)

Tabla 4. Parámetros de calidad del agua del Río Blanco en periodos estacionales, que ingresan a la piscicultura. (MOP 2004).

Parámetros	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Conductividad eléctrica ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	417,3	340,5	202,7	217,8
Oxígeno disuelto (mg/l)	9,9	10	10,5	9,9
pH	7,7	7,8	7,7	7,6
Cloruro (mg/l)	16,8	14,3	11,9	8,9
Sulfato (mg/l)	118,3	79,8	38,4	55,7
Cobre (mg/l)	90	110	770	260
Hierro (mg/l)	0,44	0,06	0,08	11

Principales parámetros registrados de calidad de agua en el Río Blanco que ingresan a la piscicultura (Tabla 4), donde presentan algunas fluctuaciones dependiendo de la estación del año en que se encuentre, siendo estas aguas consideradas de calidad regular.

3.2 De los otolitos.

Aunque no tiene pabellón, el oído de los peces es relativamente comparable al nuestro. Incluye diversos órganos complejos en forma de laberintos y organizados en tres partes: la utrícula, el sáculo y la lagena. La utrícula, en el interior de la cual desembocan las terminaciones nerviosas, incluye tres canales semicirculares, orientados en las tres dimensiones del espacio, uno horizontal y dos verticales. El sáculo y la lagena contienen una concreción calcárea, el otolito (Breton, 2007). Los otolitos son las primeras estructuras calcificadas que se forman durante el desarrollo de los embriones de peces y presenta funciones relacionadas a la audición y el equilibrio.

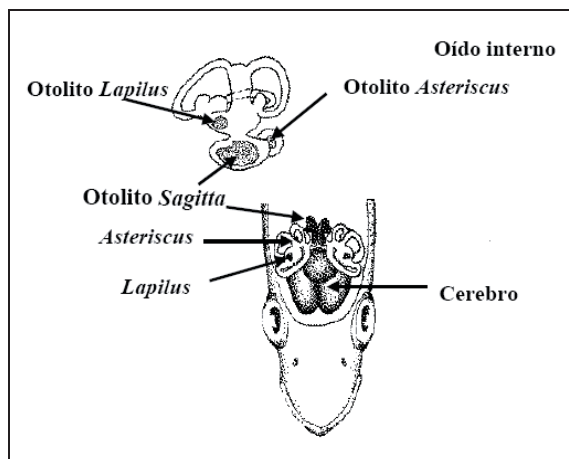


Figura 3. Ubicación de los otolitos en el oído de los peces teleósteos (Tombari, 2004)

En los peces teleósteos existen tres pares de otolitos y cada uno de ellos se diferencia en su localización, función, tamaño, forma y ultra-estructura. Estos tres pares de otolitos son denominados comúnmente *lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*, (Luque *et al.*, 1996) (Fig. 3). Al descubrir y describir Panella en 1971 la formación de anillos diarios en otolitos de peces de aguas templadas, abrió un campo amplio en el estudio de los otolitos, esto debido a que la existencia de estos micro-incrementos permite la determinación de la edad y el crecimiento diario con gran exactitud en larvas, juveniles y adultos (Luque *et al.*, 1996) a nivel individual. Según Wells *et al.* (2003), los otolitos se han utilizado masivamente como marcadores naturales, debido a que crecen durante toda la vida, esto en desmedro de las escamas y los huesos que tienden a degradarse durante periodos de stress. En muchas especies, la temporalidad de los eventos del ciclo de vida tales como la eclosión o el inicio de la primera alimentación también puede determinarse, ya que éstas pueden coincidir con la deposición de incrementos distintivos dentro de los otolitos (Víctor, 1982; Campana & Neilson, 1985; Jones, 1992; Carreño, 2010, Moyano *et al.*, 2012), estos anillos pueden entregar mucha información acerca del origen del pez. En consecuencia, todo el curso de la vida de los peces desde la eclosión hasta la muerte se refleja en la estructura de los otolitos.

3.2.1 Forma de aposición y micro-incrementos.

El otolito crece a partir de un núcleo central de materia orgánica denominado *primordium* (Fig. 4a) y luego va creciendo por aposición de materiales, formando los anillos (o bandas) tanto diarios como anuales, que se vislumbran como capas concéntricas con diferentes radios. Las bandas de micro-incrementos se encuentran constituidas por zonas hialinas y opacas (Fig. 4a). La diferente opacidad obedece a la cantidad de calcio y proteína que se deposita, en relación a diferentes condiciones fisiológicas, es decir que en las zonas hialinas existe una gran deposición de cristales de

carbonato de calcio, mientras en la zona opaca la cantidad es menor. Cuando la cantidad depositada es poca, los cristales de carbonato de calcio son pequeños y el espacio existente entre los mismos es llenado por proteínas, lo que aumenta la opacidad. De este modo, los otolitos aumentan su tamaño añadiendo zonas alternadas de diferente opacidad. Las bandas hialinas están caracterizadas por capas delgadas, mientras que las bandas opacas se caracterizan por capas gruesas (Leta & Keim, 1982). Por lo tanto los otolitos están constituidos por cristales de carbonato de calcio (aragonita) (Panfili, 1993), en pocos otolitos, el CaCO₃ se produce como calcita o vaterita. El estrés ambiental puede afectar la forma de cristalización del carbonato de calcio de los otolitos. Se han observado otolitos transparente y opacos (Morat *et al.*, 2008). Una de las características más apreciadas de los otolitos es la falta de reabsorción, esto significa que una vez que el material ha sido depositado, el organismo no va a utilizar de nuevo estos minerales incluso en períodos de inanición (Rodríguez, 2006).

Los anillos de crecimiento suelen ser idénticos en ambos otolitos, por tanto cuando un otolito resulta dañado durante la manipulación o es cristalino, puede emplearse el otro par (Morales-Nin, 1992). No obstante, se debe confirmar la existencia de simetría en la edad entre pares de otolitos, utilizando herramientas estadísticas como ANOVA de un factor, debido a que en ciertas ocasiones puede existir asimetría en la edad por causas fisiológicas, ambientales y/o efectos del proceso de preparación de los otolitos para análisis micro-estructural. Generalmente se utiliza el otolito denominado *Sagita* para realizar los estudios ya que habitualmente es el de mayor tamaño. En el caso de la familia salmónida existe la presencia de múltiples primordios (Fig. 4b) en algunas especies, tales como la Trucha Arcoíris (*O. mykiss*), Salmon del atlántico (*S. salar*), Salmon del pacifico (*O. kisutch*), entre otras. A nivel microscópico se pueden distinguir y caracterizar sus partes más importantes para representarlo de mejor forma (Fig. 5), donde: R: Rostrum; PR: Post rostrum; N: Núcleo, D: zona dorsal; V: Zona Ventral, SC: surco acústico.

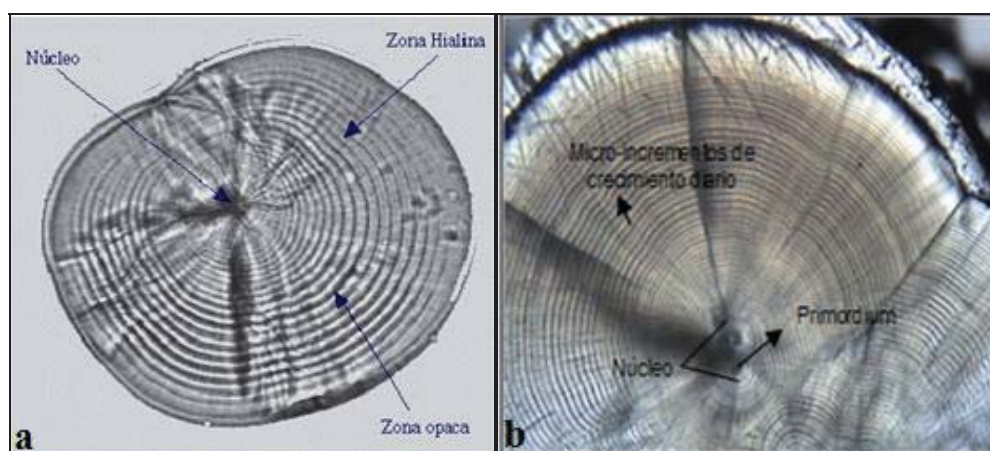


Figura 4. Descripción de los micro-incrementos encontrados en los otolitos (a) Otolitos de larva de sardina (*Sardina pilchardus*) (Luque *et al.*, 1996); (b) Otolito de Trucha arcoíris (Moyano *et al.*, 2012).

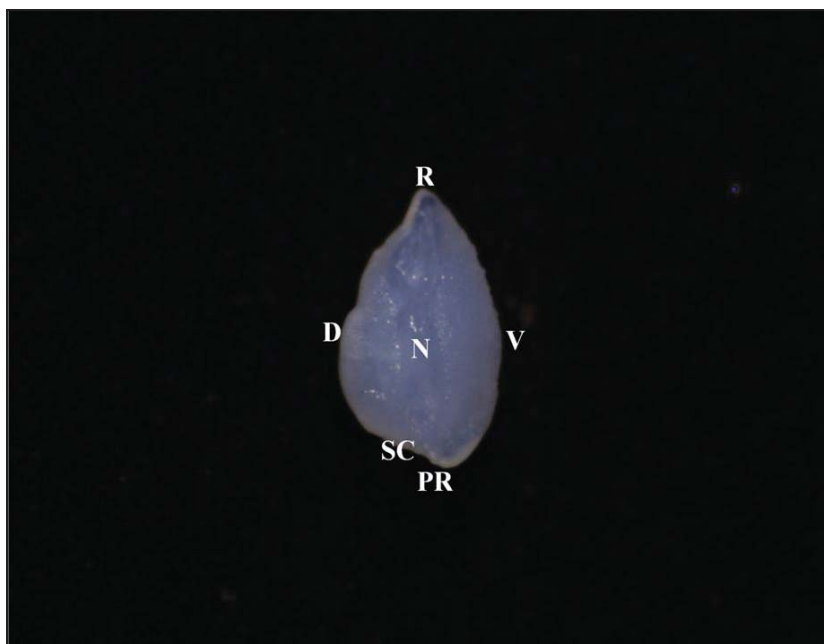


Figura 5. Vista de otolito de Trucha café (*Salmo trutta*) de 2 años, (bajo lupa).

3.2.2 De su forma.

Los otolitos presentan distintas formas en cada especie y aumentan de tamaño durante el crecimiento del pez. Por lo general la forma de los otolitos de cada familia es similar, aunque la forma es altamente especie-específica, pudiendo también variar entre sub-poblaciones (Martinez, *et al.*, 2007). En algunos casos se presentan algunas asimetría fluctuante, que es reflejo en ciertas ocasiones de la inestabilidad del desarrollo causado por estrés ambiental o genético (Sahyoun *et al.*, 2007)

3.2.3 Micro-estructura.

La periodicidad de formación de los anillos diarios, responde a un ritmo endógeno circadiano de 24 horas. La formación y bio-mineralización de estas bandas de crecimiento dependen de muchos factores metabólicos y ambientales, incluyendo clima, migraciones, nutrición, etc. (Ruiz *et al.*, 2004) La formación diaria de los incrementos permite, al menos teóricamente, determinar la edad con extrema precisión. (Morales-Nin, 1992). Se debe tener en cuenta que a partir del primer año de vida la finura de los incrementos depositados y la morfología del otolito pueden dificultar la interpretación de estos (Morales-Nin, 1988), por lo que es conveniente demostrar que los micro-incrementos tienen una naturaleza diaria antes de determinar la edad en cualquier especie (Peñailillo, 1996). La validación de la formación de incrementos diarios es un requisito previo necesario para el trabajo micro-

estructural de los otolitos de cualquier tipo (Campana & Neilson, 1985). Este requisito ha sido frecuentemente pasado por alto o ignorado (Beamish & McFarlane, 1983; Campana, 2001). La validación de la edad es más fiable cuando se obtienen los otolitos de los peces de edad conocida, sin embargo, la dificultad y el costo asociado con la cría de muchas especies hace que el uso conocido de edad en peces sea poco práctico (Dwyer *et al.*, 2003). Además, Balza (2000) recomienda incluir larvas con saco vitelino, recién eclosionados y embriones desarrollados antes de eclosionar, para poder estimar la formación del primer anillo logrando con esto una mayor exactitud y precisión en el cálculo de la edad. Para el presente estudio esta premisa se puede llevar a cabo debido a que la especie en estudio Trucha Café (*Salmo trutta*) es cultivada en la Piscicultura de Río Blanco, lo que permite conocer la edad de eclosión con una gran exactitud.

3.2.4 Conteo de incrementos.

Hay varios tipos de marcas de crecimiento cíclicos sobre los otolitos, dependiendo del nivel de percepción: micro-estructuras, macro-estructuras y discontinuidades estructurales (relacionados con macro-estructuras) (Panfili, 1993). Un incremento debe contarse cuando se puede seguir alrededor de la mayor parte del otolito (Fig. 6a). Cuando en el borde se encuentra una unidad discontinua el incremento se considera en formación y no debe contarse. Sin embargo, los micro-incrementos en el borde del otolito frecuentemente están enmascarados por la distorsión óptica producida por el cambio de refringencia entre éste y el medio y por tanto es difícil enumerar los incrementos marginales. También se pueden ver anillos sub-diarios en algunas especies que se marcan en menor grado (Morales-Nin, 1992), se debe tener especial cuidado con no sobreestimar los anillos diarios de crecimiento contando estructuras sub-diarias que suelen aparecer en otolitos de peces teleósteos (Fig. 6b), en el caso de salmónidos no se han reportado la presencia de estos anillos. En algunas ocasiones el microscopio no es lo suficientemente potente para visualizar anillos que son más pequeños, propiciando con esto una sub estimación de las edades de los peces a evaluar. Las micro-estructuras son visibles a magnificaciones mayores, tanto en microscopía óptica o electrónica, donde el grosor varía generalmente de 0,5 a 15 micrones (Panfili, 1993).

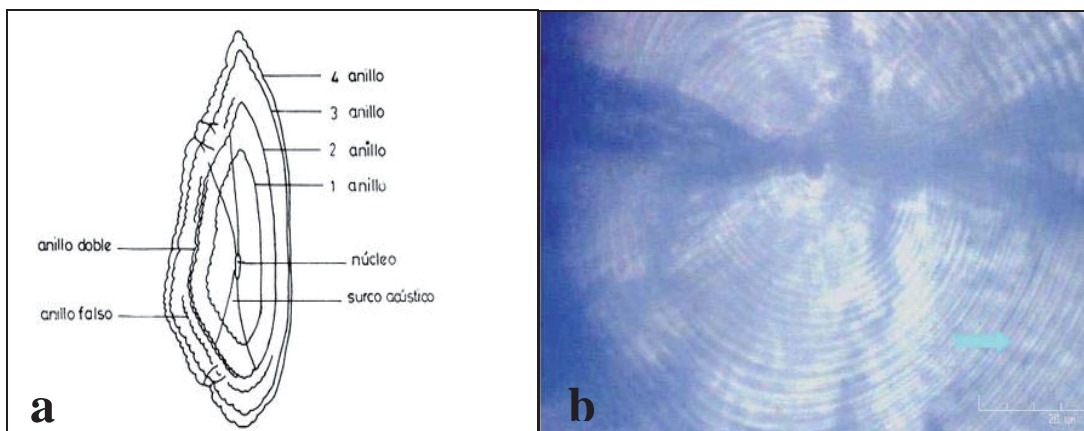


Figura 6. Incrementos encontrados en los otolitos, **a)** Anillos anuales y discontinuidades de merluza (*Merluccius merluccius hubsi*) (Fao, 1982). **b)** Anillos sub-diarios en otolitos de merluza (*Merluccius hubbsi*) (Burrati, 2003).

3.3 Retro-cálculo.

Una vez analizado los micro-incrementos presentes en el otolito u otra estructura dura como escamas o vertebras, se puede utilizar una técnica denominada retro-cálculo, esta técnica permite estimar las longitudes teóricas en edades anteriores a la de captura en base a la relación que exista entre el tamaño de la estructura que se considere (Fig. 7), para este estudio se utiliza el otolito, y la talla del pez (Domínguez, 2005). Las mediciones que se deben llevar a cabo en el caso del otolito son los radios de los micro-incrementos. Aún cuando todos los métodos de retro-cálculo se basan en la hipótesis de existencia de una proporcionalidad entre el crecimiento del otolito y el crecimiento del pez, sin embargo hay un número de especies en los cuales la relación longitud pez-otolito no es lineal (Araya & Cubillos, 2002).

La técnica de retro-cálculo se ha utilizado con diversos fines, tales como comparar tasas de crecimiento entre dos cepas (Carreño 2010), así como también reconstruir la historia de vida temprana (Moyano *et al.*, 2012; Shafer, 2000), determinación del momento de formación del primer anillo de crecimiento en otolito (Melo, 1984), estudios de la dinámica de crecimiento de los primeros estadios de vida (Laidig *et al.*, 1991), determinación del comienzo de la maduración sexual (Rijnsdorp & Storbeck, 1991), entre otras posibles aplicaciones.

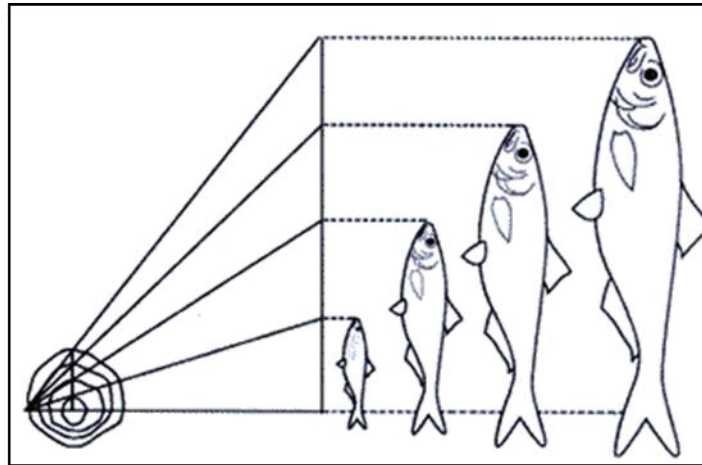


Figura 7. Relación entre el crecimiento del pez y su escama (Chugunova, 1969).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado para la presente Tesis, se llevó a cabo en la Piscicultura de Río Blanco (Fig. 8), perteneciente a Codelco-Chile, División Andina, la cual está bajo comodato de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Su ubicación se encuentra a 35 Km de la ciudad de los Andes, situada en el pueblo de Saladillo (32° 55'50 S, 70° 16'54 O), Quinta Región. Esta es la Primera piscicultura de especies salmónidas de Chile. Se encuentra abastecida por aguas del Río Blanco, que nace a los 1420 mts (snm.), los mayores caudales se presentan entre noviembre y febrero siendo en el mes de diciembre con el máximo caudal de 53,982 m³/s y los menores caudales se presentan entre los meses de mayo y agosto presentando en junio el menor caudal de 4,409 m³/s. (MOP, 2004)



Figura 8. Piscicultura de Río Blanco.

Para los propósitos del presente estudio se efectuaron dos procedimientos de recolección, uno orientado al estudio de los patrones de crecimiento y otro asociado a la validación de la periodicidad de formación de micro-incrementos.

4.1 Patrones de crecimiento.

4.1.1 Condiciones de cultivo.

Las muestras obtenidas de Trucha café para establecer los patrones de crecimiento, se obtuvieron íntegramente de la piscicultura de Río Blanco, estas presentaron una fecha de desove el 31 mayo y la eclosión se registró el 16 de agosto del año 2012, permaneciendo las ovas aproximadamente 3 meses hasta lograr la eclosión, esto influenciado por las temperaturas presentes en el agua del cultivo, las cuales están representadas en la Figura 9, del cual se puede apreciar la fluctuación de acuerdo a las estaciones del año, en donde los

meses de primavera y verano comienzan a registrar las más altas temperaturas, se tomaron registro dos veces al día por la mañana y la tarde.

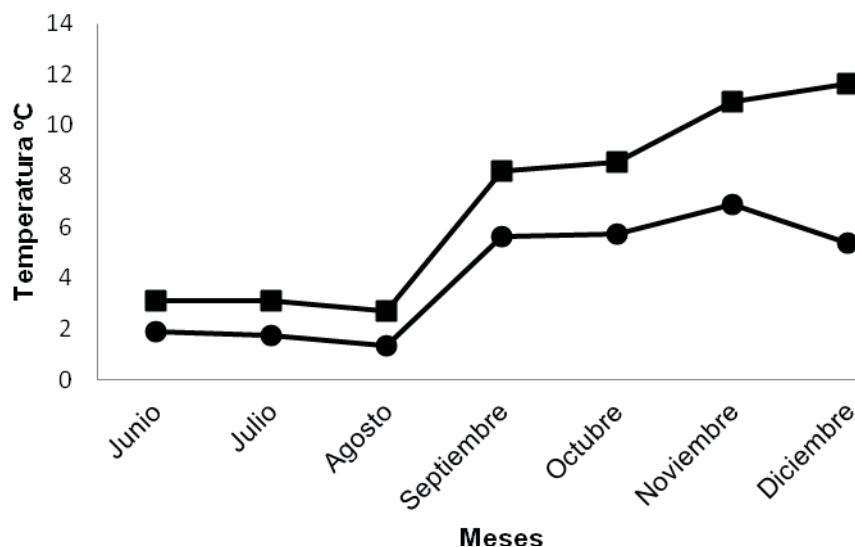


Figura 9. Temperaturas promedio mensuales en la batea de incubación registradas en la mañana (—●—) y la tarde (—■—), correspondiente a los meses de Junio-Diciembre del año 2012, Piscicultura Río Blanco.

4.1.2 Muestreo.

Se obtuvieron muestras de ovas, alevines recién eclosionados y con saco absorbido de Trucha café (*Salmo trutta*), las cuales fueron mantenidas en bateas de incubación horizontales (Fig. 10). Las ovas se mantuvieron en cunas de madera las cuales poseen malla metálica de abertura 2 mm, hasta el momento de la eclosión. Luego de absorber el saco se mantuvieron en las bateas de incubación para recibir su alimentación con dieta artificial.

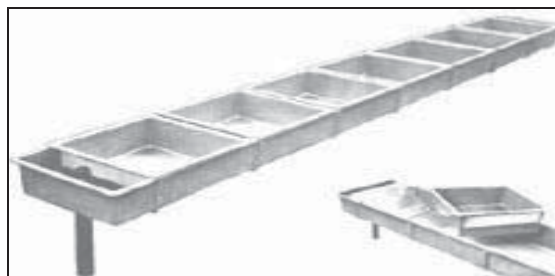


Figura 10. Batea de incubación horizontal para el periodo de incubación y alevinaje de Trucha café (Fotografía referencial).

Se tomaron un total de 190 muestras, las cuales se dividieron en 20 ovas y 80 alevines con saco vitelino recién eclosionados en una primera toma de muestras; posteriormente se obtuvieron 90 alevines con saco absorbido, las que fueron extraídas cada 7 días a partir del día 28/9/2012, quedando distribuido como se indica en la tabla 5. Todas las muestras fueron transportadas en frascos desde la piscicultura de Río Blanco hasta la Escuela de Ciencias del Mar, preservadas en una solución del alcohol al 95% para su posterior análisis en el laboratorio.

Tabla 5. Toma de muestras de ovas y alevines de Trucha café (2012).

Toma de muestras		
Fecha	Nº de muestras	Estado
28/08/2012	20 – 20	Ova y Alevín recién eclosionado
29/08/2012	30	Alevín recién eclosionado
30/08/2012	30	Alevín recién eclosionado
28/09/2012	15	Alevín con saco absorbido
05/10/2012	15	Alevín con saco absorbido
12/10/2012	15	Alevín con saco absorbido
19/10/2012	15	Alevín con saco absorbido
26/10/2012	15	Alevín con saco absorbido
02/11/2012	15	Alevín con saco absorbido

4.1.3 Procedimiento de extracción, toma de fotografía y análisis de otolitos.

Una vez obtenidas las muestras provenientes desde la piscicultura de Río Blanco, se procedió a extraer los otolitos utilizando agujas de disección y una lupa estereoscópica Labomed (Fig. 11a), la cual permitió ver de mejor forma la cámaras saculares donde se encuentran cada uno de los tres pares de otolitos. Se efectuó un corte en la parte superior de la cabeza del alevín, dejando al descubierto el cerebro, que se extrae por completo y con cuidado, debido a que puede traer adherido alguna porción de los sacos que contienen a los otolitos. Posteriormente los tres pares de otolitos fueron extraídos, limpiados de tejidos orgánicos residual, para luego ser montados en un portaobjeto utilizando esmalte de uña incolora, y finalmente fueron rotulados para su posterior análisis bajo microscopio.

Las muestras ya fijadas fueron observadas a través de un microscopio óptico el cual permitió a diferentes magnificaciones identificar la estructura del otolito. Para la caracterización de los patrones de crecimiento se utilizó el microscopio Leica ICC50 (Fig. 11b) a magnificaciones de 20-100X (esto) para ovas sin eclosionar y (en) alevines recién eclosionados, posteriormente cada muestra fue digitalizada utilizando el analizador de imágenes (LAS EZ). Para muestras de alevines con saco absorbido y alevines con saco vitelino se utilizó el microscopio Labomed digi2 (Fig. 11c) a magnificaciones de 10-40X, previo pulido parcial del otolito para exponer las bandas de crecimiento, las imágenes

fueron digitalizadas a través del programa Digi pro 4.0. Una vez tomadas las imágenes, se analizaron a través del software Image Pro Plus, para obtener registros de grosor y de las bandas de crecimiento en los otolitos (Fig. 11d).

Las lecturas de micro-incrementos de los otolitos se llevaron a cabo dos veces, de manera aleatoria, desconociendo la medida de longitud del alevín, con el fin de que la estimación de la edad no fuese influenciada.

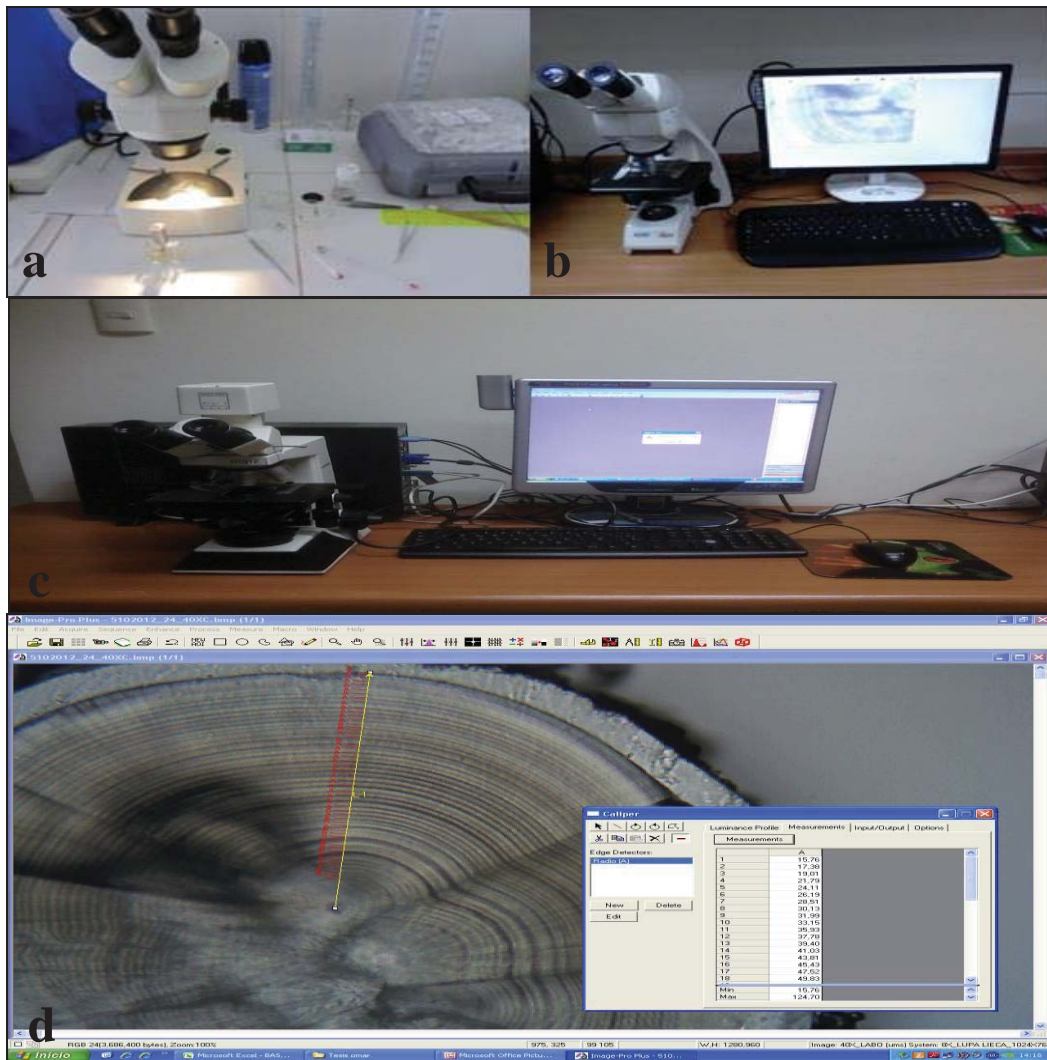


Figura 11. Equipos utilizados para extracción y análisis de otolitos, **a)** Lupa estereoscópica. **b)** Microscopio óptico Leica ICC50. **c)** Microscopio óptico Labomed DIGI2. **d)** Ilustración del analizador de imágenes Image-pro plus midiendo radios de otolito de *Salmo trutta*, aumento 40x.

4.1.4 Pulido de otolitos.

Los otolitos sagitales de alevines con saco absorbido que fueron extraídos no presentaron suficiente claridad al ser analizados bajo microscopia de luz (Fig. 12(a)); por lo tanto, debieron ser pulidos para dejar al descubierto las bandas de micro-incrementos. El procedimiento de pulido consistió en usar una lija de mayor graduación (2.000 μ m), pasando posteriormente a una lija de 3000 μ m de tamaño de grano, verificando continuamente el progreso en el microscopio, para evitar el sobre pulido. Posteriormente a la preparación las muestras fueron digitalizadas utilizando el analizador de imágenes (Image pro-plus), para realizar el conteo y medición de los micro-incrementos (Fig. 12(b)). Se debe enfatizar que el sobre-pulido (Fig. 12(c)) generó la fractura de la sección (Fig. 12(d)), con la consecuente pérdida de visibilidad de los micro-incrementos. Por consiguiente, las secciones sobre-pulidas fueron descartadas de los análisis. Los otolitos de embriones y alevines recién eclosionados fueron demasiado pequeños, por lo que no requirieron pulido para examinación de su micro-estructura.

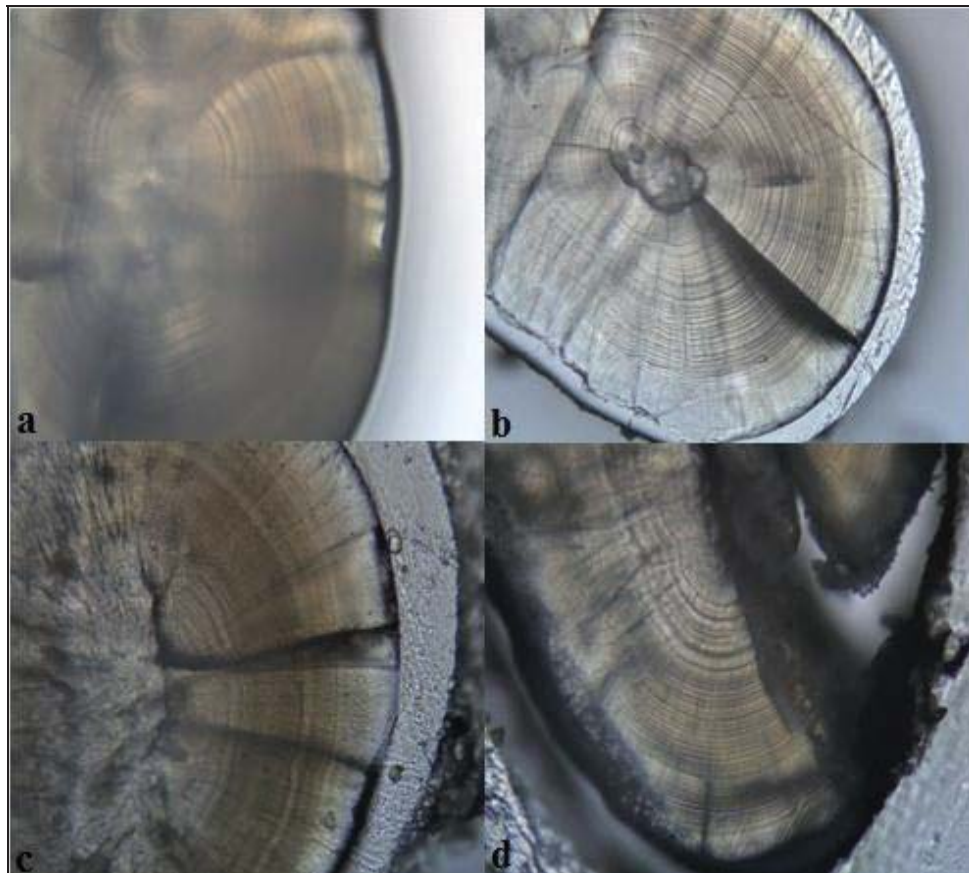


Figura 12. Otolitos de alevines de Trucha café **a)** sin pulir, **b)** correctamente pulido, donde se puede observar los micro-incrementos, **c)** Sobre-pulido, **d)** Sobre-pulido y fraccionado por un mal procedimiento. Muestras vistas bajo microscopio en zoom de 40x.

4.2 Validación de la periodicidad de formación de micro-incrementos.

La periodicidad de formación de micro-incrementos fue determinada a partir del seguimiento de alevines recién eclosionados. Para ello se recolectaron 250 ovas desde la piscicultura de Río Blanco en el año 2013, las que fueron posteriormente trasladadas al Laboratorio Experimental de Acuicultura (LEDA) ubicado en la Escuela de Ciencias del Mar. Las ovas fueron aclimatadas en un estanque acrílico (previamente desinfectado) con una cuna formada de malla fina de plástico (Fig. 13a), para permitir una buena circulación del agua. Se mantuvieron a una temperatura variable de acuerdo al medio, la cual promedió los $13,5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ para los meses de agosto-septiembre. Con el fin de mantener una buena condición de oxígeno se dispuso de aireadores los que mantuvieron el agua con $11,1\text{ mg/l}$ de O_2 promedio. Estas mediciones se llevaron a cabo con un medidor multi-parametro HACH (Fig. 13b). Todos los alevines recién eclosionados en un mismo día fueron mantenidos separados en distintos estanques para poder relacionar los días transcurridos y los micro-incrementos encontrados de forma precisa.

Para realizar la extracción y conteo de los micro-incrementos se utilizaron las mismas herramientas previamente descritas para los otolitos utilizados para caracterizar los patrones de crecimiento. Para determinar la marca de eclosión, se utilizaron otolitos de alevines recién eclosionados, para posteriormente contrastarlos con valores observados en otolitos de alevines post-eclosión.

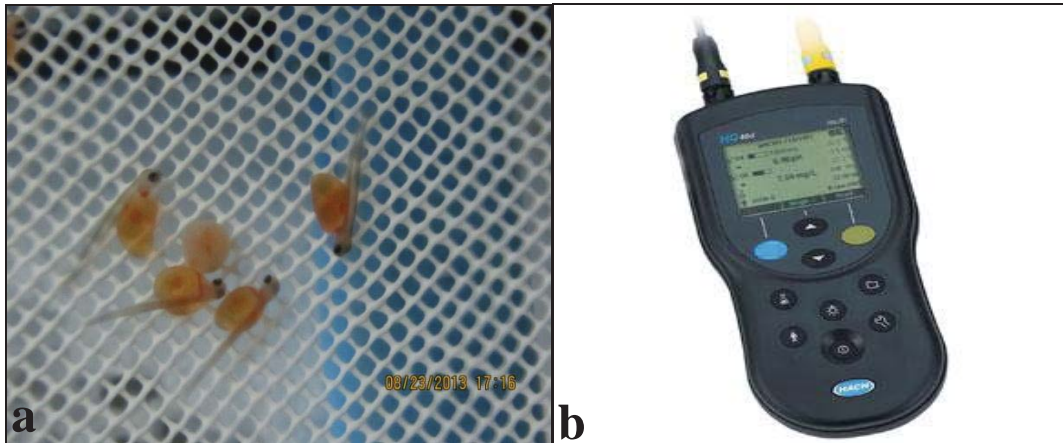


Figura 13. Mantenimiento de alevines, **a)** Alevines recién eclosionados de Trucha café (*Salmo Trutta*), mantenidos sobre una cuna de malla. **b)** Medidor multi-parametro HACH.

4.3 Análisis estadístico.

4.3.1 Diferencias entre otolito derecho e izquierdo.

Para determinar si existieron diferencias significativas entre el otolito sagita derecho e izquierdo de alevines con saco absorbido, se utilizó análisis de varianza de un factor (ANOVA), mediante los módulos de modelos generales lineales del programa SYSTAT 12. Esta técnica permitió realizar una comparación de las medias (μ) de n grupos, en este caso de ambos otolitos. Se tomaron un total de 15 muestras definiendo al número de micro-incremento diarios como variable dependiente y la posición (derecha vs izquierdo) como factor fijo. La hipótesis fueron las siguientes:

H_0 : No existieron diferencias significativas entre otolito derecho e izquierdo ($\mu_1 = \mu_2$).

H_1 : Existieron diferencias significativas entre el otolito derecho e izquierdo ($\mu_1 \neq \mu_2$).

Por lo tanto, se Rechaza H_0 (Hipótesis nula) si se cumple que: $P < \alpha$;

Donde: μ_1 : Media del n° de micro-incrementos en el otolito derecho

μ_2 : Media del n° de micro-incrementos en el otolito izquierdo

α : Nivel de significancia (0,05 %)

P: Probabilidad de ocurrencia (entregada por el programa estadístico)

4.3.2 Validación de la marca de Eclosión.

Se debió validar primero la marca de eclosión para poder llevar a cabo posteriormente los cálculos de validación de la periodicidad diaria de los micro-incrementos. Para ello se realizó una ANOVA de un factor comparando la longitud de los otolitos de alevines recién eclosionados (Fig. 14a) versus la longitud de la marca de eclosión encontrada en otolitos de alevines ya eclosionados de muestras posteriores (Fig. 14b).

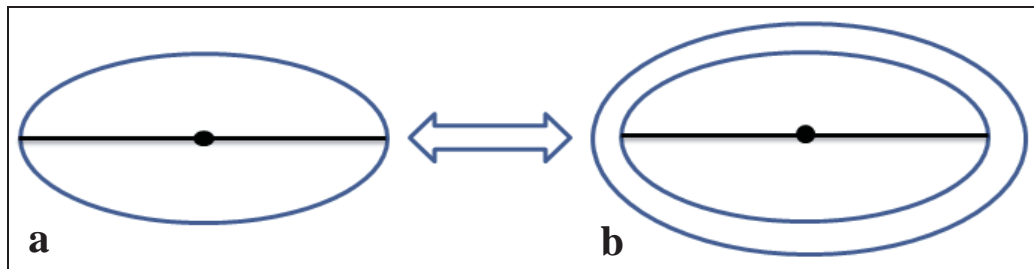


Figura 14. Procedimiento realizado en otolitos de Trucha café para validar la marca de eclosión, **a)** Otolitos recién eclosionado, **b)** otolitos de alevines post-eclosión.

La hipótesis a comprobar es; si las medias de ambas muestras son iguales o distintas, es decir:

H_0 : No existen diferencias significativas en la media de las marcas de eclosión de otolitos de alevines recién eclosionados y muestras posteriores.

H_1 : Existen diferencias significativas en las medias de las marcas de eclosión.

$$\mu_1 = \mu_2 \quad \text{ó} \quad \mu_1 \neq \mu_2$$

Se rechaza H_0 si: $p < \alpha$

Donde:

μ_1 : Media de las longitudes de otolitos de alevines recién eclosionados.

μ_2 : Media de las longitudes de otolitos de alevines con saco absorbido.

α : Nivel de significancia (0,05%)

p : Probabilidad de ocurrencia.

4.3.3 Validación periodicidad de micro-incrementos.

Para validar si los micro-incrementos fueron producidos diariamente se utilizó la prueba t-student. Para este fin se compararon los días post eclosión del alevín y el número de micro-incrementos formados en el otolito, con la intención de demostrar si la pendiente es significativamente igual a uno. Para este propósito se utilizaron muestras de alevines con saco vitelino que fueron mantenidas en el LEDA (Laboratorio Experimental de Acuicultura).

Hipótesis:

H_0 : $b_1=1$; pendiente de la recta igual a 1

H_1 : $b_1 \neq 1$; pendiente de la recta distinto de 1

Se rechaza H_0 si:

$$|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$$

En el que t_0 se calcula de la siguiente manera:

$$t_0 = \frac{b_1 - 1}{se(b_1)}$$

Donde:

- b_1 : Pendiente de la regresión.
- t_0 : Estadístico de prueba.
- α : Nivel de significancia.
- n : Número de observaciones.
- $se(b_1)$: Error estándar de la pendiente.

4.3.4 Determinación de las tasas de crecimiento.

Se realizó en base a las bandas de micro-incrementos de los otolitos, el cual permite reconstruir los patrones de crecimiento diario. Este cálculo se efectuó en base a una relación lineal existente entre la longitud del pez y la longitud del otolito, aunque esta relación no se da en todos los casos, por lo tanto se debe probar el supuesto de que efectivamente exista una relación lineal.

El análisis retrospectivo o retro-cálculo es una técnica que permite utilizar esa información para estimar dimensiones corporales en edades o etapas previas de la historia de vida, a través de relaciones entre mediciones realizadas en la estructura dura y las dimensiones del pez. (Araya & Cubillos, 2002), para llevar a cabo el retro-cálculo se usó el método del intercepto biológico.

4.3.5 Método intercepto biológico.

La ecuación a utilizar será la del intercepto biológico propuesto por Campana (1990), y es una modificación de la ecuación de Fraser-Lee (Araya 2002)

$$L_i = L_c + (R_i - R_c)(L_c - L_0)(R_c - R_0)^{-1}$$

Donde:

L_i: Longitud del pez al momento de formación del i-ésimo annulus u otra marca en el otolito.

L_c: Longitud del pez al momento de la captura.

R_i: Tamaño del otolito al momento de formación del i-ésimo annulus u otra marca.

R_c: Tamaño del otolito al momento de la captura.

R₀: Tamaño del otolito al momento de la eclosión.

L₀: Longitud del pez al momento la eclosión.

Para el caso de la Trucha café según Breton 2007, el tamaño de eclosión promedio es de 15 mm, el cual fue utilizado en la fórmula propuesta por Campana 1990, para determinar longitudes a través del retro-cálculo y con esto las tasas de crecimiento.

Se estimó la tasa de crecimiento diaria que presentan los alevines de Trucha café, para determinar qué tipo de crecimiento presentan, ya sea constante, ascendente, descendente, etc. para esto se utilizó la siguiente fórmula:

Tasa de Crecimiento Diaria= Long. Alevín Día (n+1) – Long. Alevín Día(n)

5. RESULTADOS

5.1 Micro-estructura de otolitos de alevines de Trucha café.

Los alevines con saco absorbido que fueron utilizados para análisis micro-estructural de sus otolitos, fluctuaron entre 2,4 y 2,8 cm, no detectándose diferencias significativas en el tamaño medio entre las fechas de muestreo.

Tabla 6. Variación de la longitud de alevines en la toma de muestras (2012).

Fecha de muestra	Rango(cm)	Media (cm) + SD	Nº alevines
28/09/2012	2,4 - 2,7	2,56 ± 0,101	15
05/10/2012	2,35 - 2,8	2,64 ± 0,099	15
12/10/2012	2,5 - 2,75	2,64 ± 0,063	15
19/10/2012	2,6 - 2,77	2,66 ± 0,051	15
26/10/2012	2,6 - 2,75	2,64 ± 0,057	15
02/11/2012	2,4 - 2,7	2,59 ± 0,081	15

5.1.1 Caracterización de los aspectos generales de la micro-estructura de otolitos de larvas y alevines de Trucha café.

Los otolitos sagita de Trucha café en líneas generales presentan una estructura de margen irregular comprimida lateralmente, con una parte que tiende a ser ovalada (post-rostrum) y una prolongación en su parte posterior (rostrum) terminado en punta (Fig. 15 (a, b, f)). También se aprecia la presencia de múltiples primordios al interior del núcleo del otolito (Fig.15f), aunque en algunas ocasiones queda en evidencia la existencia de dos núcleos (Fig. 15d). Alrededor del núcleo se comienza a depositar las bandas de micro-incrementos supuestamente diarios (Fig. 15(c,d,e)), los que se van formando en torno al núcleo de manera concéntrica y con bastante contraste. La zona que presentó una mayor claridad de estos micro-incrementos fue el post-rostrum (Fig. 15f), que fue la región a través de la cual se llevaron a cabo los conteos para tener una buena precisión. Otra característica presente en los otolitos fue la presencia de anillos o marcas (continuas) más prominentes que el resto, los cuales fueron distintivas en una gran cantidad de muestras. Se asumió que estas marcas correspondieron a dos momentos importantes en la vida de las larvas de Trucha café, los cuales son el momento de la eclosión y la absorción del saco vitelino (Fig. 15e). Se observó un promedio de 18 anillos (Rango 15-23) entre la marca de eclosión y absorción del saco en las muestras analizadas.

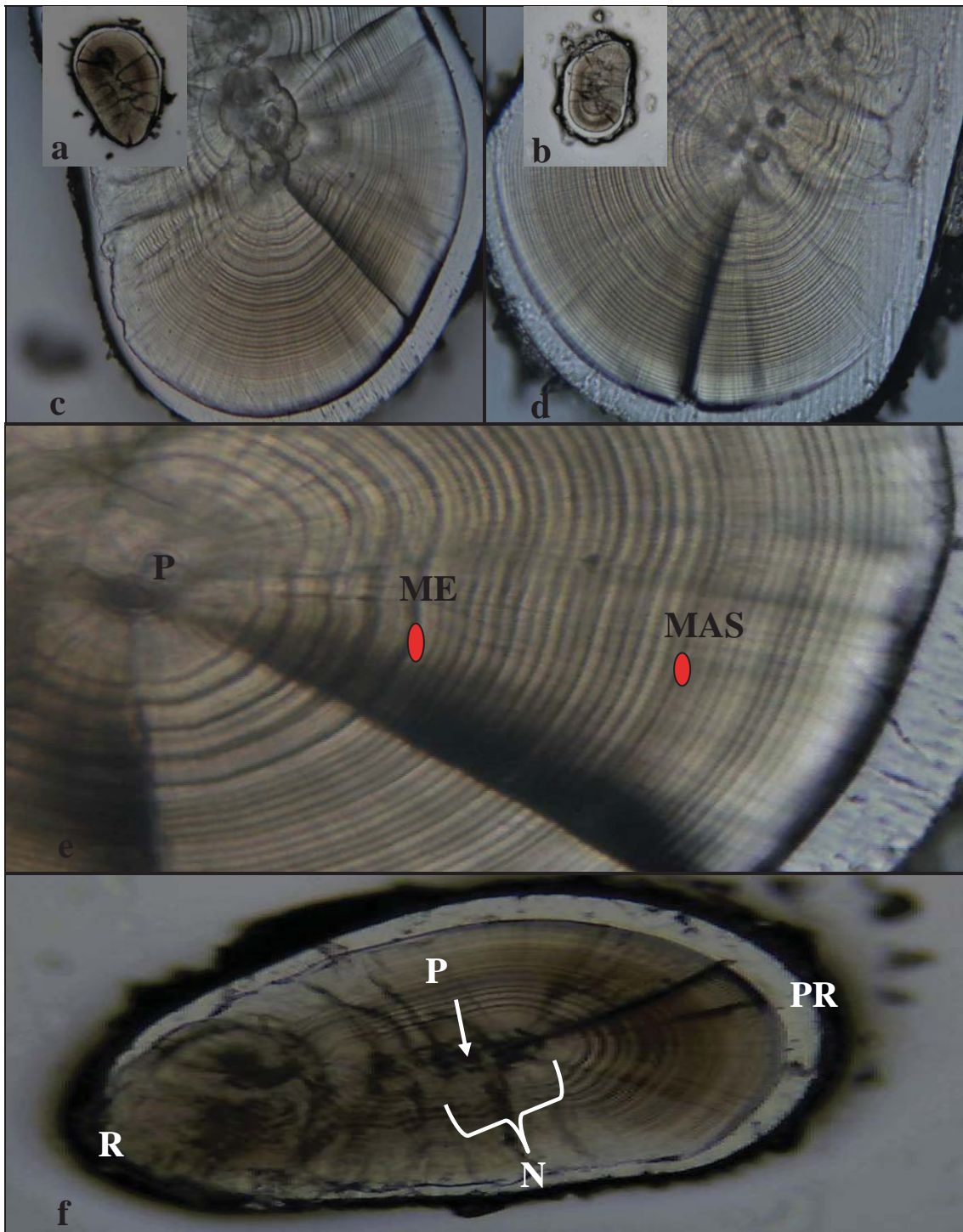


Figura 15. Estructura de otolitos alevines de Trucha café. **a-b)** pulidos y vistos al microscopio (con zoom de 10x), **c-d)** pulidos y visto en zoom de 40x, **e)** Sección del otolito que muestra P: primordio, ME: Marca de eclosión, MAS: Marca de absorción del saco, **f)** vista general del otolito en zoom de 40x, donde: PR: Post-rostrum, R: Rostrum, P: Primordio, N: Núcleo.

Los otolitos de los embriones sin eclosionar presentaron una forma similar que un otolito de alevín eclosionado (Fig. 16(a)), aunque en algunos casos ocurren algunas variaciones siendo más ancho que alargado la zona del rostro (Fig. 16(b)). Una característica distintiva de los otolitos de los embriones y larvas recién eclosionadas fue la presencia de una gran cantidad de micro-incrementos (Fig. 16(e,f)). En promedio se observaron 36 anillos desde el núcleo, aunque estos micro-incrementos mostraron una apariencia mucho menos consistente que los micro-incrementos formados hacia los bordes de los otolitos de alevines con saco absorbido. En algunos casos el rostrum apareció fijado frágilmente al resto del otolito (Fig. 16 (c)) y en ocasiones cuando se manipuló deficientemente se produjo el rompimiento de esta sección (Fig. 16(d)).

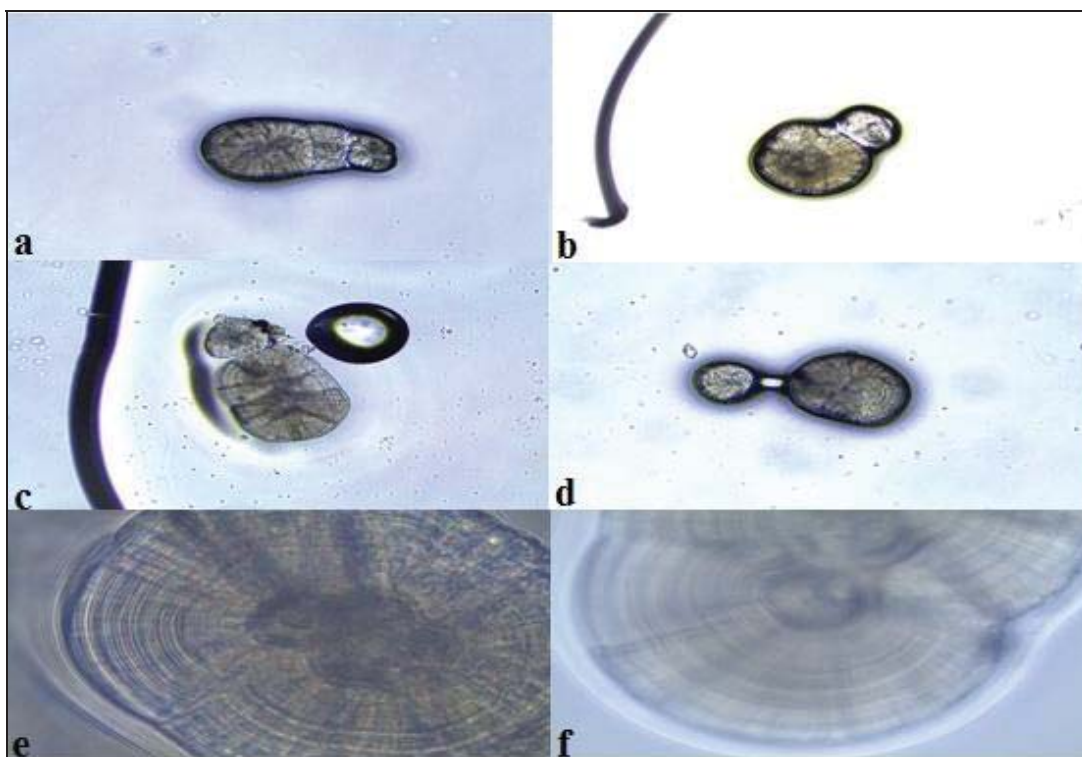


Figura 16. Diferentes morfologías de otolitos de larvas en ovas y recién eclosionados de Trucha café. Vistos al microscopio en zoom de 20x (a-b-c-d) y en 100x (e-f).

5.2 Análisis de diferencia entre el otolito izquierdo y derecho

Para determinar si existieron diferencias significativas entre ambos otolitos sagitales se analizó el número de micro-incremento diarios presentes en ambos otolitos, de una muestra de 15 alevines de Trucha café (*Salmo trutta*). Los resultados demostraron que a un nivel de confianza de 95% que no existió asimetría entre el número de micro-incrementos entre ambos pares de otolitos (Anova $p=0,33$; Tabla 7a). Se debe enfatizar que previo al método de análisis de varianza se probaron los supuestos de normalidad (Tabla 7b) y

homogeneidad de varianza (Tabla 7c) utilizando las pruebas de Kolmogorov y Shapiro-wilk, y Levene's, respectivamente. Se demostró que los datos fueron homocedásticos ($p=0,98$), aunque no siguieron una distribución normal ($p < 0,05$). En función de los resultados de simetría en el número de micro-incrementos, se determinó trabajar con el par que presentó la mayor resolución de los anillos.

Tabla 7. Análisis estadístico para evaluar diferencias en el número de micro-incrementos entre el otolito izquierdo y derecho de alevines con saco absorbido de *Salmo trutta*.

(a) Análisis de Varianza					
Fuente de Variación	SSE	GL	CM	F	p-value
Tipo	54,15	1	54,15	0,964	0,33
COD_L	0,01	1	0,01	0	0,986
TIPO*COD_L	0,81	1	0,81	0,015	0,904
Error	3.145,87	56	56,17		

(b) Test de Normalidad		
	Estadístico	p-value
Prueba K-S	0,299	0
Prueba Shapiro-wilk	0,79	0

(c) Test de Homogeneidad		
	Estadístico	p-value
Prueba Levene's	0,056	0,982

5.3 Determinación del número de micro-incrementos antes de la eclosión.

Se tomaron muestras de larvas de Trucha café antes de eclosionar y de larvas recién eclosionados. En ambos casos, se observaron entre 23 y 45 micro-incrementos ($36 \pm 4,07$), aunque la resolución de estos fue menor que los otolitos de alevines con saco absorbido. Se debe enfatizar que el procedimiento de pulido no pudo ser aplicado debido al pequeño tamaño que presentan los otolitos de los alevines recién eclosionados. Las muestras obtenidas de días posteriores a la eclosión no mostraban con claridad los anillos pre-

eclosión debido a la deposición de capas de CaCo3 que van formando con más claridad los anillos post-eclosión presumiblemente diarios.

5.4 Procedimientos de validación.

5.4.1 Validación de la marca de eclosión.

El análisis comparativo de la longitud antero-posterior de los otolitos de alevines recién eclosionados y aquellos de mayor desarrollo se llevó a cabo en una muestra de 44 ejemplares. Los resultados demostraron que no existieron diferencias significativas entre estas longitudes (ANOVA de 1 vía; $F=0,42$; Tabla 8), lo que es indicativo de que la marca prominente depositada en los otolitos al inicio de la formación de micro-incrementos distintivos, correspondió a la marca de eclosión para esta especie.

Tabla 8. ANOVA de un factor para validar la marca de eclosión. SCE: Suma de cuadrados del error; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados medios; P: Probabilidad; F: Valor crítico de F.

Análisis de varianza						
Fuente de Variación	SCE	GL	CM	F	P	F
Entre grupos	249,68	1	249,68	0,422	0,519	4,072
Dentro de los grupos	24830,79	42	591,20			
Total	25080,47	43				

5.4.2 Validación de la periodicidad de formación de los micro-incrementos.

El 80% de las ovas fertilizadas mantenidas en condiciones de confinamiento eclosionaron de forma exitosa, dando origen a una generación de alevines de edad conocida (muestras 2013), los cuales fluctuaron entre 14 y 15,5 mm ($14,7 \text{ mm} \pm 0,5$) de longitud al momento de la eclosión. Los otolitos sagitales extraídos de esta generación de alevines en general mostraron una forma similar a las muestras obtenidas el año 2012, donde se destaca que es comprimido lateralmente, de forma irregular, con un post-rostrum redondeado. También presentó las mismas características de formación de incrementos y presencia de múltiples primordios.

Los micro-incrementos encontrados en los otolitos de alevines mantenidos en el laboratorio experimental de acuicultura (LEDA), presentaron una baja resolución, lo que se tradujo en un mayor grado de dificultad al momento de identificar los incrementos (Fig. 17a), cuando se comparan con los de alevines mantenidos íntegramente en sus distintas etapas en la Piscicultura de Río Blanco (Fig. 17b).

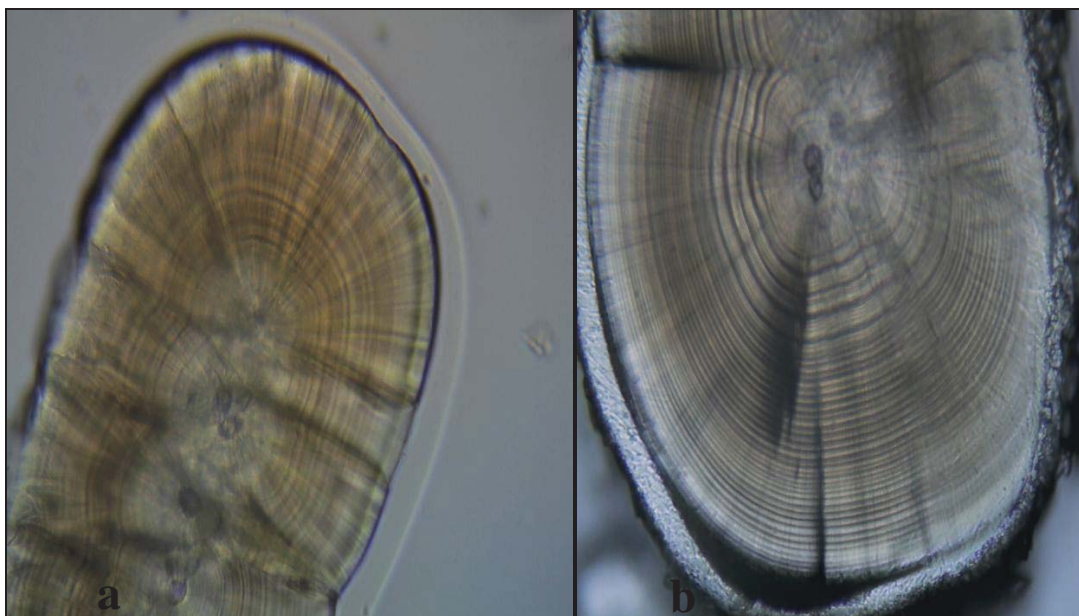


Figura 17. Diferentes resoluciones encontradas en los otolitos de Trucha café. **a)** Otolito de alevín mantenido en el LEDA (Laboratorio Experimental de Acuicultura); **b)** Otolito de alevín mantenido en la piscicultura de Río Blanco.

5.4.3 Validación de la periodicidad diaria.

Para determinar la periodicidad de formación de los micro-incrementos se realizó una regresión lineal entre los días transcurridos desde la eclosión hasta la captura y los micro-incrementos encontrados en los otolitos. Mediante este análisis se pudo establecer que la periodicidad de formación quedó descrita de manera significativa por este modelo lineal (Tabla 9, Fig. 18). Los resultados de la prueba t-student indicaron que la pendiente fue significativamente igual a 1 (Tabla 10), dado que $t_{\text{calc.}}: 1,16$ es menor que el $t_{\text{tabla}}: 1,98$, lo cual indica que los incrementos se forman de manera diaria.

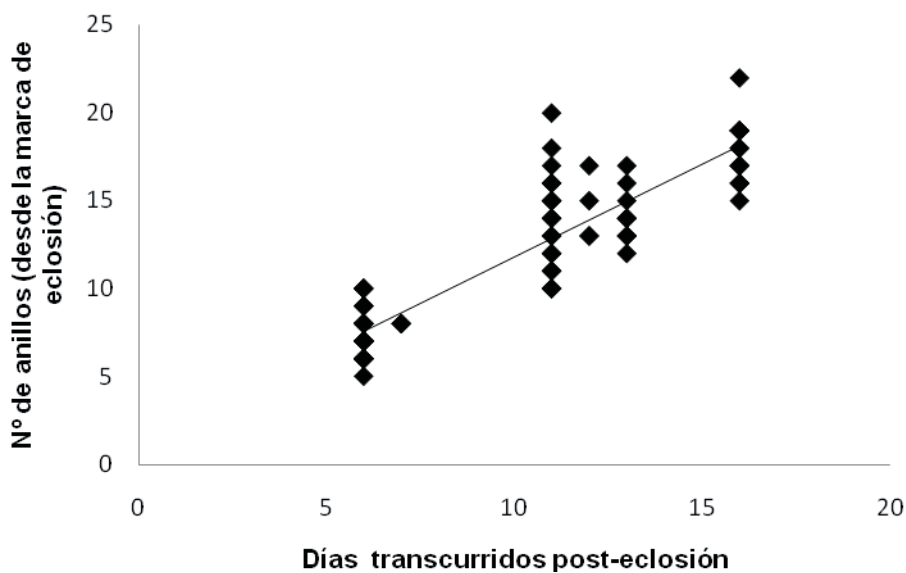


Figura 18. Regresión lineal entre el n° de anillos en los otolitos (sagita) y el n° de días transcurridos post-eclosión de alevines de *Salmo trutta*. Ec: $y = 1,056x + 1,21$ ($r^2: 0,829$).

Tabla 9. Parámetros de la Regresión lineal para validación de periodicidad. Número de muestra del estudio (N), Pendiente la regresión (b), error estándar (SE) y Coeficiente de correlación (r^2), valores entregados por la regresión lineal.

Parámetros	N	B	SE	r^2
Valores	99	1,0569317	0,048739	0,829

Tabla 10. Prueba t-student para validar periodicidad de formación de los micro-incrementos.

Parámetros	Valores
B	1,0569317
S. E	0,048739
N	99
G. l.	97
α	0,05
T tabla	1,9847231
T calc.	1,1680941
Se acepta H0: T tabla > T calc.	

5.5 Determinación de las tasas de crecimiento.

5.5.1 Relación lineal entre longitud total (LT) del alevín y la longitud antero-posterior (LAP) del otolito.

La relación LT del alevín y LAP del otolito fue analizada en un total de 267 ejemplares, ajustándose significativamente a un modelo lineal ($y=0,035x + 10,91$; $F(1,265)$: 13205,6; $P<0,001$; $r^2= 0,98$; Fig. 19ab). Estos resultados demuestran la proporcionalidad en el crecimiento del otolito y el crecimiento somático de los alevines, haciendo factible el uso de la técnica de retro-cálculo para estimar tasas de crecimiento a partir del radio a la formación de las bandas de micro-incrementos presentes en los otolitos.

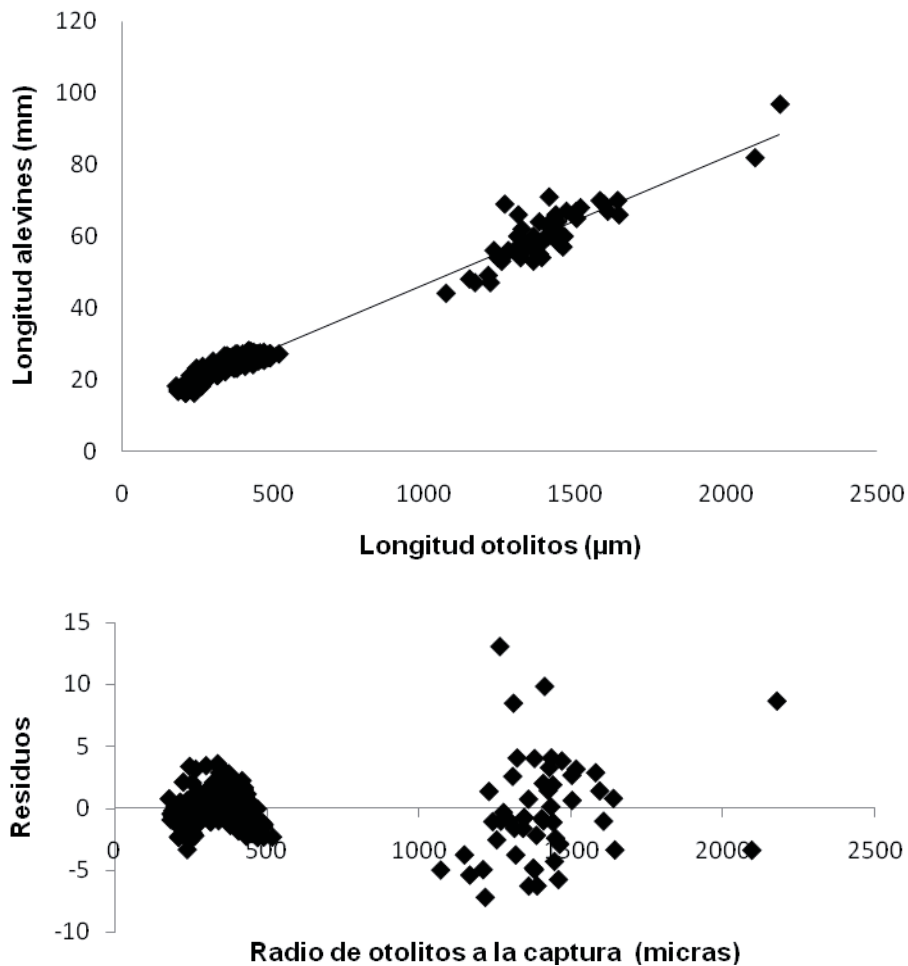


Figura 19. Verificación de la relación longitud pez-otolito, **a)** Relación lineal entre la longitud del alevín y la longitud del otolito, **b)** Error de mínimos cuadrados. (Residuos vs radio de los otolitos a la captura).

5.5.2 Longitudes retro-calculadas.

A través de la aplicación de retro-calculo se reconstruyó la longitud de los alevines (Fig. 20). Se debe enfatizar que para estas estimaciones se utilizaron los valores de los radios individuales a la marca de eclosión y el intercepto biológico de 15 mm definido por Breton (2007). La relación longitud media retro-calculada y el número de incrementos (días) transcurridos después de la eclosión siguió un modelo polinomial ($y = -0,003x^2 + 0,380x + 14,22$; $r^2 = 0,998$).

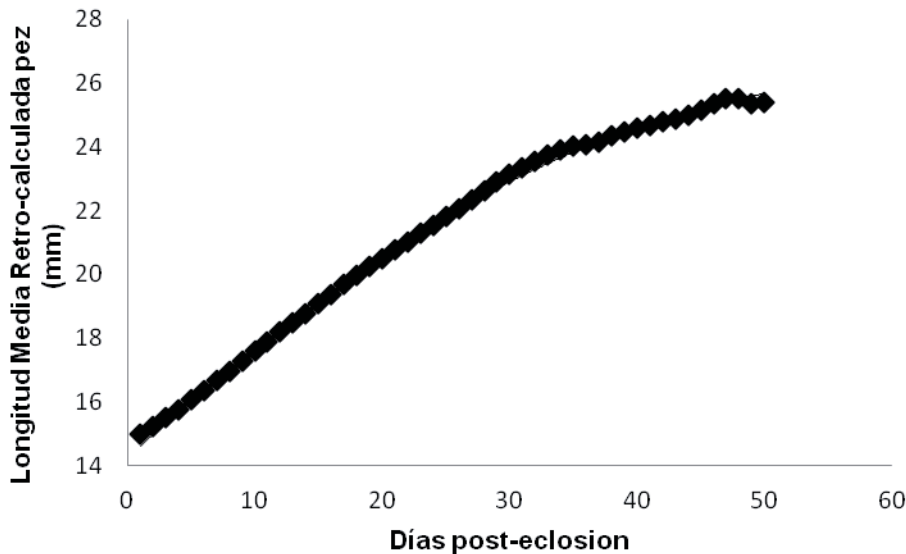


Figura 20. Longitudes medias retro-calculadas para alevines de trucha café.

5.5.3 Tasas de crecimiento.

Los cambios en las tasa de crecimiento promedio (TCP) cada 5 días de los alevines de Trucha café, obtenidas a través de la aplicación de la técnica de retro-calculo, desde la eclosión hasta días posteriores a la absorción del saco vitelino se ilustran en la Fig. 21. Las TCP total hasta el día 50 fue de 0,25 mm/d, variando entre 0,29 mm/d al inicio de la absorción del saco vitelino hasta 0,23 mm/d promedio al quincuagésimo día de experimento, donde ya consumían alimento artificial (Fig. 21). La Figura 22 muestra la relación entre la longitud media del alevín retro-calculada y la tasa de crecimiento, el cual refleja que a medida se acerca a los días finales del estudio la longitud del alevín tiende a mantener un débil crecimiento y la tasa de crecimiento tiende a disminuir. La Figura 23 muestra las curvas de las tasas de crecimiento retro-calculadas en la etapa embrionaria y

post-eclosión, donde queda reflejado la tendencia a disminuir a medida que transcurren los días de estudio, una vez eclosionado los alevines de Trucha café.

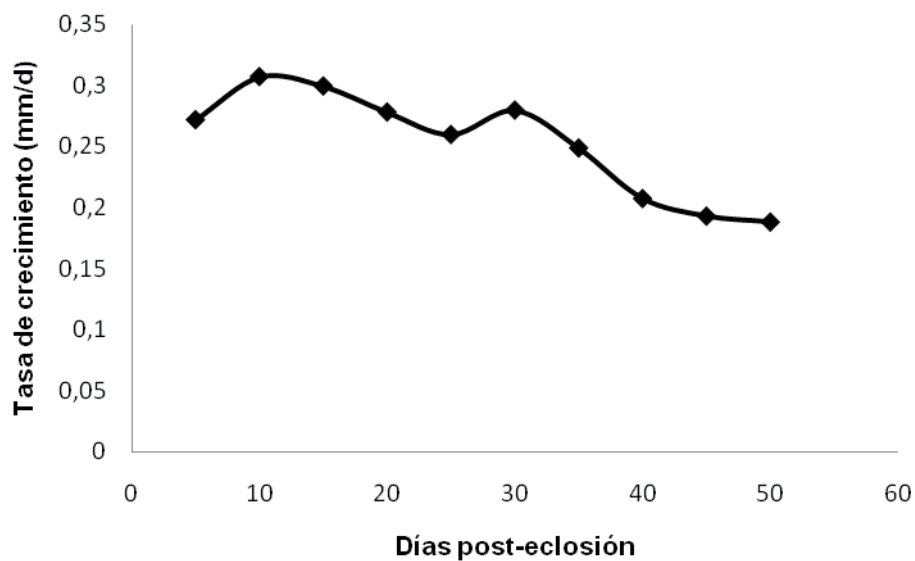


Figura 21. Tasas de crecimiento retro-calculadas, considerando desde la marca de eclosión hasta 50 días post-eclosión.

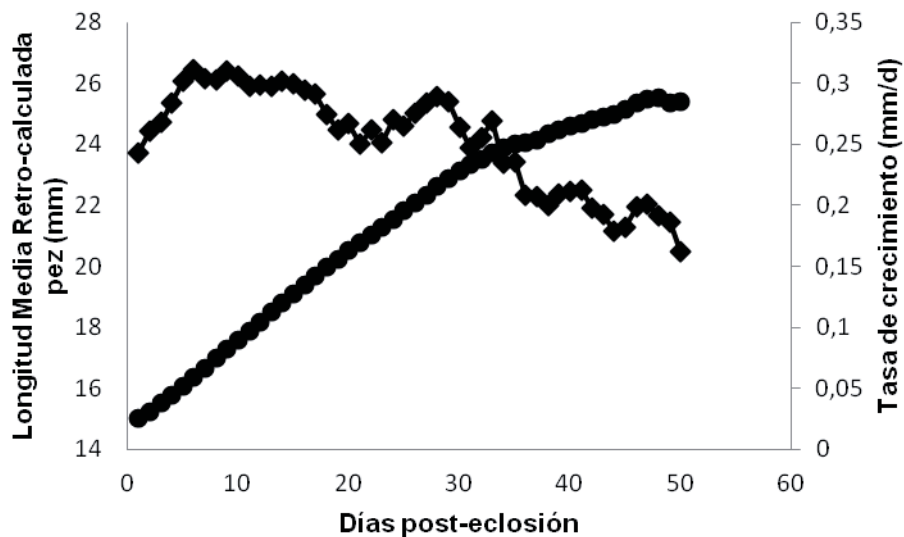


Figura 22. Relación entre la tasa de crecimiento (◆) y la longitud media retro-calculada (●)

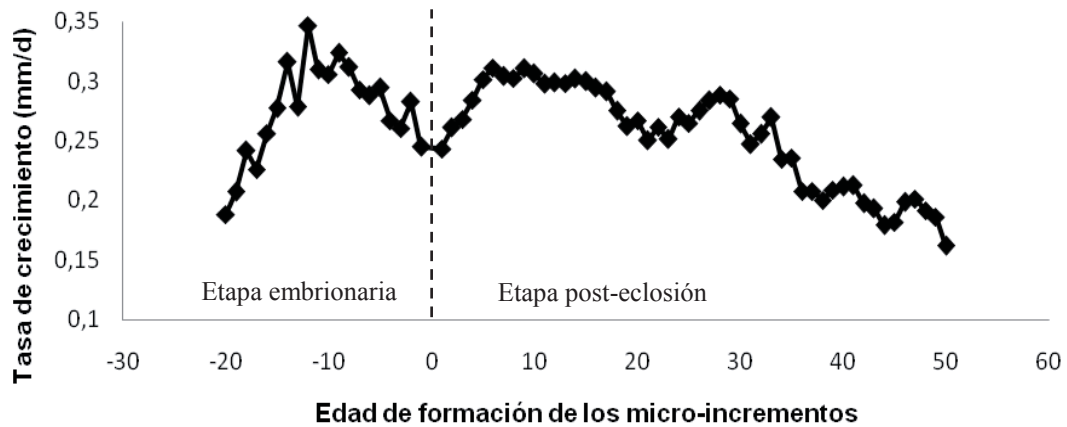


Figura 23. Curva que refleja las tasas de crecimiento encontrada para el periodo previo a la eclosión y post-eclosión en mm/d.

5.6 Grosor promedio de los micro-incrementos en otolitos.

Una vez medidos los radios y a través del programa Image pro-plus se pudo estimar el grosor de los micro-incrementos presentes en los otolitos (Fig. 24), los cuales presentan una tendencia a la disminución a medida que transcurren los días de cultivo, presentando un promedio de $2,23(\pm 0,28)$ μm en el periodo de estudio.

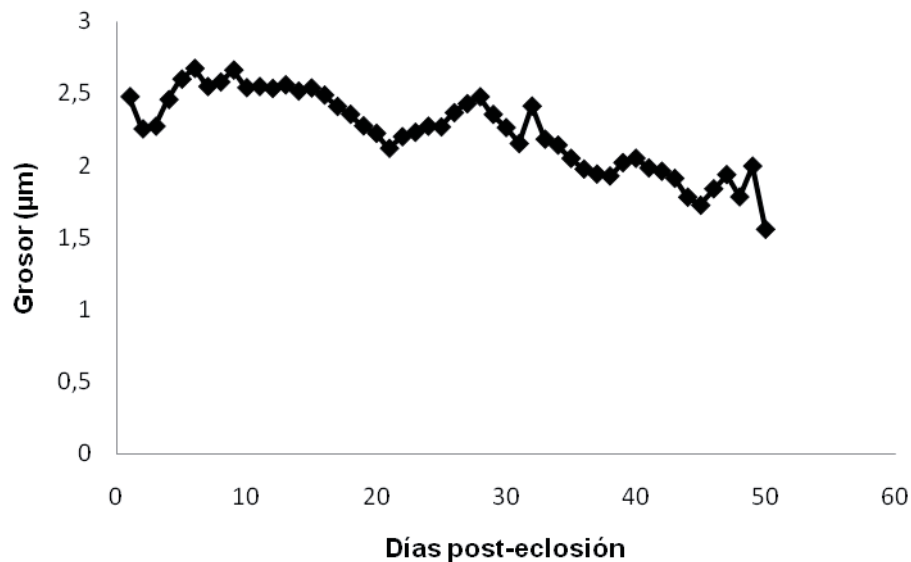


Figura 24. Grosor promedio de los micro-incrementos en otolitos de alevines post-eclosión.

6. DISCUSIÓN

6.1 Micro-estructura de los otolitos.

La micro-estructura de los otolitos sagitales de *Salmo trutta* mostro los siguientes 5 rasgos característicos: (1) elevada resolución de los micro-incrementos hacia la zona caudal; (2) ausencia de asimetría en el número de micro-incrementos entre pares de otolitos; (3) presencia de una cantidad considerable de micro-incrementos previos a la eclosión; (4) formación de múltiples primordios al interior del núcleo del otolito y la existencia de uno o más núcleos y (5) marcas propias y distintivas de eventos importantes en el alevín de Trucha café como la eclosión y la absorción del saco vitelino. Cada uno de estos rasgos micro-estructurales se discute a continuación.

El área que presenta mayor claridad para realizar los conteos de los micro-incrementos fue la zona del post-rostrum, a través de la cual se pudo obtener un conteo más preciso, a diferencia de la zona denominada rostrum, donde los micro-incrementos fueron más difusos y difíciles de identificar. La baja resolución en esta última zona pudo ser producto del proceso de preparación debido a que el rostro al ser más sobresaliente dorso-ventralmente tiende a quedar más expuesto al exceso de pulido. Cabe destacar que el post-rostrum ya ha sido utilizada para esta (Dodson *et al.*, 2013) y otras especies de salmónidos (e.g., Salmon Chinook, *O. Tshawytscha*, Volk, 2010; Salmon del Atlántico, *S. salar*, Carreño, 2010).

En el presente estudio se demostró, a través de un Análisis de Varianza, la ausencia de asimetría en el número de micro-incrementos entre los pares de otolitos sagitales. Este hallazgo facilita el proceso de preparación y análisis, debido a que no se requiere mantener la trazabilidad del otolito. Por ejemplo, si por algún motivo se extravía o manipula de mala manera el otolito izquierdo o derecho (dependiendo del que se esté utilizando), se podría trabajar sin problemas con su par. Se debe enfatizar que simetría en el número de micro-incrementos se ha reportado también en otras especies salmónidas como la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Moyano *et al.*, 2012), y en otros teleósteos como el pejerrey (*Austromenidia regia*) (Peñailillo *et al.*, 1996), Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Tanabe *et al.*, 2003).

La presencia de un número considerable de anillos previos a la eclosión parece ser un rasgo común de los otolitos de los salmónidos, en otros trabajos como el presentado por Moyano *et al.*, (2012) en la Trucha arcoíris (*O. mykiss*), Carreño (2010), Meekan *et al.*, (1998), Geffen (1983), en Salmón del atlántico (*Salmo salar*), Neilson & Geen (1985) en Salmon Chinook (*O. Tshawytscha*), entre otros, se menciona la presencia de estos anillos. Se debe enfatizar, sin embargo, que todavía no se ha demostrado la periodicidad de

formación de estas estructuras. En otras especies también ha sido posible encontrar anillos previos a la eclosión, como en el caso del Pejerrey (*Austromenidia regia*) Peñailillo & Araya (1996), en el Gruñón de California (*Leuresthes tenuis*) Brother *et al.*, (1976) y en Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Radtke & Dean (1982). Estos últimos autores señalan que las larvas que presentan períodos de incubación largos y además huevos relativamente grandes pueden formar varios incrementos antes de la eclosión.

En la totalidad de las muestras obtenidas de los otolitos sagita estudiados, presentaron una multiplicidad de primordios, que parece ser una característica común reportada en salmónidos. Hasta la fecha esta característica ha sido reportada en Salmon del Atlántico (*Salmo salar*, Carreño, 2010), Salmon chinook (*O. Tshawytscha*) y Trucha Arcoíris (*O. mykiss*) por Neilson *et al.*, (1985), Trucha Alpina (*Salvelinus alpinus*), Trucha de arroyo (*S. frontalis*), Salmon masou (*O. masou*) por Radtke & Dean, (1982). Se debe destacar también que la presencia de primordios múltiples también ha sido reportada en la familia Atherinidae (Peñailillo & Araya 1996; Brother *et al.*, 1983) y en Mummichog (*Eundulus heteroclitus*; Radtke & Dean, 1982). Este es el punto de inicio de la formación del núcleo en los otolitos, siendo las primeras estructuras calcificadas que surgen (Neilson *et al.*, 1985). En el presente estudio se observaron un promedio de 7 primordios para Trucha café, un poco menor a los 10 reportados en otras especies como Salmon Chinook (Neilson *et al.*, 1985). El número de primordios fue independiente de la temperatura del agua. Adicionalmente se logro distinguir en las muestras de 1 a 2 núcleos por otolitos. Esta característica bipartita del núcleo ha sido también reportada en otros salmónidos, como por ejemplo en otolitos sagitales de Trucha arcoíris (Neilson *et al.*, 1985).

Otra característica presente en esta zona del otolito, fue la presencia de anillos notoriamente más prominentes que el resto. Estas marcas han sido también reportadas en otros peces teleósteos, particularmente en salmónidos, donde han sido asociados a periodos o situaciones de stress, tiempo de eclosión, y la absorción del saco vitelino, entre otros (Victor, 1982, Meekan *et al.*, 1998, Moyano *et al.*, 2012, Dodson *et al.*, 2013)

6.2 Validación de la marca de eclosión.

Un rasgo distintivo encontrado en todos los otolitos sagitales de *S. trutta* de los alevines analizados fue la presencia de una marca concéntrica característica muy bien definida, que marcó una transición clara entre el patrón de micro-incrementos previo y posterior a su formación. Utilizando los rasgos micro-estructurales de otolitos sagitales de alevines recién eclosionados se demostró que esta transición correspondió a la marca de eclosión. Se debe destacar que este hallazgo confirma lo reportado para Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) Carreño, 2010; Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) Moyano *et al.*, 2012. En otros estudios referentes a la Trucha café Dodson *et al.*, (2013), reporta que la eclosión presentó una marca fuerte en los otolitos, para luego formarse los incrementos de

crecimiento diario. La longitud del otolito en alevines recién eclosionados en promedio fue de 213,67 μm , la cual no difiere a los encontrados por Geffen (1983) en otolitos de *Salmo salar*, el cual encontró que al momento de la eclosión el rango de longitud era de 200-220 μm .

6.3 Periodicidad diaria de formación de micro-incrementos.

En el presente estudio se demostró que los micro-incrementos se formaron con periodicidad diaria en *S. trutta*, durante el período de absorción del saco vitelino. Estos resultados concuerdan con lo planteado por otros autores en esta misma especie, Mosegaard & Titus (1987) validaron la periodicidad diaria de formación en condiciones de temperatura controlada, mientras que Dodson *et al.*, (2013) lo llevaron a cabo en condiciones de fluctuación natural de temperatura. Similares resultados fueron obtenidos durante el mismo estado ontogénico para Salmón del atlántico (*Salmo salar*) Carreño (2010). Es importante destacar que la formación diaria de los micro-incrementos ha sido demostrada también en diferentes etapas de la vida temprana de otras especies de la misma familia de salmónidos, *e.g.*, en juveniles de Salmón chinook (*O. tshawytscha*) Neilson & Geen (1985); Salmón sockeye (*O. Nerka*) Marshall & Parker (1982); Salmon coho (*Oncorhynchus Kitsuch*) Miller & Simenstad (1994); Salmón chum (*O. Keta*) Fukuwaka (1996); Salmón rosado (*Oncorhynchus gorbusha*) Courtney *et al.*, (2000); Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) Moyano *et al.*, (2012).

Además, se observó que los micro-incrementos presentes en los otolitos de los ejemplares mantenidos en condiciones experimentales en la Piscicultura de Río Blanco, presentaron una mejor resolución que aquellos mantenidos en el LEDA, a pesar que provinieron de reproductores que estuvieron sometidos a condiciones experimentales idénticas. Se debe destacar que la Piscicultura de Río Blanco se encuentra localizada en una zona cordillerana, con un sistema de hatchery con flujo abierto, donde la fuente de agua dulce proviene de los deshielos. Estas condiciones generan grandes variaciones diurnas-nocturnas de la temperatura, a diferencia de las variaciones menos marcadas de la temperatura del agua bajo las condiciones experimentales a nivel del mar. Por lo tanto, es razonable inferir que bajo estas condiciones la resolución de los micro-incrementos fue también diferente. Se debe destacar el trabajo de Moyano *et al.*, (2012), que también reportó una elevada resolución de los micro-incrementos en otolitos de Trucha arcoíris mantenidos en condiciones similares en la misma piscicultura. Este autor infirió que la claridad de los micro-incrementos podría ser producto de la variabilidad natural diurna-nocturna de la temperatura del agua, que gatilla un mejor contraste entre las bandas de crecimiento de los micro-incrementos. En este mismo sentido, Neilson & Geen (1985) también plantean en su estudio que se presentan incrementos más regulares y fácilmente observables con ciclos naturales de temperatura, que cuando ésta es constante. Es importante destacar también que una resolución baja de los micro-incrementos ha sido

reportado para *Salmo salar*, en condiciones experimentales controladas de la temperatura a nivel del mar (Carreño, 2010).

6.4 Determinación de tasas de crecimiento a través de retro-cálculo.

6.4.1 Relación longitud alevín-otolito.

Mediante un análisis de regresión se demostró que la relación existente entre la longitud del pez y la longitud del otolito fue significativamente lineal, lo que concuerda con lo encontrado por Dodson *et al.*, (2013) en esta misma especie, demostrándose así la proporcionalidad entre el crecimiento del otolito y el crecimiento somático de los alevines. Por consiguiente, los resultados obtenidos dejan de manifiesto la factibilidad de predecir el tamaño del pez mediante el tamaño del otolito. Una vez comprobada la relación, fue posible aplicar la técnica de retro-cálculo que permitió reconstruir las longitudes de los peces desde el momento de la eclosión hasta su captura, mediante el método del intercepto biológico, donde la longitud máxima de alevines de la muestra fue de 28 mm. Han sido reportadas esta relación proporcional en otras especies de salmónidos Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Leonardi (1991), Moyano *et al.*, (2012); Salmon del atlántico (*Salmo salar*), Carreño (2010); Wright *et al.* (1990), y otras especies de teleósteos como Sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y Sargo breado (*Diplodus cervinus cervinus*), Dominguez (2005), en Gobiidae, Ilkiaz (2011), Anguila (*Anguilla anguilla*), Holmgren *et al.* (2012), Anchoqueta (*Engraulis ringes*), Hernandez & Castro (2000), Sardina japonesa (*Sardinops melanostictus*), Plaza *et al.*, (2008).

6.4.2 Tasa de crecimiento.

Las tasas de crecimiento estimadas mediante retro-cálculo fueron variables durante el periodo de incubación, con un promedio de 0,29 mm/d en los primeros días antes de la marca de absorción del saco vitelino, llegando a 0,23 mm promedio, una vez absorbido el saco vitelino. Se debe destacar que estas tasas fueron inferiores a las reportadas por Meekan *et al.*, (1998) para juveniles de Salmón de atlántico (*Salmo salar*) 0,57 mm/d en ambiente de cultivo.

Las tasas de crecimiento presentaron una tendencia sinusoidal con dos ciclos separados por un proceso de transición. El primer ciclo presentó mayor crecimiento mientras los alevines se encontraban absorbiendo su saco vitelino, mientras que el segundo ciclo estuvo caracterizado por un menor crecimiento y una caída gradual hacia los días finales del experimento. De estos resultados se deduce que el saco vitelino pareciera estar ofreciendo los nutrientes requeridos para potenciar el crecimiento, pero que

inevitablemente se agota gradualmente generando una disminución del crecimiento del alevín, que tiende a recuperarse una vez que comienza la alimentación exógena. Se debe destacar que los resultados muestran que la recuperación del crecimiento no parece ser inmediata, debido a que el alevín requiere adaptarse al alimento artificial y por ende el crecimiento tiende a verse reducido.

Finalmente, en este trabajo se demostró que los otolitos de Trucha Café (*Salmo trutta*) registran con gran eficacia eventos de la historia de vida los primeros 50 días de vida, tales como el tiempo de eclosión, el momento de absorción del saco vitelino, así como también permitió la reconstrucción de los patrones de crecimiento temprano. Este último hallazgo permite reducir el manejo en hatchery en un estadio de desarrollo tremendamente vulnerable, al mismo tiempo que se obtienen estimaciones precisas del crecimiento en dicho periodo. Adicionalmente, se demostró que los micro-incrementos depositados en condiciones de confinamiento en la Piscicultura de Río Blanco presentaron una elevada resolución y homogeneidad. Esta característica se torna en un marcador natural que puede ser usado para evaluar potenciales planes de repoblamiento de esta especie. Esta aplicación se sustenta en el siguiente principio: “*los micro-incrementos tienden a ser regulares en el caso de peces cultivados gracias a la constante entrega de alimento*”. Por lo tanto, se recomienda en una próxima investigación efectuar un análisis comparativo de la micro-estructura de otolitos entre ejemplares de cautiverio y aquellos eclosionados en condiciones naturales en esta especie con el fin de contribuir a desarrollar una metodología científicamente validada para evaluar planes de repoblamiento.

7. CONCLUSIONES

Los hallazgos de la presente tesis demostraron que:

Se demostró la existencia de simetría en el número de incrementos entre el otolito sagital izquierdo y derecho de *Salmo trutta*, para los primeros 50 días de vida.

Se evidenció la existencia de numerosos anillos previos a la eclosión en los otolitos sagita de la Trucha café (*Salmo trutta*), que correspondieron a micro-incrementos formados durante el periodo embrionario, con una periodicidad de formación desconocida .

La presente investigación demostró que los otolitos sagitales de esta especie registran el proceso de primera alimentación a través de una marca concéntrica distintiva, que permite identificar claramente el periodo de absorción del saco vitelino.

Se demostró que la marca concéntrica prominente formada inmediatamente anterior a la formación del primer micro-incremento diario correspondió a la marca de eclosión para esta especie.

Se validó que los micro-incrementos de otolitos sagitales de *Salmo trutta* se depositaron de forma diaria durante el proceso de absorción del saco vitelino, demostrando que la estimación de edad durante este periodo es confiable.

Se evidenció la existencia de una relación lineal entre la longitud del otolito y la longitud de los alevines de *Salmo trutta*, lo que permitió reconstruir de forma confiable su historia de crecimiento somático individual, a partir de la eclosión de alevines.

El crecimiento de la Trucha café (*Salmo trutta*) fue mayor durante el periodo de absorción del saco vitelino (0,29 mm/d), que durante el inicio de la alimentación exógena (0,23 mm/d).

8. BIBLIOGRAFIA

Alonso, C., J. Gortázar & D. García de Jalón. 2010. Trucha Común – *Salmo trutta*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. [<http://www.vertebradosibericos.org/peces/saltru.html>]. Revisado: 20 noviembre 2012.

Araya, M. & L. Cubillos. 2002. El análisis retrospectivo del crecimiento en peces y sus problemas asociados. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-65382002000200010&script=sci_arttext]. Revisado: 23 abril 2013.

Balza, A. & B. Marín. 2000. Verificación de la marca de eclosión en los otolitos sagitales de larvas de *sardinella aurita* (Pisces: Clupeidae). Rev. Biol. Trop., 48(1): 183-186.

Bolles, K. & G. Begg. 2000. Distinction between silver hake (*Merluccius bilinearis*) Stocks in U.S. waters of the northwest Atlantic based on whole otolith morphometrics. Fish. Bull. 98: 451-462.

Brennan, N., K. Leber & B. Blackburn. 2007. Use of coded-wire and visible implant elastomer tags for marine stock enhancement with juvenile red snapper *Lutjanus campechanus*. Fish. Res. 83(1): 90-97.

Breton, B. 2007. El cultivo de la Trucha. Ed. Omega, Barcelona. 338pp.

Brothers, E., C. Mathews, & R. Lasker. 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. Fish. Bull. 74(1): 1-8.

Brothers, E., D. Williams & P. Sale. 1983. Length of larval life in twelve families of fishes at “One Tree Lagoon”, Great barrier reef, Australia. Mar. Biol. 76: 319-324.

Bustos, C. & M. Landaeta. 2005. Desarrollo de huevos y larvas tempranas de la merluza del sur, *Merluccius Australis*, cultivados bajo condiciones de laboratorio. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-65382005000200016&script=sci_arttext#t2]. Revisado: 21 febrero 2013.

Campana S. & Neilson. 1985. Microstructure of fish otolith. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1014-1032.

Campana, S. 1990. How reliable are growth back-calculation based on otoliths?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 2219-2227.

Campana, S. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *J. Fish. Biol.* 59: 197-242.

Carreño, D. 2010. Reconstruir los patrones de crecimiento, durante la etapa de incubación del salmón del Atlántico (*salmo salar*), mediante análisis de la micro-estructura de otolitos. Tesis, Esc. de Ciencias del Mar, UCV, 33 pp.

Courtney, D.L., D.G. Mortensen & J.A. Orsi. 2000. Digitized scale and otolith microstructures as correlates of juvenile pink salmon size. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.* (2): 337-345.

Crecco, V. & T. 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.

Departament: Agriculture, forestry & fisheries (Daff). 2013. Biodiversity Risk and benefit Assessment. [http://www.nda.agric.za/daDev/fisheries/03_areasofwork/social.html#BHM]. Revisado: 8 Mayo 2013.

Dodson , J., P. Sirois, G. Daigle, P. Gaudin & A. Bardonnet. 2013. Otolith Microstructure during the Early Life-History Stages of Brown Trout: Validation and Interpretation. *N. Am. J. Fish. Manag.* 33(1): 108-116.

Dominguez, R. 2005. Edad y crecimiento del Sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) y del Sargo breado *Diplodus cervinus cervinus* (Lowe, 1838) en aguas de gran canaria. *Vector plus* (26): 57-64 pp.

Dwyer, K. S., S. Walsh & S. Campana. 2003. Age determination, validation and growth of Grand Bank yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). ICES J. Mar. Sci. (60): 1123–1138.

Elliott, J. M. 1993. A 25-year study of production of juvenile sea-trout, *Salmo trutta*, in an English Lake District stream. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 118: 109–122.

Estay, F., R. Noriega, J. Ureta, W. Martin & N. Colihueque. 2004. Reproductive performance of cultured Brown trout (*Salmo trutta* L.) in Chile. Aquac. Res. 35: 447-452.

Fukuwaka, M. 1996. Formation periodicity of increment and allometric growth in juvenile chum salmon otolith. NPAFC: 1-7.

Francis, R. 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. J. Fish. Biol. 36: 883-902.

Geffen, A. 1983. The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., embryos. J. Fish. Biol. 23: 467-474.

Golusda, P. 1907. La introducción del Salmon en Chile. Imprenta cervantes, Santiago de Chile. 31pp.

Heard, W. 2012. Alaska and compatibility with maintenance of hatchery and wild stocks. Environ. Biol. Fish. 94: 273-283.

Heggenes, J. 1988. Effect of experimentally increased intraspecific competition on sedentary adult brown trout (*Salmo trutta*) movement and stream habitat choice. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:1163-1172.

Hernandez, E. & L. Castro. 2000. Larval growth of the anchoveta *Engraulis ringens* during the winter spawning season off central Chile. Fish. Bull. 98: 704-710.

Herrera-Reveles, A., M. Lemus & B. Marin. 2012. Crecimiento somático y relación ARN/ADN en estadios juveniles de *Eucinostomus argenteus* (Pisces: Gerreidae) en dos localidades del Caribe de Venezuela. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442012000500013&script=sci_arttext]. Revisado: 20 febrero 2013.

Holmgren, K. & H. Wickström. 2012. Note on otolith growth in elvers, *Anguilla anguilla* (L.), and the relative otolith size during somatic growth. Arch. polish fish. 20: 207-214.

İlkyaz, A., G. Metin & H. Kinacigil. 2011. The use of otolith length and weight measurements in age estimations of three Gobiidae species (*Deltentosteus quadrimaculatus*, *Gobius niger*, and *Lesueurigobius friesii*). Turk J. Zool. 35(6): 819-827.

Jones, C. 1992. Development and application of the otolith increment technique. In: D. Stevenson & S. Campana (ed.). Otolith microstructure examination and analysis. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci., Virginia: 1-11.

Laidig, T., S. Ralston & J. Bence. 1991. Dynamics of growth in the early life history of shortbelly rockfish *Sebastes Jordani*. Fish. bull. 89: 611-621.

Leonardi, M., R. Vega & E. Tarifeño. 1991. Efecto del nivel de lípido en la dieta de trucha arcoíris KAMLOOP *Oncorhynchus mykiss* Jordan, 1982 en el crecimiento, factor de condición y coeficiente de conversión del alimento durante la fase de agua dulce. Rev. Biol. Mar. 26(2): 253-266.

Leta, H. & A. Keim. 1982. Lectura de Edades en otolitos de peces teleósteos. FAO Doc.: 41.

Luque, A. & T. Ramirez. 1996. Otolitos: una introducción a su potencial uso para el estudio de la biología de los peces. [<http://www.encuentros.uma.es/encuentros32/otolit.html>]. Revisado: 20 Noviembre 2012.

Marshall, S & S. Parker. 1982. Pattern identification in the microstructure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) Otoliths. Can. J. fish. Aquat sci. 39(4): 542-547.

Martinez, J., M. Chavez, J. Tello & A. Morales. 2007. Utilización de los otolitos como herramienta en la determinación de especies. *Rev. de Zool.* 18: 13-18.

Melo, Y. 1984. Age studies on anchovy *Engraulis capensis* Gilchrist off South West Africa. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 2: 19-31.

Meekan, M., J. Dodson, S. Good & D. Ryan. 1998. Otolith and fish size relationship, measurement error, and size-selective mortality during the early life of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1663-1673.

Methot, R. & D. Kramer. 1979. Growth of northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae in the sea. *Fish. Bull.* 77: 413-423.

Miller, J. & C. Simenstad. 1994. Growth of juvenile coho salmon in natural and created estuarine habitats: a comparative study using otolith microstructure analysis. *Fish. Res. Institute*: 1-30.

Ministerio de Obras Publicas (MOP). 2004. Diagnostico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad, “Cuenca del rio Aconcagua”: 1-160.

Morales-Nin, B. 1988. Caution in the use of daily increments for ageing tropical fishes. *Instituto de ciencias del mar* 6: 5-6 pp.

Morales-Nin, B. 1992. Determinación del crecimiento de peces óseos en base a la microestructura de los otolitos. *FAO Doc. Téc. Pesca* 322: 1-58.

Morat, F., S. Betoulle, M. Robert, A. Thailly, S. Biagianti-Risbourg & R. Lecomte-Finiger. 2008. What can otolith examination tell us about the level of perturbations of Salmonid fish from the Kerguelen Islands?. *Ecol. Fresh. Fish* 17: 617–627.

Mosegaard, H. & R. Titus. 1987. Daily growth rates of otoliths in yolk sac fry of two salmonid species at five different temperatures. *Proc. V Congr. Europ. Ichthyol.*: 221-227.

Moyano, G., G. Plaza, M. I. Toledo. 2012. Análisis de la micro-estructura de otolitos en alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cautiverio. Lat. Am. J. Aquat. Res. 40(3): 722-729.

Neilson, J. & G. Geen. 1985. Effects of feeding regimes and diel temperature cycles on otolith increment formation in juvenile Chinook salmon, *oncorhynchus tshawytscha*. Fish. Bull. 83(1): 85-101.

Neilson, J., G. Gleen & B. Chan. 1985. Variability in dimensions of salmonid otolith nuclei: implications for stock identification and microstructure interpretation. Fish. Bull. 83(1): 81-89.

Panfili, J. 1993. Estimation de L'age individuel des poissons: Méthodologies et applications à des populations naturelles tropicales et tempérées. Éditions de l'orstrom, Paris, 485 pp.

Peñaillio, J. & M. Araya. 1996. Momento de formación y periodicidad de los micro-incrementos de crecimiento en otolitos de larvas de pejerrey (*Austromenidia regia*) mantenidas en laboratorio. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-71781996002400003&script=sci_arttext]. Revisado: 10 Diciembre 2012.

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

Quillet, E. A. Faure, B. Chevassus, F. krieg, Y. Harache, J. Arzel, R. Metailler & G. Boeuf. 1992. The potential of Brown trout (*Salmo trutta L.*) for mariculture in temperate waters. Icel. Agr. Sci. 6: 63-76.

Radtke, R. & J. Dean. 1982. Increment formation in the otoliths of embryos, larvae, and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Fish. Bull. 80(2): 201-215.

Ramirez, T. & B. Marin. 2006. Edad y crecimiento en larvas de *Sardinella aurita* (Pisces: Clupeidae) de nororiente de Venezuela, mediante el análisis de sus otolitos. Ciencias Marinas, 32(3): 559-567.

Rijnsdorp, A. & F. Storbeck. 1991. A method to determine the onset of sexual maturity from back - calculated growth curves from otoliths of individual female North Sea plaice, *Pleuronectes platessa* L. ICES, demersal fish Committee. 97-117 pp.

Ruiz, M., E. Rodriguez & J. Landa. 2004. Protocolo de muestreo de partes duras para estudios de crecimiento de atún rojo (*Thunnus thynnus*). Instituto español de oceanografía. Santander, España, 6 pp.

Sahyoun, R., J. Claudet, G. Fazio, C. Da Silva & R. Lecomte-Finiger. 2007. The otolith as stress indicator of parasitism on European eel. *Vie et milieu-life and environment* 57: 193-200.

Shafer, D. 2000. Evaluation of periodic and aperiodic otolith structure and somatic-otolith scaling for use in retrospective life history analysis of a tropical marine goby, *Bathygobius coalitus*. *Mar. Ecol-Prog Ser.* 199: 217-229.

Soto, D. 2002. Estudio del ciclo reproductivo de las principales especies objetivo de la pesca deportiva en la X región. Proyecto Fip. Universidad austral de Chile: 1-153.

Tanabe, T., S. Kayama & M. Ogura. 2003. Precise age determination of young to adult skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) with validation of otolith daily increment. *NRIFSF*: 1-10 pp.

Tanaka, Y. 2013. Survival mechanism and its application to aquaculture and stock enhancement in early life histories of mass-spawning marine fishes. *Nippon Suisan Gakk.* 79(4): 623-626.

Tringali, M., S. Seyoum, E. Wallace, M. Higham, R. Taylor, A. Trotter & J. Whittington. 2008. Limits to the use of contemporary genetic analyses in delineating biological populations for restocking and stock enhancement. *Rev. Fish. Sci.* 16: 111-116.

Turismo Alto Palena. 2012. Pesca recreativa desarrollo de palena. [<http://www.turismoaltopalena.cl/fic/noticias/46-pesca-recreativa-desarrollo-palena.html>]. Revisado: 20 Marzo 2013.

Victor, B.C. 1982. Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus*. Mar. Biol. 71: 203–208.

Volk, E., E. Bottom, K. Jones & C. Simenstad. 2010. Reconstructing Juvenile Chinook Salmon Life History in the Salmon River Estuary, Oregon, Using Otolith Microchemistry and Microstructure. Trans. Am. Fish. Soc., 139: 535-549.

Wada, T., K. Kamiyama, S. Shimamura, T. Mizuno & Y. Nemoto. 2012. Effectiveness of stock enhancement of a rare species, spotted halibut *Verasper variegates*, in Fukushima, Japan. Aquaculture 364: 230-239.

Wells, B., S. Thorrold & C. Jones. 2003. Stability of elemental signatures in the scales of spawning weakfish, *Cynoscion regalis*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 60(4): 361-369.

Wright, P., N. Metcalfe & J. Thorpe. 1990. Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., evidence against coupling. J. Fish. Biol., 36: 241-249 pp.