

CARACTERIZACION DEL ESTADO DE HAMBRUNA EN LAS LARVAS DE SARDINA *SARDINOPS SAGAX MUSICA* (PISCES, CLUPEIFORMES), MEDIANTE CRITERIOS MORFOMETRICOS E HISTOLOGICOS

Iker Uriarte* y Fernando Balbontín**

ABSTRACT. Characterization of the starving condition of the sardine *Sardinops sagax musica*, larvae (Pisces, Clupeiformes) by morphometric and histological criteria.

With the purpose of developing morphometric and histological criteria to discriminate among sardine larvae in a healthy, semihealthy and starved condition, larvae were reared in the laboratory from planktonic eggs. One group was deprived of food and other was kept with food as a control. The more sensitive morphometric variables to the lack of food, considering the higher values of F in a multivariate analysis of variance and the mean values of the data and their standard desviations during the experiment, were head height, body height at the anus, interorbital distance, and pectoral angle. At the histological level, the gradation designed according to the aspect and shape of the cells and tissues, showed that starvation is mainly reflected in the liver, pancreas, foregut, midgut, trunk musculature, and brain. Signs of emaciation were evident by the increasing degree of dissociation of the tissue, reduction of the cell volume and loss of intercellular substance, particularly in the musculature.

The morphometric and histological criteria developed in the laboratory, adequately ponderated, can be utilized to estimate mortality of planktonic larvae due to starvation.

Key words: fish larvae mortality, laboratory rearing, larval histology, larval morphometry.

* Instituto de Acuicultura de Torre de La Sal, Ribera de Cabanes s/n, Castellón, España.

** Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso. Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile.

INTRODUCCION

Las relaciones entre la abundancia de larvas y el subsecuente reclutamiento han sido el tema de varios estudios recientes sobre peces, ya que se supone que el tamaño de las clases anuales está determinado dentro del primer año de vida (Hjort 1914). Por lo tanto, el conocimiento de los factores que afectan la sobrevivencia de los estados larvales es muy importante para predecir las fluctuaciones de la abundancia anual (Ehrlich *et al.* 1976, Lasker 1985).

Las causas principales de mortalidad larval serían la inanición y la predación (Hunter 1984). O'Connell (1980), Martín *et al.* (1985) y Theilacker (1986) han entregado evidencias de que efectivamente la falta de alimento puede ser una fuente importante de mortalidad en el ambiente natural. Hewitt *et al.* (1985) encontraron que inicialmente, la predación era el factor de mayor incidencia en la mortalidad de las larvas de jurel, *Trachurus symmetricus*, aún con vitelo y que una vez reabsorbido éste, la hambruna adquiriría mayor significancia. Posteriormente, la predación volvía a tener mayor relevancia, esta vez en un menor grado.

Estudios experimentales en el laboratorio de inducción de la hambruna en larvas, señalan la existencia de una serie de parámetros utilizables en la detección del grado de nutrición de éstas. Los criterios empleados se han basado en la histología (Umeda & Ochiai 1975, O'Connell 1976), morfometría (Powell & Chester 1985, Yin & Blaxter 1986) o una combinación de ambos métodos (Kostomarova 1962, Ehrlich *et al.* 1976, Theilacker 1978, 1981).

La sardina, *Sardinops sagax musica* (Girard), continúa representando para Chile, por lo menos hasta 1986, la especie de mayor tonelaje de desembarco, luego de la drástica caída de la pesca de la anchoveta ocurrida en la última década (SERNAP 1987). Cushing (1971) analiza el caso de cuatro grandes stocks de Clupeiformes (arenques y sardinias) que han experimentado una drástica declinación en períodos de alto esfuerzo de pesca. Las mayores perturbaciones que se pueden relacionar con el colapso de las grandes pesquerías mundiales de Clupeiformes serían la sobrepesca y la interrupción del suministro de alimento en una escala de tiempo de días durante la deriva larval (Walsh 1978). Estos antecedentes ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios biológicos en la sardina relativos a la sobrevivencia de las larvas.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar el estado de nutrición de las larvas de sardina desarrollando criterios de clasificación morfométricos e histológicos bajo condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron huevos de sardina a 1 milla de la costa frente a Montemar, Valparaíso (35°57'S, 71°33'W). Se usó una red de plancton cilíndrico-cónica, con una malla de 500 μm . Los huevos se incubaron hasta producirse la eclosión de las larvas, las que se colocaron en recipientes de vidrio de 2500 ml a $16 \pm 0,02^\circ\text{C}$. Se aplicaron 18 horas de luz y 6 de oscuridad. En este punto el trabajo se dividió en dos etapas experimentales: la etapa experimental I realizada con larvas al final del proceso de reabsorción del vitelo y la etapa experimental II llevada a cabo con larvas alimentadas previamente durante 10 días.

En la etapa experimental I, 240 larvas próximas al término de la reabsorción del vitelo se mantuvieron sin alimento y 160 se dejaron como grupo control con alimento. En los experimentos con larvas sin alimentar se utilizó agua de mar filtrada con Millipore de 0,45 μm . A las larvas utilizadas como controles, se les suministró una dieta compuesta de una mezcla de algas unicelulares (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis* sp., *Dunaliella* sp. y *Monochrysis* sp.) junto con rotíferos (*Brachionus plicatilis*). La concentración mantenida para asegurar la alimentación fue de 50.000 algas unicelulares/ml y 40 rotíferos/ml. Día por medio se agregó una fracción compensatoria debido a que el número de partículas disminuía a causa de la ingestión por las larvas y a la sedimentación. Diariamente se muestrearon 11 larvas de cada condición experimental. El período de muestreo fue de 6 días, tiempo máximo de resistencia presentado por las larvas a la falta de alimento.

En la etapa experimental II, 210 larvas que habían sido alimentadas durante 10 días se mantuvieron sin alimento y 130 continuaron alimentándose, manteniéndose las mismas condiciones del cultivo que en la etapa I. Día por medio (0, 2, 4 y 6 días) se muestrearon 11 larvas de cada condición experimental.

Las larvas se estudiaron morfométrica e histológicamente. Las mediciones se efectuaron con un estereomicroscopio de una precisión de 0.03 mm. En el momento de medirlas, fueron anes-tesiadas con metasulfonato de sodio (MS 222). La primera medida tomada fue la longitud estándar *in vivo* (desde la punta del hocico hasta el extremo de la notocorda, y en las de mayor talla desde la punta del hocico hasta el borde posterior del complejo hipural). Posteriormente, las larvas se fijaron en solución Bouin. A continuación se midieron las nueve variables restantes: longitud estándar; diámetro vertical del ojo; altura de la cabeza (desde la base de la mandíbula inferior, pasando por el medio del ojo, hasta el extremo superior de la cabeza); longitud de la cabeza (desde la punta del hocico hasta el cleitro); altura del cuerpo a nivel pectoral; altura del cuerpo a nivel anal; distancia interorbital (en una vista dorsal de la larva); ángulo pectoral (ángulo delineado a nivel de la cintura pectoral, medido con cámara clara y transportador); altura del ojo como porcentaje de la cabeza. Estas variables fueron elegidas considerando los experimentos realizados por Ehrlich *et al.* (1976) y los de Theilacker (1978) en larvas de otras especies de peces.

Del total de larvas que fueron examinadas morfométricamente, 153 se separaron al azar, utilizando una tabla de números aleatorios, para su examen histológico.

Las larvas fueron transferidas desde la solución Bouin a alcohol etílico de 70%; el tejido se deshidrató haciendo pasar las larvas por una serie de alcoholes de menor a mayor pureza, culminando con benzol; luego se embebieron en parafina. Los bloques de parafina con las larvas incluidas fueron seccionados en planos parasagittales de 5 μ y en forma seriada. Las secciones montadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina de Harris y cubiertas con bálsamo de Canadá.

En el examen histológico se consideraron seis variables indicadoras del estado alimentario de las larvas, tomando en cuenta los experimentos de O'Connell (1976) y Theilacker (1978). Estos tejidos u órganos correspondieron al hígado, páncreas, musculatura, intestino anterior, intestino medio y cerebro.

Análisis de los datos

A los datos morfométricos se les aplicó un análisis de varian-

za multivariante (MANOVA). Este análisis permitió, por una parte, distinguir dos grupos o poblaciones, dado un conjunto de variables que describían las características en las cuales los individuos de cada grupo se esperaba que difirieran; y por otra parte, permitió seleccionar, del conjunto de variables, aquellas que reflejaban más sensiblemente la hambruna (Cooley & Lonnes 1971).

Por medio de las razones F individuales más significativas, los valores promedios de las medidas corporales y sus desviaciones estándar durante el tiempo que duraron los experimentos, se seleccionaron cuatro variables morfométricas. Siguiendo el criterio desarrollado por O'Connell (1976) y Theilacker (1978), los valores de estas variables se llevaron a una gradación que constó de tres niveles de clasificación del estado de nutrición de las larvas: (3) un estado saludable; (2) un estado intermedio o semisaludable y (1) un estado moribundo afectado por la hambruna.

Este criterio se construyó comparando en primer lugar las medidas corporales de las larvas mantenidas sin alimento por un período prolongado de tiempo (tiempo máximo de resistencia de las larvas a esta condición antes de morir) con las larvas mantenidas con alimento (control) por el mismo período. De esta comparación se obtuvieron los niveles extremos de la gradación (3) y (1). Luego se estableció un nivel intermedio que se otorgó a las larvas cuyas medidas corporales denotaron un cambio inicial decreciente y que se consideró como un estado semisaludable (2).

Se otorgaron puntajes para clasificar las larvas en forma individual. Se asignaron 3 puntos a la variable que presentara un estado de nutrición saludable, 2 al intermedio y 1 al estado moribundo. Se fijaron rangos para clasificar los promedios obtenidos de los valores de las cuatro variables para cada larva. Se catalogaron en grado 3 a los puntajes promedios entre 3,00 y 2,34; grado 2 entre 2,33 y 1,67; y grado 1 entre 1,66 y 1,00.

La gradación morfométrica se contrastó con una clasificación obtenida a través de la aplicación de una función discriminante D (Anderson 1958). Esta función discriminante, a diferencia del método de gradación, clasificó a las larvas en dos niveles, indicando un estado de nutrición saludable o un estado de inanición por falta de alimento.

Aplicando un criterio semejante al utilizado con los datos

morfométricos, se diseñó una escala de gradación para los datos obtenidos del estudio histológico de las larvas. Igualmente, esta escala constó de tres niveles de catalogación.

RESULTADOS

Análisis de los datos morfométricos

Las diferencias en las medidas corporales entre las larvas mantenidas con y sin alimento desde la reabsorción del vitelo se comenzaron a observar a partir del segundo o tercer día de tratamiento, ésto es cuando las desviaciones estándar no se superponen (Fig. 1 A-E). En aquellas larvas alimentadas inicialmente durante 10 días y a continuación mantenidas con y sin alimento, se produjo la misma variación pero a partir del segundo a cuarto día (Fig. 2 A-E). En las figuras sólo se muestran las relaciones morfométricas que mejor evidenciaron los efectos de la falta de alimento. En el caso del diámetro vertical del ojo como porcentaje de la altura de la cabeza, a pesar de presentar una diferencia significativa a nivel del 1% entre tratamientos, muestra gran sobreposición de las desviaciones estándar de ambas curvas.

Tanto la altura del cuerpo a nivel pectoral como el ángulo pectoral en relación con la longitud estándar de las larvas alcanzaron valores menores en las larvas sin alimento que en las alimentadas, para una misma longitud larval. Esta tendencia se acentuó a medida que transcurrieron los días de experimentación (Figs. 1F y 2 F).

El MANOVA aplicado a los datos morfométricos indicó que las variables escogidas son significativamente diferentes entre larvas con y sin alimento, ya sea en el experimento realizado inmediatamente después de la reabsorción de vitelo, con un $F(10,121) = 21,48$, $p < 0,01$; o bien en el experimento realizado después de 10 días de alimentación inicial, con un $F(10,63) = 14,56$, $p < 0,01$.

Las variaciones de las medias totales de las variables morfométricas de las larvas mantenidas con y sin alimento y la importancia de cada una de las variables respecto del total de ellas según el test F se muestra en la tabla 1.

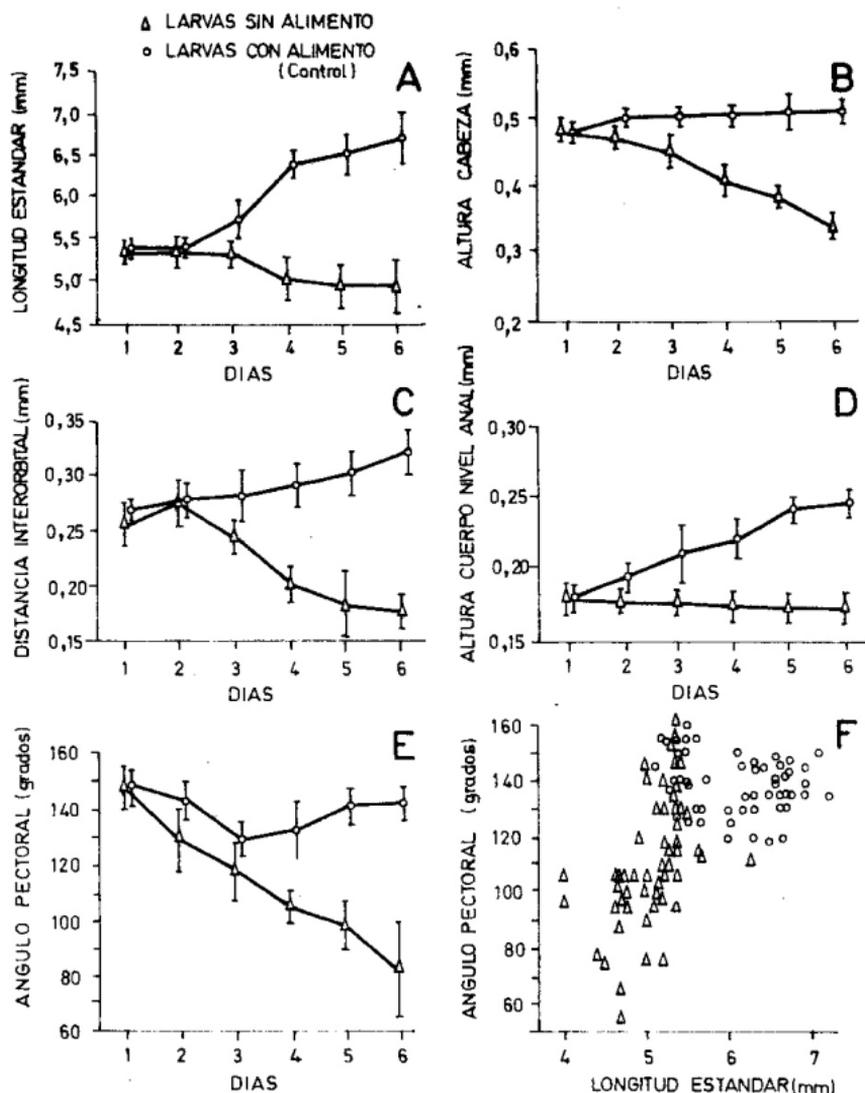


Fig. 1. Variaciones en las dimensiones corporales de las larvas de sardina *Sardinops sagax musca*, mantenidas con y sin alimento en el laboratorio después de la reabsorción del vitelo. A-E, valores correspondientes a la media \pm la desviación estándar ($n = 11$); F, valores individuales de las larvas.

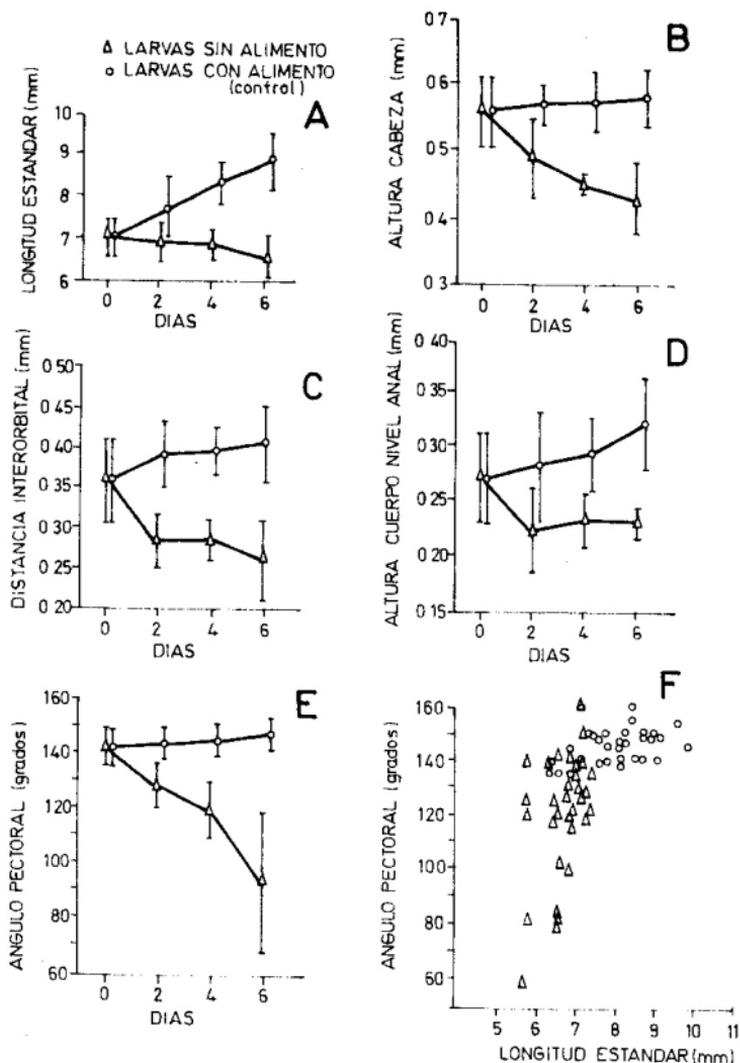


Fig. 2. Variaciones en las dimensiones corporales de las larvas de sardina *Sardinops sagax musica*, mantenidas con y sin alimento en el laboratorio después de 10 días de alimentación inicial. A-E, valores correspondientes a la media \pm la desviación estándar ($n = 11$); F, valores individuales de las larvas.

TABLA 1. Medias totales de las variables morfométricas de las larvas de sardina (*Sardinops sagax musica*) mantenidas con y sin alimento en el laboratorio e importancia de cada variable a través del test F con un nivel de significación del 1%.

VARIABLES	LARVAS DESPUES REABSORCION VITELO			LARVAS ALIMENTADAS INICIALMENTE DURANTE 10 DIAS		
	Con alimento \bar{X}_t	Sin alimento \bar{X}_t	F	Con alimento \bar{X}_t	Sin alimento \bar{X}_t	F
Longitud estándar in vivo (mm)	6,63	5,91	91,73	9,26	7,90	46,73
Longitud estándar fijado (mm)	6,03	5,11	117,73	8,01	6,79	41,82
Diámetro vertical del ojo (mm)	0,26	0,23	116,49	0,34	0,30	25,47
Altura de la cabeza (mm)	0,50	0,43	133,69	0,57	0,47	82,45
Longitud de la cabeza (mm)	0,74	0,62	84,96	1,05	0,91	31,76
Altura del cuerpo nivel pectoral (mm)	0,29	0,25	79,28	0,44	0,32	86,81
Altura del cuerpo nivel anal (mm)	0,21	0,17	119,29	0,29	0,23	38,05
Distancia interorbital (mm)	0,29	0,23	112,87	0,39	0,28	96,26
Angulo pectoral (grados)	139	113	64,73	144	115	70,67
Razón diám. vertical ojo/alt. cabeza (%)	51,65	53,01	3,92	58,44	64,81	24,22

Las variables morfométricas seleccionadas, considerando por una parte la media de los datos y sus desviaciones estándar en el tiempo que duró el experimento y por otra, las máximas ponderaciones entregadas por el MANOVA a través del test F ya mencionado, fueron cuatro de un total de diez: altura de la

cabeza, altura del cuerpo a nivel anal, distancia interorbital y ángulo pectoral. Estas cuatro variables seleccionadas se aplicaron indistintamente en el diagnóstico tanto para las larvas tratadas inmediatamente después de la reabsorción del vitelo como en el de las larvas tratadas después de 10 días de alimentación inicial. En las figuras 3A y 3B se pueden comparar estos parámetros en una larva alimentada y en otra privada de alimento.

La aplicación de la escala de gradación morfométrica permitió definir los rangos para los valores de cada una de las cuatro variables seleccionadas, correspondientes a una condición saludable, semisaludable o moribunda (Tabla 2). La clasificación morfométrica de las larvas establecida a través de la asignación de grados se muestra resumida en las tablas 3 y 4.

TABLA 2. Rango de las medidas corporales utilizables como criterios para clasificar el estado de nutrición de las larvas de sardina, *Sardinops sagax musca*. Los valores se obtuvieron de ejemplares mantenidos con y sin alimento en el laboratorio. S = saludable; Ss = semisaludable; M = moribunda.

VARIABLES MORFOMETRICAS	Longitud estándar			Longitud estándar		
	S	Ss	M	S	Ss	M
	4,00-7,25 mm			7,26-10,00 mm		
Altura de la cabeza (mm)	> 0,472	0,458-0,471	< 0,457	> 0,493	0,460-0,492	< 0,459
Altura cuerpo nivel anal (mm)	> 0,180	0,175-0,179	< 0,174	> 0,251	0,235-0,250	< 0,234
Distancia inter- orbital (mm)	> 0,274	0,247-0,273	< 0,246	> 0,291	0,286-0,290	< 0,285
Angulo pecto- ral (grados)	> 129,2	118,5-129,1	< 118,4	> 128,3	118,6-128,2	< 118,5

TABLA 3. Gradación morfométrica de las larvas de sardina (*Sardinops sagax musica*) mantenidas con y sin alimento en el laboratorio inmediatamente después de la reabsorción del vitelo.

CONDICIONES EXPERIMENTALES		GRADACION MORFOMETRICA			
Con alimento	Días	n	Saludables	Semisaludables	Moribundas
	1	11	11		
	2	11	11		
	3	11	11		
	4	11	11		
	5	11	11		
	6	11	11		
TOTAL		66	66		
Sin alimento	1	11	9	2	
	2	11	8	3	
	3	11		8	3
	4	11		1	10
	5	11			11
	6	11			11
TOTAL		66	17	14	35

TABLA 4. Gradación morfométrica de las larvas de sardina (*Sardinops sagax musica*) de 10 días de edad mantenidas a continuación con y sin alimento en el laboratorio.

CONDICIONES EXPERIMENTALES		GRADACION MORFOMETRICA			
Con alimento	Días	n	Saludables	Semisaludables	Moribundas
	0	11	11		
	2	11	11		
	4	11	11		
	6	11	11		
TOTAL		44	44		
Sin alimento	0	11	11		
	2	11	4	4	3
	4	11		8	3
	6	8	1	1	6
TOTAL		41	16	13	12

De acuerdo a la gradación morfométrica, el 100% de las larvas mantenidas con alimento presentaron una condición saludable. **V**En cambio, en el grupo de larvas privadas de alimento inmediatamente después de la reabsorción del vitelo, se observó un deterioro físico notorio desde el tercer día, con un 73% de ejemplares en estado semisaludable y otro 27% en condición moribunda. A partir del cuarto día, prácticamente la totalidad de las larvas estaban moribundas. En larvas del grupo sin alimento desde los 10 días de edad, se presentaron signos de deterioro a contar del segundo día de experimentación. Al cuarto día el 73% de las larvas fue clasificado como semisaludable y al sexto, el 75% estaba moribundo.

Para contrastar los resultados de la aplicación de la gradación morfométrica se utilizó la función discriminante D empleando 3 como también las 4 variables previamente seleccionadas. Primero se calculó la función con la altura de la cabeza (AC), altura del cuerpo a nivel anal (ACNA) y distancia interorbital (DI). Posteriormente se incluyó el ángulo pectoral (AP). Sustituyendo los datos morfométricos en la función señalada, se obtuvo en el primer caso:

$$D = X_0^t \begin{bmatrix} 28,63 \\ -3,62 \\ 10,19 \end{bmatrix} - 16,02$$

$$D = 28,63 AC - 3,62 ACNA + 10,19 DI - 16,02$$

En el segundo caso:

$$D = X_0^t \begin{bmatrix} 18,56 \\ 6,77 \\ 3,60 \\ 0,06 \end{bmatrix} - 18,60$$

$$D = 18,56 AC + 6,77 ACNA + 3,60 DI + 0,06 AP - 18,60$$

Donde D = función discriminante y $X^t = AC, ACNA, DI, AP$ (variables seleccionadas)

Lo cual se compara con 0:

Si $D \geq 0$ X_0^t se clasifica en la población con alimento.

En caso contrario X_0^t se clasifica en la población sin alimento.

Al considerar en la función discriminante cuatro variables en vez de tres, hay un ligero aumento en el porcentaje de bue-

na clasificación de las larvas alimentadas (de 91 a 96), no así en las larvas sin alimentar en que el porcentaje bajó de 81 a 76 (Tabla 5).

TABLA 5. Porcentaje de buena clasificación de las larvas de sardina, *Sardinops sagax musica*, de acuerdo al estado de nutrición al aplicar la función discriminante D utilizando las variables morfométricas. Etapa I, larvas inmediatamente después de reabsorbido el vitelo. Etapa II, larvas de 10 días de edad mantenidas a continuación con y sin alimento.

CONDICION EXPERIMENTAL	FUNCION DISCRIMINANTE			
	Utilización de 3 variables (AC, ACNA y DI)		Utilización de 4 variables (AC, ACNA, DI y AP)	
	n	%	n	%
Etapa I				
Alimentadas	66	85	66	94
Sin alimentar	66	88	66	80
Etapa II				
Alimentadas	44	100	44	100
Sin alimentar	30	67	30	67
Total Etapas				
Alimentadas	110	91	110	96
Sin alimentar	96	81	96	76

Análisis de los datos histológicos

Al describir la condición de las larvas a nivel histológico considerando los seis caracteres sensibles a la inanición, se indican los aspectos más destacados que se utilizaron para aplicar las escalas de gradación.

Hígado

El tejido hepático está compuesto de células piramidales dis-

puestas en cordones tubulares. Los núcleos de las células hepáticas de las larvas mantenidas con alimento 6 días en el laboratorio presentaron formas regulares, eran prominentes y poseían cromatina dispersa. Por el contrario, los núcleos de las células de las larvas mantenidas sin alimento por el mismo período presentaron formas irregulares, eran de reducido tamaño y se observaron muy teñidas. El citoplasma de las células del grupo de larvas alimentadas se mostró considerablemente voluminoso con espacios o vacuolización intracelular. Por el contrario, en las células hepáticas de larvas sin alimento, el citoplasma se redujo considerablemente, condensándose y tiñéndose oscuro; desaparecieron los espacios intracelulares. El tejido hepático de una larva alimentada se apreció compacto e íntegro en su estructura (Fig. 3C) mientras que el de una larva mantenida sin alimento se observó fraccionado y con espacios intercelulares (Fig. 3D).

Para la determinación del estado de nutrición de las larvas, se consideró en el hígado el aspecto del tejido, citoplasma y núcleo, de acuerdo a la siguiente gradación:

Tejido: grado 1 (moribundo), notoriamente fragmentado; grado 2 (intermedio), escasamente fragmentado; grado 3 (saludable); compacto e íntegro en su estructura.

Citoplasma: grado 1, sin textura citoplasmática y/o muy teñido; grado 2, granuloso; grado 3, desde escasamente granular a granular con vacuolización intracelular.

Núcleo: grado 1, intensamente teñido, de pequeño tamaño y de forma angulosa y nucléolo no distinguible; grado 2, variablemente teñido y esférico; grado 3, prominente con nucléolo distinguible.

Páncreas

Las células del páncreas exocrino están dispuestas en series circulares conformando unidades secretoras denominadas acinos. Los núcleos de células pancreáticas de larvas mantenidas con alimento presentaron formas esféricas, eran prominentes y en ellos se distinguía el nucléolo (Fig. 3C). Por el contrario, los núcleos de las células pancreáticas de las larvas mantenidas sin alimento presentaron formas angulosas e irregulares, notándose muy teñidas (Fig. 3D). El tejido pancreático de las larvas alimentadas se observó compacto e íntegro en su estruc-

tura, mientras que el de las larvas en inanición se mostró considerablemente alterado y disociado; los acinos se vieron conformando una estructura muy teñida sin simetría y se distinguieron zonas de separación del tejido. El producto de secreción del páncreas se descartó como carácter indicador del estado de nutrición de la larva, ya que éste experimentaba variaciones que no siempre correspondían con la condición de inanición.

La gradación histológica del páncreas se basó en el aspecto del tejido y de las células:

Tejido: grado 1 (moribundo), notoriamente fragmentado y sin eosinofilia; grado 2 (intermedio), escasamente fragmentado con eosinofilia en ciertas áreas; grado 3 (saludable), compacto e íntegro en su estructura con eosinofilia en extensas áreas.

Células: grado 1, generalmente pequeñas, muy teñidas y disociadas; grado 2, núcleo picnótico y espacios intercelulares en algunas áreas; grado 3, voluminosas y asociadas, con núcleo prominente y nucléolo distinguible.

Intestino anterior

La mucosa intestinal en larvas mantenidas con alimento presentó una conformación continua e íntegra. Las células se observaron asociadas y el lumen intestinal se detectó amplio. La mucosa intestinal en larvas privadas de alimento se visualizó poco compacta y discontinua. Las células aparecieron separadas y con formas irregulares. El lumen se presentó sinuoso y reducido.

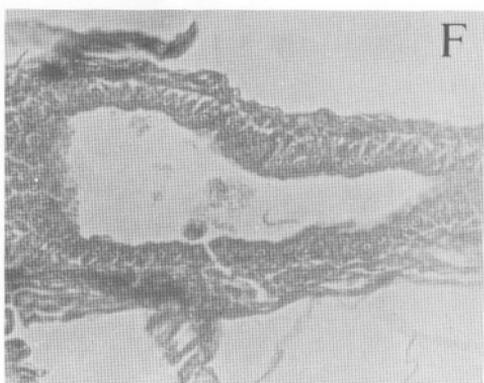
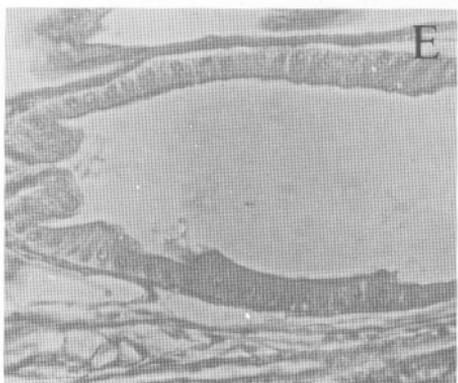
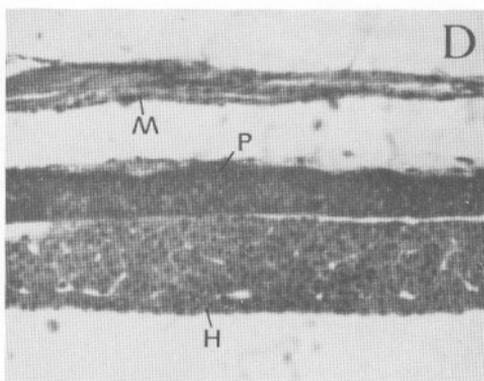
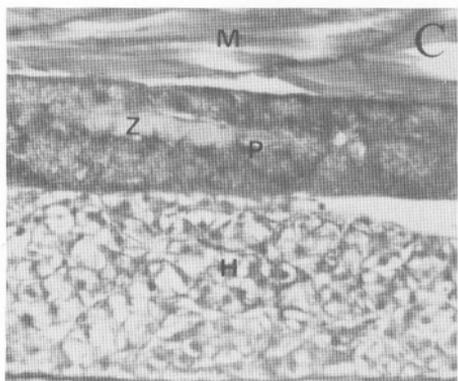
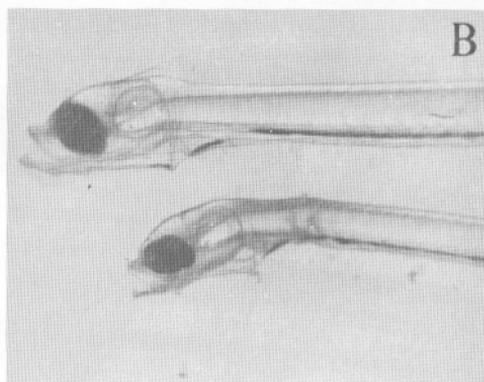
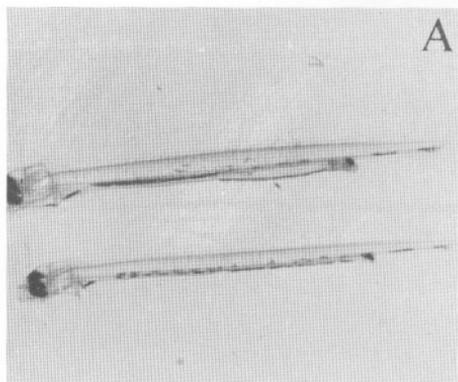
La gradación histológica del intestino anterior se basó en las características de la mucosa: grado 1 (moribundo), discontinua con espacios intercelulares marcados y lumen intestinal reducido; grado 2 (intermedio), escasamente discontinua; grado 3 (saludable), continua e íntegra en su estructura y lumen intestinal amplio.

Intestino medio

Las células epiteliales columnares del intestino en larvas mantenidas con alimento se observaron bien asociadas (Fig. 3E). En larvas privadas de alimento, las células aparecieron disociadas y hubo desprendimiento de mucosa en el lumen intesti-

Fig. 3. Comparación histológica de las larvas de sardina *Sardinops sagax musica*, bien alimentadas o en hambruna. A, larvas en que se observan diferencias en las dimensiones corporales, principalmente en la mayor altura del intestino en la larva bien alimentada (arriba) que en larva sin alimento (abajo). B, con mayor aumento se nota que el ángulo pectoral de la larva privada de alimento es más agudo que en la larva alimentada. C, tejido hepático y pancreático compacto en larvas alimentadas; hepatocitos voluminosos con vacuolización intracelular; núcleos prominentes y nucléolo distinguible, 400 X. D, fraccionamiento y disociación celular del tejido hepático y pancreático de larvas en hambruna; células pequeñas con espacios intercelulares y núcleos con formas irregulares, 400 X. E, intestino medio denota buena integridad en larvas alimentadas; las células de la mucosa se ven altas y asociadas; lumen considerablemente amplio, 400 X. F, intestino de una larva en hambruna; la mucosa se observa fraccionada, con espacios intercelulares y desprendimiento de mucosa en el lumen, 400 X.

Simbología: H, hígado; M, musculatura; P, páncreas; Z, cimógeno.



nal. El lumen intestinal se observó reducido en comparación con el de las larvas alimentadas (Fig. 3F). Para la gradación histológica del intestino medio se aplicó el mismo criterio que para el intestino anterior.

Musculatura

El tronco muscular de las larvas mantenidas con alimento se observó compacto. Las fibras musculares se notaron paralelas y asociadas. Los núcleos aparecieron claros con nucléolo distinguible. En las larvas mantenidas sin alimento, las fibras musculares se observaron separadas dejando espacios, viéndose reducida la matriz del tejido muscular y perdiendo su disposición paralela.

La gradación histológica de la musculatura se basó en las características de las fibras musculares: grado 1 (moribundo), ampliamente separadas con espacios interfibrilares y núcleos muy teñidos (Fig. 4B); grado 2 (intermedio), escasamente separadas; grado 3 (saludable), paralelas y asociadas con núcleos prominentes y nucléolo distinguible (Fig. 4A).

Cerebro

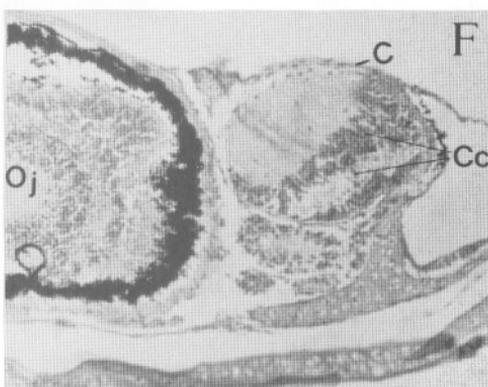
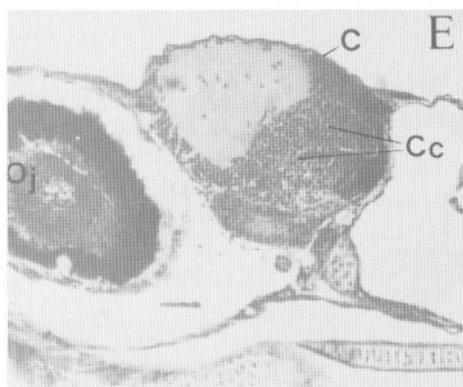
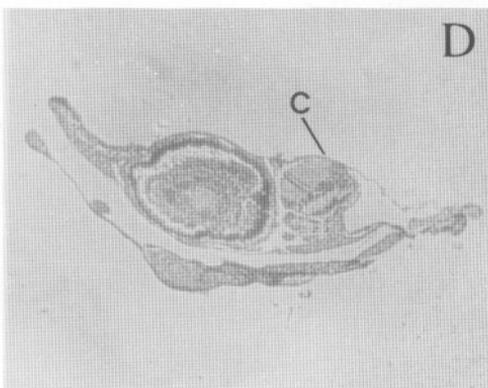
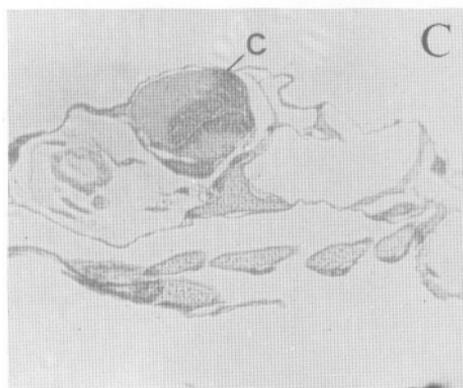
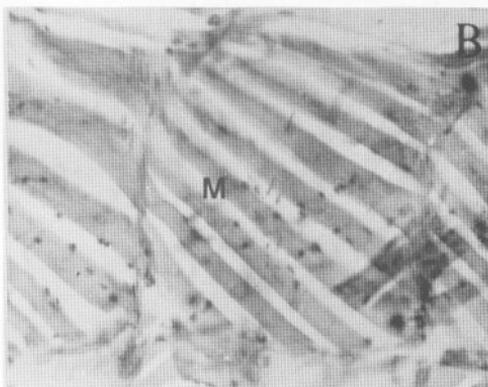
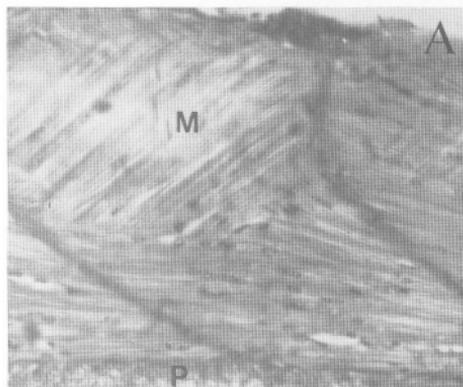
El tejido cerebral en las larvas alimentadas se observó compacto e íntegro. Los cuerpos de las células cerebrales se presentaron asociados. Por el contrario, en larvas mantenidas sin alimento el tejido apareció fraccionado con espacios intercelulares.

La gradación histológica del cerebro se basó en las características de los cuerpos de las células: grado 1 (moribundo), disociados con espacios intercelulares (Figs. 4D y 4F); grado 2 (intermedio), escasamente disociados; grado 3 (saludable), asociados en extensas áreas (Figs. 4C y 4E).

La clasificación histológica de las larvas establecida mediante la asignación de grados se resume en las tablas 6 y 7. Se observó que las larvas mantenidas con alimento presentaron a igual edad una mejor condición histológica que las mantenidas sin alimento. Sobre la base de esta gradación, el 78% de las larvas alimentadas presentaron una condición saludable a lo largo de todo el experimento. En tanto que en larvas privadas de alimento desde la reabsorción del vitelo o desde los

Fig. 4. Comparación histológica de larvas de *Sardinops sagax musica* bien alimentadas (A, C, E) o en hambruna (B, D, F). A, tejido muscular compacto; las fibras musculares se ven paralelas y asociadas, 400 X. B, fibras musculares ampliamente separadas y con pérdida de la matriz del tejido intermuscular, 400 X. C, los cuerpos de las células cerebrales en la sustancia gris se ven asociados, 100 X. D, el tejido cerebral se nota poco compacto, 100 X. E, las células cerebrales se distribuyen en forma homogénea en el tejido, 250 X. F, las células cerebrales se distribuyen irregularmente, evidenciándose áreas claras, 300 X.

Simbología: C, cerebro; Cc, células cerebrales; M, musculatura; P, páncreas; Oj, ojo.



diez días de edad se observaron signos de deterioro desde el segundo día, en que el 100% de los ejemplares muestreados estaban en condición semisaludable o moribunda. Ya al quinto y sexto día de experimentación, la totalidad de las larvas fueron clasificadas como moribundas.

TABLA 6. Gradación histológica de las larvas de sardina *Sardinops sagax musica* mantenidas con y sin alimento en el laboratorio, inmediatamente después de la reabsorción del vitelo.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	Días	n	GRADACION HISTOLOGICA		
			Saludables	Semisaludables	Moribundas
Con alimento	1	9	7		2
	2	8	4	4	
	3	7	7		
	4	8	5	3	
	5	11	9		2
	6	9	9		
TOTAL		52	41	7	4
Sin alimento	1	8	7		1
	2	8		4	4
	3	5		5	
	4	10		1	9
	5	8			8
	6	11			11
TOTAL		50	7	10	33

TABLA 7. Gradación histológica de las larvas de sardina (*Sardinops sagax musica*) de 10 días de edad mantenidas a continuación con y sin alimento en el laboratorio.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	Días	n	GRADACION HISTOLOGICA		
			Saludables	Semisaludables	Moribundas
	0				
Con alimento	0	7	4	2	1
	2	7	6	1	
	4	7	5	2	
	6	4	4		
TOTAL		25	19	5	1
Sin alimento	0	8	4	4	
	2	7		4	3
	4	6		1	5
	6	5			5
TOTAL		26	4	9	13

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En larvas de peces la falta de alimento se ha visto reflejada en una serie de estructuras tanto externas como internas que muestran una mayor sensibilidad a esta condición. Ehrlich et al. (1976) encontraron que las larvas de arenque (*Clupea harengus*) en inanición mostraban una disminución del ángulo pectoral y colapsamiento del cuerpo en general, y a nivel de órganos internos en un análisis histológico, una reducción en la altura de las células epiteliales del intestino. En larvas de lenguado (*Pleuronectes platessa*) en inanición, estos mismos autores hallaron una marcada disminución en el volumen del hígado visto en sección transversal. O'Connell (1976, 1980) encontró que las larvas de anchoveta de California (*Engraulis mordax*) evidenciaban una amplia separación de las fibras musculares y anomalías a nivel del hígado, páncreas y tracto digestivo. Theilacker (1978, 1981), utilizando análisis discriminante por etapas para determinar inanición en larvas de jurel (*Trachurus symmetricus*), encontró a nivel morfométrico disminución de la longitud estándar, de la altura corporal, de la longitud de la cabeza y del diámetro del ojo;

a nivel histológico, deterioro del tejido intestinal, pancreático, hepático, muscular y de las células cerebrales; además, observó dilatación de la vesícula biliar. Kostomarova (1962) observó una disminución de más del 50% en la altura de las células epiteliales del intestino y pérdida del tejido conectivo en larvas de carpa (**Cyprinus carpio**) y lucio (**Esox lucio**) en hambruna. Umeda & Ochiai (1975) encontraron que la falta de alimento en larvas de **Seriola quinqueradiata** producía degeneración nuclear y celular en el hígado y páncreas. Posteriormente, Umeda et al. (1986) al realizar estudios similares en larvas de **Trachurus japonicus**, encontraron que además de alterarse el hígado y el páncreas en el epitelio del intestino anterior y posterior desaparecían los pliegues y se producía degeneración nuclear. Asimismo, Kashuba & Matthews (1984) encontraron que en las larvas de **Dorosoma** spp, el hígado, páncreas y especialmente el intestino medio eran afectados por la hambruna. Igualmente Watanabe (1985) detectó en larvas de **Chaenogobius annularis** privadas de alimento por 48 horas, la desaparición del glicógeno almacenado en los hepatocitos y de las gotas de lípidos y gránulos de proteína de las células del epitelio intestinal; en el epitelio rectal observó cambios degenerativos. Powell & Chester (1985) determinaron morfométricamente que en las larvas de **Leiostomus xanthurus**, la falta de alimento se reflejaba con mayor nitidez en la disminución de la altura del cuerpo a nivel del cleitro y a nivel de la base de la aleta pectoral. También por morfometría, Yin & Blaxter (1986) encontraron que valores bajos para la relación altura del intestino: altura de los miotomos era uno de los caracteres más útiles para detectar un estado de nutrición pobre en las larvas de **Gadus morhua** y **Platichthys flesus**. En todo caso, experimentos de larga duración deben analizarse con cautela, ya que al comparar larvas criadas en el laboratorio con larvas capturadas en el mar se han detectado diferencias significativas en algunas medidas corporales y en la composición química (Balbontín et al. 1973).

En este trabajo se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos en larvas de otras especies de peces. Aplicando criterios morfométricos y a través del uso de análisis de varianza multivariante, se identificaron los caracteres más sensibles a la hambruna en las larvas de sardina española. Estos caracteres fueron altura de la cabeza, altura del cuerpo a nivel anal, distancia interorbital y ángulo pectoral. Por otra parte, al utilizar criterios histológicos se pudo determinar que en las larvas de sardina, al igual que en otras espe-

cies de peces, los órganos y tejidos más susceptibles a la falta de alimento fueron el hígado, páncreas, intestino anterior, intestino medio, musculatura y cerebro. Los signos de alteración se hicieron evidentes en la acentuación del grado de fraccionamiento del tejido, reducción del volumen celular y separación y pérdida de sustancia intercelular, particularmente a nivel de la musculatura. De los tejidos analizados y tomando en cuenta el bajo grado de dificultad para realizar el diagnóstico, resultaron extremadamente útiles el hígado y la musculatura.

La función discriminante D construida con los datos morfo-métricos de larvas mantenidas con y sin alimento confirmó los resultados obtenidos al aplicar los gradientes morfométricos e histológicos.

Los criterios morfométricos e histológicos desarrollados en el laboratorio, al ser aplicados en larvas recolectadas en su ambiente natural para detectar estados de hambruna, han resultado exitosos (O'Connell 1980, Kashuba & Matthews 1984, Hewitt et al. 1985, Martin et al. 1985, Theilacker 1986). Estudios sobre las larvas de anchoveta de California *Engraulis mordax*, realizados en el laboratorio y en el mar mostraron que tanto la concentración como el tamaño de alimento eran importantes durante la primera alimentación larval (Lasker 1975, 1978). En esta especie, la inanición en el mar se ha detectado no sólo en larvas inmediatamente después de reabsorbido el vitelo sino que también en larvas que habían iniciado su alimentación exógena (O'Connell 1980). Un análisis preliminar de larvas planctónicas de sardina de las costas de Valparaíso y Quintero indicó que, de acuerdo a los criterios de clasificación señalados en el presente trabajo, entre un 13% de larvas (según la gradación morfométrica) a un 15% (según la gradación histológica) presentaban síntomas de inanición (datos sin publicar).

En larvas de jurel de las costas de California, el mayor porcentaje de inanición coincidió con el tamaño del inicio de la alimentación exógena (Hewitt et al. 1985). Estos resultados reafirman la hipótesis de Hjort (1914) respecto a la importancia para las larvas de disponer en el ambiente del alimento adecuado una vez alcanzado el período crítico. En este sentido, la presente metodología desarrollada para evaluar el estado de nutrición de las larvas de sardina en el laboratorio, podrá utilizarse como un criterio que deberá ser ponderado para cuantificar la mortalidad por hambruna de las larvas de sardina en el mar.

AGRADECIMIENTOS. Se agradece al Dr. Pedro Gorgollón sus recomendaciones en la aplicación de las técnicas histológicas. Igualmente se agradece a la Sra. Inés Guerrero, al Sr. Enrique Cabrera y al Sr. Gabriel Lillo por su ayuda en el análisis estadístico de los datos. Asimismo, al Sr. René Astudillo por su colaboración en la confección de gráficos y fotografías. Las sugerencias de la Dra. Gail Theilacker al revisar un primer borrador del manuscrito fueron de gran valor. El Dr. Eduardo Bustos-Obregón ayudó a mejorar la copia final del manuscrito.

Parte del análisis estadístico de los datos se efectuó en un equipo IBM PC gracias a un Programa Corporativo con esa empresa.

Este trabajo formó parte de la tesis para optar al grado de licenciado en Biología del primer autor, realizado en el Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso.

LITERATURA CITADA

- Anderson, T. 1958. An introduction to multivariate statistical analysis. John Wiley & Sons, Inc., 6: 126-152.
- Arthur, D.K. 1976. Food and feeding of larvae of three fishes occurring in the California Current, *Sardinops sagax*, *Engraulis ringens* and *Trachurus symmetricus*. Fishery Bulletin, 74 (3): 517-530.
- Balbontín, F., S.S. De Silva & K.F. Ehrlich. 1973. A comparative study of anatomical and chemical characteristics of reared and wild herring. Aquaculture, 2: 217-240.
- Blaxter, J.H.S. 1971. Feeding and condition of Clyde herring larvae. Rapports et Procès Verbaux, Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 160: 128-136.
- Cooley, C. & P. Lohnes. 1971. Multivariate data analysis. John Wiley & Sons, Inc. Sydney, 364 pp.
- Cushing, D. 1971. The dependence of recruitment on parent stock in different groups of fishes. Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 33 (3): 340-362.
- Ehrlich, K., J. Blaxter & R. Pemberton. 1976. Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. Marine Biology, 35: 105-118.
- Hewitt, R., G. Theilacker & N.C. Lo. 1985. Causes of mortality of young jack mackerel. Marine Ecology Progress Series, 26 (1-2): 1-10.

- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 20: 1-228.
- Honjo, K., I. Kidachi & H. Susuki. On the food distribution and survival of post larval iwashi - I - Distribution of food organisms, the food of the anchovy and ecologically related species along the south western Pacific coast of Honshu, Sept.-Nov. 1958. Reports on the major coastal fish investigations, and the investigations for forecasting of oceanographic conditions and fisheries (Preliminary report).
- Hunter, J. 1976. Report of a colloquium on larval fish mortality studies and their relation to fishery research, January 1975. NOAA Technical Report, NMFS Circular, 395: 1-5.
- Hunter, J. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In: Lasker, R. (ed.), *Marine Fish Larvae*, pp. 33-77. University of Washington Press.
- Isaacs, J. 1965. Larval sardine and anchovy interrelationships. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 10: 102-140.
- Kashuba, S. & W.J. Matthews. 1984. Physical condition of larval shad during spring-summer in a southwestern reservoir. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113: 119-204.
- Kostomarova, A. 1962. Effect of starvation on the development of the larvae of bony fishes. *Trudy Instituta Morfologii Zhivotnykh imeni A.N. Severtsova, Moskva*, Issue, 40: 4-77.
- Lasker, R. 1985. What limits Clupeoid production? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42 (Supplement 1): 31-38.
- Martin, F.D., D.A. Wright, J.C. Means & E.M. Setzler-Hamilton. 1985. Importance of food supply to nutritional state of larval striped bass in the Potomac river estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114: 137-145.
- Methot, R. & D. Kramer. 1979. Growth of northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae in the sea. *Fishery Bulletin*, 77: 413-423.
- Nakai, Z., M. Kosaka, M. Ogura, G. Hayashida & H. Shimozono. 1969. Feeding habit, and depth of body and diameter of digestive tract of shirasu, in relation with nutritious condition. *Journal of the College of Marine Science and Technology, Tokai University*, 3: 23-34.

- O'Connell, C. 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk-sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **25**: 285-312.
- O'Connell, C. 1980. Percentaje of starving northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae in the sea as estimated by histological methods. *Fishery Bulletin*, **78** (2): 475-489.
- Powell, A.B. & A.J. Chester. 1985. Morphometric indices of nutritional condition and sensitivity to starvation of spot larvae. *Transactions of the American Fisheries Society*, **114**: 338-347.
- SERNAP. 1987. Estadísticas pesqueras. Series cronológicas (1976-1986). Servicio Nacional de Pesca, Departamento de Recursos Naturales, 12 págs.
- Shelbourne, J. 1957. The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.*, **36** (3): 539-552.
- Theilacker, G. 1978. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Fishery Bulletin*, **76** (2): 403-414.
- Theilacker, G. 1981. Effect of feeding history and egg size on the morphology of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Rapports et Procés-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **178**: 432-440.
- Theilacker, G. 1986. Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *Trachurus simmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fishery Bulletin*, **84** (1): 1-17.
- Umeda, S. & A. Ochiai. 1975. On the histological structure and function of the digestive organs of the fed and starved larvae of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **21**: 213-219.
- Umeda, S., H. Ochi & A. Ochiai. 1986. The influences of delayed initial feeding on survival, growth and digestive organs in early post-larvae of the jack mackerel, *Trachurus japonicus*. Report Usa Marine Biological Institute, Kochi University, **8**: 45-53.
- Walsh, J. 1978. The biological consequences of interaction of the climatic, El Niño, and event scales of variability in the eastern tropical Pacific. *Rapports et Procés-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **173**: 182-192.
- Watanabe, Y. 1985. Histological changes in the liver and intestine of freshwater goby larvae during short-term starvation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **51** (5): 707-709.

Yim, M.C. & J.H.S. Blaxter. 1986. Morphological changes during growth and starvation of larval cod (*Gadus morhua* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104: 215-228.

Manuscrito recibido en abril de 1987 y aceptado en julio de 1987.