

INTER-AMERICAN TROPICAL TUNA COMMISSION
COMISION INTERAMERICANA DEL ATUN TROPICAL

Bulletin — Boletín
Vol. VI, No. 4

**ARTIFICIAL FERTILIZATION OF THE EGGS, AND REARING
AND IDENTIFICATION OF THE LARVAE OF THE
ANCHOVETA, *CETENGRAULIS MYSTICETUS***

**FERTILIZACION ARTIFICIAL DE LOS HUEVOS DE LA
ANCHOVETA, *CETENGRAULIS MYSTICETUS*, Y CRIANZA E
IDENTIFICACION DE SUS LARVAS**

by — por
EDWARD F. KLIMA, IZADORE BARRETT, and/y JOHN E. KINNEAR

La Jolla, California
1962

CONTENTS — INDICE

ENGLISH VERSION — VERSION EN INGLES

	Page
INTRODUCTION.....	155
MATERIALS AND METHODS.....	156
Artificial fertilization.....	156
Rearing of planktonic eggs and larvae.....	156
Rearing equipment.....	157
Water.....	157
Salinity.....	157
Temperature.....	157
Pressure.....	158
Food.....	158
Natural habitat.....	158
Attempts to identify anchoveta larvae using larvae collected in the field.....	159
RESULTS.....	160
Artificial fertilization.....	160
Rearing of planktonic eggs.....	160
Attempts to identify anchoveta larvae using larvae collected in the field.....	160
—————	
FIGURES — FIGURAS.....	164

SPANISH VERSION — VERSION EN ESPAÑOL

	Página
INTRODUCCION.....	167
MATERIAL Y METODOS.....	168
Fertilización artificial.....	168
Crianza de los huevos planctónicos y de las larvas.....	168
Equipo para la crianza.....	169
Agua.....	169
Salinidad.....	170
Temperatura.....	170
Presión.....	170
Alimento.....	170
Ambiente natural.....	171
Ensayos para identificar las larvas de la anchoveta usando las larvas recolectadas en el mar.....	171
RESULTADOS.....	172
Fertilización artificial.....	172
Crianza de los huevos planctónicos.....	172
Ensayos para identificar las larvas de la anchoveta usando las larvas recolectadas en el mar.....	173
—————	
LITERATURE CITED—BIBLIOGRAFIA CITADA.....	177

**ARTIFICIAL FERTILIZATION OF THE EGGS, AND REARING AND
IDENTIFICATION OF THE LARVAE OF THE ANCHOVETA,
*CETENGRAULIS MYSTICETUS***

by

Edward F. Klima, Izadore Barrett, and John E. Kinnear

INTRODUCTION

The anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Günther), is an important bait fish used to capture tunas in the Eastern Tropical Pacific Ocean. Contributions to the early life history of this species in the Gulf of Panama were made by Simpson (1959), who was able to identify deductively the planktonic egg of the anchoveta from 10 other anchovy eggs concurrently present. He also reared these planktonic eggs in the laboratory and described the resultant larvae to the age of 48 hours after hatching. Because of the lack of differences among the anchovy larvae, this description does not permit the identification of anchoveta larvae from those of other engraulid species. Furthermore, while adult specimens are easily recognized, up to the present it has not been possible to extend the identification of the juvenile anchoveta to specimens smaller than about 25 mm. The purpose of this study, therefore, was to identify anchoveta from the time of hatching to about 25 mm.

The problem of identification was approached in two ways. One method was to attempt to rear larvae from planktonic eggs thought to be those of the anchoveta, based on Simpson's (1959) identification, under a variety of conditions in the laboratory and the field, to a size (about 25 mm.) at which they could be definitely identified from their physical characteristics as anchoveta; and in the process to obtain a series of the developmental stages for comparison with the larvae of other anchovies from field collections. However, before planktonic anchoveta eggs could be used in the rearing experiments with complete confidence as to their identification it was necessary to confirm Simpson's (1959) identification of the anchoveta egg. Therefore, attempts were made to fertilize anchoveta eggs artificially. No attempt was made to study the mortality rates, since the objective was only to rear the larvae to as large a size as possible. The other approach was to examine field collections of anchovy larvae made shortly before, during, and immediately after the anchoveta spawning season, to identify and separate the anchoveta larvae from the larvae of other anchovies, using meristic, morphometric, and anatomical characteristics.

Dr. Milner B. Schaefer, Mr. Clifford L. Peterson, and Mr. William H. Bayliff provided helpful suggestions and constructive criticisms for all phases of the project. In addition, Messrs. Bayliff and Guillermo G. Gamboa participated in its execution. Messrs. John G. Simpson and Gilbert W. Bane did some preliminary work in the study of the field collections of larvae.

MATERIALS AND METHODS

Artificial fertilization

The difficulty of obtaining running-ripe female marine fish has been noted (Clark, 1934; Miller, 1952), and was one of the main problems in the artificial fertilization of anchoveta eggs. Intensive trawling and cast-netting off Panama Viejo (Figure 1) during November and December 1958, from about 1:30 to 4:30 a.m., finally led to the simultaneous capture of a male and a female anchoveta, both in a running-ripe stage of maturity. These fish were wiped partially dry and the sexual products of each were expressed into a clean, dry plastic dish. The ripe eggs had a semi-translucent, pale cream color, and ran freely down the side of the plastic dish. It was not possible to express more than a drop or two of milt from the ripe male. This had the typical creamy-white appearance of fish milt. Sea water was added and the mixture of milt and eggs was gently stirred, to increase the chances of fertilization of the eggs. The presence of transparent, floating eggs indicated successful artificial fertilization. The dead or unfertilized eggs had a white, opaque appearance, and sank to the bottom of the container. Artificial fertilization was effected at approximately 3 a.m. The eggs were held in static sea water in petri dishes, where they subsequently hatched 19 to 20 hours after fertilization (10 to 11 p.m.). Samples were taken at regular intervals for comparison with planktonic eggs and larvae described as those of anchoveta by Simpson (1959).

Rearing of planktonic eggs and larvae

Planktonic anchoveta eggs collected from the Gulf of Panama during the 1958 and 1959 spawning seasons were the most readily-available source of fertilized eggs for the rearing experiments. These eggs were used in all of the rearing experiments except for one series in 1958, when artificially-fertilized eggs were available.

The planktonic eggs were collected by 20-minute surface tows made at 2 to 3 miles per hour with a $\frac{1}{2}$ meter plankton net constructed with 40XXX and 56XXX nylon grit gauze in the body and cod end, respectively. The collections were made between 6 and 12 a.m. off Panama Viejo, based on Simpson's (1959) findings. The floating eggs were decanted from the plankton sample and taken, in quart or gallon jars protected from the sun and shock, to the laboratory. The anchoveta eggs were then separated from the other eggs, with the aid of a binocular microscope and an ocular micrometer, on the basis of their dimensions as given by Simpson (1959).

In some of the early experiments, engraulid eggs other than those of anchoveta were used to test and develop the rearing techniques. During the course of the rearing experiments samples of eggs and larvae were taken at regular intervals. All the samples were preserved in a solution of 4 per cent buffered formalin.

Rearing equipment

Three basic methods were used in attempts to rear the larvae in the laboratory. One method employed re-circulating sea water, subjected to ultraviolet irradiation for bacterial control. The eggs and larvae were held in small plastic bowls or 2½-gallon glass aquaria through which the sea water was circulated. A second technique used in the 1958 experiments was holding the eggs and larvae in petri dishes containing static sea water which was changed every 4 to 8 hours. The petri dishes were replaced by 1-, 2½-, and 15-gallon aquaria in the 1959 experiments, and the water was either not changed or changed slowly by dripping in freshly-collected sea water. A third method was to hatch the eggs and rear the larvae in "balanced" aquaria of different sizes containing static sea water, marine algae, and other forms of microscopic life.

Water

For some experiments, surface and, occasionally, bottom sea water was obtained daily from the Pacific entrance of the Panama Canal, and off Panama Viejo. Following a suggestion by Mr. J. E. Shelbourne, Fisheries Laboratory, Lowestoft, England, sea water, conditioned for a month or more by holding it in glass carboys or battery jars to which littoral algae and filter-feeding molluscs were added, was used for another series of experiments. A mixture of 50 p.p.m. of penicillin and streptomycin was added to the water used in most of the 1959 experiments, to increase the survival of eggs, as suggested by Oppenheimer (1955).

Salinity

Clupeoid larvae can sometimes be reared to a larger size in sea water diluted with distilled water (Dr. Reuben Lasker, Bureau of Commercial Fisheries, La Jolla, Calif., personal communication). Both freshly-collected and conditioned sea water were diluted with distilled water to concentrations ranging in salinity from 5.5 to 33.7 ‰. Various dilutions and mixtures of freshly-collected surface and bottom sea water, and conditioned sea water were used. For all experiments, routine determinations of the temperature, pH, and salinity were made; when necessary, distilled water was added to the aquaria to compensate for evaporation.

Temperature

The mean sea surface temperatures in the Gulf of Panama range from about 26° to 28° C. in October, November, and December, the peak period

of anchoveta spawning. The water temperature in most of the experiments ranged from 26° to 31° C., which approximates this environmental temperature range; regulation was by the ambient air temperature of the laboratory. For one group of experiments, the temperature was maintained between 19° to 23° C. by means of room air conditioning.

Pressure

The effect of pressure on the survival of the larvae was tested, because Simpson (1959) suggested that anchoveta larvae sink to the bottom after hatching. A 4-quart pressure cooker with a pressure gauge was used to provide 15 to 18 pounds per square inch of pressure, under which the eggs were hatched and the larvae were reared, using different combinations of food, light, and temperature.

Food

The natural foods of anchoveta larvae are not presently known; however, adult and juvenile anchoveta are reported to feed on diatoms and occasionally dinoflagellates (Schaefer, 1961). Therefore, a variety of foods was presented to the newly-hatched larvae in the hope that something might be found which they would eat. These foods included naturally-occurring and cultured phytoplankton; human blood; powdered yolk from hard-boiled eggs; 12 commercially-prepared fish fry foods including, among others, "Infusoria," "Baby Manna," and "Longlife Micrograin"; 4 water-soluble vitamin compounds; dry yeast microorganisms; and newly-hatched brine shrimp larvae.

Natural habitat

The most obvious method of providing the complex factors necessary for the hatching of fish eggs and the subsequent survival and growth of the larvae is to rear them in their natural habitat. This was attempted using planktonic eggs. The plankton collections containing these eggs were taken by boat directly to either of two field experiment sites; one off Taboga Island (Figure 1), where juvenile anchovetas occur in February and March, and the other off Panama Viejo, where adult anchovetas are present the year round. Because it was not feasible to use a microscope aboard the vessel to sort the anchoveta eggs from those of the other species, all the floating planktonic material was used for the rearing experiments. However, the area and time of collection and subsequent inspection of subsamples at the laboratory indicated that the majority of the eggs were those of the anchoveta.

The eggs and other plankton were placed in a variety of containers including phytoplankton and zooplankton nets, plastic milk bottles, 1-gallon jars, wooden frames and boxes covered with netting, each modified to retain the eggs and the larvae, but to permit the exchange of sea water

and food material. The containers were held either just below the surface or at 2 fathoms.

Attempts to identify anchoveta larvae using larvae collected in the field

The samples of larvae which were used to attempt to identify larval anchoveta were collected in the Gulf of Panama in 1956, 1957, 1958, and 1959 by Tuna Commission personnel. The most successful means of collecting larvae was trawling with either an otter trawl or shrimp try-net modified by lining the cod end with fine-mesh nylon netting. In addition, some collections were made by towing a plankton net at the surface, and by dynamiting schools of small surface fish. The larvae ranged in size from 5 mm. to 25 mm. standard length, and were preserved in 4 per cent buffered formalin.

Samples of larval anchovies from a given collection were first sorted into size groups. A gross examination of the larvae in these groups was made, to look for any obvious differences. Then, a detailed examination of each fish was made on the basis of the following characteristics:

1. Meristic characters (vertebrae; anal, dorsal, pectoral, and pelvic fin rays)
2. Pigmentation
3. Anatomy (soft and skeletal)
4. Morphological development (degree of ossification and sequence of fin formation)
5. Body measurements (standard length, head length, eye diameter, depth at base of pectoral fin, length from snout to origin of anal fin, length from snout to origin of dorsal fin)

The larvae used to study the meristic characters and skeletal anatomy were cleared and stained following the procedure described by Clothier (1950). Morphometric measurements, using a calibrated ocular micrometer, were made on groups of 50 larvae which were chosen at random from single collections made with the shrimp try-net.

In addition to the meristic studies of the larvae, detailed examinations were made of the juvenile specimens (28 to 50 mm.) of *Anchoa naso* (Gilbert and Pierson), *A. curta* (Jordan and Gilbert), *A. starksi* (Gilbert and Pierson), and *Anchoviella balboae* (Jordan and Seale) to search for any distinguishing features which might also be present in the larval stage, and which would thus serve to distinguish the larvae of these four species from those of the anchoveta, which they closely resemble.

RESULTS

Artificial fertilization

The size of the eggs, the time of hatching, the rate of embryological development, and the general appearance of the larvae described by Simpson as those of the anchoveta are identical with those observed from the artificially-fertilized eggs of the anchoveta. Hence it was possible to use the planktonic eggs of this size and with the same hatching time for the rearing experiments with complete confidence that they were anchoveta eggs.

Rearing of planktonic eggs

Attempts to rear anchoveta larvae to an identifiable stage (approximately 25 mm. standard length) were unsuccessful in all the laboratory and field experiments. Larvae reared at 26° to 31° C. lived only about 89 hours after hatching (shortly after absorption of the yolk sac) whereas larvae reared in water of 19° to 23° C. lived approximately 154 hours after hatching. There was no apparent difference, however, in the developmental stages attained by the two groups of larvae.

No difference was apparent in the survival times of the larvae reared in systems using freshly-collected sea water and larvae reared in conditioned sea water. The larvae survived longer in undiluted sea water than in sea water diluted with distilled water. In the one experiment designed to test the survival of eggs in antibiotic and non-antibiotic water, more eggs hatched in antibiotic than in non-antibiotic water.

Attempts to rear the larvae in their natural habitat, using various types of containers, were also unsuccessful. In most of these experiments the netting which prevented the loss of the eggs and larvae and which was to have permitted the water to circulate, became clogged. The eggs probably received insufficient oxygen, and also were probably damaged due to the jarring of the containers by wave action. In five of the six field experiments the eggs failed to hatch, whereas in the laboratory experiments the eggs hatched in almost every experiment.

Food is a major factor affecting the transition of fish from the prolarval to postlarval stages (Vladimirov and Somenov, 1959). Since the larvae reared in these experiments were not observed to ingest any of the foods offered them, it is thought that the problem of finding an acceptable food is the main obstacle to the successful rearing of the anchoveta larvae. However, the possibility of some other factor or factors being responsible for the lack of success should not be completely discounted.

Attempts to identify anchoveta larvae using larvae collected in the field

Hildebrand (1943) reports 19 species of anchovies in the Gulf of Panama. The separation of the anchoveta larvae from those of the other species

is complicated by at least three problems. First, except for the anchoveta, little is known of the biology and ecology of the engraulids of the Gulf of Panama. Second, the taxonomy of the group has not been adequately investigated, leaving some doubt as to the actual number of species in existence. For example, Simpson (1959) raises the question of synonymy in the cases of *Anchovia macrolepidota* (Kner and Steindachner) and *A. rastralis* (Gilbert and Pierson); *Anchoa exigua* (Jordan and Gilbert) and *A. tropica* (Hildebrand); and *A. mundeoloides* (Breder) and *A. sp.* Two species, *A. chamensis* (Hildebrand) and *Engraulis clarki* (Hildebrand) have been described from only one and two specimens, respectively. Finally, it is apparent from the data given by Hildebrand (1943) that the various meristic characters of these species are very similar; for example, the number of vertebrae is about 40 to 42 for 12 of the 19 species.

Whatever may be the exact number of anchovies in the Gulf of Panama, Simpson (1959) in his egg study encountered 11 types of anchovy eggs, one of which was identified as the egg of the anchoveta. The other types of eggs were not identified; in fact, there is no direct evidence concerning the identities of the other anchovies which spawn concurrently with the anchoveta. The only evidence available implicates the following species: *Anchovia macrolepidota*, *Anchoa starksi*, *A. panamensis* (Steindachner), *A. curta*, *A. naso*, *A. sp.*, and *Anchoviella balboae*. These anchovies were observed to have maturing gonads during the anchoveta spawning season (Simpson, 1959). Therefore, the problem is to distinguish anchoveta larvae from the larvae of at least 10 other species of anchovies which spawn synchronously in the Gulf of Panama.

The meristic characters of the anchoveta used in this study are those given by Berdegué A. (1958) for specimens from the Gulf of Panama. Extensive meristic studies of this type are not available for the other anchovies in the Gulf. Consequently, the meristic characters of fish from collections from the Eastern Tropical Pacific Ocean (Hildebrand, 1943) and collections from the Gulf of Nicoya (Peterson, 1956) were used, even though it was realized that the range of these counts might not be identical to those of the anchovies of the Gulf of Panama.

The findings of this study, based on customary taxonomic techniques, are presented in the following key, with the qualification regarding the range of meristic characters noted above.

Stage 1: 10 to 15 mm. standard length

Vertebrae 40, 41, or 42 . . .

one of: *Cetengraulis mysticetus*

Anchoa eigenmannia (Meek and Hildebrand)

Anchoa curta

Anchoa starksi

Anchoa naso
Anchoa lucida (Jordan and Gilbert)
Anchoa mundeoloides
Anchoa panamensis
Anchovia rastralis
Anchovia macrolepidota
Anchoviella balboae
Engraulis clarki

Vertebrae not 40, 41, or 42 . . .

one of: *Anchoa spinifer* (Cuvier and Valenciennes)
Anchoa arenicola (Meek and Hildebrand)
Anchoa tropica
Anchoa cbamensis
Anchoa exigua
Anchoa eigenmannia
Anchoa lucida
Anchoviella miarcha (Jordan and Gilbert)
Lycengraulis poeyi (Kner and Steindachner)

Stage 2: 15 to 25 mm. standard length

Vertebrae 40, 41, or 42 and
 anal fin rays 21, 22, 23, 24, or 25 . . .

one of: *Cetengraulis mysticetus*
Anchoa naso
Anchoa curta
Anchoa starksi
Anchoviella balboae
Engraulis clarki

Vertebrae not 40, 41, or 42,
 anal fin rays not 21, 22, 23, 24, or 25 . . .
 one of 13 remaining species

Stage 3: 25 to 30 mm. standard length

Vertebrae 40-42, anal fin rays 21-25, and coiled intestine . . .
Cetengraulis mysticetus

Vertebrae not 40-42, anal fin rays not 21-25,
 and intestine not coiled . . .
 one of 18 remaining species

Stage 4: 30 mm. and longer, standard length

Membrane present across gill isthmus . . .
Cetengraulis mysticetus

No membrane present across gill isthmus . . .
 one of 18 remaining species

Larvae shorter than 15 mm. can be separated into two groups on the basis of the vertebral counts. The anchoveta larvae are present in the group of 12 species which have 40, 41, or 42 vertebrae.

At about 15 mm. the larvae have their full complement of anal fin rays and, by a combination of vertebral and anal fin ray counts, it is possible to divide them into two groups. The anchoveta is one of the several species in the group characterized by 40, 41, or 42 vertebrae together with 21, 22, 23, 24, or 25 anal fin rays.

In the group of fish ranging from 25 to 30 mm., the anchoveta larvae can be separated from the other larvae by a combination of the number of vertebrae and anal fin rays along with the configuration of the intestine (Figure 2). At this stage, the intestine of the anchoveta begins to coil, a feature which distinguishes it from other anchovies (Harder, 1958). In addition, a study of the skeletal structure of the anchoveta revealed the pectoral girdle to be crescent-shaped whereas in the four other meristically similar species (*Anchoa naso*, *A. curta*, *A. starksii*, and *Anchoviella balboae*) the girdle has a more angular shape (Figure 2). This characteristic, while noteworthy, was sufficiently variable to preclude its use for positive differentiation.

Anchoveta larger than 30 mm. can be identified easily by the presence of a thin transparent membrane broadly uniting the gill covers.

The pigmentation patterns in all the larvae studied were so similar as to be useless as a distinguishing characteristic. Typically, newly-hatched anchovy larvae (examined from formalin-preserved material) are almost completely transparent. At a length of about 8 mm. the larvae have a few melanophores in the area bordering the origin of the anal fin. With a further increase in length, a single line of melanophores gradually appears along each side of the body and the opercle, with a scattering of spots on the head.

To determine if a given collection contained larvae which were strikingly different in body proportions from the other larvae present in that collection, regression lines of the various morphometric measurements were fitted. Since, in the few plots examined, visual inspection gave no indication of heterogeneity among the points and, since the morphometric measurements were time-consuming, the technique was abandoned in favor of more promising approaches.

The task of distinguishing anchoveta smaller than 25 mm. in length from those of all other engraulid species in the Gulf of Panama is obviously a complex problem which probably will remain unsolved until some more definitive method of identification is devised. Serological techniques involving yolk and flesh proteins may well be useful in this regard, although at present such techniques are not well developed.

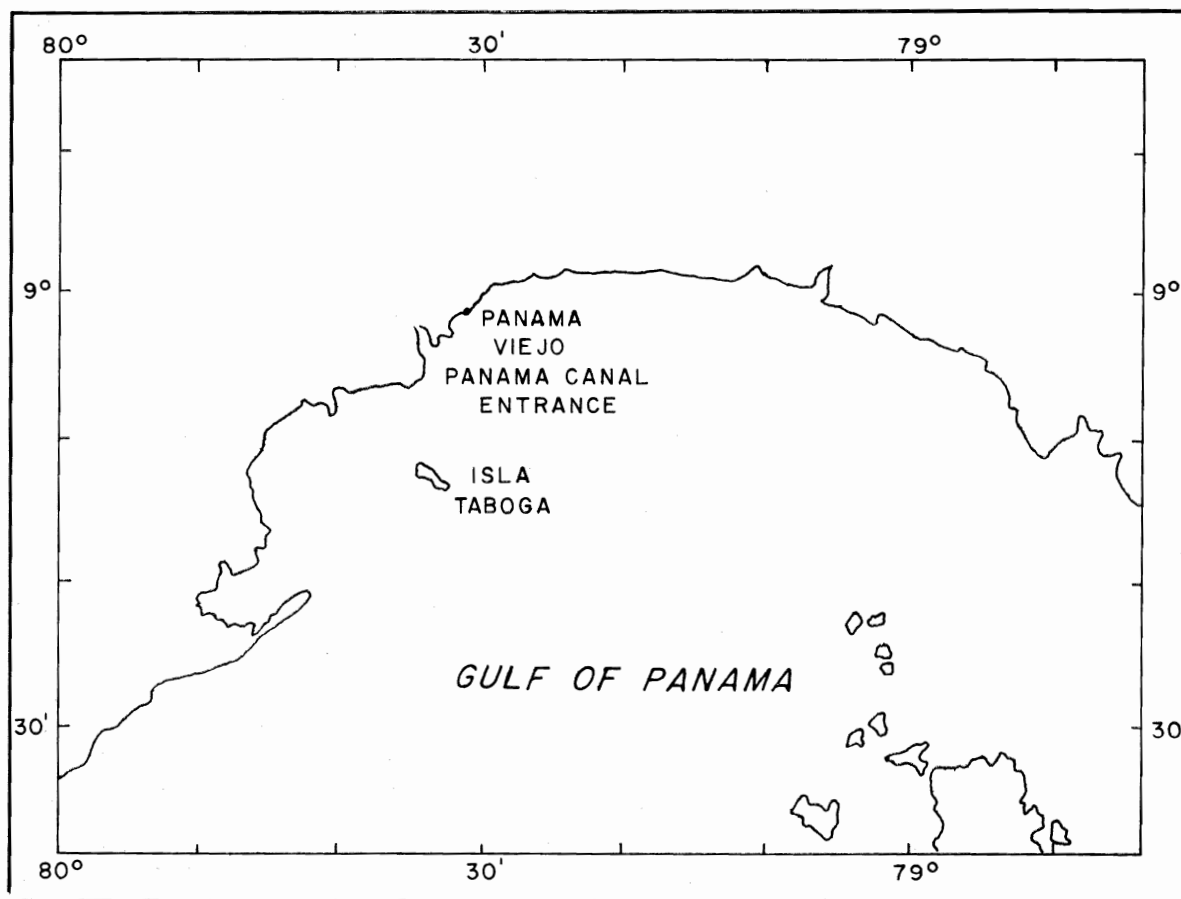


Figure 1. Map showing localities in the Gulf of Panama mentioned in the text.

Figura 1. Mapa que muestra las localidades en el Golfo de Panama que se han mencionado en el texto.

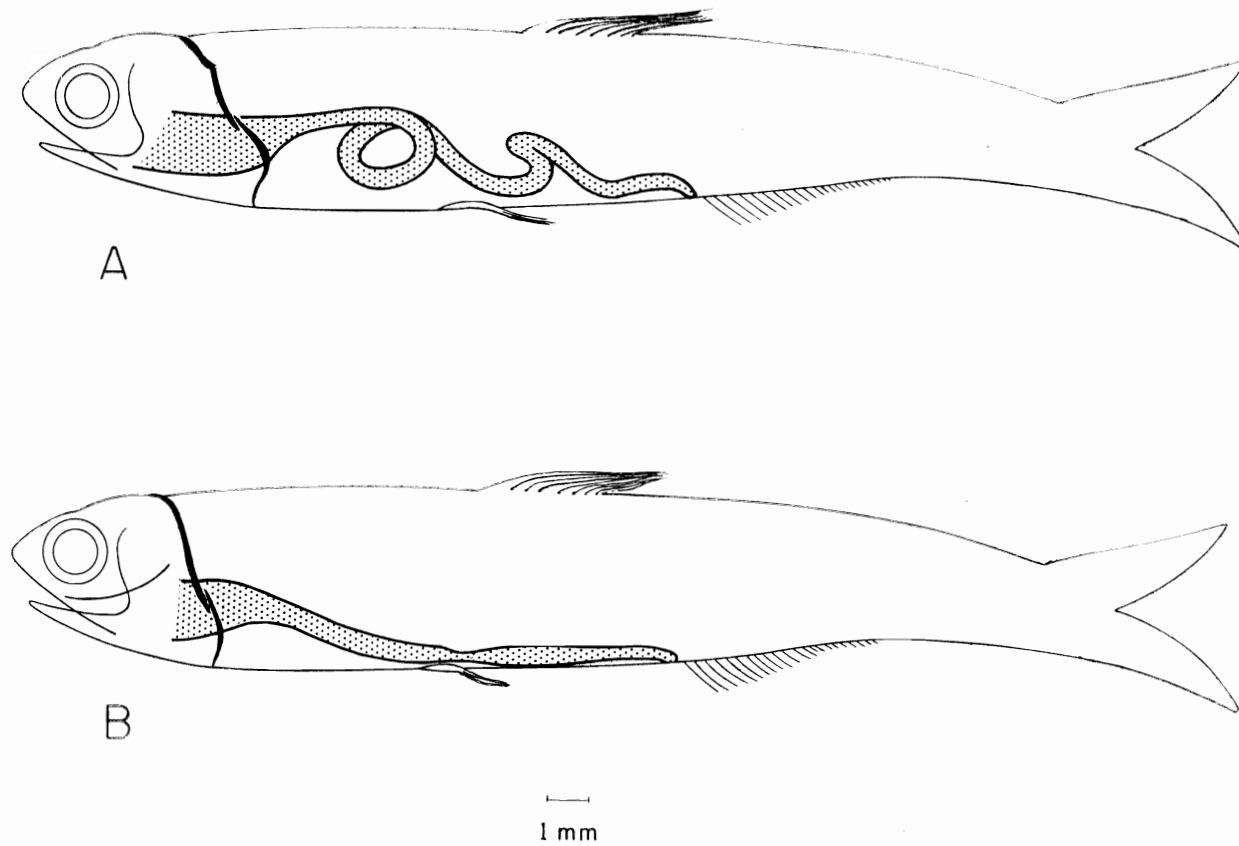


Figure 2. Schematic diagram of the configuration of the intestine and pectoral girdle of an anchoveta (A) and of an anchovy representative of the remaining species from the Gulf of Panama (B); both specimens are 26 mm. long.

Figura 2. Diagrama esquemático de la configuración del intestino y faja pectoral de una anchoveta (A) y de una anchoa representativa de las otras especies del Golfo de Panamá (B); ambos especímenes son de 26 mm. de largo.

FERTILIZACION ARTIFICIAL DE LOS HUEVOS DE LA ANCHOVETA, *CETENGRAULIS MYSTICETUS*, Y CRIANZA E IDENTIFICACION DE SUS LARVAS

por

Edward F. Klima, Izadore Barrett y John E. Kinnear

INTRODUCCION

La anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Günther), es un importante pez de carnada que se emplea en la captura de los atunes en el Océano Pacífico Oriental Tropical. Simpson (1959) logró identificar deductivamente el huevo planctónico de la anchoveta al separarlo de otros diez huevos de anchoas que se encuentran al mismo tiempo, contribuyendo de esta manera a conocer los primeros estados de la historia natural de esta especie en el Golfo de Panamá. El también estableció un criadero en el laboratorio con estos huevos planctónicos y describió las larvas resultantes hasta la edad de 48 horas después de la eclosión. Debido a que no hay diferencias entre las larvas de las anchoas, esta descripción no permite identificar las larvas de la anchoveta de las otras especies de engráulidos. Más aun, a pesar de que los especímenes adultos son fácilmente reconocibles, hasta ahora no ha sido posible identificar la anchoveta juvenil de menos de unos 25 mm. Consecuentemente, el propósito del presente estudio ha sido el de identificar al anchoveta desde el momento de la eclosión hasta que tiene unos 25 mm.

El problema de la identificación fué abordado de dos maneras. Uno de los métodos seguidos fué el de intentar la crianza de larvas en una variedad de condiciones en el laboratorio y en el ambiente natural hasta que alcanzaran un tamaño (más o menos 25 mm.) que permitiera identificarlas definitivamente como anchovetas por sus características físicas, utilizando los huevos planctónicos que se creyeron eran de anchoveta basados en la identificación de Simpson (1959); y, en el proceso, obtener una serie de los estados de desarrollo para su comparación con las larvas de otras anchoas recolectadas en el mar. Sin embargo, antes de que pudieran usarse los huevos planctónicos de la anchoveta en los experimentos de crianza con la confianza absoluta en cuanto a su identificación, fué necesario confirmar la identificación de Simpson (1959) de los huevos de esta especie. En consecuencia, se hicieron experimentos para fertilizar artificialmente huevos de anchoveta. No se intentó estudiar las tasas de mortalidad, ya que el objetivo era solamente criar las larvas hasta el tamaño más grande posible. El otro método fué examinar las larvas de anchoas cogidas antes, durante e inmediatamente después de la estación

de desove de la anchoveta, a fin de identificar y separar las larvas de esta especie de las de las otras anchoas, usando las características numéricas, morfométricas y anatómicas.

El Dr. Milner B. Schaefer y los Sres. Clifford L. Peterson y William H. Bayliff hicieron sugerencias muy útiles y con su crítica constructiva ayudaron en todas las fases del proyecto. Además los Sres. Bayliff y Guillermo G. Gamboa participaron en la ejecución del mismo. Los Sres. John G. Simpson y Gilbert W. Bane hicieron el trabajo preliminar en el estudio de las colecciones de larvas cogidas en el Golfo.

MATERIAL Y METODOS

Fertilización artificial

Se ha destacado la dificultad de obtener peces marinos hembras a punto de desovar (Clark, 1934; Miller, 1952) y ésto ha sido uno de los problemas principales en la fertilización artificial de los huevos de la anchoveta. Gracias al intenso trabajo con redes de arrastre y atarrayas frente a Panamá Viejo (Figura 1) durante noviembre y diciembre de 1958, desde más o menos la 1:30 a las 4:30 de la madrugada, se logró finalmente la captura simultánea de anchovetas macho y hembra, ambas en estado de completa madurez. Estos peces fueron secados con una toalla y, luego, los productos sexuales de cada uno se exprimieron en una vasija plástica de bordes bajos, limpia y seca. Los huevos maduros tenían un color crema pálido semitranslúcido y se movían libremente por los bordes interiores de la vasija. No fué posible exprimir más de una gota o dos de la lecha del espécimen macho; ésta tenía su típica apariencia blanco-cremosa. Se agregó agua de mar, y la mezcla de lecha y ovas fué agitada suavemente para aumentar las oportunidades de fertilización de los huevos. La presencia de huevos flotantes transparentes indicó el buen resultado de la fertilización artificial. Los huevos muertos o no fertilizados tenían una apariencia blanca opaca y se hundían hasta el fondo de la vasija. La fertilización artificial se efectuó aproximadamente a las 3 a.m. Los huevos fueron mantenidos en agua de mar estática contenida en platillos de Petri, en donde la eclosión se operó subsecuentemente después de 19 a 20 horas de la fertilización (10 a 11 p.m.). Se tomaron muestras a intervalos regulares para la comparación con huevos planctónicos y larvas considerados como de anchoveta de acuerdo con la descripción de Simpson (1959).

Crianza de los huevos planctónicos y de las larvas

Los huevos planctónicos de la anchoveta recolectados en el Golfo de Panamá durante las estaciones de desove de 1958 y 1959 fueron el material del que más fácilmente se dispuso para los experimentos de crianza. Estos huevos fueron usados en todos los experimentos, excepto en una serie en 1958 cuando se dispuso de huevos artificialmente fertilizados.

Los huevos planctónicos fueron recolectados en arrastres de 20 minutos hechos a una velocidad de 2 a 3 millas por hora con una red para plancton fabricada con tejido de nylon de 40XXX y 56XXX en el cuerpo y en la bolsa al extremo, respectivamente. Las recolecciones fueron hechas entre las 6 y las 12 a.m. frente a Panamá Viejo, basados en los descubrimientos de Simpson (1959). Los huevos flotantes fueron decantados de la muestra de plancton y llevados al laboratorio en recipientes de un cuarto de galón o de un galón protegidos del sol y contra golpes. Los huevos de la anchoveta fueron separados entonces de los otros huevos con la ayuda de un microscopio binocular y de un micrómetro ocular, usando las dimensiones indicadas por Simpson (1959). En algunos de los primeros experimentos se usaron otros huevos de engráulidos para probar y desarrollar las técnicas de crianza. Durante el curso de los experimentos de crianza se tomaron muestras de huevos y larvas a intervalos regulares. Todas las muestras fueron conservadas en una solución de 4 por ciento de formalina neutra.

Equipo para la crianza

Se emplearon tres métodos básicos en los intentos de criar las larvas en el laboratorio. En uno de ellos se usó agua de mar que recirculaba sometida a irradiación ultravioleta para el control bacterial. Los huevos y las larvas se mantuvieron en pequeñas escudillas plásticas o en acuarios de cristal de 2½ galones, a través de los cuales se hacía circular agua de mar. Para los experimentos de 1958 se usó un segundo método consistente en mantener los huevos y las larvas en platillos de Petri con agua de mar estática que se cambiaba cada 4 a 8 horas. En los experimentos de 1959, los platillos de petri fueron reemplazados por acuarios de 1, 2½ y 15 galones, y el agua no se cambiaba, o se cambiaba lentamente echando gotas de agua recién sacada del mar. Un tercer método consistió en incubar los huevos y criar las larvas en acuarios "balanceados" de diferentes tamaños con agua de mar estática, algas marinas y otras formas de la vida microscópica.

Agua

Para algunos experimentos se obtuvo diariamente agua de la superficie del mar y, ocasionalmente, agua del fondo, del lado del Pacífico del Canal de Panamá y de frente a Panamá Viejo. Atendiendo a una sugerencia del Sr. J. E. Shelbourne, del Fisheries Laboratory, Lowestoft, Inglaterra, para otra serie de experimentos se usó agua de mar acondicionada por un mes o más manteniéndola en garrafones de vidrios o en frascos de batería a los que se agregaba algas del litoral y moluscos que se alimentan por medio de filtros. Según una sugerencia de Oppenheimer (1955), en la mayoría de los experimentos de 1959 se agregó una mezcla de 50 p.p.m. de penicilina y estreptomycinina al agua usada, a fin de aumentar la supervivencia de los huevos.

Salinidad

Algunas veces, las larvas de los clupeidos pueden ser criadas en agua de mar diluída con agua destilada para que alcancen mayores tamaños (comunicación personal del Dr. Reuben Lasker, Bureau of Commercial Fisheries, La Jolla, California). Tanto el agua fresca de mar como el agua acondicionada fueron diluídas con agua destilada para obtener concentraciones que variaban de 5.5 a 33.7 ‰ de salinidad. Se emplearon varias diluciones y mezclas de agua de mar de la superficie y del fondo recientemente recogidas, así como de agua de mar acondicionada. En todos los experimentos se hicieron determinaciones rutinarias de la temperatura, pH y salinidad; cuando fué necesario, se añadió agua destilada a los acuarios para compensar la evaporación.

Temperatura

Las temperaturas medias de la superficie del mar en el Golfo de Panamá varían entre 26° y 28° C. en octubre, noviembre y diciembre, que son los meses del máximo desove de la anchoveta. La temperatura del agua en la mayoría de los experimentos osciló entre 26° y 31° C., lo que se aproxima a la temperatura del medio ambiente de las larvas, y se reguló por la temperatura ambiente del aire en el laboratorio. Para un grupo de experimentos, la temperatura se mantuvo entre 19° y 23° C. por medio del sistema de aire acondicionado para habitaciones.

Presión

Se probó el efecto de la presión en la supervivencia de las larvas, porque Simpson (1959) sugirió que las larvas de la anchoveta se hunden hasta el fondo después de la eclosión. Se usó una olla de presión de un galón para obtener de 15 a 18 libras de presión por pulgada cuadrada, bajo la cual se incubaron los huevos y criaron las larvas mediante el uso de diferentes combinaciones de alimentos, luz y temperatura.

Alimento

No se sabe hasta ahora cuáles son los alimentos naturales de las larvas de la anchoveta; sin embargo, se ha informado que las anchovetas adultas y juveniles se alimentan de diátomos y ocasionalmente de dinoflagelados (Schaefer, 1961). En consecuencia, a las larvas recién nacidas se les dió una variedad de alimentos en la esperanza de que podría encontrarse algo que pudieran comer. Estos alimentos incluyeron fitoplancton en estado natural y cultivado; sangre humana; yema pulverizada de huevos duros; doce preparados comerciales para alimentos de pececillos, entre los que se encuentran los llamados "Infusoria," "Baby Manna" y "Longlife Micro-grain"; cuatro compuestos de vitaminas solubles en agua; microorganismos de levadura seca; y larvas recién nacidas de *Artemia*.

Ambiente natural

El método más obvio de lograr los complejos factores que se necesitan para incubar los huevos de los peces y para la supervivencia y crecimiento subsiguiente de las larvas es el de criarlos en su ambiente natural; ésto fué lo que se intentó con huevos planctónicos. Las recolecciones de plancton que contenían estos huevos se llevaron directamente en embarcaciones a cualquiera de las dos localidades en el Golfo escogidas para los experimentos; una de ellas frente a la Isla Taboga (Figura 1), en donde las anchovetas juveniles se presentan en febrero y marzo; y la otra frente a Panamá Viejo, en donde las anchovetas adultas se encuentran todo el año. Como no era factible usar un microscopio a bordo de la embarcación para escoger los huevos de las anchovetas y separarlos de los de las otras especies, para los experimentos de crianza se usó todo el material planctónico flotante. Sin embargo, el área y el tiempo de la recolección, así como la inspección posterior de las submuestras en el laboratorio indicaron que la mayoría de los huevos empleados en los experimentos eran de anchoveta.

Los huevos y el resto del plancton fueron colocados en una variedad de recipientes, incluyendo redes para fitoplancton y zooplancton, botellas plásticas, frascos de un galón, marcos y cajas de madera cubiertos con tejido de red, modificado cada uno para poder retener los huevos y las larvas y permitir el intercambio del agua de mar y del material alimenticio. Los recipientes fueron mantenidos justo debajo de la superficie o a dos brazas de profundidad.

Ensayos para identificar las larvas de la anchoveta usando las larvas recolectadas en el mar

Las muestras de las larvas que se usaron para intentar la identificación de las larvas de la anchoveta fueron recolectadas en el Golfo de Panamá en 1956, 1957, 1958 y 1959 por el personal de la Comisión del Atún. El medio más efectivo de recolectar las larvas fué el de arrastre de redes modificadas en su extremo con fino tejido de malla de nylon. Además, se hicieron algunas recolecciones arrastrando por la superficie redes para plancton y dinamitando cardúmenes de pequeños peces de superficie. Las larvas medían de 5 a 25 mm. de longitud estándar y se conservaron en formalina neutra al 4 por ciento.

Las muestras de las larvas de anchovas de una colección determinada fueron primero clasificadas por grupos de tamaños. Para buscar las diferencias obvias, se hizo un examen a simple vista de estos grupos; luego se procedió a un examen detallado de cada ejemplar, atendiendo a las siguientes características:

1. Caracteres numéricos (vértebras; radios de las aletas anal, dorsal, pectoral y pélvica)

2. Pigmentación
3. Anatomía (partes suaves y esqueleto)
4. Desarrollo morfológico (grado de osificación y secuencia de la formación de las aletas)
5. Medidas anatómicas (longitud estándar, longitud de la cabeza, diámetro del ojo, altura del pez en la base de la aleta pectoral, longitud desde el hocico hasta el nacimiento de la aleta anal, longitud desde el hocico hasta el nacimiento de la aleta dorsal)

Las larvas empleadas en el estudio de los caracteres numéricos y de la anatomía del esqueleto fueron aclaradas y teñidas según el procedimiento descrito por Clothier (1950). Las medidas morfométricas se hicieron con un micrómetro ocular calibrado, por grupos de 50 larvas que eran tomadas al azar de cada una de las recolecciones hechas con las redes de arrastre.

Además de los estudios de los caracteres numéricos de las larvas, se examinaron detalladamente especímenes juveniles (de 28 a 50 mm.) de *Anchoa naso* (Gilbert y Pierson), de *A. curta* (Jordan y Gilbert), de *A. starksi* (Gilbert y Pierson) y de *Anchoviella balboae* (Jordan y Seale) para buscar los rasgos característicos que pudieran estar también presentes en el estado larval y que consecuentemente sirvieran para diferenciar las larvas de estas cuatro especies de las de la anchoveta, a las que tanto se parecen.

RESULTADOS

Fertilización artificial

El tamaño de los huevos, el tiempo de la eclosión, la tasa del desarrollo embriológico y la apariencia general de las larvas, según la descripción de Simpson con relación a la anchoveta, son las mismas características observadas en el proceso de la fertilización artificial de los huevos de la anchoveta y en la crianza de sus larvas. De allí que fuera posible usar huevos planctónicos de este tamaño y con el mismo tiempo de eclosión para los experimentos de crianza, con la confianza absoluta de que se trataba de huevos de anchoveta.

Crianza de los huevos planctónicos

Los intentos para criar larvas de anchoveta hasta un estado identificable (aproximadamente 25 mm. de longitud estándar) fueron infructuosos en todos los experimentos efectuados tanto en el laboratorio como en el ambiente natural. Las larvas criadas a una temperatura entre 26° y 31° C. vivieron solamente unas 89 horas después de la eclosión (poco después de la absorción del saco vitelino), en tanto que las larvas desarrolladas en agua de 19° a 23° C. vivieron aproximadamente 154 horas después de la eclosión. Sin embargo, no hubo una diferencia aparente en los estados de desarrollo alcanzados por los dos grupos de larvas.

Aparentemente no se encontró diferencia en el tiempo de supervivencia de las larvas criadas en agua de mar fresca y las larvas criadas en agua de mar acondicionada. Las larvas vivieron más tiempo en agua de mar no diluida que en la diluida con agua destilada. En el único experimento proyectado para probar la supervivencia de huevos en agua con o sin antibióticos, mayor número de huevos hicieron eclosión en el agua con antibióticos.

Los intentos para criar las larvas en su ambiente natural, mediante el uso de varios tipos de recipientes, fueron también infructuosos. En la mayoría de estos experimentos, se obstruyó el tejido de la red que se usaba para prevenir la pérdida de los huevos y de las larvas pero que permitía la circulación del agua. Probablemente los huevos no recibieron suficiente oxígeno, y también probablemente se dañaron debido a la agitación de los recipientes por la acción de las olas. En cinco de los seis experimentos en el Golfo no se produjo la eclosión y, en cambio, los huevos hicieron eclosión en casi todos los experimentos del laboratorio.

La alimentación es un factor importante que efecta la transición de los peces de su estado prelarval a su estado postlarval (Vladimirov y Somenov, 1959). Como no se observó que las larvas criadas en estos experimentos ingerían ninguno de los alimentos que se les proporcionaban, se ha llegado a la conclusión de que el problema de encontrar un alimento aceptable es el obstáculo principal para el buen resultado de la crianza de las larvas de la anchoveta. Sin embargo, no puede descontarse completamente la posibilidad de otro factor o factores responsables de la falta de éxito.

Ensayos para identificar las larvas de la anchoveta usando las larvas recolectadas en el mar

Hildebrand (1943) informa sobre la existencia de 19 especies de anchoas en el Golfo de Panamá. La separación de las larvas de la anchoveta de las otras especies se complica con por lo menos tres problemas. Primero, con excepción de la anchoveta, poco se conoce sobre la biología y ecología de los engráulidos del Golfo de Panamá. Segundo, la taxonomía del grupo no ha sido investigada adecuadamente, por lo que ha quedado alguna duda en cuanto al número exacto de especies en existencia. Por ejemplo, Simpson (1959) propone como asunto de sinonimia los casos de la *Anchovia macrolepidota* (Kner y Steindachner) y la *A. rastralis* (Gilbert y Pierson); de la *Anchoa exigua* (Jordan y Gilbert) y la *A. tropica* (Hildebrand); de la *A. mundeoloides* (Breder) y la *A. sp.* Dos especies, *A. chamensis* (Hildebrand) y *Engraulis clarki* (Hildebrand) han sido descritas contando con sólo uno y dos especímenes, respectivamente. Finalmente, según los datos dados por Hildebrand (1943), parece que los diversos caracteres numéricos de estas especies son muy similares; por ejemplo, el número de vértebras es de 40 a 42 en 12 de las 19 especies.

Cualquiera que sea el número exacto de anchoas en el Golfo de Panamá, Simpson (1959), en su estudio de los huevos encontró once tipos de huevos de anchoas, uno de los cuales fué identificado como de la anchoveta. Los otros tipos de huevos no fueron identificados; de hecho, no hay una evidencia directa en lo que concierne a la identidad de las otras anchoas que desovan al mismo tiempo y en las mismas localidades que la anchoveta; la única evidencia disponible implica las siguientes especies: *Anchovia macrolepidota*, *Anchoa starksi*, *A. panamensis* (Steindachner), *A. curta*, *A. naso*, *A. sp.* y *Anchoviella balboae*. Se observó que estas anchoas presentan gónadas en maduración durante la temporada de desove de la anchoveta (Simpson, 1959). En consecuencia, el problema es distinguir las larvas de la anchoveta de las larvas de por lo menos otras diez especies de anchoas que desovan al mismo tiempo en el Golfo de Panamá.

Los caracteres numéricos de la anchoveta usados en este estudio son los dados por Berdegué A. (1958) para los especímenes del Golfo de Panamá. No se dispone de amplios estudios de esta clase sobre otras anchoas del Golfo; en consecuencia, se usaron los caracteres numéricos de los pescados de las colecciones del Océano Pacífico Oriental Tropical (Hildebrand, 1943) y del Golfo de Nicoya (Peterson, 1956), aún cuando se tuvo en cuenta que la amplitud de estas medidas podría no ser idéntica a las de las anchoas del Golfo de Panamá.

Los descubrimientos de este estudio, basados en las técnicas taxonómicas usuales, se presentan en la siguiente clave con la calificación anotada más arriba sobre la amplitud de los caracteres numéricos:

Estado 1: 10 a 15 mm. de longitud estándar

Con 40, 41 ó 42 vértebras . . .

puede ser: *Cetengraulis mysticetus*
Anchoa eigenmannia (Meek y Hildebrand)
Anchoa curta
Anchoa starksi
Anchoa naso
Anchoa lucida (Jordan y Gilbert)
Anchoa mundeoloides
Anchoa panamensis
Anchovia rastralis
Anchovia macrolepidota
Anchoviella balboae
Engraulis clarki

Con vértebras que no suman 40, 41 ó 42 . . .

puede ser: *Anchoa spinifer* (Cuvier y Valenciennes)
Anchoa arenicola (Meek y Hildebrand)
Anchoa tropica
Anchoa chamensis

Anchoa exigua
Anchoa eigenmannia
Anchoa lucida
Anchoviella miarcha (Jordan y Gilbert)
Lycengraulis poeyi (Kner y Steindachner)

Estado 2: 15 a 25 mm. de longitud estándar

Con 40, 41 ó 42 vértebras y con 21, 22, 23, 24 ó 25
 radios de la aleta anal . . .

Puede ser: *Cetengraulis mysticetus*

Anchoa naso
Anchoa curta
Anchoa starksi
Anchoviella balboae
Engraulis clarki

Con vértebras que no suman 40, 41 ó 42, y con radios
 de la aleta anal que no suman 21, 22, 23, 24 ó 25 . . .

Puede ser: una de las 13 especies restantes

Estado 3: 25 a 30 mm. de longitud estándar

Con 40-42 vértebras, 21-25 radios de la aleta anal,
 e intestino enrollado . . .

Cetengraulis mysticetus

Con vértebras que no suman 40-42, con radios de la aleta anal
 que no suman 21-25, y el intestino no enrollado . . .

Puede ser: una de las 18 especies restantes

Estado 4: 30 mm. y mayor longitud estándar

Con membrana a través del istmo de las agallas . . .

Cetengraulis mysticetus

Sin la membrana a través del istmo de las agallas . . .

Puede ser: una de las 18 especies restantes

Sobre la base del número de vértebras, las larvas de menos de 15 mm.
 pueden ser separadas en dos grupos. Las larvas de la anchoveta están
 en el grupo de las 12 especies que tienen 40, 41 ó 42 vértebras.

Cuando alcanzan unos 15 mm., las larvas tienen todos los radios de
 su aleta anal y, mediante la combinación del número de vértebras y del
 número de radios, es posible dividir las en dos grupos. La anchoveta es
 una de las varias especies en el grupo caracterizado por 40, 41 ó 42
 vértebras, junto con 21, 22, 23, 24 ó 25 radios en la aleta anal.

En el grupo de peces que miden de 25 a 30 mm., las larvas de la
 anchoveta pueden ser separadas de las otras larvas tomando en cuenta

una combinación del número de vértebras y de los radios de la aleta anal y la configuración del intestino (Figura 2). En este estado de su vida, el intestino de la anchoveta comienza a enrollarse, característica que la distingue de las otras anchoas (Harder, 1958). Además, un estudio de la estructura del esqueleto de la anchoveta reveló que la faja pectoral tiene forma de cuarto creciente, mientras que en las otras cuatro especies similares en sus caracteres numéricos (*Anchoa naso*, *A. curta*, *A. starksi* y *Anchoviella balboae*), la faja tiene una forma más angular (Figura 2). Esta característica, aunque notable, es suficientemente variable como para no poder usarla al tratar de hacer una diferenciación positiva.

La anchoveta de más de 30 mm. puede ser identificada fácilmente por la presencia de una membrana delgada y transparente que une ampliamente las agallas.

Los patrones de pigmentación en todas las larvas estudiadas fueron muy similares y no podían usarse como característica distintiva. Típicamente, las larvas de las anchoas recién nacidas (examinadas del material conservado en formalina) son casi por completo transparentes. Cuando alcanzan una longitud de alrededor de 8 mm., las larvas tienen unos pocos melanóforos en el área limítrofe del nacimiento de la aleta anal. Al aumentar su longitud, aparece gradualmente una línea de melanóforos a lo largo de cada lado del cuerpo y del opérculo, así como unos melanóforos dispersos en la cabeza.

Para determinar si una colección cualquiera contenía larvas que fueran notoriamente diferentes en sus proporciones anatómicas de las de las otras larvas de la misma colección, se ajustaron líneas de regresión de las diversas mediciones morfométricas. Como en los pocos gráficos examinados, la inspección visual no dió indicación de heterogeneidad entre los puntos, y como las mediciones morfométricas tomaban mucho tiempo, esta técnica fué abandonada para dar lugar a métodos más prometedores.

La tarea de distinguir las anchovetas con una longitud de menos de 25 mm., de todas las otras especies de engráulidos en el Golfo de Panamá, constituye sin duda un problema complejo que probablemente continuará sin resolverse hasta que no se logre algún método de identificación más definitivo. Las técnicas serológicas que involucran las proteínas del saco vitelino y de los músculos, bien pueden servir para este propósito, a pesar de que tales técnicas no están bien desarrolladas.

LITERATURE CITED — BIBLIOGRAFIA

Berdegúe A., Julio

- 1958 Biometric comparison of the anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Günther), from ten localities of the Eastern Tropical Pacific Ocean.
Inter-Amer. Trop. Tuna Comm., Bull., Vol. III, No. 1, pp. 1-53 (English), pp. 54-76 (Spanish).

Clark, F. N.

- 1934 Maturity of the California sardine (*Sardina caerulea*), determined by ova diameter measurements.
Calif. Fish and Game Comm., Fish Bull., No. 42, 49 pp.

Clothier, C. R.

- 1950 A key to some southern California fishes based on vertebral characters.
Calif. Fish and Game Comm., Fish Bull., No. 79, 83 pp.

Harder, Wilhelm

- 1958 The intestine as a diagnostic character in identifying certain clupeoids (Engraulidae, Clupeidae, Dussumieriidae) and as a morphometric character for comparing anchoveta (*Cetengraulis mysticetus*) populations.
Inter-Amer. Trop. Tuna Comm., Bull., Vol. II, No. 8, pp. 365-380 (English), pp. 381-388 (Spanish).

Hildebrand, S. F.

- 1943 A review of the American anchovies (Family Engraulidae).
Bull. Bingham oceanogr. Coll., Vol. VIII, Art. 2, 165 pp.

Miller, D. J.

- 1952 Development through the prolarval stage of artificially fertilized eggs of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*).
Calif. Fish and Game, Vol. 38, No. 4, pp. 587-595.

Oppenheimer, C. H.

- 1955 The effect of marine bacteria on the development and hatching of pelagic fish eggs, and the control of such bacteria by antibiotics.
Copeia, 1955, No. 1, pp. 43-49.

Peterson, C. L.

- 1956 Observations on the taxonomy, biology and ecology of the engraulid and clupeid fishes in the Gulf of Nicoya, Costa Rica.
Inter-Amer. Trop. Tuna Comm., Bull., Vol. I, No. 5, pp. 137-212 (English), pp. 213-280 (Spanish).

Schaefer, M. B.

- 1961 Report on the investigations of the Inter-American Tropical Tuna Commission for the year 1960.
Inter-Amer. Trop. Tuna Comm., Ann. Rept. 1960, pp. 40-107
(English), pp. 108-183 (Spanish).

Simpson, J. G.

- 1959 Identification of the egg, early life history and spawning areas of the anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Günther), in the Gulf of Panama.
Inter-Amer. Trop. Tuna Comm., Bull., Vol. III, No. 10, pp. 437-538
(English), pp. 539-580 (Spanish).

Vladimirov, V. L., and K. I. Somenov

- 1959 A critical period in the development of fish larvae.
C. R. Acad. Sci. U. R. S. S., Vol. 126, pp. 663-666.