

NOTA

EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LA LONGITUD DE LARVAS DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*)*

por

MARINA V. DIAZ^{1,2}, EZEQUIEL LEONARDUZZI¹ y PAOLA BETTI¹

¹Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP),
Paseo Victoria Ocampo N° 1, Escollera Norte, B7602HSA - Mar del Plata, Argentina
correo electrónico: mdiaz@inidep.edu.ar

²Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), Universidad Nacional de Mar del Plata
(UNMdP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

SUMMARY

Freezing effect on *Merluccius hubbsi* larvae length. Studies on the effect of freezing on the length of *Merluccius hubbsi* larvae from the southern stock and conversion equations between pre and post preservation measurements were performed.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la congelación sobre la longitud de larvas de *Merluccius hubbsi* provenientes del stock sur y se confeccionaron ecuaciones de conversión entre mediciones pre y postpreservación.

Key words: Preservation, shrinkage, hake larvae, *Merluccius hubbsi*.

Palabras clave: Preservación, encogimiento, larvas de merluza, *Merluccius hubbsi*.

Durante los últimos años de la década de los noventa la biomasa desovante de *Merluccius hubbsi* disminuyó en forma drástica, lo cual fue atribuido principalmente al incremento de la presión pesquera ejercida sobre este recurso durante los años previos (Aubone *et al.*, 2000). Históricamente, la actividad reproductiva de este conjunto ha tenido lugar en inmediaciones de Isla Escondida (43° 30' S-44° S y 65° W), principalmente

entre noviembre y abril con un máximo en diciembre y enero (Ehrlich, 1998; Macchi, *et al.*, 2004, 2007). A partir de 1998 comenzaron a detectarse variaciones en el patrón reproductivo del efectivo patagónico de esta especie, que sugerían el desplazamiento de los reproductores hacia sectores más alejados de la costa y una disminución en la densidad de las concentraciones (Ehrlich *et al.*, 2000; Macchi *et al.*, 2010).

*Contribución INIDEP N° 1932

Debido a estos cambios poblacionales producidos por la sobrepesca, se han intensificado los estudios sobre diferentes aspectos de la biología de los adultos. Sin embargo, los estudios sobre los primeros estadios de desarrollo son escasos. Recientemente se han comenzado a realizar estudios de edad y crecimiento larval, condición nutricional y dieta de las larvas de merluza (Brown *et al.*, 2004; Temperoni y Viñas, 2013; Diaz *et al.*, 2013) empleando para ello material congelado.

Es ampliamente conocido que las técnicas de fijación y preservación producen cambios en la longitud, peso y calidad de las larvas de peces, ocasionando la necesidad de realizar correcciones para convertir las variables registradas sobre el material fijado a las correspondientes a las larvas frescas. Diversos estudios se han concentrado en los cambios producidos por la fijación en formol y alcohol (Kristoffersen y Salvanes, 1998; Fey, 1999; Cunningham *et al.*, 2000; Fey y Hare, 2005) demostrando que los fijadores producen una reducción en la longitud de las larvas, cuya magnitud depende de la especie en estudio, del tiempo que han permanecido en el fijador y de la longitud inicial de los ejemplares al momento de la fijación. Estos autores observaron que las larvas más pequeñas presentan mayores porcentajes de encogimiento en comparación con las más grandes y, por otra parte, la mayor proporción del encogimiento se da durante los primeros 15 días de la fijación, llegando a una asíntota a lo largo del tiempo. Por otra parte, las larvas fijadas en alcohol se encogen en mayor proporción que aquellas fijadas en formol.

Los estudios que consideran los cambios ocasionados por la congelación son más escasos (Fowler y Smith, 1983; Hjörleifsson y Klein-MacPhee, 1992; Buchheister y Wilson, 2005). En general, el encogimiento promedio por congelación resulta menos importante que lo observado empleando otros fijadores. Fowler y Smith (1983) estudiaron los efectos de la congelación empleando larvas de *Merluccius bilinearis* y observaron grandes variaciones de las longitudes

de los ejemplares, ya que algunos se encogieron y otros se expandieron. En particular, para *M. hubbsi*, no se dispone hasta el momento de información sobre los efectos de los diferentes fijadores sobre la longitud de las larvas.

Usualmente en el trabajo a bordo no es posible realizar mediciones del material fresco previo a su fijación. Debido a la necesidad de utilizar la talla de los ejemplares para estudios ecológicos o fisiológicos; o bien para comparar material colectado en el mar con material criado en laboratorio, se hace indispensable contar con ecuaciones de conversión entre mediciones pre y postpreservación. Dado que las larvas empleadas en estudios de condición nutricional, dieta y edad son actualmente fijadas y conservadas por congelación, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la congelación sobre la longitud estándar de las larvas de la merluza provenientes del *stock* sur de la especie y brindar ecuaciones de conversión entre mediciones pre y postpreservación.

El material utilizado proviene de la Campaña "Evaluación de juveniles y desovantes del efectivo sur de merluza durante enero de 2011" (OB-01/2011) realizada por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) durante el mes de enero, la cual coincide con el período reproductivo de esta especie.

Para la recolección del ictioplancton se llevaron a cabo arrastres horizontales con muestreadores RMT (*rectangular midwater trawl*) y MEB (muestreador epibentónico), dirigidos a la posición de la marca acústica, detectada por la ecosonda EK-500, con ciertas características propias de larvas de merluza. Esta técnica se basa en la reverberación acústica generada principalmente por la vejiga natatoria de las larvas, la cual se encuentra presente en ejemplares de 3 mm de longitud y es funcional a partir de los 4 mm (Álvarez-Colombo *et al.*, 2011). La presencia de agregaciones de larvas de merluza se determinó a partir de los ecogramas a 38 kHz, mientras que los ecogramas a otras frecuencias se emplearon para discriminar larvas de otros tipos de dispersores, dada su res-

puesta distintiva a cada frecuencia. Cuando estos eco-registros se ubicaron alejados del fondo, se utilizó el muestreador RMT, provisto de mallas de 500 micrones, maniobras realizadas a una velocidad aproximada de 3,0 nudos. En el caso en que el registro acústico de larvas de merluza se encontró en contacto estrecho con el fondo, se empleó un MEB. Este equipo se desliza directamente sobre el lecho marino, siendo arrastrado a una velocidad de 2,5 nudos.

Las larvas de merluza ($N = 40$) fueron separadas a bordo, fotografiadas y fijadas inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Con el objeto de minimizar los procesos degradativos sufridos por las larvas, los tiempos de recolección y manipulación de las muestras fueron reducidos al mínimo. Los arrastres realizados para la recolección de las muestras fueron cortos, con una duración aproximada de 2 min y el tiempo de manipulación de las muestras previo a la congelación de las larvas menor a 10 min. Posteriormente las larvas fotografiadas fueron medidas en el laboratorio empleando el *software* Axio Vision de Carl Zeiss. Se registró la longitud estándar (LS) sobre la fotografía tomada el día de la recolección del material, o longitud estándar inicial (LS_i) y 64 días después se procedió a descongelar, fotografiar y medirlas nuevamente empleando una lupa binocular, registrándose nuevamente la longitud estándar final (LS_f) y el diámetro del ojo (DO).

Las mediciones fueron expresadas en milímetros, micrones o en porcentaje de encogimiento ($\%Enc$) definido de acuerdo con la ecuación 1 (Fowler y Smith, 1983):

$$\%Enc = \left(1 - \frac{LS_f}{LS_i}\right) \times 100 \quad (1)$$

donde:

LS_f : longitud estándar final, luego de 64 días de congelación;

LS_i : longitud estándar inicial, previo a la fijación.

Las larvas recolectadas empleando ambos muestreadores (RMT y MEB) fueron utilizadas en conjunto ya que no se registraron diferencias significativas en las tallas medias ni en el porcentaje de encogimiento ($P > 0,05$).

Finalmente se formularon las ecuaciones de conversión de mediciones pre y postpreservación. Las mismas permitirán convertir una longitud estándar o diámetro del ojo de una larva preservada por congelación a su correspondiente longitud estándar en vivo, es decir, previo a la congelación.

Se estimó un 1,2% de encogimiento promedio del LS de las larvas por congelación luego de 64 días de preservación, para larvas de entre 4,2 y 33 mm. Este valor proviene de los cambios de talla sufridos por las larvas que se encontraron de un rango de -20,52% (expansión) a 19,30% (encogimiento). Considerando únicamente las larvas menores a 13 mm se observó una expansión promedio del 1,19%. Resultados similares se observaron por Fowler y Smith (1983) empleando larvas de *M. bilinearis*, quienes observaron un 1,4% de encogimiento promedio, con valores entre -29,9 y 26,5% para larvas de entre 4,6 y 41 mm luego de 338 días de fijación por congelación.

Los tejidos de los peces contienen entre un 60 y un 80% de agua, dependiendo de las especies. Durante la congelación, el agua contenida en los tejidos se convierte en hielo. La transición a estado sólido y la formación de cristales de agua podría perturbar y destruir el tejido muscular. Debido al aumento del volumen del agua en estado sólido las células musculares pueden expandirse o bien romperse. La ruptura de las células podría producir una importante pérdida de fluidos al descongelarse (Johnston *et al.*, 1994). Este incremento del volumen celular con posibles rupturas podría explicar las variaciones observadas en las tallas de los ejemplares antes y después de la congelación, pudiendo registrarse una expansión o un encogimiento de las mismas.

En este estudio se observó gran variabilidad del encogimiento en las larvas menores de 13 mm, observándose tanto larvas con un 20% de expansión como con un 14% de encogimiento (Figuras 1 y 2). En la Figura 2 se puede ver en más detalle la gran variabilidad observada en las larvas más pequeñas. Por el contrario, en las larvas mayores de 13 mm no se observó dicha variabilidad y sólo se determinó encogimiento. Con estos resultados se podría proponer una transición desde la expansión hacia el encogimiento con el incremento de la talla, una tendencia opuesta a lo observado por Fowler y Smith (1983). Debido a que probablemente el pequeño número de larvas de longitudes mayores sea el responsable de esta conclusión, se necesitan realizar más estudios con un mayor número de larvas grandes para confirmar los resultados.

A pesar de la variabilidad observada del efecto de la fijación en nitrógeno líquido sobre la longitud de las larvas, se determinaron las ecuaciones para realizar la corrección postfijación (Figuras 3 y 4).

Buchheister y Wilson (2005) observaron que los efectos de la congelación sobre la longitud de las larvas no varían con el tiempo, aconsejando realizar estudios de encogimiento al menos un mes después de la fijación. Fowler y Smith (1983) sugieren esperar al menos 50 días para realizar mediciones, por lo tanto se decidió preservar durante dos meses el material antes de realizar este estudio de encogimiento. Sin embargo, se necesita un estudio especialmente diseñado para responder esa pregunta en esta especie en particular, para garantizar así que las modificaciones en la talla han alcanzado una asíntota en el período de tiempo transcurrido.

A pesar de que algunos estudios indican que la congelación no debería ser utilizada debido a la variabilidad que produce en los cambios de longitud (Fowler y Smith, 1983; Glenn y Mathias, 1987), este tipo de fijación es imprescindible en determinaciones bioquímicas, por tanto las ecuaciones aquí presentadas son esenciales para estudios futuros sobre las larvas de *M. hubbsi*. Tam-

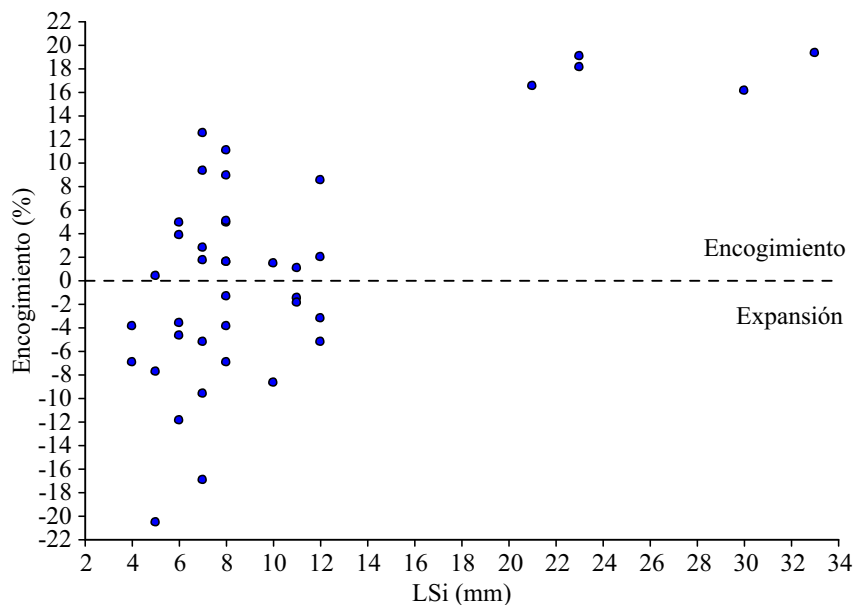


Figura 1. Porcentaje de encogimiento de las larvas de merluza debido a la congelación en función de la talla inicial de los ejemplares (LSi). Los valores positivos indican encogimiento y los negativos expansión. Las larvas fueron congeladas durante 64 días.
 Figure 1. Percentage of hake larvae shrinkage due to freezing as a function of the initial size of specimens (LSi). The positive values indicate shrinkage and the negative expansion. Larvae were frozen during 64 days.

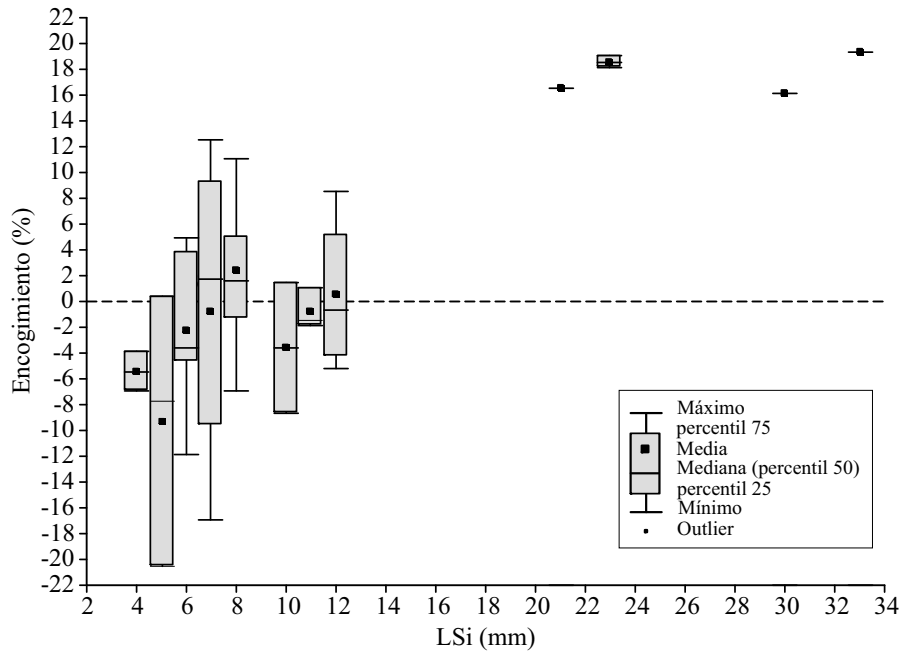


Figura 2. Gráfico *box plot* del porcentaje de encogimiento de las larvas de merluza debido a la congelación, por clase de talla, en función de la talla inicial de los ejemplares (LSi). Los valores positivos indican encogimiento y los negativos expansión. Las larvas fueron congeladas durante 64 días.

Figure 2. *Box plot graph* of the percentage of hake larvae shrinkage due to freezing, per size class, as a function of the initial size class of specimens (LSi). The positive values indicate shrinkage and the negative expansion. Larvae were frozen during 64 days.

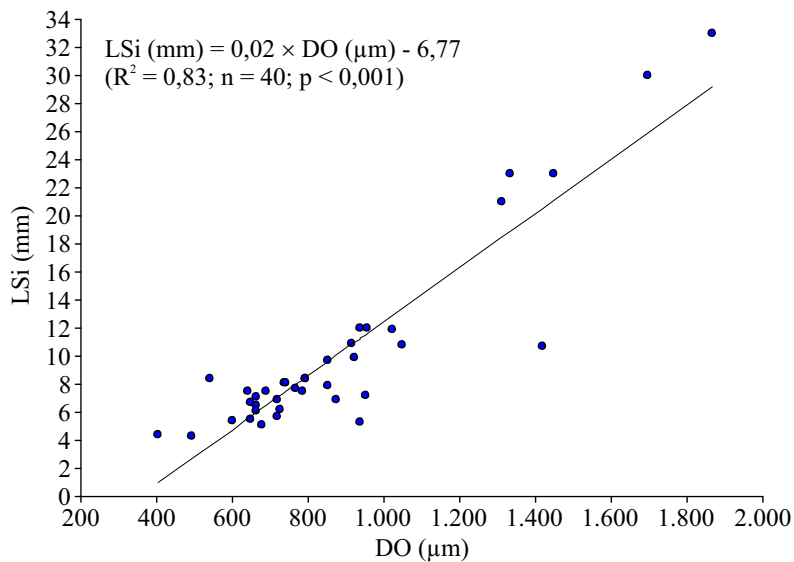


Figura 3. Longitud estándar inicial (LSi) de las larvas de merluza en función del diámetro del ojo (DO) luego de 64 días de congelación.

Figure 3. Initial standard length (LSi) of hake larvae as a function of the eye diameter (DO) after 64 days of freezing.

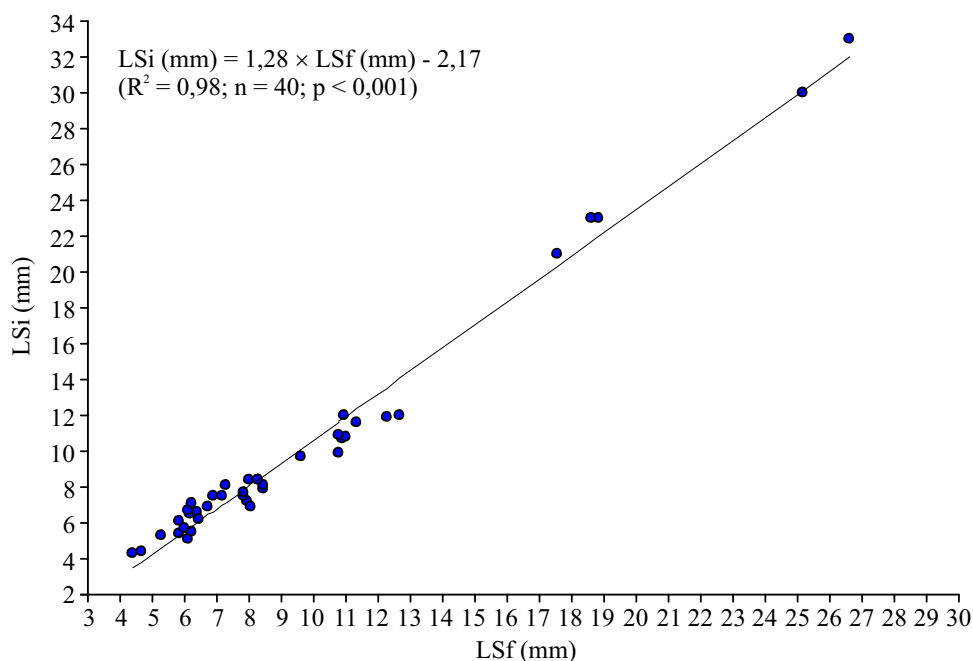


Figura 4. Longitud estándar inicial (LSi) de las larvas de merluza en función de la longitud estándar final (LSf) luego de 64 días de congelación.

Figure 4. Initial standard length (LSi) of hake larvae as a function of the final standard length (LSf) after 64 days of freezing.

bién es necesario analizar el efecto de otros fijadores como el alcohol y el formol para completar las curvas de corrección de mediciones pre y postfijación de las larvas de merluza.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud al personal perteneciente al Proyecto “Reclutamiento del Efectivo Patagónico de merluza” por todo tipo de colaboración brindada durante las campañas de investigación y el procesamiento del material empleado, especialmente a Gustavo Macchi y Gabriela Irusta por la lectura y corrección del manuscrito; a las autoridades del INIDEP y al personal embarcado. Finalmente, agradecemos a los revisores por sus amables contribuciones para mejorar este manuscrito. Este trabajo ha sido financiado por el INIDEP y por el CONICET PIP 11220080100815.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ-COLOMBO, G., DATO, C., MACCHI, G., PALMA, E., MACHINANDIARENA, L., CHRISTIANSEN, E., BETTI, P., MARTOS, P., CASTROMACHADO, F., BROWN, D., EHRLICH, M.D., MIANZAN, H. & ACHA, E.M. 2011. Distribution and behaviour of Argentine hake larvae: evidences of a biophysical mechanism for self-recruitment at the North Patagonian shelf waters. *Cienc. Mar.*, 37 (4 B): 633-657.
- AUBONE, A., BEZZI, S., CASTRUCCI, R., DATO, C., IBAÑEZ, P., IRUSTA, G., PÉREZ, M., RENZI, M., SANTOS, B., SCARLATO, N., SIMONAZZI, M., TRINGALI, L. & VILLARINO, F. 2000. Merluza (*Merluccius hubbsi*). En: BEZZI, S.I., AKSELMAN, R. & BOSCHI, E.E. (Eds.). Síntesis del estado de las pesquerías marítimas argentinas y de la Cuenca del Plata. Años 1997-1998, con

- una actualización de 1999. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, 388 pp.
- BROWN, D.R., LEONARDUZZI, E. & MACHINANDI-ARENA, L. 2004. Age, growth and mortality of hake larvae (*Merluccius hubbsi*) in the north Patagonian shelf. *Sci. Mar.*, 68: 273-283.
- BUCHHEISTER, A. & WILSON, M.T. 2005. Shrinkage correction and length conversion equations for *Theragra chalcogramma*, *Mallotus villosus* and *Thaleichthys pacificus*. *J. Fish Biol.*, 67: 541-548.
- CUNNINGHAM, M.K., GRANBERRY, W.F.J. & POPE, K.L. 2000. Shrinkage of inland silverside larvae preserved in ethanol and formalin. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 20: 816-818.
- DÍAZ, M.V., OLIVAR, M.P. & MACCHI, G.J. 2013. Larval condition of *Merluccius hubbsi* (Marini, 1933) in the northern Patagonian spawning ground. *Fish. Res.*, 160: 60-68.
- EHRlich, M.D. 1998. Los primeros estadios de vida de la merluza *Merluccius hubbsi*, Marini 1933, en el Mar Argentino como aporte al conocimiento de su reclutamiento y estructura poblacional. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 318 pp.
- EHRlich, M.D., MARTOS, P., MADIROLAS, A. & SÁNCHEZ, R.P. 2000. Causes of spawning pattern variability of anchovy and hake on the Patagonian shelf. ICES Council Meeting papers. Copenhagen, N:06, 13 pp.
- FEY, D.P. 1999. Effects of preservation technique on the length of larval fish: methods of correcting estimates and their implication for studying growth rates. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 47: 17-29.
- FEY, D.P. & HARE, J.A. 2005. Length correction for larval and early-juvenile Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) after preservation in alcohol. *Fish. Bull.*, 103: 725-727.
- FOWLER, G.M. & SMITH, S.J. 1983. Length Changes in Silver Hake (*Merluccius bilinearis*) Larvae: Effects of Formalin, Ethanol, and Freezing. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 866-870.
- GLENN, C.L. & MATHIAS, J.A. 1987. Body shrinkage in young walleye, *Stizostedion vitreum*, preserved with AFA, formalin, ethanol and quick freezing. *Can. Field-Nat.*, 101: 408-414.
- HJÖRLEIFSSON, E. & KLEIN-MACPHEE, G. 1992. Estimation of live standard length of winter flounder *Pleuronectes americanus* larvae from formalin-preserved, ethanol-preserved and frozen specimens. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82: 13-19.
- KRISTOFFERSEN, J.B.K. & SALVANES, A.G.V. 1998. Effects of formaldehyde and ethanol preservation on body and otoliths of *Maurolicus muelleri* and *Benthosema glaciale*. *Sarsia*, 83: 95-102.
- JOHNSTON, W.A., NICHOLSON, F.J., ROGER, A. & STROUD, G.D. 1994. Freezing and refrigerated storage in fisheries. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 340, 143 pp.
- MACCHI, G.J., PÁJARO, M. & DATO, C. 2007. Spatial variations of the Argentine hake (*Merluccius hubbsi*) spawning shoals in the Patagonian area during a reproductive season. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.*, 42 (3): 345-356.
- MACCHI, G.J., PÁJARO, M. & EHRlich, M.D. 2004. Seasonal egg production pattern of the Patagonian stock of Argentine hake (*Merluccius hubbsi*). *Fish. Res.*, 67: 25-38.
- MACCHI, G.J., MARTOS, P., RETA, R. & DATO, C. 2010. Offshore spawning of the Argentine hake (*Merluccius hubbsi*) Patagonian stock. *Pan. Am. J. Aquat. Sci.*, 5(1): 22-35.
- TEMPERONI, B. & VIÑAS, M.D. 2013. Food and feeding of Argentine hake (*Merluccius hubbsi*) larvae in the Patagonian nursery ground. *Fish. Res.*, 148: 47-55.

Recibido: 10-07-2014

Aceptado: 08-04-2015