


Descripción de la morfología de los otolitos lapillus, sagitta y asteriscus del caballito de mar *Hippocampus ingens* (Girard 1858) de una muestra incautada en Perú


Morphological description of the lapillus, sagitta, and asteriscus otoliths of the seahorse *Hippocampus ingens* (Girard 1858) from a seized sample in Peru

Analucía Alarco

 0000-0002-7732-7744

alarcoanalucia@gmail.com

Sonia Valle-Rubio

 0000-0001-9019-1100

svalle@cientifica.edu.pe

1. Grupo de Investigación Comunidades Acuáticas, Carrera de Biología Marina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.
2. Grupo de Investigación Comunidades Acuáticas, Carrera de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

Recibido / Received: 29/04/2024

Aceptado / Accepted: 26/06/2025

Citación / Citation: Alarco, A.; Valle-Rubio, S. 2026. Morphological description of the lapillus, sagitta, and asteriscus otoliths of the seahorse *Hippocampus ingens* (Girard 1858) from a seized sample in Peru. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 55(2): 82-100.

RESUMEN

El caballito de mar del Pacífico (*Hippocampus ingens*) está clasificado como especie vulnerable debido a la degradación del hábitat, la captura incidental y la sobreexplotación. Comprender su biología es clave para una gestión eficaz. Los otolitos proporcionan información valiosa sobre la historia de vida de los peces. Este estudio desarrolló una metodología para extraer e identificar los tres pares de otolitos—*lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*—a partir de especímenes secos, así como para describir su morfología y morfometría. Todos los otolitos fueron recuperados exitosamente de la cavidad craneal. Sus formas variaron entre tetraédricas y ovaladas y ninguno superó los 500 µm de longitud. No se encontraron diferencias significativas en tamaño o forma entre otolitos izquierdos y derechos; sin embargo, se observaron diferencias entre los distintos tipos de otolitos. Debido a la ausencia de diferencias bilaterales significativas, los datos se agruparon por tipo de otolito para los análisis posteriores. Los modelos de regresión entre la longitud total del cuerpo (LT) y la longitud del otolito (LO) indicaron que el *asteriscus* presentó la mayor correlación ($R^2 = 0.557$), seguido por la *sagitta* ($R^2 = 0.369$) y el *lapillus* ($R^2 = 0.373$). Estos resultados destacan el potencial de los otolitos provenientes de especímenes secos para analizar las relaciones de tamaño pez–otolito y respaldan su uso en estudios de *H. ingens* y otros Syngnathidae. Este estudio constituye la primera descripción de los tres pares de otolitos en *Hippocampus ingens*.

Palabras clave: otolitos microscópicos; extracción de otolitos; relaciones pez–otolito; análisis morfométrico; muestras biológicas secas

ABSTRACT

The Pacific seahorse (*Hippocampus ingens*) is classified as a vulnerable species due to habitat degradation, bycatch, and overexploitation. Understanding its biology is essential for effective management. Otoliths provide valuable life-history information. This study developed a methodology to extract and identify the three otolith pairs—*lapillus*, *sagitta*, and *asteriscus*—from dried specimens, and to describe their morphology and morphometry. All otoliths were successfully recovered from the cranial cavity. Their shapes ranged from tetrahedral to oval, and none exceeded 500 µm in length. No significant differences in size or shape were found between left and right otoliths; however, differences were observed among otolith types. Because no bilateral differences were detected, data were pooled by otolith type for subsequent analyses. Regression models between total length (TL) and otolith length (OL) indicated that the *asteriscus* showed the highest correlation ($R^2 = 0.557$), followed by the *sagitta* ($R^2 = 0.369$) and *lapillus* ($R^2 = 0.373$). These results highlight the potential of otoliths obtained from dried specimens to analyze fish–otolith size relationships and support their use in studies of *H. ingens* and other Syngnathidae. This study constitutes the first description of the three otolith pairs in *Hippocampus ingens*.

Keywords: microscopic otoliths; otolith extraction; fish–otolith relationships; morphometric analysis; dried biological samples.

INTRODUCCIÓN

La especie *Hippocampus ingens* (Girard 1858), conocida comúnmente como el “caballito de mar del Pacífico”, pertenece a la familia Syngnathidae. Se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde California, EE. UU., y el Golfo de California, Isla Cocos, Panamá, Colombia, Ecuador, las Islas Galápagos, Perú y el norte de Chile (IUCN, 2017). Es una especie marina nerítica o costera que habita exclusivamente ambientes sublitorales (Saarman *et al.*, 2010), presentes en hábitats como bosques de macroalgas, manglares, praderas de pastos marinos y arrecifes tanto rocosos como coralinos (Aguilar-Barrón, 2009; Lourie *et al.*, 2016). Además, las especies del género *Hippocampus* pueden dispersarse en ambientes oceánicos mediante arrastre sobre objetos flotantes (Luzzatto *et al.*, 2013). Debido a su morfología particular, *H. ingens* es un nadador lento y generalmente permanece sujeto a estructuras como macroalgas utilizando su cola prensil. Esta especie no es migratoria y se ha sido registrada profundidades que van de 1 a 60 m (IUCN, 2017). Presenta patrones de actividad tanto diurnos como nocturnos (Foster y Vincent, 2004). Al detectar presas, como anfípodos, misidáceos, copépodos y otros organismos planctónicos (Koldewey y Martin-Smith 2010), alinean sus cabezas y succionan el alimento a través de sus largos hocicos tubulares (Foster y Vincent, 2004).

Esta especie está asociada con hábitats marinos costeros que están sufriendo degradación, lo que incrementa su vulnerabilidad (Alfaro-Shigueto *et al.*, 2022). Además de la pérdida de hábitat, las poblaciones están amenazadas por la captura incidental en redes de pesca y la sobreexplotación para medicina tradicional, particularmente en China y otros mercados asiáticos (World Wildlife Fund, 2023), así como por el comercio de acuarios y fines decorativos (Bell *et al.*, 2003; Alfaro-Shigueto *et al.*, 2022). Desde 2016, *H. ingens* ha sido clasificado como vulnerable en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (Pollom, 2017). En el Perú, debido a la contaminación, la degradación del hábitat y la extracción comercial de caballitos de mar, en 2004 se emitió la Resolución Ministerial N.° 306-2004-PRODUCE (Ministerio de la Producción, 2004), que prohíbe la extracción de *H. ingens* de las aguas marinas peruanas (Chipana-Robles y Valle-Rubio, 2021). Por lo tanto, es necesario mejorar el conocimiento biológico y ecológico básico de esta especie para desarrollar mejores herramientas para su adecuada gestión y conservación.

Los otolitos son estructuras calcificadas ubicadas en el oído interno

INTRODUCTION

The species *Hippocampus ingens* (Girard 1858), commonly known as the “Pacific seahorse”, belongs to the family Syngnathidae. It is distributed along the Pacific coast from California, USA, and the Gulf of California, Cocos Island, Panama, Colombia, Ecuador, the Galápagos Islands, Perú, and northern Chile (IUCN, 2017). It is a neritic or coastal marine species that inhabits exclusively subtidal environments (Saarman *et al.*, 2010) occurring in habitats such as kelp forests, mangroves, seagrass beds, and both rocky and coral reefs (Aguilar-Barrón, 2009; Lourie *et al.*, 2016). In addition, species of the genus *Hippocampus* may disperse in oceanic environments through rafting (Luzzatto *et al.*, 2013). Due to their distinctive morphology, *H. ingens* is a slow swimmer and usually remains attached to structures such as macroalgae using its prehensile tail. This species is non-migratory and has been reported at depths ranging from 1 to 60 m (IUCN, 2017). It exhibits both diurnal and nocturnal activity patterns (Foster and Vincent, 2004). When detecting prey, such as amphipods, mysids, copepods, and other plankton organisms (Koldewey and Martin-Smith 2010), they align their heads and suck food through their long tubular snouts (Foster and Vincent, 2004).

This species is associated with coastal marine habitats that are undergoing degradation, increasing their vulnerability (Alfaro-Shigueto *et al.*, 2022). In addition to habitat loss, populations are threatened by incidental capture in fishing nets and overexploitation for traditional medicine particularly in China and other Asian markets (World Wildlife Fund, 2023), as well as the aquarium trade, and decorative purposes (Bell *et al.*, 2003; Alfaro-Shigueto *et al.*, 2022). Since 2016, *H. ingens* has been classified as vulnerable on the IUCN Red List of Threatened Species (Pollom, 2017). In Peru, owing to pollution, habitat degradation, and commercial extraction of seahorses, a Ministerial Resolution N° 306-2004-PRODUCE was issued in 2004 (Ministerio de la Producción, 2004), prohibiting the extraction of *H. ingens* from Peruvian marine waters (Chipana-Robles and Valle-Rubio, 2021). Therefore, it is necessary to improve the basic biological and ecological knowledge of this species to develop better tools for proper management and conservation.

Otoliths are calcified structures located in the inner ear of teleost fishes that play a fundamental role in balance and spatial orientation by detecting gravity and linear acceleration, as well as in auditory perception by transmitting sound-induced vibrations to sensory hair cells (Popper and Fay, 1993). In addition, otoliths

de los peces teleósteos que desempeñan un papel fundamental en el equilibrio y la orientación espacial al detectar la gravedad y la aceleración lineal, así como en la percepción auditiva al transmitir vibraciones inducidas por el sonido a las células ciliadas sensoriales (Popper y Fay, 1993). Además, los otolitos crecen continuamente a lo largo de la vida del pez, formando estructuras específicas de cada especie e incrementos periódicos de crecimiento que permiten su uso en la determinación de la edad, el análisis del crecimiento, la identificación de especies y la reconstrucción de rasgos de la historia de vida y de las condiciones ambientales (Campana, 1999; Panfili *et al.*, 2002).

Los otolitos se utilizan ampliamente en ecología y en las ciencias pesqueras para diversas aplicaciones más allá de la estimación de edad y crecimiento. La información de los otolitos se aplica en diversas disciplinas, como la ecología trófica, la paleontología, la arqueología, la ecomorfología, la filogenia y la biología pesquera (Volpedo y Vaz-dos-Santos, 2015). Una de las aplicaciones más destacadas de los estudios de morfología de otolitos es su uso como herramientas taxonómicas para la diferenciación y caracterización de especies (Pansard, 2009). Los otolitos de los singnátidos son muy pequeños en relación con el tamaño del pez (Do *et al.*, 2006). En contraste, los peces marinos con longitudes totales comparables a *Hippocampus ingens* (longitud total media ≈ 18 cm) generalmente presentan otolitos más grandes, con una longitud del otolito que representa aproximadamente el 2% de la longitud total del pez (Do *et al.*, 2016; García-Godos, 2001; Oré, 2017). Esta característica plantea desafíos metodológicos para obtener material suficiente para el análisis de incrementos de crecimiento, la microquímica y otras aplicaciones basadas en otolitos.

Para *H. ingens*, actualmente no existe información sobre la morfología y morfometría de los otolitos, a pesar del amplio uso de estas estructuras en la investigación biológica y ecológica. Esta falta de información se debe en gran medida al tamaño extremadamente pequeño de los otolitos de los singnátidos, lo que complica su localización, extracción e identificación, particularmente en especímenes secos. En consecuencia, los tres tipos de otolitos (*lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*) no han sido descritos conjuntamente para esta especie. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo desarrollar una metodología específica para identificar y extraer los tres pares de otolitos de especímenes secos de *H. ingens* y describir su morfología, morfometría y relaciones con el tamaño del pez.

grow continuously throughout the life of the fish, forming species-specific shapes and periodic growth increments that allow their use in age determination, growth analysis, species identification, and the reconstruction of life-history traits and environmental conditions (Campana, 1999; Panfili *et al.*, 2002).

Otoliths are widely used in ecology and fisheries sciences for various applications beyond age and growth estimation. Otolith information is applied in diverse disciplines, such as trophic ecology, paleontology, archaeology, ecomorphology, phylogeny, and fisheries biology (Volpedo and Vaz-dos-Santos, 2015). One of the most notable applications of otolith morphology studies is their use as taxonomic tools for species differentiation and characterization (Pansard, 2009). The otoliths of Syngnathids are very small relative to fish size (Do *et al.*, 2006). In contrast, marine fishes with total lengths comparable to *Hippocampus ingens* (mean total length ≈ 18 cm) generally exhibit larger otoliths, with otolith length representing approximately 2% of the fish total length (García-Godos, 2001; Do *et al.*, 2016; Oré, 2017). This characteristic poses methodological challenges for obtaining sufficient material for growth increment analysis, microchemistry, and other otolith-based applications.

For *H. ingens*, information on otolith morphology and morphometry remains unavailable, despite the widespread use of otoliths in biological and ecological research. This lack of information is largely due to the extremely small size of syngnathid otoliths, which complicates their localization, extraction, and identification, particularly in dried specimens. Consequently, the three otolith types (*lapillus*, *sagitta*, and *asteriscus*) have not been jointly described for this species. Therefore, this study aims to develop a specific methodology for identifying and extracting the three otolith pairs from dried *H. ingens* specimens and to describe their morphology, morphometry, and relationships with fish size.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las muestras y extracción de otolitos

La muestra de *H. ingens* (especímenes secos) corresponde a un lote confiscado de la pesca ilegal en los departamentos de Tumbes, Piura y Lambayeque (Perú) en 2016 (Chipana-Robles y Valle-Rubio, 2021) (Figura 1).

MATERIAL AND METHODS

Sample origin and otolith extraction

The *H. ingens* sample (dry specimens) corresponds to a batch confiscated from illegal fishing in the departments of Tumbes, Piura and Lambayeque (Peru) in 2016 (Chipana-Robles and Valle-Rubio, 2021) (Figure 1).

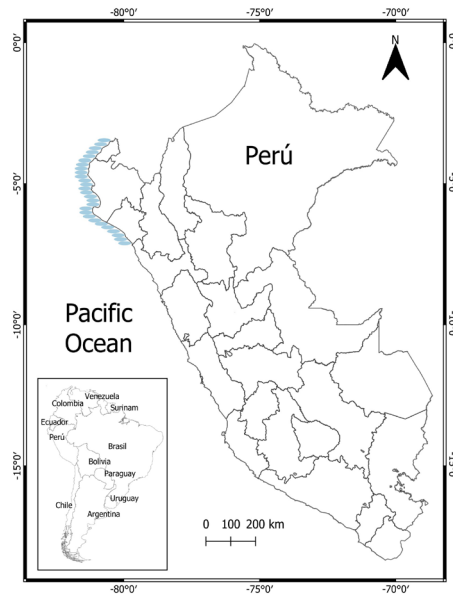


Figura 1. Mapa que muestra el origen de las muestras confiscadas en el norte del Perú (línea resaltada en azul)

Figure 1. Map showing the origin of the confiscated samples in northern Peru (area highlighted in blue).

Las muestras secas fueron rehidratadas para determinar la longitud total (LT, desde la coronilla hasta el extremo de la cola) y la longitud de la cabeza (LC, desde el punto medio del anillo cleitral hasta la punta del hocico), ambas medidas en milímetros (mm) (Figura 2).

The dry samples were rehydrated to determine total length (TL, from the coronet to the end of the tail) and head length (HL, from the midpoint of the cleithral ring to the tip of the snout) both measured in millimeters (mm) (Figure 2).

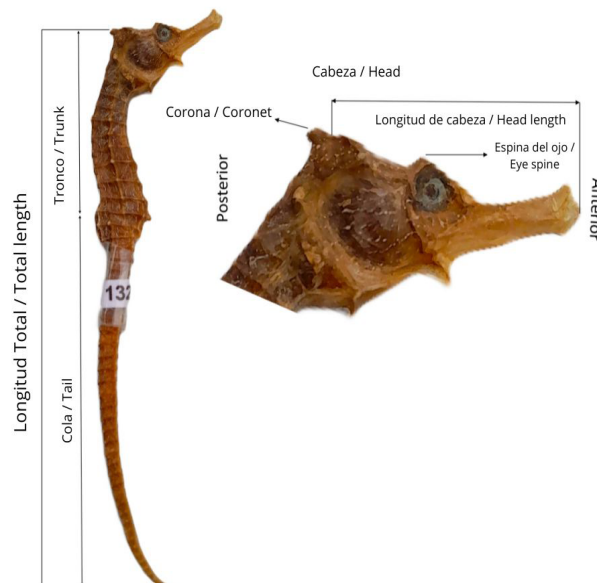


Figura 2. Longitud total del cuerpo (LT) y longitud de la cabeza (LC) en un ejemplar de *Hippocampus ingens*.

Figure 2. Total body length (TL) and head length (HL) in a specimen of *Hippocampus ingens*.

Se realizaron varios intentos para localizar los otolitos de *H. ingens* utilizando métodos convencionales. Inicialmente, se efectuó un corte craneal para exponer la cavidad cerebral y localizar visualmente los otolitos, particularmente la *sagitta*, el más grande de los tres tipos (Popper y Lu, 2000). Sin embargo, este método fue ineficaz debido al tamaño diminuto de los otolitos de los síngnátidos (menos de 1 mm; Campana, 2004; Do et al., 2006; Oré, 2017), lo que los hacía invisibles a simple vista. Además, los métodos convencionales de corte con tijeras o sierras a menudo dañaban o desplazaban los otolitos, especialmente en especímenes secos (Chalupnicki y Dittman, 2016).

Un método alternativo consistió en rehidratar las muestras en agua dulce durante 45 minutos antes de realizar la disección (Do et al., 2006), pero esto no mejoró la recuperación de otolitos. En última instancia, se identificó una técnica eficaz: realizar un corte preciso a lo largo de una línea desde la espina ocular hasta la corona (Do et al., 2006) utilizando un bisturí con hojas gruesas para tejido grueso. Este método facilitó el acceso a la cavidad craneal y la localización de los otolitos en su posición original.

Para la extracción de los otolitos, se siguieron los pasos descritos por Do et al. (2006) con algunas modificaciones. La cabeza de cada individuo se separó y se realizó un corte con un bisturí desde debajo de la espina ocular hasta la base de la corona (Figura 3A). Este procedimiento permitió un corte preciso y limpio, exponiendo los tres pares de otolitos en sus posiciones originales, que fueron observados bajo un microscopio estereoscópico.

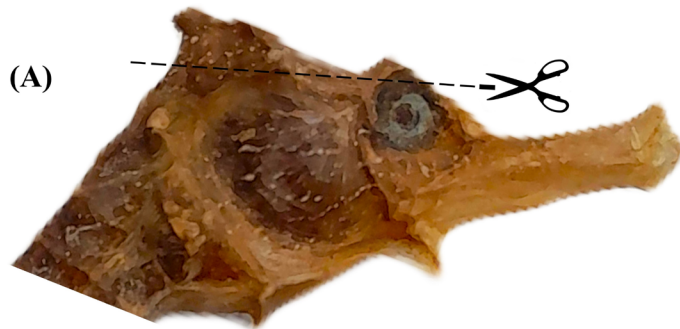


Figura 3. (A) *Hippocampus ingens* mostrando la línea de corte de disección en el cráneo. (B) Vista lateral de la cabeza de un individuo de *H. ingens* mostrando el corte en la corona de la cabeza.

Several attempts were made to locate *H. ingens* otoliths using conventional methods. Initially, a cranial cut was performed to expose the brain cavity and visually locate the otoliths, particularly the *sagitta*, the largest of the three types (Popper and Lu, 2000). However, this method was ineffective due to the minute size of Syngnathidae otoliths (less than 1 mm; Campana, 2004; Do et al., 2006; Oré, 2017), rendering them invisible to the naked eye. Additionally, conventional cutting methods using scissors or saws often damaged or displaced the otoliths, especially in dry specimens (Chalupnicki and Dittman, 2016).

An alternative method involved rehydrating samples in freshwater for 45 minutes before performing the dissection (Do et al., 2006), but this did not improve otolith retrieval. Ultimately, an effective technique was identified: making a precise cut along a line from the ocular spine to the coronet (Do et al., 2006) using a scalpel with thick tissue blades. This method facilitated access to the cranial cavity and the location of the otoliths in their original position.

For the otolith removal, the steps described by Do et al. (2006) were followed with some modifications. The head of each individual was separated and a cut was made with a scalpel from below the ocular spine to the base of the coronet (Figure 3A). This procedure enabled a precise and clean cut, exposing the three pairs of otoliths in their original positions, which were observed under a stereoscopic microscope.

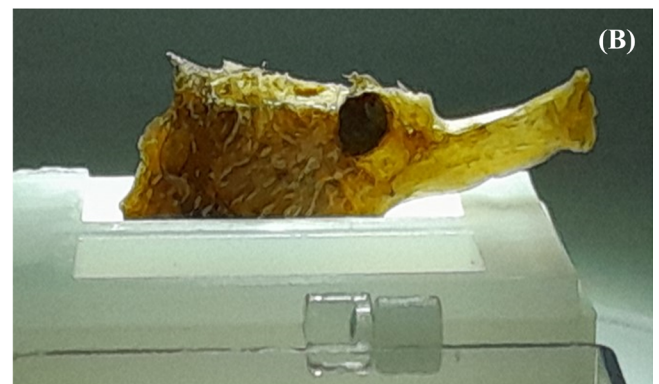


Figure 3. (A) *Hippocampus ingens* showing the dissection cut line on the skull. (B) Lateral view of the head of an *H. ingens* individual showing the cut on the coronet of the head.

La primera etapa de identificación *in situ* de la disposición fue clave para la posterior identificación de los tres pares de otolitos, *sagitta*, *lapillus* y *asteriscus*, antes de su extracción. Cada otolito fue extraído meticulosamente usando microespátulas y cada par se almacenó individualmente en microviales para su posterior análisis morfométrico.

Análisis morfológico y morfométrico de los otolitos

Para las descripciones morfológicas, la forma del otolito y sus características estructurales se utilizó la terminología propuesta por Tuset *et al.* (2008). Los datos morfométricos, incluyendo la longitud del otolito (OL), el ancho del otolito (OW) y el área del otolito (OA), se obtuvieron siguiendo los procedimientos descritos por Do *et al.* (2006) y Lombarte y Tuset (2015). Todas las mediciones morfométricas se registraron en micrómetros (μm) mediante análisis digital de imágenes.

Cada otolito se sumergió en peróxido de hidrógeno durante 60 min para limpiarlo y eliminar toda la materia orgánica adherida. Las fotografías se tomaron bajo un microscopio con aumento de 20x y posteriormente se analizaron utilizando el software NIS-Elements D 4.5. Se realizaron mediciones lineales para calcular el área total del otolito (OA), la longitud total de los otolitos (OL) (desde el borde posterior hasta el anterior) y el ancho de los otolitos (OW), medido desde el borde dorsal hasta el ventral (Kontas y Bostanci, 2015) (Figura 6).

Se calcularon estadísticas descriptivas (media, rango e IC del 95%; véanse las Tablas 1 y 2) para caracterizar las variables morfométricas de los peces y los otolitos. Para evaluar posibles diferencias entre los otolitos izquierdo y derecho de cada tipo (*lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*), se analizaron las variables morfométricas longitud del otolito (OL), ancho del otolito (OW) y área del otolito (OA). La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando se cumplió el supuesto de normalidad, se aplicaron pruebas t pareadas; de lo contrario se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

Se realizó un ANOVA para evaluar diferencias significativas en la longitud del otolito (LO) entre los tres tipos de otolitos (*lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*). Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas, se realizó una prueba HSD de Tukey (diferencia honestamente significativa) para determinar qué tipos diferían estadísticamente en tamaño.

The first stage of *in situ* identification of the arrangement was key for the subsequent identification of the three pairs of otoliths, *sagitta*, *lapillus* and *asteriscus*, before extraction. Each otolith was meticulously removed using microspatulas and each pair was stored individually in microvials for posterior morphometric analysis.

Morphological and morphometric analysis of the otoliths

For morphological descriptions, otolith shape and structural features were described using the terminology proposed by Tuset *et al.* (2008). Morphometric data, including otolith length (OL), otolith width (OW), and otolith area (OA), were obtained following the procedures described by Do *et al.* (2006) and Lombarte and Tuset (2015). All morphometric measurements were recorded in micrometers (μm) using digital image analysis.

Each otolith was immersed in hydrogen peroxide for 60 min to clean and remove all the adhered organic matter. Photographs were taken under a microscope at 20x magnification and subsequently analyzed using NIS-Elements D 4.5 software. Linear measurements were taken to calculate the total area of the otolith (OA), total length of the otoliths (OL) (from the posterior to the anterior edge), and width of the otoliths (OW), measured from the dorsal to the ventral edge (Kontas and Bostanci, 2015) (Figure 6).

Descriptive statistics (mean, range and 95% CI; see Tables 1 and 2) were calculated to characterize the morphometric variables of fishes and otoliths. To evaluate potential differences between left and right otoliths for each type (*lapillus*, *sagitta* and *asteriscus*), the morphometric variables otolith length (OL), otolith width (OW), and otolith area (OA) were analyzed. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. When the assumption of normality was met, paired t-tests were applied; otherwise, the Wilcoxon signed-rank test was used.

ANOVA was conducted to assess statistically significant differences in otolith length (OL) among the three types of otoliths (*lapillus*, *sagitta* and *asteriscus*). When significant differences were detected by ANOVA, a Tukey HSD (Honest Significant Difference) test was performed to determine which types differed significantly in size.

A linear regression analysis was performed to assess the relationship between total length (TL), head length (HL), and otolith length (OL). The aim was to model these relationships to assess whether otolith measurements could be used in a simple predictive model to estimate fish size when specimens are incomplete,

Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la relación entre la longitud total (LT), la longitud de la cabeza (LC) y la longitud del otolito (LO). El objetivo fue modelar estas relaciones para evaluar si las mediciones de los otolitos podrían utilizarse en un modelo predictivo simple para estimar el tamaño del pez cuando los ejemplares están incompletos; por ejemplo, cuando los caballitos de mar están fragmentados o solo se dispone de la cabeza. Los análisis se realizaron utilizando Minitab Statistical Software 2024.

RESULTADOS

Muestra y extracción de otolitos

De los 68 individuos procesados inicialmente, se lograron extraer otolitos de 45 otolitos tras las pruebas de identificación y los procedimientos descritos en la sección de metodología. La tasa de recuperación de otolitos fue relativamente alta (66%); sin embargo, no se recuperaron los tres pares de otolitos de cada individuo (Tabla 1).

Los caballitos de mar variaron en tamaño entre 75 y 178 mm de longitud total (LT) (Figura 4) y entre 15 y 42 mm de longitud de la cabeza (Tabla 1). Se obtuvieron conjuntos completos de los tres pares de otolitos de 13 individuos, lo que arrojó una tasa de recuperación del 29%. Además, se recuperaron *lapillus* pareados (derecho e izquierdo) de 32 individuos (tasa de recuperación del 71%), *sagitta* pareados de 31 individuos (69%) y *asteriscus* pareados de 23 individuos (51%).

for example when seahorses are fragmented or only the head is available. Analyses were performed using Minitab Statistical Software 2024.

RESULTS

Sample and otolith extraction

From the 68 individuals initially processed, otoliths were successfully extracted from 45 individuals following the identification tests and procedures described in the methodology section. The otolith recovery rate was relatively high (66%); however, not all three pairs of otoliths were retrieved from each individual (Table 1).

Seahorses ranged in size from 75 to 178 mm in total length (TL) (Figure 4) and from 15 to 42 mm in head length (Table 1). Complete sets of the three otolith pairs were obtained from 13 individuals, yielding a recovery rate of 29%. Additionally, paired *lapillus* (right and left) were retrieved from 32 individuals (71% recovery rate), paired *sagitta* from 31 individuals (69% recovery rate), and paired *asteriscus* from 23 individuals (51% recovery rate).

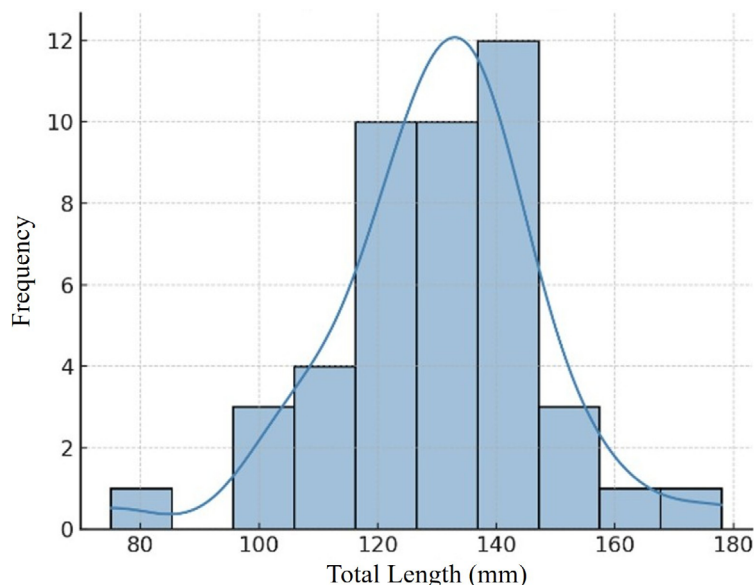


Figura 4. Histograma de la distribución de longitudes de todos los individuos de *Hippocampus ingens* con otolitos analizados (n = 45)

Figure 4. Histogram of the length distribution of all individuals of *Hippocampus ingens* with otoliths analyzed (n = 45)

Tabla 1. Datos de *Hippocampus ingens* obtenidos en este estudio. N = 45. Tamaño (longitud total LT) y longitud de la cabeza (LC). Intervalo de confianza del 95%.

Medida / Measure	Valor / Value
LT promedio (mm) / Average TL (mm)	130.36 (IC del 95%: 125.2 a 135.51) / 130.36 (95% CI: 125.2 to 135.51)
Rango de LT (mm) / TL range (mm)	75 - 178
LC promedio (mm) / Average HL (mm)	28.6 (IC del 95%: 27.03 a 30.12) / 28.6 (95% CI: 27.03 to 30.12)
Rango de LC (mm) / HL range (mm)	15 - 42
N° de individuos con los tres pares de otolitos / N° of individuals with the three pairs of otoliths	13
N° de individuos con ambos <i>lapillus</i> (derecho e izquierdo) / N° of individuals with both <i>lapillus</i> (right and left)	32
N° de individuos con ambas <i>sagitta</i> (derecha e izquierda) / N° of individuals with both <i>sagitta</i> (right and left)	31
N° de individuos con ambos <i>asteriscus</i> (derecho e izquierdo) / N° of individuals with both <i>asteriscus</i> (right and left)	23

Table 1. *Hippocampus ingens* data obtained in this study. N = 45. Size (Total Length TL) and head length (HL). 95% Confidence Interval. Number of individuals from which otoliths were obtained.

La **figura 5** ilustra una vista dorsal de la cabeza de un ejemplar de *H. ingens*, mostrando un corte limpio realizado con un bisturí. Una vez expuestos los otolitos, los tres pares (*sagitta*, *asteriscus* y *lapillus*) parecían similares en tamaño y forma. Sin embargo, podían distinguirse basado en su posición *in situ*.

Figure 5 illustrates a dorsal view of the head of an *H. ingens* specimen, showing a clean cut made with a scalpel. Once the otoliths were exposed, all three pairs (*sagitta*, *asteriscus* and *lapillus*) appeared similar in size and shape. However, they could be distinguished based on their *in situ* position.

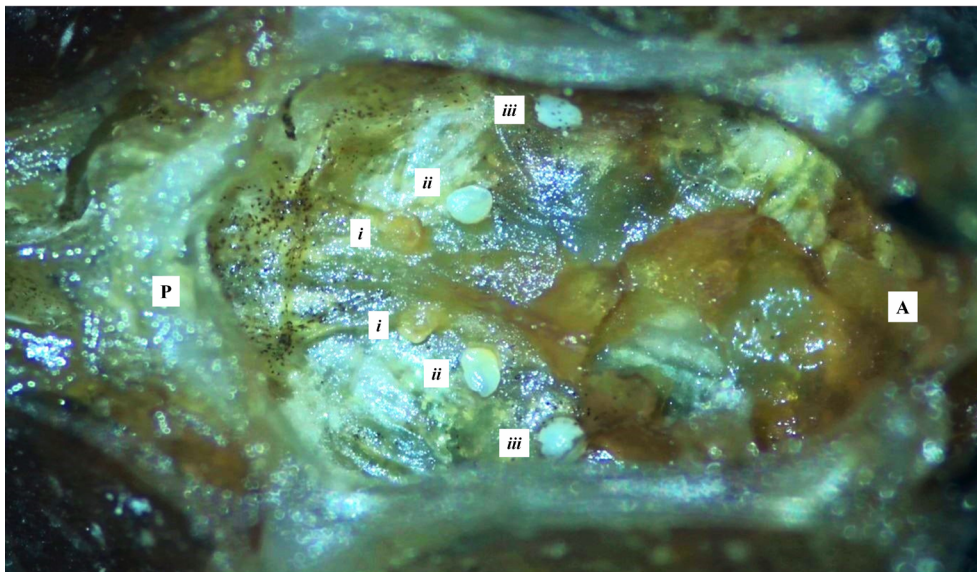


Figura 5. Vista superior de la cabeza de un individuo de *H. ingens* sin la tapa del cráneo. (P) Lado posterior de la cabeza; (A) Lado anterior de la cabeza. Otolitos: i: *Asteriscus*; ii: *Sagitta*; iii: *Lapillus*.

Figure 5. Superior view of the head of an *H. ingens* individual without the skull cap. (P) Posterior side of the head; (A) Anterior side of the head. Otoliths: i: *Asteriscus*; ii: *Sagitta*; iii: *Lapillus*.

Estos tres pares se ubicaban claramente en el piso de la cavidad craneal superior, dentro de los canales semicirculares que originalmente los alojaban. Al secarse, es probable que los otolitos se adhirieran a su posición original. Los *asteriscus* derecho e izquierdo (Figura 5i) estaban situados en la región más posterior del cráneo. Un poco por delante de los *asteriscus* se encontraban las *sagitta* (Figura 5ii), mientras que los *lapillus* (Figura 5iii) estaban ubicados anteriormente y más cerca de los lados del cráneo.

Análisis morfológico y morfométrico de los otolitos

La Figura 6 ilustra la orientación de un otolito, destacando los bordes dorsal, ventral, anterior y posterior. El rostrum y el antirostrum se encontraban en la región anterior, mientras que el sulcus estaba posicionado medialmente.

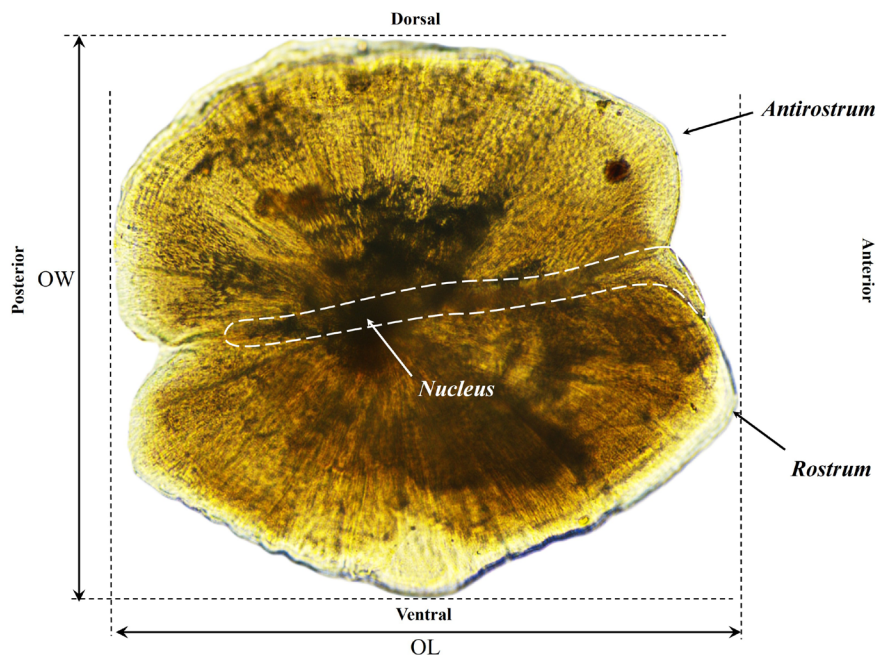


Figura 6. Ejemplar de un otolito de *H. ingens* (*lapillus*), que muestra la forma general, las principales partes diferenciadas y las mediciones de longitud del otolito (LO) y ancho del otolito (AO). El Sulcus aparece en la posición media del otolito (línea punteada).

Los tres pares de otolitos presentaron morfologías similares, oscilando entre formas tetraédricas y ovaladas, como describieron Tuset *et al.* (2008) (Figura 7). El *lapillus* presentó un contorno redondeado a subovalado, con curvatura marcada y márgenes lisos a ligeramente crenulados. Su superficie fue convexa, con estructuras anteriores poco diferenciadas (*rostrum* y *antirostrum*) y un surco medial tenue. La *sagitta* presentó un contorno ligeramente más alargado e irregular, con lóbulos más amplios, leve ornamentación marginal y un surco tenue que se extendía a

These three pairs were clearly located on the floor of the upper cranial cavity, within the semicircular canals that originally housed them. Upon drying, the otoliths likely adhered to their original position. The right and left *asterisci* (Figure 5i) were positioned at the most posterior region of the skull. Slightly anterior to the *asterisci* were the *sagittae* (Figure 5ii), while the *lapilli* (Figure 5iii) were situated anteriorly and closer to the sides of the skull.

Morphological and morphometric analysis of the otoliths

Figure 6 illustrates the orientation of an otolith, highlighting the dorsal, ventral, anterior, and posterior edges. The rostrum and antirostrum were in the anterior region, while the sulcus was positioned medially.

Figure 6. Sample of an otolith of *H. ingens* (*lapillus*), showing the general shape, the main differentiated parts and the otolith length (OL) and otolith width (OW) measurements. The Sulcus appears in the middle position of the otolith (dotted line).

The three otolith pairs exhibited generally similar morphologies, although subtle differences in outline, curvature, and marginal ornamentation were observed among otolith types (Figure 7). The *lapillus* showed a rounded to suboval outline, with marked curvature and smooth to slightly crenulated margins. Its surface was convex, with poorly differentiated anterior structures (*rostrum* and *antirostrum*) and a faint medial sulcus. The *sagitta* presented a slightly more elongated and irregular outline, with broader lobes, slight marginal ornamentation, and a faint sulcus extending

lo largo de la región central. La curvatura fue menos pronunciada que en el *lapillus*. El *asteriscus* fue el tipo de otolito de menor tamaño y exhibió una forma subcircular a ovalada, con bordes lisos, ornamentación reducida y un surco menos evidente. En todos los tipos de otolitos, el surco se ubicó en posición medial y la ornamentación externa fue generalmente débil, de acuerdo con la terminología propuesta por Tuset *et al.* (2008).

along the central region. Curvature was less pronounced than in the *lapillus*. The *asteriscus* was the smallest otolith type and exhibited a subcircular to oval shape, with smooth edges, reduced ornamentation, and a less conspicuous sulcus. In all otolith types, the sulcus was positioned medially and external ornamentation was generally weak, according to the terminology proposed by Tuset *et al.* (2008).

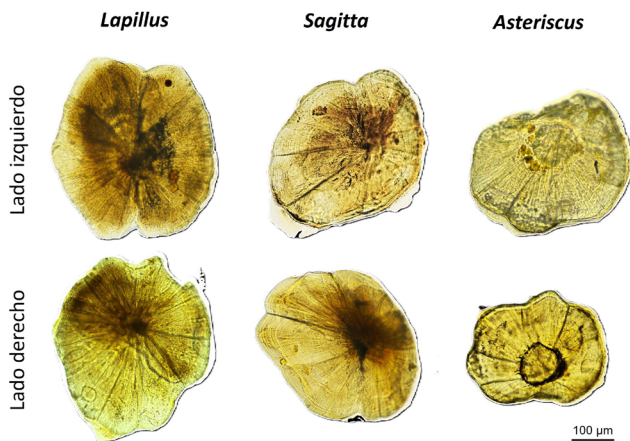


Figura 7. Vista de los tres pares de otolitos de un individuo de *H. ingens* (LT 138 mm).

No se detectaron diferencias significativas entre los otolitos izquierdo y derecho para ningún tipo de otolito (*lapillus*, *sagitta* y *asteriscus*) (comparaciones pareadas, $p > 0.05$ en todos los casos). Las mediciones de las *sagitta* cumplieron el supuesto de normalidad ($W = 0.97$, $p = 0.35$), mientras que *lapillus* ($W = 0.92$, $p = 0.04$) y *asteriscus* ($W = 0.90$, $p = 0.02$) no lo cumplieron. En consecuencia, los otolitos izquierdo y derecho se agruparon para cada tipo de otolito en los análisis posteriores.

La [Tabla 2](#) presenta las mediciones morfométricas de cada tipo de otolito analizado en este estudio (valores expresados como media \pm DE). El *lapillus* y la *sagitta* presentaron longitudes similares, con intervalos de confianza del 95 % parcialmente superpuestos, mientras que el *asteriscus* mostró dimensiones menores en todos los casos. Se observó un patrón similar para el ancho y el área del otolito, con *lapillus* presentando los valores más altos, *sagitta* valores intermedios y *asteriscus* los más bajos. La variabilidad fue generalmente alta en todas las mediciones, particularmente para el área de *sagitta*.

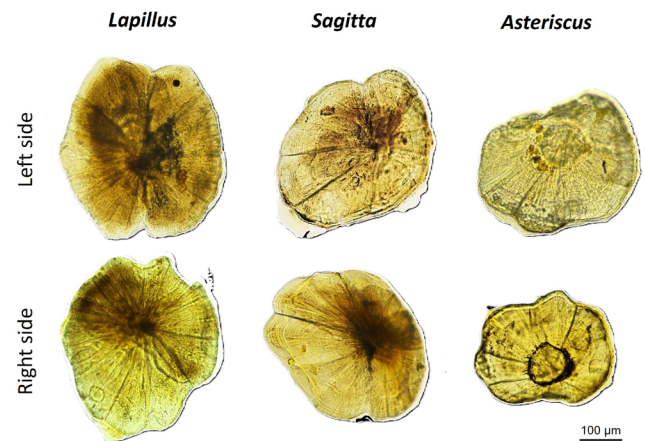


Figure 7. View of the three pairs of otoliths of an individual of *H. ingens* (TL 138 mm).

No significant differences were detected between left and right otoliths for any otolith type (*lapillus*, *sagitta* and *asteriscus*) (paired comparisons, $p > 0.05$ in all cases). *Sagitta* measurements met the assumption of normality ($W = 0.97$, $p = 0.35$), whereas *lapillus* ($W = 0.92$, $p = 0.04$) and *asteriscus* ($W = 0.90$, $p = 0.02$) did not. Accordingly, left and right otoliths were pooled for each otolith type in subsequent analyses.

[Table 2](#) presents the morphometric measurements of each otolith type analyzed in this study (values expressed as mean \pm SD). *Lapillus* and *sagitta* exhibited comparable otolith lengths, with partially overlapping 95% confidence intervals, whereas the *asteriscus* showed consistently smaller dimensions. A similar pattern was observed for otolith width and area, with *lapillus* presenting the largest values, *sagitta* intermediate values, and *asteriscus* the smallest. Variability was generally high across measurements, particularly for *sagitta* area.

Tabla 2. Morfometría de los otolitos *lapillus*, *sagitta* y *asteriscus* de *Hippocampus ingens*. Longitud del otolito (LO); Ancho del otolito (WO); Área del otolito (AO). Los valores se expresan como media ± DE. IC: intervalo de confianza del 95%.

Mediciones - tipo de otolito / Otolith measurements / type	<i>Lapillus</i> (IC del 95%) / <i>Lapillus</i> (95% CI)	<i>Sagitta</i> (IC del 95%) / <i>Sagitta</i> (95% CI)	<i>Asteriscus</i> (IC del 95%) / <i>Asteriscus</i> (95% CI)
LO (µm)	401.8 ± 50.9 (389.3–414.3)	398.9 ± 43.2 (387.7–410.0)	317.1 ± 55.0 (300.8–333.5)
Rango/Range LO (µm)	273.1–503.6	299.6–484.1	188.4–456.3
WO (µm)	362.0 ± 48.9 (349.1–375.0)	310.8 ± 27.3 (303.8–317.8)	267.9 ± 46.8 (253.6–282.1)
Rango/Range WO (µm)	249.0–465.5	261.9–382.9	167.6–408.0
AO (µm²)	114,892.8 ± 30,074.9 (107,437.0–122,348.7)	101,964.6 ± 39,141.2 (92,762.4–111,166.7)	70,525.2 ± 24,068.4 (64,193.7–76,856.8)
Rango/Range AO (µm²)	44,692.1–177,439.3	42,830.1–382,052.9	16,494.0–154,052.7

Diferencias significativas entre los tres tipos de otolitos ($F = 47.73$, $p < 0.00001$). La prueba post hoc de Tukey confirmó que todas las comparaciones por pares fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), lo que indica que los valores medios de los tres tipos de otolitos diferían entre sí (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la prueba post hoc de Tukey comparando las diferencias medias entre los tipos de otolitos. La tabla presenta las diferencias medias, los intervalos de confianza del 95% (IC) y los p -valores para cada comparación por pares.

Comparación/ Comparison	Diferencia media/ Mean difference	IC 95%/ CI 95%	valor p / p - value
<i>Lapillus</i> - <i>sagitta</i>	24.76	17.89 - 31.64	< 0.001
<i>Lapillus</i> - <i>asteriscus</i>	87.69	80.81 - 94.56	< 0.001
<i>Sagitta</i> - <i>asteriscus</i>	62.93	56.05 - 69.8	< 0.001

Los análisis de regresión lineal mostraron relaciones positivas entre la longitud total (LT, mm) y la longitud del otolito (LO, µm) para todos los tipos de otolitos (Figura 8). Cuando los otolitos izquierdos y derechos se analizaron por separado, se observaron patrones similares en ambos lados, en consonancia con la ausencia de diferencias bilaterales significativas ($p > 0.05$). Por lo tanto, también

Tabla 2. Morfometría de los otolitos *lapillus*, *sagitta* y *asteriscus* de *Hippocampus ingens*. Longitud del otolito (LO); Ancho del otolito (WO); Área del otolito (AO). Los valores se expresan como media ± DE. IC: intervalo de confianza del 95%.

Significant differences among the three types of otoliths ($F = 47.73$, $p < 0.00001$). Tukey's post hoc test confirmed that all pairwise comparisons were statistically significant ($p < 0.05$), indicating that the mean values of the three otolith types differed from each other (Table 3).

Tabla 3. Post hoc Tukey test results comparing the mean differences between otolith types. The table presents the mean differences, 95% confidence intervals (CI), and p -values for each pairwise comparison.

Linear regression analyses showed positive relationships between total length (TL, mm) and otolith length (OL, µm) for all otolith types (Figure 8). When left and right otoliths were analyzed separately, similar patterns were observed on both sides, consistent with the absence of significant bilateral differences ($p > 0.05$). Therefore, regression analyses were also performed using pooled data for

se realizaron análisis de regresión utilizando datos agrupados para cada tipo de otolito, obteniendo las siguientes ecuaciones: *sagitta*: $LO = 1.8534 \times LT + 156.35$ ($R^2 = 0.369$); *asteriscus*: $LO = 2.0058 \times LL + 59.81$ ($R^2 = 0.557$) y *lapillus*: $LO = 1.8361 \times LT + 164.12$ ($R^2 = 0.373$).

Los paneles superiores de la Figura 8 ilustran las relaciones LT–LO para los otolitos izquierdos (Figura 8A) y derechos (Figura 8B), mientras que los paneles inferiores muestran las relaciones entre la longitud de la cabeza (LC) y LO para los otolitos izquierdos (Figura 8C) y derechos (Figura 8D). Se observó una relación positiva entre LT y LC ($R^2 = 0.8103$), mientras que se encontraron relaciones más débiles entre LC y LO en los distintos tipos de otolitos.

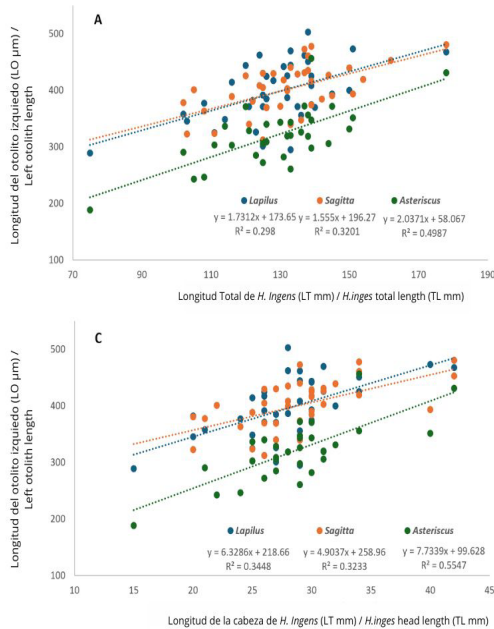


Figura 8. Relaciones entre las medidas corporales y la longitud del otolito (OL) en *H. ingens*. Los paneles superiores muestran regresiones lineales entre la longitud total (LT) y LO para (A) otolitos izquierdos y (B) otolitos derechos. Los paneles inferiores muestran regresiones entre la longitud de la cabeza (LC) y LO para (C) otolitos izquierdos y (D) otolitos derechos. Patrones similares entre los lados son consistentes con la ausencia de diferencias bilaterales significativas ($p > 0.05$).

Los modelos de regresión también revelaron relaciones positivas entre LT y otras medidas del otolito, incluido el ancho del otolito (OW) y el área del otolito (AO), con variaciones en la fuerza de la correlación según el tipo de otolito y el lado del cuerpo (Tabla 4). El *asteriscus* generalmente presentó las correlaciones más altas, seguido por *lapillus* y *sagitta*. Los coeficientes de correlación fueron ligeramente más altos en el lado derecho en la mayoría de las comparaciones, aunque las diferencias bilaterales no fueron significativas ($p > 0.05$).

each otolith type, yielding the following equations: *sagitta*: $OL = 1.8534 \times TL + 156.35$ ($R^2 = 0.369$); *asteriscus*: $OL = 2.0058 \times TL + 59.81$ ($R^2 = 0.557$) and *lapillus*: $OL = 1.8361 \times TL + 164.12$ ($R^2 = 0.373$).

The upper panels of Figure 8 illustrate TL–OL relationships for left (Figure 8A) and right otoliths (Figure 8B), while the lower panels show the relationships between head length (HL) and OL for left (Figure 8C) and right otoliths (Figure 8D). A positive relationship was observed between TL and HL ($R^2 = 0.8103$), whereas weaker relationships were found between HL and OL across otolith types.

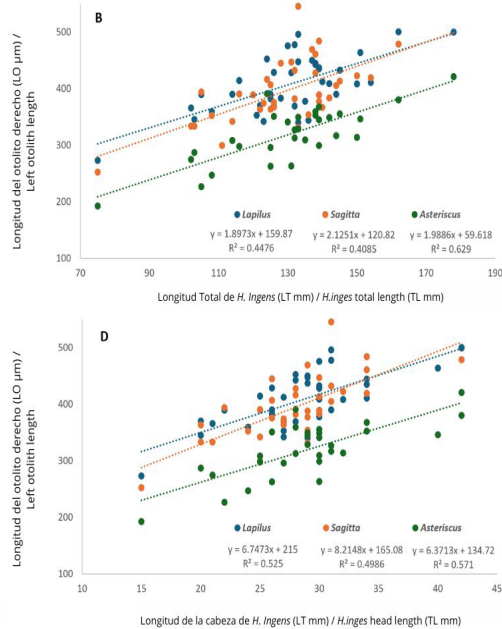


Figure 8. Relationships between body measurements and otolith length (OL) in *H. ingens*. Upper panels show linear regressions between total length (TL) and OL for (A) left otoliths and (B) right otoliths. Lower panels show regressions between head length (HL) and OL for (C) left otoliths and (D) right otoliths. Similar patterns between sides are consistent with the absence of significant bilateral differences ($p > 0.05$).

Regression models also revealed positive relationships between TL and other otolith measurements, including otolith width (OW) and otolith area (OA), with variations in correlation strength depending on otolith type and body side (Table 4). The *asteriscus* generally exhibited the highest correlations, followed by *lapillus* and *sagitta*. Correlation coefficients were slightly higher on the right side in most comparisons, although bilateral differences were not statistically significant ($p > 0.05$).

Tabla 4. Relaciones de la longitud total del cuerpo (LT) con la longitud del otolito (LO), el ancho del otolito (OW) y el área del otolito (AO) de *H. ingens*.

Modelos de regresión / Lado - Regression models / Side		Otolitos		
		<i>Lapillus</i>	<i>Sagitta</i>	<i>Asteriscus</i>
LT y LO	Derecho/right	r =0.67, R ² =0.45	r =0.64, R ² =0.41	r = 0.79, R ² = 0.63
	izquierdo / left	r =0.55, R ² =0.30	r =0.57; R ² =0.32	r = 0.71, R ² = 0.50
LT y OW	Derecho /right	r = 0.62, R ² = 0.39	r = 0.56, R ² = 0.32	r = 0.70, R ² = 0.49
	izquierdo / left	r = 0.47, R ² = 0.22	r = 0.45, R ² = 0.20	r = 0.67, R ² = 0.45
LT y AO	Derecho / right	r = 0.55, R ² = 0.31	r = 0.61, R ² = 0.38	r = 0.65, R ² = 0.43
	izquierda /left	r = 0.59, R ² = 0.34	r = 0.52, R ² = 0.24	r = 0.67, R ² = 0.45

Table 4. Relationships of body total length (TL) with the otolith length (OL), otolith width (OW) and otolith area (OA) of *H. ingens*.

DISCUSIÓN

Especímenes secos y recuperación de otolitos

Los especímenes de *Hippocampus ingens* analizados en este estudio procedían de capturas ilegales confiscadas en Perú (2016), lo que brindó una oportunidad poco común para evaluar la utilidad del material seco para la investigación de otolitos. A pesar de los procesos de deshidratación y secado al sol comúnmente utilizados durante el contrabando, los otolitos pudieron identificarse y recuperarse con éxito incluso después de un almacenamiento prolongado. La identificación *in situ* de los tres pares de otolitos, *sagitta*, *lapillus* y *asteriscus*, resultó esencial para una extracción precisa. Estos resultados demuestran que los especímenes secos aún pueden proporcionar información morfológica y morfométrica fiable, en concordancia con estudios previos que muestran que los otolitos siguen siendo valiosos en brindar información incluso después de alteraciones post mortem y de una preservación a largo plazo (Disspain *et al.*, 2015). El número limitado de individuos con conjuntos completos de otolitos refleja la dificultad de recuperar los tres pares de otolitos de especímenes secos, una limitación también reportada para otros sígnatidos.

Identificación y características de los otolitos

Una vez expuestos los otolitos, los tres pares presentaron en general una similitud superficial en la forma y el tamaño, diferenciándose principalmente por su posición *in situ*. Sin embargo, los análisis

DISCUSSION

Dried specimens and otolith recovery

The *Hippocampus ingens* specimens analyzed in this study originated from confiscated illegal catches in Perú (2016), providing a rare opportunity to evaluate the usefulness of trafficked dried material for otolith research. Despite dehydration and sun-drying processes commonly used during smuggling, otoliths were successfully identified and retrieved even after prolonged storage. The *in situ* identification of the three otoliths pairs *sagitta*, *lapillus* and *asteriscus* proved essential for accurate extraction. These results demonstrate that dried specimens can still yield reliable morphological and morphometric information, consistent with previous studies showing that otoliths remain informative even after post-mortem alteration and long-term preservation (Disspain *et al.*, 2015). The limited number of individuals with complete otolith sets reflects the difficulty of recovering all three otolith pairs from dried specimens, a limitation also reported for other syngnathids.

Identification and otoliths characteristics

Once the otoliths were exposed, the three pairs appeared superficially similar in overall shape and size, differing mainly in their *in situ* position. However, morphometric analyses revealed significant size differences among otolith types. In most fish species, *sagitta* otoliths are typically the largest and, consequently, the most used for studies related to age estimation and morphology

morfométricos revelaron diferencias significativas de tamaño entre los tipos de otolito. En la mayoría de las especies de peces, los otolitos *sagitta* suelen ser los más grandes y, en consecuencia, los más utilizados en estudios relacionados con la estimación de la edad y la morfología (Harvey *et al.*, 2000; Tuset *et al.*, 2008; González *et al.*, 2023). Esto puede explicar la relativa escasez de información sobre la morfología y la diversidad de los otolitos *lapillus* y *asteriscus*.

Aunque en muchos peces teleósteos la *sagitta* suele ser el otolito más grande, en algunas especies puede ser más pequeña o más frágil que los otros dos pares, y aun así ser adecuada para análisis microestructurales (D'Iglio *et al.*, 2023). En *H. ingens*, ninguno de los tres tipos de otolito mostró el marcado predominio de tamaño que comúnmente se describe para la *sagitta* en otros grupos de peces. En cambio, sus dimensiones y morfología general son comparables a las reportadas para otras especies del género, como *H. erectus* (Campana, 2004), *H. spinosissimus* (Do *et al.*, 2006) y *H. hippocampus* (Tuset *et al.*, 2008) cuyos otolitos también exhibieron tamaño reducido, poca ornamentación y estructuras poco diferenciadas.

El tamaño de los otolitos de *H. ingens* en este estudio no superó los 500 μm , excepto en un individuo (138 mm TL) con un *lapillus* de 503.6 μm . En un estudio realizado por Oré (2017), quien analizó otolitos de más de 170 especies de peces de Perú, incluyendo peces que abarcan un amplio rango de tamaños corporales, *H. ingens* tenía los otolitos más pequeños entre todas las especies examinadas. De manera similar, Do *et al.* (2006) informaron que en *H. spinosissimus*, el *lapillus* era ligeramente más grande que la *sagitta*, seguido por el *asteriscus*, un patrón que coincide con nuestros hallazgos para *H. ingens*.

Oré (2017) planteó la hipótesis de que el otolito más grande en *H. ingens*, identificado como la *sagitta*, podría utilizarse para estimar el tamaño de los otros otolitos mediante relaciones proporcionales. Sin embargo, esta hipótesis parece basarse en datos muy limitados, ya que solo se reportó la medición de un otolito. En contraste, nuestro análisis, basado en 45 otolitos, reveló variabilidad de tamaño entre los tres tipos de otolitos y mostró que la *sagitta* no fue consistentemente la más grande. Por lo tanto, la suposición de relaciones proporcionales simples entre los tipos de otolito en esta especie requiere una evaluación adicional.

Tal variabilidad también puede tener implicaciones funcionales. Las

(Harvey *et al.*, 2000; Tuset *et al.*, 2008; González *et al.*, 2023). This may explain the relative scarcity of information on the morphology and diversity of *lapillus* and *asteriscus* otoliths.

Although in many teleost fishes the *sagitta* is typically the largest otolith, in some species it may be smaller or more fragile than the other two pairs, yet still suitable for microstructural analyses (D'Iglio *et al.*, 2023). In *H. ingens*, none of the three otolith types showed the marked size dominance commonly described for *sagitta* in other fish groups. Instead, their dimensions and general morphology were comparable to those reported for other species of the genus, including *H. erectus* (Campana, 2004) *H. spinosissimus* (Do *et al.*, 2006) and *H. hippocampus* (Tuset *et al.*, 2008), whose otoliths likewise exhibited small size, weak ornamentation, and poorly differentiated structures.

The size of *H. ingens* otoliths in this study did not exceed 500 μm , except for one individual (138 mm TL) with a *lapillus* measuring 503.6 μm . In a study conducted by Oré (2017), which analyzed otoliths from more than 170 fish species from Peru, including species spanning a wide range of body sizes, *H. ingens* was reported to have the smallest otoliths among all species examined. Similarly, Do *et al.* (2006) reported that in *H. spinosissimus*, the *lapillus* was slightly larger than the *sagitta*, followed by the *asteriscus*, a pattern that aligns with our findings for *H. ingens*.

Oré (2017) hypothesized that the largest otolith in *H. ingens*, identified as the *sagitta*, could be used to estimate the size of the other otoliths through proportional relationships. However, this hypothesis appears to be based on very limited data, as only a single otolith measurement was reported. In contrast, our analysis, based on 45 otoliths, revealed size variability among the three otolith types and showed that the *sagitta* was not consistently the largest. Therefore, the assumption of simple proportional relationships among otolith types in this species requires further evaluation.

Such variability may also have functional implications. Differences in otolith size and morphology are primarily related to inner-ear biomechanics, since otolith mass influences their mechanical behaviour and sensory performance (Parmentier *et al.*, 2001). However, these traits are also interpreted as eco-functional because auditory and equilibrium capabilities can influence habitat use, communication, and predator-prey interactions in fishes (Popper and Fay, 1993; Volpedo and Echeverría, 2003; Lombarte *et al.*,

diferencias en tamaño y morfología de los otolitos se relacionan principalmente con la biomecánica del oído interno, ya que la masa del otolito influye en su comportamiento mecánico y su desempeño sensorial (Parmentier *et al.*, 2001). Sin embargo, estos rasgos también se interpretan como ecofuncionales, porque las capacidades auditivas y de equilibrio pueden influir en el uso del hábitat, la comunicación y las interacciones depredador-presa en los peces (Popper y Fay, 1993; Volpedo y Echeverría, 2003; Lombarte *et al.*, 2010). La variación en el tamaño de los otolitos puede modificar las propiedades inerciales y el movimiento relativo de los otolitos durante el movimiento corporal, afectando potencialmente la sensibilidad auditiva y el rendimiento del equilibrio (Parmentier *et al.*, 2001). En este contexto, las diferencias observadas entre los tipos de otolito en *H. ingens* podrían reflejar diferencias funcionales relacionadas con la biomecánica del oído interno, aunque este aspecto no fue evaluado en el presente estudio.

Relaciones entre el tamaño del pez y el otolito

El análisis de regresión en este estudio indica relaciones significativas entre la longitud total (LT) y la longitud del otolito (LO), lo que sugiere que las mediciones de los otolitos pueden proporcionar un indicador útil, aunque aproximado, del tamaño del pez en *H. ingens*. Estas relaciones entre el tamaño del otolito y del pez han sido documentadas en peces teleósteos, donde las dimensiones de los otolitos aumentan proporcionalmente con el crecimiento del pez y pueden utilizarse para inferir la correlación del tamaño corporal (Taştan y Sönmez 2021; Tran *et al.*, 2025). Entre los tres tipos de otolito, los *asteriscus* mostraron las asociaciones más fuertes con la LT. Sin embargo, una proporción sustancial de la variabilidad en el tamaño de los otolitos no queda explicada por la LT, lo que indica que estas relaciones deben interpretarse con cautela y no como modelos predictivos precisos. Tal variabilidad es de esperarse dado el tamaño extremadamente pequeño de los otolitos de los sígnatidos y la variación biológica y morfológica inherente dentro de la especie. Se han registrado relaciones positivas, aunque moderadas, entre LT y LO en *H. spinosissimus*, con los otolitos *lapillus* mostrando la correlación más fuerte (Do *et al.*, 2006), lo que respalda el uso de las mediciones de otolitos como herramientas complementarias y no como predictores definitivos del tamaño del pez.

2010). Variation in otolith size may modify inertial properties and the relative movement of otoliths during body motion, potentially affecting auditory sensitivity and balance performance (Parmentier *et al.*, 2001). In this context, the observed differences among otolith types in *H. ingens* could potentially reflect functional differences related to inner-ear biomechanics, although this aspect was not evaluated in the present study.

Fish–otolith size relationships

The regression analysis in this study indicates significant relationships between total length (TL) and otolith length (OL), suggesting that otolith measurements may provide a useful, albeit approximate, indicator of fish size in *H. ingens*. Such otolith–fish size relationships have been documented in teleost fishes, where otolith dimensions increase proportionally with fish growth and can be used to infer the correlation body size (Taştan and Sönmez 2021; Tran *et al.*, 2025). Among the three otolith types, *asteriscus* otoliths exhibited the strongest associations with TL. However, a substantial proportion of the variability in otolith size remains unexplained by TL, indicating that these relationships should be interpreted with caution and not as precise predictive models. Such variability is expected given the extremely small size of Syngnathid otoliths and the inherent biological and morphological variation within the species. Similar positive, yet moderate, relationships between TL and OL have been reported for *H. spinosissimus*, with *lapillus* otoliths showing the strongest correlation (Do *et al.*, 2006), supporting the use of otolith measurements as complementary tools rather than definitive predictors of fish size.

Applications and limitations of otolith-based size estimation

The correlation between OL and TL has valuable implications for fisheries management and conservation. This study demonstrates that regression models based on OL–TL relationships can provide approximate estimates of fish size, particularly when specimens are incomplete, even in dried specimens confiscated from illegal trade. These relationships could potentially be applied in ecological and archaeological contexts. For instance, they can be used to reconstruct fish size at the time of capture in pre-Columbian periods (Verdurmen, 2019), estimate historical body size from otolith measurements (Echeverría, 1987), and analyze the dietary habits of predators by determining prey size based on retrieved otoliths (Jobling and Breiby, 1986). However, further research is required to refine fish size estimations based on otolith measurements,

Aplicaciones y limitaciones de la estimación del tamaño basada en otolitos

La correlación entre LO y LT tiene valiosas implicaciones para la gestión pesquera y la conservación. Este estudio demuestra que los modelos de regresión basados en las relaciones LO-LT pueden proporcionar estimaciones aproximadas del tamaño del pez, particularmente cuando los especímenes están incompletos, incluso en especímenes secos confiscados del comercio ilegal. Estas relaciones podrían aplicarse potencialmente en contextos ecológicos y arqueológicos. Por ejemplo, pueden utilizarse para reconstruir el tamaño del pez en el momento de la captura en periodos precolombinos (Verdurmen, 2019), estimar el tamaño corporal histórico a partir de mediciones de otolitos (Echeverría, 1987) y analizar los hábitos alimentarios de los depredadores determinando el tamaño de la presa a partir de los otolitos recuperados (Jobling y Breiby, 1986). Sin embargo, se requiere más investigación para refinar las estimaciones del tamaño de los peces basados en mediciones de otolitos, particularmente para especies presa. También es necesario cuantificar la reducción de tamaño y la pérdida de material calcáreo que pueden ocurrir a medida que los otolitos pasan por el tracto digestivo de los depredadores o se someten a procesamiento y análisis.

Aunque la relación entre la longitud total (LT) y la longitud de la cabeza (LC) mostró un fuerte ajuste lineal, este no fue el caso de la relación entre LC y la longitud del otolito (LO). Entre los tres tipos de otolitos, los otolitos *asteriscus* mostraron el mejor ajuste en esta relación. Esto sugiere que, aunque la correlación entre el tamaño del pez y el tamaño de la cabeza es un aspecto clave de la biología de los peces, la LC no es un predictor fiable de la LO en *H. ingens*.

Los hallazgos indican que el *asteriscus* es el otolito más adecuado para estimar LT, ya que mostró la correlación más alta con el tamaño del pez. Aunque la mayoría de los estudios en teleosteos suelen utilizar la *sagitta* para la estimación del tamaño, debido a su mayor tamaño y disponibilidad, también se han reportado correlaciones entre la longitud del pez y otros tipos de otolitos (Harvey *et al.*, 2000; Campana, 2004; Tuset *et al.*, 2008). Las correlaciones más bajas observadas para *sagitta* y *lapillus* en nuestro estudio pueden reflejar diferencias en los patrones de crecimiento entre los tipos de otolitos, un fenómeno descrito en peces donde cada par de otolitos puede responder de manera distinta al crecimiento somático y a las condiciones ambientales.

particularmente for prey species. It is also necessary to quantify size reduction and calcareous material loss that may occur as otoliths pass through predators digestive tracts or undergo processing and analysis.

While the relationship between total length (TL) and head length (HL) exhibited a strong linear fit, this was not the case for the relationship between HL and otolith length (OL). Among the three otolith types, *asteriscus* otoliths showed the best fit in this relationship. This suggests that, although the correlation between fish size and head size is a key aspect of fish biology, HL is not a reliable predictor of OL in *H. ingens*.

Our findings indicate that the *asteriscus* is the most suitable otolith for estimating TL, as it exhibited the highest correlation with fish size. Although most studies in teleosts commonly use the *sagitta* for size estimation, due to its larger size and availability, correlations between fish length and other otolith types have also been reported (Harvey *et al.*, 2000; Campana, 2004; Tuset *et al.*, 2008). The lower correlations observed for *sagitta* and *lapillus* in our study may reflect differences in growth patterns among otolith types, a phenomenon described in fishes where each otolith pair can respond differently to somatic growth and environmental conditions. Slightly higher correlations were observed on the right side in some comparisons; however, these differences were not statistically significant and therefore should be interpreted cautiously. Furthermore, the stronger TL–OL relationship compared with TL–OW and TL–OA suggests that otolith length may represent a more reliable predictor of fish size, consistent with previous studies that identified OL as a stable parameter for fish growth and size estimation (Harvey *et al.*, 2000; Campana, 2004;). Comparable evaluations in seahorses are scarce; thus, our results provide new baseline information on TL–otolith relationships among the three otolith types in *Hippocampus ingens*, highlighting the need for additional research to confirm these patterns in seahorses and other syngnathids.

Although the OL–TL and OW–TL relationships showed the best fit in *asteriscus* otolith, their application in seahorses should be interpreted cautiously and restricted to size estimation. Otoliths have not proven to be a reliable structure for aging adult *Hippocampus* species (Do *et al.*, 2006), highlighting the need for validated alternative methods for age determination.

This study provides the first description and characterization of the three otolith pairs in *Hippocampus ingens*, including their size

Se observaron correlaciones ligeramente más altas en el lado derecho en algunas comparaciones; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas y, por lo tanto, deben interpretarse con cautela. Además, la relación LT–LO más fuerte en comparación con LT–OW y LT–AO sugiere que la longitud del otolito puede representar un predictor más fiable del tamaño del pez, en concordancia con estudios previos que identificaron la LO como un parámetro estable para el crecimiento y la estimación del tamaño de los peces (Harvey *et al.*, 2000; Campana, 2004;). Las evaluaciones comparables en caballitos de mar son escasas; por lo tanto, nuestros resultados proporcionan nueva información de referencia sobre las relaciones LT–otolito entre los tres tipos de otolitos en *H. ingens*, destacando la necesidad de investigaciones adicionales para confirmar estos patrones en caballitos de mar y otros singnátidos.

Aunque las relaciones LO–LT y OW–LT mostraron el mejor ajuste en el otolito *asteriscus*, su aplicación en caballitos de mar debe interpretarse con cautela y restringirse a la estimación del tamaño. Los otolitos no han demostrado ser una estructura fiable para determinar la edad de especies adultas de *Hippocampus* (Do *et al.*, 2006), lo que resalta la necesidad de métodos alternativos validados para la determinación de la edad.

Este estudio proporciona la primera descripción y caracterización de los tres pares de otolitos en *Hippocampus ingens*, incluyendo su tamaño y sus relaciones morfométricas con la longitud total. Los resultados demuestran que se puede obtener información útil de los otolitos incluso a partir de especímenes secos, como los incautados del comercio ilegal en Perú, lo que contribuye a una mejor comprensión de la biología y ecología de la especie.

Finalmente, la información derivada de los otolitos tiene múltiples aplicaciones (Volpedo y Vaz-dos-Santos, 2015), y este estudio aporta información de referencia sobre el tamaño de los tres pares de otolitos en *Hippocampus ingens*, destacando el potencial de las mediciones de otolitos para explorar patrones relacionados con el tamaño y proporcionando un marco de referencia para futuros estudios biológicos y comparativos.

and morphometric relationships with total length (TL). The results demonstrate that useful otolith information can be obtained even from dried specimens, such as those seized from illegal trade in Peru, contributing to a better understanding of the species biology and ecology.

Finally, otolith-derived information has multiple applications (Volpedo and Vaz-dos-Santos, 2015), and this study contributes baseline information on the size of the three otolith pairs in *Hippocampus ingens*, highlighting the potential of otolith measurements for exploring size-related patterns and providing a reference framework for future biological and comparative studies.

CONCLUSIONES

Este estudio demostró que los otolitos pueden identificarse y extraerse con éxito de especímenes secos de *H. ingens* mediante una metodología *ad hoc*. Se detectaron diferencias significativas de tamaño entre los tres tipos de otolitos, mientras que no se observaron diferencias entre otolitos derechos e izquierdos, lo que facilita su identificación en estudios futuros. Los análisis de regresión mostraron relaciones significativas entre el tamaño del pez y las dimensiones de los otolitos, siendo el *asteriscus* el mejor predictor de la longitud total. Estos resultados proporcionan información de referencia sobre la morfología de los otolitos y las relaciones de tamaño en *Hippocampus ingens* y respaldan futuros estudios biológicos y comparativos en caballitos de mar.

CONCLUSIONS

This study demonstrated that otoliths can be successfully identified and extracted from dried specimens of *Hippocampus ingens* using an *ad hoc* methodology. Significant size differences were detected among the three otolith types, while no differences were observed between right and left otoliths, facilitating their identification in future studies. Regression analyses showed significant relationships between fish size and otolith dimensions, with the *asteriscus* providing the strongest predictor of total length. These results provide baseline information on otolith morphology and size relationships in *Hippocampus ingens* and support future biological and comparative studies in seahorses.

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Aguilar Barrón, D. (2009). *Enfoque de los cultivos de los caballitos de mar (Pisces: Syngnathidae) de ocurrencia en México*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Alfaro-Shigueto, J., Alfaro-Cordova, E., Mangel, J.C. (2022). Review of threats to the Pacific seahorse *Hippocampus ingens* (Girard 1858) in Peru. *Journal of Fish Biology*, 100(6), pp. 1327-1334. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.15058>
- Bell, E.M., Lockyear, J.F., McPherson, J.M., Dale Marsden, A. and Vincent, A.C.J. (2003). First field studies of an endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Environmental Biology of Fishes*, 67(1), pp. 35-46. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1024440717162>
- Campana, S.E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188, 263-297.
- Campana, S.E. (2004). *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*. NRC Ottawa: Research Press, pp. 284.
- Chalupnicki, M.A. and Dittman, D.E. (2016). Alternative method of removing otoliths from sturgeon. *Journal of Visualized Experiments*, 112, e54316. doi: <https://doi.org/10.3791/54316>
- Chipana-Robles, S. y Valle-Rubio, S. (2021). Estadios, proporción sexual y talla de captura *Hippocampus ingens* Girard, 1858 (*Syngnathiformes: Syngnathidae*) a partir de una muestra incautada en Perú. *The Biologist* 19(2). doi: <https://doi.org/10.24039/rtb20211921049>
- D'Iglio, C., Famulari, S., Albano, M., Carnevale, A., Di Fresco, D., Costanzo, M. and Capillo, G. (2023). Intraspecific variability of the saccular and utricular otoliths of the hatchetfish *Argyropelecus hemigymnus* (Cocco, 1829) from the Strait of Messina (Central Mediterranean Sea). *PLoS ONE*, 18(2), e0281621. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281621>
- Disspain, M. C. F., Ulm, S. and Gillanders, B. M. (2016). Otoliths in archaeology: Methods, applications and future prospects. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 6, pp. 623-632.
- Do, H.H., Gronkjaer, P. and Simonsen, V. (2006). Otolith morphology, microstructure and ageing in the hedgehog seahorse, *Hippocampus spinosissimus* (Weber, 1913). *Journal of Applied Ichthyology*, 22(2), pp. 153-159. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00729.x>
- Echeverría, T.W. (1987). Relationship of otolith length to total length in rockfishes from northern and central California. *Fishery Bulletin*. 85, pp. 383-387.
- Foster, S.J. and Vincent, A.C.J. (2004). Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 65(1), 1-61. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00429.x>
- García-Godos Naveda, I. (2001). Patrones morfológicos del otolito *sagitta* de algunos peces óseos del mar peruano. *Boletín Instituto del Mar del Perú*, 20(1-2), pp. 1-83. <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/articulo/view/151>
- González Dubox, M.C., Córdoba Gironde, S., Lopez, L.S. and Tombari, A.D. (2023). Morfología de los otolitos *sagitta*, *lapillus* y *asteriscus* de *Genidens barbatus* de distribución patagónica. *Marine and Fishery Sciences*. 36(1), pp. 109-116. doi: <https://doi.org/10.47193/mafis.3612023010107>
- Harvey J.T., Loughlin, T.R., Perez, M.A. and Oxman, D.S. (2000). Relationship between fish size and otolith length for 63 species of fishes from the eastern North Pacific Ocean. *NOAA/National Marine Fisheries Service, Seattle. NOAA Technical Report NMFS 150*: pp. 1-36.
- IUCN (2025). The IUCN Red List of Threatened Species. [online] IUCN Red List of Threatened Species. Available at: <https://www.iucnredlist.org>
- Jobling, M. and Breiby, A. (1986). The use and abuse of fish otoliths in studies of feeding habits of marine piscivores. *Sarsia*, 71(3-4), pp. 265-274. doi: <https://doi.org/10.1080/00364827.1986.10419696>
- Koldewey, H.J. and Martin-Smith, K.M. (2010). A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, pp. 131-152.
- Kontas, S. and Bostanci, D. (2015). Morphological and biometrical characteristics on otolith of *Barbus tauricus* Kessler, 1877 on light and scanning electron

- microscope. *International Journal of Morphology*. 33(4), pp. 1380-1385. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022015000400032>
- Lombarte, A. y Tuset, V.M. (2015). Morfometría de otólitos. In: *Métodos de estudio con otólitos: principios y aplicaciones*. CAFP-BA-PIESCI, pp. 269–302.
- Lombarte, A., Palmer, M., Matallanas, J., Gómez-Zurita, J. and Morales-Nin, B. (2010). Ecomorphological trends and phylogenetic inertia of otolith *sagittae* in Nototheniidae. *Environmental Biology of Fishes*, 89: pp. 607–618.
- Lourie, S.A., Pollom, R.A. and Foster, S.J. (2016). A global revision of the seahorses *Hippocampus* Rafinesque, 1810 (*Actinopterygii: Syngnathiformes*): taxonomy and biogeography with recommendations for further research. *Zootaxa* 4146(1), pp. 1-66. doi: <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4146.1.1>
- Luzzatto, D.C., Estalles, M.L. and Diaz de Astarloa, J.M. (2013). Rafting seahorses: the presence of juvenile *Hippocampus patagonicus* in floating debris. *Journal of Fish Biology*, 83(3): pp. 677-691.
- Oré-Villalba, D.O. (2017). Catálogo fotográfico de otólitos de peces marinos y dulceacuícolas del Perú. *Boletín Instituto del Mar del Perú*, 32(2), pp. 136-213.
- Pansard, A.C. (2009). *Ecología alimentar do boto cinza, Sotalia guianensis (Van Benédén, 1864), no litoral do Rio Grande do Norte (RN)*. Tesis de licenciatura, pp. 196.
- Parmentier, E., Vandewalle, P. and Lagar-Dère, F. (2001). Morpho-anatomy of the otic region in carapid fishes: eco-morphological study of their otoliths. *Journal of Fish Biology*, 58, pp. 1046-1061. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00554.x>
- Panfili, J., Pontual, H., Troadec, H. and Wright, P.J. (Eds.). (2002). *Manual of fish sclerochronology*. Brest: Ifremer-IRD.
- Pollom, R. (2017). *Hippocampus ingens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T10072A54905720.
- Popper, A. N. and Fay, R. R. (1993). Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain, Behaviour and Evolution* 41, pp. 14–38.
- Popper, A. N. and Lu, Z. (2000). Structure-function relationships in fish otolith organs. *Fisheries Research* 46: pp. 15-25.
- Ministerio de la Producción. (2004). Resolución Ministerial N.º 306-2004-PRODUCE. Lima: Ministerio de la Producción.
- Saarman, N.P., Louie, K.D. and Hamilton, H. (2010). Genetic differentiation across eastern Pacific oceanographic barriers in the threatened seahorse *Hippocampus ingens*. *Conservation Genetics*, 11, pp. 65–71.
- Taştan, Y. and Sönmez, A. Y. (2021). A review on the relationship between the fish length and otolith biometry. *Journal of Biometry Studies*, 1(1), pp. 26-34. doi: <https://doi.org/10.29329/JofBS.2021.348.06>
- Tran, L.T., Quach, T.A., Le, Y.T. and Dinh, M. (2025). Otolith morphology, position, and size-body relationships in *Periophthalmodon schlosseri* (Gobiiformes: Oxudercidae) from Bac Lieu, Vietnam. *Discover Animals*, 2, pp. 72. doi: <https://doi.org/10.1007/s44338-025-00123-5>
- Tuset, V.M., Lombarte, A. and Assis, C.A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72 (Suppl. 1), pp. 1–198. doi: <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72s17>
- Verdurmen, A. (2018). Estudio comparativo de otólitos provenientes de la pesca pre-colombina y contemporánea de corvinas en la Bahía de Parita. Tesis. Zenodo. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3970630>
- Volpedo, A., Echeverría, D. (2003). Ecomorphological patterns of the *sagitta* in fish on the continental shelf off Argentina. *Fisheries Research*, 60(2-3), pp. 551-560. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-7836\(02\)00170-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-7836(02)00170-4)
- Volpedo, A.V. y Vaz-dos-Santos, A.M. (2015). Métodos de estudios con otólitos: principios y aplicaciones. Buenos Aires: INPA CONICET UBA.
- World Wildlife Fund (WWF) report (2023). Seahorse trade and TCM demand in China and Hong Kong. (citing similar reports on seahorse trade and demand).



Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia
CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual /
This is an open Access article under the CC BY-NC-SA