

## Hormone-induced spawning of wild and captive-grown spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* using carp pituitary suspension and human chorionic gonadotropin

### Inducción hormonal con suspensión de pituitaria de carpa y gonadotropina coriónica humana en el pargo manchado *Lutjanus guttatus* silvestre y criado en cautiverio

J Boza-Abarca<sup>1\*</sup>, S Valverde-Chavarría<sup>1</sup>, E Calvo-Vargas<sup>1</sup>, M Ramírez-Alvarado<sup>1</sup>, E Rodríguez-Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estación de Biología Marina, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, PO Box 66-5400, Puntarenas, Costa Rica.

<sup>2</sup> Facultad de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia.

\* Corresponding author: E-mail: jboza@una.ac.cr

**ABSTRACT.** Hormone-induced spawning of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* was studied using wild and cage-grown fish. Carp pituitary suspension (CPS) and human chorionic gonadotropin (hCG) were assessed. Wild females (0.7–2.1 kg body weight (BW),  $n = 18$ ) were collected by hook and line in the Gulf of Nicoya, Costa Rica, to induce final maturation and ovulation in the laboratory. In the first experiment, five doses of CPS were evaluated and spawning was only observed at the higher doses (4.0 and 4.5 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW); the doses used were lower than for other species under similar conditions. In the second experiment, CPS and hCG protocols were compared using cage-grown broodstock ( $n = 30$  females, 462–995 g;  $n = 60$  males, 400–600 g); egg production was more consistent for the hCG protocol. In the third experiment, cage-grown fish ( $n = 12$  females, 368–977 g;  $n = 24$  males, 400–600 g) were used to assess the female response to hCG and the fertility of the spawned eggs; two successive injections of different hCG doses were tested. The results confirm that two successive doses of 900 and 700 IU hCG  $\text{kg}^{-1}$  BW result in the highest number of eggs spawned and the best fertilization rates.

**Key words:** *Lutjanus guttatus*, spotted rose snapper, hormonal induction, spawning, fertilization.

**RESUMEN.** Se estudio la inducción hormonal al desove del pargo manchado *Lutjanus guttatus* utilizando peces silvestres y peces criados en jaulas flotantes. Las hormonas utilizadas fueron la suspensión de pituitaria de carpa (SPC) y la gonadotropina coriónica humana (GCh). Las hembras silvestres (0.7–2.1 kg de peso corporal (PC),  $n = 18$ ) se capturaron mediante el uso de anzuelos y línea de fondo en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, y fueron inducidas a la maduración final y ovulación en el laboratorio. En el primer experimento, se evaluaron cinco dosis de SPC y el desove se observó con las dosis más altas (4.0 y 4.5 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC). Las dosis que se aplicaron fueron más bajas que las utilizadas para otras especies de lutjánidos en condiciones similares. En el segundo experimento, se realizó una comparación entre los protocolos utilizados para SPC y GCh con peces criados en jaulas flotantes ( $n = 30$  hembras, 462–995 g;  $n = 60$  machos, 400–600 g); la producción de huevos fue más consistente para el protocolo de la GCh. En el tercer experimento y con peces criados en jaulas flotantes ( $n = 12$  hembras, 368–977 g;  $n = 24$  machos, 400–600 g), se utilizaron dos inyecciones sucesivas con diferentes dosis de GCh para medir la respuesta de las hembras a la GCh y la fertilidad de los huevos desovados. Los experimentos confirman que dos dosis sucesivas de 900 y 700 UI  $\text{kg}^{-1}$  PC resultan en un número mayor de huevos desovados y mejores porcentajes de fertilización.

**Key words:** *Lutjanus guttatus*, pargo manchado, inducción hormonal, desove, fertilización.

## INTRODUCTION

The spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* is naturally distributed along the Pacific coast from the Gulf of California to Peru (Grimes 1987, Fischer *et al.* 1995, Rojas *et al.* 2004, Ibarra-Castro and Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008). This species is found around coral reefs and rocks near the coast, and grows to 80 cm in total length (TL) (Fischer *et al.* 1995). It is one of the commercially important snappers from the Costa Rican Pacific coast: captures represent 99.5% of the total capture from artisanal fishermen in the Gulf of

## INTRODUCCIÓN

El pargo manchado *Lutjanus guttatus* se encuentra distribuido en forma natural a lo largo de la costa pacífica, desde el Golfo de California hasta Perú (Grimes 1987, Fischer *et al.* 1995, Rojas *et al.* 2004, Ibarra-Castro y Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008). Esta especie vive cerca de los arrecifes de coral y en las zonas rocosas cercanas a la costa, y puede crecer hasta 80 cm de longitud total (LT) (Fischer *et al.* 1995). En la costa pacífica de Costa Rica es una de las especies más importantes comercialmente: las capturas en el

Nicoya (Siefke 1995, Rojas 1997a), with landings of 118 to 299 t (Soto *et al.* 2009). The spotted rose snapper is reproductively active in all months of the year, with two peaks of activity in April and October (Rojas 1997b), which is similar to that observed in Mexico (Arellano-Martínez *et al.* 2001, Ibarra-Castro and Duncan 2007). This behavior coincides with the beginning and end of the rainy season. During this season, mature males and females, hooked at depths between 30 and 50 m, can be caught alive by artisanal fishermen (Valverde and Boza 1999).

Snapper species have been evaluated and recommended for mariculture activities because they are easy to manipulate, accept artificial feed, and are not aggressive when kept at high densities (Arnold *et al.* 1978, Tucker and Jory 1991, Benetti and Wilson 1996, Cano 2003, Boza-Abarca *et al.* 2008). Ibarra-Castro and Duncan (2007) detail the commercial importance of the species, and other authors the interest of aquaculture and fishing industries in developing snapper culture (Tucker and Jory 1991, Benetti and Wilson 1996, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004, Ogle and Lotz 2006, Ibarra-Castro and Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008, Ibarra-Castro and Alvarez-Lajonchere 2009).

In other snapper species, the doses of different hormones used to induce spawning range from very low to very high concentrations, with spawning results that are variable (Singhagraiwan and Doi 1993; Emata *et al.* 1994, 1999; Clarke *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 1998; Fielder *et al.* 2002; Emata 2003; Dumas *et al.* 2004); hence, it is important to determine under which conditions a hormonal dose should be applied, taking into account fish condition.

Recently, Ibarra *et al.* (2004) induced *L. guttatus* spawning using luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) implants with doses of 25 or 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$  body weight (BW). Ibarra-Castro and Duncan (2007) determined that the 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$  BW implant induced spawning with a significantly higher percentage hatch (86.1%). Ibarra-Castro and Alvarez-Lajonchere (2009) presented detailed results that demonstrate the efficiency of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH<sub>a</sub>) implants in wild and captive-grown spotted rose snapper.

In Costa Rica, the control of spotted rose snapper reproduction with hormonal treatments initiated with the use of carp pituitary suspension (CPS). In a preliminary study wild females were injected with 4.0 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW to induce spawning, and expelled 11,550–12,550 eggs after 24 h (Valverde and Boza 1999). Because of the positive results, several experiments evaluating female response to human chorionic gonadotropin (hCG) doses were done. Boza-Abarca *et al.* (2008) induced spawning in cage-grown spotted rose snapper of 605  $\pm$  98 g BW and 36.4  $\pm$  2.1 cm TL, using two injection doses, the first of 900 IU hCG  $\text{kg}^{-1}$  BW and the second of 700 IU hCG  $\text{kg}^{-1}$  BW; after 9 to 12 h, females released eggs.

The aim of the present study was to determine the effect of CPS on wild-caught and cage-grown females, and to

Golfo de Nicoya representan el 99.5% de la captura total de la pesca artesanal (Siefke 1995, Rojas 1997a), con cifras reportadas que varían de 118 a 299 t (Soto *et al.* 2009). El pargo manchado se encuentra reproductivamente activo en todos los meses del año, con dos picos de actividad en abril y en octubre (Rojas 1997b), similar a lo registrado en México (Arellano-Martínez *et al.* 2001, Ibarra-Castro y Duncan 2007). Este comportamiento coincide con el inicio y el fin de la época lluviosa. Durante esta época, los machos maduros y las hembras maduras pueden ser capturados vivos por los pescadores artesanales, mediante el uso de anzuelos, a profundidades de 30 a 50 m (Valverde y Boza 1999).

Las especies de pargo han sido evaluadas y recomendadas para actividades de maricultura debido a que son manipulables, aceptan el alimento artificial y no son agresivas entre sí cuando se encuentran en altas densidades (Arnold *et al.* 1978, Tucker y Jory 1991, Benetti y Wilson 1996, Cano 2003, Boza-Abarca *et al.* 2008). Ibarra-Castro y Duncan (2007) detallaron la importancia comercial de la especie, y otros autores resaltan el interés de la industria pesquera y de la acuicultura para desarrollar el cultivo de las especies de pargos (Tucker y Jory 1991, Benetti y Wilson 1996, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004, Ogle y Lotz 2006, Ibarra-Castro y Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008, Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere 2009).

En otras especies de pargo, las dosis de diferentes hormonas suministradas para inducir el desove varían desde concentraciones muy bajas hasta concentraciones muy altas, siendo variables los resultados en el desove (Singhagraiwan y Doi 1993; Emata *et al.* 1994, 1999; Clarke *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 1998; Fielder *et al.* 2002; Emata 2003; Dumas *et al.* 2004). Por lo tanto, es importante determinar bajo qué condiciones se debe suministrar una dosis hormonal, tomando en cuenta la condición de los peces.

Recientemente, Ibarra *et al.* (2004) indujeron el desove de *L. guttatus* utilizando implantes del análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa), con dosis de 25 ó 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal (PC). Ibarra-Castro y Duncan (2007) determinaron que los implantes con dosis de 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$  PC indujeron la liberación de huevos en un porcentaje altamente significativo (86.1%). Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere (2009) presentaron resultados detallados que demuestran la eficiencia de los implantes del análogo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH<sub>a</sub>) en peces silvestres y criados en cautiverio de pargo manchado.

En Costa Rica, el control de la reproducción del pargo manchado mediante el uso de preparados hormonales se inició con la utilización de suspensión de pituitaria de carpa (SPC). En un estudio preliminar las hembras silvestres fueron inyectadas con una dosis de 4.0 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC y después de 24 h éstas liberaron 11,550–12,550 huevos (Valverde y Boza 1999). Debido a los resultados positivos, se realizaron varios experimentos que evaluaron la respuesta de las hembras a la inducción hormonal con la gonadotropina coriónica humana (GCh). Boza-Abarca *et al.* (2008) indujeron el

develop and optimize the spawning protocol of cage-grown female spotted rose snapper using hCG.

## MATERIAL AND METHODS

In view of the variability in doses applied to different snapper species, three experiments were conducted to determine the effect of different hormonal doses of CPS and hCG on mature *L. guttatus* females. The first experiment (June–December 1998) used wild females that were injected once with increasing doses of CPS. The second experiment (February 2001–August 2002) used females reared in floating cages that were injected once with increasing hormonal doses of CPS and hCG. The third experiment (February 2001–August 2002) used females reared in floating cages that were injected with hormonal doses of CPS and hCG supplied in two injections at a 24-h interval. Analysis of each experiment revealed which hormone and which dose should be applied to spotted rose snapper females for successful spawning, and which criteria to use for hormone-induced spawning.

### Broodstock

In the first experiment, wild mature females ( $n = 18$ ) were collected with bottom hook and line (longline) in the outer region of the Gulf of Nicoya, Costa Rica (7–8 h on bottom hook and line). Only females with oocyte diameter of 350–400  $\mu\text{m}$  were selected for the experiment. In the second and third experiments, wild juveniles were collected with fish hooks in the inner region of the Gulf of Nicoya. Around 400 wild juveniles were stocked in floating grow-out cages ( $4 \times 4 \times 3$  m, 48  $\text{m}^3$ ) as described by Boza-Abarca *et al.* (2008) during one year (February 2001–February 2002). Captured and cage-grown fish were transported early in the morning (8:00 a.m.) to the Marine Biology Station at Puntarenas by speedboat equipped with an oxygenated holding tank (150 L). Seawater was changed several times during transports, which lasted around 0.5–1 h.

The CPS (Sigma, Argent, USA) was dissolved in saline solution (0.9% NaCl) at the specific concentration to be evaluated in the first and second experiments. The hCG (Chorulon, Intervet Int. B.V., Boxmeer, Holland) was prepared by dissolving the lyophilized powder (1500 IU) in a sterile solution of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1.5 mL) and used in the second and third experiments. Once the fish were in the laboratory, a small tank (150 L) was prepared with anesthetic solution (quinidine sulphate or MS-222, 10–100  $\text{mg L}^{-1}$ , Phoenix, USA). Fishes were anaesthetized and weighed (Sartorius balance,  $\pm 0.1$  g). An ovarian sample was taken by gently sucking oocytes into a polyethylene tube (0.75 mm inner diameter) inserted through the oviduct (1–2 cm). Oocyte diameter was measured at random ( $\pm 0.01$  mm,  $n = 50$ ) in fresh samples using a direct light stereomicroscope. All females were injected intramuscularly (1-mL syringe) at the posterior end of the base of the dorsal fin with hormone

desove en *L. guttatus* (engordado en jaulas) de  $605 \pm 98$  g PC y  $36.4 \pm 2.1$  cm LT utilizando dos inyecciones de GCh (la primera inyección fue de 900 UI GCh  $\text{kg}^{-1}$  PC y la segunda de 700 UI GCh  $\text{kg}^{-1}$  PC); después de 9 a 12 h, las hembras liberaron los huevos.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de SPC sobre la inducción al desove en hembras silvestres y hembras criadas en jaulas flotantes, y desarrollar y optimizar el protocolo del desove utilizando GCh en hembras de pargo manchado criadas en jaulas flotantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a la variabilidad en las dosis aplicadas en diferentes especies de pargo, se planteó la realización de tres experimentos con el fin de determinar el efecto de diferentes dosis hormonales de SPC y GCh en hembras maduras de *L. guttatus*. En el primer experimento (junio–diciembre de 1998) se utilizaron hembras salvajes, las cuales se inyectaron una sola vez con dosis crecientes de SPC. En el segundo experimento (febrero de 2001–agosto de 2002) se utilizaron hembras engordadas en jaulas flotantes, las cuales se inyectaron una sola vez con dosis hormonales crecientes de SPC y GCh. En el tercer experimento (febrero de 2001–agosto de 2002) se utilizaron hembras engordadas en jaulas flotantes, las cuales se inyectaron con dosis hormonales crecientes de SPC y GCh suministradas en dos inyecciones en un intervalo de 24 h. Del análisis de cada experimento se determinó cuál hormona y qué dosis debe aplicarse a las hembras de pargo manchado para obtener desoves exitosos, y qué criterios utilizar al realizar la inducción hormonal al desove.

### Reproductores

Para el primer experimento, se recolectaron hembras silvestres maduras ( $n = 18$ ) mediante el uso de anzuelos de fondo (palangre) y línea en la región externa del Golfo de Nicoya, Costa Rica (7–8 h en la línea de palangre). Solamente se seleccionaron hembras con ovocitos entre 350 y 400  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el segundo y el tercer experimento se recolectaron juveniles silvestres por medio de anzuelos en áreas de la región interna del Golfo de Nicoya. Alrededor de 400 juveniles fueron colocados en jaulas flotantes ( $4 \times 4 \times 3$  m, 48  $\text{m}^3$ ) y engordados como se describe en Boza-Abarca *et al.* (2008) durante un año (febrero de 2001–febrero de 2002). Los peces capturados y los criados en las jaulas flotantes se transportaron (8:00 a.m.) a la Estación de Biología Marina, en Puntarenas, por medio de una lancha con motor fuera de borda y un tanque con aireación (150 L). El agua se cambió varias veces durante los transportes, los cuales duraron de 0.5–1 h.

La SPC (Sigma, Argent, USA) se disolvió en una solución salina (0.9% NaCl) a la concentración específica a ser evaluada en el primer y el segundo experimento. La GCh (Chorulon, Intervet Int. B.V., Boxmeer, Holland) utilizada en el segundo y el tercer experimento se preparó disolviendo el

immediately after ovarian biopsy. During the experiments, all tanks were supplied daily with aeration and constant water exchange. Temperature and salinity were measured in each tank and ranged from 26 to 28 °C and from 30 to 32, respectively. Oxygen was 5.5–6.6 g L<sup>-1</sup>.

## Experiments

All experiments were conducted once the fish were in the Marine Biology Station (at 8:00 a.m.). In the first experiment, only wild-caught females (0.7–2.1 kg BW,  $n = 18$ ) were used to evaluate the effect of different CPS doses on spawning. All females were stocked individually in 1-t tanks. The CPS doses were administered in a single injection and evaluated in triplicate, as follows: control (saline solution), 1.25, 2.5, 3.75, 4.0, and 4.5 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW.

In the second experiment, females (462–995 g,  $n = 30$ ) and males (400–600 g,  $n = 60$ ) reared in floating cages were used to evaluate the effect of increasing doses of CPS and hCG on spawning. Females were placed individually in 2.5-t tanks and injected once with different doses of either hCG or CPS ( $n = 3$  for each hormone treatment). For every female, two fluent males were stocked. Males received one injection of 200 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW or 2 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW, depending on the treatment, when the female injection was given. The following doses were used for females: 0 (control, diluent only), 250, 500, 750, and 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW; and 0, 1.25, 2.5, 3.75, and 4.0 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW.

In the third experiment, cage-grown females (368–977 g,  $n = 12$ ) and males (400–600 g,  $n = 24$ ) were used to evaluate the effect on spawning of hCG doses administered in two successive injections. Each female was stocked together with two males in 2.5-t tanks. Females received two successive injections of hCG, given 24 h apart, as follows: 750 + 250, 900 + 300, 700 + 700, and 900 + 700 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW. All treatments were tested in triplicate. All females were anaesthetized before the second injection and injected after a second biopsy. Males received only one injection of 200 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW at the same time as when the second female injection was given.

In all experiments, each tank was checked regularly for spawned eggs, which float in water. When spawning was detected, the number of hours after the administration of the second injection and spawning (latency period) was recorded and floating eggs were concentrated in an egg collector. After 48 h, the fish were removed from the tanks and the number of remaining eggs was estimated by taking a sample of known volume and counting the eggs.

Egg fertilization rate was determined by counting the number of eggs showing embryonic development and the number of unfertilized eggs in triplicate samples of 100 eggs. Fertilization percentage (%F) was calculated using the following formula:

polvo liofilizado (1500 UI) en una solución estéril de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.5 mL). Cuando se transportaron los peces al laboratorio, se preparó un tanque pequeño (150 L) con una solución anestésica (sulfato de quinaldina o MS-222, 10–100 mg L<sup>-1</sup>, Phoenix, USA). Los peces se anestésicos y pesaron (balanza Sartorius, ±0.1 g). Se tomó una biopsia ovárica succionando suavemente los ovocitos mediante un tubo plástico de polietileno (0.75 mm de diámetro interno) que fue insertado a través del oviducto (1–2 cm). El diámetro de los ovocitos se midió al azar (±0.01 mm,  $n = 50$ ) y en fresco con un estereomicroscopio de luz directa. Todas las hembras fueron inyectadas con la hormona intramuscularmente (jeringa de 1 mL) en la parte posterior de la base de la aleta dorsal inmediatamente después de la biopsia ovárica. Durante todos los experimentos, los tanques fueron suministrados con aireación diaria y un intercambio constante de agua. La temperatura y la salinidad se midieron en cada tanque, y fluctuaron entre 26 y 28 °C y entre 30 y 32, respectivamente. El oxígeno permaneció entre 5.5 y 6.6 g L<sup>-1</sup>.

## Experimentos

Todos los experimentos se realizaron una vez que los peces llegaron a la Estación de Biología Marina (8:00 a.m.). En el primer experimento se utilizaron solamente las hembras silvestres capturadas (0.7–2.1 kg PC,  $n = 18$ ) para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de SPC sobre el desove. Todas las hembras se colocaron individualmente en tanques de 1 t. Las dosis hormonales de SPC se suministraron en una única inyección y se evaluaron por triplicado, según los siguientes tratamientos: control (solución salina), 1.25, 2.5, 3.75, 4.0 y 4.5 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC.

En el segundo experimento, se utilizaron hembras (462–995 g,  $n = 30$ ) y machos (400–600 g,  $n = 60$ ) engordados en las jaulas flotantes con el fin de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de SPC y GCh sobre el desove. Las hembras se colocaron individualmente en tanques de 2.5 t y se inyectaron una sola vez con diferentes dosis de GCh o de SPC ( $n = 3$  para cada tratamiento hormonal). Por cada hembra se adicionaron dos machos cuyo semen fue fluido. Los machos recibieron una inyección de 200 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC o de 2 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC, según el tratamiento, al mismo tiempo que se inyectaron las hembras. Las dosis utilizadas para las hembras fueron: 0 (control, solamente el diluyente), 250, 500, 750 y 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC; y 0, 1.25, 2.5, 3.75 y 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC.

En el tercer experimento se usaron hembras (368–977 g,  $n = 12$ ) y machos (400–600 g,  $n = 24$ ) engordados en jaulas para evaluar el efecto de las dosis de GCh sobre el desove; las dosis se suministraron en dos inyecciones sucesivas. En cada tanque de 2.5 t se colocaron una hembra y dos machos. Las hembras recibieron dos inyecciones sucesivas de GCh, en un intervalo de tiempo de 24 h, con las siguientes dosis: 750 + 250, 900 + 300, 700 + 700 y 900 + 700 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. En este

$$\%F = \left( \frac{\text{Number of eggs showing development}}{\text{Total number of eggs}} \right) \times 100 \quad (1)$$

From ovarian biopsy samples, the initial mean oocyte diameter at 0 h (I0) and mean oocyte diameter at 24 h (I24) of 100 oocytes (experiment I) or 30 oocytes (experiments II and III) were measured ( $\pm 0.01$  mm) with a stereoscope (Meiji EMZ-5TR). The percent increase in oocyte diameter at 24 h (PI) was calculated as:

$$PI = \left( \frac{I24 - I0}{I0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Data were analyzed using one-way analysis of variance (SPSS 13) to detect differences in oocyte diameters at 0 and 24 h, and between treatments. To determine the effect of the hormonal treatments on oocyte development, all the females that received CPS doses in experiments I and II were grouped and all the females that received hCG doses in experiments II and III were grouped, and plotted and compared using regression analysis.

## RESULTS

### Experiment I

Wild females in the control group and in the treatment using 1.25 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW did not spawn. Only one female spawned with dose 2.5 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW. In the last three treatments (3.75, 4.0, and 4.5 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW), two females spawned in each treatment (table 1). Females treated with 3.75 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW produced few eggs, but those treated with 4.0 mg  $\text{kg}^{-1}$  BW produced 115,500 and 125,500 eggs, even though the difference in dosage is small. At 4.5 mg  $\text{kg}^{-1}$  BW, one female produced 46,600 eggs while the other produced few eggs. The mean time interval between injection and spawning (latency period) was  $28 \pm 7.7$  h, though it ranged from 22 h (4.5 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW) to 44 h (3.75 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW). Mean spawned egg diameter was  $0.723 \pm 0.027$  mm ( $n = 100$ ). After 24 h, significant differences ( $P < 0.05$ ) in all treatments were detected in the increase in oocyte diameter.

### Experiment II

No spawning females were observed in the control and 1.25 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW treatments (table 2). Only one female spawned in the 2.5, 3.75, and 4.0 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW treatments. The latency period was 25 h in the 2.5 and 3.75 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW treatments, and 28 h in the 4.0 mg CPS  $\text{kg}^{-1}$  BW treatment. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between initial oocyte diameters, but significant differences were found between oocyte diameters at 24 h ( $P < 0.05$ ). The largest increase in oocyte diameter was

caso, todas las hembras se anestesiaron antes de la segunda inyección e inyectaron después de obtener una segunda biopsia ovárica. Los machos recibieron una sola inyección de 200 UI GCh  $\text{kg}^{-1}$  PC al mismo tiempo de la segunda inyección suministrada a las hembras.

En todos los experimentos, cada tanque se revisó regularmente para detectar huevos desovados, los cuales flotan en el agua. Una vez que se detectó el desove, se registró el número de horas transcurridas entre la aplicación de la segunda inyección y el desove (periodo de latencia), y los huevos flotantes se concentraron en el colector. Después de 48 h de iniciado el experimento, se sacaron los peces de los tanques y se estimó el número total de huevos desovados restantes tomando una muestra de volumen conocido y contando los huevos.

La tasa de fertilización se determinó en tres muestras, de 100 huevos cada una, contando el número de huevos con desarrollo embrionario y el número de huevos no fertilizados. El porcentaje de fertilización (%F) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%F = \left( \frac{\text{Número de huevos con desarrollo embrionario}}{\text{Número total de huevos}} \right) \times 100 \quad (1)$$

De las biopsias ováricas, se midió ( $\pm 0.01$  mm) con un estereoscopio (Meiji EMZ-5TR) el diámetro inicial promedio de los ovocitos a las 0 h (I0) y el diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h (I24) de 100 (experimento I) ó 30 ovocitos (experimentos II y III). El porcentaje de incremento en el diámetro de los ovocitos después de 24 h (PI) se calculó como:

$$PI = \left( \frac{I24 - I0}{I0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (SPSS 13) para detectar diferencias en los diámetros de los ovocitos a las 0 y 24 h, y entre los tratamientos. Para determinar el efecto de los tratamientos hormonales sobre el desarrollo del ovocito, se agruparon los datos de todas la hembras que recibieron dosis de SPC en los experimentos I y II, así como los de las hembras que recibieron dosis de GCh en los experimentos II y III, y se graficaron y compararon mediante un análisis de regresión.

## RESULTADOS

### Experimento I

Las hembras silvestres en el grupo control y en el tratamiento con 1.25 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC no desovaron. Solamente una hembra desovó con la dosis de 2.5 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC, mientras que en los tratamientos con dosis de 3.75, 4.0 y 4.5 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC desovaron dos hembras por tratamiento (tabla 1). Las hembras del tratamiento 3.75 mg SPC  $\text{kg}^{-1}$  PC

23.7 ± 7.3% in the 4.0 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW treatment. Maximum egg diameter was 0.830 ± 0.085 mm in the 4.0 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW treatment, corresponding to highest egg production (119,100 eggs) and highest fertilization rate (60%, table 2).

The shortest latency period was 32 h at 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW and the longest was 34 h at 500 and 750 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were detected between initial oocyte diameters for all treatments, but significant differences ( $P < 0.05$ ) in mean oocyte diameter at 24 h were observed between 750 and 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW. The increase in oocyte diameter was significantly different ( $P < 0.05$ ) among treatments, the highest value (25.8 ± 13.3%) corresponding to the 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatment. Maximum spawned egg diameter was 0.909 mm in the same treatment. In the 500 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatment, only one female spawned (4,113 eggs) and no fertilization occurred, whereas in the 750 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatment, one female spawned (31,000 eggs) and there was 45% fertilization. All females spawned in the 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatment, producing 27,000–73,000 eggs with fertilization rates of 85–95% (table 2).

### Experiment III

The latency period occurred between 9 and 14 h after the second injection (table 3), a shorter period than that obtained after one injection. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were detected between initial oocyte diameters for all treatments, but significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed between mean oocyte diameters at 24 h. The increase in oocyte diameter at 24 h after the first injection was high in the 700 + 700 and 900 + 700 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatments. Unlike the other experiments, in all treatments at least one female spawned and produced fertilized eggs. Two females treated with 750 + 250 IU hCG kg<sup>-1</sup>, two of the ones treated with 900 + 300 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW, and one female treated with 700 + 700 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW spawned (table 3). All females in the 900 + 700 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW treatment spawned more eggs (104,000–163,400 eggs) when compared to other treatments ( $P < 0.05$ ) and the fertilization rate was higher in two females (90–100%).

To view the effects of the CPS doses, all females that received this treatment were grouped and the initial oocyte diameter and mean oocyte diameter at 24 h of the spawned and unspawned females were plotted against the CPS doses (fig. 1). A significant positive correlation ( $P < 0.05$ ) was observed between mean oocyte diameter at 24 h and the CPS doses. Females with mean oocyte diameters of 0.450 mm (cage-grown females) and 0.800 mm (wild females) at 24 h spawned. There was a significant positive correlation ( $P < 0.05$ ) between the CPS doses and the increase in oocyte diameter (fig. 2). In wild females, spawning success was positive when there was a more than 80% increase in oocyte diameters.

produjeron pocos huevos, pero las hembras tratadas con 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC produjeron 115,500 y 125,500 huevos, aunque la diferencia entre las dosis suministradas fue muy poca. En la dosis de 4.5 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC, una hembra produjo 46,600 huevos, mientras que la otra hembra produjo muy pocos huevos. El tiempo promedio entre la inyección y el desove (periodo de latencia) fue de 28 ± 7.7 h, aunque varió de 22 h (tratamiento 4.5 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC) hasta 44 h (tratamiento 3.75 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC). El diámetro promedio de los huevos desovados fue 0.723 ± 0.027 mm ( $n = 100$ ). Después de 24 h, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el incremento en diámetro de los ovocitos.

### Experimento II

Ninguna hembra desovó en el tratamiento de control ni en el de 1.25 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC (tabla 2). En los tratamientos de 2.5, 3.75 y 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC solamente desovó una hembra por tratamiento. El periodo de latencia fue de 25 h en los tratamientos de 2.5 y 3.75 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC, y 28 h en el tratamiento 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC. No se detectaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diámetros de los ovocitos iniciales, pero sí existieron diferencias entre los diámetros a las 24 h ( $P < 0.05$ ). El mayor incremento en el diámetro de los ovocitos se observó en el tratamiento de 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC, cuyo valor fue de 23.7 ± 7.3%. El diámetro máximo de los huevos fue de 0.830 ± 0.085 mm en el tratamiento de 4.0 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC, correspondiendo también al mayor número de huevos producidos (119,100 huevos) y el porcentaje de fertilización más alto (60%, tabla 2).

El periodo de latencia más corto fue de 32 h con el tratamiento de 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC y el periodo más largo fue de 34 h con los tratamientos de 500 y 750 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC. No existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diámetros iniciales de los ovocitos para cada tratamiento, pero se observaron diferencias significativas en el diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h en los tratamientos de 750 y 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC ( $P < 0.05$ ). El incremento en diámetro de los ovocitos entre los tratamientos fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ), siendo el valor más alto (25.8 ± 13.3%) para el tratamiento de 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC. El diámetro máximo de los huevos desovados fue 0.909 mm y se observó en el mismo tratamiento. En el tratamiento de 500 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC sólo una hembra desovó (4,113 huevos) y no ocurrió la fertilización, mientras que en el tratamiento de 750 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC una hembra desovó (31,000 huevos) y ocurrió una fertilización de 45%. Todas las hembras desovaron con el tratamiento de 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC, produciendo de 27,500–73,000 huevos con porcentajes de fertilización de 85–95% (tabla 2).

### Experimento III

El periodo de latencia ocurrió entre 9 y 14 h después de la segunda inyección (tabla 3), un periodo más corto que el

**Table 1.** First experiment using increasing doses of carp pituitary suspension (CPS): number of females per treatment, mean body weight (mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), latency period after the last injection (mean  $\pm$  SD, minimum–maximum; NS = not spawned), initial (0 h) mean oocyte diameter ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD), mean oocyte diameter at 24 h ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD), increase in oocyte diameter at 24 h, and total number of eggs (females) spawned.

**Table 1.** Primer experimento con dosis crecientes de suspensión de pituitaria de carpa (CPS): número de hembras por tratamiento, peso corporal promedio (promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), periodo de latencia después de la última inyección (promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo; NS = no desovado), diámetro inicial promedio (0 h) de los ovocitos ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE), diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE), porcentaje de incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h y número total de huevos desovados (hembras desovadas).

	CPS dose (mg kg <sup>-1</sup> body weight)					
	0	1.25	2.5	3.75	4.0	4.5
Females ( <i>n</i> )	3	3	3	3	3	3
Mean body weight (kg)	2.0 $\pm$ 0.0 (2.0–2.0)	1.53 $\pm$ 0.74 (0.7–2.1)	1.77 $\pm$ 0.21 (1.6–2.0)	1.48 $\pm$ 0.48 (1.05–2.0)	1.80 $\pm$ 0.17 (1.70–2.0)	1.70 $\pm$ 0.44 (1.20–2.0)
Latency period (h)	NS	NS	27 $\pm$ 0.0 (27.0–27.0)	38 $\pm$ 8.5 (32.0–44.0)	24 $\pm$ 0.0 (24.0–24.0)	23 $\pm$ 1.4 (22.0–24.0)
Initial mean oocyte diameter (mm)	0.413 $\pm$ 0.008	0.421 $\pm$ 0.024	0.443 $\pm$ 0.060	0.433 $\pm$ 0.024	0.446 $\pm$ 0.040	0.419 $\pm$ 0.021
Mean oocyte diameter at 24 h (mm)	0.485 $\pm$ 0.030	0.541 $\pm$ 0.014	0.849 $\pm$ 0.078	0.849 $\pm$ 0.078	0.914 $\pm$ 0.114	0.865 $\pm$ 0.022
Oocyte diameter increase at 24 h (%)	17.4*	28.5*	72*	96*	105*	106.5*
Number of eggs (females) spawned	0	0	Few (1)	Few (2)	115,500–125,500 (2)	46,600–few (2)

\* Significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Second experiment using increasing doses of (a) carp pituitary suspension (CPS) and (b) human chorionic gonadotropin (hCG): number of females per treatment, mean body weight (mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), latency period after the last injection (NS = not spawned), initial (0 h) mean oocyte diameter ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD), mean oocyte diameter at 24 h ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD), percent increase in oocyte diameter after spawning ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD), total number of eggs (females) spawned, and percentage of fertilized eggs.

**Tabla 2.** Segundo experimento con dosis de (a) suspensión de pituitaria de carpa (CPS) y (b) gonadotropina coriónica humana (hCG): número de hembras por tratamiento, peso corporal promedio (promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), periodo de latencia después de la última inyección (NS = no desovado), diámetro inicial promedio (0 h) de los ovocitos ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE), diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE), porcentaje de incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h (promedio  $\pm$  DE), diámetro máximo de los huevos desovados ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE), número total de huevos desovados (hembras desovadas), y porcentaje de huevos fertilizados.

	CPS dose (mg kg <sup>-1</sup> body weight)				
	0	1.25	2.5	3.75	4.0
Females ( <i>n</i> )	3	3	3	3	3
Mean body weight (g)	596 $\pm$ 325 (573–619)	675 $\pm$ 280 (474–995)	492 $\pm$ 293 (473–480)	617.0 $\pm$ 171.8 (488–812)	574.1 $\pm$ 12.9 (559–583)
Latency period (h)	NS	NS	25 (one female)	25 (one female)	28 (one female)
Initial mean oocyte diameter (mm)	0.385 $\pm$ 0.117	0.409 $\pm$ 0.023	0.425 $\pm$ 0.021	0.406 $\pm$ 0.044	0.391 $\pm$ 0.060
Mean oocyte diameter at 24 h (mm)	0.350 $\pm$ 0.103	0.476.0 $\pm$ 0.028*	0.507 $\pm$ 0.072*	0.502 $\pm$ 0.083*	0.458 $\pm$ 0.117*
Oocyte diameter increase at 24 h (%)	-3.8 $\pm$ 2.5	16.5 $\pm$ 7.0	18.8 $\pm$ 11.0	23.1 $\pm$ 7.5	23.7 $\pm$ 7.3
Maximum egg diameter after spawning (mm)	-	-	0.784 $\pm$ 0.289	0.761 $\pm$ 0.151	0.830 $\pm$ 0.085
Total number of eggs (females) spawned	-	-	10,000 (1)	69,000 (1)	119,100 (1)
Fertilized eggs (%)	0	0	10	11	60
	hCG dose (IU kg <sup>-1</sup> body weight)				
	0	250	500	750	900
Females ( <i>n</i> )	3	3	3	3	3
Mean body weight (g)	570.7 $\pm$ 49.5 (520–619)	668.0. $\pm$ 280.1 (462–987)	492.3 $\pm$ 29.3 (473–526)	615.0 $\pm$ 174.1 (482–812)	571.3 $\pm$ 12 (559–583)
Latency period (h)	NS	NS	34 (one female)	34 (one female)	32–33–32
Initial mean oocyte diameter (mm)	0.392 $\pm$ 0.050	0.403 $\pm$ 0.047	0.391 $\pm$ 0.031	0.417 $\pm$ 0.012	0.406 $\pm$ 0.037
Mean oocyte diameter at 24 h (mm)	0.397 $\pm$ 0.060	0.442 $\pm$ 0.023	0.409 $\pm$ 0.076	0.476 $\pm$ 0.029*	0.514 $\pm$ 0.103*
Oocyte diameter increase at 24 h (%)	1.1 $\pm$ 2.5	10.3 $\pm$ 7.0	4.3 $\pm$ 11.	14.1 $\pm$ 4.2*	25.8 $\pm$ 13.3*
Maximum egg diameter after spawning (mm)	-	-	0.845	0.863	0.909
Total number of eggs (females) spawned	-	-	4,113 (1)	31,000 (1)	27,500–56,100–73,000 (3)
Fertilized eggs (%)	0	0	0	45	85, 90, 95

\* Significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Table 3.** Third experiment using increasing doses of human chorionic gonadotropin (hCG): number of females per treatment, mean body weight (mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), latency period after the last injection, initial (0 h) mean oocyte diameter ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), mean oocyte diameter at 24 h ( $n = 300$ , mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), percent increase in oocyte diameter at 24 h after first injection (mean  $\pm$  SD, minimum–maximum), total number of eggs (females) spawned, and percentage of fertilized eggs.

**Table 3.** Tercer experimento con dosis de gonadotropina coriónica humana (hCG): número de hembras por tratamiento, peso corporal promedio (promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), período de latencia después de la última inyección, diámetro inicial (0 h) de los ovocitos ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h ( $n = 300$ , promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), porcentaje de incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h después de la primera inyección (promedio  $\pm$  DE, mínimo–máximo), número total de huevos desovados (hembras desovadas), y porcentaje de huevos fertilizados.

	hCG dose (UI kg <sup>-1</sup> body weight)			
	1000 (750+250)	1200 (900+300)	1400 (700+700)	1600 (900+700)
Females ( $n$ )	3	3	3	3
Mean body weight (g)	553.0 $\pm$ 94.5 (453–641)	607.7 $\pm$ 134.6 (526–763)	650.0 $\pm$ 0.307 (368–977)	635.0 $\pm$ 101.4 (539–741)
Latency period (h)	14–14	13–13	11	9–10–10
Initial mean oocyte diameter (mm)	0.410 $\pm$ 0.004 (0.405–0.413)	0.401 $\pm$ 0.040 (0.358–0.436)	0.411 $\pm$ 0.032 (0.379–0.444)	0.395 $\pm$ 0.039 (0.373–0.440)
Mean oocyte diameter at 24 h (mm)	0.485 $\pm$ 0.019 (0.472–0.507)	0.456 $\pm$ 0.087 (0.358–0.524)	0.523 $\pm$ 0.121 (0.393–0.633)*	0.532 $\pm$ 0.085 (0.464–0.628)*
Oocyte diameter increase at 24 h (%)	18.2 $\pm$ 4.1 (14.5–22.6)	12.8 $\pm$ 11.0 (0.2–20.0)	27.0 $\pm$ 2.7 (4.9–43.1)	28.5 $\pm$ 13.0 (18.2–42.9)
Total number of eggs (females) spawned	16,000–25,340 (2)	26,300–40,800 (2)	76,500 (1)	104,000–106,633–163,400 (3)*
Fertilized eggs (%)	75–60	70–75	80	90,100, 56

\* Significant differences ( $P < 0.05$ ).

The cage-grown females that received hCG doses spawned when their mean oocyte diameters at 24 h were larger than 0.450 mm with doses over 800 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW (fig. 3). The relationship between the hCG doses and the increase in oocyte diameter at 24 h in cage-grown females showed that there should be an increase of at least 15% in oocyte diameter for spawning to occur (fig. 4).

## DISCUSSION

The CPS hormone has been used mainly in freshwater species, and the present study is one of the first attempts to use this hormone to induce spawning in *L. guttatus*. Intramuscular injections of CPS induced an increase in oocyte diameter of more than 100% with the 3.75 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW dose. The number of eggs released in the 3.75 and 4.0 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW treatments was very different despite the similarity of the dosage (table 1). These differences are likely related to the reduced number of females used ( $n = 3$ ). Wild females released eggs only once, a behavior observed in other hormone treatments (Ibarra-Castro and Duncan 2007, Ibarra-Castro and Alvarez-Lajonchere 2009).

In the first and second experiments, it is shown that CPS can be an effective agent for inducing final maturation and ovulation in *L. guttatus*. The effect was evident in the high-dose treatments (table 1). In the 3.75, 4.0, and 4.5 mg CPS kg<sup>-1</sup> BW treatments, two females spawned per dose and only one did not. The CPS hormone is a viable alternative and can be used in an emergency when other hormones (hCG or GnRH $\alpha$ ) are not available. In this study, spawning occurred 22–44 h after the last injection (latency period) when using CPS. In other species like *Lutjanus argentimaculatus*,

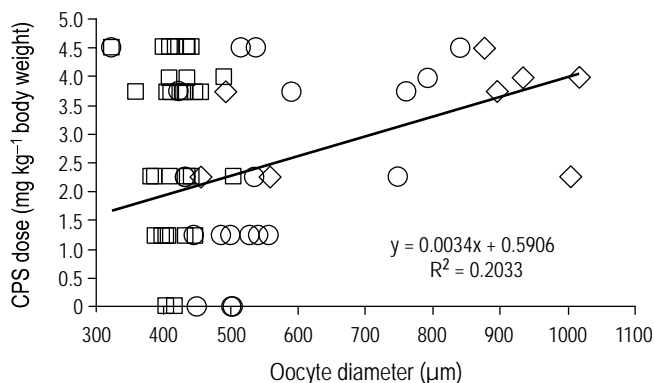
obtenido con la aplicación de una sola inyección. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diámetros iniciales promedio de los ovocitos entre tratamientos, pero hubo diferencias significativas entre los diámetros promedio de los ovocitos a las 24 h ( $P < 0.05$ ). El incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h después de la primera inyección fue mayor en los tratamientos de 700 + 700 y 900 + 700 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC. A diferencia de los otros experimentos, en todos los tratamientos al menos una hembra desovó y produjo huevos fertilizados. Dos hembras tratadas con la dosis de 750 + 250 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC, dos de las tratadas con la dosis 900 + 300 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC y una hembra tratada con la dosis de 700 + 700 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC desovaron (tabla 3). Todas las hembras tratadas con la dosis de 900 + 700 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC desovaron mayor cantidad de huevos (104,000–163,400 huevos) al compararlos con los otros tratamientos ( $P < 0.05$ ), y la tasa de fertilización fue más alta en dos de las hembras (90–100%).

Para poder observar el efecto de las dosis de la hormona SPC, se agruparon todas las hembras que recibieron este tratamiento y se graficaron las dosis contra el diámetro inicial de los ovocitos y el diámetro de los ovocitos a las 24 h de las hembras desovadas y no desovadas (fig. 1). Los resultados muestran una correlación significativa positiva ( $P < 0.05$ ) entre el diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h y las dosis de SPC. Las hembras cuyo diámetro promedio de ovocito a las 24 h superó los 0.450 mm (hembras criadas en cautiverio) y 0.800 mm (hembras silvestres) desovaron. Se observó una correlación significativa positiva ( $P < 0.05$ ) entre el incremento en diámetro de los ovocitos y las dosis de SPC (fig. 2). En el caso de las hembras silvestres, sólo aquellas que superaron el 80% de incremento en el diámetro de los ovocitos desovaron.

Las hembras criadas en jaulas flotantes y tratadas con dosis de GCh desovaron cuando el diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h fue superior a 0.450 mm, utilizando dosis mayores de 800 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC (fig. 3). Al relacionar el incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h con la dosis hormonal de GCh (fig. 4) se observa que, para hembras criadas en jaulas flotantes, los ovocitos deben tener un incremento de al menos un 15% en el diámetro promedio para poder desovar.

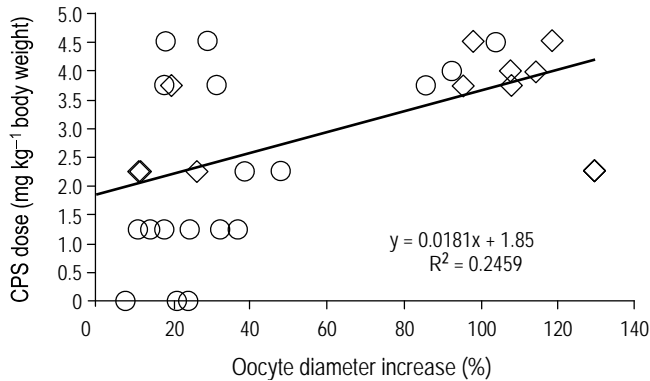
## DISCUSIÓN

La SPC se ha utilizado principalmente en especies de agua dulce, y el presente estudio es uno de los primeros trabajos en utilizar esta hormona para la inducción al desove en *L. guttatus*. La SPC suministrada intramuscularmente provocó incrementos en el diámetro de los ovocitos de más de 100% en dosis superiores a los 3.75 mg SPC kg<sup>-1</sup> PC. El número de huevos desovados en los tratamientos de 3.75 y 4.0 mg CPS kg<sup>-1</sup> PC fue muy diferente, si se toma en cuenta que las dosis son similares (tabla 1). Esto probablemente se deba al número reducido de hembras utilizadas ( $n = 3$ ) en



**Figure 1.** Relationship between the dose of carp pituitary suspension (CPS) and initial oocyte diameter (□), mean oocyte diameter at 24 h of unspawned females (○), and mean oocyte diameter at 24 h of spawned females (◇) in spotted rose snapper.

**Figura 1.** Relación entre la dosis de suspensión de pituitaria de carpa (CPS) y el diámetro inicial de los ovocitos (□), el diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h de hembras no desovadas (○) y el diámetro de los ovocitos a las 24 h de hembras desovadas (◇) de pargo manchado.



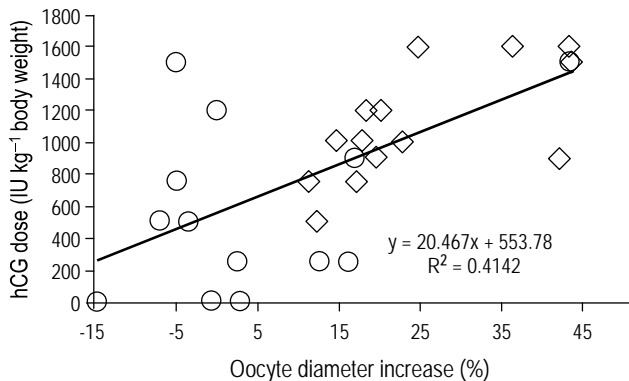
**Figure 2.** Relationship between the dose of carp pituitary suspension (CPS) and increase in oocyte diameter at 24 h of unspawned (○) and spawned (◇) female spotted rose snapper.

**Figura 2.** Relación entre la dosis de suspensión de pituitaria de carpa (CPS) y el incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h de hembras de pargo manchado no desovadas (○) y desovadas (◇).

*L. campechanus*, *L. johnii*, and *L. griseus*, spawning occurred 24–56 h after a single injection of hCG (Emata *et al.* 1994, 1999; Cabrera *et al.* 1998; Watanabe *et al.* 1998; Bourque and Phelps 2007; Boza-Abarca *et al.* 2008).

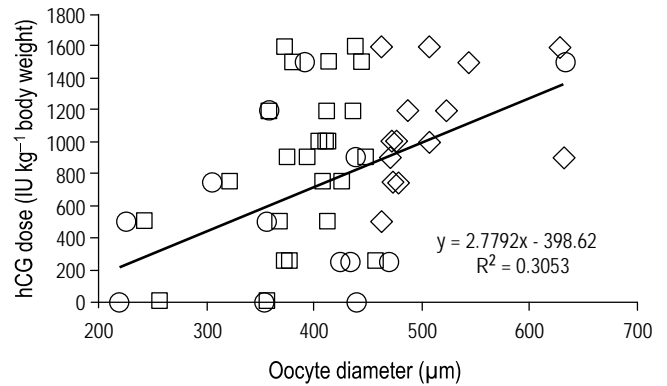
The capture and handling of wild fish can slow down final maturation and ovulation, increasing the latency period (Bromage 1995). In this study, females were on the line hook for 7–8 h and it took 0.5–1.0 h to reach the laboratory. This protocol represents stressful conditions for the fish. However, the performance of cage-grown females (experiment II) was comparable to that of wild females (experiment I).

Effective doses of hCG (experiments II and III) were in the range used for other snapper species. In some studies spawning was induced in *L. analis*, *L. argentimaculatus*,



**Figure 4.** Relationship between the dose of human chorionic gonadotropin (hCG) and increase in oocyte diameter at 24 h of unspawned (○) and spawned (◇) female spotted rose snapper.

**Figura 4.** Relación entre la dosis de gonadotropina coriónica humana (hCG) y el incremento en el diámetro de los ovocitos a las 24 h de hembras de pargo manchado no desovadas (○) y desovadas (◇).



**Figure 3.** Relationship between the dose of human chorionic gonadotropin (hCG) and initial oocyte diameter (□), mean oocyte diameter at 24 h of unspawned females (○), and mean oocyte diameter at 24 h of spawned females (◇) in spotted rose snapper.

**Figura 3.** Relación entre la dosis de gonadotropina coriónica humana (hCG) y el diámetro inicial de los ovocitos (□), diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h de hembras no desovadas (○) y diámetro promedio de los ovocitos a las 24 h de hembras desovadas (◇) de pargo manchado.

cada tratamiento. Las hembras salvajes desovaron una sola vez, comportamiento que se ha observado también al aplicar otras hormonas (Ibarra-Castro y Duncan 2007, Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere 2009).

En el primer y el segundo experimento se demostró que la SPC puede ser un agente efectivo para inducir la maduración final y la ovulación en hembras de *L. guttatus*. El efecto fue evidente en las dosis altas (tabla 1). Cuando se utilizaron 3.75, 4.0 y 4.5 mg CPS kg<sup>-1</sup> PC, dos de las hembras desovaron por tratamiento y solamente una no lo hizo. La SPC es una alternativa viable al uso de otras hormonas y se puede utilizar en casos de emergencia; por ejemplo, la falta o accesibilidad a la GCh o a la GnRHα. En este estudio, al utilizar SPC, los desoves ocurrieron entre 22 y 44 h después de la segunda inyección (periodo de latencia). En comparación con otras especies como *Lutjanus argentimaculatus*, *L. campechanus*, *L. johnii* y *L. griseus*, las cuales fueron inyectadas una vez con GCh, los desoves ocurrieron 24–56 h después de la inyección (Emata *et al.* 1994, 1999; Cabrera *et al.* 1998; Watanabe *et al.* 1998; Bourque y Phelps 2007; Boza-Abarca *et al.* 2008).

La captura y el manejo de peces silvestres pueden retrasar la maduración final y la ovulación, incrementándose el periodo de latencia (Bromage 1995). En este estudio, las hembras salvajes duraron 7–8 h retenidas en la línea de anzuelos, y se tomó al menos 0.5–1.0 h para llegar al laboratorio. Este protocolo representa condiciones estresantes para los peces. Sin embargo, al utilizar las hembras criadas en jaulas flotantes (experimento II), los resultados son comparables a los obtenidos para las hembras silvestres (experimento I).

En el caso de la GCh (experimentos II y III) se observó que las dosis efectivas utilizadas en este trabajo se encuentran

*L. campechanus*, and *L. griseus* with doses of 1000–6300 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW (Minton *et al.* 1983, Emata *et al.* 1994, Rosas *et al.* 1998, Watanabe *et al.* 1998), while other studies required doses of 100–500 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW for *L. johnii* and *L. argentimaculatus* (Lim *et al.* 1985, Singhagraiwan and Doi 1993).

In this study, cage-grown fish matured at 368–987 g BW and 32–36 cm TL, which is an advantage when hormonal induction protocols are used since the amount of hormone needed to induce spawning is lower. In the case of *L. guttatus*, it is not necessary to grow the fish until attaining maximum weight, because they can mature before. The females and males used in our experiments did not weigh more than 1 kg.

*Lutjanus guttatus* is characterized as a gonochoronic batch spawner (Ibarra *et al.* 2004, Ibarra-Castro and Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008), with asynchronous oocyte development. This is consistent with other species showing polymodality when females attain maturity (Grimes 1987). However, a unimodal distribution of oocyte diameter prior to successfully induced spawning was observed in *L. analis* (Watanabe *et al.* 1998). Hormonal doses should thus be adjusted at 24 h, when at least two doses are administered, based on the results of the ovarian biopsy.

The recruitment process of mature oocytes from the primary oocyte pool is not yet understood in lutjanids, and the relationship between the number of modes and the number of spawns is unclear (Grimes 1987, Watanabe *et al.* 1998). In our laboratory, *L. guttatus* oocytes of 0.500–0.600 mm have shown oil drops even though germinal vesicle migration had not yet occurred (unpublished data). This indicates that hormonal stimulation can advance oocyte development to the oil drop stage before the oocyte is ready for spawning. The batch of oocytes ready to be spawned will receive the last stimulation and this will affect the other oocytes that are not ready to be spawned, resulting in the release of a large amount of poor-quality eggs. For hormone dosage, it is therefore necessary to consider mean oocyte diameter at 24 h, as well as fish total weight, age, and stress during the entire induction process.

Differences in the latency period were found when fish were injected with single or double injections. In the second experiment, five of the twelve females treated with hCG spawned after more than 24 h, while three females spawned with CPS induction. This can be explained by assuming that some of the treatments using low doses in the first injection did not provide enough stimulus to induce spawning in the first 24 h. The ovulation times reported by Tucker (1998) vary widely, from hours (*L. analis*, two injections, 33 h; *L. argentimaculatus*, 27 h; *L. griseus*, 31–70 h) to days (*L. argentimaculatus*, 24–264 h; *L. johnii*, 36–132 h), using different treatments of hCG and other hormones (Lim *et al.* 1985, Singhagraiwan and Doi 1993, Tucker 1998, Watanabe *et al.* 1998, Cabrera *et al.* 1998). After induction of

en el intervalo de las dosis aplicadas en otras especies. En algunos trabajos la cantidad de GCh necesaria para inducir el desove en *L. analis*, *L. argentimaculatus*, *L. campechanus*, y *L. griseus* fluctuó entre 1000 y 6300 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC (Minton *et al.* 1983, Emata *et al.* 1994, Rosas *et al.* 1998, Watanabe *et al.* 1998), mientras que en otros estudios se necesitaron dosis de 100–500 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC para *L. johnii* y *L. argentimaculatus* (Lim *et al.* 1985, Singhagraiwan y Doi 1993).

En el presente estudio, los peces criados en jaulas flotantes maduraron a 368–987 g PC y 32–36 cm LT, lo cual representa una ventaja al aplicar protocolos de inducción hormonal, debido a que la cantidad de hormona necesaria para inducir al desove es menor. En *L. guttatus* no es necesario criar los peces hasta su peso máximo, debido a que pueden madurar mucho antes. Los machos y las hembras utilizados en los diferentes experimentos no pesaron más de 1 kg.

*Lutjanus guttatus* se caracteriza por ser gonocorista por grupos (Ibarra *et al.* 2004, Ibarra-Castro y Duncan 2007, Boza-Abarca *et al.* 2008), siendo el patrón de desarrollo de los ovocitos asincrónico. Esto es consistente con otras especies que muestran multimodalidad una vez que las hembras alcanzan la madurez (Grimes 1987). Sin embargo, se observó una distribución unimodal del diámetro de los ovocitos en *L. analis* antes de lograr un desove inducido exitoso (Watanabe *et al.* 1998). Así, las dosis hormonales aplicadas a peces silvestres deberían ser ajustadas a las 24 h, cuando se aplican al menos dos dosis, con base en el resultado obtenido de una biopsia ovárica.

El proceso de reclutamiento de los ovocitos maduros provenientes del total de ovocitos primarios no está esclarecido en los lutjánidos, y la relación entre el número de modas y número de desoves tampoco es clara (Grimes 1987, Watanabe *et al.* 1998). En nuestro laboratorio se ha observado que los ovocitos de *L. guttatus* entre 0.500 y 0.600 mm pueden presentar gotas de aceite, pero aún no ha ocurrido la migración de la vesícula germinal (datos no publicados). Esto evidencia que la estimulación hormonal adelanta el desarrollo del ovocito hasta el estado de gota de aceite, antes que el ovocito esté listo para la ovulación. El grupo de ovocitos que están listos para ser desovados recibirán la última estimulación, lo cual a su vez afecta a los ovocitos que no estaban listos para ser desovados; esto provoca la liberación de una gran cantidad de huevos con una fracción alta de pobre calidad. De esta manera, la dosis hormonal a ser aplicada está condicionada al diámetro promedio del ovocito, al peso total, a la edad y al estrés de los peces durante todo el proceso de inducción.

Se observaron diferencias en los periodos de latencia cuando se inyectaron los peces una o dos veces. En el segundo experimento, cinco de las doce hembras inyectadas con GCh desovaron después de más de 24 h, mientras que tres desovaron al ser inyectadas con SPC. Esto puede explicarse

*L. argentimaculatus* females with GnRHa, a latency period of 38.0–38.5 h was determined (Emata 2003), whereas for *L. guttatus*, a latency period of 32–40 h was obtained (Ibarra-Castro and Duncan 2007). In our case, the latency period with one hCG injection was 32–34 h, while with two hCG injections it was 9–14 h after the second injection; however, if the time interval between the first and second injections (24 h) is taken into account, the values are similar to those of Ibarra-Castro and Duncan (2007).

With one injection (experiment II) of 900 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW, not more than 73,000 eggs were produced; with two injections (experiment III), more than 100,000 eggs were produced after the second injection. Tucker (1998) states that a common practice is to space the injections not less than 24 h apart to ensure high hormone levels in the blood. The number of injections required and the time interval between them will also depend on the species, initial degree of maturity, and water temperature.

The variable response to the treatment applied to female *L. guttatus* suggests variations during the final stimulation. In some species, hCG has a low biopotency and high doses or multiple injections are required. In the third experiment, fish were injected twice and the stimulus of the hormonal treatment was maintained for a longer period. The large number of spawned eggs and the high fertilization percentages associated with the high hCG doses (900 + 700 IU hCG kg<sup>-1</sup> BW) showed that the stimulus was sustained long enough to produce good results. It is possible that treatments with slow-release pellets containing GnRHa, LHRHa or hCG could prove to be more effective (Mugnier *et al.* 2000). Zohar and Mylonas (2001) suggested using these delivery systems to alleviate the need for multiple treatments and induce multiple spawning in fish with asynchronous or multiple-batch group-synchronous ovarian physiology. Recently, Ibarra-Castro and Duncan (2007) and Ibarra-Castro and Alvarez-Lajonchere (2009) demonstrated that variable GnRHa doses induce spawning of wild *L. guttatus* females with body weights similar to those used in this study and with late vitellogenic oocyte diameters of 0.430 mm. Moreover, the model proposed by Ibarra-Castro and Duncan (2007) predicts that females with oocyte diameters of 0.440–0.500 mm can produce around 100,000 eggs using 240–280 µg GnRHa kg<sup>-1</sup> BW.

Cano (2003) and Boza-Abarca *et al.* (2008) reported natural spawnings of *L. guttatus* months after hormonal induction with hCG, while some authors have reported spawnings of other lutjanid species without hormonal stimulus (Singhagraiwan and Doi 1993, Avilés-Quevedo *et al.* 1996, Papanikos *et al.* 2003, Leu *et al.* 2003). The relationship between synchronization of environmental variables, like temperature and photoperiod, and spawning has been documented (Arnold *et al.* 1978, Emata 2003, Boza-Abarca *et al.* 2008), whereas some authors did not find any relation (Davis and West 1993, Jackson *et al.* 2006). These observations suggest that spontaneous spawning can be achieved

suponiendo que algunos de los tratamientos en los cuales se utilizaron dosis bajas en la primera inyección no estimularon lo suficiente para inducir el desove en las primeras 24 h. Los tiempos de ovulación reportados por Tucker (1998) varían desde horas (*L. analis*, dos inyecciones, 33 h; *L. argentimaculatus*, 27 h; *L. griseus*, 31–70 h) hasta días (*L. argentimaculatus*, 24–264 h; *L. johnii*, 36–132 h), al utilizar diferentes tratamientos de GCh y otras hormonas (Lim *et al.* 1985, Singhagraiwan y Doi 1993, Tucker 1998, Watanabe *et al.* 1998, Cabrera *et al.* 1998). Después de la inducción en hembras de *L. argentimaculatus* con GnRHa se determinó un periodo de latencia de 38.0–38.5 h (Emata 2003), mientras que con *L. guttatus* se registró un tiempo de latencia de 32–40 h (Ibarra-Castro y Duncan 2007). En el presente estudio, el periodo de latencia con una sola inyección de GCh fue de 32–34 h, mientras que con dos inyecciones el periodo fue de 9–14 h, a partir de la segunda inyección. Sin embargo, si se toma en cuenta el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda inyección (24 h), los valores son similares a los reportados por Ibarra-Castro y Duncan (2007).

Con una inyección (experimento II) de 900 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC no se produjeron más de 73,000 huevos, mientras que con las dos inyecciones (experimento III) se produjeron desoves de más de 100,000 huevos. Tucker (1998) afirma que una práctica usual es el de distribuir las inyecciones en un tiempo prudencial no menor de 24 h, garantizando los niveles altos de la hormona en la sangre. El número necesario de inyecciones y el intervalo entre inyecciones va a depender también de la especie, el grado inicial de madurez y la temperatura del agua.

La variabilidad en la respuesta a los tratamientos aplicados a las hembras de *L. guttatus* se puede deber a diferencias durante la estimulación final. En algunas especies, la GCh tiene una baja biopotencia y se requieren dosis altas o inyecciones múltiples. En el tercer experimento, los peces se inyectaron dos veces y el estímulo del tratamiento hormonal se mantuvo por un periodo más largo. La gran cantidad de huevos desovados y los altos porcentajes de fertilización relacionados con altas dosis de GCh (900 + 700 UI GCh kg<sup>-1</sup> PC) demuestran que el estímulo se sostuvo el tiempo suficiente para producir buenos resultados. Probablemente la utilización de cápsulas liberadoras conteniendo GnRHa, LHRHa o la misma GCh como tratamientos sea una forma más efectiva de estimulación (Mugnier *et al.* 2000). Zohar y Mylonas (2001) sugieren utilizar estos sistemas liberadores para evitar la necesidad de tratamientos múltiples e inducir desoves múltiples en peces con una fisiología ovárica asincrónica o sincrónica por grupos múltiples. Ibarra-Castro y Duncan (2007) e Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere (2009) demostraron que dosis variables de GnRHa inducen al desove en hembras silvestres de *L. guttatus* con pesos relativamente parecidos a los utilizados en este trabajo y con ovocitos vitelógenicos tardíos con un diámetro de 0.430 mm. Además, el modelo propuesto por Ibarra-Castro y Duncan (2007) propone que las hembras con ovocitos con un diámetro entre

in the laboratory during the natural spawning season, with fish adapted to captivity conditions (environmental and nutritional) appropriate for their maturation and spawning, but that artificial stimulation is necessary outside the natural spawning season.

In summary, to induce spawning of *L. guttatus*, in the case of CPS we recommend using a dose of 4.0 mg kg<sup>-1</sup> PC in one injection. In the case of hCG, we recommend a dose of 1600 IU kg<sup>-1</sup> BW divided in two injections, the first containing 900 IU kg<sup>-1</sup> BW and the second, administered 24 h later, 700 IU kg<sup>-1</sup> BW. The hCG dose can be adapted by doing an ovarian biopsy to determine the dose based on the maximum diameter and degree of hydration of the oocytes. Nevertheless, it is important to continue with the standardization of hormonal doses and to avoid the stress conditions generated by the ovarian biopsy at 24 h in future studies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by Ley del Atún No. 6267. The authors are grateful to Captain O Torres for collecting and transporting the wild and cage-grown animals, and would like to thank the anonymous reviewers for their detailed revision of the manuscript.

#### REFERENCES

- Arellano-Martínez M, Rojas-Herrera A, García-Domínguez F, Caballos-Vazquez BP, Villarejo-Fuerte M. 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunajero *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869) en las costas de Guerrero, México. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 36: 1–8.
- Arnold C, Wakeman J, Williams T, Treece G. 1978. Spawning of red snapper (*Lutjanus campechanus*) in captivity. Aquaculture 15: 301–302.
- Avilés-Quevedo A, Reyes L, Valdés S, Hiraes O, Rodríguez R, McGregor U, Lizawa M. 1996. Manejo de reproductores y producción de huevos de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) bajo condiciones de cultivo. In: Silva A, Merino G (eds.), Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2° Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile, pp. 244–247.
- Benetti D, Wilson E. 1996. Estado actual y perspectivas del cultivo de peces marinos en el Ecuador. In: Silva A, Merino G (eds.), Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2° Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile, pp. 5–14.
- Bourque BD, Phelps RP. 2007. Induced spawning and egg quality evaluation of red snapper, *Lutjanus campechanus*. J. World Aquacult. Soc. 38: 208–217.
- Boza-Abarca J, Calvo-Vargas E, Solís-Ortiz N, Komen J. 2008. Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica. Cienc. Mar. 34: 239–252.
- Bromage NR. 1995. Broodstock management and egg and seed quality. In: Bromage NR, Roberts RJ (eds.), Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell, Oxford, pp. 1–24.
- Cabrera JR, Cabrera TB, Millán JQ. 1998. Spawning induction of the mangrove snapper, *Lutjanus griseus* Linnaeus (Pisces: Lutjanidae), matured in captivity. Arq. Cien. Mar. 31(1–2): 57–63.
- Cano A. 2003. Reproduction in captivity and cultivation of the Pacific rose spotted snapper *Lutjanus guttatus* in the Republic of Panama. World Aquaculture 2003. World Aquaculture Society, pp. 153.
- Clarke ME, Domeier ML, Laroche WA. 1997. Development of larvae and juveniles of the mutton snapper (*Lutjanus analis*), lane snapper (*Lutjanus synagris*) and yellowtail snapper (*Lutjanus chrysurus*). Bull. Mar. Sci. 61: 511–537.
- Davis TLO, West GJ. 1993. Maturation, reproductive seasonality, fecundity, and spawning frequency in *Lutjanus vittus* (Quoy and Gaimard) from the North West Shelf of Australia. Fish. Bull. 91: 224–236.
- Dumas S, Rosales-Velásquez M, Contreras-Olguín M, Hernández-Ceballos D, Silverberg N. 2004. Gonadal maturation in captivity

0.440 y 0.500 mm producirán alrededor de 100,000 huevos utilizando dosis de 240–280 µg GnRHa kg<sup>-1</sup> PC.

Algunos autores han reportado desoves naturales meses después de realizar una inducción hormonal al desove con GCh (Cano 2003, Boza-Abarca *et al.* 2008), mientras que otros autores reportan desoves en otras especies de lutjánidos sin necesidad de estímulo (Singhagrainwan y Doi 1993, Avilés-Quevedo *et al.* 1996, Papanikos *et al.* 2003, Leu *et al.* 2003). Se ha documentado la relación entre la sincronización del desove con variables ambientales como la temperatura y el fotoperiodo (Arnold *et al.* 1978, Emata 2003, Boza-Abarca *et al.* 2008), mientras que otros autores no han obtenido esta relación con otras especies (Davis y West 1993, Jackson *et al.* 2006). Lo anterior demuestra que es posible obtener desoves espontáneos en el laboratorio durante la época natural de desove, con peces adaptados a las condiciones (ambiental y nutricional) de cautiverio propicias para su maduración y desove, pero es necesaria una estimulación durante aquellos periodos fuera de la época de desove.

En conclusión, para la inducción al desove de *L. guttatus* con SPC se recomienda una dosis de 4.0 mg kg<sup>-1</sup> PC suministrada en una inyección. Para el caso de la GCh, se recomienda una dosis de 1600 UI kg<sup>-1</sup> PC dividida en dos dosis, una dosis inicial de 900 UI kg<sup>-1</sup> PC y una segunda, suministrada 24 h después de la primera, de 700 UI kg<sup>-1</sup> PC. La dosis de GCh se puede readecuar mediante una biopsia ovárica, con el fin de determinar la dosis con base en el diámetro máximo y el grado de hidratación de los ovocitos. Sin embargo, es importante continuar con la estandarización de las dosis y evitar el estrés generado por la toma de una biopsia a las 24 h en futuros trabajos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Ley del Atún No. 6267. Los autores agradecen al capitán O Torres por cooperar en las recolecciones y el transporte de los peces silvestres y criados en las jaulas. También se agradece a los revisores anónimos su revisión detallada del manuscrito.

- and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture* 234: 615–623.
- Emata AC. 2003. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: A potential candidate species for sustainable aquaculture. *Aquacult. Res.* 34: 849–857.
- Emata A, Eullaran B, Bagarinao T. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture* 121: 381–387.
- Emata A, Damaso J, Eullaran B. 1999. Growth, maturity and induced spawning of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, broodstock reared in concrete tanks. *Isr. J. Aquacult./Bamidgeh* 51(2): 58–64.
- Fielder DS, Bardsley WJ, Allan GL, Pankhurst PM. 2002. Effect of photoperiod on growth and survival of snapper *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture* 211: 135–150.
- Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter K, Niem V. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. III. Vertebrados: Parte 2. FAO, Rome, pp. 1201–1813.
- Grimes C. 1987. Reproductive biology of the Lutjanidae: A review. In: Polovina JJ, Ralston S (eds.), *Tropical Snappers and Groupers Ecology and Fisheries Management*. Westview Press, Boulder, pp. 239–294.
- Ibarra L, Dumas S, Duncan N. 2004. Gonad development and LHRHa-induced spawning in female spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Abstract, 5th International Symposium on Fish Endocrinology. 5–9 September, Castellón, Spain, 1 pp.
- Ibarra-Castro L, Duncan NJ. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272: 737–746.
- Ibarra-Castro L, Alvarez-Lajonchere L. 2009. Improved induced-spawning protocol for the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *Isr. J. Aquacult./Bamidgeh* 61:121–133.
- Jackson MW, Nieland DL, Cowan JH. 2006. Diel spawning periodicity of red snapper *Lutjanus campechanus* in the northern Gulf of Mexico. *J. Fish Biol.* 68: 695–706.
- Leu MY, Chen IH, Fang LS. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. *Isr. J. Aquacult./Bamidgeh* 55: 22–30.
- Lim LC, Cheong L, Lee HB, Heng HH. 1985. Induced breeding studies of the John's snapper, *Lutjanus johni* (Bloch), in Singapore. *Singapore J. Prim. Ind.* 13: 70–83.
- Minton RV, Hawke JP, Tatum WM. 1983. Hormone induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture* 30: 1–4.
- Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E, Fostier A, Breton B. 2000. Induction and synchronization of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustainable-release GnRH-a pellet. *Aquaculture* 181: 241–255.
- Ogle JT, Lotz JM. 2006. Characterization of an experimental indoor larval production system for red snapper. *North Am. J. Aquacult.* 68: 86–91.
- Papanikos N, Phelps RP, Williams K, Ferry A, Maus D. 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 487–488.
- Rojas JR. 1997a. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 44/45: 471–476.
- Rojas JR. 1997b. Fecundidad y época de reproducción del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 44/45: 477–487.
- Rojas JR, Maravilla E, Chicas B. 2004. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Los Cóbano y Puerto La Libertad, El Salvador. *Rev. Biol. Trop.* 52: 163–170.
- Rosas JC, Cabrera TB, Millán JQ. 1998. Inducción al desove del pargo de mangle, *Lutjanus griseus* Linnaeus (Pisces: Lutjanidae), sexualmente maduro en cautiverio. *Arq. Cien. Mar.* 31: 57–63.
- Siefke K. 1995. Zur Fischerei und Populations dynamik des “pargo de la mancha” (*Lutjanus guttatus*) im Golf von Nicoya, Costa Rica. M.Sc. thesis, Center for Tropical Marine Ecology, University of Bremen, Germany, 72 pp.
- Singhagruiwan T, Doi M. 1993. Induced spawning and larval rearing of the red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, at the Eastern Marine Fisheries Development Center. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* 4: 45–57.
- Soto RLR, Mejía-Arana F, Palacios JA, Hiramatsu K. 2009. Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 57: 125–131.
- Tucker J, Jory D. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquacult.* 22: 10–25.
- Tucker JW Jr. 1998. *Marine Fish Culture*. 1st ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 750 pp.
- Valverde S, Boza JA. 1999. Inducción al desove en hembras del pargo mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869). *UNICIENCIA* 15–16: 65–69.
- Watanabe W, Ellis E, Ellis S, Chaves J, Manfredi C. 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 176–187.
- Zohar Y, Mylonas C. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99–136.

Received June 2010;  
accepted February 2011.