

Inducción hormonal del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) y calidad de los desoves en condiciones de laboratorio

Hormonal induction of flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) and spawning quality by laboratory conditions

Lili Carrera^{1,3}, Noemí Cota¹, Joel Linares¹, Angélica Castro¹,
Melissa Montes¹, Leenin Flores²

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo inducir al desove a hembras maduras de *Paralichthys adspersus* (lenguado) utilizando una hormona análoga a la gonadotropina (GnRH α) y determinar la calidad de huevos y larvas obtenidas en los periodos de 2014 y 2015. Se seleccionaron hembras con ovocitos en maduración avanzada (542.61 μ m), que desovaron luego de un periodo de latencia de 45-48 h a una temperatura de 16.46 \pm 0.06 °C. El porcentaje de fecundación fue mayor al 70% en ambos periodos. Los huevos fecundados presentaron un diámetro de 857.98 \pm 5.90 μ m y la gota oleosa de 168.76 \pm 5.31 μ m. La eclosión ocurrió a las 48 h posteriores al desove a 18.03 \pm 0.13 °C, con porcentajes entre 16.7 a 94.0% para ambos periodos. Para la calidad de larvas se determinó el Índice de Sobrevivencia Larval (ISL), donde las larvas sobrevivieron la inanición hasta por 11 días. El valor más alto de ISL fue de 31.2% en 2014 y de 22.9% en 2015. La mortalidad acumu-

¹ Laboratorio de Cultivo de Peces, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú- IMARPE, Callao, Perú

² Laboratorio de Análisis Instrumental, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú- IMARPE, Callao, Perú

³ E-mail: lcarrera@imarpe.gob.pe

El trabajo de investigación fue financiado por el programa presupuestal N° 0094 Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura, con el proyecto «Acondicionamiento y Reproducción de especies priorizadas» del Instituto del Mar del Perú

Recibido: 7 de abril de 2021

Aceptado para publicación: 29 de diciembre de 2021

Publicado: 25 de febrero de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

lada al día 3 (MA3) fue mayor en diciembre (21.1%) de 2014 y en abril (13.7%) de 2015. La composición proximal de los huevos fue de 47.1% proteínas, 17.4% lípidos y 3.9% carbohidratos. Los ácidos grasos (mg/g de muestra seca) muestran una predominancia de ácidos grasos poliinsaturados, seguido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. El DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6n-3) fue el más abundante de los poliinsaturados, seguido del EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3) y ARA (ácido araquidónico 20:4n-6). La relación DHA: EPA fue de 3.4 ± 0.5 . Se concluye que la inducción hormonal con GnRHa permitió obtener huevos y larvas de calidad, sin embargo, se requiere considerar una dieta especie específica para reproductores que puedan asegurar una buena calidad de la progenie.

Palabras clave: *Paralichthys adspersus*, desove, inducción hormonal, reproductor, GnRH

ABSTRACT

The aim of this objective study was to induce the spawning of mature females of *Paralichthys adspersus* (sole) using a hormone analogue to gonadotropin (GnRH_a) and to determine the quality of eggs and larvae obtained in the periods of 2014 and 2015. Females with oocytes were selected in advanced maturation (542.61 μm), which spawned after a latency period of 45-48 h at a temperature of 16.46 ± 0.06 °C. The percentage of fertilization was greater than 70% in both periods. The fertilized eggs had a diameter of 857.98 ± 5.90 μm and the oily droplet of 168.76 ± 5.31 μm . Hatching occurred 48 hours after spawning at 18.03 ± 0.13 °C, with percentages between 16.7 and 94.0% for both periods. For larval quality, the Larval Survival Index (ISL) was determined, where the larvae survived starvation for up to 11 days. The highest ISL value was 31.2% in 2014 and 22.9% in 2015. The accumulated mortality at day 3 (MA3) was higher in December 2014 (21.1%) and in April 2015 (13.7%). The proximal composition of eggs was 47.1% protein, 17.4% lipids and 3.9% carbohydrates. Fatty acids (mg/g of dry sample) show a predominance of polyunsaturated fatty acids, followed by saturated and monounsaturated fatty acids. DHA (docosahexaenoic acid, 22: 6n-3) was the most abundant of the polyunsaturated, followed by EPA (eicosapentaenoic acid, 20: 5n-3) and ARA (arachidonic acid 20: 4n-6). The DHA: EPA ratio was 3.4 ± 0.5 . It is concluded that hormonal induction with GnRH_a can produce quality eggs and larvae, however, it is necessary to consider a species-specific diet for broodstock that can ensure good quality of the progeny.

Key words: *Paralichthys adspersus*, spawning, hormonal induction, broodstock, GnRH

INTRODUCCIÓN

El lenguado *Paralichthys adspersus* es una especie que se distribuye en las costas de Perú y Chile (Acuña y Cid, 1995). En el litoral peruano constituye un recurso de importancia económica por su alto valor comercial. Las investigaciones orientadas al desarrollo de la acuicultura de esta especie se iniciaron hace más de una década y ac-

tualmente se encuentra en los inicios de una proyección a escala piloto comercial. En estudios recientes se ha determinado la madurez gonadal para la especie (Cota, 2012; Perea *et al.*, 2015), el acondicionamiento y maduración gonadal de reproductores en sistemas de recirculación de agua de mar (SRA) (Perea y Carrera, 2012; Carrera *et al.*, 2013a), así como el seguimiento del crecimiento de juveniles en cautiverio (Carrera *et al.*, 2017); la evaluación de varias microdietas

en condiciones de laboratorio (Orihuela *et al.*, 2018) y últimamente la densidad de cultivo durante la etapa larval (Castro *et al.*, 2019). Sin embargo, aún son escasas las investigaciones sobre el control de su reproducción, la calidad de los desoves en cautiverio y los factores que involucran estos procesos.

El control de la reproducción representa el primer paso para alcanzar una acuicultura autosostenible (De Metrio *et al.*, 2010) y para la obtención de semilla de calidad, que permita el desarrollo comercial de una especie en cultivo (Mylonas *et al.*, 2010). Por ello, es importante identificar posibles disfunciones que pueda causar el cautiverio sobre el proceso de reproducción, tal y como ha sido observado en peces silvestres o nacidos en cultivo, lo cual se atribuye a las alteraciones del ambiente o por la presencia de algún agente que interfiera con el funcionamiento normal del proceso reproductivo (Mylonas y Zohar, 2001, 2007; Mylonas *et al.*, 2010, 2013).

Se conoce que las hembras de peces planos sufren la ausencia de la maduración final de los ovocitos (Berlinsky *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1997) o ausencia de desove (Kjorsvik *et al.*, 1990; Rasines *et al.*, 2012). La estrategia más común para solucionar estos problemas son los tratamientos con hormonas exógenas, como por ejemplo análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH_a), análogos de la hormona luteinizante liberadora (LHRH_a), extracto de hipófisis de carpa (CPE) y gonadotropina coriónica humana (HCG) (Zohar y Mylonas, 2001; Mylonas y Zohar, 2001; Sampaio *et al.*, 2008; Valdebenito, 2008). Al respecto, las terapias hormonales basadas en el tratamiento con GnRH_a se han utilizado para controlar alteraciones del proceso reproductivo como: ausencia del desarrollo gonadal, ausencia de la maduración final de los ovocitos y la falta de desoves en varias especies de teleósteos (Mañanos *et al.*, 2009). Asimismo, ha sido aplicada con éxito en algunos peces planos como *Paralichthys lethostigma* (Smith *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999), *Scoph-*

talmus maximus (Mugnier *et al.*, 2000), *Solea solea*, *Solea senegalensis* (Bertotto *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2009; Rasines *et al.*, 2012), entre otros.

En tal sentido, el objetivo del presente trabajo fue inducir la ovulación y posterior desove de hembras de *Paralichthys adspersus*, capturadas del medio natural y acondicionadas al laboratorio, utilizando una hormona análoga a la gonadotropina (GnRH_a), realizando la fecundación artificial y la evaluación de la calidad de los huevos y larvas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de Reproductores

Los ejemplares de lenguado *Paralichthys adspersus* fueron capturados del ambiente natural para su acondicionamiento en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Peces del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). En el laboratorio los peces fueron colocados en tanques circulares de fibra de vidrio de 2.5 m³ conectados a sistemas de recirculación de agua de mar (SRA), con una tasa de recambio diario del 300%/día y un flujo de 750 L/h (Carrera *et al.*, 2013). La densidad de cultivo promedio fue de 6.15 kg/m²; es decir, 10 peces por tanque de cultivo, distribuidos en 4 tanques (S3T1, S3T2, S4T1 y S4T2), con un peso promedio de 1.4 kg. La temperatura estuvo entre 15 y 17 °C con un fotoperiodo de 10:00 h de oscuridad y 14:00 h de luz. Los ejemplares fueron sexados y marcados con microchips Passive Integrated Transponders (PITS, HDI Chip International, Holanda) para el seguimiento de su condición física y madurez gonadal (Carrera *et al.*, 2013). Se hizo el seguimiento diario de los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua como temperatura, oxígeno disuelto y pH con un multiparámetro Thermo Scientific™ Orion™ Star A329 y semanalmente de productos nitrogenados como nitrógeno

Cuadro 1. Clasificación de ovocitos de *Paralichthys adspersus* basado en los diámetros y morfología

Tipo de ovocito	Rango (µm)	Descripción
Inmaduro	<150	Forma esférica a irregular, transparente, con un citoplasma uniforme y un núcleo central evidente.
Pre-vitelogénico	150-250	Forma esférica, transparentes. Presenta un citoplasma con pequeñas vacuolas (gránulos corticales) y un núcleo central.
Vitelogénico	250-400	Forma esférica, opacos por la incorporación de gránulos de vitelo en el citoplasma. Presenta un núcleo central que en algunos casos no se evidencia.
Maduro	400-750	Forma esférica, muy opacos por la mayor incorporación de gránulos de vitelo, que se esparcen por todo el citoplasma. No se evidencia el núcleo y se observa claramente la zona radiata.
Hidratado	>750	Transparentes por la rápida incorporación de agua para su posterior ovulación y desove.

amoniaco total (LM3304), nitrato (LM3319), nitrito (LM3352) y dióxido de carbono (LM7297) con kits colorimétricos LaMotte®.

Alimentación

Se realizó en base a trozos de anchoveta, a una tasa de 2.5% de la biomasa total de cada tanque de cultivo, suministrándose de manera interdiaria y en una ración al día, durante el periodo de mayor intensidad de luz (13:00 h). La alimentación fue complementada con cápsulas que contenían vitaminas C (Ácido ascórbico, Sigma-Aldrich®) y E (á-Tocopherol Merk®).

Maduración Gonadal

En los muestreos periódicos de los peces acondicionados en el SRA, se seleccionaron hembras con base al seguimiento de la madurez gonadal en dos periodos: el primero en 2014 (julio, setiembre, octubre y diciembre) y el segundo en 2015 (abril, junio, julio y agosto). Las muestras de ovocitos se obtu-

vieron por biopsia ovárica usando cánulas estériles de polipropileno (Mylonas *et al.*, 2010; Perea y Carrera, 2012), se midió el diámetro de 30 ovocitos por cada hembra, y se clasificaron según sus características morfológicas (Cuadro 1, Figura 1) de acuerdo con la escala de madurez gonadal del lenguaje planteada por Cota (2012) y Perea *et al.* (2015). Para esto, se utilizó un microscopio óptico LEICA® con una cámara digital incorporada utilizando el software de medición LAS 4.3.

Para el caso de los machos, se colectó una muestra de semen mediante masaje abdominal para evaluar la calidad espermática en base a la concentración y motilidad (Carrera *et al.*, 2013).

Inducción Hormonal

Se seleccionaron hembras en estadio III de maduración (7 en 2014 y 6 en 2015), con promedio de ovocitos mayores a 500 µm. Se les aplicó una dosis intraperitoneal de 0.1 ml/kg

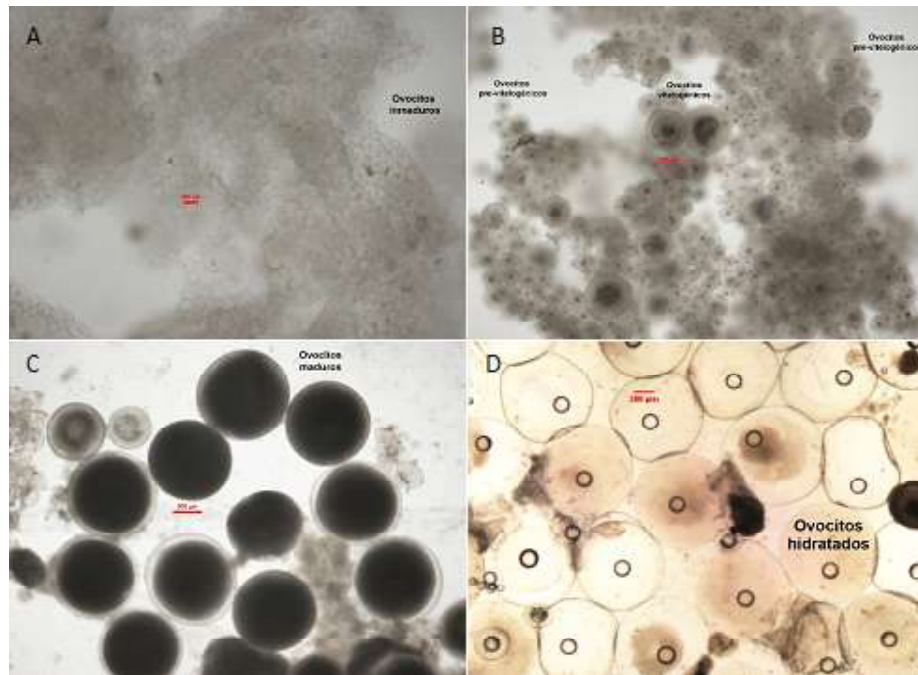


Figura 1. Tipos de ovocitos de *Paralichthys adspersus* basado en sus diámetros y características morfológicas. A: inmaduro; B: pre-vitalogénico; C: maduro; D: hidratado

equivalente a 1 µg/kg de pez, de un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa), acetato de buserelina (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser-(But)-Leu-Arg-Pro-NH₂), Conceptase[®]. En los machos se seleccionaron ejemplares con una motilidad espermática mayor al 50% y una concentración promedio de 0.84×10^{10} espermatozoides/ml, sin necesidad de realizar inducción hormonal.

Desove, Fecundación e Incubación

A las 48 h de la inducción hormonal y a temperatura de 16.8 ± 0.7 °C, las hembras mostraron la cavidad abdominal abultada con signos de una hidratación avanzada (IV desovante). Los peces fueron trasladados a un tanque de menor tamaño, que contenía agua de mar con el anestésico Tricaine-S (MS-222 – Metasulfonato de tricaina) a una concentración de 80 mg/l para sedar y facilitar la manipulación siguiendo protocolos de

ética animal. Se aplicó una presión abdominal o «stripping» a las hembras para obtener los ovocitos y fueron colectados en vasos de precipitado de 500 ml. Se determinó el peso de los ovocitos colectados y fueron conservados a 5 °C.

Se utilizaron dos machos por cada hembra para la fertilización. El semen de los machos se obtuvo igualmente aplicando el «stripping» a nivel abdominal y colectando las muestras en jeringas de 1 ml y conservándolas a 5 °C.

Ambos productos sexuales se mezclaron en seco a razón de 1 ml de esperma por cada 100 g de ovocitos en los vasos de precipitado. Luego de 5 min los huevos fecundados fueron transferidos a una probeta de 1 L con agua de mar esterilizada por radiación ultravioleta (UV), dejándose en reposo por 30 min. Posteriormente, los huevos viables (huevos flotantes) fueron recuperados y

transferidos a tanques cónicos de 150 L, a una densidad de 150 huevos/L en sistema estático. El periodo de incubación fue de 48 h a una temperatura de 18.03 ± 0.13 °C.

Parámetros de Desove

El número de huevos totales se obtuvo a partir de una muestra de 1 g de huevos de los cuales se contabilizó el número de huevos por gramo, para luego extrapolar al peso total obtenido. Asimismo, se midió el diámetro de los huevos, la gota oleosa y las larvas recién eclosionadas con un microscopio óptico con cámara digital incorporada, utilizando el programa de imágenes LAS 4.3. Además, se determinó la fecundidad relativa con la fórmula Fecundidad Relativa = (Número de huevos / kg de pez).

Parámetros de Calidad de Huevos y Larvas

Se calculó el porcentaje de fecundación, porcentaje de eclosión, índice de supervivencia larval (ISL) y la tasa de mortalidad del día 3 (MA3) de acuerdo con Shimma y Tsujigado (1981). Para el porcentaje de fecundación, una hora después de realizada la mezcla de gametos se tomaron tres muestras de 50 huevos, colocadas en placas Petri con agua de mar UV. Se observó al microscopio y se contabilizó el número de huevos que se encontraban al inicio de la división celular de 2-64 blastómeros. En forma similar, se utilizaron muestras de 50 huevos por triplicado para determinar el porcentaje de eclosión, donde los huevos fueron incubados en vasos precipitados de 1 L con agua de mar UV, luego de 48 horas ocurrió la eclosión y se contabilizó el número de larvas recién eclosionadas o nacidas (Aristizabal *et al.*, 2009).

- Porcentaje de fecundación = $(N^{\circ} \text{ de huevos con 2-64 blastómeros} / N^{\circ} \text{ total de huevos}) \times 100$
- Porcentaje de eclosión = $(N^{\circ} \text{ larvas vivas} / [N^{\circ} \text{ larvas vivas} + N^{\circ} \text{ larvas muertas} + N^{\circ} \text{ huevos remanentes}]) \times 100$.

Para determinar el Índice de Supervivencia Larvaria (ISL), se colocaron en tres vasos de precipitado de 1 L con agua UV a 30 larvas por vaso y diariamente se contabilizó el número de larvas muertas. El cálculo se hizo de acuerdo con la fórmula:

$$ISL = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k (N - hi) \times i$$

donde: N = Número total de larvas; hi = Mortalidad acumulada en i-th; k = número de días transcurridos hasta que todas las larvas mueren debido a la inanición. El ISL también indica la mortalidad acumulada al día tres después de la eclosión.

Composición Bioquímica de los Huevos

Se tomaron muestras de 5 g de huevos de cada desove en ambos periodos, las cuales fueron enjuagadas con agua destilada y colocadas en tubos Falcón de 50 ml y conservadas a -80 °C en una ultra congeladora. Los análisis de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos se hicieron en el Laboratorio de Análisis Instrumental del IMARPE. Las proteínas totales se estimaron mediante el método de Hartree (1972), el total de carbohidratos mediante el método espectrofotométrico usando la glucosa como estándar (Dubois *et al.*, 1956) y los lípidos totales por el método de Folch-Lee (Folch *et al.*, 1957), para luego derivatizarlos mediante una reacción de transesterificación usando HCL al 8% en metanol como catalizador y llevarlos a las pruebas de cromatografía de gases para la identificación de ácidos grasos (Ichihara y Fukubayashi, 2010).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico R (R Core Team, 2019). La normalidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante una prueba de Levene. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$ y se correlacionó la

Cuadro 2. Parámetros de desove con un análogo de GnRH y de calidad de huevos de *Paralichthys adspersus* en dos periodos

Año	Mes	Código	Peso total (g)	Huevos totales (N°)	Fecundidad relativa (N° huevos/kg)	Fecundación (%)	Eclosión (%)	ISL (%)	MA3 (%)
2014	Jul	932837	2,328	98,400	45,229	78.9	52.7	22.7	8.9
	Sep	887960	2,464	57,000	24,024	91.5	61.3	31.2	7.8
		1101151	1,545	73,600	49,973	89.9	19.3	29.0	4.4
	Oct	927137	1,586	37,100	22,035	66.1	28.0	11.7	17.8
		932837	2,161	25,800	12,286	89.1	47.3	23.7	18.9
	Dic	110151	1,540	55,067	38,457	83.5	16.7	28.2	17.8
904588		1,876	113,500	62,804	89.5	38.0	23.8	24.4	
2015	Abr	897592	1,439	28,700	21,072	60.9	38.7	11.5	12.0
		1101151	1,514	32,800	22,627	86.0	38.7	22.9	15.3
	Ju	887960	2,472	67,333	28,215	83.1	74.0	11.9	8.0
		897592	1,400	22,867	17,309	92.5	69.3	12.9	7.2
	Jul	885751	1,548	124,600	84,895	93.7	83.3	16.5	11.2
	Ago	887960	2,527	78,000	31,622	90.7	94.0	12.7	8.3
	Promedio		1,877	62,674	35,427	84.3	50.9	19.9	12.5
	Mínimo		1,400	22,867	12,286	60.9	16.7	11.5	4.4
	Máximo		2,527	124,600	84,895	93.7	94.0	31.2	24.4

ISL: Índice de supervivencia larval; MA3: Tasa de mortalidad al día 3

fecundidad relativa y los porcentajes de fecundación y eclosión con el ISL, MA3 a través del test de Pearson.

RESULTADOS

Desoves

Las hembras en maduración avanzada seleccionadas para la inducción hormonal presentaron ovocitos de tamaño promedio de 542.61 μm . Todas las hembras desovaron y tuvieron un periodo de latencia entre 45 y 48 h a una temperatura promedio de 16.46 ± 0.06 °C. En el Cuadro 2 se muestra los ejemplares que desovaron en cada grupo y los parámetros determinados en cada desove.

Los mayores valores de fecundación se observaron en los meses de julio y diciembre de 2014 y en julio y agosto de 2015. Por otro lado, el porcentaje de fecundación fue superior al 70% en todos los meses de ambos periodos. Los huevos fecundados presentaron un diámetro de 858.0 ± 5.9 μm y de la gota oleosa de 168.8 ± 5.3 μm . Se caracterizaron por ser esféricos, transparentes y pelágicos. La eclosión ocurrió 48 h posteriores al desove a una temperatura de 18.03 ± 0.13 °C. Los mayores porcentajes de eclosión se observaron en los meses de julio y setiembre en 2014 y de julio a agosto en 2015. Las diferencias entre la fecundidad relativa, porcentajes de fecundación y eclosión de los desoves agrupados por meses se muestran en la Figura 2.

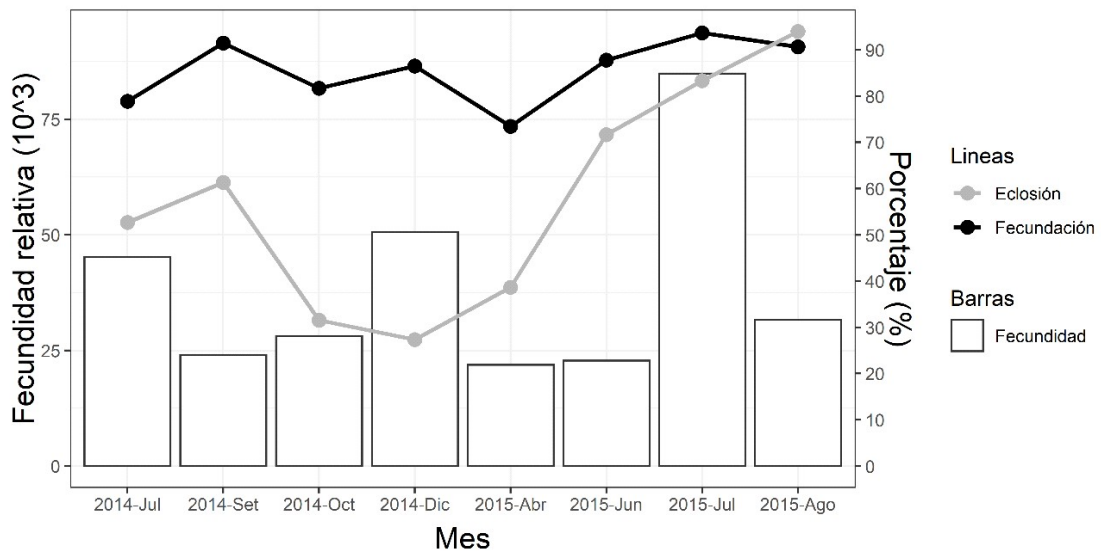


Figura 2. Fecundidad relativa, porcentaje de fecundación y eclosión de los desoves de *Paralichthys adspersus* con un análogo de GnRH según los meses

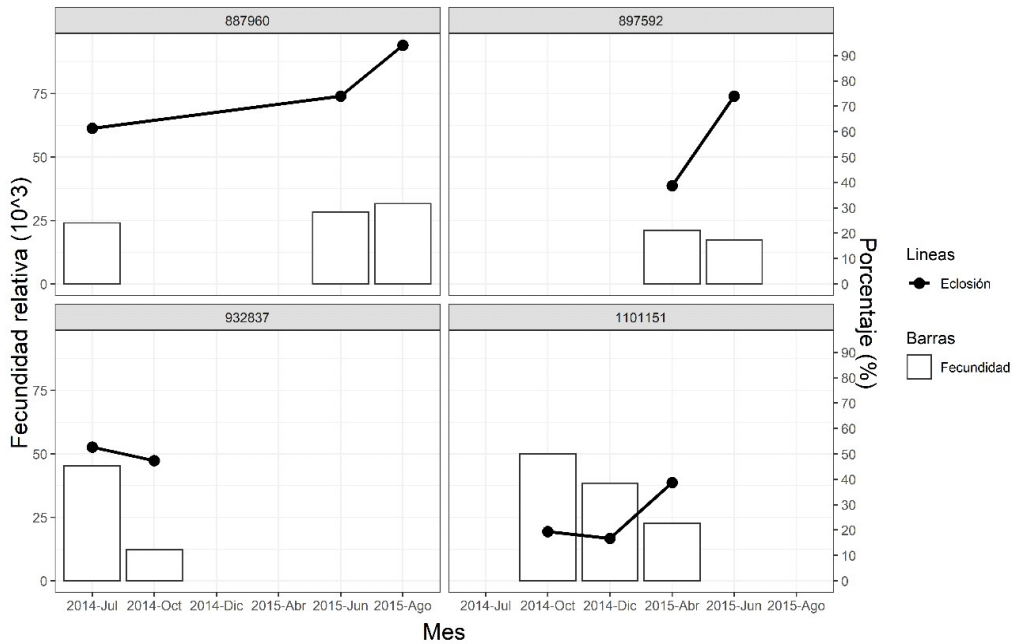


Figura 3. Parámetros de desove de cuatro hembras *Paralichthys adspersus* inducidas hormonalmente con un análogo de GnRH en los periodos de 2014 y 2015

Cuadro 3. Correlación de Pearson entre los parámetros de calidad de huevos y el índice de supervivencia larval (ISL) y mortalidad acumulada al día 3 (MA3) de los desoves de *Paralichthys adspersus*

Correlación de Pearson (r)	Fecundidad (N° huevos/kg)	Porcentaje de fecundación	Porcentaje de eclosión
ISL	0.17	0.17	0.42
MA3	0.05	-0.18	-0.43

Las correlaciones no fueron estadísticamente significativas

Cuadro 4. Composición bioquímica de huevos de los desoves de *Paralichthys adspersus* con un análogo de GnRH en los periodos 2014 y 2015

Año	Mes	Código	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	Humedad (%)
2014	Jul	932837	49.1 ± 0.7	13.1 ± 1.5	5.7 ± 0.2	95.2 ± 0.0
		887960	59.9 ± 1.5	18.8 ± 0.14	5.4 ± 10.5	95.5 ± 0.1
	Oct	1101151	4.3 ± 0.2	14.4 ± 0.8	1.8 ± 0.1	91.6 ± 0.3
		927137	62.3 ± 2.5	19.2 ± 1.4	4.5 ± 0.1	95.1 ± 0.1
		932837	63.2 ± 0.4	19.5 ± 0.1	4.3 ± 0.2	94.7 ± 0.0
		110151	52.8 ± 1.8	21.7 ± 0.7	3.9 ± 0.1	94.2 ± 0.1
Dic	904588	39.3 ± 1.0	19.0 ± 1.3	3.1 ± 0.2	95.0 ± 0.3	
	2015	Abr	897592	37.9 ± 0.4	15.8 ± 0.3	2.2 ± 0.1
1101151			42.4 ± 1.1	21.0 ± 0.1	3.9 ± 0.2	95.2 ± 0.3
Jun		887960	51.8 ± 0.0	15.5 ± 0.8	4.4 ± 0.4	94.0 ± 0.2
		897592	25.6 ± 1.2	15.2 ± 1.7	2.7 ± 0.3	92.7 ± 0.1
Jul		885751	49.4 ± 1.2	16.6 ± 0.8	4.6 ± 0.2	93.5 ± 0.1
Ago		887960	37.0 ± 1.1	16.7 ± 0.0	3.9 ± 0.3	94.2 ± 0.2
Promedio			47.1	17.4	3.9	94.2
Mínimo			25.6	13.1	1.8	91.6
Máximo			63.2	21.7	5.7	95.5

En la Figura 3 se observan los parámetros de desoves de cuatro hembras que tuvieron más de un desove. En la mayoría de los casos la fecundidad relativa disminuyó con el progreso de los meses; sin embargo, el porcentaje de eclosión aumentó.

El ISL indica que las larvas de *P. adspersus* sobreviven a la inanición hasta un máximo de 11 días después de la eclosión. El valor más alto de ISL para 2014 se presentó en el mes de setiembre y en 2015 en abril. Asimismo, la MA3 presentó los valores más

Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos de huevos de los desoves con GnRH α del periodo del 2014 y 2015 de *Paralichthys adspersus*

Ácidos grasos (mg/g base seca)	2014					2015			Promedio \pm DS
	Jul	Sep	Oct	Dic	Abr	Jun	Jul	Ago	
16:00	21.7 \pm 2.3	29.9 \pm 1.5	25.5 \pm 0.4	29.0 \pm 0.2	26.7 \pm 0.1	20.9 \pm 1.1	20.0 \pm 1.5	23.1 \pm 0.1	24.9 \pm 3.7
18:00	4.2 \pm 0.3	5.5 \pm 0.0	4.8 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	5.1 \pm 0.0	3.8 \pm 0.3	4.5 \pm 0.3	4.5 \pm 0.0	4.8 \pm 0.7
Saturados	29.4	38.5	33.4	38.1	34.9	27.1	27.3	30.4	32.4 \pm 4.5
16:1n-7	5.1 \pm 0.7	5.3 \pm 0.3	5.3 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	5.8 \pm 0.0	4.4 \pm 0.3	4.9 \pm 0.4	4.8 \pm 0.0	5.3 \pm 0.7
18:1n-9	9.0 \pm 0.6	10.3 \pm 0.0	10.6 \pm 0.2	11.7 \pm 0.1	10.6 \pm 0.1	8.3 \pm 0.5	8.6 \pm 0.6	9.2 \pm 0.0	10 \pm 1.4
Monoinsaturados	17.5	19.7	19.9	22.9	20.7	15.9	17.0	17.6	18.9 \pm 2.3
20:4n-6 (ARA)	1.6 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.2 \pm 0.0	1.9 \pm 0.2	2.2 \pm 0.1	2.8 \pm 0.0	2.2 \pm 0.4
20:5n-3 (EPA)	9.5 \pm 0.3	12.3 \pm 0.2	9.1 \pm 0.1	10.2 \pm 0.2	8.5 \pm 0.0	6.6 \pm 0.4	8.3 \pm 0.6	8.8 \pm 0.0	9.0 \pm 1.6
22:6n-3 (DHA)	22.3 \pm 0.1	37.2 \pm 0.3	32.3 \pm 0.5	35.5 \pm 0.3	33.0 \pm 0.2	26.0 \pm 1.3	25.0 \pm 1.8	26.2 \pm 0.2	30.5 \pm 5.5
Poliinsaturados	39.4	59.8	51.6	57.9	53.0	41.8	43.1	45.1	49 \pm 7.7
DHA/EPA	2.3	3.0	3.6	3.5	3.9	3.9	3.0	3.0	3.4 \pm 0.5

altos en octubre (13.7%) y diciembre (21.1%) de 2014 y en abril (13.7%) de 2015, lo cual coincide con los meses en que se presentó los porcentajes de eclosión más bajos (31.6 y 27.3% en octubre y diciembre de 2014, respectivamente y 38.7% en abril de 2015). En el Cuadro 3 se muestran las correlaciones de Pearson (r) entre la fecundidad relativa, porcentaje de fecundación y eclosión con los índices ISL y MA3. Si bien los mayores valores de r correspondieron entre el porcentaje de eclosión con el ISL (valor positivo) y entre el porcentaje de eclosión y el MA3 (valor negativo); sin embargo, no fueron significativos ($p > 0.05$).

Composición Bioquímica de los Huevos

Los resultados de los análisis de la composición bioquímica de los huevos se observan en el Cuadro 4. En relación a las proteínas, se encuentran en un rango entre el 37 y 62% (a excepción de junio del 2015 donde la hembra con código 897592 muestra un valor de 25.6 ± 1.2), los lípidos varían entre 13 y

19% y los carbohidratos entre 2.2 y 5.7%. Información necesaria para la formulación y elaboración de dietas para reproductores de la especie.

La abundancia relativa de los ácidos grasos (mg/g de muestra seca) se observa en el Cuadro 5. Se encontró una predominancia de los ácidos grasos poliinsaturados, seguido de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. El DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6n-3) fue el más abundante de los ácidos grasos poliinsaturados, seguido del EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3) y ARA (ácido araquidónico 20:4n-6). La relación de DHA: EPA fue 3.4 ± 0.5 .

DISCUSIÓN

La situación ideal es que los reproductores desoven espontáneamente, pero en condiciones de cautiverio este proceso se ve alterado por la falta de maduración final del ovocito y espermiación, o por la falta de

sincronización entre machos y hembras; siendo la fertilización artificial una buena alternativa, donde los ovocitos ovulados y el espermatozoides maduro son obtenidos por separado por presión abdominal, colocados en seco en un recipiente libre de contaminación (orina) y mezclados con la adición de agua de mar (Mylonas *et al.*, 2010). Al respecto, el estrés de los reproductores a las condiciones de cautiverio tiene un efecto negativo en el acondicionamiento, maduración gonadal y en la calidad de huevos, lo cual se le conoce como disfunciones reproductivas. Esto puede ocurrir por la falta de liberación de la hormona luteinizante (LH) al final de vitelogénesis; siendo por ello utilizada la GnRHa en varias especies de peces. Una ventaja particular del uso de GnRHa es que se puede utilizar en peces con desarrollo ovocitario asincrónico o grupos sincrónicos, con ovocitos en diferentes estadios de maduración (Mylonas *et al.*, 2013), como es el caso de lenguado *P. adspersus*. Entre las terapias hormonales, la GnRHa es la más utilizada por tener menor especificidad de especie y actuar a nivel del eje cerebro-pituitaria-gónada, estimulando la liberación de la LH endógena (Mylonas *et al.*, 2010). Adicionalmente, la GnRHa puede administrarse en forma de bolo (inyección líquida) o en un sistema de liberación sostenida conocida como implante (Mylonas y Zohar, 2001). Esta aplicación hormonal se ha realizado con éxito en hembras con ovocitos mayores a 500 μm (Sarih *et al.*, 2018), y en el caso de *P. adspersus* se ha utilizado para la inducción al desove.

Es importante mencionar que cada método de inducción tiene ventajas dependiendo de la especie (Fakriadis *et al.*, 2018). Por ejemplo, en la corvina *Argyrosomus regius*, múltiples inyecciones de GnRHa fueron más ventajosas en comparación con los implantes, debido a un mejor control de la producción de huevos y repetibilidad de la respuesta (Mylonas *et al.*, 2015). Asimismo, en *Seriola dumerili* se evaluaron los dos tipos de uso de la GnRHa para inducir al desove (Mylonas *et al.*, 2004; Fernández-Palacios *et al.*, 2013). En el presente estudio con *P. adspersus* se

utilizaron inyecciones de GnRHa obteniendo desoves en los dos periodos de experimentación.

Respecto a la dosis de GnRHa (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pez), los desoves ocurrieron en un periodo de latencia entre 45 y 48 h posteriores a la inyección, con una temperatura de 16.46 ± 0.1 °C. En *Solea senegalensis* con dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de GnRHa ([des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH-ethyl-amide) (Sigma) se reporta la ovulación a las 41-44 h después del tratamiento, con una temperatura de 16 °C (Rasines *et al.*, 2012). En *Paralichthys lethostigma* se usaron tres concentraciones (5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pez) de un análogo a la hormona liberadora luteinizante de mamíferos (sGnRHa), produciendo desoves a las 54-58 h (Wright-Moore *et al.*, 2019). Asimismo, en *Seriola dumerili*, múltiples desoves ocurrieron después de un periodo de latencia de 43.1 ± 2.5 con inyecciones de GnRHa (20-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Fakriadis *et al.*, 2018; Sarih *et al.*, 2018).

En los peces se define la calidad del huevo como la capacidad para desarrollarse y producir embriones viables (Reading *et al.*, 2018). Esta capacidad se ve afectada por factores que incluyen el estado nutricional, estrés, sobre-maduración del huevo, tipo de hormona para inducción al desove, la genética y la edad de los reproductores; además de otros factores como la calidad del agua y ambientales como fotoperiodo, temperatura y salinidad (Bobe y Labbe, 2010; Mylonas *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2014). Los indicadores más usados para determinar la calidad del huevo son las tasas de fertilización y eclosión, así como la morfología, flotabilidad y tamaño del huevo, distribución de gotas de lípidos y morfología anormal de blastómeros (Aristizabal *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2014). Jia *et al.* (2014) reportó en desoves naturales de turbot *Scophthalmus maximus* de origen silvestre los mayores valores de fertilización ($90.74 \pm 1.01\%$) y eclosión ($76.49 \pm 3.29\%$) a mitad de la temporada reproductiva, pero con grandes variaciones durante todo el periodo. Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo 84.3% de fertilización y 50.9% de

eclosión en ambos periodos de experimentación. Por otro lado, en *Solea senegalensis* se reportó 36.7 ± 4.5 y $18.5 \pm 3.6\%$ de fertilización y eclosión, respectivamente (Rasines *et al.*, 2012); y en *Seriola dumerili* entre 81.6 y 98.9 de fertilización y entre 33.3 y 100.0% de eclosión (Fernández-Palacios *et al.*, 2013).

La cantidad de huevos producidos por hembra por inducción hormonal con GnRHa depende de las concentraciones utilizadas. Así, Wright-Moore *et al.* (2019) reportaron para *Paralichthys lethostigma* 128 000 huevos a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 61 100 a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 40 600 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con fecundidades relativas de 95 400, 26 700 y 7800 huevos/kg, respectivamente. El mayor número de huevos producidos en *P. adspersus* fue de 124 600 y la mayor fecundidad relativa fue de 84 895 huevos/kg a una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En relación a la composición bioquímica de huevos y larvas como indicador de calidad, las proteínas cumplen un papel importante en la fertilización y en el desarrollo normal del embrión, y los aminoácidos libres son indispensables como combustible metabólico para las larvas (Cecon *et al.*, 2012). Asimismo, la composición de lípidos y ácidos grasos en el alimento de los reproductores permite la reproducción y supervivencia exitosas de la descendencia (Izquierdo *et al.*, 2001); teniendo importancia el perfil de los ácidos grasos esenciales como DHA, EPA, ARA y sus proporciones (Cecon *et al.*, 2012), por lo cual deben ser considerados (Sargent *et al.*, 2002). El DHA juega un papel importante como componente estructural de las membranas celulares, especialmente en los procesos de sinaptogénesis y retinogénesis durante el desarrollo embrionario en peces (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2010). Además, la relación DHA/EPA conduce a un equilibrio adecuado en la composición estructural de las células, pudiendo afectar el desarrollo del embrión y supervivencia de la larva (Furuita *et al.*, 2002).

En el hirame (*Paralichthys olivaceus*), Furuita *et al.* (2000) reportaron que los huevos presentaron valores de ARA 0.6 ± 0.1 , DHA 8.2 ± 0.6 , EPA $6.9 \pm 1.0\%$ del total de ácidos grasos y una relación DHA/EPA de $1.2 \pm 0.1\%$ a partir de reproductores alimentados con un nivel 2.1 g/100 g dieta de ácidos grasos. Asimismo, en esta misma especie, reproductores alimentados con dietas con una relación de DHA/EPA de 1.2, 1.6 y 1.5%, obtuvieron valores de ARA 1.0 ± 0.2 , 0.9 ± 0.3 y 0.9 ± 0.2 , EPA 6.7 ± 0.5 , 8.1 ± 1.0 y 11.7 ± 0.3 ; DHA 9.4 ± 0.7 , 11.9 ± 2.4 y $13.4 \pm 1.1\%$ del total de ácidos grasos y una relación DHA/EPA 1.4 ± 0.1 , 1.5 ± 0.4 y $1.2 \pm 0.1\%$, respectivamente (Furuita *et al.*, 2002).

En turbot se obtuvo para huevos producidos por desoves naturales valores de proteína $12.7 \pm 0.7\%$, lípidos $20.6 \pm 0.8\%$ y carbohidratos $9.4 \pm 0.3\%$, y con respecto a los ácidos grasos (g/kg de peso seco): EPA 7.6 ± 0.5 , DHA 29.2 ± 0.6 y ARA 2.6 ± 0.1 , y una relación DHA/EPA de $3.8 \pm 0.3\%$ (Jia *et al.*, 2014). Asimismo, para la misma especie, Tong *et al.* (2017) determinaron que el DHA y EPA están estrechamente asociados con el crecimiento, desarrollo del cerebro y la función visual. En general, la relación DHA/EPA varía entre 3:1 a 4:1 (Jia *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2017). La composición de ácidos grasos en huevos fertilizados de *Liza ramada* por inducción hormonal (segunda dosis) obtuvieron DHA 0.4, EPA 2.5, ARA 0.2% del total de ácidos grasos, y una relación DHA/EPA de 0.1% (Fayez-Fahmy y Abdel-Baki, 2014). En el presente estudio, la composición de ácidos grasos de huevos de *P. adspersus* para DHA, EPA y ARA fue de 30.5 ± 5.5 , 9.0 ± 1.6 y 2.2 ± 0.4 (mg/g en base seca, respectivamente), y la relación DHA/EPA de 3.4 ± 0.5 , considerándose huevos de buena calidad para los desoves obtenidos por la inducción hormonal.

El ISL es un indicador potencial de calidad, porque determina la calidad de las reservas endógenas contenidas en el saco

vitelino y el potencial de sobrevivencia intrínseca de la larva (Giménez *et al.*, 2006). Este valor refleja la actividad de las larvas y es un indicador práctico en la producción de juveniles. En *P. olivaceus* varió de 15.3 a 30.9 (Furuita *et al.*, 2000). Por otro lado, Furuita *et al.* (2001) reportan un MA3 de 80.4% e ISL de 27.1%, en tanto que Furuita *et al.* (2002) obtuvieron valores de MA3 entre 71.1 y 86.0% e ISL entre 40.3 y 59.7%, dependiendo de los niveles de ácidos grasos utilizados en la dieta. En especies como el dentón común *Dentex dentex* y besugo *Pagrus pagrus*, Giménez *et al.* (2006) y Aristizabal *et al.* (2009), respectivamente, determinaron que el ISL fue similar entre desoves de alta y baja calidad. En el presente estudio se obtuvo un MA3 entre 4.4 y 24.2% con un ISL entre 11.5 y 31.0, lo cual indica la buena calidad de huevos y larvas, considerando que se encuentran dentro del rango de resultados que se presentaron en especies similares y otras.

Se puede concluir que la inducción hormonal con GnRHa permitió obtener huevos y larvas de calidad; sin embargo, se requiere considerar una dieta especie específica para reproductores que permita asegurar una buena calidad de la progenie y con ello lograr la producción de semilla sostenible en el tiempo.

LITERATURA CITADA

1. **Acuña E, Cid L. 1995.** On the ecology of two sympatric flounder of the genus *Paralichthys* in the Bay of Coquimbo, Chile. *Neth J Sea Res* 34: 7-18. doi: 10.1016/0077-7579(95)90011-X
2. **Aristizabal E, Suárez J, Vega A, Vargas R. 2009.** Egg and larval quality assessment in the Argentinean red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 287: 329-334. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.044
3. **Berlinsky D, King W, Hodson R, Sullivan C. 1997.** Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J World Aquacult Soc* 28: 79-86. doi: 10.1111/j.1749-7345.1997.tb00964.x
4. **Bertotto D, Francescon A, Richard J, Libertini A, Barbaro A. 2006.** Induced spawning in common sole (*Solea solea* L). *Aquac Res* 37: 423-427.
5. **Bobbe J, Labbe C. 2010.** Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocr* 165: 535-548.
6. **Carrera L, Cota N, Castro A, Montes M, Tam J. 2017.** Preliminary assessment of growth of flatfish *Paralichthys adspersus* juveniles in different culture systems. *World Aquac* 48: 44-48.
7. **Carrera L, Cota N, Montes M, Mateo E, Sierralta V, Castro T, Perea A, et al. 2013.** Broodstock management of the fine flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) using recirculating aquaculture systems. *Lat Am J Aquat Res* 41: 89-98. doi: 103856/vol41-issue1-fulltext-7
8. **Carrera L, Cota N, Montes M. 2013.** Compendio metodológico para la reproducción de lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio. Lima, Perú: Instituto del Mar del Perú. 60 p.
9. **Castro A, Montes M, Orihuela L, Linares J, Cota N, Carrera L, Toledo P, Lazo JP. 2019.** Effect of stocking density on growth and survival of fine flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) larvae. *Lat Am J Aquat Res* 47: 1-8. doi: 10.3856/vol47-issue1-fulltext-1
10. **Ceccon C, Tilahun T, Bolla S, Martins C, Oliveira J, Bianchini A, Kiron V, Babiak I. 2012.** Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. *Aquaculture* 324: 267-275. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.10.036
11. **Cota N. 2012.** Escala de madurez gonadal del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867). Tesis de Biólogo. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 101 p.

12. **De Metrio G, Caggiano M, Deflorio M, Mylonas CC, Bridges CR, Santamaria N, Caprioli R, et al. 2010.** Reproducing the Atlantic blue fin tuna in captivity: the Italian experience. *ICCAT* 65: 864-867.
13. **DuBois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356. doi: 10.1021/ac60111a017
14. **Fayez-Fahmy A, Abdel-Baki Z. 2014.** Induced spawning of *Liza ramada* using different protocols or hormones with respect to their effects on egg quality. *Afr J Biotechnol* 13: 4028-4039. doi: 10.5897/AJB2013.13068
15. **Fernández-Palacios H, Schuchardt D, Roo J, Hernández-Cruz CM, Izquierdo M. 2013.** Multiple GnRH α injections to induce successful spawning of wild caught greater amberjack (*Seriola dumerili*) matured in captivity. *Aquac Res* 46: 1748-1759.
16. **Fakriadis I, Lisi F, Sigelaki I, Papadaki M, Mylonas CC. 2018.** Spawning kinetics and egg/larval quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*) in response to multiple GnRH α injections or implants. *Gen Comp Endocr* 279: 78-87. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.12.007.
17. **Folch J, Lee M, Sloane Stanley GH. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
18. **Furuita H, Tanaka H, Yamamoto T, Shiraishi M, Takeuchi T. 2000.** Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 187: 387-398. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00319-7
19. **Furuita H, Tanaka H, Yamamoto T, Shiraishi M, Takeuchi T. 2001.** Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci* 67: 606-613. doi: 10.1046/j.1444-2906.-2001.00296.x
20. **Furuita H, Tanaka H, Yamamoto T, Suzuki N, Takeuchi T. 2002.** Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 210: 323-333. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00855-9
21. **Giménez G, Estévez A, Lahnsteiner F, Zecevic B, Bell JG, Henderson R J, Piñera JA, et al. 2006.** Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260: 232-243. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.028
22. **Guzmán JM, Ramos J, Mylonas C.C, Mañanós EL. 2009.** Spawning performance and plasma levels of GnRH α and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRH α -delivery systems. *Aquaculture* 291: 200-209. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.024
23. **Hartree EF. 1972.** Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427. doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2
24. **Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ. 2001.** Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25-42. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00581-6
25. **Jia Y, Meng Z, Liu X, Lei J. 2014.** Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season. *Fish Physiol Biochem* 40: 1093-1104. doi: 10.1007/s10695-014-9908-9
26. **Ichihara K, Fukubayashi Y. 2010.** Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 51: 635-640. doi: 10.1194/jlr.-D001065
27. **Kjorsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I. 1990.** Egg quality in fishes. *Adv Mar Biol* 26: 71-113. doi: 10.1016/S0065-2881(08)60199-6

28. **Larsson D, Mylonas CC, Zohar Y, Crim L. 1997.** Gonadotropin releasing hormone-analogue (GnRH-A) advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batch-spawning teleost the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Can J Aquat Fish Sci* 54: 1957-1964. doi: 10.1139/f97-102
29. **Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E, Fostier A, Breton B. 2000.** Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. *Aquaculture* 181: 241-255. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00234-3
30. **Mylonas C, Papadaki M, Pavlidis M, Divanach P. 2004.** Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 232: 637-649. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00534-9
31. **Mylonas CC, Zohar Y. 2007.** Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: *The fish oocyte*. Dordrecht.: Springer. p 437-474.
32. **Mylonas C, Fostier A, Zanuy S. 2010.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocr* 165: 516-534. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007
33. **Mylonas CC, Zohar Y. 2001.** Use of GnRH-a-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fisher* 157: 463-491. doi: 10.1023/A:101-2279814708
34. **Mylonas CC, Fatira E, Karkut P, Sigelaki I, Papadaki M, Duncan N. 2015.** Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity III. Comparison between GnRH-a implants and injections on spawning kinetics and egg/larval performance parameters. *Aquaculture* 448: 44-53. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.-05.036
35. **Mylonas CC, Mitrizakis N, Castaldo C. 2013.** Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture* 414-415: 318-327. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.008
36. **Orihuela L, Montes M, Linares J, Castro A, Carrera L, Lazo JP. 2018.** Effect of two novel experimental micro-diet types on growth, survival, and pigmentation during the weaning period of the fine flounder, *Paralichthys adspersus*, larvae. *J World Aquacult Soc* 49: 770-779. doi: 10.1111/jwas.12526
37. **Perea A, Carrera L. 2012.** Seguimiento en cautiverio de la maduración gonadal y desove del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner). *Ing Inst Mar Perú* 39(1-2): 82-87.
38. **Perea A, Cota N, Roque C. 2015** Escala de la madurez gonadal del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1897). *Bol Inst Mar Perú* 30: 66-78.
39. **Rasines I, Gómez M, Martín I, Rodríguez C, Mañanós E, Chereguini O. 2012.** Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* 326: 129-135. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.021
40. **Reading BJ, Andersen LK, Ryu Y-W, Mushiobira Y, Todo T, Hiramatsu N. 2018.** Oogenesis and egg quality in finfish: yolk formation and other factors influencing female fertility. *Fishes* 3: 45. doi: 10.3390/fishes3040045
41. **Sampaio L, Robaldo R, Bianchini A. 2008.** Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac Res* 39: 712-717. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.01923.x

42. **Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. 2002.** The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds). Fish nutrition, 3rd ed. New York, USA: Academic Press. p 181-257.
43. **Sarih S, Djellata A, La Barbera A, Roo J, Izquierdo M, Fernández-Palacios H. 2018.** High-quality spontaneous spawning in greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810) and its comparison with GnRHa implants or injections. *Aquac Res* 49: 3442-3450. doi: 10.1111/are.13808
44. **Smith T, Mcvey D, Jenkins W, Denson, M, Heyward D, Sullivan C, Berlinsky D. 1999.** Broodstock management and spawning of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture* 176: 87-99. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00053-8
45. **Shimma H, Tsujigado A. 1981.** Some biochemical quality of bred scorpaenoid fish, *Sebastes marmoratus*, and activities of their larvae. *Bull Natl Res Inst Aquac* 2: 11-20.
46. **Tocher DR. 2010.** Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac Res* 41: 717-732. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x
47. **Tong X, Yang X, Bao C, Wang J, Tang X, Jiang D, Yang L. 2017.** Changes of biochemical compositions during development of eggs and yolk-sac larvae of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aqua-culture* 473: 317-326. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.024
48. **Valdebenito I. 2008.** Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Arch Med Vet* 40: 115-123. doi: 10.4067/S0301-732X2008000200002
49. **Watanabe W, Carroll P, Daniels H. 1999.** Recent progress in controlled reproduction of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. In: Proc XXVIII US-Japan Natural Resources Aquaculture Panel. UJNR Technical Report 28. p 141-148.
50. **Wright-Moore WD, Watanabe WO, Bourdelais AJ, Alam MS, Rezek TC, Carroll PM, Woolridge CA. 2019.** Spawning performance and egg quality of wild-caught and first generation southern flounder *Paralichthys lethostigma* broodstock induced with piscine and mammalian GnRH analogs. *Aquaculture* 506: 367-379. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.03.062
51. **Zohar Y, Mylonas CC. 2001.** Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136. doi: /10.1016/S0044-8486(01)00584-1