

Research Article

Inducción del desove y espermiación de anchoveta peruana *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842) en cautiverio mediante la inyección de un análogo de GnRH

Carlos Espinoza¹, Ángel Perea², Betsy Buitrón², Paola Cisneros¹,
Christian Catcoparco¹, Andrés Alberro³ & Denise Vizziano³

¹Laboratorio de Biología Experimental, Instituto del Mar del Perú
Esquina Gamarra y Valle s/n, Chucuito, Callao, Perú

²Laboratorio de Biología Reproductiva, Instituto del Mar del Perú
Esquina Gamarra y Valle s/n, Chucuito, Callao, Perú

³Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Facultad de Ciencias
Universidad La República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

RESUMEN. Con la finalidad de obtener desoves de ejemplares de *Engraulis ringens* en cautiverio para realizar pruebas experimentales con huevos y larvas; el presente trabajo evaluó el efecto de inyecciones de acetato de buserelina (un análogo de GnRH; GnRHa) sobre desove y espermiación. Además, se utilizó domperidona (DOM) para eliminar un posible control dopaminérgico en la liberación de gonadotropinas endógenas en esta especie. Se inyectaron intraperitonealmente ejemplares maduros con 0,005 µg GnRHa g⁻¹ pez (GnRHa); 0,005 µg GnRHa g⁻¹ pez + 0,01 mg DOM g⁻¹ pez (GnRHa+DOM) o solución salina a 0,9% (SS). Hubo un efecto inductor de los tratamientos con GnRHa y GnRHa+DOM sobre el desove. Los desoves ocurrieron entre 24 y 48 h post-inyección (p.i.) y los porcentajes totales fueron 57,3% y 20,9% con GnRHa y GnRHa+DOM respectivamente, los cuales fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$). El efecto de la hormona sobre la expulsión de semen fue inmediato en el tratamiento con GnRHa (44,4%), siendo el porcentaje de machos expulsantes a 0 horas p.i. significativamente diferente al control (0 %) ($P < 0,05$). El máximo porcentaje de machos expulsantes se observó a las 12 horas p.i., siendo 85,7% con GnRHa y 75,0% con GnRHa+DOM, entre los cuales no se encontró diferencias significativas ($P > 0,05$). De acuerdo a los resultados obtenidos no existiría un control dopaminérgico en esta especie, ya que hubo expulsión de gametos con o sin la aplicación de domperidona. Por el contrario, se observó significativa reducción de los porcentajes de peces expulsantes al inyectar DOM.

Palabras clave: antidopaminérgico, esteroides, GnRHa, desove, espermiación, *Engraulis ringens*, Perú.

Induction of spawning and spermiation in captive Peruvian anchovy *Engraulis ringens* (Jenyns) using GnRH analogue injection

ABSTRACT. In order to achieve spawning in captive *Engraulis ringens* that would result in eggs and larvae for experimental assays, the present work evaluated the effect of buserelin acetate (an analogue of GnRH; GnRHa) injections on spawning and spermiation. Domperidone (DOM) was also used in order to reject a possible dopaminergic control in the release of endogenous gonadotropins for this species. Ripe fish were injected intraperitoneally with 0.005 µg GnRHa g⁻¹ fish (H), 0.005 µg GnRHa g⁻¹ fish + 0.01 mg DOM g⁻¹ fish (HD) or saline solution at 0.9% (SS). The GnRHa and GnRHa+DOM treatments showed an inductor effect on spawning, which occurred between 24 and 48 h post injection (p.i.). The results were significantly different ($P < 0.05$), with total percentages of 57.3% (GnRHa) and 20.9% (GnRHa+DOM). The effect of the hormone on spermiation was immediate, with the GnRHa (44.4%) treatment, and percentages of spermiated males at 0 hours p.i. differed significantly from the control ($P < 0.05$). Spermiation was highest 12 hours p.i., with values of 85.7% (GnRHa) and 75.0% (GnRHa+DOM). These values did not differ significantly ($P > 0.05$). Our results indicate the absence of a dopaminergic control in this species, since gametes were expelled with or

without domperidone. On the contrary, the percentages of spawned and spermiated fish after being injected with DOM were significantly lower.

Keywords: antidopaminergic, steroids, GnRH α , spawning, spermiation, *Engraulis ringens*, Peru.

Corresponding author: Carlos Espinoza (cespinoza@imarpe.gob.pe)

INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos utilizados para acelerar la maduración gonadal e inducir el desove de peces en cautiverio es la manipulación de factores ambientales como temperatura y fotoperiodo (Blancas-Arroyo *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2005); para lo cual es indispensable la adaptabilidad de los peces a su nuevo ambiente. Por ello, métodos que utilizan la administración de hormonas exógenas son utilizados eficazmente cuando no se logran los desoves espontáneos, tal es el caso de extractos de hipófisis (Leong, 1971; Adebayo & Fagbenro, 2004) y gonadotropinas (Gn) hipofisiarias o placentarias (Cacot *et al.*, 2002).

Actualmente, la tendencia más utilizada es la administración de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) y sus análogos potenciados (Marino *et al.*, 2003; Mylonas *et al.*, 2004; Vermeirssen *et al.*, 2004; Arabaci *et al.*, 2004a; Levavi-Sivan *et al.*, 2004; Dorafshan & Heyrati, 2006; Ronyai, 2007), ya que actúan al más alto nivel del eje hipotálamo-pituitaria-gónada, promoviendo un adecuado balance de la cascada hormonal reproductiva y desencadenando el desove y espermiación (Zohar & Mylonas, 2001).

Sin embargo, el uso de GnRHs puso en evidencia que en algunas especies la secreción de Gn está regulada por un control dual hipotalámico de GnRH y dopamina, los cuales actúan como inductor e inhibidor respectivamente (Peter & Yu, 1997). Por tal motivo, la reproducción artificial de estas especies con GnRHs, requiere el uso de antidopaminérgicos que permitan el correcto funcionamiento de la hormona inyectada (Brzuska & Adamek, 1999; Sukumasavin *et al.*, 2000).

Las técnicas de reproducción de peces en cautiverio no sólo tienen importancia acuícola, sino también pesquera, a fin de permitir un abastecimiento de huevos, embriones y larvas para realizar estudios experimentales que aporten datos a modelos pesqueros o ecológicos (Peñailillo & Araya, 1996; Olivar *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2007). En este contexto, es que se realizan experimentos en laboratorio con ejemplares de anchoveta peruana mantenidos en cautiverio, para

comprender procesos de su biología que no pueden ser dilucidados con datos de pesquerías (Espinoza *et al.*, 2009).

A pesar de haberse establecido las bases del mantenimiento en cautiverio de ejemplares silvestres de *Engraulis ringens* (Espinoza *et al.*, 2008), su reproducción espontánea en tanques de cría no ha sido posible. Las hembras alcanzan su madurez gonadal pero son incapaces de desovar espontáneamente, mientras que bajos porcentajes de machos expulsan el semen tempranamente ante la presencia de hembras vitelogenadas (Espinoza *et al.*, 2009). Pruebas preliminares de inducción del desove utilizando gonadotropina coriónica humana (HCG) dieron resultados poco alentadores en nuestro laboratorio (datos no publicados). Por lo tanto, en el presente trabajo se evalúa el efecto de la inyección de acetato de buserelina (un análogo de GnRH) para el mismo fin y el objetivo de reproducir a esta especie en cautiverio. Junto con GnRH α se utilizó domperidona (DOM) para inhibir un posible control dopaminérgico en la liberación de gonadotropina endógena de los peces tratados; pues como se conoce, la inhibición de la acción de GnRHs por parte de la dopamina, es determinante en algunas especies (Richard *et al.*, 1988; Alok *et al.*, 1997; Firat *et al.*, 2005; Heyrati *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplares adultos de anchoveta peruana fueron capturados en la Bahía del Callao, Perú; utilizando un sistema de red izada y luces de atracción según metodología descrita por Espinoza *et al.* (2008). El acondicionamiento al cautiverio de los peces capturados, se realizó durante 30 días en tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 10 m³ de capacidad conectados a un sistema de recirculación de agua, a temperatura constante de 16°C, fotoperiodo de 10L-14O, y alimentando con Larval AP100® (4,53 Kcal g⁻¹) y alimento extruido Nicovita (4,61 Kcal g⁻¹) según metodología descrita por Espinoza *et al.* (2008). Al final de este periodo, los peces terminaron en estadios de regresión gonadal debido al estrés producido por la captura y el acondicionamiento al cautiverio; por lo

que fueron mantenidos 30 días más para su recuperación gonadal con alimentación *ad libitum*. Después de este periodo se realizó un muestreo invasivo para verificar histológicamente la maduración gonadal de los peces (hembras vitelogénicas y machos con esperma-tozoides).

Los peces maduros (longitud total promedio $15,3 \pm 0,7$ cm; $n = 298$) fueron anestesiados con MS222 (40 mg L^{-1}) para registrar su peso corporal y calcular el volumen de hormona a inyectar a cada uno, de acuerdo a la dosis fijada. Se evaluó cuatro grupos experimentales: i) inyectados con $0,005 \mu\text{g GnRHa g}^{-1}$ pez (GnRHa), ii) inyectados con $0,005 \mu\text{g GnRHa g}^{-1}$ pez + $0,01 \text{ mg DOM g}^{-1}$ pez (GnRHa+DOM), iii) inyectados con solución salina 0,9 % (SS) y iv) peces sin inyectar (SI); los cuales fueron colocados en tanques de 2 m^3 de capacidad para evaluar su respuesta a 0, 12, 24 y 48 h post-inyección (p.i.). El muestreo a las 0 h fue realizado exactamente a los 15 minutos p.i. Se utilizó acetato de buserelina (Conceptal®) como GnRHa y Netaf® como DOM. Los peces fueron inyectados a las 18 h del día en grupos de 20 (seis por cada tratamiento) hasta completar al menos seis individuos por cada sexo, cada tiempo p.i. y cada tratamiento. Transcurrido el tiempo p.i. correspondiente, los peces fueron anestesiados para extraer muestras de sangre y luego sacrificados por decapitación para disectar sus gónadas y fijarlas en formaldehído para su procesamiento histológico.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción caudal con una jeringa heparinizada calibre 26, luego centrifugadas en tubos de microcentrífuga a 614 g durante 10 min para separar el plasma y refrigerarlo hasta su análisis. Mediante radioinmunoanálisis (RIA) se cuantificaron los niveles plasmáticos de 17β -estradiol (E_2), testosterona (T) y $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta\text{P}$) en los laboratorios de la Universidad La República (Uruguay). De acuerdo a la metodología descrita por Barrios (2005), se realizó una doble extracción del esteroide de las muestras de plasma con acetato de etilo:ciclohexano (1:1). Los extractos se evaporaron y se retomaron en buffer fosfato (50 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM) con 0,1% gelatina. La incubación se realizó durante 20 h a 18°C con las siguientes diluciones finales de antisueros: anti- $17,20\beta\text{P}$ 1/9000, anti-T 1/4800 y anti- E_2 1/1800. La reacción fue detenida mediante el agregado de una suspensión carbón/dextrán a 0°C (500 mg de carbón y 50 mg de dextrán T70 en buffer fosfato), incubadas durante 15 min y finalmente centrifugadas a 3500 g durante 15 min a 2°C . Al sobrenadante se les agregó 4 mL de líquido de centelleo para la medición de su

radioactividad. El límite de los ensayos fue determinado en 30 pg mL^{-1} .

De acuerdo a las características histológicas de las gónadas descritas por Hunter & Golberg (1980) en la anchoveta del norte *E. mordax* y en la aplicación de éstas a la anchoveta peruana por Buitrón *et al.* (1997), los peces fueron clasificados como evacuados y no evacuados. En el caso de las hembras, fueron consideradas desovadas o evacuadas, aquellas que presentaron ovocitos hidratados (OH) y/o folículos post-ovulatorios de 0 a 24 h (F0) y de 24 a 48 h (F1) (Hunter & Macewicz, 1983). Los porcentajes de desove y espermiación fueron determinados respecto al número de hembras o machos maduros tratados. Las comparaciones de las frecuencias de hembras desovadas y machos expulsantes entre tratamientos fueron hechas por medio de pruebas chi-cuadrado, mientras que de los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas se realizó con las pruebas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon-Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

No hubo hembras desovantes en los grupos SS ni en SI, por lo que se consideró en adelante ambos tratamientos como un solo grupo control. Con el tratamiento GnRHa, a las 24 y 48 h post-inyección (p.i.) desovaron el 50% y 54,6% de las hembras respectivamente; mientras que con el tratamiento GnRHa+DOM, lo hicieron el 30,8% y 11,1% respectivamente (Fig. 1). Los porcentajes totales de hembras desovadas fueron 57,3% y 20,9% con GnRHa y GnRHa+DOM respectivamente, valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Mediante identificación histológica de OH, F0 y F1, se observó que las hembras de los muestreos de 24 h p.i. presentaron OH y/o F0; mientras que de las desovadas en el muestreo de 48 h p.i., el 83,3% del tratamiento con GnRHa presentó F1 (Fig. 2).

No se observó diferencias entre los niveles plasmáticos de esteroides gonadales en hembras ($P > 0,05$) encontrándose todos los valores de E_2 y T por debajo de 4000 pg/mL y los de $17,20\beta\text{P}$ menores a 2000 pg/mL (Fig. 3).

Los porcentajes de machos expulsantes en los grupos SS y SI fueron estadísticamente despreciables y no mostraron diferencias significativas entre ellos ($P > 0,05$), por lo que también se les consideró en adelante como un mismo grupo control. Hubo un efecto inmediato del tratamiento hormonal en los machos; observándose machos expulsantes desde las 0

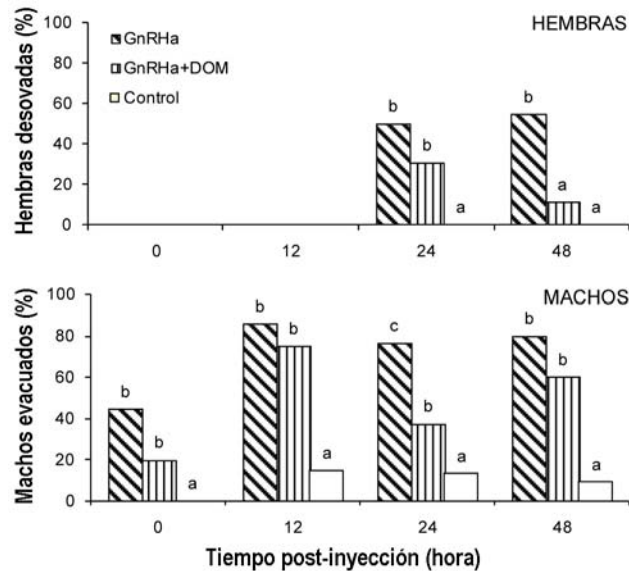


Figura 1. Porcentaje de hembras desovantes y machos expulsantes de *E. ringens* en cautiverio, posterior a la inyección de GnRHα o GnRHα+DOM. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de la misma hora ($P < 0,05$). GnRHα: análogo de hormona liberadora de gonadotropina (acetato de busserelina); DOM: domperidona.

Figure 1. Percentage of spawned females and evacuated males of *E. ringens* in captivity after GnRHα or GnRHα+DOM injection. Different letters indicate significant differences between treatments at the same time ($P < 0,05$). GnRHα: gonadotropin releasing hormone analogue (buserelin analogue); DOM: domperidone.

h (44,4%) y con valores máximos a las 12 h p.i. (85,7%) en los tratados con GnRHα. Con GnRHα+DOM, el 20% de machos expulsó a las 0 h y los máximos valores se observaron también a las 12 h p.i. (75,0%) (Fig. 1). Los porcentajes totales de machos expulsantes fueron 73,3% y 53,3% con GnRHα y GnRHα+DOM, respectivamente, siendo los valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

En los machos, sólo los niveles plasmáticos de E_2 del grupo control a las 0 h mostraron diferencias significativas (11938 pg/mL) respecto a los de 12, 24 y 48 h p.i. (5267; 1886 y 2659 pg/mL respectivamente) ($P < 0,05$) (Fig. 3). Los niveles de T y 17,20βP no mostraron variación ni entre tratamientos ni en el tiempo ($P > 0,05$) (Fig. 3).

DISCUSIÓN

El acetato de busserelina, un análogo de GnRH utilizado en mamíferos, resultó ser un efectivo inductor del desove (24 h p.i.) y espermiación (12 h

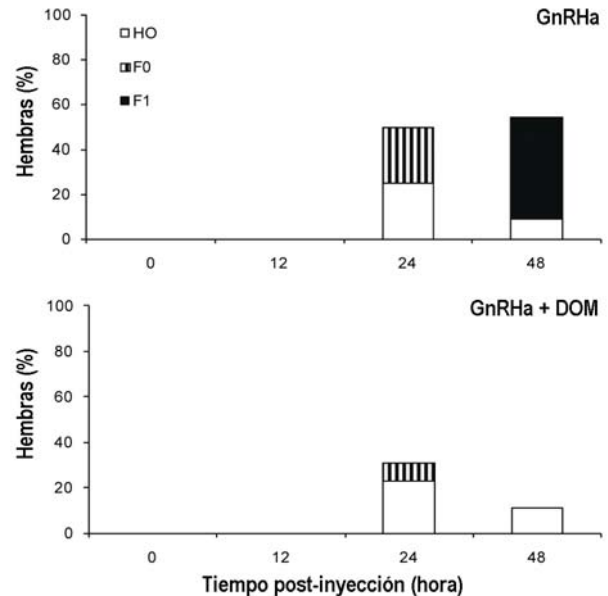


Figura 2. Porcentajes de hembras con ovocitos hidratados (OH), folículos post-ovulatorios de 0 a 24 h (F0), folículos post-ovulatorios de 24 a 48 h (F1) para la determinación de la hora de desove en pruebas de inducción en *E. ringens* en cautiverio.

Figure 2. Percentages of females with hydrated oocytes (OH), postovulatory follicles of 0 to 24 h (F0), postovulatory follicles of 24 to 48 h (F1) for determination of spawning time in induction test of *E. ringens* in captivity.

p.i.) en *Engraulis ringens*. Trabajos previos reportan también a este compuesto como un potente inductor del desove en truchas (Arabaci *et al.*, 2004b) y carpas cuando es utilizado con algún antidopaminérgico (Sukumasavin & Leelapatra, 1993; Sukumasavin *et al.*, 2000).

Aunque los porcentajes de hembras desovadas a 24 y 48 h p.i. fueron similares, los análisis histológicos mostraron OH y F0 en el primer grupo y F1 en el según grupo. Ello indica que casi la totalidad de desoves detectados en el muestreo de 48 h p.i. ocurrió a las 24 h p.i. En ese sentido, el periodo de latencia fue rápido comparado con el de otros peces marinos como *Dicentrarchus labrax* (Firat *et al.*, 2005; Forniés *et al.*, 2001) y *E. mordax* (Leong, 1971).

Los bajos niveles plasmáticos de E_2 y T observados en hembras desde el inicio del experimento, confirman el final del proceso de vitelogénesis, indicando que el momento de la inducción del desove fue el adecuado. Estos niveles se mantuvieron así, tal como corresponde a los estadios de maduración final en peces (King *et al.*, 1994). Además, en ningún momento del experimento se observó elevación de los niveles plasmáticos de

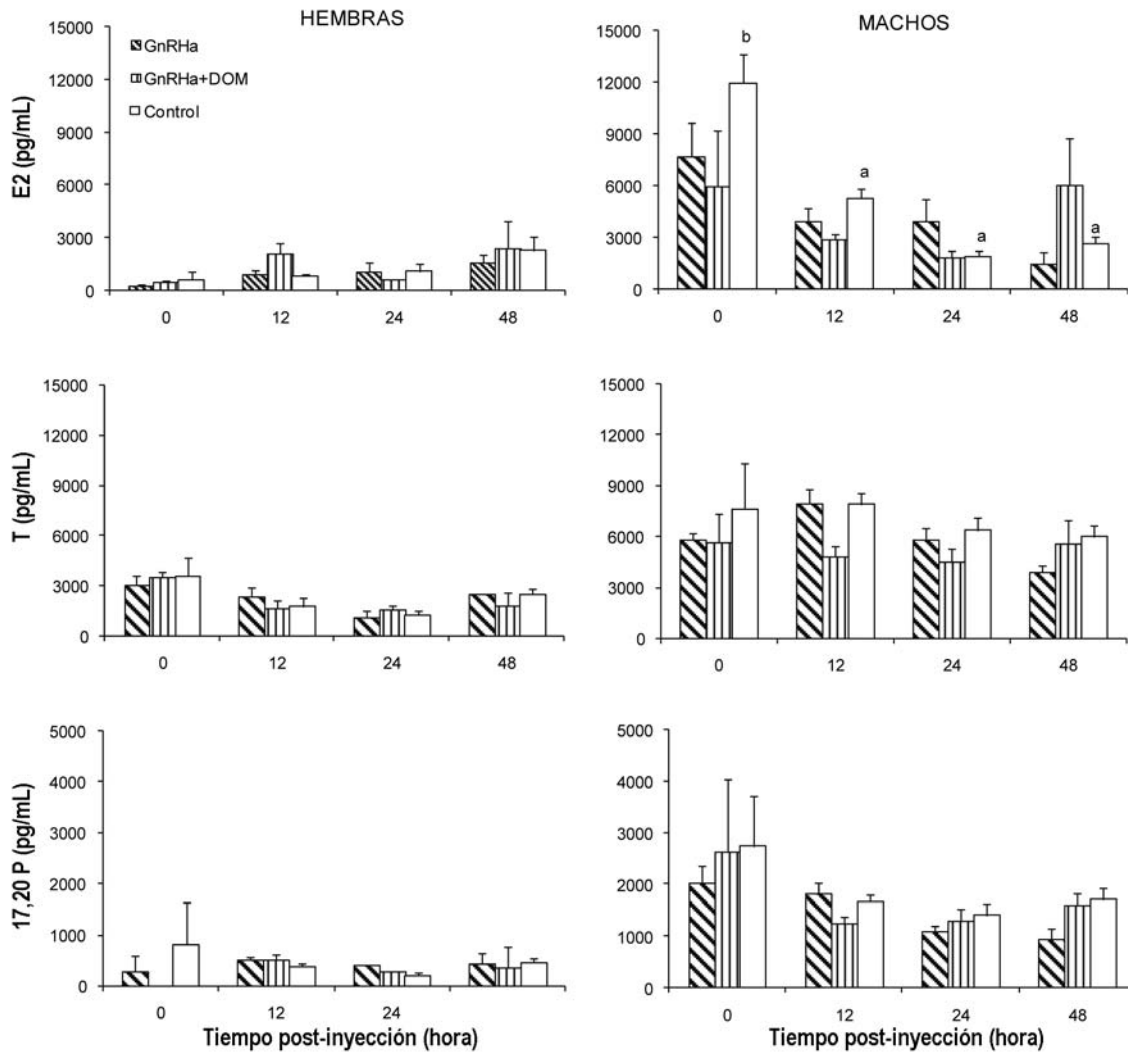


Figura 3. Niveles plasmáticos de esteroides gonadales en *E. ringens* inducidos al desove en cautiverio. Diferentes letras indican grupos estadísticamente diferentes entre horas del mismo tratamiento. Valores muestran media ± error estándar.

Figure 3. Plasmatic levels of gonadal steroids in *E. ringens* induced to spawning in captivity. Different letters indicate statistically different groups between hours of the same treatment. Values represent mean ± standard error.

17,20BP a pesar que el periodo entre muestreos fue corto (12 h), ello podría indicar que este esteroide no sería el inductor de la maduración final (MIS) en esta especie. Al respecto, es conocido que el 17,20BP es el MIS principalmente en goldfish y salmónidos (Nagahama, 1997). Sin embargo, en algunas especies se reporta al 17 α ,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) como el responsable de esta función (Patiño & Thomas, 1990; García *et al.*, 2004; Alberro *et al.*, 2008), lo cual podría estar sucediendo también en engráulidos. No debería descartarse tampoco la ocurrencia de acciones paracrinas o metabolizaciones de la 17,20BP a nivel ovárico, las cuales pudiesen haber enmascarado sus fluctuaciones plasmáticas, tal

como se ha descrito en otras especies (Scott & Canario, 1987; Scott *et al.*, 1998; Asturiano *et al.*, 2002). En este sentido, son necesarios más estudios para identificar al MIS en esta especie y la función que cumpliría el 17,20BP para optimizar los desoves en cautiverio.

La presencia de machos expulsantes inmediatamente después de la inyección, lo cual no se observó en los grupos control, indicaría una rápida acción del GnRH α sobre la espermiación, tal como se ha reportado para la lubina *Dicentrarchus labrax*, donde el tratamiento incrementó considerablemente los niveles de LH en plasma y minutos después la espermiación (Mañanós *et al.*, 2002). También

algunos peces del control mostraron expulsión de espermatozoides. Como lo describen Pérez *et al.* (2000) en *Anguilla anguilla*, tal hecho ocurriría como respuesta a feromonas liberadas al agua por los peces tratados con GnRH α ; ya que a pesar de encontrarse en diferentes tanques, todos los peces utilizaron el mismo sistema de recirculación de agua. Ello podría haber causado entonces la disminución de los niveles de E₂ plasmático en el grupo control, en que los valores disminuyeron significativamente a partir de las 12 h p.i. Al igual que en las hembras, en los machos tratados con GnRH α , los niveles de E₂, T y 17,20 β P no mostraron diferencias significativas durante todo el experimento.

Los mayores porcentajes de desoves y espermiación de los peces tratados con GnRH α respecto a los tratados con GnRH α +DOM, indicarían que la anchoveta peruana no tendría un fuerte control dopaminérgico en su sistema gonadotrófico, como sí ocurre en *Cirrhinis molitorella*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Paramisgurnus dabryanus* (Richard *et al.*, 1988), *Cyprinus carpio* (Alok *et al.*, 1997), *Rutilus frisii kutum* (Heyrati *et al.*, 2007) y *D. labrax* (Firat *et al.*, 2005). Por el contrario, se ha observado una significativa reducción de los porcentajes de desove y espermiación al inyectar DOM, tal como lo registrado por Prat *et al.* (2001) en *D. labrax*, quienes plantean un efecto negativo de algunos antidopaminérgicos en peces en los que la dopamina no es un inhibidor determinante de GnRHs.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto "Determinación experimental en ambientes controlados de los rangos de tolerancia de especies indicadoras a los cambios en las principales variables ambientales". Agradecemos al M.Sc. Víctor Yépez (IMARPE) por sus aportes y correcciones en la revisión de este artículo.

REFERENCIAS

- Adebayo, O. & O. Fagbenro. 2004. Induced ovulation and spawning of pond raised African giant catfish, *Heterobranchus bidorsalis* by exogenous hormones. *Aquaculture*, 242: 229-236.
- Alberro, A., P. Williot & D. Vizziano. 2008. Steroid synthesis during ovarian follicle maturation in the Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Cybium*, 32(2) Suppl.: 255.
- Alok, D., D. Pillai & L. Garg. 1997. Effect of D-Lys β salmon sGnRH alone and in combination with domperidone on the spawning of common carp during the late spawning season. *Aquacult. Int.*, 5: 369-374.
- Arabaci, M., H. Cagirgan & M. Sari. 2004a. Induction of ovulation in ornamental common carp (Koi, *Cyprinus carpio* L.) using LHRH α ([D-Ser(tBu) β , Pro β -NET]-LHRH) combined with haloperidol and carp pituitary extract. *Aquac. Res.*, 35: 10-14.
- Arabaci, M., I. Diler & M. Sari. 2004b. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRH α) and its effects on egg quality. *Aquaculture*, 237: 475-484.
- Asturiano, J., L. Sorbera, J. Ramos, D. Kime, M. Carrillo & S. Zanuy. 2002. Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci. Mar.*, 66: 273-282.
- Barrios, F. 2005. Determinación de los perfiles circulantes de esteroides gonadales y su relación con las variaciones histológicas del ovario de corvina blanca *Micropogonias furnieri*, a lo largo de un ciclo reproductivo. Tesis de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad La República, Uruguay, 52 pp.
- Biswas, A., T. Morita, G. Yoshizaki, M. Maita & T. Takeuchi. 2005. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, 243: 229-239.
- Blancas-Arroyo, G., G. Figueroa-Lucero, I. Barriga-Sosa & J. Arredondo-Figueroa. 2004. Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1935 (Pisces: Atherinopsidae). *Aquaculture*, 241: 575-585.
- Brzuska, E. & J. Adamek. 1999. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: stimulation of ovulation using LHRH α , ovaprim and carp pituitary extract. *Aquac. Res.*, 30: 59-64.
- Buitrón, B., A. Perea & A. Pellegrino. 1997. Estado reproductivo de la anchoveta peruana *Engraulis ringens* durante los veranos 1996 y 1997. *Inf. Inst. Mar Perú*, 127: 72-81.
- Cacot, P., M. Legendre, T.-Q. Dan, L.-T. Thung, P.-T. Liem, C. Mariojouis & J. Lazard. 2002. Induced ovulation of *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) with a progressive hCG treatment. *Aquaculture*, 213: 199-206.
- Dorafshan, S. & F. Heyrati. 2006. Spawning induction in Kutum *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using carp pituitary extract or GnRH analogue combined with metoclopramide. *Aquac. Res.*, 37: 751-755.

- Espinoza, C., A. Perea, J. Calderón, C. Salazar, B. Buitrón, V. Vera, E. Mecklenburg & P. Rojas. 2008. Captura y acondicionamiento en cautiverio de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). Inf. Inst. Mar Perú, 34(4): 269-277.
- Espinoza, C., V. Vera, A. Perea, B. Buitrón, P. Rojas & O. Kjesbu. 2009. Efecto de la ración alimenticia sobre la maduración gonadal y acumulación de grasa de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*, Jenyns 1842) en cautiverio. Lat. Am. J. Aquat. Res., 37(2): 181-190.
- Firat, K., S. Saka & C. Suzer. 2005. Gonadal oocyte development in LHRH hormone treated European Sea Bas (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) broodstock. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29: 83-87.
- Forniés, M., E. Mañanós, M. Carrillo, A. Rocha, S. Laureau, C. Mylonas & Y. Zohar. 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRH-delivery system. Aquaculture, 202: 221-234.
- García-Alonso, J., A. Nappa, A. Rey, G. Somoza & D. Vizziano. 2004. Steroid metabolism *in vitro* during final oocyte maturation in white croaker *Micropogonias furneri* (Pisces: Sciaenidae). Braz. Biol., 64(2): 211-220.
- Garrido, S., A. Marçalo, J. Zwolinski & C. Van der Lingen. 2007. Laboratory investigation on the effect of prey size and concentration on the feeding behaviour of *Sardina pilchardus*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 330: 189-199.
- Heyrati, F., H. Mostafavi, H. Toloee & S. Dorafshan. 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala⁶, Pro⁹-NET) GnRH_a combined with domperidone. Aquaculture, 265: 288-293.
- Hunter, J. & S. Golberg. 1980. Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish. Bull., 83(2): 119-136.
- Hunter, J. & B. Macewicz. 1983. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. In: R. Lasker (ed.). An eggs production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*, US Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS, 36: 79-94.
- King, W., P. Thomas & C. Sullivan. 1994. Hormonal regulation of final maturation of Striped Bass oocytes *in vitro*. Gen. Comp. Endocr., 96: 223-233.
- Leong, R. 1971. Induced spawning of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. Fish. Bull., 69: 357-60.
- Levavi-Sivan, B., R. Vaiman, O. Sachs & I. Tzchori. 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture, 229: 419-431.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. Finoia, Y. Zohar & C. Mylonas, 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH_a implant. Aquaculture, 219: 841-858.
- Mañanós, E., M. Carrillo, L. Sorbera, C. Mylonas, J. Asturiano, M. Bayarri, Y. Zohar & S. Zanuy. 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. J. Fish Biol., 60: 328-339.
- Mylonas, C., N. Papandroulakis, A. Smboukis, M. Papadaki & P. Divanach. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRH_a implants. Aquaculture, 237: 141-154.
- Nagahama, Y. 1997. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20BP), a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. Steroids, 62: 190-196.
- Olivar, M., P. Ambrosio & I. Catalán. 2000. A closed water recirculation system for ecological studies in marine fish larvae: growth and survival of sea bass larvae fed with live prey. Aquat. Living Resour., 13: 29-35.
- Patiño, R. & P. Thomas. 1990. Characterization of membrane receptor activity for 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). Gen. Comp. Endocr., 78: 204-217.
- Peñailillo, J. & M. Araya. 1996. Formation moment and periodicity of the growth microincrements in the otoliths of pejerrey larvae (*Austromenidia regia*) maintained in the laboratory. Invest. Mar., Valparaíso, 24: 31-38.
- Pérez, L., J. Asturiano, A. Tomás, S. Zegrari, R. Barrera, F. Espinós, J. Navarro & M. Jover. 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. J. Fish Biol., 57: 1488-1504.
- Peter, R. & K. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. Rev. Fish Biol. Fisher., 7: 173-197.
- Prat, F., S. Zanuy & M. Carrillo. 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH_a) and pimozone on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture, 198: 325-338.

- Richard, E., H. Lin & G. Van der Kraak. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 74: 1-10.
- Ronyai, A. 2007. Induced out-of-season and seasonal tank spawning and stripping of pike perch (*Sander lucioperca* L.). *Aquac. Res*, 38: 1144-1151.
- Scott, A. & A. Canario. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. En: D. Idler, L.-W. Crim & J. Walsh (eds). *Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, pp. 224-234.
- Scott, A., P. Witthames, R. Turner & A. Canario. 1998. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *J. Fish Biol.*, 52: 128-145.
- Sukumasavin, N. & W. Leelapatra. 1993. Comparison on the biological activities of gonadotropin releasing hormone and its analogs in combination with domperidone on the induction of gonadotropins secretion and spawning in the Thai carp, *Puntius gonionotus* Bleeker. *Thai Fisher. Gazette*, 46(6): 511-518.
- Sukumasavin, N., S. Sakulthong & R. Sangthong. 2000. A comparison of the potency of dopamine antagonist on spawning induction in Thai carp (*Puntius gonionotus* Bleeker). *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 34: 240-247.
- Vermeirssen, E., C. de Quero, R. Shields, B. Norberg, D. Kime & A. Scott. 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture*, 230: 547-567.
- Zohar, Y. & C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in culture fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.

Received: 23 Jun 2009; Accepted: 11 May 2010