

Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica

Desove inducido y crecimiento larval del pargo manchado, *Lutjanus guttatus*, en la Estación de Biología Marina de Puntarenas, Costa Rica

J Boza-Abarca^{1*}, E Calvo-Vargas¹, N Solis-Ortiz¹, J Komen²

¹ Estación de Biología Marina, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica.

* E-mail: jboza@una.ac.cr

² Fish Culture and Fisheries Group, Department of Animal Sciences, Wageningen Agricultural University, Netherlands.

Abstract

Wild spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* ($n = 400$, 60–100 g), were captured and grown out in cages during one year (February 2001 to February 2002). When the mature stage was detected by cannula samples, females ($n = 9$) were induced to spawn with a total dose of 1600 IU of human chorionic gonadotropin (HCG) per kilogram of body weight, given in two injections (56% and 44% of the total dose). Males received only one injection of 200 IU HCG kg⁻¹ body weight, at the time of the second female injection. The sex ratio (female:male) was 1:2. Mean female body weight was 604.9 ± 98.8 g (36.4 ± 2.1 cm). Egg release occurred 9–12 hours after the second injection (latent period), at a temperature of 26.3–28.2°C, salinity of 30–32‰, and oxygen concentration of 5.5–6.6 g L⁻¹. The fertilization rate was 90% of buoyant eggs, with a mean egg diameter of 0.857 ± 0.044 mm. Hatching occurred 15 hours after spawning (h.a.s.) at 26.3–28.2°C. Larvae started feeding 65 h.a.s. and the postflexion stage was observed 27 days after spawning (d.a.s.). The critical period was observed 3–5 d.a.s., as in other lutjanid species. At 26 d.a.s., the growth rate was 0.243 mm d⁻¹ and the survival rate was 1.5%. The growth rate of the fingerlings (171 d.a.s.) was 0.2 g d⁻¹, with a mean body weight of 33.36 ± 9.13 g. Naturally spawned larvae grew until 30 d.a.s., when massive mortality occurred.

Key words: *Lutjanus guttatus*, spotted rose snapper, reproduction, larval rearing.

Resumen

Se capturaron y engordaron especímenes silvestres de pargo manchado ($n = 400$, 60–100 g), *Lutjanus guttatus*, en jaulas flotantes por un año (de febrero 2001 a febrero 2002). El estado de madurez de las hembras fue registrado mediante muestras de cánula y, cuando se detectó la madurez, las hembras fueron inducidas a desovar con gonadotropina coriónica humana (GCH) en una dosis total de 1600 UI de GCH kg⁻¹ de peso corporal. Las hembras ($n = 9$) recibieron dos inyecciones (56% y 44% de la dosis total) y los machos fueron inyectados con una dosis de 200 UI de GCH kg⁻¹ de peso corporal, simultáneamente con la segunda inyección de las hembras. La relación de sexos (hembra:macho) fue de 1:2. Los promedios de peso y talla de las hembras fueron de 604.9 ± 98.8 g y 36.4 ± 2.1 cm, respectivamente. El desove ocurrió entre 9 y 12 horas después de la segunda inyección (periodo de latencia) a 30–32‰ de salinidad, 26.3–28.2°C y 5.5–6.6 g L⁻¹ de oxígeno. El porcentaje de fertilización fue de 90% de los huevos flotantes, cuyos diámetros eran de 0.857 ± 0.044 mm. Las larvas eclosionaron 15 horas después del desove (hdd) a 26.3–28.2°C. Después de 65 hdd, las larvas empiezan a alimentarse, y 27 días después del desove (ddd) se observó el estado de postflexión. El periodo crítico se detectó, al igual que en otros lutjánidos, entre 3 y 5 ddd. La tasa de crecimiento a los 26 ddd fue de 0.243 mm d⁻¹, y la supervivencia de 1.5%. El crecimiento de los juveniles (171 ddd), con un peso medio de 33.36 ± 9.13 g, fue de 0.2 g d⁻¹. En larvas obtenidas con desove espontáneo, el periodo crítico ocurre a los 30 ddd, cuando se presenta una mortalidad masiva.

Palabras clave: *Lutjanus guttatus*, pargo manchado, reproducción, alevinaje.

Introduction

The spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869), is distributed along the Pacific coast of the American continent (Grimes 1987, Fischer *et al.* 1995, Rojas *et al.* 2004) and, in Costa Rica, it is a very important commercial species (Siefke 1995). In 1996, its landings reached around 60 t only in the external area of the Gulf of Nicoya (Vargas 1999). In recent

Introducción

El pargo manchado, *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869), se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico del continente americano (Grimes 1987, Fischer *et al.* 1995, Rojas *et al.* 2004), y es una especie de gran importancia comercial en Costa Rica (Siefke 1995). En 1996, tan sólo en la zona externa del Golfo de Nicoya se capturaron alrededor de 60 t (Vargas

years, however, landings have tended to decrease and fishing effort to increase.

Snappers are considered potential commercial species for the aquaculture industry (Tucker and Jory 1991, Bennetti and Wilson 1996, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004, Ogle and Lotz 2006). Several lutjanid species have been found suitable for aquaculture (Watanabe *et al.* 1998, Turano *et al.* 2000, Emata 2003, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004), among them *L. guttatus* (Cano 2003, Ibarra *et al.* 2004). It accepts dry pellets and can be kept in cages without showing aggressive behaviour (Olivares and Boza 1999), and its reproduction can be controlled (Valverde and Boza 1999, Cano 2003).

Some lutjanid species have been spawned spontaneously or artificially in captivity; however, spawning can be very difficult and larvae die in the first few days after hatching or during metamorphosis, and the survival rate is low (Emata *et al.* 1994, Avilés-Quevedo *et al.* 1996, Leu *et al.* 2003, Ibarra *et al.* 2004, Ogle and Lotz 2006). In 1997, in Panama, *L. guttatus* was spawned spontaneously and in captivity using hormone induction, but details about the hormone used, doses, or conditions have not been reported (Cano 2003).

Valverde and Boza (1999) studied the effect of carp pituitary suspension in mature wild *L. guttatus* caught by bottom long line. Females (2–3 kg body weight) were injected with 4 mg CPS kg⁻¹ body weight (around 800 IU HCG kg⁻¹), and expelled 11,550–12,550 eggs after 24 h. In other spawning induction experiments in Costa Rica, the human chorionic gonadotropin (HCG) hormone has been used with success (unpublished data). Ibarra *et al.* (2004) induced *L. guttatus* spawning using luteinizing hormone releasing hormone ethylamide analogue (LHRHa) implants with 25 or 75 µg kg⁻¹ body weight.

The following fertilization rates have been reported for lutjanid species: for *L. argentimaculatus*, 0–86.4% by hormonal induction (HI) (Singhagraiwan and Doi 1993), 77.3–80% by HI (Emata 2003), and 74.3% by natural spawning (NS) (Leu *et al.* 2003); for *L. analis*, 75.7% by HI (Watanabe *et al.* 1998); for *L. griseus*, 85.9% by HI (Cabrera *et al.* 1998); and for *L. campechanus*, 1.74–79.0% by HI (Bourque and Phelps 2007).

Survival rates have also been reported for several species. For *L. johni*, Lim *et al.* (1985) obtained a survival rate of 5% (HI) 35 days after hatching (d.a.h.). For *L. argentimaculatus*, Singhagraiwan and Doi (1993) reported 3% (HI, 20 d.a.h.) and Leu *et al.* (2003) obtained 10.8–32.3% (NS, 50 d.a.h.). Duray *et al.* (1996, in Tucker 1998) reported 16.2% (55 d.a.h.) for Asian red snapper and Watanabe *et al.* (1998), 14.3% (HI, 38 d.a.h.) for *L. analis*, while Cano (2003) reported 9–30% for *L. guttatus* after 30 days of culture.

Controlled reproduction of captive breeders must be assessed to develop a reliable broodstock management technique as well as fingerling production, and thus ensure sustainable aquaculture production (Bromage 1995).

In Costa Rica, the marine fish group at the Marine Biology Station of Nacional University uses HCG to induce final maturation and ovulation, and larvae are grown under laboratory

1999). Sin embargo, mientras que el esfuerzo de pesca sobre esta especie se incrementa, su captura tiende a disminuir, .

Los pargos se consideran especies con potencial para la acuicultura comercial (Tucker y Jory 1991, Bennetti y Wilson 1996, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004, Ogle y Lotz 2006), y *L. guttatus* es una de las especies que ha mostrado buenas condiciones para la acuicultura (Cano 2003, Ibarra *et al.* 2004), junto con otras especies de lutjánidos (Watanabe *et al.* 1998, Turano *et al.* 2000, Emata 2003, Leu *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2004). Esta especie acepta alimento peletizado, se puede mantener en jaulas sin presentar un comportamiento agresivo (Olivares y Boza 1999), y es posible controlar su reproducción (Valverde y Boza 1999, Cano 2003).

Varias especies de lutjánidos han sido desovadas espontánea o artificialmente en cautiverio, aunque la principal dificultad estriba en la inducción al desove y en que las larvas mueren durante los primeros días después de eclosionar, o durante la metamorfosis, con una supervivencia muy baja (Emata *et al.* 1994, Avilés-Quevedo *et al.* 1996, Leu *et al.* 2003, Ibarra *et al.* 2004, Ogle y Lotz 2006). En 1997, en Panamá se lograron desoves espontáneos y por inducción hormonal de *L. guttatus* en cautiverio, pero no se reportaron detalles acerca de la hormona utilizada, la dosis y demás condiciones del desove (Cano 2003).

Valverde y Boza (1999) estudiaron el efecto de la suspensión de pituitaria de carpa en hembras salvajes maduras de *L. guttatus* capturadas por medio de línea de fondo con anzuelos. Las hembras (2–3 kg de peso corporal) fueron inyectadas con 4 mg SPC kg⁻¹ de peso corporal (alrededor de 800 UI GCH kg⁻¹ de peso corporal), y 24 h después del tratamiento liberaron entre 11,550 y 12,550 huevos. También, en otros experimentos de inducción al desove en Costa Rica se ha utilizado hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) con éxito (datos no publicados). Ibarra *et al.* (2004) utilizaron implantes del análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (HLHLA) en hembras de *L. guttatus*, logrando desoves con dosis de 25 ó 75 µg kg⁻¹ de peso corporal.

En otras especies de lutjánidos se han evaluado los porcentaje de fertilización en los desoves, y de supervivencia de las larvas producidas. En cuanto a fertilización, para *L. argentimaculatus*, con inducción hormonal (IH), se han reportado porcentajes de 0–86.4% (Singhagraiwan y Doi 1993) y de 77.3–80% (Emata 2003), y 74.3% con desove natural (DN) (Leu *et al.* 2003); para *L. analis* se ha reportado un 75.7% con IH (Watanabe *et al.* 1998); para *L. griseus* un 85.9% con IH (Cabrera *et al.* 1998), y para *L. campechanus* de 1.74–79.0% con IH (Bourque y Phelps 2007). En cuanto al porcentaje de supervivencia larval, Lim *et al.* (1985) obtuvieron 5% de supervivencia de *L. johni* (IH) 35 días después de la eclosión (dde); para larvas de *L. argentimaculatus*, Singhagraiwan y Doi (1993) observaron un 3% de supervivencia (IH, 20 dde), y Leu *et al.* (2003) observaron 10.8–32.3% (DN, 50 dde). Duray *et al.* (1996, en Tucker 1998) reportan para el pargo rojo asiático un 16.2% de supervivencia larval (55 dde); Watanabe *et al.* (1998) para *L. analis* reportaron una supervivencia de 14.3%

conditions. This paper describes the results of induced spawning with HCG and larval rearing conditions. These results are the first to be reported by the project aiming to establish a larval rearing technique for *L. guttatus*.

Material and methods

Broodstock

Spotted rose snapper juveniles ($n = 400$) were caught in the Gulf of Nicoya (Costa Rica) using fish hooks in February 2001. The fish were reared in cages during one year to produce broodstock, and the maturation stage was monitored every month. Broodfish of 60–100 g (76.76 ± 14.47 g, mean $\pm$ SD) body weight and 16–20 cm (18.60 ± 1.8 cm, mean $\pm$ SD) total length were reared in cages ($4 \times 4 \times 3$ m, 48 m^3), at a density of 8 fish m^{-3} . Broodfish were fed a commercial diet containing 38% protein. After 10 months (305 days, December 2001) the mean weight was 550 ± 150 g. After maturation was observed (605 ± 99 g, 36.4 ± 2.1 cm, February 2002), by preliminary ovarian biopsy (vitellogenic egg present), broodfish were transported to the Marine Biology Station at Puntarenas to perform hormonal induction.

Spawning protocol

Hormonal induction was performed from February to August 2002. Gonadal maturation in females was evaluated by canulation. Female specimens were anesthetized with MS-222 ($10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$) until they stopped moving. Maturation was detected by inserting a polyethylene tube (0.75 mm inner diameter) into the genital pore, followed by gentle aspiration of ovary tissue (oocytes). In males, a gentle massage of the abdomen followed by sperm release was sufficient indication of mature specimens (Singhagraiwan and Doi 1993, Leu *et al.* 2003, Bourque and Phelps 2007). The fish were transported from the cages to the Marine Biology Station (around 30 min by speed boat), where a gonadal biopsy was taken and analyzed in detail. The oocyte samples ($n = 50$) were measured in diameter (± 0.01 mm) and the maturation stages were determined. During the artificial induction period, 27 broodfish were selected (females, $n = 9$; males, $n = 18$).

Before the first HCG injection (Chorulon Intervet Int.), males and females were again anesthetized ($10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$) and weighed (Sartorius balance, ± 0.1 g). They were given a freshwater bath for 3 min to avoid introducing ectoparasites into the system. Fish was injected intramuscularly in the posterior end of the dorsal fin. Females were injected with a total dose of $1600 \text{ IU HCG kg}^{-1}$ body weight given in two injections, the first consisting of 56% of the total dose. Once injected, females were placed in the 2.5-t cylindrical fiberglass spawning tank (with egg collector, and internal and external water flow), together with the males. The second injection (44% of the total dose) was given after 24 h. Males received only one injection of $200 \text{ IU HCG kg}^{-1}$ body weight, when the

(IH, 38 dde), mientras que durante los 30 primeros días de cultivo para *L. guttatus* Cano (2003) obtuvo supervivencias de 9–30%.

Es necesario lograr la reproducción controlada de especímenes cautivos para así poder desarrollar una técnica confiable de manejo de reproductores, así como de producción de juveniles, y de esta manera asegurar la sostenibilidad de la acuicultura de esta especie (Bromage 1995).

En Costa Rica, el grupo de Peces Marinos de la Estación de Biología Marina, de la Universidad Nacional, ha utilizado GCH para inducir la maduración final y el desove, cultivando las larvas en condiciones de laboratorio. Este trabajo describe los resultados del desove inducido con GCH y las condiciones del cultivo de larvas. Estos son los primeros resultados reportados de un proyecto para establecer una técnica de producción y crianza de larvas de *L. guttatus*.

Materiales y métodos

Reproductores

Se recolectaron con caña de pescar pargos manchados juveniles ($n = 400$) en el Golfo de Nicoya en febrero de 2001, para ser utilizados como reproductores. Los peces fueron engordados durante un año observando cada mes el estado de madurez. Los peces, con un peso entre 60 y 100 g (76.76 ± 14.47 g, promedio $\pm$ DE) y una longitud total de 16 a 20 cm (18.60 ± 1.8 cm, promedio $\pm$ DE), fueron engordados en jaulas ($4 \times 4 \times 3$ m, 48 m^3) a una densidad de 8 peces m^{-3} . Los peces fueron alimentados con una dieta comercial con 38% de proteína. Después de 10 meses (305 días, diciembre de 2001), los peces promediaron un peso de 550 ± 150 g. Una vez que la maduración fue evidenciada (605 ± 99 g, 36.4 ± 2.1 cm, febrero 2002) por la presencia de ovocitos vitelogénicos en la biopsia ovárica preliminar (canulación), los reproductores se trasladaron a la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional para realizar la inducción hormonal.

Protocolo de desove

La inducción hormonal fue realizada de febrero a agosto de 2002. La maduración gonadal de las hembras fue evaluada mediante canulación. Los peces fueron anestesiados en un tanque con MS-222 ($10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$). La madurez fue detectada en las hembras inmovilizándolas e insertando un tubo de polietileno (0.75 mm de diámetro interno) en el poro genital, y aspirando suavemente el contenido ovárico (ovocitos). En los machos, un masaje suave en el abdomen seguido de la liberación de semen, fue suficiente indicación para seleccionar los machos maduros (Singhagraiwan y Doi 1993, Leu *et al.* 2003, Bourque y Phelps 2007). Los peces fueron trasladados de las jaulas a la Estación de Biología Marina (alrededor de 30 min en una lancha rápida), donde se analizó en detalle otra biopsia ovárica midiendo el diámetro de los ovocitos (± 0.01 mm; $n = 50$) y verificando su estado de madurez. Durante el periodo de

second female injection was given. Before each injection, female ovary samples were taken by canulation and oocytes were measured ($n = 50$). The male:female ratio was 2:1.

After the second injection, females and males were returned to the spawning tank. Males fertilized eggs naturally once females released them into the water. The presence of eggs on the surface indicated that spawning had occurred. The egg collector consisted of a fiberglass basket covered by a fine mesh of less than 500 μm (20 L volume). After spawning had occurred, broodstock were kept in a 18-t cylindrical fiberglass recuperation tank with constant air supply, seawater supply, and covered with Saran Wrap, and fed fresh food (squid, polychaete worms, chopped sardines, and live shrimp). The recuperation tank was also checked for eggs every day. In both the spawning and recuperation tanks, salinity was 30–32‰, temperature was 26.3–28.2°C, and oxygen was 5.5–6.6 g L⁻¹.

Eggs and larval rearing

The eggs from the spawning tank were gathered in the egg collector (4–5 h after spawning), and the total number of eggs and fertilization rate were estimated. The eggs were washed under minimal aseptic conditions (irradiated water, 30,000 $\mu\text{W sec cm}^{-2}$) to remove dirty particulate debris, and then placed in 2.5-t aerated cylindrical fiberglass tanks containing 500 L of filtered (10- μm mesh) and UV-irradiated seawater (26.3–28.2°C). A Saran Wrap cover (85% shade) was installed to prevent the direct incidence of light. A blower supplied a minimum level of aeration (20 psi). Before initiating the feeding regime (fig. 1), fertilized eggs were stocked at 20 eggs L⁻¹. When the larvae showed eye pigmentation and the mouth opening (measured using a stereomicroscope with ocular micrometer, ± 0.01 mm; $n = 100$), the tanks were inoculated with *Isochrysis galbana* (0.6×10^6 cells mL⁻¹), *Brachionus plicatilis* (15–20 rotifers mL⁻¹), fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*, 5 eggs mL⁻¹), and wild zooplankton from

desove se seleccionaron 27 reproductores (hembras, $n = 9$; machos, $n = 18$).

Antes de la primera inyección con GCH (Chorulon, Intervet Int.), los peces fueron anestesiados con MS-222 (10–100 mg L⁻¹), pesados (balanza Sartorius, ± 0.1 g), introducidos en un baño de agua dulce por 3 min para eliminar ectoparásitos, e inyectados intramuscularmente al final de la aleta dorsal. Las hembras fueron inyectadas con una dosis total de 1600 UI GCH kg⁻¹ de peso corporal, dividida en dos inyecciones; la primera inyección fue de 56% de la dosis total. Una vez inyectadas se colocaron junto a los machos en el tanque de desove, el cual consistió de un tanque cilíndrico de fibra de vidrio de 2.5 t, adaptado a las condiciones de desove (con colector de huevos, flujo de agua interno y externo). Se sacaron del tanque de desove 24 h después, y entonces se aplicó la segunda inyección (44% restante). Al momento de cada inyección se tomaron muestras de ovocitos por medio de canulación y se midieron ($n = 50$). Los machos recibieron solamente una inyección de 200 UI GCH kg⁻¹ de peso corporal, junto con la segunda inyección de las hembras. La relación machos: hembras fue de 2:1.

Después de la segunda inyección, los peces inyectados (hembra y machos) permanecieron en el tanque de desove. Los machos fecundan los huevos naturalmente una vez que éstos son liberados por la hembra en el agua. El momento del desove fue registrado por la presencia de huevos en la superficie del tanque. El colector de huevos consistió de un contenedor de fibra de vidrio cubierto de malla fina menor a las 500 μm (volumen de 20 L). Una vez desovados, los peces fueron trasladados a un tanque cilíndrico de fibra de vidrio de 18 t con aireación constante, entrada y salida de agua, y cubierta de sarán, para su recuperación; estos peces fueron alimentados con alimento fresco (calamar, poliquetos, sardina picada y camarón vivo). Este último tanque también fue observado diariamente con el fin de detectar desoves. La salinidad, tanto en los tanques de desove como en los de recuperación, fue de 30–32‰, la temperatura de 26.3–28.2°C y la concentración de oxígeno de 5.5–6.6 g L⁻¹.

Huevos y cultivo larval

Los huevos en el tanque de desove fueron recolectados por rebalse (4–5 h después del desove), y se estimó su número total y porcentaje de fertilización. Los huevos se limpiaron bajo las mínimas condiciones asépticas (recambios de agua irradiada (30,000 $\mu\text{W sec cm}^{-2}$) para eliminar impurezas, y luego fueron colocados en tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 2.5 t, con 500 L de agua de mar filtrada (malla 10 μm) e irradiada (UV), a 26.3–28.2°C. Se instaló una cubierta de sarán (85% de sombra) para evitar la incidencia directa de la luz solar, y se suministró aireación leve (20 psi) con un soplador eléctrico. Al iniciar el proceso de alimentación (fig. 1), la densidad en el tanque fue de 20 huevos L⁻¹. Al observarse la pigmentación en los ojos de la larva y la abertura de la boca, ésta se midió ($n = 100$) utilizando un estereoscopio con micrómetro (± 0.01 mm),

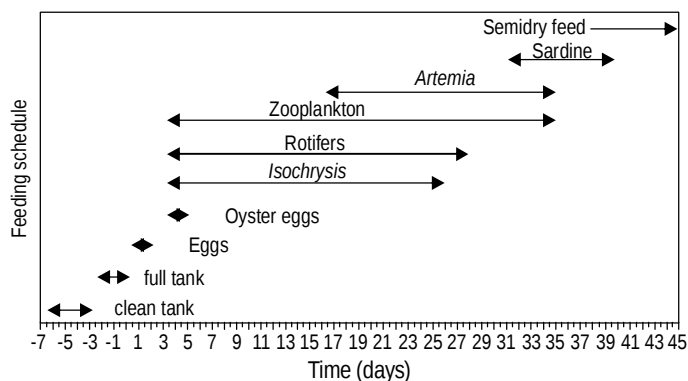


Figure 1. Feeding regime used during larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, from egg to weaning.

Figura 1. Esquema de alimentación utilizado durante el levantamiento larval del pargo manchado *Lutjanus guttatus*, desde huevos fertilizados hasta el destete.

the Gulf of Nicoya (less than 150 μm in size), mainly copepod larvae (5–10 ind mL^{-1}). Densities (oyster eggs only one day) were maintained until day 27 for *Isochrysis*, day 29 for rotifers, and day 35 for zooplankton. On day 16, larvae were ready to accept *Artemia* nauplii, at 3–5 nauplii mL^{-1} (supplied three times per day). *Artemia* feeding was stopped on day 36, when larvae began to accept fresh sardine (day 31). In the weaning period, semidry feed (20%) was combined with fresh sardine (80%). The proportion of semidry feed was increased every day until it was the only food provided (table 1, Olivares and Boza 1999). The tanks were cleaned every day by siphon. Samples of larvae were taken every two days when possible. Larval growth was monitored until day 26 by measuring the total length of at least 10 larvae under a stereomicroscope equipped with an ocular micrometer (± 0.01 mm).

Larval survival was determined after each cycle (around 45 days, females 8 and 9). Growth was determined on days 67, 73, 135, and 171, measuring the total weight ($n = 30$) using a digital balance (± 0.01 g). Once weighed, juveniles were returned to the tanks.

Results

Broodstock

Nine spawnings were induced with different females ($n = 9$) from February to August 2002. Females only spawned once by hormonal induction, releasing the eggs 10–12 h after the second injection (latent period). The broodstock data are summarized in table 2. The mean female body weight was 604.89 ± 98.80 g (mean $\pm$ SD). The maximum weight was 774 g (female 8), with an oocyte diameter of 0.425 ± 0.020 mm at the first injection and of 0.516 ± 0.070 mm at the second (fig. 2a, b), producing 47,000 eggs, with a fertilization rate of 90% (buoyant eggs) (fig. 2c). The minimum female weight was 450 g (female 9), with an oocyte diameter of 0.400 ± 0.035 mm at the first injection and of 0.502 ± 0.081 mm at the

y los tanques fueron inoculados con el alga *Isochrysis galbana* (0.6×10^6 cel mL^{-1}), rotíferos *Brachionus plicatilis* (15–20 ind mL^{-1}), huevos de ostra fertilizados (*Crassostrea gigas*, 5 huevos mL^{-1}), y zooplankton prefiltrado del Golfo de Nicoya (menos de 150 μm de tamaño) que contenía principalmente larvas de copépodos (5–10 ind mL^{-1}). Excepto los huevos de ostra fertilizados que se mantuvieron un sólo día, las densidades de *Isochrysis galbana*, rotíferos, y zooplankton se mantuvieron respectivamente hasta los días 27, 29 y 35. El día 16 se inició la alimentación con nauplios de *Artemia* (3–5 nauplios mL^{-1} , en tres raciones diarias). La alimentación con nauplios de *Artemia* terminó el día 36, ya que a partir de entonces las larvas aceptaron la sardina fresca como alimento (día 31). El destete se realizó combinando alimento semiseco (20%) con sardina fresca (80%). La proporción fue cambiando hasta que únicamente se suministró alimento seco (tabla 1, Olivares y Boza 1999). Todos los días se limpió el fondo de los tanques con sifones. Cuando fue posible, se recolectaron muestras de larvas cada dos días. Se registró el crecimiento hasta el día 26 midiendo la longitud total de al menos 10 larvas, mediante un estereoscopio con micrómetro (± 0.01 mm).

La supervivencia de las larvas fue determinada después de cada ciclo (alrededor de 45 días, hembras 8 y 9). El crecimiento en peso de los juveniles fue medido a los 67, 73, 135 y 171 días, por medio de una balanza digital (± 0.01 g, $n = 30$). Una vez pesados, los peces fueron devueltos a su respectivo tanque.

Resultados

Reproductores

Se realizaron nueve inducciones al desove con diferentes hembras ($n = 9$) de febrero a agosto de 2002. Las hembras inducidas al desove por medio del protocolo hormonal sólo desovaron una vez, y lo hicieron de 10–12 h después de la segunda inyección (periodo de latencia). La tabla 2 resume los resultados de los desoves. Las hembras tuvieron un peso de 604.89 ± 98.80 g (promedio $\pm$ DE). El peso máximo fue de 774 g (hembra 8), con ovocitos de 0.425 ± 0.020 mm de diámetro en la primera inyección, y de 0.516 ± 0.070 mm en la segunda inyección (fig. 2a, b), y una producción de 47,000 huevos con 90% de fertilización (huevos flotantes) (fig. 2c). El peso mínimo de las hembras fue de 450 g (hembra 9), con un diámetro en la primera inyección de 0.400 ± 0.035 mm, y de 0.502 ± 0.081 mm en la segunda, produciendo 47,000 huevos con 90% de fertilización de los huevos flotantes.

Una vez que se dio el desove inducido, los peces fueron colocados en un tanque cilíndrico de 18 t (hembras 8 y 9 con sus respectivos machos, agosto de 2002) y fueron alimentados con sardina fresca y calamar hasta saciarse, cada dos días.

Los huevos fertilizados fueron transparentes, esféricos, pelágicos y no adheribles, con un espacio perivitelino muy pequeño (fig. 2c, d). Los huevos fertilizados (hembra 8) tuvieron un diámetro de 0.857 ± 0.044 mm ($n = 100$), con un

Table 1. Formulated feed diet composition for *Lutjanus guttatus* juveniles (Olivares and Boza 1999).

Tabla 1. Composición del alimento formulado en base seca para juveniles de pargo manchado (Olivares y Boza 1999).

Ingredients	%	Nutrients	%
Fish meal	35	Protein	49.61
Shrimp meal	15	Carbohydrate	17.53
Soybean meal	10	Lipids	11.77
Wheat meal	15	Ash	15.89
Meat and bone meal	5	Fiber	2.20
Blood meal	10	Humidity	5.14
Fish oil	7	Gross energy	19.62 KJ g^{-1}
Vitamin premix	3	(calculated)	

Table 2. *Lutjanus guttatus* female body weight (BW, $n = 9$), latent period after the second injection, initial oocyte diameter before the first injection, oocyte diameter before the second injection (24 h), number of eggs produced, fertilization rate, and larval survival rate (February to August 2002).**Tabla 2.** Peso corporal de las hembras ($n = 9$), tiempo de latencia después de la segunda inyección, diámetro de los ovocitos antes de la primera inyección (cero horas) y antes de la segunda inyección (24 h), número de huevos desovados, tasa de fertilización y tasa de supervivencia de las larvas, febrero a agosto de 2002.

Induction date (female)	Female BW (g)	Latent period (h)	Oocyte diameter (0 h) (mm $\pm$ SD)	Oocyte diameter (24 h) (mm $\pm$ SD)	Number of eggs	Fertilization (%)	Larval survival (days)
February (1)	605	15	0.425 $\pm$ 0.067	0.508 $\pm$ 0.079	–	–	–
February (2)	715	9	0.422 $\pm$ 0.058	0.458 $\pm$ 0.047	20,000	65	5
March (3)	575	9	0.423 $\pm$ 0.018	0.511 $\pm$ 0.051	21,000	60	–
April (4)	520	12	0.383 $\pm$ 0.021	0.428 $\pm$ 0.011	11,000	–	10
May (5)	543	12	0.441 $\pm$ 0.021	0.498 $\pm$ 0.077	9,000	–	9
June (6)	624	10	0.373 $\pm$ 0.032	0.455 $\pm$ 0.073	8,600	30	4
July (7)	638	10	0.361 $\pm$ 0.064	0.449 $\pm$ 0.089	11,000	40	4
August (8)	774	10	0.425 $\pm$ 0.020	0.516 $\pm$ 0.070	47,000	90	+45
August (9)	450	10	0.400 $\pm$ 0.035	0.502 $\pm$ 0.081	47,000	90	+45

second, producing 47,000 eggs, with a fertilization rate of 90% (buoyant eggs).

After the artificial spawning, broodstock were kept in an 18-t cylindrical fiberglass tank (females 8 and 9 with their males, August 2002). Broodstock were fed fresh sardine and squid to satiation every two days.

The fertilized eggs were transparent, spherical, pelagic, and non-adhesive, with no or very narrow perivitelline space (fig. 2c, d). Fertilized eggs (female 8) had a mean diameter of 0.857 ± 0.044 mm ($n = 100$), with a maximum diameter of 0.943 mm and minimum diameter of 0.761 mm. The oil globule in the spawned eggs (female 8) measured 0.115 ± 0.013 mm ($n = 100$).

Eggs and larval rearing

The blastula stage was observed one hour after spawning (h.a.s.) (fig. 2c) and the gastrula stage was reached 3 h.a.s. (fig. 2d). A C-shaped embryo was observed 5 h.a.s. (fig. 2e, f), and an S-shaped embryo was detected 13 h.a.s. (fig. 2g). Larvae hatched 15 h.a.s. (fig. 3a), and had a total length of 2.384 ± 0.043 mm (mean $\pm$ SD, $n = 30$). A single oil globule was observed in front of the head (but below it), inside the yolk sac (which extended in front of the head). Larvae had consumed nearly half of the yolk sac at 37 h.a.s. (fig. 3b) and all of it at 53 h.a.s., but the oil globule remained (fig. 3c).

After 65 h (0.105 ± 0.010 mm, $n = 100$), larvae opened the mouth and the eyes were pigmented, and the external feeding began (fig. 3d). Preflexion larvae occurred 15 days after spawning (d.a.s.) (4.225 ± 0.074 mm, $n = 10$; fig. 3e), flexion larvae occurred 20 d.a.s. (5.598 ± 0.088 mm, $n = 10$; fig. 3f), and postflexion larvae occurred 27 d.a.s. (8.711 ± 0.068 mm, $n = 10$; fig. 3g).

máximo de 0.943 mm y un mínimo de 0.761 mm. La gota de lípidos en los huevos desovados (hembras 8) midió 0.115 ± 0.013 mm ($n = 100$).

Huevos y cultivo larval

Una hora después del desove (hdd) fue fácil de observar la blástula (fig. 2c) y 3 hdd se observó la gástrula (fig. 2d). El embrión fue observado en forma C a las 5 hdd (fig. 2e, f), y la forma S fue observada 13 hdd (fig. 2g). Las larvas eclosionaron 15 hdd (fig. 3a), con una longitud total de 2.384 ± 0.043 mm (promedio $\pm$ DE, $n = 30$). La gota de lípidos fue visible en una posición anterior a la cabeza (pero inferior a ella), dentro del saco vitelino, el cual se extiende más allá de la cabeza. A las 37 hdd las larvas habían consumido aproximadamente la mitad del saco vitelino (fig. 3b) y 53 hdd lo habían consumido en su totalidad, pero prevalece la gota de lípidos (fig. 3c).

Las larvas abrieron la boca a las 65 hdd (0.105 ± 0.010 mm, $n = 100$) y se observó la pigmentación de los ojos, iniciando en ese momento la alimentación externa (fig. 3d). La preflexión de las larvas ocurrió a los 15 días después del desove (ddd) (4.225 ± 0.074 mm, $n = 10$; fig. 3e), la flexión a los 20 ddd (5.598 ± 0.088 mm, $n = 10$; fig. 3f), y la posflexión a los 27 ddd (8.711 ± 0.068 mm, $n = 10$; fig. 3g).

El crecimiento de las larvas de *L. guttatus* se realizó en dos grupos (hembras 8 y 9), y se muestra durante los primeros 26 ddd en la figura 4. La tasa de crecimiento fue 0.243 mm día⁻¹, con larvas de 10.23 mm de longitud 25 ddd. A partir de 26 ddd el crecimiento se determinó pesando los peces individualmente ($n = 30$). Estos juveniles se mantuvieron en los mismos tanques hasta 67 ddd, siendo su promedio de peso 2.42 ± 0.84 g ($n = 138$) y su tasa de supervivencia, hasta ese momento, de 1.5%.

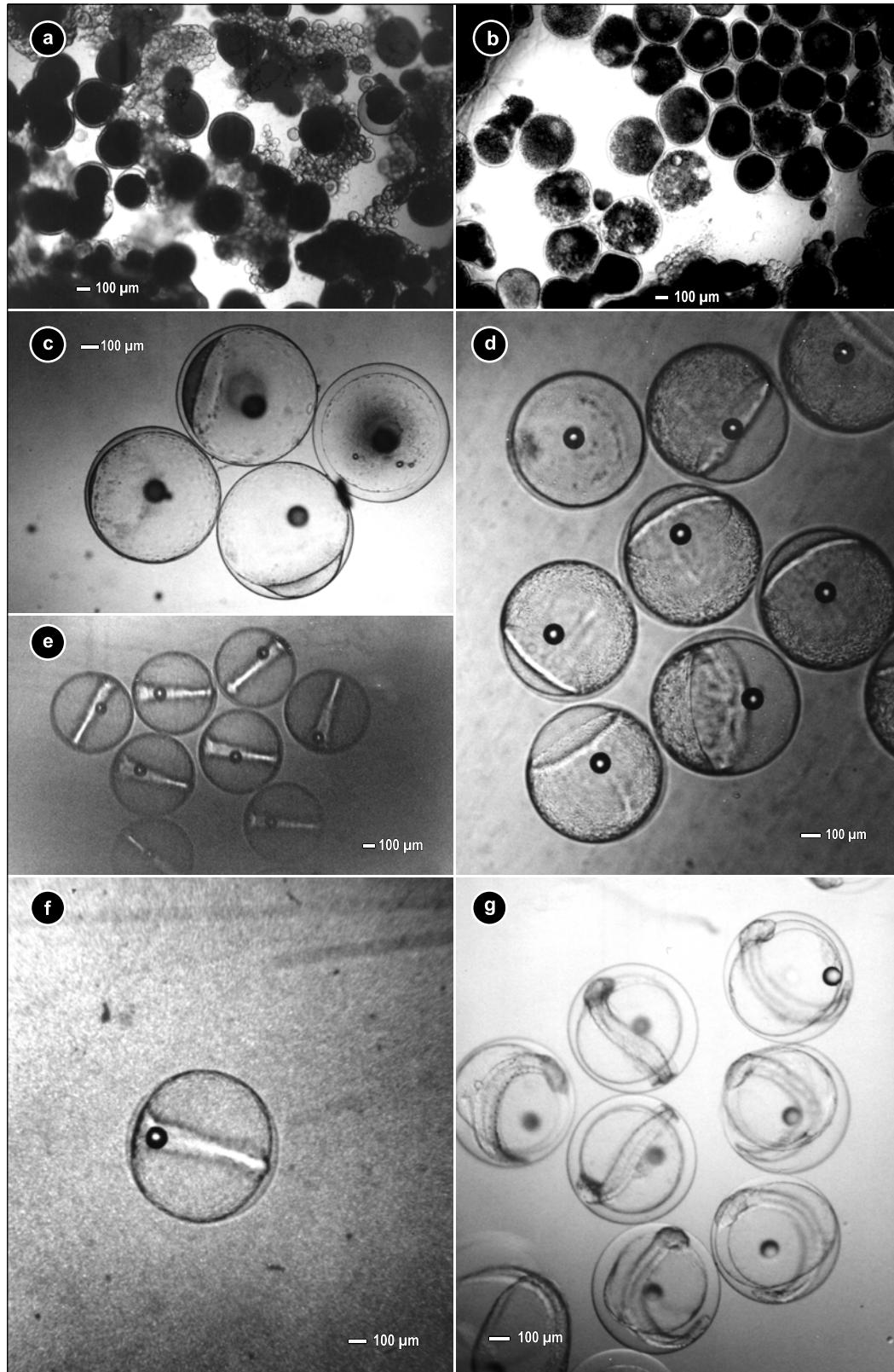


Figure 2. Embryonic development of fertilized eggs of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. (a) Oocytes from the cannula sample taken before the first injection. (b) Oocytes from the cannula sample taken before the second injection (24 h). (c) Fertilized egg with early development (blastule). (d) Fertilized egg with late development (gastrule). (e) C-shaped embryo. Early embryonic body formation. (f) Oil globule detail. (g) S-shaped embryo. Late embryonic body formation.

Figura 2. Desarrollo embrionario de los huevos fertilizados del pargo manchado *Lutjanus guttatus*. (a) Ovocitos de muestra de cánula tomados antes de la primera inyección. (b) Ovocitos de muestra de cánula tomados antes de la segunda inyección (24 h). (c) Huevos fertilizados con desarrollo temprano (blástula). (d) Huevos fertilizados con desarrollo tardío (gastrula). (e) Embrión en forma de C. Formación del cuerpo embrionario temprano. (f) Detalle de la gota de lípidos. (g) Embrión en forma de S. Forma corporal embrionaria tardía.

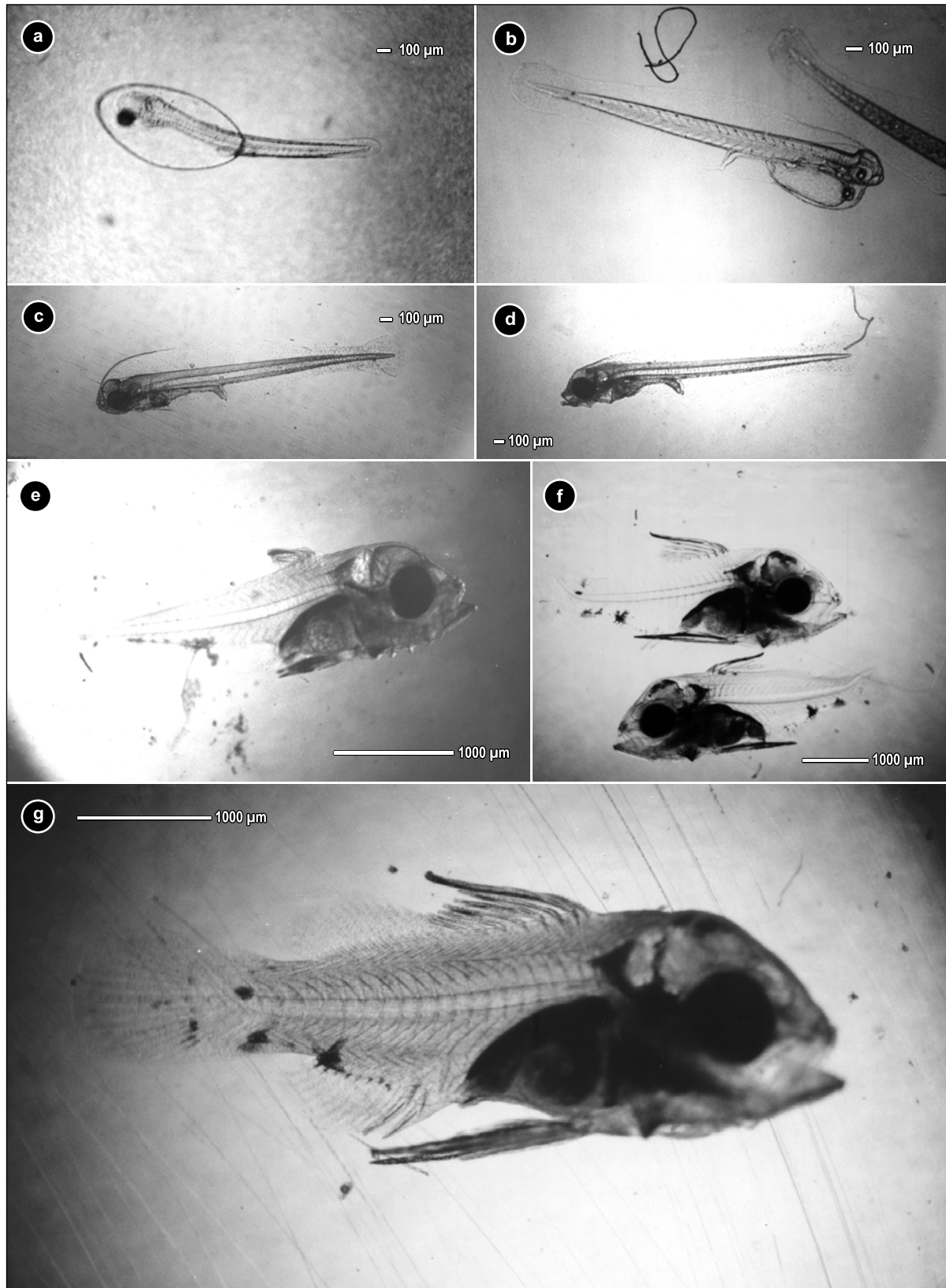


Figure 3. Larval development of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. **(a)** Hatched larva. **(b)** Hatched larva, 24 h. **(c)** Hatched larva, 48 h. **(d)** Pigmented-eye larva. **(e)** Preflexion larva, 15 days after spawning. **(f)** Flexion larva, 20 days after spawning. **(g)** Postflexion larva, 22 days after spawning.
Figura 3. Desarrollo larvario del pargo manchado *Lutjanus guttatus*. **(a)** Larva eclosionada. **(b)** Larva eclosionada, 24 horas. **(c)** Larva eclosionada, 48 horas. **(d)** Larva con el ojo pigmentado. **(e)** Larva en pre-flexión, quince días después de la eclosión. **(f)** Larva en flexión, veinte días después de la eclosión. **(g)** Larva en posflexión, veintidos días después de la eclosión.

The growth of *L. guttatus* larvae was followed in two trials (females 8 and 9). The growth curve obtained for the first 26 d.a.s. (rearing period) is shown in figure 4. Larval growth rate was 0.243 mm d^{-1} , with large larvae of 10.23 mm at 25 d.a.s. After this period, the growth was followed by individual body weight ($n = 30$). These juveniles were maintained in the same rearing tanks until 67 d.a.s.; the mean body weight was $2.42 \pm 0.84 \text{ g}$ ($n = 138$) and the survival rate was 1.5% at this time.

In the first days of October 2002 (67 d.a.s.) the fish were distributed in two 4-t cylindrical tanks with aeration and similar temperature and salinity conditions ($26.3\text{--}28.2^\circ\text{C}$ and $30\text{--}32\text{‰}$, respectively). Until 171 d.a.s., the mean body weight was $33.36 \pm 9.13 \text{ g}$ ($n = 30$), with a growth rate of 0.20 g d^{-1} . Growth during this period is shown in figure 5. Maximum body weight was 60.4 g and juvenile mortality at this time was 5%.

Natural spawning

Broodstock (females 8 and 9, plus their males, $n = 6$) were placed in an 18-t cylindrical tank (constant aeration) and were fed fresh sardine and squid to satiation every two days. After four months (November 2002), the fish started natural spawning. Spawning days coincided with tidal fluctuation and moon phase changes. During the new moon phase and when tidal fluctuation was not strong (fig. 6), the spawning behaviour was more prolonged, with females spawning eggs during more days. Mating behaviour was observed in the broodstock tanks. Males and females stayed near the surface during sunset, and at midnight the males followed the females with their heads near the female anal fin. When the females released the eggs, the males increased their speed and fertilized them.

From 10,000 to 35,000 eggs were released and the fertilization rate (buoyant eggs) was higher than 90% (fig. 6). Larval survival obtained by natural spawning was 30 d.a.s., when massive mortality occurred. These larvae were very sensitive to manipulation.

Discussion

Spotted rose snapper, *L. guttatus*, reaches first maturity during the first year of captivity, when wild juveniles of 60–100 g body weight have been captured. Under our conditions (cage-grown wild snapper, low density, *ad libitum* feeding), after the first induction the specimens were exposed to outside weather and moon phase changes, and they reached mature stages without any induction, releasing eggs naturally. Costa Rica is a tropical country, with slight changes in temperature throughout the year. Most of the behaviour is influenced by rainfall, salinity, moon phases and tides. *Lutjanus analis* attained first maturity in the third year of captivity (Watanabe *et al.* 1998), and in vermilion snapper, *Rhomboplites aurorubens*, gonadal maturation and spawning were associated with increased daylength and water temperatures in late spring

A los 67 ddd (inicios de octubre de 2002), los juveniles fueron divididos en dos tanques cilíndricos de 4 t, con aireación y condiciones de temperatura y salinidad similares ($26.3\text{--}28.2^\circ\text{C}$ y $30\text{--}32\text{‰}$, respectivamente). Hasta 171 ddd, el peso medio fue $33.36 \pm 9.13 \text{ g}$ ($n = 30$), con una tasa de crecimiento de 0.20 g día^{-1} . El crecimiento durante este periodo se muestra en la figura 5. El peso máximo fue de 60.4 g, y la mortalidad hasta entonces fue de 5%.

Desove natural

Los reproductores (hembras 8 y 9, y sus respectivos machos, $n = 6$) fueron mantenidos en un tanque cilíndrico de 18 t de capacidad, con aireación constante y alimentados cada dos días hasta la saciedad con sardina y calamar. Después de cuatro meses (noviembre de 2002) empezaron a desovar naturalmente. Con la luna nueva y su consecuente débil fluctuación de marea (fig. 6), el comportamiento reproductivo fue más prolongado: las hembras desovaron durante más días. El comportamiento reproductivo fue observado en los tanques. Machos y hembras permanecen cerca de la superficie al atardecer, mientras que en la noche los machos siguen a las hembras con su cabeza cerca de la aleta anal de la hembra. Cuando la hembra libera los huevos, el macho incrementa su velocidad y fertiliza los huevos desovados.

La cantidad de huevos desovados fue entre 10,000 y 35,000, y la fertilización siempre fue mayor al 90% de los huevos flotantes (fig. 6). Las larvas obtenidas de estos desoves naturales no sobrevivieron 30 ddd ya que fueron muy sensibles a la manipulación.

Discusión

El pargo manchado, *L. guttatus*, alcanza su primera madurez durante el primer año de cautiverio, cuando se han capturado juveniles entre los 60 y 100 g de peso corporal. Bajo nuestras condiciones (pargos silvestres en jaulas, baja densidad, alimentación *ad libitum*), y después de la inducción, los peces estuvieron expuestos a cambios de clima y fases lunares, alcanzando la madurez sin ninguna inducción y liberando huevos naturalmente. Costa Rica es un país tropical, con pequeños cambios en la temperatura a lo largo del año, en donde mucho del comportamiento de las especies es influenciado por las precipitaciones pluviales, cambios en salinidad, fases lunares y mareas. *Lutjanus analis* alcanzó su primera madurez al tercer año de cautiverio (Watanabe *et al.* 1998), y en el pargo bermellón, *Rhomboplites aurorubens*, la maduración gonadal y el desove estuvieron asociados con un incremento en la duración del día y la temperatura del agua, a finales de primavera e inicios del verano (Grimes y Huntsman 1980). Las diferencias en la calidad de los desoves en *L. guttatus*, realizados casi uno por mes (tabla 2), probablemente sugieren cambios temporales en la respuesta al protocolo de inducción al desove. Algunas hembras de *L. guttatus* (8 y 9) inducidas en agosto de 2002 presentaron buena calidad de huevos, lo cual se refleja en la calidad

and early summer (Grimes and Huntsman 1980). Our differences in spawning quality in *L. guttatus*, with almost one spawning per month (table 2), probably suggest seasonal changes in response to the hormonal induction protocol. Females 8 and 9 induced in August 2002 had a good egg quality, and likewise a good larval quality. Rojas (1997a, b) recorded the reproductive activity of *L. guttatus* all year round, and observed two peaks of activity in April and October. This reproductive behaviour is coincident with the start of the rainy season and with the month of heaviest rainfall (October). Laboratory-induced females, however, produced few eggs and low fertilization rates (February–May 2002) (table 2). Between June and August 2002 there was an increase in fertilization rate and in the survival rate of larvae.

The amount of eggs spawned by *L. guttatus* females as a result of hormonal induction (47,000 eggs, August 2002, females 8 and 9) is low when compared with other species. For *L. argentimaculatus*, by hormonal induction Tucker (1998) obtained 1.3×10^6 – 10×10^6 eggs d^{-1} and Singhagraiwan and Doi (1993), 3.5×10^5 – 3.2×10^6 eggs d^{-1} , while by natural spawning Emata (2003) obtained 500,000–6,350,000 eggs and Leu *et al.* (2003), 1,057–186,571 eggs d^{-1} . Other amounts obtained by hormonal induction are: 190,000–210,000 eggs for *L. griseus* (Cabrera *et al.* 1998); 534,781 eggs for *L. analis* (Watanabe *et al.* 1998), and 5,000–35,000 eggs for *L. peru* (Dumas *et al.* 2004). Cano (2003) hormonally induced spawning of *L. guttatus* and reported 10^7 eggs produced by broodstock ($n = 60$), while Ibarra *et al.* (2004) used LHRHa but did not report the amount of eggs spawned.

The eggs of *L. guttatus* were characterized by having one oil globule; eggs with several oil globules were scarce. The size of the oil globule (0.115 ± 0.013 mm, $n = 100$) was similar to that reported for other species: for *L. argentimaculatus*, 0.140 ± 0.005 mm (Emata *et al.* 1994) and 0.14 ± 0.16 mm (Leu *et al.* 2003); for *L. griseus*, 0.139 mm (Cabrera *et al.* 1998); and for *L. campechanus*, 0.117 ± 0.015 mm (Bourque and Phelps 2007).

In the wild, *L. guttatus* has been characterized as a batch spawner (Ibarra *et al.* 2004), releasing eggs for several days, then stopping for a few days and starting again (fig. 6). The red snapper, *L. campechanus*, under artificial conditions in the Gulf of Mexico, spawned on multiple occasions between May and June, after constant photoperiod (Arnold *et al.* 1978). Natural spawnings of *L. guttatus* occurred in the laboratory, after hormonal induction, and fertilization was always higher than 90% of buoyant eggs, without any photoperiod or temperature manipulation.

Recently, Cano (2003) reported natural spawnings of *L. guttatus* throughout the year, with a maximum of eggs spawned between August and September. In our case, natural spawning of *L. guttatus* was related to tidal fluctuation and moon phases (fig. 6). This behaviour does not concur with that reported by Jackson *et al.* (2006), who studied the relationship between the spawning period of *L. campechanus* and the lunar cycle, and did not find any evident association. On the other

de las larvas. Rojas (1997a, b) observó actividad reproductiva de *L. guttatus* todo el año, pero entre abril y octubre ocurrieron dos picos de desove. Este comportamiento en la reproducción coincide con el inicio de la época lluviosa y con el mes con mayores lluvias (octubre), respectivamente. Sin embargo, las hembras inducidas al desove en el laboratorio produjeron pocos huevos y bajas fertilizaciones (febrero de 2002 a mayo de 2002) (tabla 2). En junio de 2002 aumentó la tasa de fertilización hasta agosto de 2002, mejorando la supervivencia de las larvas.

La cantidad de huevos desovados por las hembras de *L. guttatus* por inducción hormonal (47,000 huevos en agosto de 2002, hembras 8 y 9) fueron bajas si se comparan con los producidos por otras especies. De hembras de *L. argentimaculatus*, por inducción hormonal Tucker (1998) obtuvo 1.3×10^6 – 10×10^6 huevos d^{-1} , y Singhagraiwan y Doi (1993) obtuvieron 3.5×10^5 – 3.2×10^6 huevos d^{-1} , mientras que por desove natural Emata (2003) obtuvo de 500,000–6,350,000 por desove y Leu *et al.* (2003) obtuvieron de 1,057–186,571 huevos d^{-1} . En otros ensayos por inducción hormonal, para *L. griseus* Cabrera *et al.* (1998) obtuvieron de 190,000–210,000 huevos; para *L. analis* Watanabe *et al.* (1998) obtuvieron 534,781 huevos; y Dumas *et al.* (2004), para *L. peru*, obtuvieron entre 5,000 y 35,000 huevos. Cano (2003) obtuvo desoves mediante inducción hormonal en *L. guttatus* en los que se produjeron 10^7 huevos por un grupo de 60 reproductores, mientras que Ibarra *et al.* (2004) no reportaron la cantidad de huevos obtenidos.

Los huevos desovados por *L. guttatus* se caracterizaron por tener una gota de lípidos, pero se observaron muy pocos huevos con varias gotas. La gota de lípidos de *L. guttatus* tuvo un tamaño similar (0.115 ± 0.013 mm, $n = 100$) al reportado en otras especies: 0.140 ± 0.005 mm y 0.14 ± 0.16 mm para *L. argentimaculatus* (Emata *et al.* 1994 y Leu *et al.* 2003, respectivamente); 0.139 mm para *L. griseus* (Cabrera *et al.* 1998); y 0.117 ± 0.015 mm para *L. campechanus* (Bourque y Phelps 2007).

En el medio natural *L. guttatus* se ha caracterizado como un desovador por grupos (Ibarra *et al.* 2004), liberando huevos varios días, parando varios días y empezando otra vez (fig. 6). El pargo rojo, *L. campechanus*, en condiciones artificiales en el Golfo de México, desovó en múltiples ocasiones entre mayo y junio, después de ser sometido a un fotoperíodo constante (Arnold *et al.* 1978). En *L. guttatus* los desoves naturales ocurren en el laboratorio después de una inducción hormonal, con un porcentaje de fertilización mayor a 90% de los huevos flotantes, sin necesidad de manipular el fotoperíodo o la temperatura.

Recientemente Cano (2003) reportó desoves naturales para *L. guttatus* durante todo el año, con un pico máximo entre agosto y septiembre. En nuestro caso, los días de desove natural en *L. guttatus* coinciden con la fluctuación de las mareas y los cambios en las fases lunares (fig. 6), pero no todos los lutjánidos presentan el mismo comportamiento. Este comportamiento es contrario al reportado por Jackson *et al.* (2006),

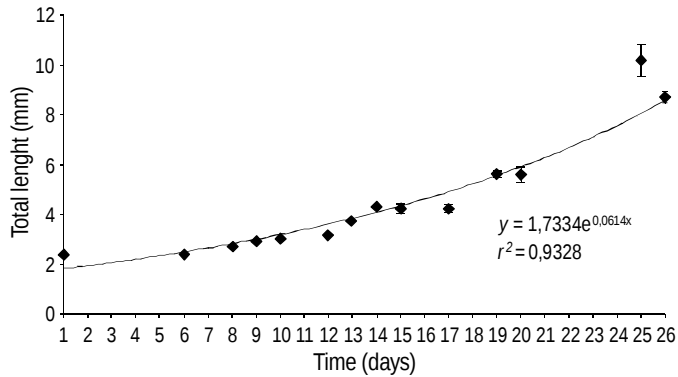


Figure 4. Mean total length (mm $\pm$ standard error) of *Lutjanus guttatus* during the laboratory rearing period (August 2002).

Figura 4. Longitud total media (mm $\pm$ error estándar) de *Lutjanus guttatus* durante el periodo de cultivo larval en laboratorio (agosto de 2002).

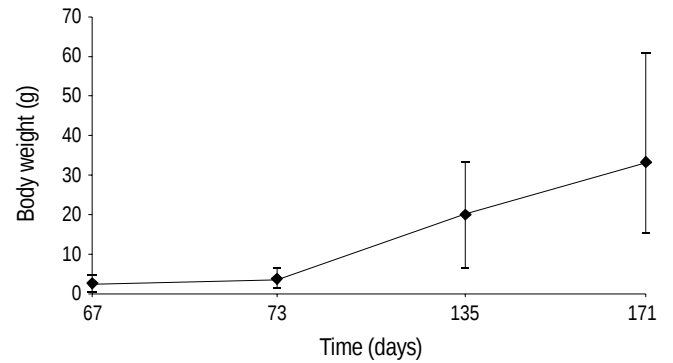


Figure 5. Mean body weight (g), maximum body weight (top bar) and minimum body weight (low bar) of *Lutjanus guttatus* juveniles after 171 days under laboratory conditions (October 2002 to January 2003).

Figura 5. Peso medio (g), peso máximo (barra superior) y peso mínimo (barra inferior) de juveniles de *Lutjanus guttatus* durante un período de 171 días en condiciones de laboratorio (octubre de 2002 a enero de 2003).

hand, Davis and West (1993) reported a tide-related increase in spawning activity around the new and full moon phases for *L. vittus*.

Lutjanus argentimaculatus spawned naturally during the season of full gonadal maturity (July–September), in a 500-m³ tank without hormonal injection, and the number of eggs spawned per day ranged from $<10^5$ to 10^6 , with an average hatching rate of 73% (Singhagraiwan and Doi 1993). *Lutjanus argentiventris* naturally produced 1,000–15,000 eggs per female, with 89% of viable larvae (Avilés-Quevedo *et al.* 1996). The amount of eggs produced naturally by *L. guttatus* in this study (0.4–0.8 kg body weight) was less than that of *L. argentimaculatus* (4–7 kg body weight), probably because of the big difference in body weight, but comparable to that produced by *L. argentiventris* (female body weight of 0.5–0.6 kg). Cano (2003) reported 10^7 eggs spawned by *L. guttatus* brood-stock ($n = 60$); however, no relationship can be established with the data to calculate the number of eggs per female or to determine whether spawning occurred in one or several days. Conversely, when the number of eggs per gram of body weight is considered, the *L. argentimaculatus* data (25–143 eggs g⁻¹) are comparable with those of *L. guttatus* (60.7–104.4 eggs g⁻¹), but different from those of *L. argentiventris* (1.85–24.59 eggs g⁻¹).

The mortality rate of the *L. guttatus* larvae obtained by hormonal induction was around 80% at 3 d.a.s., and reached almost 98% 45 d.a.s. Few individuals died afterwards and final overall survival was 1.5% (171 days). Singhagraiwan and Doi (1993) reported different survival rates for *L. argentimaculatus* larvae fed copepod nauplii (*Acartia* and *Oithona*): 3.4% at 8 d.a.h. and 1.6% at 12 d.a.h. For *L. argentimaculatus* larvae fed rotifers (*Brachionus*), Emata *et al.* (1994, 1999) found that survival was zero (mass mortality) at 28 d.a.h., without reaching metamorphosis. Cabrera *et al.* (1998) reported a survival rate of 79% at 24 h.a.h. for *L. griseus*, and a survival rate of 2.5% can be calculated at 135 h.a.h. from their data; *L. griseus* larvae were fed rotifers, trocophora oyster and *Tetraselmis*

quienes intentaron relacionar los ciclos de desove de *L. campechanus* con los ciclos lunares, y no encontraron ninguna relación evidente. Sin embargo, Davis y West (1993) reportaron una mayor actividad de desove de *L. vittus* cercana a las fases de luna nueva y luna llena, y relacionada con las mareas.

Lutjanus argentimaculatus desovó naturalmente durante la temporada de completa maduración gonadal (julio a septiembre), en un tanque de 500 m³ sin inyecciones hormonales, y el número de huevos desovados por día varió de $<10^5$ a 10^6 huevos, con una tasa de eclosión media de 73% (Singhagraiwan y Doi 1993). *Lutjanus argentiventris* produce espontáneamente de 1,000–15,000 huevos por hembra con un porcentaje de larvas viables de 89% (Avilés-Quevedo *et al.* 1996). La cantidad de huevos producidos naturalmente por *L. guttatus* en este trabajo (0.4–0.8 kg de su peso corporal), fue menor que la de *L. argentimaculatus* (4–7 kg de su peso corporal), probablemente debido a la gran diferencia en el peso corporal, y fue comparable con la de *L. argentiventris* (el peso corporal de las hembras fue de 0.5–0.6 kg). Cano (2003) reportó 10^7 huevos producidos espontáneamente por un lote de 60 reproductores de *L. guttatus*. Sin embargo, los datos no permiten establecer la relación de huevos producidos por hembra, ni si el desove fue en un solo día o en varios. Sin embargo, con respecto al número de huevos producidos por gramo de peso corporal, *L. argentimaculatus* (25–143 huevos g⁻¹) es comparable con *L. guttatus* (60.70–104.44 huevos g⁻¹), mientras que *L. argentiventris* presenta valores menores (1.85–24.59 huevos g⁻¹).

La tasa de mortalidad en las larvas de *L. guttatus* obtenidas mediante inducción hormonal fue de 80% a los 3 ddd. A los 45 ddd, la mortalidad alcanzó casi el 98%. A partir de 45 ddd mueren muy pocos peces, con una supervivencia final de 1.5% (171 días). Singhagraiwan y Doi (1993) reportaron diferentes tasas de supervivencia para larvas obtenidas de *L. argentimaculatus*, alimentadas con nauplios de copépodo (*Acartia* y *Oithona*): 3.4% a los 8 dde y 1.6% a los 12 dde, en diferentes ensayos. Emata *et al.* (1994, 1999) alimentaron a

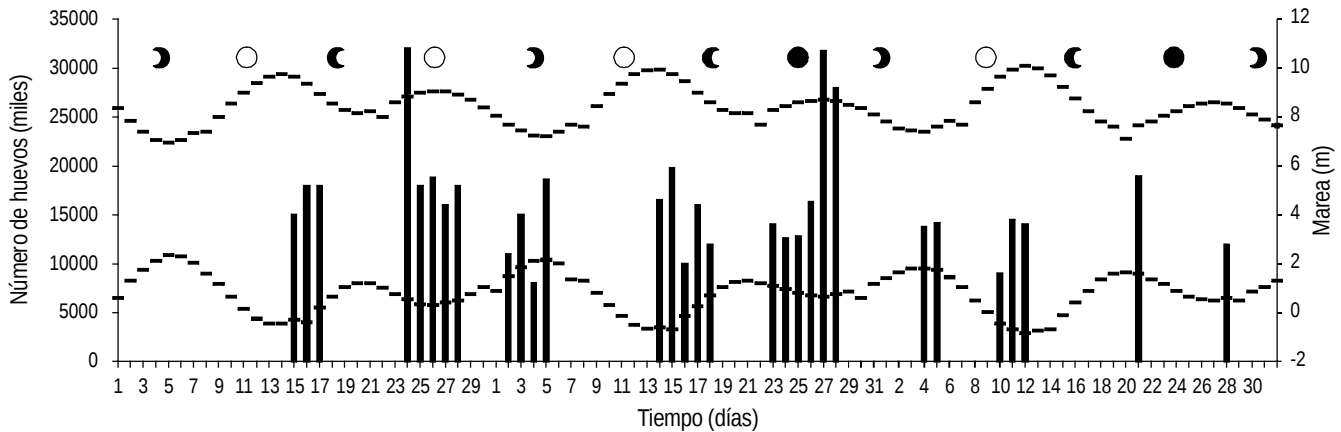


Figure 6. Amount of naturally spawned eggs (vertical bars) produced by *Lutjanus guttatus* during three months (November 2002, December 2002, and January 2003). Moon phases, high tide (superior dashed bar), and low tide (inferior dashed bar) are shown.

Figura 6. Cantidad de huevos de un desove natural (barras verticales) de *L. guttatus* durante tres meses (noviembre de 2002, diciembre de 2002 y enero de 2003). Fases lunares, marea alta (barras horizontales superiores) y marea baja (barras horizontales inferiores).

chui. Watanabe *et al.* (1998) reported a survival rate of 14.3% at 38 d.a.h. for *L. analis* fed ss-type rotifers, while Ogle and Lotz (2006) found a survival rate of 16.5% (1–31%) at 24 d.a.h. for *L. campechanus*. From these data it can be concluded that the survival rates vary among snapper species and this can be attributed to two factors: broodstock conditions and feed quality for larval rearing.

The naturally spawned *L. guttatus* larvae (fertilization rate of 90% of buoyant eggs) were very susceptible to the handling and tank conditions, mainly temperature fluctuation. In most cases, larvae survived around 30 d.a.s. and then mass mortality occurred. By natural spawning, Turano *et al.* (2000) obtained a survival rate of 28% from egg to juvenile (45 d.a.s.) with yellowtail *Ocyurus chrysurus*, while for *L. argentimaculatus* Leu *et al.* (2003) obtained a survival rate of 10.8–32.3% at 50 d.a.s. Cano (2003) reported a survival rate of 9–30% for *L. guttatus* larvae after 30 days. Papanikos *et al.* (2003) found that the eggs and larvae from natural spawns of *L. campechanus* were more viable in terms of fertilization, hatching and survival rates, and according to Leu *et al.* (2003), natural spawning is an alternative to induced spawning. In our case, the naturally-spawned larvae were not viable; however, the viability can be optimized by changing the spawning conditions (bigger tanks, better food quality, and manipulation of ambient variables).

Since the mouth of *L. guttatus* larvae is very small (around 100 μ m), young rotifers are of too big a size (100–200 μ m) to start exogenous feeding. Trocophora oyster and *Isochrysis* microalga are considered to be a suitable food item for *L. guttatus* larvae, though it was always necessary to have rotifers and zooplankton (<200 μ m) in the rearing tanks because some larvae grow faster than others. Cano (2003) fed *L. guttatus* larvae different-sized rotifers, *Artemia*, fish larvae, and artificial feed, confirming our feeding regime. Water stability was assured by the presence of microalgae in the system (green water), as suggested by Tucker (1998) and Turano *et al.* (2000) for lutjanid rearing tanks. There was no evidence of

esta misma especie con rotíferos (*Brachionus*), encontrando una supervivencia de cero (mortalidad en masa) a los 28 dde, sin alcanzar la metamorfosis. Cabrera *et al.* (1998) obtuvieron una supervivencia de 79% a las 24 hde para *L. griseus*, y a partir de sus datos 135 hde se puede calcular una supervivencia de 2.5%; esas larvas de *L. griseus* fueron alimentadas con rotíferos, trocóforas de ostra y *Tetraselmis chui*. Watanabe *et al.* (1998), trabajando con larvas de *L. analis*, lograron una supervivencia de 14.3% a los 38 dde alimentándolas con rotíferos tipo ss., mientras que Ogle y Lotz (2006) encontraron una supervivencia en *L. campechanus* 24 dde de 16.5% (1–31%). Como se puede observar las supervivencias son muy variables entre las diferentes especies, lo cual depende de la condición de los reproductores y de la calidad de la alimentación que se brinde a las larvas.

Las larvas obtenidas del desove natural de *L. guttatus* (fertilización de 90% de los huevos flotantes) fueron muy sensibles al manejo y a las condiciones del tanque, principalmente a la fluctuación de temperatura. En muchos casos, la larva sobrevivió alrededor de 30 ddd y luego ocurrió una mortalidad masiva. Mediante desoves naturales, Turano *et al.* (2000) obtuvieron 2.8% de supervivencia de las larvas desde huevos hasta juveniles (45 ddd) de pargo cola amarilla *Ocyurus chrysurus*, mientras que Leu *et al.* (2003) con *L. argentimaculatus* obtuvieron supervivencias entre 10.8–32.3% 50 ddd. En *L. guttatus* la supervivencia varió de 9% a 30% durante los primeros 30 días de cultivo (Cano 2003). Papanikos *et al.* (2003) reportaron que los huevos y larvas obtenidos en desoves naturales de *L. campechanus* fueron más viables en términos de fertilización, eclosión y supervivencia, y Leu *et al.* (2003) explican que los desoves naturales son una alternativa a los desoves inducidos. En nuestro caso, las larvas obtenidas por desove natural no fueron viables, pero la viabilidad se puede optimizar haciendo cambios en las condiciones de desove (tanques más grandes, mejor calidad de alimentación, manipulación de variables ambientales).

cannibalism and deformation during the rearing of *L. guttatus* larvae, as has been reported by Watanabe *et al.* (1998) and Leu *et al.* (2003).

The growth rate obtained for *L. guttatus* (0.24 mm d^{-1}) at 26 d.a.s. is lower than the values of 0.47 mm d^{-1} (23 d.a.h.) and 0.37 mm d^{-1} (28 d.a.h.) reported for *L. argentimaculatus* by Singhagraiwan and Doi (1993) and Emata *et al.* (1994), respectively. It is also lower than the value of 0.44 mm d^{-1} (24 d.a.h.) obtained by Ogle and Lotz (2006) for *L. campechanus*, but it is similar to the growth rate of 0.23 mm d^{-1} (21 d.a.h.) obtained by Watanabe *et al.* (1998) for *L. analis*.

Juvenile growth has been reported for yellowtail snapper, *Ocyurus chrysurus*, which grew 0.66 g d^{-1} in a 900-day trial (Turano *et al.* 2000), and for *L. analis*, which grew 0.78 g d^{-1} in a 168-day trial (Watanabe *et al.* 1998). Juveniles of *L. guttatus* grew 0.2 g d^{-1} (171 days). In general, growth data for snapper species indicate that juvenile snapper are relatively slow-growing fish. Yellowtail snapper, however, grew slowly until day 500, when some animals were moved to maturation tanks for spawning, and then growth increased drastically (Turano *et al.* 2000). We have observed that when the density in the cages decreases, a growth response is obtained.

Differences were found between the naturally obtained and artificially induced spawns in our laboratory. Further studies are still necessary to optimize broodstock maintenance in order to obtain better quality eggs and larvae. The first few days of larval feeding also require more attention to obtain better survival rates.

Acknowledgements

This work was supported by the UNA-LUW project and by Ley del Atún No. 6267. The authors are grateful to Captain O Torres for collecting and transporting the cage-grown animals. Special thanks to M Verdegem (Department of Animal Sciences, Wageningen Agricultural University, Netherlands) for financial support. We would like to thank the anonymous reviewers for their detailed revision of the manuscript.

References

- 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.

Para la larva de *L. guttatus* los rotíferos recién eclosionados (tamaño 100–200 μm) siguen siendo grandes como para iniciar la alimentación exógena, debido a que la boca de la larva tiene un tamaño reducido. Las larvas trocóforas de ostra y las células de la microalga *Isochrysis* han mostrado un tamaño adecuado para alimentar las larvas de *L. guttatus*; sin embargo, en los tanques siempre fue necesaria la presencia de rotíferos y zooplancton ($<200 \mu\text{m}$) debido a que algunas larvas crecen más rápido que otras. Cano (2003) alimentó las larvas de *L. guttatus* con rotíferos de diferentes tamaños, con artemia, larvas de peces y alimento artificial, lo cual confirma el protocolo utilizado. La estabilidad del agua fue asegurada por la presencia de microalgas en el sistema (agua verde), lo cual fue sugerido por Tucker (1998) y Turano *et al.* (2000) en condiciones de cultivo larval para las especies de lutjánidos. Durante este periodo no fue evidente el canibalismo ni las deformaciones observadas en las larvas de *L. guttatus* por otros autores en otras especies (Watanabe *et al.* 1998, Leu *et al.* 2003).

La tasa de crecimiento de *L. guttatus* (0.24 mm d^{-1}) a los 26 ddd fue menor que los valores de 0.47 mm día^{-1} (23 ddd) y 0.37 mm día^{-1} (a los 28 ddd) reportados para *L. argentimaculatus* por Singhagraiwan y Doi (1993) y Emata *et al.* (1994), respectivamente; también fue menor que la tasa de 0.44 mm día^{-1} (24 ddd) obtenida por Ogle y Lotz (2006) para *L. campechanus*, pero fue similar a la obtenida de 0.23 mm día^{-1} a los 21 ddd por Watanabe *et al.* (1998) con larvas de *L. analis*.

Se han reportado tasas de crecimiento para juveniles de pargo cola amarilla, *Ocyurus chrysurus*, de 0.66 g día^{-1} en un ensayo de 900 días (Turano *et al.* 2000), de *L. analis* que crecieron 0.78 g día^{-1} en un ensayo de 168 días (Watanabe *et al.* 1998). Los juveniles de *L. guttatus* crecieron 0.2 g día^{-1} después de 171 días de ensayo. En general, los datos de crecimiento para las especies de pargos indican que son relativamente lentos en crecer. Sin embargo, el cola amarilla creció lento hasta el día 500, cuando un grupo de peces fue trasladado a un tanque de maduración para desovarlos; después de esto el crecimiento aumento drásticamente (Turano *et al.* 2000). Se ha observado que cuando se disminuye la densidad en las jaulas, siempre se ha obtenido una respuesta en el crecimiento.

Aunque existen diferencias entre los desoves obtenidos naturalmente o inducidos artificialmente, es necesario optimizar el protocolo de mantenimiento de los reproductores con el fin de obtener huevos y larvas de mejor calidad. También se debe investigar sobre los primeros días de alimentación de las larvas para poder obtener mejores porcentajes de supervivencia.

Agradecimientos

Este estudio formó parte del proyecto UNA-LUW, el cual financió la infraestructura en la Estación de Biología Marina de Puntarenas, Costa Rica, así como fue financiado por la Ley del Atún, No. 6267. Los autores agradecen al Capitán O Torres por recolectar y transportar los animales de las jaulas a la estación.

- Bourque BD, Phelps RP. 2007. Induced spawning and egg quality evaluation of red snapper, *Lutjanus campechanus*. J. World Aquacult. Soc. 38: 208–217.
- 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, 153 pp.
- 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 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. Israeli J Aquacult./Bamidgheh 51: 58–64.
- 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. Pt. 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 Biology and Fisheries Management. Westview press, pp. 239–294.
- Grimes C, Huntsman GR. 1980. Reproductive biology of the vermilion snapper, *Rhomboplites aurorubens*, from North Carolina and South Carolina. Fish. Bull. 78: 137–146.
- Ibarra L, Dumas S, Duncan N. 2004. Gonad development and LHRHa induced spawning in female spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology. 5–9 September. Castellón, Spain.
- 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. Israeli J. Aquacult./Bamidgheh 55: 22–30.
- Se agradece en especial a M Verdegem del grupo de cultivo de peces y pesquerías, del Departamento de Ciencias Animales, de la Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda, por financiar la investigación. Deseamos agradecer la detallada revisión realizada por los revisores anónimos al manuscrito.
- Lim LC, Cheong L, Lee HB, Heng HH. 1985. Induced breeding studies of the John's snapper *Lutjanus johni* (Bloch), in Singapore. Singapore J. Pri. Ind. 13: 70–83.
- Ogle JT, Lotz JM. 2006. Characterization of an experimental indoor larval production system for red snapper. N. Am. J. Aquacult. 68: 86–91.
- Olivares OP, Boza JB. 1999. Crecimiento de juveniles de pargo mancha (*Lutjanus guttatus*) utilizando alimento granulado en condiciones de laboratorio. UNICIENCIA 16: 45–48.
- 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 épocas de reproducción del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya. 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.
- Siefke K. 1995. Zur Fischerei und Populations dynamik des “pargo de la mancha” (*Lutjanus guttatus*) im Golf von Nicoya, Costa Rica. MSc thesis, University of Bremen, Germany, 72 pp.
- Singhagraiwan 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.
- Tucker JW Jr. 1998. Marine Fish Culture. 1st ed. Kluwer Academic, Netherlands, 750 pp.
- Tucker J, Jory D. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. World Aquacult. 22: 10–25.
- Turano M, Davis DA, Arnold CR. 2000. Observations and techniques for maturation, spawning, and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. J. World Aquacult. Soc. 31: 59–68.
- Valverde S, Boza JA. 1999. Inducción al desove en hembras del pargo mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). UNICIENCIA 15–16: 65–69.
- Vargas MB. 1999. Estimación de parámetros biológico-pesqueros para el pargo mancha *Lutjanus guttatus* en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. UNICIENCIA 15–16: 79–84.
- 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.

Recibido en abril de 2007;
aceptado en mayo de 2008.