

Online ISSN: 2395-9053  
**Natural spawning of the leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*)  
in captivity in La Paz, Mexico**

**Puestas naturales de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*)  
en cautiverio en La Paz, México**

[Vicente Gracia-López\\*](#), [Minerva Concepción Maldonado-García](#), [Marcos Fabián Quiñones-Arreola](#),  
[Jorge León Sandoval-Soto](#), [Francisco Javier Encarnación-Ramírez](#), [Ana Gabriela Trasviña-Moreno](#),  
[Gerardo Arturo García-González](#)

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 23090 La Paz, Baja California Sur, Mexico.

\* Corresponding author. E-mail: [vinny@cibnor.mx](mailto:vinny@cibnor.mx)

**ABSTRACT.** Natural spawning of the leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*) was studied in captivity from 2004 to 2008 under natural photoperiod conditions. Fish spawned naturally in 2006, but only 90,000 unfertilized eggs were collected. A total of 43 and 27 spawning days were observed in 2007 and 2008, respectively. Spawning season began in March and lasted until May–June and was related to an increase in water temperature from 21.1 to 23.8 °C. The mean (SE) number of eggs released each day was 101,705 (13,876) in 2007 and 40,510 (7,874) in 2008, and the total number of eggs collected in 2007 and 2008 was  $4.37 \times 10^6$  and  $1.07 \times 10^6$ , respectively. The number of eggs collected per month was not significantly different within each year ( $P > 0.05$ ), although a significant difference was observed between 2007 and 2008 ( $P < 0.05$ ). The annual relative number of eggs released was 288,750 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2007 and 72,919 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2008, and viable egg production was 184,800 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2007 and 25,375 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2008. The fertilization rate (%) of the eggs collected daily differed significantly throughout the spawning season of 2007 ( $P < 0.05$ ). The fertilization rate also differed ( $P < 0.05$ ) between 2007 (61.10%) and 2008 (32.30%). Statistical analysis of the 2 consecutive spawning seasons indicated no correlation between the fertilization rate and fecundity. The effect of the moon phase on spawning was also considered. The fish spawned at dusk before total darkness. Mean (SD) egg diameter was  $864.0 \pm 22.0$  µm.

**Key words:** *Mycteroperca rosacea*, natural spawning, grouper, production, photoperiod.

**RESUMEN.** Se estudió el desove natural de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, en cautiverio, de 2004 a 2008 en condiciones naturales de luz y temperatura. Los peces desovaron naturalmente en 2006, pero solo se recolectaron 90,000 huevos no fertilizados. Se observó un total de 43 días de desove en 2007 y 27 días en 2008. La temporada de desove comenzó en marzo y se prolongó hasta mayo-junio, lo cual se relacionó con un aumento en la temperatura del agua de 21.1 a 23.8 °C. La media (error estándar) del número de huevos liberados diariamente fue de 101,705 (13,876) en 2007 y 40,510 (7,874) en 2008, y el número total de huevos recolectados fue de  $4.37 \times 10^6$  y  $1.07 \times 10^6$ , respectivamente. El número de huevos recolectados por mes no fue significativamente diferente dentro de cada año ( $P > 0.05$ ), pero sí al comparar 2007 y 2008 ( $P < 0.05$ ). La puesta relativa anual fue de 288,750 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2007 y 72,919 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2008, y la producción de huevos viables fue de 184,800 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2007 y 25,375 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2008. La tasa de fertilización (%) de los huevos recolectados diariamente fue significativamente diferente a lo largo de la temporada de desove de 2007 ( $P < 0.05$ ). La tasa de fertilización también difirió significativamente ( $P < 0.05$ ) entre 2007 (61.10%) y 2008 (32.30%). El análisis estadístico indicó que no hubo correlación entre la tasa de fertilización y el número de huevos liberados en ambas temporadas de desove. El efecto de la luna sobre el desove también se analiza en el documento. Durante todo el estudio, los peces desovaron al anochecer antes de la oscuridad total. El diámetro medio ( $\pm$  desviación estándar) del huevo fue de  $864.0 \pm 22.0$  µm.

**Palabras clave:** *Mycteroperca rosacea*, puestas naturales, mero, producción, fotoperiodo.

Received 13 December 2021, accepted 18 June 2022, published 25 May 2023.

Screened via Similarity Check powered by iThenticate

Open Access



©Vicente Gracia-López, Minerva Concepción Maldonado-García, Marcos Fabián Quiñones-Arreola, Jorge León Sandoval-Soto, Francisco Javier Encarnación-Ramírez, Ana Gabriela Trasviña-Moreno, Gerardo Arturo García-González.

This is an Open Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](#), which allows you to share and adapt the work, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Figures, tables, and other elements in the article are included in the article's CC BY 4.0 license, unless otherwise indicated. You must seek permission from the copyright holder for use of material not covered by this license. The journal title is protected by copyrights owned by Universidad Autónoma de Baja California, and the journal title and logo are not subject to this license.

## INTRODUCTION

The leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877), is a member of the Epinephelidae family. The distribution of this species spans the Gulf of California to the western Pacific coast of Mexico. Adult leopard groupers form spawning aggregations from April to June in the Gulf of California (Erisman et al. 2007), which increases their vulnerability to fishing pressure (Sala et al. 2004). As of 2018, the leopard grouper has been listed as a species of “Least Concern” on the Red List of the International Union for Conservation of Nature (Erisman and Craig 2018). Due to the quality of its meat, the leopard grouper is a highly valued resource with a high market price, with reported landings of 200–400 t per year (González-Cuellar et al. 2019). Prior to 2000, information on this species was scarce and primarily related to biological aspects such as feeding habits (Peláez-Mendoza 1997). Since then, various studies of leopard grouper reproduction in the wild have been conducted.

In this study, we were able to verify the information that has been generated to date regarding leopard grouper reproduction. The leopard grouper does indeed form large aggregations and spawns for long periods; however, leopard groupers also aggregate outside of the spawning season, and the lunar cycle and spawning do not appear to be synchronized (Erisman et al. 2007). Leopard groupers are gonochoric (Erisman et al. 2008), and this species shows group-synchronous ovarian development (Estrada-Godínez et al. 2011). In the wild, leopard groupers have been observed to spawn from May to June (Estrada-Godínez et al. 2011), March to May (Sala et al. 2003) or April to June (Erisman et al. 2007). In addition, differences in bioindicators and biochemical variables have also been observed throughout the reproductive cycle of this species (Estrada-Godínez et al. 2014).

In recent years, the leopard grouper has been the subject of multiple studies conducted under captive conditions. For example, induced spawning of wild-caught fish was conducted by administering 2 injections of 1,000 and 500 IU·kg<sup>-1</sup> of human chorionic gonadotropin (hCG; Gracia-López et al. 2004a). In another induction study with hCG and luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa), better results were obtained with females that were induced with hCG (Kiewek-Martínez et al. 2010). Additionally, improvements in larval and juvenile culture have resulted in the production of thousands of juveniles (Gracia-López et al. 2005). The reproductive physiology of captive leopard groupers has also been studied, specifically the roles of sex steroids (estradiol, testosterone, and 11 keto-testosterone) in the reproductive cycle (Maldonado-García et al. 2018).

At the same time, great efforts have been made to increase our current understanding of the different culture phases for this species. For example, Gracia-López et al. (2004a) reported improved hatching rates at temperatures ranging from 24.0 to 30.0 °C and improved yolk sac volume from 26.0 to 28.0 °C. In addition, higher temperatures and the

## INTRODUCCIÓN

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877), pertenece a la familia Epinephelidae. La distribución de esta especie se extiende desde el golfo de California hasta la costa oeste del Pacífico mexicano. Los adultos de la cabrilla sardinera forman agregaciones de desove de abril a junio en diferentes sitios del golfo de California (Erisman et al. 2007), lo que incrementa su vulnerabilidad a la presión pesquera (Sala et al. 2004). Desde 2018, la cabrilla sardinera ha figurado como “Preocupación menor” en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza desde 2018 (Erisman y Craig 2018). Por la calidad de su carne, la cabrilla sardinera es un recurso muy valorado con un alto precio de mercado, con desembarques de entre 200 y 400 t anuales (González-Cuellar et al. 2019). Previo al año 2000, la información sobre esta especie era escasa y estaba relacionada con aspectos biológicos como los hábitos alimenticios (Peláez-Mendoza 1997). Desde entonces, se han realizado diversos estudios sobre la reproducción de la cabrilla sardinera en vida silvestre.

En el presente estudio pudimos verificar la información que se ha generado a la fecha con respecto a la reproducción de la cabrilla sardinera. Esta especie, en efecto, forma grandes agregaciones de desove durante periodos prolongados; sin embargo, también se agrega fuera de los periodos de desove, y el desove parece no estar sincronizado con el ciclo lunar (Erisman et al. 2007). La cabrilla sardinera es gonocórica (Erisman et al. 2008) y muestra un desarrollo ovárico grupal sincrónico (Estrada-Godínez et al. 2011). Se ha observado que la puesta de la cabrilla sardinera en vida silvestre ocurre de mayo a junio (Estrada-Godínez et al. 2011), de marzo a mayo (Sala et al. 2003) o de abril a junio (Erisman et al. 2007). Además, se han observado diferencias en los bioindicadores y los parámetros bioquímicos en el ciclo reproductivo de esta especie (Estrada-Godínez et al. 2014).

Actualmente, existen diversos estudios sobre la cabrilla sardinera en condiciones de cautiverio. Por ejemplo, se indujo el desove en hembras silvestres suministrando 2 inyecciones de 1,000 y 500 UI·kg<sup>-1</sup> de gonadotropina coriónica humana (hCG) con 24 h de diferencia (Gracia-López et al. 2004a). En otro estudio, en el cual la inducción se hizo con hCG y la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa), las hembras inducidas con hCG produjeron mejores resultados (Kiewek-Martínez et al. 2010). Además, las mejoras en el cultivo de larvas y juveniles han permitido producir miles de juveniles (Gracia-López et al. 2005). También se ha estudiado la fisiología reproductiva de la cabrilla sardinera en cautiverio, específicamente el papel de los esteroides sexuales (estradiol, testosterona y 11-ketotestosterona) en el ciclo reproductivo (Maldonado-García et al. 2018).

Al mismo tiempo, se han realizado grandes esfuerzos para mejorar nuestro entendimiento de las diferentes fases de cultivo de esta especie. Por ejemplo, Gracia-López et al. (2004a) reportaron tasas de eclosión mejoradas a temperaturas

salinity value of 32 resulted in the best larval growth and hatching rates (Gracia-López et al. 2004a). Larvae and juvenile production has also been achieved with fertilization, hatching, and survival rates of 76.8%, 71.2%, and 1.38%, respectively (Gracia-López et al. 2005, Martínez-Lagos and Gracia-López 2009). However, despite these advances, low larval survival at the first feeding remains problematic, which has led to studies of enzymology, probiotics, and disease (Reyes-Becerril et al. 2008, 2011; Martínez-Lagos et al. 2014).

In grouper aquaculture, major limitations have led to inadequate larval survival and inconsistent egg production (Okumura et al. 2002). Capturing fingerlings to be raised in captivity is not an optimal production strategy due to the scarcity of these source organisms (Kungvankij et al. 1986, Lim 1993). As such, reproduction has been studied in a large number of species in captivity with the aim of obtaining eggs. Lee and Yang (2002) and several studies have identified causes that prevent captive females from completing oocyte maturation (Zohar and Mylonas 2001). In most cultured marine fish species, it is sometimes necessary to manipulate abiotic factors, such as the photoperiod or temperature (Carrillo et al. 1989, Zanuy et al. 1995), or rely on exogenous hormone treatments to stimulate final oocyte maturation and ovulation (Mylonas and Zohar 2001).

One successful means to improve fecundity, fertilization, and egg production is related to natural spawning, with the broodstock being maintained in appropriately sized tanks with optimum water conditions and nutritional requirements. This method has been successfully implemented with various grouper species (Toledo et al. 1993, James et al. 1997, Ranjan et al. 2017) and appears to be a logistically feasible means to obtain good quality eggs in adequate quantities (Mylonas et al. 2004, Jerez et al. 2006).

In spite of the results that have been achieved in previous studies with hormonal induction, much remains to be understood about leopard grouper reproduction in captivity. To this end, a long-term study was conducted to evaluate leopard grouper maturation and natural spawning in captivity. This study evaluated egg production and fertilization over multiple spawning seasons and determined which factors may influence reproduction.

## MATERIALS AND METHODS

### Broodstock and husbandry

In May 2004, the broodstock used in this study ( $n = 17$ ) were captured by hook and line in the northern area of San José Island, Baja California Sur (Mexico), and transported to the facilities of the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) in cylindrical tanks (500 L) with supplemental oxygenation. In the laboratory, the fish were anaesthetized with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of tricaine methanesulfonate (MS-222), weighed, and dorsally tagged with Spaghetti

que oscilaron entre  $24.0$  y  $30.0$  °C y volúmenes de saco vitelino mejorados a  $26.0$  y  $28.0$  °C. Además, las temperaturas más altas y la salinidad de 32 resultaron en una mejor tasa de crecimiento y mejores tasas de eclosión (Gracia-López et al. 2004a). La producción de larvas y juveniles se ha logrado con tasas de fertilización, eclosión y supervivencia del 76.8%, 71.2% y 1.38%, respectivamente (Gracia-López et al. 2005, Martínez-Lagos y Gracia-López 2009). Sin embargo, a pesar de estos avances, la baja supervivencia de las larvas en etapas tempranas siguen siendo un problema, lo que ha dado lugar a estudios de enzimología, probióticos y enfermedades (Reyes-Becerril et al. 2008, 2011; Martínez-Lagos et al. 2014).

En la industria del cultivo de meros, las grandes limitaciones han llevado a la inadecuada supervivencia larval y una producción de huevos inconsistente (Okumura et al. 2002). La captura de juveniles silvestres para criarlos en granjas no es una estrategia de producción óptima debido a la escasez de estos organismos (Kungvankij et al. 1986, Lim 1993). Lee y Yang (2002) y varios estudios han identificado las causas que impiden que las hembras en cautiverio completen la maduración del ovocito (Zohar y Mylonas 2001). En la mayoría de los peces de cultivo, a menudo es necesario manipular los factores abióticos, como el fotoperiodo y la temperatura (Carrillo et al. 1989, Zanuy et al. 1995), o acudir al uso de tratamientos con hormonas exógenas para estimular la maduración final del ovocito y la ovulación (Mylonas y Zohar 2001).

Un medio para mejorar la fecundidad, la fertilización y la producción de huevos es a través del desove natural porque los reproductores se mantienen en tanques de tamaño apropiado con condiciones óptimas de agua y requerimientos nutricionales. Este método ha sido exitoso con varias especies de mero (Toledo et al. 1993, James et al. 1997, Ranjan et al. 2017) y parece ser una forma logísticamente factible para obtener buena calidad de huevos en cantidades adecuadas (Mylonas et al. 2004, Jerez et al. 2006).

A pesar de los resultados que se han obtenido en estudios anteriores con inducción hormonal, aún falta mucho por entender sobre la reproducción de la cabrilla sardinera en cautiverio. Con este fin, se llevó a cabo un estudio de largo plazo para evaluar la maduración y el desove natural de la cabrilla sardinera en cautiverio. Este estudio evaluó la producción de huevos y la fertilización a lo largo de múltiples temporadas de desove y determinó qué factores pueden influir en la reproducción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reproductores y cultivo

En mayo de 2004, los reproductores utilizados en este estudio ( $n = 17$ ) fueron capturados con anzuelo en la zona norte de la isla San José, Baja California Sur (México) y fueron transportados al Centro de Investigaciones Biológicas

FloyTags (Floy Tags & Mfg.; Seattle, WA, USA) for subsequent identification.

The fish were stocked in an outdoor circular tank (7 m<sup>3</sup>, 1 m depth) at a density of 1.40 kg·m<sup>-3</sup> under natural temperature and photoperiod conditions. The group consisted of 14 females with a mean (SD) weight of 1.17 (0.36) kg and 3 males with a mean (SD) weight of 1.36 (0.15) kg. The fish were fed on alternate days with frozen sardine and mackerel to satiation. From 2004 to 2007, the fish remained outdoors, after which they were transferred to a circular black fiberglass tank (7 m<sup>3</sup>) in a closed laboratory where they were kept until 2009. Suitable water conditions were maintained by a recirculation system composed of settler, filter, UV lamp, and chiller equipment. With this system, physicochemical parameters, such as temperature, dissolved oxygen, CO<sub>2</sub>, ammonium nitrogen, nitrites, and nitrates, were controlled. Supplemental oxygenation was provided via blower aeration.

Temperature was continuously measured by submersible HOBO TidbiT temperature loggers (Onset; Bourne, MA, USA); salinity was measured using a refractometer (ATAGO; Bellevue, WA, USA), and oxygen was measured with a YSI 85 oximeter (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA). The mean water temperature during the spawning period was 22.9 (1.2) °C and ranged between 21.1 and 23.8 °C. The annual water temperature and photoperiod are shown in Figure 1. Salinity was 37 and dissolved oxygen ranged from 5.3 to 6.2 mg·L<sup>-1</sup>.

## Maturity

Individuals were weighed and sampled to determine the maturation stage and sex in February, July, September, and November 2007 and January 2008. Sperm samples were taken by applying gentle abdominal pressure. Sperm were collected in Eppendorf tubes for subsequent motility observations. Gonad samples were obtained from females by introducing a polyethylene cannula into the oviduct. To

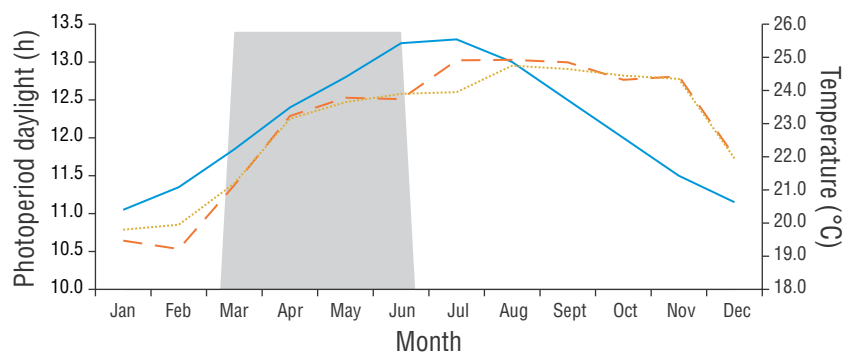
del Noroeste (CIBNOR) en tanques cilíndricos de 500 L provistos de oxigenación suplementaria. En el laboratorio, los organismos fueron anestesiados con 50 mg·L<sup>-1</sup> de tricafina metanosulfonato (MS-222), pesados y marcados en el dorso con marcas Spaghetti Floy Tags externas (Floy Tags & Mfg.; Seattle, WA, EE. UU.) para su posterior identificación.

Los peces fueron colocados en el exterior en un tanque circular (7 m<sup>3</sup>, 1 m de profundidad) a una densidad de 1.40 kg·m<sup>-3</sup> en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo. El grupo estaba formado por 14 hembras y 3 machos con peso medio (desviación estándar [DE]) de 1.17 (0.36) kg y 1.36 (0.15) kg, respectivamente. Los peces fueron alimentados en días alternos con sardina congelada y caballa hasta saciedad. De 2004 a 2007, los peces fueron mantenidos en el exterior; luego, fueron transferidos a un tanque negro cilíndrico (7 m<sup>3</sup>) en un laboratorio cerrado, donde se mantuvieron hasta 2009. Las condiciones de agua adecuadas y estables se mantuvieron a través de un sistema de recirculación compuesto por sedimentadores, filtros, lámparas de luz UV, y enfriadores. Este tipo de sistema permite controlar los parámetros fisicoquímicos, como temperatura, oxígeno disuelto, CO<sub>2</sub>, nitrógeno amónico, nitritos y nitratos. La oxigenación suplementaria se proporcionó con aireación por sopladores.

Se midió diariamente la temperatura (registrador de temperatura sumergible HOBO TidbiT, Onset; Bourne, MA, EE. UU.), la salinidad (refractómetro ATAGO; Bellevue, WA, EE. UU.) y el oxígeno disuelto (YSI 85, Yellow Springs Instruments; Yellow Springs, OH, EE. UU.). La temperatura media del agua durante el periodo de desove fue de 22.9 (1.2) °C, y osciló entre 21.1 y 23.8 °C. La temperatura del agua anual y el fotoperiodo se muestran en la Figura 1. La salinidad fue de 37 y el oxígeno disuelto osciló entre 5.3 y 6.2 mg·L<sup>-1</sup>.

## Madurez

Los peces fueron pesados, y se tomaron muestras de las gónadas para determinar el estado de maduración y el sexo



**Figure 1.** Photoperiod (solid line) and temperature recorded in the tanks where the leopard groupers were maintained in 2007 (dashed line) and 2008 (dotted line). Shaded area corresponds to the spawning season.

**Figura 1.** Fotoperiodo (línea continua) y temperatura registrados en los tanques donde se mantuvieron los ejemplares de cabrilla sardinera en 2007 (línea discontinua) y 2008 (línea punteada). El área sombreada corresponde a la temporada de desove.



determine oocyte diameter and maturation stage, photographs of the samples were taken with a Coolsnap-Pro Color camera (Media Cybernetics; Rockville, MD, USA) installed on a Bx-41 microscope (Olympus; Tokyo, Japan) and analyzed using Image-Pro Plus (v.5.0, Media Cybernetics).

### Egg collection and analysis

After spawning, buoyant eggs were passed through the outlet pipe to the collector tank, where they were retained by a mesh net (300  $\mu\text{m}$ ). On each spawning day, the eggs were collected in the morning, washed with sterile sea water, and transferred to a tank (35 L) with aeration to estimate the number of eggs released and fertilization rate (%). In this study, the fertilization rate represents the eggs obtained on a spawning day and does not represent the fertilization of a particular female. The total number of eggs was estimated by counting the eggs in 20 samples (15 ml). Mean (SD) egg diameter was measured with Sigma Scan Pro 5.0 (Systat Software; Chicago, IL, USA). The eggs were examined under the microscope to monitor embryonic development, and the fertilization rate was calculated following the early stages of embryonic development. The eggs were individually placed in 96-well microtiter plates (in replicates), with one egg per well, and maintained at  $23.0 \pm 1.2$  °C.

The fertilization rate was evaluated daily and was calculated as the number of fertilized eggs/total number of buoyant eggs. The number of viable eggs was calculated by multiplying the total number of eggs by the fertilization rate. In terms of egg production, the annual relative number of eggs released (eggs $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and viable egg production (eggs $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) were calculated taking into account the total mass of females (kg) in the tank. The time of day when spawning occurred was determined when the first egg was collected in the collector tank.

### Statistical analysis

Monthly and annual differences in the number of eggs released and the fertilization rate for the 2 spawning seasons were analyzed by an analysis of variance (ANOVA,  $P < 0.05$ ). The effect of the moon on fecundity was determined through a one-way ANOVA, after recording the number of eggs by moon phase and month. Significance was determined with Statistica v.8.0 (StatSoft; Tulsa, OK, USA). We modeled the expected fertilization rate using the generalized linear model logit link function in R v.4.1.2 (RStudio Team 2020) as a function of the spawning date and the number of eggs released per day. We used residual deviance to assess the goodness-of-fit and the chi-square test to evaluate the validity of the model.

Lunar phases were assigned as follows: 0 to the full moon and values up to 29 for each successive date. Days were grouped into 8 lunar phases adapted by Grant et al. (2009) from Stolov (1965) and Bell and Defouw (1966). A circular

en febrero, julio, septiembre y noviembre de 2007 y enero de 2008. Se tomaron muestras de semen aplicando suave presión abdominal, y las muestras se colocaron en tubos Eppendorf para posteriormente observar la motilidad espermática. Las muestras de gónadas de hembras se obtuvieron introduciendo una cánula de polietileno en el oviducto. Para determinar el diámetro del ovocito y el estado de madurez, se capturaron imágenes de las muestras con una cámara digital Coolsnap-Pro Color (MediaCybernetics; Rockville, MD, EE. UU.) instalada sobre un microscopio óptico Bx-41 (Olympus; Tokio, Japón), y las imágenes se procesaron con el software Image-Pro Plus (v.5.0, MediaCybernetics).

### Recolección y análisis de huevos

Después del desove, los huevos flotantes se pasaron a través de la tubería de salida al tanque recolector, donde se retuvieron por una malla (300  $\mu\text{m}$ ). Los huevos fueron recolectados todas las mañanas de los días de desove, lavados con agua de mar estéril y transferidos a un tanque (35 L) con aireación para estimar el número de huevos liberados y la tasa de fertilización (%). En este estudio, la tasa de fertilización representa los huevos obtenidos en un día de desove y no representa la fertilización de una hembra en particular. El número total de huevos se calculó contando el número de huevos en 20 muestras de 15 mL. El diámetro medio de los huevos se midió con el programa Sigma Scan 5.0 (Systat Software; Chicago, IL, USA). Los huevos fueron examinados bajo el estereoscopio para monitorear el desarrollo embrionario, y la tasa de fertilización se calculó tomando en cuenta las primeras etapas del desarrollo embrionario. Los huevos se colocaron individualmente en placas de microtitulación de 96 pocillos (en réplicas), un huevo por pocillo, y se mantuvieron a  $23.0 \pm 1.2$  °C.

La tasa de fertilización se evaluó diariamente y se calculó como el número de huevos fertilizados/huevos flotantes totales. El número de huevos viables se calculó multiplicando el número total de huevos por la tasa de fertilización. En cuanto a la producción de huevos, se calculó el número relativo de huevos liberados anualmente (huevos $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y la producción de huevos viables (huevos $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) tomando en cuenta la masa total de las hembras (kg) en el tanque. La hora del día en que se produjo el desove se determinó cuando se recogió el primer huevo en el tanque recolector.

### Análisis estadístico

Las diferencias mensuales y anuales en el número de huevos recolectados y la tasa de fertilización para las 2 temporadas de desove se examinaron utilizando un análisis de varianza (ANDEVA,  $P < 0.05$ ). El efecto lunar sobre la fecundidad se determinó mediante un ANDEVA de una vía, después de registrar el número de huevos por fase lunar y mes. La significancia estadística se determinó mediante el *software* Statistica v.8.0 (Stat Soft; Tulsa, OK, EE. UU.). Se

histogram was plotted with bar length representing the cumulative number of eggs released ( $\times 10^6$ ), the dashed lines and dots representing the spawning frequency, and the color representing the fertilization rate according to lunar phase. Data were analyzed for possible correlations with the lunar phase using Rao's spacing test. In this case, significance was determined with  $P < 0.1$  (Grant et al. 2009).

This study was conducted following the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) and Mexican Government (NOM-062—ZOO-1999) for the production, care, and use of experimental animals. Experimental protocols and procedures were reviewed and approved by the aquaculture committee of CIBNOR. The authors confirm that the ethical policies of the journal *Ciencias Marinas*, as noted in the author guidelines, have been followed, and approval was awarded by the appropriate ethical review committee.

## RESULTS

### Spawning season

In 2006, 22 months after the start of the study, a batch of 90,000 unfertilized eggs was obtained, representing the only spawn of that year. No fertile eggs were collected until 2007. In that year, the first and last batches of eggs were collected on 9 March and 29 June, respectively. In 2008, the first spawning date was 12 March, and the spawning season ended on 21 May. The spawning seasons took place during periods in which temperatures increased (21.1 to 23.8 °C in 2007 and 21.2 to 23.6 °C in 2008) as the photoperiod increased (Fig. 1). Throughout the duration of this experiment, the first fertilized eggs were collected just before total darkness, between sunset and night, when it was impossible to see any signs of courtship. Egg diameter ranged from 848.0 to 884.0  $\mu\text{m}$  with a mean (SD) of  $864.0 \pm 22.0 \mu\text{m}$ .

### Maturation

Fish sampled in February 2007 showed evidence of maturity, albeit with males and females in different stages of maturity. Eleven days after this sampling, the first spawning of the year was observed. Oocyte size (mean  $\pm$  SD) ranged from  $107 \pm 42$  to  $554 \pm 103 \mu\text{m}$ . In July 2007, only the males were mature (flowing males); 4 females exhibited vitellogenic oocytes, and 10 females showed previtellogenic oocytes. In September and November 2007, no signs of maturity were observed in any individual. In January 2008, 3 females exhibited hydrated oocytes, although males were not mature at this point.

### Egg production

There were 43 and 27 spawning days in 2007 and 2008, respectively, with a similar number of spawning days (9 to

modeló la tasa de fertilización esperada usando la función de enlace logit del modelo lineal generalizado en R v.4.1.2 (RStudio Team 2020) en función de la fecha de desove y el número de huevos liberados por día. Se utilizó la desviación residual para evaluar la bondad de ajuste y la prueba de chi cuadrada para evaluar la validez del modelo.

Para asignar las fases lunares, se asignaron valores del 0 al 29 a cada fecha, donde 0 representa luna llena, y los demás valores, los días sucesivos. Los días se agruparon en 8 fases lunares adaptadas por Grant et al. (2009) de Stolov (1965) y Bell y Defouw (1966). El histograma circular se realizó con la longitud de la barra que representa el número acumulado de huevos liberados ( $\times 10^6$ ), las líneas discontinuas y los puntos que representan la frecuencia de desove y el color que representa la tasa de fertilización según la fase lunar. Los datos se analizaron para determinar la posible correlación con la fase lunar utilizando la prueba de Rao. En este caso, se supuso significancia con  $P < 0.1$  (Grant et al. 2009).

Este estudio se llevó a cabo bajo los Lineamientos del Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU) y el Gobierno de México (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, el cuidado y el uso de animales de experimentación. Los protocolos y procedimientos experimentales contaron con la revisión y la aprobación del comité de acuicultura del CIBNOR. Los autores confirman que se cumplieron las políticas éticas de la revista *Ciencias Marinas*, como se indica en las directrices para autores, y que se recibió la aprobación del comité de revisión ética correspondiente.

## RESULTADOS

### Época de desove

En 2006, luego de 22 meses desde el inicio del estudio, ocurrió una puesta de 90,000 huevos no fecundados, el único desove en ese año. Los primeros huevos fértiles se recolectaron hasta 2007. En ese año, el primer lote de huevos se recolectó el 9 de marzo y el último se recolectó el 29 de junio. En 2008, la fecha del primer desove fue el 12 marzo, y la temporada de desove finalizó el 21 de mayo. Las épocas de puesta ocurrieron en los periodos en los cuales la temperatura aumentó (de 21.1 a 23.8 °C en 2007 y de 21.2 a 23.6 °C en 2008) con el incremento de las horas de luz (Fig. 1). Durante este experimento, los primeros huevos fertilizados se recolectaron justo antes de la oscuridad total, entre el atardecer y el anochecer, cuando era imposible observar algún signo de cortejo. El diámetro de los huevos presentó una media ( $\pm$ DE) de  $864.0 \pm 22.0 \mu\text{m}$  y un rango de 848.0 a 884.0  $\mu\text{m}$ .

### Maduración

Los peces muestreados en febrero de 2007 mostraron evidencia de madurez, aunque diferentes estados de madurez para los machos y las hembras. Once días después de este muestreo, se observó el primer desove de ese año. El

13 days) and eggs obtained each month, except in March 2008, when only 5 spawning days were recorded because the spawning season began in the middle of that month. The monthly and annual mean (SE) number of eggs per spawning day and mean (SE) fertilization rate obtained in 2007 and 2008 are shown in Table 1. Large variation in daily egg release was observed, with 18,560 to 471,000 eggs released per day in 2007 (mean [SE]: 101,705 [13,876]) and 800 to 145,000 eggs released per day in 2008 (mean [SE]: 40,510 [7,874]) (Fig. 2). No consistent trend was recorded throughout the spawning season. In all,  $4.37 \times 10^6$  and  $1.07 \times 10^6$  eggs were released in 2007 and 2008, respectively (Fig. 3, Table 2). The annual relative number of eggs released was 288,750 eggs·kg<sup>-1</sup> and 72,919 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2007 and 2008, respectively, while viable egg production was 184,800 and 25,375 eggs·kg<sup>-1</sup> in 2007 and 2008, respectively.

### Statistical Analysis

The number of eggs collected per spawning day ranged from 68,200 (April) to 144,600 (June) in 2007 and 38,900 (March) to 47,000 (May) in 2008. There were no statistically significant differences within each year ( $P > 0.05$ ; Table 1), although significant differences were found between 2007 and 2008 ( $P < 0.05$ ). A low fertilization rate was recorded at the start of the spawning season that gradually increased,

tamaño de los ovocitos (media  $\pm$  DE) osciló entre  $107 \pm 42$  y  $554 \pm 103$   $\mu$ m. En julio de 2007, solo los machos estuvieron maduros (machos fluyentes); 4 hembras mostraron ovocitos vitelogénicos y 10 hembras mostraron ovocitos previtelogénicos. En septiembre y noviembre de 2007 no se observó ningún signo de madurez en ningún individuo. En enero de 2008, 3 hembras mostraron ovocitos hidratados, pero los machos aún no estaban maduros.

### Producción de huevos

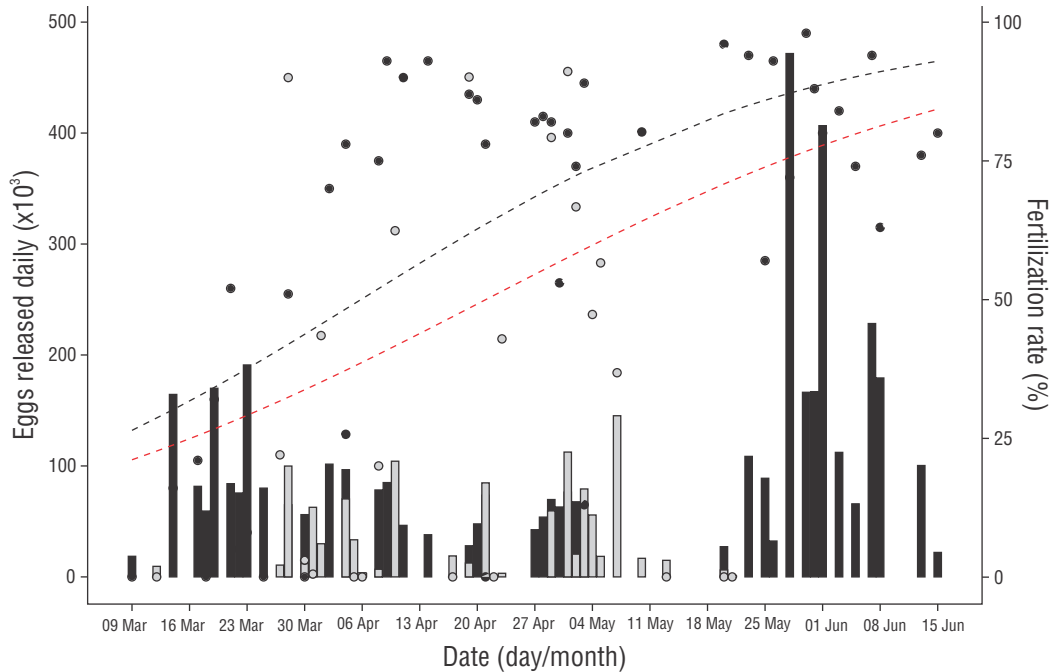
Hubo 43 días de desove en 2007 y 27 en 2008, con un número similar de días de desove (9 a 13 días) y huevos en cada mes, excepto en marzo de 2008, cuando solo se registraron 5 días de desove debido a que la temporada de desove comenzó a mediados de ese mes. El número medio mensual y anual de huevos obtenidos por día de desove ( $\pm$  error estándar) y la tasa de fertilización media ( $\pm$  error estándar) para 2007 y 2008 se presentan en la Tabla 1. Hubo una gran variación en la liberación de huevos diaria, de 18,560 o 471,000 huevos liberados por día en 2007 (media [ $\pm$  error estándar]: 101,705 [13,876]) y 800 a 145,000 huevos liberados por día en 2008 (media [ $\pm$  error estándar]: 40,510 [7,874]) (Fig. 2). No se observó ni una tendencia constante durante la temporada de desove. El número total de huevos obtenidos fue de  $4.37 \times 10^6$  en 2007 y  $1.07 \times 10^6$  en 2008 (Fig. 3, Tabla 2). El número relativo

**Table 1.** Number of spawning days and eggs obtained per month. Mean (SE) eggs per release and fertilization rate (F) per month obtained in 2007 and 2008.

**Tabla 1.** Número de días de desove y huevos liberados por mes. Número medio (error estándar) de huevos por puesta y tasa de fertilización (F) por mes obtenidos en 2007 y 2008.

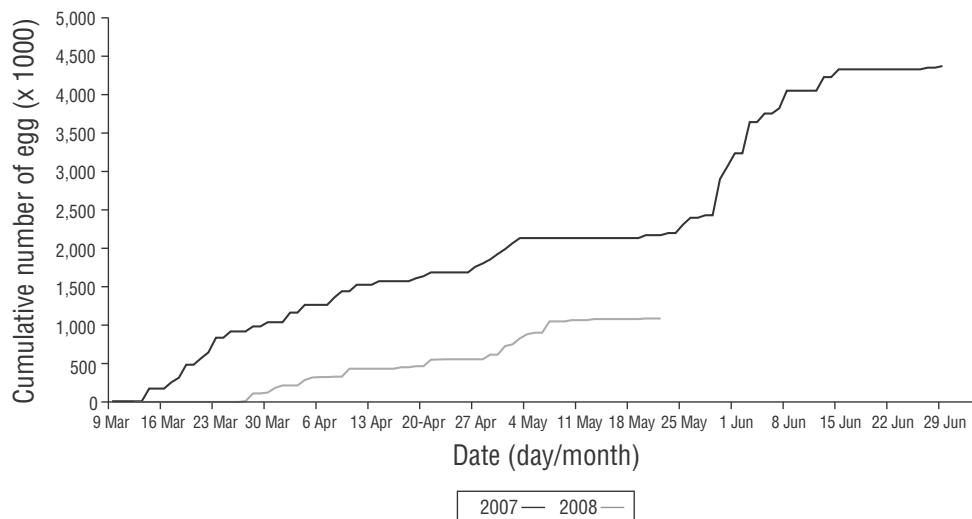
Year	Month	Spawning days	Eggs	Eggs/release ( $\times 10^3$ )	F(%)
2007					
	March	11	1,045,667	95.0 (54.8) <sup>a</sup>	16.8 (20.0) <sup>a</sup>
	April	13	886,111	68.2 (28.6) <sup>a</sup>	76.7 (24.0) <sup>b</sup>
	May	10	1,139,828	114.0 (132.0) <sup>a</sup>	80.6 (16.3) <sup>b</sup>
	June	9	1,301,692	144.6 (121.0) <sup>a</sup>	71.0 (28.0) <sup>b</sup>
2008					
	March	5	194,870	38.9 (40.8) <sup>a</sup>	23.1 (38.5) <sup>a</sup>
	April	12	428,373	35.7 (35.5) <sup>a</sup>	30.3 (33.1) <sup>a</sup>
	May	10	470,537	47.0 (46.8) <sup>a</sup>	39.2 (34.6) <sup>a</sup>
Total	2007	43	4,373,298	101.7 (91.0) <sup>x</sup>	61.1 (34.2) <sup>x</sup>
Total	2008	27	1,093,780	40.5 (40.9) <sup>y</sup>	32.3 (33.8) <sup>y</sup>

Means within a column followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Eggs released each day in 2007 (black bars) and 2008 (grey bars) and the fertility rate in 2007 (black spots) and 2008 (grey spots) based on leopard grouper natural spawning. The relationship between the number of eggs released and spawning date in 2007 (black dashed line) and for the combined values of 2007 and 2008 (red dashed line) is shown based on the generalized linear models logit link function.

**Figura 2.** Huevos liberados por día en 2007 (barras negras) y 2008 (barras grises) y tasa de fertilización en 2007 (puntos negros) y 2008 (puntos grises) con base en los desoves naturales de la cabrilla sardinera. Se muestra la relación entre el número de huevos liberados y la fecha de desove en 2007 (línea discontinua negra) y para los valores combinados de 2007 y 2008 (línea discontinua roja) con base en el enlace logit del modelo lineal general.



**Figure 3.** Leopard grouper eggs accumulated during the spawning season of 2007 and 2008) in captivity.

**Figura 3.** Huevos de la cabrilla sardinera acumulados durante la temporada de desove de 2007 y de 2008 en cautiverio.



**Table 2.** Cumulative spawning parameters during 2 consecutive leopard grouper spawning seasons (2007 and 2008).

**Table 2.** Parámetros acumulados de los desoves de la cabrilla sardinera durante 2 temporadas de desove consecutivas (2007 y 2008).

	2007 Mean (SE)	2008 Mean (SE)
Eggs released daily ( $\times 10^3$ eggs)	101.70 (13.9) <sup>a</sup>	40.50 (7.8) <sup>b</sup>
Total eggs released ( $\times 10^6$ eggs)	4.37	1.07
Annual relative number of eggs released ( $10^3$ eggs·kg <sup>-1</sup> )	288.00	73.00
Fertilization (%)	61.10 (5.2) <sup>a</sup>	32.30 (6.5) <sup>b</sup>
Viable egg production ( $10^3$ eggs·kg <sup>-1</sup> )	184.80	25.30

Statistically significant differences between the 2 years were present in the parameters examined ( $P < 0.05$ ).

with significant differences between months in 2007 ( $P < 0.05$ ). The fertilization rate exhibited higher daily variations in 2007 than in 2008, and significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between those 2 years, with the fertilization rate decreasing from 61.1% in 2007 to 32.3% in 2008.

For 2007, a significant interaction between the fertilization rate and spawning date was detected, but no relationship was present between the fertilization rate and daily egg release (Fig. 2). The same significant interaction between fertilization rate and spawning date was detected for the combined data of 2007 and 2008. The expectation did not deviate from zero. Also, most residuals exhibited absolute values smaller than 2. There appeared to be no influential data points, and only 3 outliers without influence. The chi-square test for residual deviance returned a  $P$  value of 0.99 for both models, so we can conclude that the model fits well. For 2008, no relationship was observed between factors.

The spawning frequency was significantly different according to the moon phase. More spawning days (9 days) were observed during the full moon phase compared to the waning gibbous (4 days), waning crescent (3 days), or first quarter (2 days) phases. Moreover, the number of eggs released was significantly higher during the full moon (1,067,696 eggs) and waning gibbous (742,876 eggs) phases and significantly lower during the first quarter (107,222 eggs) phase when compared to those of the other moon phases (371,540 to 637,046 eggs). No significant difference was observed in the fertilization rate. Nonetheless, a tendency toward greater fertilization from waxing gibbous to third quarter phases can be observed in Figure 4.

## DISCUSSION

### Conditions for natural spawning in captivity

The acclimatization of organisms to captive conditions, maturation, and successful natural spawning are influenced

anual de huevos liberados fue de 288,750 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2007 y 72,919 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2008, y la producción de huevos viables fue de 184,800 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2007 y 25,375 huevos·kg<sup>-1</sup> en 2008.

### Análisis estadístico

El número de huevos recolectados por día de desove varió de 68,200 (abril) a 144,600 (junio) en 2007 y de 38,900 (marzo) a 47,000 (mayo) en 2008. No hubo diferencias estadísticamente significativas dentro de cada año ( $P > 0.05$ ; Tabla 1), pero sí se observaron diferencias significativas entre 2007 y 2008 ( $P < 0.05$ ). Se registró una tasa de fertilización baja cuando comenzó la temporada de desove, y esta aumentó gradualmente, con diferencias significativas entre meses en 2007 ( $P < 0.05$ ). La tasa de fertilización presentó mayor variación diaria en 2007 en comparación con 2008, y se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los 2 años, con una disminución del 61.1% en 2007 al 32.3% en 2008.

En 2007 hubo una interacción significativa entre la tasa de fertilización y la fecha de desove, pero no se detectó una relación entre la tasa de fertilización y el número de huevos liberados diariamente (Fig. 2). La misma interacción significativa entre la tasa de fertilización y la fecha de desove se detectó para los datos combinados de 2007 y 2008. La expectativa no se desvió de cero. Además, la mayoría de los residuos presentaron un valor absoluto menor que 2. Aparentemente, no hubo puntos de datos influyentes, solo 3 valores atípicos sin influencia. La prueba de chi cuadrada para la desviación estándar residual arrojó un valor  $P$  de 0.99 para ambos modelos, por lo que podemos concluir que el modelo se ajustó bien. Para 2008, no se observó relación entre factores.

La frecuencia de desove fue significativamente diferente según las fases lunares. Se observaron más días de desove (9 días) durante la fase de luna llena en comparación con

by a large number of biological, physicochemical, and environmental factors. For example, farmed fish can exhibit reproductive problems if their environmental conditions are suboptimal (Mustafa et al. 2015). As such, maintaining individuals of different species under appropriate temperature and tank conditions with proper feeding and care can encourage spontaneous reproduction in captivity. Our results have shown that the recirculating system employed with the tanks (7 m<sup>3</sup>) used in this study was efficient and produced desirable conditions for leopard grouper maturation and natural breeding. Moreover, the feeding and photoperiod regimes and oxygen, salinity, and temperature conditions properly maintained the wild-caught broodstock and allowed for reproduction with spontaneous spawning to develop in this species. Spontaneous spawning has also been reported in a large number of fish species including the amberjack, *Seriola dumerili* (Jerez et al. 2006), and the fine sole, *Paralichthys adspersus* (Ángeles and Mendo 2005). There are also many examples of grouper species in which individuals were maintained in fiberglass tanks, cages, or

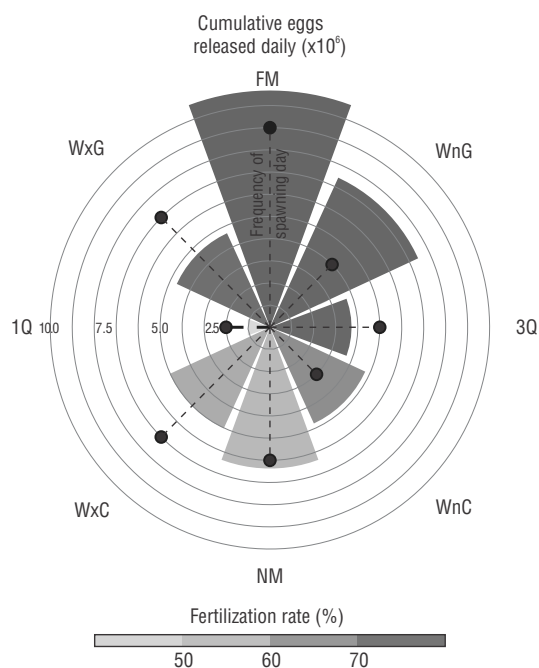
las fases gibosa menguante (4 días), menguante (3 días) o primer cuarto (2 días). Además, el número de huevos liberados fue significativamente mayor durante las fases de luna llena (1,067,696 huevos) y gibosa menguante (742,876 huevos) y significativamente menor durante el primer cuarto (107,222 huevos) en comparación con el número de huevos en las otras fases lunares (de 371,540 a 637,046 huevos). No se hallaron diferencias significativas en la tasa de fertilización. No obstante, se observó una tendencia a mayores tasas de fertilización desde la fase gibosa creciente hasta la de tercer cuarto (Fig. 4).

## DISCUSIÓN

### Condiciones para el desove natural en cautiverio

La aclimatación de los organismos a las condiciones de cautiverio, la madurez gonadal y el desove natural están influenciados por un gran número de factores biológicos, físicoquímicos y ambientales. Por ejemplo, los peces criados en cautiverio pueden presentar problemas reproductivos si las condiciones ambientales no son adecuadas (Mustafa et al. 2015). Por tanto, el mantener a los individuos de diferentes especies a temperatura y condiciones de tanque adecuadas con una alimentación y cuidados apropiados puede promover la reproducción espontánea en cautiverio. Nuestros resultados comprueban que el sistema de recirculación utilizado en los tanques (7 m<sup>3</sup>) en este estudio fue eficiente y produjo condiciones deseables para la maduración y la reproducción natural de la cabrilla sardinera. Además, los regímenes de alimentación y fotoperiodo y las condiciones de oxígeno, salinidad y temperatura fueron adecuados para el buen mantenimiento de los reproductores silvestres y el desarrollo de la reproducción con desove espontáneo de esta especie. El desove natural se ha reportado en un gran número de especies que incluye la seriola, *Seriola dumerili* (Jerez et al. 2006), y el lenguado fino, *Paralichthys adspersus* (Ángeles y Mendo 2005). Existen numerosos ejemplos de especies de cabrilla en los que los individuos se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio, jaulas o tanques de concreto con sistemas de recirculación (Toledo et al. 1993, James et al. 1997, Jagadis et al. 2006, Mathew 2010, Ranjan et al. 2017).

La dieta proporcionada durante este estudio estuvo compuesta principalmente de sardina, caballa y calamar. Esta dieta fue similar a las observadas en estudios de alimentación natural de poblaciones silvestres de *M. rosacea* con organismos del mismo tamaño que aquellos utilizados en el presente estudio (Peláez-Mendoza 1997, Pérez-Rojo 2016). La dieta fue suficiente para mantener reproductores saludables y lograr la maduración y el desove. Sin embargo, se necesitan más estudios para desarrollar dietas artificiales que mejoren la calidad y cantidad de desoves. A pesar de que se conoce la importancia de la nutrición de los reproductores sobre la calidad de los huevos y las larvas, y la fecundidad,



**Figure 4.** Fecundity (cumulative number of eggs  $\times 10^6$ ), spawning frequency (number of spawning days), and fertilization rate of leopard grouper natural spawning according to moon phase. FM: full moon; WnG: waning gibbous; 3Q: third quarter; WnC: waning crescent; NM: new moon; WxC: waxing crescent; 1Q: first quarter; WxG: waxing gibbous.

**Figura 4.** Fecundidad (número acumulado de huevos  $\times 10^6$ ), frecuencia de desove (número de días de desove) y tasa de fertilización de los desoves naturales de la cabrilla sardinera según las fases lunares. FM: luna llena; WnG: gibosa menguante; 3Q: cuarto menguante; WnC: luna menguante; NM: luna nueva; WxC: luna creciente; 1Q: cuarto creciente; WxG: gibosa creciente.

concrete tanks with recirculation systems (Toledo et al. 1993, James et al. 1997, Jagadis et al. 2006, Mathew 2010, Ranjan et al. 2017).

The diet provided during this study was mainly composed of sardine, mackerel, and squid. This diet is similar to those observed in natural feeding studies of wild *M. rosacea* populations with organisms of the same size as those in the present study (Peláez-Mendoza 1997, Pérez Rojo 2016). The diet was sufficient for maintaining healthy broodstock and achieving maturation and spawning. However, more studies are needed to develop artificial diets that improve the quality and number of spawns. Grouper nutrition has not been adequately studied, although its importance to reproductive organisms, the quality of eggs and larvae, and fecundity is understood (Luo et al. 2005). During a natural spawning study with *Epinephelus tauvina*, broodstock were fed a variety of trash fish, cephalopods, vitamins E and B12, and other nutritional supplements to provide eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and polyunsaturated fatty acids (Mathew 2010).

The acclimatization time and maturation in captive fishes depend on a variety of factors, which include facility conditions, management, nutrition, and aspects related to the biology of the species. Marine fishes like *Solea solea* (Ofelio et al. 2020) and *S. dumerli* (Jerez et al. 2006) can take 2 and 6 years to mature in captivity, respectively. Groupers have been described as species that can mature and naturally spawn in captivity after a post-capture acclimatization period, which has been found to be relatively short in *Epinephelus suillus* (Toledo et al. 1993), *Epinephelus polyphekadion* (James et al. 1997), and *Epinephelus merra* (Jagadis et al. 2006).

### **Reproductive cycle, spawning season, and the influence of temperature, photoperiod, and moon phase**

In the wild, leopard groupers have been observed to spawn from May to June (Estrada-Godínez et al. 2011), March to May (Sala et al. 2003), or April to June (Erisman et al. 2007). Estrada-Godínez et al. (2011) observed temperatures ranging from 21 to 25 °C and approximately 13 h of daylight in the spawning season. The differences reported between spawning seasons could be due to differences in temperature or other variables between study sites. Indeed, Sala et al. (2003) suggested that latitudinal differences in the Gulf of California, which are related to water temperature, could result in differences in leopard grouper spawning periods. In both the wild and captivity, the reproductive cycle of the leopard grouper exhibits differences in reproductive phases throughout the year (Erisman et al. 2008, Estrada-Godínez et al. 2011). A period of rest occurs from August until the oocytes begin to develop in November (Kiewek-Martínez et al. 2010). This is followed by a maturation period of 4 months, which begins as the daylight hours and temperature begin to progressively increase.

la nutrición de meros no ha sido estudiada adecuadamente (Luo et al. 2005). Durante un estudio del desove natural de *Epinephelus tauvina*, los reproductores fueron alimentados con morralla, pequeños cefalópodos, vitaminas E y B12, y otros suplementos nutricionales para proporcionar un enriquecimiento esencial de ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácidos grasos poliinsaturados (Mathew 2010).

El tiempo de aclimatación y la madurez de peces en cautiverio dependen de varios factores, como las instalaciones, el manejo, la nutrición, y los aspectos biológicos de las especies. Los peces marinos como *Solea solea* (Ofelio et al. 2020) y *S. dumerli* (Jerez et al. 2006) pueden tardar 2 y 6 años en madurar en cautiverio, respectivamente. Los meros han sido descritos como especies que pueden madurar y desovar naturalmente en cautiverio después de un periodo de aclimatación poscaptura, que puede ser relativamente corto en especies como *Epinephelus suillus* (Toledo et al. 1993), *Epinephelus polyphekadion* (James et al. 1997) y *Epinephelus merra* (Jagadis et al. 2006).

### **Ciclo reproductivo, época de desove e influencia de la temperatura, el fotoperiodo y la fase lunar**

En la naturaleza, se ha observado que la cabrilla sardinera desova de mayo a junio (Estrada-Godínez et al. 2011), de marzo a mayo (Sala et al. 2003) o de abril a junio (Erisman et al. 2007). Estrada-Godínez et al. (2011) observaron, en la temporada de desove, temperaturas que variaron entre 21 y 25 °C y aproximadamente 13 h de luz (Estrada-Godínez et al. 2011). Las diferencias en la temporada de desove entre los diferentes estudios podrían referirse a diferencias en la temperatura y otras variables entre los sitios de estudio. Sala et al. (2003) sugirieron que las diferencias latitudinales en el golfo de California, relacionadas con la temperatura del agua, pueden provocar diferencias en los periodos de desove de la cabrilla sardinera. El ciclo reproductivo de la cabrilla sardinera en la naturaleza y en cautiverio muestra diferentes fases reproductivas a lo largo del año (Erisman et al. 2008, Estrada-Godínez et al. 2011). Hay un periodo de reposo, desde agosto hasta noviembre, en el que los ovocitos comienzan a desarrollarse (Kiewek-Martínez et al. 2010). Luego ocurre un periodo de maduración de 4 meses, que comienza cuando las horas de luz y la temperatura aumentan progresivamente.

En el presente estudio, la maduración final en las hembras y la maduración completa en los machos se observó en febrero de 2007 y enero de 2008 tras el análisis de los ovocitos. Con base en los huevos recolectados, el desove comenzó en marzo y duró hasta mayo-junio. Notamos que el comienzo de la época de desove ocurrió conforme incrementó el fotoperiodo, que puede ser lo que desencadena la madurez gonadal después del solsticio de invierno. No obstante, se requieren más estudios para comprobar esta hipótesis. De hecho, se han realizado pocos estudios sobre la influencia del fotoperiodo y la temperatura del agua en los meros a pesar de que

In the present study, final maturation in females and full maturation in males was observed in February 2007 and January 2008 through oocyte analyses. Based on the collected eggs, the spawning began in March and carried through until May-June. We noted that the onset of the spawning season occurred as the photoperiod increased, which may be what triggers gonadic maturity after the winter solstice. However, additional follow-up studies are needed to confirm this hypothesis. Indeed, few studies have been conducted on photoperiod and temperature in groupers despite these variables being highly important to the reproductive process (Rimmer and Glamuzina 2019). Kanemaru et al. (2012) observed gonadal maturity in *E. merra* after induction with gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa) and a long photoperiod. The influence of temperature on maturation and spawning remains largely unknown, although temperature alone was insufficient to control gonadal development in *Epinephelus fuscoguttatus* (Rimmer and Glamuzina 2019).

The spawning and daily egg release frequencies were significantly different according to moon phases, although no significant difference was observed in the fertilization rate after analyzing 70 spawning days throughout the spawning season. It should be noted that these results are based on the effect of the moon on a group of fish and are not the result of observations of individual fish. The lunar rhythm has been found to influence the natural spawning of *E. merra* (Jagadis et al. 2006) and *E. tauvina* (Mathew 2010) in captivity. In another study, the relationship between spawning and the lunar cycle was found to decrease throughout the experimental period (Ranjan et al. 2017).

### Egg production

Groupers generally acclimatize well to confinement and can reproduce spontaneously under these conditions (Tucker 1994). The efficiency of egg production per animal was very clear, which supports natural reproduction as an important component of leopard grouper reproduction, especially when considering the additional associated benefits such as lower personnel, facility, and energy costs and less animal handling. In 2007 and 2008, the total number of eggs released during the spawning season was  $4.3 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^6$ , respectively. In addition, natural spawning also resulted in successful egg production.

In previous studies, a total of  $47.00 \times 10^6$  eggs were collected in a study with *Epinephelus coioides* (Ranjan et al. 2017), while  $9.20 \times 10^6$  eggs were collected with *E. tauvina* (Mathew 2010), and more than  $17.00 \times 10^6$  eggs were collected with *E. polyphekadion* (James et al. 1997). Great differences in egg production are apparent among these studies, as they focused on different species, individual sizes, confinement conditions, feeding methods, and facility conditions. In this study, differences were present between 2007 and 2008, including significant differences in the number of eggs collected and their fertilization rates. These differences

estas variables son importantes en el proceso reproductivo (Rimmer y Glamuzina 2019). Kanemaru et al. (2012) observaron la maduración en ejemplares de *E. merra* luego de la inducción con un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) y un fotoperiodo largo. La influencia de la temperatura sobre la madurez gonadal y el desove es poco conocida, y la temperatura por sí sola no fue suficiente para controlar el desarrollo gonadal en *Epinephelus fuscoguttatus* (Rimmer y Glamuzina 2019).

La frecuencia de desove y la frecuencia de la liberación de huevos diaria fueron significativamente diferentes según las fases lunares, aunque no se hallaron diferencias significativas en las tasas de fertilización luego del análisis de 70 días a lo largo de la temporada de desove. Cabe señalar que estos resultados se basan en el efecto de la luna sobre un grupo de peces y no son los resultados de observaciones de peces individuales. Se ha encontrado que el ritmo lunar influye en el desove natural de *E. merra* (Jagadis et al. 2006) y *E. tauvina* (Mathew 2010) en cautiverio. En otro estudio, se encontró que la asociación del desove con el ciclo lunar se debilitó durante el periodo experimental (Ranjan et al. 2017).

### Producción de huevos

Los meros se aclimatan bien al confinamiento y generalmente pueden reproducirse espontáneamente en esas condiciones (Tucker 1994). La eficiencia de la producción de huevos por animal fue muy clara, lo que respalda que la puesta natural es un componente importante en la reproducción de la cabrilla, especialmente si se consideran los beneficios asociados adicionales como menores costos de personal, instalaciones y energía y menos manejo de animales. El total de huevos liberados durante la temporada de desove fue de  $4.3 \times 10^6$  en 2007 y  $1.0 \times 10^6$  en 2008. Además, el desove natural también dio resultados exitosos en la producción de huevos.

En estudios previos, se recolectaron un total de  $47.00 \times 10^6$  huevos con *Epinephelus coioides* (Ranjan et al. 2017),  $9.20 \times 10^6$  huevos con *E. tauvina* (Mathew 2010) y más de  $17.00 \times 10^6$  huevos en *E. polyphekadion* (James et al. 1997). Son evidentes las grandes diferencias en la producción de huevos entre estos estudios, pues utilizaron diferentes especies, tamaños de individuos, condiciones de confinamiento, métodos de alimentación e instalaciones. En el presente estudio hubo diferencias entre 2007 y 2008, incluso diferencias significativas en el número de huevos recolectados y sus tasa de fertilización. Estas diferencias pueden deberse a que los animales fueron trasladados a un laboratorio cerrado en 2007 después de la época de desove. No obstante, las razones de estas diferencias no son claras, ya que los parámetros físico-químicos, la alimentación y el manejo fueron similares en ambos años.

Es difícil comparar los resultados del presente estudio con aquellos estudios que han empleado la inducción hormonal. Los resultados aquí expuestos se obtuvieron de un grupo



may be the result of the fish being moved to a closed laboratory in 2007 after the spawning season. Nonetheless, the reasons for these differences are not clear given that physicochemical parameters, feeding, and handling were similar in both years.

It is difficult to compare the results of the present study to those of studies that have employed hormonal induction. In this study, the results were obtained from a group of fish and did not come from the data of individuals. However, the collective results of all studies on this topic elucidate the improvements that have been made with natural spawning when compared to those of hormonal induction. The fecundity and fertilization rates obtained after hormonal induction with hCG and LHRHa in *M. rosacea* are highly variable and range from  $3 \times 10^3$  to  $571 \times 10^3$  eggs per spawning (Kiewek-Martínez et al. 2010), which resulted in the production of  $3.70 \times 10^6$  viable eggs with 97 females and a low fertilization rate. In general, studies of leopard grouper reproduction have made the benefits of natural reproduction apparent given that natural reproduction yields higher egg production with a smaller number of specimens than does hormonal induction.

Estimated egg production was  $288 \times 10^3$  and  $73 \times 10^3$  eggs·kg<sup>-1</sup> in 2007 and 2008, respectively. Interspecific variation in fecundity has been observed with other species that show higher fecundity than the leopard grouper. For example, annual relative fecundity values greater than 400,000 eggs·kg<sup>-1</sup> and between 2.80 to  $4.90 \times 10^6$  eggs·kg<sup>-1</sup> were observed with the red porgy (*Pagrus pagrus*; Mylonas et al. 2004) and sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*; Papadaki et al. 2008), respectively.

### Number of spawning events

Leopard grouper females show group-synchronous ovarian development (Maldonado-García et al. 2018). Group synchronous fish have ovaries with different types of oocytes at the same time. These fish may ovulate once or over many days or weeks during a reproductive cycle. In the present study, 43 and 27 spawning days were observed in 2007 and 2008, respectively, and the number of spawning days per month remained relatively constant (9–13 spawning days per month) except in March 2008. In this month, the leopard groupers began to spawn on 12 March, which resulted in only 5 spawning events in that month.

In general, grouper species that reproduce naturally in captivity spawn several times a month during several months of the year. Natural spawning has been observed in almost all months during 2 consecutive years (Mathew 2010). During the spawning season, the spawning frequency has been observed to increase from 5 to 13 spawns per month (Ranjan et al. 2017). In addition, multiple spawning events were observed between August and October in 2004, with the number of eggs per spawning event ranging from 22,000 to 180,000 (Jagadis et al. 2006). Finally, groupers that had spawned only a few times for 3 consecutive years were able

de peces y no provinieron de datos de los individuos. Sin embargo, los resultados colectivos de todos los estudios sobre este tema permiten visualizar las mejoras que se han producido con el desove natural en comparación con la inducción hormonal. La tasa de fertilización y la fecundación que se han obtenido tras la inducción con hormonas (hCG y LHRHa) en *M. rosacea* son muy variables y oscilan entre  $3 \times 10^3$  y  $571 \times 10^3$  huevos por puesta (Kiewek-Martínez et al. 2010), lo que resultó en la producción de  $3.70 \times 10^6$  huevos viables con 97 hembras y una baja tasa de fertilización. En general, los estudios de la reproducción en la cabrilla sardinera demuestran los beneficios de la reproducción natural dado que, en comparación con la inducción hormonal, la reproducción natural rinde una mayor producción de huevos con un menor número de ejemplares.

La producción de huevos estimada fue de  $288 \times 10^3$  y  $73 \times 10^3$  huevos·kg<sup>-1</sup> en 2007 y 2008, respectivamente. La variación interespecífica en la fecundidad se ha observado con otras especies que presentan mayor fecundidad que la cabrilla sardinera. Por ejemplo, se observó que la fecundidad relativa anual fue mayor que 400,000 huevos·kg<sup>-1</sup> con el pargo rojo, *Pagrus pagrus* (Mylonas et al. 2004), y de 2.80 a  $4.90 \times 10^6$  huevos·kg<sup>-1</sup> con el pargo *Diplodus puntazzo* (Papadaki et al. 2008).

### Número de puestas

Las hembras de cabrilla sardinera presentan desarrollo ovárico sincrónico por grupos (Maldonado-García et al. 2018). Los peces sincrónicos grupales tienen ovarios con distintos tipos de ovocitos al mismo tiempo. Estos peces pueden ovular una vez o durante unos pocos días o semanas en un ciclo reproductivo. En el presente estudio, se observaron 43 días de desove en 2007 y 27 días de desove en 2008, y el número de días de desove por mes se mantuvo relativamente constante (9–13 días de desove por mes) excepto en marzo de 2008. En este mes, los peces comenzaron a desovar el 12 de marzo, lo que dio como resultado solo 5 desoves en ese mes.

En general, las especies de mero que se reproducen de forma natural en cautiverio desovan varias veces al mes durante varios meses del año. El desove natural ha sido observado en casi todos los meses durante 2 años consecutivos (Mathew 2010). Durante la temporada de desove, se ha observado un aumento en la frecuencia de desove de 5 a 13 puestas por mes (Ranjan et al. 2017). Además, se observaron múltiples puestas entre agosto y octubre en 2004, con un número de huevos por puesta que osciló entre 22,000 y 180,000 (Jagadis et al. 2006). Finalmente, se encontró que meros que habían desovado unas cuantas veces al año durante 3 años consecutivos fueron capaces de desovar 2–3 veces al mes durante 4 meses después de que se implementaron cambios a la nutrición de los reproductores (James et al. 1997). Como futura meta de investigación, se deben incorporar organismos reproductores silvestres en los programas



to continuously spawn 2–3 times a month over 4 months after changes to the nutrition of the broodstock were implemented (James et al. 1997). A future research goal should be to incorporate wild-caught reproductive organisms into captive breeding programs to take advantage of their genetic makeup to avoid inbreeding, which can negatively impact subsequent generations (Bright et al. 2016, Superio et al. 2021).

### Time of spawning

The lack of light at the time of courtship and spawning did not allow for direct observations of these 2 actions. However, direct observations throughout the duration of this experiment allowed us to confirm that the first fertilized eggs obtained in the collector appeared just before total darkness between sunset and night. Erisman et al. (2007) studied the spawning behavior of the leopard grouper in the wild and indicated that spawning occurred in the late afternoon a few hours before sunset. Spawning as dark approaches is a regular behavior that has been frequently observed in other species, like the brown grouper (*Epinephelus marginatus*), which was found to spawn one hour before and half an hour after sunset around the new moon period (Zabala et al. 1997). This spawning behavior has also been observed with the Nassau grouper (*Epinephelus striatus*; Whaylen et al. 2004). Spawning amongst 10 to 17 fish was observed in the evening a few days after the full moon (Rowell et al. 2019). Natural spawning in captivity has often been observed during the afternoon, at sunset, and overnight (Jagadis et al. 2006, Mathew 2010, Ranjan et al. 2017), but it can also occur in the morning (James et al. 1997).

### Size of fertilized oocytes

The mean  $\pm$  SD egg diameter from natural spawning was  $864.0 \pm 22.0 \mu\text{m}$  (848.0 to 884.0  $\mu\text{m}$ ). Similar egg diameters have been found via hormonal induction, namely  $859.0 \pm 18.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2005),  $860.0 \pm 30.0 \mu\text{m}$  and  $880.0 \pm 20.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2004a), and  $872.0 \pm 15.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2004b). *Epinephelus merra* eggs were found to be spherical and buoyant with diameters ranging from 710.0 to 730.0  $\mu\text{m}$  (Jagadis et al. 2006). The fertilized eggs of *E. coioides* were round and measured about 857.7  $\mu\text{m}$  (Fouroughifard et al. 2017). In *E. polyphkadion*, egg diameter was  $757.3 \pm 37.4 \mu\text{m}$  (James et al. 1997). It is important to mention that the resulting egg diameter was higher in eggs that were naturally spawned than in those obtained with hormonal induction (Papanikos et al. 2003).

In conclusion, with our methodology, we can ensure constant egg production in captivity with wild-caught fish that are maintained for approximately 2 years without manipulating the parameters that commonly affect fish reproduction. Leopard groupers spawn during 3–4 months and can produce  $184 \times 10^3$  viable eggs  $\cdot \text{kg}^{-1}$ . The spawning season in

de crianza en cautiverio para aprovechar su composición genética y evitar la endogamia, lo que puede impactar de manera negativa las generaciones posteriores (Bright et al. 2016, Superio et al. 2021).

### Época de desove

La falta de luz en el momento del cortejo y el desove no permitió la observación directa de estas 2 acciones. Sin embargo, las observaciones directas a lo largo de este experimento permitieron confirmar que los primeros óvulos fecundados obtenidos en el recolector aparecieron entre la puesta del sol y la noche, justo antes de la oscuridad total. Erisman et al. (2007) estudió el comportamiento de desove de la cabrilla sardinera en su entorno natural e indicó que el desove ocurrió al final de la tarde a pocas horas antes de la puesta del sol. El desove conforme se acerca la oscuridad es un comportamiento regular que se ha observado con frecuencia en otras especies, como el mero *Epinephelus marginatus*, el cual fue observado desovar una hora antes y media hora después de la puesta del sol alrededor del periodo de la luna nueva (Zabala et al. 1997). Este comportamiento de desove también se ha observado con el mero de Nassau, *Epinephelus striatus* (Whaylen et al. 2004). El desove de entre 10 y 17 individuos se observó en el anochecer a pocos días después de la luna llena (Rowell et al. 2019). Los desoves naturales en cautiverio a menudo se han observado durante la tarde, el atardecer y la noche (Jagadis et al. 2006, Mathew 2010, Ranjan et al. 2017), pero también pueden ocurrir por la mañana (James et al. 1997).

### Tamaño de los ovocitos fertilizados

El diámetro medio ( $\pm$ DE) de huevos del desove natural fue de  $864.0 \pm 22.0 \mu\text{m}$  (848.0 a 884.0  $\mu\text{m}$ ). Se han encontrado diámetros de huevo similares mediante la inducción hormonal, a saber:  $859.0 \pm 18.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2005),  $860.0 \pm 30.0 \mu\text{m}$  y  $880.0 \pm 20.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2004a), y  $872.0 \pm 15.0 \mu\text{m}$  (Gracia-López et al. 2004b). Los huevos de *E. merra* fueron descritos como perfectamente esféricos y flotantes, con diámetros que oscilaron entre 710.0 y 730.0  $\mu\text{m}$  (Jagadis et al. 2006). Los huevos fertilizados de *E. coioides* eran redondos y midieron alrededor de 857.7  $\mu\text{m}$  (Fouroughifard et al. 2017). El diámetro de los huevos de *E. polyphkadion* fue de  $757.3 \pm 37.4 \mu\text{m}$  (James et al. 1997). Es importante mencionar que el diámetro de huevo resultante fue mayor en los huevos obtenidos por desove natural que en aquellos obtenidos por inducción hormonal (Papanikos et al. 2003).

En conclusión, con nuestra metodología, podemos asegurar una producción de huevos constante en cautiverio con peces capturados en libertad y mantenidos durante aproximadamente 2 años sin manipular los parámetros que comúnmente afectan la reproducción de los peces. La cabrilla sardinera desova durante 3–4 meses y puede

this study (March to May-June) was related to increases in temperature and the photoperiod, although further studies are needed to confirm the effects of these variables on leopard grouper reproduction. Lastly, the moon phase affected fecundity throughout the spawning season.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project was funded by the Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA) and jointly by Secretaría de Educación Pública and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT). The authors thank Francisco Nieto for coordinating the project on behalf of CONAPESCA, Vanessa Díaz for English language editing, and Alexia Omont for statistical support. All co-authors declare they have no competing interests. Data supporting this study are available from the corresponding author.

## REFERENCES

- Angeles B, Mendo J. 2005. Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindechner) de la costa central del Perú. *Ecología aplicada*. 4(1-2):105-112. <https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.304>
- Bell B, Defouw RJ. 1966. Dependence of the lunar modulation of geomagnetic activity on the celestial latitude of the moon. *J Geophys Res*. 71:951-957.
- Bright D, Reynolds A, Nguyen NH, Knuckey R, Knibb W, Elizur A. 2016. A study into parental assignment of the communal spawning protogynous hermaphrodite, giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Aquaculture*. 459:19-25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.013>
- Carrillo M, Bromage N, Zanuy S, Serrano R, Prat F. 1989. The effects of modifications in photoperiod on spawning time ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 81(3-4):351-365. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90159-2)
- Erisman BE, Buckhorn ML, Hastings PA. 2007. Spawning patterns in the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in comparison with other aggregating groupers. *Mar Biol*. 151:1849-1861. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0623-2>
- Erisman B, Craig MT. 2018. *Mycteroperca rosacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T14053A100466656. [place unknown]: International Union for Conservation of Nature; [accessed 2021 February 09]. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.R.LTS.T14053A100466656.en>.
- Erisman BE, Rosales-Casián JA, Hasting PA. 2008. Evidence of gonochorism in a grouper, *Mycteroperca rosacea*, from the Gulf of California, Mexico. *Environ Biol Fish*. 82:23-33. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9246-1>
- Estrada-Godínez JA, Maldonado-García M, Gracia-López V, Carrillo M. 2011. Reproductive cycle of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets) and evidence of hermaphroditism = Ciclo reproductivo de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en la bahía de La Paz, México. *Cienc Mar*. 37(4):425-441.
- Estrada-Godínez JA, Maldonado-García M, Gracia-López V, Carrillo M, Rebollar-Prudente R, Spanopoulos-Zarco M. 2014. Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la composición bioquímica en Reproductores silvestres de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) = Effect of photoperiod and temperature on the biochemical composition in wild broodstock of sardine cabrilla, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Lat Am J Aquat Res*. 42(1):85-96. <http://doi.org/10.3856/vol42-issue1-fulltext-6>
- Fourooghifard H, Matinfar A, Abdolalian E, Moezzi M, Roohani-Ghadikolae K, Kamali E, Allen S, Zahedi MR. 2017. Egg production and larval rearing of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) using reared broodstocks in Hormozgan Province, Iran. *Iranian J Fish Sci*. 16(3):984-992.
- González-Cuellar OT, Plomozo-Lugo T, Castro-Moreno P, Weaver AH, Álvarez-Flores CM. 2019. Información de los recursos pesqueros, costa sudoriental de Baja California Sur. La Paz (Baja California Sur, Mexico): Sociedad de Historia Natural Niparájá AC y ProNatura Noroeste AC. 68 p.
- Gracia-López V, Kiewek-Martínez M, Maldonado-García M. 2004a. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture*. 237(1-4):485-498. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.018>
- Gracia-López V, Kiewek-Martínez M, Maldonado-García M, Monsalvo-Spencer P, Portillo-Clark G, Civera-Cerecedo R, Linares-Aranda M, Robles-Mungaray M, Mazón-Suástegui JM. 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877). *Aquacult Res*. 36(1):110-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01186.x>
- Gracia-López V, Rodríguez-Romero J, Pérez-Ramírez JM. 2004b. Inducción del desove con HCG y desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) = Hormone Induced spawning (HCG) and embryonic and larval development of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877). *Cienc Mar*. 30(2):279-284. <https://doi.org/10.7773/cm.v30i2.246>
- Grant RA, Chadwick EA, Halliday T. 2009. The lunar cycle: a cue for amphibian reproductive phenology?. *Anim Behav*. 78(2):349-357. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.05.007>
- Jagadis I, Ignatius B, Kandasami D, Khan MA. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquacult Res*. 37(11):1140-1145. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01538.x>

- James CM, Al-Thobaiti SA, Rasem BM, Carlos MH. 1997. Breeding and larval rearing of the camouflage grouper *Epinephelus polyphekadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of the Red Sea coast of Saudi Arabi. *Aquacult Res.* 28(9):671-681. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00908.x>
- Jerez S, Samper M, Santamaria FJ, Villamandos JE, Cejas JR, Felipe BC. 2006. Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture.* 252(2-4):199-207. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.031>
- Kanemaru T, Nakamura M, Murata R, Kuroki K, Horie H, Uchida K, Senthilkumaran B, Kagawa H. 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture.* 358-359:85-91. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.026>
- Kiewek-Martinez M, Gracia-Lopez V, Carrillo-Estevez M. 2010. Comparison of the effects of HCG and LHRHa on the induction of ovulation of wild and captive leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*. *J World Aquacult Soc.* 41(5):733-745. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00415.x>
- Kungvankij P, Tiro LB, Pudadera BP, Potestas IO. 1986. Induced spawning and larval rearing of grouper (*Epinephelus salmoides* Maxwell). In: Maclean JL, Dizon LB, Hosillos LV (eds.), *Proceedings of the First Asian Fisheries Forum.*, May 26-31, 1986. Manila (Philippines): Asian Fisheries Society. p. 663-666.
- Lee WK, Yang SW. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture.* 207(1-2):169-183. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00728-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00728-1)
- Lim LC. 1993. Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus taurina* F. and the brown-marbled grouper *E. fuscoguttatus* F. in Singapore. *J World Aquacult Soc.* 24(2):262-273. <https://doi.org/10.1111/J.1749-7345.1993.TB00015.X>
- Luo Z, Liu Y, Mai K, Tian L. 2005. Advances in the study on nutrient requirements of grouper (*Epinephelus* sp.): a review. *J Ocean Univ China (English Edition).* 4:93-98. <http://doi.org/10.1007/s11802-005-0001-y>
- Maldonado-García M, Gracia-López V, Kiewek-Martínez M, Carrillo M, Zanuy S. 2018. Reproductive cycle of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) held in captivity: relationship between gonad development and sex steroid concentration. *Lat Am J Aquat Res.* 46(1):83-90. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-10>
- Martínez-Lagos R, Gracia-López V. 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquacult Res.* 41:120-128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02313.x>
- Martínez-Lagos R, Tovar-Ramírez D, Gracia-López V, Lazo JP. 2014. Changes of digestive enzyme activities during larval development of leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish Physiol Biochem.* 40(3):773-785. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9884-5>
- Mathew G. 2010. Spontaneous spawning of *Epinephelus taurina* (Forsk.) in captivity. *J Mar Biol Ass India.* 52(1):14-18.
- Mustafa S, Hajini MH, Senoo S, Kian AYS. 2015. Conditioning of broodstock of tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, in a recirculating aquaculture system. *Aquacult Rep.* 2:117-119. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.09.004>
- Mylonas CC, Papadaki M, Pavlidis M, Divanach P. 2004. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pargus pargus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture.* 232(1-4):637-649. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00534-9](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00534-9)
- Mylonas CC, Zohar Y. 2001. Use of GnRH-a-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish.* 10:463-491. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012279814708>
- Ofelio C, Guarniero I, Cariani A, Viroli C, Bonaldo A, Gatta PP, Parma L. 2020. Monitoring of common sole *Solea solea* (L) captive broodstock from Northern Adriatic Sea over consecutive spawning seasons. *Aquacult Rep.* 18(2020):100495. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100495>
- Okumura S, Okamoto K, Oomori R, Nakazono A. 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Aquaculture.* 206(3-4):165-173. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00722-0](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00722-0)
- Papadaki M, Papadopoulou M, Siggelakia I, Mylonas CC. 2008. Egg and sperm production and quality of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. *Aquaculture.* 276(1-4):187-197. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.033>
- 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(1-4):487-488. <http://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030636.08228.4e>
- Peláez-Mendoza AK. 1997. Hábitos alimenticios de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* Streets, 1877 (Pisces: Serranidae) en la Bahía de La Paz BCS y zonas adyacentes [BSc thesis]. [La Paz (BCS, Mexico)]: Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). 71 p.
- Pérez-Rojo MP. 2016. Hábitos alimentarios de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877), en Santa Rosalía, BCS, México [MSc thesis]. [La Paz (BCS, Mexico)]: Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 65 p.
- Ranjan R, Megarajan S, Xavier B, Dash B, Ghosh S, Menon M, Edward LL. 2017. Conditioning, maturation and year-round natural spawning of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) in recirculating aquaculture system. *Aquacult Res.* 48(12):5864-5873. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/are.13409>
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-López V, Barbosa-Solomieu V. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture.* 280(1-4):39-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056>
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-López V, Barbosa-Solomieu V, Esteban MA. 2011. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult Res.* 42(11):1676-1686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02762.x>
- Rimmer MA, Glamuzina B. 2019. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. *Rev Aquacult.* 11:58-87. <https://doi.org/10.1111/raq.12226>
- Rowell TJ, Aburto-Oropeza O, Cota-Nieto JJ, Steele MA, Erisman BE. 2019. Reproductive behaviour and concurrent sound production of Gulf grouper *Mycteroperca jordani* (Epinephelidae) at a spawning aggregation site. *J Fish Biol.* 94(2):277-296. <https://doi.org/10.1111/jfb.13888>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. Boston, MA: RStudio, PBC; accessed 24 August 2022. <http://www.rstudio.com/>.

- Sala E, Aburto-Oropeza O, Paredes G, Thompson G. 2003. Spawning aggregations and reproductive behavior of reef fishes in the Gulf of California. *Bull Mar Sci.* 72(1):103-121.
- Sala E, Aburto-Oropeza O, Reza M, Paredes G, López-Lemus LG. 2004. Fishing down coastal food webs in the Gulf of California. *Fisheries.* 29(3):19-25.  
[http://doi.org/10.1577/1548-8446\(2004\)29\[19:FDCFWI\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1577/1548-8446(2004)29[19:FDCFWI]2.0.CO;2)
- Stolov HL. 1965. Further investigations of a variation of geomagnetic activity with lunar phase. *J Geophys Res.* 70:4921-4926.  
<https://doi.org/10.1029/JZ070i019p04921>
- Superio J, Fakriadis I, Tsigenopoulos CS, Lancerotto SA, Rodriguez AV, Vervelakis E, Mylonas CC. 2021. Spawning kinetics and parentage contribution of European sea bass (*S*) broodstocks, and influence of GnRH $\alpha$ -induced spawning. *Aquacult Rep.* 21:100766.  
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100766>
- Toledo JD, Nagai A, Javellana D. 1993. Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. *Aquaculture.* 115(3-4):361-367.  
[http://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90149-S](http://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90149-S)
- Tucker JW Jr. 1994. Spawning by captive Serranid fishes: a review. *J World Aquacult Soc.* 25(3):345-359.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00218.x>
- Whaylen L, Pattengill-Semmens, Semmens BX, Bush PG, Boardman MR. 2004. Observations of a Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, spawning aggregation site in Little Cayman, Cayman Islands, including multi-Species spawning information. *Environ Biol Fish.* 70:305-313.  
<https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000033341.57920.a8>
- Zabala M, Garcia-Rubies A, Louisy P, Sala E. 1997. Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae), in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci Mar.* 61(1):65-77.
- Zanuy S, Prat F, Carrillo M, Bromage NR. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 $\beta$ -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour.* 8(2):147-152.  
<http://dx.doi.org/10.1051/alr:1995011>
- Zohar Y, Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture.* 197(1-4):99-136.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00584-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00584-1)