

Niveles plasmáticos de hormona luteinizante en machos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)
alimentados con dietas con distinta composición en ácidos grasos

Luteinizing hormone plasma levels in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) feeding diets
with different fatty acid composition

José María Navas^{1*}

Evaristo Mañanós²

Jesús Ramos²

Silvia Zanuy²

Manuel Carrillo²

¹ INIA, Departamento de Medio Ambiente
A6 Km. 7,
28040, Madrid, España

² Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC)
E-12595 Torre de la Sal
Castellón, España

* E-mail: jmnavas@inia.es

Recibido en abril de 2003; aceptado en febrero de 2004

Resumen

Se estudió el efecto de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre los niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH) y sobre el porcentaje de machos espermiantes de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) en el ciclo reproductor. El grupo control recibió una dieta natural (boga, *Boops boops* L., troceada). Otros dos grupos recibieron pienso con 10% o 22% de lípidos (grupos 10% y 22% respectivamente). El pienso con 22% de lípidos se obtuvo sumergiendo el de 10% en un aceite refinado de pescado rico en ácidos grasos de la serie *n*-3. El grupo control mostró los porcentajes más altos de machos espermiantes, con valores cercanos a 100% entre diciembre y marzo. Este signo de elevada eficacia reproductora estuvo asociado con los valores más altos de LH, que aumentaron desde noviembre hasta febrero. En el grupo alimentado con 10% de lípidos el porcentaje de machos espermiantes fue mayor de 75% sólo entre enero y marzo. En este grupo, los niveles plasmáticos de LH se mantuvieron bajos a lo largo de toda la estación reproductora, siendo en febrero significativamente más bajos que los observados en el grupo control. El grupo alimentado con 22% mostró en general porcentajes de machos espermiantes menores a los observados en el grupo control, pero mayores a los del grupo de 10%. En el grupo 22%, los niveles plasmáticos de LH fueron significativamente más bajos que en el grupo control en diciembre. Las diferencias observadas en las concentraciones plasmáticas de LH entre grupos no están claramente asociadas con diferencias en la composición de ácidos grasos de la dieta, lo que sugiere que en los machos de lubina los ácidos grasos de la dieta tienen una influencia más moderada sobre la producción y liberación de LH que en las hembras.

Palabras clave: hormona luteinizante, gonadotropina, lubina, ácido graso.

Abstract

This work analyzes the plasma level variations of luteinizing hormone (LH) during the reproductive cycle and the percentage of spermiating European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) males fed diets containing different percentages of lipids. The control group was fed with a natural diet consisting of trash fish (*Boops boops* L.). Two experimental groups were fed with pelleted diets containing different amounts of lipids: one group was fed with a commercially available diet with 10% lipid content (called group 10%), and another group was fed with this base diet enriched to a 22% lipid content using refined fish oil enriched in *n*-3 fatty acids (called group 22%). The control group exhibited the highest percentages of spermiating males, with values close to 100% from December to March. This good reproductive performance was associated with the highest LH plasma levels, which increased from November to February. In group 10%, the percentage of spermiating males was higher than 75% only between January and March, and plasma levels of LH were low during the reproductive season and significantly lower in February than in the control group. Group 22% also exhibited lower percentages of spermiating males than the control group, but higher than those observed in group 10%; LH plasma levels in this group were significantly lower in December than those observed for the control group. Differences in LH plasma levels between groups are not clearly associated with differences in the fatty acid composition of the diets. These results suggest that dietary fatty acids do not affect LH plasma levels in male European sea bass as strongly as previously reported in females.

Key words: luteinizing hormone, gonadotropin, sea bass, fatty acid.

Introducción

En muchas especies de teleósteos se han descrito los ciclos estacionales de actividad gonadal. La asociación de los cambios en el desarrollo gonadal con los niveles plasmáticos de esteroides gonadales y de gonadotropinas ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para el estudio del control endocrino de la reproducción en teleósteos. Diversas revisiones han puesto de relieve la extraordinaria importancia de las gonadotropinas en la regulación de los procesos reproductores (Swanson, 1991; Nagahama, 1994; Kah *et al.*, 1997). Durante muchos años se pensó que la hipófisis de los peces contenía un único tipo de gonadotropina, denominada gonadotropina maduracional, la cual regularía todo el proceso de la reproducción (Burzawa-Gerard, 1982). Al final de los años ochenta varios trabajos realizados en salmónidos parecían indicar la presencia de dos gonadotropinas diferentes (Suzuki *et al.*, 1988a, 1988b). La hormona foliculo estimulante (FSH, previamente denominada GTH I, Quérat, 1994) se libera durante el periodo de crecimiento gonadal y estimula la producción folicular de 17 β -estradiol (E2) y testosterona (T) (Prat *et al.*, 1996; Nagahama, 1994). Por su parte, la LH (antes denominada GTH II, Quérat, 1994) regula el final de la maduración gonadal, la ovulación y la espermiación. La falta de inmunoensayos para determinar los niveles de FSH ha hecho que la información sobre las variaciones estacionales de las concentraciones plasmáticas de esta hormona estén limitadas a los salmónidos.

Un ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para LH desarrollado para especies de moronidae (Mañanós *et al.*, 1997) permitió describir las modificaciones experimentadas por la concentración plasmática de LH a lo largo del ciclo reproductor en las hembras de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) (Navas *et al.*, 1998). En las hembras, los niveles plasmáticos de LH aumentaron a lo largo del periodo de puesta y alcanzaron un máximo en el punto medio de este periodo de puesta. Estas observaciones sugieren que la LH juega un papel fundamental en el control de la ovulación en la lubina. Además, también se estudió la influencia de la composición en ácidos grasos de las dietas administradas a los reproductores de lubina sobre las concentraciones plasmáticas de E2 y LH (Navas *et al.*, 1998). Las hembras alimentadas con dietas artificiales mostraron niveles plasmáticos de E2 y LH mayores que los de las hembras alimentadas con boga (*Boops boops* L.) troceada. Estos resultados indicaron que la composición en ácidos grasos de la dieta puede influir sobre los niveles plasmáticos de E2. También se observó una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de E2 y de LH, lo que se atribuyó a una retroalimentación positiva causada por el E2 sobre la producción y liberación de LH en la hipófisis.

Varios trabajos han mostrado la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre la eficacia reproductora de las hembras de lubina. Se ha observado que la composición en ácidos grasos de la dieta afecta a la composición en ácidos grasos de los huevos y, con ello, a su calidad. Los ácidos grasos de la serie *n*-3, en particular el docosahexaenoico (DHA, 22:6

Introduction

Seasonal cycles of gonadal activity have been described for many teleost species. The association of changes in gonadal condition with plasma levels of gonadal steroids and gonadotropins has proven to be a valuable tool in the study of endocrine control of reproduction in teleosts. The paramount importance of gonadotropins in the regulation of reproductive processes has been extensively reviewed (Swanson, 1991; Nagahama, 1994; Kah *et al.*, 1997). For many years, it was believed that the pituitary of fish contained a single gonadotropin, called maturational gonadotropin, which regulated all processes of reproduction (Burzawa-Gerard, 1982). In the late 1980s, works on salmonid species showed the existence of two distinct gonadotropins (Suzuki *et al.*, 1988a, 1988b): follicle stimulating hormone (FSH, previously named GTH I, Quérat, 1994) is released during the period of gonadal growth and stimulates the follicular production of 17 β -estradiol (E2) and testosterone (T) (Prat *et al.*, 1996; Nagahama, 1994), whereas luteinizing hormone (LH, previously named GTH II, Quérat, 1994) regulates final gonadal maturation, ovulation and spermiation. The unavailability of FSH immunoassays for other teleosts has restricted the information about plasma seasonal variations of this hormone to salmonids.

In Moronidae species, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to measure LH (Mañanós *et al.*, 1997). Using ELISA, the LH plasma concentration variations during the reproductive cycle in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) females was described (Navas *et al.*, 1998). LH plasma levels increased strongly during the spawning period and peaked in the middle of the spawning period. These observations suggested an important role of this hormone in the control of ovulation. In addition, the influence of the fatty acid composition of diets administered to broodstock on plasma E2 and LH levels was studied (Navas *et al.*, 1998). It was observed that females fed artificial diets exhibited significantly higher plasma levels of E2 and LH than females fed a natural diet consisting of trash fish (*Boops boops* L.). The results obtained were indicative of the influence of the diet's fatty acid composition on E2 plasma levels. A direct relationship was observed between E2 and LH plasma concentration that was attributed to effects of steroid feedback on LH production and release. However, in that study no direct influence of dietary fatty acids on LH secretion was suggested.

Several works carried out on European sea bass, mainly females, have demonstrated that the fatty acid composition of the diet clearly affects reproductive performance. It has been observed that dietary fatty acid composition influences egg fatty acid composition, affecting egg quality. In particular, *n*-3 fatty acids, especially docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 *n*-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 *n*-3), appear to have a deep influence on egg quality (Thrush *et al.*, 1993; Bell *et al.*, 1997; Navas *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999). In males it has been observed that feeding diets enriched in polyunsaturated

n-3) y el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 *n*-3), parecen tener una profunda influencia sobre la calidad de los huevos (Thrush *et al.*, 1993; Bell *et al.*, 1997; Navas *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999). En los machos se ha observado que la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) aumenta la capacidad reproductiva mediante un aumento del volumen de esperma y de la movilidad de los espermatozoides (Asturiano *et al.*, 2001). Sin embargo no se han realizado estudios sobre el efecto de la nutrición en la regulación hormonal de la reproducción en machos.

El objetivo de este trabajo fue determinar si variaciones en la composición en ácidos grasos de las dietas administradas a lubinas en edad reproductora afecta a las concentraciones plasmáticas de LH a lo largo del ciclo reproductor de los machos y comparar los efectos que se observaran con los que se describieron previamente para hembras (Navas *et al.*, 1998).

Material y métodos

Peces y tratamientos nutricionales

En el experimento se utilizaron noventa lubinas de 5 años de edad (1327.1 ± 39.8 g y 46.2 ± 0.4 cm) que habían sido criadas en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (costa este de España, 40°N 0°). Las lubinas se mantuvieron en tanques rectangulares de $4 \times 2 \times 1.5$ m³ con 8000 L de agua marina (37.8‰ de salinidad) en flujo continuo, bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura. Todos los peces recibieron diariamente una ración correspondiente a 0.7% de su peso corporal entre diciembre y marzo (periodo de puesta), y una ración de 1.8% de su peso corporal entre julio y septiembre (periodo de reposo reproductor). El experimento comenzó en abril (periodo de post-puesta) y duró 14 meses, para cubrir completamente un ciclo reproductor anual.

Los peces se dividieron en tres grupos de 20 a 26 peces con una proporción machos:hembras de 3:2. Igual que en experimentos anteriores (Bell *et al.*, 1996; Cerdá *et al.*, 1994; Navas *et al.*, 1998), uno de los grupos se alimentó con boga troceada y sirvió como control. Los otros grupos se alimentaron con dietas formuladas que contenían distintas cantidades de lípidos (tabla 1). Así, un grupo se alimentó con una dieta comercial para lubina que contenía un 10% de lípidos (Fulmar, Scotland); y el otro se alimentó con la misma dieta comercial, pero los granos de pienso fueron sumergidos en un aceite refinado de pescado (Super Selco, Artemia Systems, Bélgica) con una concentración elevada de PUFA de la serie *n*-3, particularmente 22:6 *n*-3. De ese modo la cantidad total de lípidos en el pienso que recibió este otro grupo se elevó hasta un 22%.

La composición de la dieta comercial de Fulmar aparece en la tabla 1. La composición en ácidos grasos de los lípidos de la dieta aparece en la tabla 2. Los lípidos totales se extrajeron utilizando el método de Folch *et al.* (1957) y se determinaron por gravimetría. La derivatización de los lípidos totales a ésteres de metilo se llevó a cabo tratando 250 mg de los lípidos extraídos con ácido sulfúrico al 1% en metanol y tolueno (2:1 v:v) a 40°C durante 16 h (Christie, 1982). Los ésteres se purificaron

fatty acids (PUFA) enhanced reproductive performance (Asturiano *et al.*, 2001) by increasing milt volumes and milt spermatozoa density. However, studies on the nutritional factors affecting reproductive performance in male fish and particularly works regarding the effects on male hormonal regulation of reproduction are scarce.

The objective of this work was to determine if diets with different fatty acid composition affect the variations of LH plasma levels during the reproductive cycle in European sea bass males and to compare the effects observed with those previously described for females (Navas *et al.*, 1998).

Material and methods

Fish and feeding treatments

Ninety 5-year-old male and female European sea bass (1327.1 ± 39.8 g and 46.2 ± 0.4 cm) were reared at the Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (east coast of Spain, 40°N 0°). Fish were kept in $4 \times 2 \times 1.5$ m³ rectangular 8000-L tanks, supplied with aerated flow-through sea water (37.8‰ salinity) and maintained under natural conditions of photoperiod and temperature. All fish were fed daily at a rate of 0.7% of their body weight from December to March (spawning period), at a rate of 1.8% from July to September (resting period) and at a rate of 1.2% the remainder of the year. The experiment started in April (post-spawning period) and lasted for 14 months in order to incorporate a complete reproductive period.

Fish were divided into three groups of 20 to 26 fish, containing both males and females (3:2 ratio, males:females). One group was fed with a diet consisting of trash fish and, as in previous experiments (Cerdá *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1996; Navas *et al.*, 1998), this diet served as control. The other two groups were fed with formulated diets containing different amounts of lipids (table 1). One group was fed with a commercial diet for sea bass, containing 10% lipids (Fulmar, Scotland) and will henceforth be called group 10%. Another group was fed with the same commercial diet soaked in a refined fish oil (Super Selco, Artemia Systems, Belgium), with an enhanced concentration of *n*-3 PUFA, particularly 22:6 *n*-3, to elevate the

Tabla 1. Composición nutricional (%) de la dieta natural (*Boops boops* L.), grupo Control, y de las dietas artificiales, grupos 10% y 22%.

Table 1. Nutritional composition (%) of the natural diet (*Boops boops* L.), control group, and of the pelleted diets, groups 10% and 22%.

	Dietas		
	Control	Grupo 10%	Grupo 22%
Peso seco (%)	23	91	92
Proteínas	71	60	53
Carbohidratos	No detectado	19	16
Lípidos	20	10	22
Cenizas	9	10	9

Tabla 2. Composición porcentual de ácidos grasos de la fracción lipídica de la dieta natural (*Boops boops* L.), grupo Control, y de las dietas artificiales, grupos 10% y 22%. * Incluye más de un monoeno.

Table 2. Percentage fatty acid composition of the lipidic fraction of the natural diet (*Boops boops* L.), control group, and of the pelleted diets, groups 10% and 22%. * Includes more than one monoene.

	Dietas		
	Control	Grupo 10%	Grupo 22%
14:0	1.9	4.6	4.5
16:0	20.1	15.0	13.4
16:1 <i>n</i> -7	4.1	4.9	5.3
18:0	8.3	3.0	2.5
18:1*	10.3	16.3	12.7
18:2 <i>n</i> -6	2.6	9.8	6.9
18:3 <i>n</i> -3	0.6	2.0	1.5
20:1*	1.8	6.8	4.8
20:4 <i>n</i> -6 (AA)	4.6	0.6	0.8
20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	6.7	7.2	11.6
22:1*	0.6	10.4	6.8
22:6 <i>n</i> -3 (DHA)	22.1	9.1	17.4
PUFA totales	44.6	35.1	46.8
<i>n</i> -3 totales	34.6	24.3	38.4
<i>n</i> -6 totales	10.0	10.8	8.4
Relación <i>n</i> -3: <i>n</i> -6	3.5	2.3	4.5
Relación DHA:EPA	0.7	0.1	0.1
Relación AA:EPA	3.3	1.3	1.5

por cromatografía en capa fina y, finalmente, se llevó a cabo el análisis de ácidos grasos utilizando un cromatógrafo de gases Packard 436 tal y como detallan Tocher *et al.* (1985).

Muestreos

A lo largo del experimento se llevaron a cabo muestreos mensuales anestesiando los peces con metanosulfonato de 3-(etoxicarbonil) anilina (metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo) (MS-222) a una concentración de 0.1 g L⁻¹, tras un día de ayuno. En los machos, después de limpiar el área genital con agua fresca, se determinó la presencia de esperma mediante un ligero masaje abdominal. Se extrajo sangre de los vasos caudales mediante una jeringa heparinizada, siempre en el mismo momento del día (entre las 10 y las 14 horas). A partir de la sangre se obtuvo plasma por centrifugación (1500 g durante 30 minutos a 4°C), el cual fue alicuotado y guardado a -20°C hasta su análisis.

Los huevos de las lubinas son pelágicos y, en cautividad, machos y hembras liberan oocitos y esperma espontáneamente en los tanques. La presencia de huevos en los tanques se determinó diariamente observando si había huevos en unas

content of lipids to the maximum amount of 22%, and will be called group 22%.

Diet composition was provided by Fulmar and is shown in table 1. The fatty acid composition of the dietary lipids is shown in table 2. Total lipids were extracted using Folch *et al.*'s (1957) method and determined gravimetrically. Derivatization of total fatty acids to methyl esters was performed using 250 µg of total extracted lipids with 1% sulphuric acid in methanol and toluene (2:1 v/v) at 40°C for 16 h (Christie, 1982). The esters were purified by thin layer chromatography prior to analysis using a Packard 436 gas chromatograph, as detailed by Tocher *et al.* (1985).

Sampling procedure

During the experimental period, samples were obtained at monthly intervals from fish anesthetized with ethyl-m-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222) at 0.1 g L⁻¹, after one day of fasting. In males, after cleaning the genital area with fresh water, the presence of expressible milt was determined by applying gentle abdominal pressure. Blood samples were always collected at the same time of day (between 10:00 and 14:00). Blood was withdrawn from the caudal vessels with a heparinized syringe and dispensed in ice-cold heparinized tubes. Plasma was obtained by centrifugation (1500 g for 30 min at 4°C), aliquoted and stored at -20°C until analysis.

Sea bass are pelagic spawners and during the spawning season, females and males spontaneously released their ova and sperm into the tanks. Presence of eggs in conical mesh traps placed across the out-flow of each tank was checked daily. The period between the first and the last spawning was considered the spawning season, and the mean spawning time was calculated using a value equal to the mean number of days passed between the first and successive spawnings (Zanuy *et al.*, 1995). Although spawning performances of the different groups have been published (Navas *et al.*, 1998), the spawning period and the mean spawning time are used here for comparative purposes.

Plasma luteinizing hormone analysis

Plasma LH levels were determined using a heterologous ELISA, according to Mañanós *et al.* (1997). The primary antibodies used in the assay were obtained against the β sub-unit of the hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *chrysops*) LH, and the intact LH from the same hybrid was used for the standard curve. The range of the standard curve was 156 to 5000 pg mL⁻¹, corresponding to 85% to 20% of binding, respectively. This method has been previously validated for European sea bass and used for the analysis of LH plasma levels in females (Navas *et al.*, 1998).

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard error of the mean (s.e.m.). Significant differences between groups were deter-

pequeñas redes cónicas que se colocaron a la salida de los tanques. El periodo entre la primera y la última puesta se considera como la “estación de puesta”. El “punto medio de puesta” se calculó utilizando un valor igual a la media del número de días que pasaron entre la primera y las siguientes puestas (Zanuy *et al.*, 1995). Previamente se han publicado diversos datos relativos a las puestas de estos grupos (Navas *et al.*, 1998).

Análisis de la concentración plasmática de LH

Los niveles plasmáticos de LH se determinaron mediante un ELISA heterólogo de acuerdo al método de Mañanós *et al.* (1997). Los anticuerpos primarios utilizados en el ensayo eran anticuerpos dirigidos contra la subunidad β de la LH del híbrido (*Morone saxatilis* $\times$ *chrysops*), y la LH intacta del mismo híbrido se utilizó para la curva estándar. El rango de la curva estándar abarcó desde 156 hasta 5000 pg mL⁻¹, que correspondieron desde 85% hasta 20% de unión (*binding*), respectivamente. Este método se ha validado previamente para lubina y se ha usado para el análisis de LH en el plasma de hembras (Navas *et al.*, 1998).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (s.e.m.). La presencia de diferencias significativas entre grupos se estableció utilizando el programa Sigma Stat de Jandel Scientific (San Rafael, CA). Este programa determina automáticamente la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov Smirnov, y la homogeneidad de las varianzas observando la variabilidad del grupo de medias. Puesto que los datos resultaron ser no paramétricos se aplicó el test de Kruskal-Wallis tanto a los resultados de puesta como a los de los análisis hormonales; y a continuación se aplicó el test de Dunns para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $P < 0.05$.

Resultados

Los porcentajes de machos espermiantes se muestran en la figura 1. En el grupo control, el 100% de los machos fueron espermiantes en diciembre y enero. Este porcentaje disminuyó hasta alrededor de un 85% en febrero y marzo, y alrededor de un 75% en abril. En el grupo alimentado con el 10% de lípidos, el porcentaje de machos espermiantes fue de aproximadamente el 25% en diciembre, aumentando hasta un 100% en enero y oscilando alrededor de 80% en febrero y marzo. En abril no se detectaron machos espermiantes en este grupo. El grupo alimentado con un 22% mostró aproximadamente el 80% de machos espermiantes en diciembre. Este porcentaje aumentó a un 100% en enero y estuvo cercano al 80% en febrero y marzo, descendiendo hasta aproximadamente el 50% en abril.

El periodo de puesta se representa como una barra horizontal en la base del gráfico de concentraciones de LH (fig. 2). En todos los grupos, las puestas comenzaron en la segunda mitad de diciembre y finalizaron en los últimos días de marzo (grupo

mined using the Sigma Stat software from Jandel Scientific (San Rafael, California). The program automatically tests the normality of the data, using the Kolmogorov Smirnov test, and the equal variance, by checking the variability of the group means. Data were non-parametric; hence, the Kruskal-Wallis test was applied to the spawning and hormonal analysis results, followed by Dunn's multiple comparisons test. Significant differences were accepted at $P < 0.05$.

Results

The percentages of spermiating males in all the groups are shown in figure 1. The control group showed 100% of spermiating males in December and January. This percentage was around 85% in February and March, and around 75% in April. In group 10%, the percentage of spermiating males was approximately 25% in December, increasing to 100% in January and oscillating around 80% in February and March. In April no males were spermiating in this group. Group 22% exhibited approximately 80% of spermiating males in

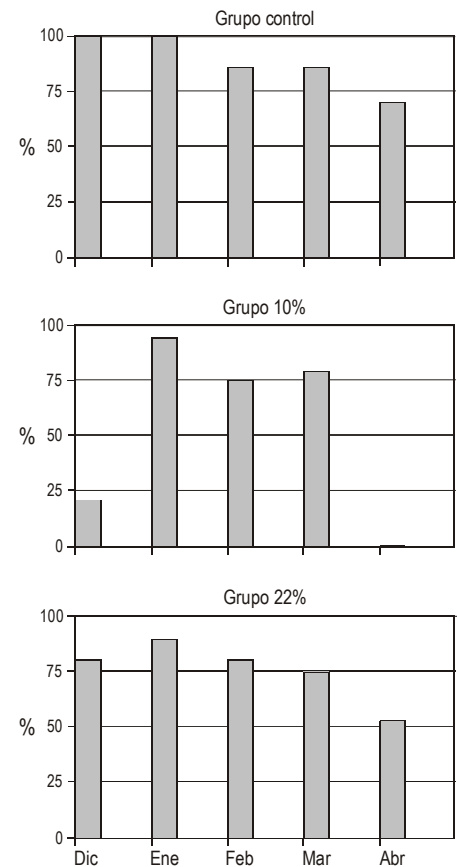


Figura 1. Porcentaje de machos de lubina espermiantes alimentados con una dieta natural (grupo control), o con una dieta comercial con 10% ó 22% de lípidos (grupo 10% y grupo 22%, respectivamente).

Figure 1. Percentage of spermiating sea bass males fed a natural diet (control), or a commercial diet containing 10% or 22% of lipids.

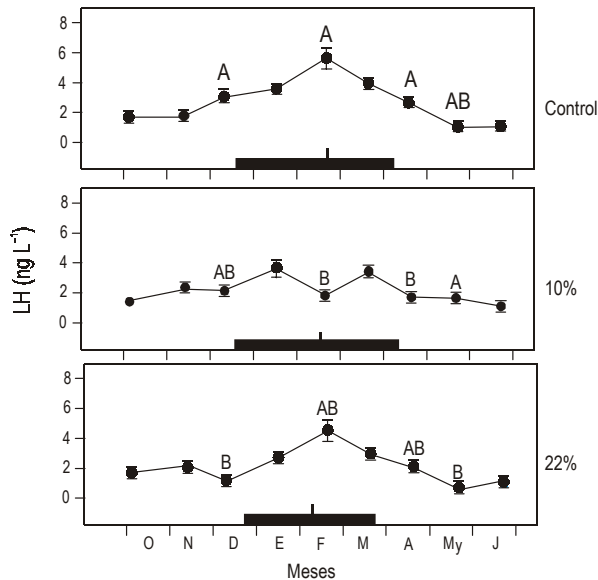


Figura 2. Niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH) a lo largo del ciclo reproductor en machos de lubina alimentados con una dieta natural (control) o con dietas comerciales (con 10% de lípidos y 22% de lípidos). Las barras horizontales en la base de cada gráfico representan el periodo de puesta y la barrita vertical indica el punto medio de puesta. Los datos corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. ($n = 5$ a 9 peces/punto de muestreo). Letras diferentes señalan diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).
Figure 2. Plasma luteinizing hormone (LH) levels during the reproductive cycle of male sea bass fed a natural diet (control) and different pelleted diets (10% lipid and 22% lipid diets). Horizontal bars at the bottom of each graph represent the spawning period in each group and arrows indicate the mid-spawning time. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 5$ to 9 fish/sampling point). Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

22%) o a inicios de abril (grupos control y 10%). El punto medio del periodo de puesta, marcado como una línea vertical en las mismas gráficas, se observó alrededor de mitad de febrero.

El perfil anual de los niveles plasmáticos de LH a lo largo del ciclo reproductivo de todos los grupos se representa en la figura 2. En el grupo control las concentraciones de LH fueron bajas en octubre y noviembre, aumentaron gradualmente en diciembre y enero, y alcanzaron un pico en febrero, coincidiendo con el punto medio del periodo de puesta. Después descendieron a lo largo de marzo y abril hasta los valores basales observados en mayo. En el grupo 10% las concentraciones plasmáticas de LH a lo largo del ciclo reproductivo mostraron una tendencia similar a las del grupo control, pero en febrero se observó un fuerte descenso de los niveles plasmáticos de LH hasta alcanzar valores similares a los que se observaron fuera de la época reproductora (es decir en octubre o mayo). Como consecuencia, los niveles plasmáticos de LH en febrero fueron significativamente menores en el grupo 10% que en el grupo control. El grupo 10% también mostró en abril una concentración plasmática de LH significativamente más baja que la de los animales controles. El grupo 22% presentó concentraciones plasmáticas de LH similares a las del control, con la única

December. This percentage increased to 100% in January and was close to 80% in February and March, decreasing to approximately 50% in April.

The spawning period is represented as a horizontal bar in the base of the plasma LH concentration graphs (fig. 2). In all groups, spawning began in the second half of December and ended at the end of March (group 22%) or beginning of April (control and group 10%). The mid-spawning time, marked as a vertical line in the same graphs, appeared around the middle of February.

The annual profile of LH plasma levels throughout the reproductive cycle of all groups is represented in figure 2. In the control group, plasma LH concentrations were low in October and November, gradually increased in December and January to peak in February, coincident with the mean spawning time, and decreased in March and April to the basal levels observed in May. In group 10%, plasma LH concentrations exhibited a similar tendency as the control group, but a sharp decrease of LH plasma levels to values similar to those observed outside the reproductive season (i.e., October or May) was observed in February. Consequently, plasma LH values in February were significantly lower in group 10% than in the control group. Moreover, in April this group exhibited significantly lower plasma LH levels than the control animals. Group 22% showed similar plasma LH concentrations as those observed in the control group, except in December, exhibiting in this month significantly lower plasma levels than those of the latter group.

Discussion

Most studies on the hormonal regulation of reproduction in fish, and particularly in European sea bass, have concentrated on females. In contrast, research on the regulation of spermatogenesis and spermiation in male fish has been neglected. Nevertheless, hormonal differences between sexes, particularly the very low or absent plasma levels of the key female hormone E2 in males, can be an important tool in comparative studies that would permit the advance of knowledge in this field. Following this reasoning, this work presents, for the first time, the profile of LH plasma levels during the reproductive cycle in European sea bass males.

In the present experiment, LH plasma levels in males were above basal values from December to April, i.e., throughout the spermiating period, and peaked in February (except in group 10%), coincident with the middle of this period. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) males, LH plasma levels increased at the time of spermiation, suggesting that LH is involved in the control of later stages of spermatogenesis (Prat *et al.*, 1996). In European sea bass females, maximum concentrations of LH were also observed in February, coinciding with the mean spawning time (Navas *et al.*, 1998), but increases in LH plasma levels were observed only during the spawning period, i.e., from January to March (Navas *et al.*, 1998). In salmonid females, LH plasma levels exhibit a sharp increase in the pre-spawning period, reaching maximal levels

excepción de diciembre, mes en el que las concentraciones de LH fueron significativamente más bajas que en los controles.

Discusión

La mayor parte del trabajo realizado acerca de la regulación hormonal de la reproducción en peces, y particularmente en la lubina, se ha concentrado en las hembras. Por el contrario, la investigación sobre la regulación de la espermatogénesis y la espermiación en los machos se ha descuidado. Esto es especialmente grave si se tiene en cuenta que las diferencias hormonales entre sexos, y en particular las bajas concentraciones o incluso total ausencia de E2 en los machos, puede usarse como una herramienta muy eficiente en estudios comparativos, lo que permitiría realizar avances importantes en el campo de la endocrinología de peces. Siguiendo este razonamiento, este trabajo presenta por primera vez el perfil de los niveles plasmáticos de LH a lo largo del ciclo reproductivo de los machos de lubina.

En este experimento, los niveles plasmáticos de LH en los machos estuvieron por encima de los niveles basales entre diciembre y abril, es decir a lo largo del periodo de espermiación, y el máximo se alcanzó en febrero (con excepción del grupo 10%), coincidiendo con el punto medio del periodo de puesta. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) los niveles plasmáticos de LH en los machos aumentan durante la espermiación, lo que sugiere que esta hormona está implicada en el control de los estadios tardíos de la espermatogénesis (Prat *et al.*, 1996). En las hembras de la lubina las concentraciones máximas de LH se observaron en febrero, en el punto medio del periodo de puesta (Navas *et al.*, 1998), pero desde enero a marzo, a lo largo de todo el periodo de puesta, se observaron niveles elevados de LH (Navas *et al.*, 1998). En las hembras de salmónidos los niveles plasmáticos de LH muestran un incremento en el periodo de prepuesta, alcanzando niveles máximos en los estadios de ovulación y postovulación (Suzuki *et al.*, 1988 b; Swanson, 1991; Prat *et al.*, 1996). En una especie que, igual que la lubina presenta un ovario de tipo sincrónico por grupos, como el carpín (*Carassius auratus* L.), el crecimiento oocitario tiene lugar con niveles bajos de LH en plasma, produciéndose un fuerte incremento de esta hormona en el momento de la ovulación (Kobayashi *et al.*, 1987, 1988). Las variaciones que se han observado en las concentraciones plasmáticas de LH en los machos a lo largo de la estación reproductora, junto con el hecho de que el periodo en que aparecen concentraciones altas de LH en machos es más amplio que en hembras, sugieren que la LH es también importante en la lubina, al igual que en otras especies de peces, en el control de la maduración final de los gametos y en la espermiación/ovulación.

Las diferencias en las concentraciones plasmáticas de LH que se detectaron en diciembre en el grupo 22% con respecto a los controles probablemente son debidas a variaciones puntuales en el estatus fisiológico del pez en un momento dado. En los machos de peces de muchas especies, la T y la 11-ceto-testosterona (11KT) regulan la producción y liberación

at ovulatory and post-ovulatory stages (Suzuki *et al.*, 1988b; Swanson, 1991; Prat *et al.*, 1996). In goldfish (*Carassius auratus* L.) females, which present a group-synchronous ovary like the European sea bass, oocyte growth occurs under low plasma LH levels, peaking sharply at the moment of ovulation (Kobayashi *et al.*, 1987, 1988). Variations in LH plasma levels during the reproductive season, together with the wider period at which high LH plasma concentrations are observed in males with respect to females, indicate that LH is important in the control of final gamete maturation and spermiation/ovulation in European sea bass, as observed in other fish species.

Differences detected in group 22% with respect to the control group in LH plasma concentrations in December are probably related to punctual variations in the particular physiological status of fish in a fixed moment. In male fish, T and 11-keto-testosterone (11KT) regulate the production and release of LH (Nagahama, 1994). Asturiano *et al.* (2002) observed high values of these two androgens throughout the period of spermiation in European sea bass males; however, when males were sampled several times in each wave of milt production, strong variations of these two hormones were observed. Thus, in the same month values could decrease sharply to 1 ng mL⁻¹ from almost 4 ng mL⁻¹ and increase again. Such differences were provoked by shifts in gonadal steroidogenesis from production of T to that of the maturational inducing steroid, i.e., 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) and 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β S) (Asturiano *et al.*, 2002). Similar shifts were observed by Vizziano *et al.* (1996) in male rainbow trout. If T and 11KT directly influence LH plasma levels, strong variations in LH plasma concentrations would also probably be observed, although they are difficult to detect in monthly samplings. In the present experiment, it is possible that sampling of group 10% in February coincided with a time of low plasma LH concentrations.

The pronounced decay in LH plasma levels observed in group 10% could also be related to a general alteration of hormonal regulation of reproduction. Such an alteration would be related to the lower percentages of spermiating males observed in this group throughout the spermiating period. However, in the middle months of this period, the percentage of spermiating males was also high. It appears that once initiated, spermiation occurs even with low LH plasma levels. Nevertheless, LH would have a direct influence on the quantity of expressible milt, as has been reported for striped bass (*Morone saxatilis* Walbaum) (Mylonas *et al.*, 1997). These punctual decreases in milt volumes have also been detected in European sea bass when samplings were performed frequently into the same spermiation wave (Asturiano *et al.*, 2002).

Data regarding the effects of nutritional factors on the reproductive performance of European sea bass males are scarce. For females, it has been reported that experimental diets containing 51% of crude protein do not negatively affect fecundity or egg quality (Cerdá *et al.*, 1994). If males need similar dietary protein content than females, the differences

de LH (Nagahama, 1994). En un trabajo previo (Asturiano *et al.*, 2002) se observaron valores altos de estos dos andrógenos a lo largo de todo el periodo de espermiación en lubinas macho. Sin embargo, cuando los machos se muestrearon varias veces en un periodo corto de tiempo se observó que en una misma oleada de producción de esperma había variaciones muy fuertes de esta hormona (Asturiano *et al.*, 2002). De hecho dentro del mismo mes los valores de estos andrógenos podían descender bruscamente de casi 1 ng mL^{-1} hasta 1 ng mL^{-1} , para después aumentar de nuevo. Tales diferencias eran provocadas por los cambios que se producían en la esteroidogénesis gonadal desde la producción de T hacia la de los esteroides inductores de la maduración, la $17,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta\text{P}$) y la $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($20\beta\text{S}$) (Asturiano *et al.*, 2002). Vizziano *et al.* (1996) observaron cambios similares en machos de trucha arco iris. Si la T y la 11KT influyen directamente los niveles plasmáticos de LH, es de esperar que también se observen variaciones fuertes en las concentraciones de LH que, no obstante, son difíciles de detectar en muestreos mensuales. En este experimento, es posible que uno de los muestreos del grupo 10% en febrero haya coincidido con un momento de bajas concentraciones plasmáticas de LH.

También puede haber ocurrido que los niveles de LH en el grupo 10% estuvieran relacionados con una alteración global de la regulación hormonal de la reproducción. Tal alteración estaría relacionada con los bajos porcentajes de machos espermiantes observados en este grupo en el periodo de espermiación. Sin embargo, en los meses centrales de este periodo el porcentaje de machos espermiantes también fue alto, lo que parece indicar que, una vez iniciado, el proceso de espermiación tiene lugar incluso con niveles bajos de LH. No obstante, la LH tendría una influencia directa en la cantidad de esperma producido, tal y como se ha observado en otra especie de lubina (*Morone saxatilis* Walbaum) (Mylonas *et al.*, 1997). Estas reducciones en el volumen de esperma producido también se han observado en la lubina europea cuando se realizaron varios muestreos dentro de la misma oleada de espermiación (Asturiano *et al.*, 2002).

Los datos acerca del efecto de diferentes factores nutricionales sobre los machos de lubina son escasos. En el caso de las hembras, se ha observado que dietas experimentales que contenían 51% de proteína cruda no afectaban negativamente la fecundidad o la calidad de los huevos (Cerdá *et al.*, 1994). Si los machos necesitan un contenido similar de proteína en la dieta, entonces las diferencias observadas entre los grupos en el presente experimento no pueden atribuirse a deficiencias proteicas puesto que en todos los casos el contenido de proteínas era mayor del 51%. El grupo 10%, que mostró el menor contenido de LH y también los menores porcentajes de machos espermiantes, fue alimentado con una dieta comercial que tenía los contenidos más bajos de ácido araquidónico (AA, $20:4 n-6$) y de DHA. Estos ácidos grasos son esenciales para los peces marinos ya que éstos no pueden sintetizarlos y, por lo tanto, deben ser ingeridos a través de la dieta para mantener un

observado between groups in the present experiment cannot be attributed to proteic deficiencies since the protein content of the diets was in all cases higher than 51%. Group 10%, which exhibited the lowest LH plasma levels and the lowest percentages of spermiating males during the spermiation period, was fed with a commercial diet with the lowest percentage of arachidonic acid (AA, $20:4 n-6$) and DHA. These fatty acids are essential for marine fish and cannot be synthesized, so they must be provided by the diet for the maintenance of cellular structure and function (Mourete and Tocher, 1994; Sargent *et al.*, 1995). Several studies (reviewed by Núñez *et al.*, 1995) have shown that AA and/or its metabolites mediate GnRH-stimulated gonadotropin release. It seems that AA acts on the initial phase of exocytosis of the stored LH. AA also stimulates T production by goldfish testis pieces *in vitro* (Wade and Van der Kraak, 1993), and it is known that T plays a key role in the regulation of LH production. The low AA percentage in pellets fed to group 10% could be related to the low LH plasma concentrations observed in this group. Although the AA content in the 22% lipid diet was similar, the total quantity of AA in this diet should be higher (since the total content of lipids is 2.2 times higher than in 10% lipid pellets). The other PUFA present at a low percentage in the 10% lipid diet was DHA. This fatty acid plays a very important role in the maintenance of plasticity and functionality of cellular membranes (Bell *et al.*, 1986). The lower proportion of DHA in the 10% diet with respect to the natural diet, and the lower absolute content of this fatty acid in the 10% diet with respect to the 22% diet could have affected the reproductive performance of group 10% males.

Together with absolute contents of DHA and AA, the ratios of these two fatty acids with respect to EPA, i.e., ratios DHA:EPA and AA:EPA, are very important in the determination of fish reproductive performance. DHA and EPA compete for the same enzymes to be included in the structure of membrane phospholipids (Bell *et al.*, 1986). On the other hand, AA and EPA compete for the same enzymes that synthesize prostaglandins; however, AA derived prostaglandins have a higher biological activity than those derived from EPA (Crawford, 1983). It can be observed that DHA:EPA and AA:EPA ratios are higher in the control diet than in the pelleted diets, and this can be easily related to the higher reproductive performance of the control group, reflected by the higher LH plasma levels and percentages of spermiating males with respect to groups fed artificial diets.

LH plasma levels of females from this experiment were reported previously (Navas *et al.*, 1998). Females from groups 10% and 22% exhibited significantly higher LH plasma concentrations than controls at the mid-spawning time (Navas *et al.*, 1998). Increases in LH plasma levels with respect to controls have always been observed simultaneously to increases in E2 plasma concentrations (Navas *et al.*, 1998). It has been hypothesized (Navas *et al.*, 1998) that high levels of E2 provoked the increase of LH plasma levels due to the control that E2 exerts on LH production and release by the pituitary

adecuado funcionamiento y la estructura celular (Mourete y Tocher, 1994; Sargent *et al.*, 1995). Diversos trabajos (revisado por Núñez *et al.*, 1995) han mostrado que el AA y/o sus metabolitos median en la liberación de gonadotropina inducida por GnRH. Parece ser que el AA actúa en la fase inicial de exocitosis de la LH almacenada. El AA también estimula la producción de T *in vitro* en piezas de testículo de carpín (Wade y Van der Kraak, 1993), y es sabido que la T juega un papel fundamental en la regulación de la producción de LH. El bajo porcentaje de AA en el pienso administrado al grupo 10% podría estar relacionado con las bajas concentraciones de LH observadas en este grupo. Aunque el contenido porcentual de AA en el pienso administrado al grupo 22% fue similar al del pienso con 10% de lípidos, la cantidad total de AA en la dieta con 22% de lípidos debió de ser mayor puesto que el contenido total de lípidos fue 2.2 veces mayor que en el otro pienso. El otro PUFA que apareció en un porcentaje muy bajo en la dieta con 10% de lípidos fue el DHA. Este ácido graso juega un papel muy importante en el mantenimiento de la plasticidad y funcionalidad de las membranas celulares (Bell *et al.*, 1986). La baja proporción de DHA en la dieta con 10% de lípidos con respecto a la dieta natural, y el bajo contenido absoluto de este ácido graso en la dieta con 10% de lípidos, con respecto a la dieta con 22%, podría haber afectado la eficacia reproductora del los machos del grupo 10%.

Junto con el bajo contenido absoluto de DHA y AA, las proporciones de estos dos ácidos grasos con respecto al EPA, es decir las proporciones DHA:EPA y AA:EPA, son muy importantes en la determinación de la eficacia reproductora de los peces. El DHA y el EPA compiten por las mismas enzimas para ser incluidos en la estructura de los fosfolípidos de las membranas (Bell *et al.*, 1986). Por otra parte, AA y EPA compiten por las mismas enzimas que sintetizan las prostaglandinas; sin embargo, las prostaglandinas derivadas del AA tienen mayor actividad biológica que las derivadas del EPA (Crawford, 1983). Puede observarse que las relaciones DHA:EPA y AA:EPA son mayores en la dieta control que en las dietas comerciales, y esto se puede relacionar con la mayor eficacia reproductora observada en los machos del grupo control. Eficacia reproductora que se refleja en las mayores concentraciones plasmáticas de LH y los mayores porcentajes de machos espermiados con respecto a los grupos alimentados con dietas artificiales.

Los niveles plasmáticos de LH en las hembras de los grupos experimentales utilizados en este trabajo han sido presentados previamente (Navas *et al.*, 1998). Las hembras de los grupos 10% y 22% exhibieron niveles plasmáticos de LH significativamente mayores que los de las hembras control en el punto medio del periodo de puesta (Navas *et al.*, 1998). Estos incrementos en la concentración plasmática de LH con respecto a los controles han estado siempre asociados a incrementos de E2 en plasma (Navas *et al.*, 1998). Se ha mantenido la hipótesis (Navas *et al.*, 1998) de que los niveles altos de E2 provocan incrementos de los niveles plasmáticos de LH debido al control que el E2 ejerce, mediante mecanismos de

through feedback mechanisms (reviewed by Kah, 1997). In the case of males, the middle of the spermiation period coincides approximately with the mid-spawning time. At this time, contrary to females, LH plasma levels in males are either lower (group 10%) or similar (group 22%) than those observed in the control group. This fact suggests that hormonal pathways that control hypothalamus and pituitary functions in males differ from those of females.

In conclusion, data regarding LH in European sea bass males are presented for the first time. Contrary to previous observations in females (Navas *et al.*, 1998), a marked influence of the diet's fatty acid composition on male LH plasma levels was not detected, suggesting intersex differences in the pathways controlling LH production and release.

Acknowledgements

The first author holds a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT). This work was supported in part by EC projects FAR No. AQ 2 406 E UK and AIR No. 2-CT93 1005, and by INIA project ACU02-004.

English translation by the authors.

retroalimentación positivos y negativos, sobre la producción y liberación de LH en la hipófisis (revisado por Kah, 1997). En el caso de los machos, el punto medio del periodo de espermiación coincide aproximadamente con el punto medio del periodo de puesta. En ese momento, contrariamente a lo que ocurre en las hembras los niveles de LH en los machos fueron más bajos (grupo 10%) o similares (grupo 22%) a los observados en el grupo control. Este hecho sugiere que en los machos los mecanismos hormonales que controlan el funcionamiento endocrino del hipotálamo y de la hipófisis difieren de los de las hembras.

En conclusión, en este trabajo se presentan por primera vez los datos de las variaciones estacionales de LH en machos de lubina. Contrariamente a lo observado previamente en hembras (Navas *et al.*, 1998), en los machos no se observa una influencia marcada de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre los niveles plasmáticos de LH, lo que sugiere que hay diferencias intersexuales en los mecanismos que controlan la producción y liberación de LH.

Agradecimientos

JM Navas ha sido contratado dentro del programa Ramón y Cajal del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (MCYT). Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos FAR nº AQ 2 406 E UK y AIR nº 2-CT93 1005 de la CE, y por el proyecto ACU02-004 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Referencias

- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C. and Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: A comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194: 173–190.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M. and Zanuy, S. (2002). Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina*, 66: 273–282.
- Bell, M.V., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83(B): 711–719.
- Bell, M.V., Dick, J.R., Thrush, M. and Navarro, J.C. (1996). Decreased 20:4 n-6/20:5 n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared to wild fish. *Aquaculture*, 44: 189–199.
- Bell, J.G., Farndale, B.M., Bruce, M., Navas, J.M. and Carrillo, M. (1997). Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid composition of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 149: 107–119.
- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J.F., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J. and Bromage, N. (1999). Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. *Aquaculture*, 177: 85–97.
- Burzawa-Gerard, E. (1982). Chemical data on the pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 80–91.
- Cerdá, J., Carrillo, M., Zanuy, S. and Ramos, J. (1994). Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Preliminary observations. *Aquat. Living Resour.*, 7: 255–266.
- Christie, W.W. (1982). *Lipid Analyses*. 2nd ed. Pergamon, Oxford, UK, pp. 52–56.
- Crawford, M.A. (1983). A background to essential fatty acids and their prostanoid derivatives. *Br. Med. Bull.*, 39: 210–213.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 276: 497–509.
- Kah, O., Anglade, I., Linard, B., Pakdel, F., Salbert, G., Bailhache, T., Ducouret, B., Saligaut, C., LeGoff, P., Valotaire, Y. and Jegou, P. (1997). Estrogen receptors in the brain-pituitary complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 53–62.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. (1987). Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 67: 24–32.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. (1988). Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 69: 301–307.
- Mañanós, E., Swanson, P., Stubblefield, J. and Zohar, Y. (1997). Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108: 209–222.
- Mourente, G. and Tocher, T.R. (1994). *In vivo* metabolism of [1-¹⁴C]eicosapentaenoic acid (20:5 (n-3)) in a marine fish: Time course of the desaturation/elongation pathway. *Biochem. Biophys. Acta*, 1212: 109–118.
- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M. and Zohar, Y. (1997). Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist delivery systems. *Biol. Reprod.*, 57: 669–675.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 217–229.
- Navas, J.M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B.M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J.G. and Ramos, J. (1997). The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*, 51: 760–773.
- Navas, J.M., Mañanós, E., Thrush, M., Ramos, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y. and Bromage, N. (1998). Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 165: 65–79.
- Núñez, E.A., Haourigui, M., Martin, M.E. and Benassayag, C. (1995). Fatty acids and steroid hormone action. *Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 52: 185–190.
- Prat, F., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R. (1996). Validation of radioimmunoassay for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.*, 54: 1375–1382.
- Quérat, B. (1994). Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In: K.G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe (eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 27–35.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 183–198.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. and Nagahama, Y. (1988a). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71: 292–301.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. and Nagahama, Y. (1988b). Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71: 302–306.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe (eds.), *Proc. Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symp. 91, Sheffield, pp. 2–7.
- Thrush, M., Navas, J.M., Ramos, J., Bromage, N., Carrillo, M. and Zanuy, S. (1993). The effect of artificial diets on lipid class and total fatty acid composition of cultured sea bass eggs (*Dicentrarchus labrax*). In: A. Cerviño, A. Landin, A. de Coö, A. Gerra and M. Torre (eds.), *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*, Isla de Arosa, Spain, pp. 37–42.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R. and Gamble, J.C. (1985). Fatty acid composition of lipids using double development HPTLC and scanning densitometry. *J. Mar. Biol. Assoc.*, 129: 189–197.
- Vizziano, D., Le Gac, F. and Fostier, A. (1996). Effect of 17 β -estradiol, testosterone, and 11-ketotestosterone on 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the rainbow trout testis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 104: 179–188.
- Wade, M.G. and Van der Kraak, G. (1993). Arachidonic acid and prostaglandin E₂ stimulate testosterone production by goldfish testis *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 90: 109–118.
- Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M. and Bromage, N. (1995). Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquat. Living Resour.*, 8: 147–152.