

Avances en la reproducción controlada del lenguado *Paralichthys orbignyanus* en Argentina

Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina

M Radonic*, MI Müller, AV López, GA Bambill, M Spinedi, JJ Boccanfuso

Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Paseo Victoria Ocampo No. 1, B7602HSA Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

* E-mail: mradonic@inidep.edu.ar

Resumen

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la maduración gonadal, la liberación de huevos y el comportamiento reproductivo del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) en cautiverio. La relación de sexos fue de 1:2.2 y 1:2.5 (hembra:macho) en los grupos de reproductores B1 y B2, respectivamente. La talla promedio de las hembras en B1 fue de 3461 ± 861 g y en B2 fue de 1416 ± 435 g. La maduración gonadal se logró con la aplicación de un esquema de fotoperiodo y temperatura simulando las condiciones del medio natural en un periodo de 10 meses, alcanzando en febrero y marzo $19\text{--}20^\circ\text{C}$ y 16 h L:08 h O. Las condiciones fototermales usadas en este estudio indujeron la liberación de huevos en *P. orbignyanus*. La producción de huevos se extendió por un periodo mayor a 4 meses con una frecuencia de 1 a 3 días. El grupo B1 desovó durante 133 días, produciendo 31.9% de huevos viables con diámetro de 882.5 ± 76.4 μm , una tasa de eclosión de $76.9 \pm 17.0\%$, una supervivencia al tercer día posterior a la eclosión (S-3dpe) de $38.3 \pm 25.7\%$, y un índice de actividad larval (IAE) de 6.1 ± 6.6 . El grupo B2 desovó durante 90 días con una producción de huevos viables de 67.1%, diámetro de 866.4 ± 37.9 μm , tasa de eclosión de $66.4 \pm 30\%$, una S-3dpe de $67.8 \pm 26.9\%$ y un IAE de 10.5 ± 7.5 . No se hallaron diferencias significativas en la producción total de huevos, tasa de fecundación, fecundidad, diámetro del huevo, tasa de eclosión, S-3dpe y IAE (test no paramétrico de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$) entre B1 y B2, sin embargo, el porcentaje de huevos viables fue significativamente diferente ($P < 0.01$) siendo mayor para B2. Los parámetros diámetro del huevo, tasa de eclosión y longitud larval serían criterios apropiados para determinar la calidad de huevos y larvas en *P. orbignyanus*.

Palabras clave: *Paralichthys orbignyanus*, desove espontáneo, esquema fototermal, calidad de huevos, reproducción controlada.

Abstract

This study evaluates the effect of temperature on gonadal maturation, egg release and broodstock performance of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) in captivity. The sex ratio (female:male) was kept at 1:2.2 in broodstock 1 (B1) and 1:2.5 in broodstock 2 (B2). Mean female body weight was 3461 ± 861 g in B1 and 1416 ± 435 g in B2. Final maturation of broodfish was achieved through the use of a photoperiod and water temperature regimen simulating natural seasonal changes over a 10-month period, reaching $19\text{--}20^\circ\text{C}$ and 16 h L:08 h D by February and March. The photothermal conditions used in this study successfully induced egg release in *P. orbignyanus*. The spawning period was extended for more than four months, egg release occurring at a frequency of 1–3 days: B1 spawned for 133 days, yielding 31.9% buoyant eggs, a mean egg diameter of 882.5 ± 76.4 μm , a hatching rate of $76.9 \pm 17.0\%$, a 3-day post-hatching (3dph) survival rate of $38.3 \pm 25.7\%$, and a specific activity index (SAI) of 6.1 ± 6.6 ; B2 spawned for 90 days, yielding 67.1% buoyant eggs, a mean egg diameter of 866.4 ± 37.9 μm , a hatching rate of $66.4 \pm 30\%$, a 3dph survival rate of $67.8 \pm 26.9\%$ and SAI of 10.5 ± 7.5 . No significant differences (Kruskal-Wallis nonparametric test, $P > 0.05$) in total egg production, fertilization rate, fecundity, egg diameter, hatching rate, survival at 3dph and SAI were found between B1 and B2; however, there were significant differences ($P < 0.01$) in the percentage of buoyant eggs, which was higher for B2. Egg diameter, hatching rate and larval length are good criteria for determining the egg and larval quality of *P. orbignyanus*.

Key words: *Paralichthys orbignyanus*, natural spawning, photothermal conditioning, egg quality, controlled spawning.

Introducción

Desde 1994 la Estación Experimental de Maricultura (EEM) del INIDEP viene desarrollando dentro del Proyecto de Cultivo de Peces Marinos, técnicas de producción de especies

Introduction

Since 1994, the Mariculture Experimental Station (MES) of the National Institute of Fisheries Research and Development (INIDEP, Argentina) has been involved, as part of the

de lenguados autóctonos tales como *Paralichthys patagonicus* y *Paralichthys orbignyanus* con buenos resultados en términos de aclimatación, reproducción, larvicultura y engorde (Bambill *et al.* 2000, Bambill *et al.* 2003, Müller *et al.* 2006a, b). Desde el año 2000, las investigaciones se han centrado en el manejo y acondicionamiento de reproductores de *P. orbignyanus* debido a la calidad de su carne, alto precio en los mercados y creciente demanda pesquera. Es considerada una especie estuarina que tolera amplios rangos de salinidad (Wasielesky *et al.* 1995, Cousseau y Perrotta 1998), lo que facilitaría su cultivo a nivel experimental. Radonic *et al.* (2005a) y Bambill *et al.* (2006) estudiaron el comportamiento reproductivo de un grupo de ejemplares salvajes de esta especie mantenidos en cautiverio durante tres años (2001–2003). La relación de sexos fue de diez hembras:siete machos (1:0.7) bajo condiciones finales de temperatura del agua de $15 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h L:08 h O (horas luz:horas oscuridad). A pesar de que los machos se encontraban fluyentes, no se observó ningún cambio significativo en las hembras en términos de maduración y desove, siendo finalmente en 2003 inyectadas con hormona gonadotropina humana. Los reproductores fueron sometidos a masaje abdominal y los huevos fecundados artificialmente.

Numerosos autores citan la importancia de la temperatura en la maduración final de los peces. Al respecto, Silva (1994) observó una influencia directa de la temperatura sobre la producción de ovocitos o de huevos de mala calidad en *P. microps*. Bromley *et al.* (1986) y Devauchelle *et al.* (1988) confirman esta observación en rodaballo y solea, respectivamente. Robaldo (2003) registró desoves naturales para *P. orbignyanus* cuando la temperatura disminuyó de 26°C a 22°C . Esta información sugiere que la maduración gonadal y el desove de *P. orbignyanus* ocurren en aguas con temperaturas mayores a los 15°C aplicados en la EEM durante el periodo 2001–2003. En dicho periodo la relación de sexos tampoco favoreció el comportamiento de cortejo. Kumagai (1999), Smith *et al.* (1999), Silva (2001), y Watanabe y Carroll (2001) recomiendan, para la reproducción del género *Paralichthys*, una proporción de sexos de 1 a 3 machos por cada hembra.

Existe poca información sobre la biología reproductiva de *P. orbignyanus* en Argentina. En diciembre de 2003, dos hembras silvestres maduras de esta especie (5 y 14.5 kg peso total) fueron capturadas en campañas de investigación del INIDEP. Estas hembras se encontraron en 39°S , 61°O , a 12 m de profundidad, 33 ppt de salinidad y temperaturas que oscilaron entre 19°C y 20.6°C . Las gónadas fueron disectadas y examinadas encontrándose ovocitos en diferentes estadios vitelogénicos (Militelli 2004). López-Cazorla (2005) estudió la edad, crecimiento y maduración gonadal de *P. orbignyanus* en el estuario de Bahía Blanca (38°S , Argentina), indicando que es un desovante parcial cuya estación reproductiva se extiende de noviembre a enero con temperaturas del agua de 19°C a 23°C . Mellito da Silveira *et al.* (1995) en un estudio similar observaron que la maduración final y desoves de esta especie se

Marine Finfish Culture Project, in developing techniques for culturing native flounders such as *Paralichthys patagonicus* and *Paralichthys orbignyanus*, with good results in terms of acclimation, reproduction, larviculture and on-growing (Bambill *et al.* 2000, Bambill *et al.* 2003, Müller *et al.* 2006a, b). Since 2000, research has focused on broodstock management and conditioning of *P. orbignyanus* because of its good flesh quality, high market price and increasing fishery demand. Moreover, since it is considered an estuarine, euryhaline teleost species (Wasielesky *et al.* 1995, Cousseau and Perrotta 1998), it can be cultured under experimental conditions. Radonic *et al.* (2005a) and Bambill *et al.* (2006) studied the spawning performance of a wild broodstock of this species kept in captivity for three years (2001–2003) using a sex ratio of 10 females:7 males (1:0.7), final water temperature of $15 \pm 1^\circ\text{C}$ and photoperiod of 16 h L:08 h D (hours of light/darkness). Although males were mature and running, females showed no significant changes in maturation or egg release, and in 2003 they were injected with human chorionic gonadotropin (HCG). Broodfish were stripped and eggs artificially fertilized.

Numerous authors have indicated the importance of temperature on final maturation in fish. Silva (1994) observed a direct influence of temperature in the production of infertile or poor quality eggs of *P. microps*. Bromley *et al.* (1986) and Devauchelle *et al.* (1988) supported this observation for turbot and sole, respectively. Robaldo (2003) reported *P. orbignyanus* natural spawnings when the temperature decreased from 26°C to 22°C . These data suggest that gonadal maturation and spawning of this species occur at a warmer temperature than the 15°C used at MES during 2001–2003. In that period, the sex ratio might not have been favourable for courtship behaviour. Kumagai (1999), Smith *et al.* (1999), Silva (2001), Watanabe and Carroll (2001) recommend ratios of 1–3 males per female for *Paralichthys* reproduction.

Information on the reproductive biology of *P. orbignyanus* in Argentina is scarce. In December 2003, two mature wild females of this species (5 and 14.5 kg body weight) were caught during research cruises undertaken by INIDEP. These females were found between 39°S and 61°W , at 12 m depth, 33 ppt salinity and temperatures ranging from 19°C to 20.6°C . The gonads were sampled, and oocytes in different vitellogenic stages were determined (Militelli 2004). López-Cazorla (2005) studied the age, growth and gonadal maturation of *P. orbignyanus* in Bahía Blanca Estuary (38°S , Argentina), and indicated that it is a batch spawner, being the spawning season from November to January when water temperatures are 19 – 23°C . In a similar study, Mellito da Silveira *et al.* (1995) observed that final maturation and spawning of this species take place between October and April in the Patos Lagoon Estuary (32°S , Brazil).

This study aimed to obtain fertilized eggs from natural spawnings of *P. orbignyanus* broodstock maintained at MES, and to determine the effect of final water temperature (19 – 20°C) on gonadal maturation and natural egg release, as well as broodstock performance at a sex ratio of 1:2–3 (female:male).

registran de octubre a abril en el estuario de la Laguna Dos Patos (32°S, Brasil).

Con la finalidad de obtener huevos fecundados con desoves espontáneos de ejemplares reproductores de *P. orbignyanus* mantenidos en la EEM, se determinó (1) el efecto de la temperatura final del agua (19–20°C) en la maduración gonadal y desoves espontáneos, y (2) el comportamiento de los reproductores cuando se aplica una relación de sexos de 1 hembra por cada 2–3 machos.

Materiales y métodos

Manejo de reproductores

La EEM cuenta con una sala equipada con dos tanques para reproductores (5 m diámetro, 80 cm profundidad del agua) conectados cada uno a un sistema de recirculación de agua de mar, en el cual el agua se reutiliza en un ciclo continuo de depuración y desinfección en base a filtración mecánica, biológica y luces ultravioleta. Asimismo, el sistema de recirculación cuenta con decantador, espumador e intercambiador de calor (automático, de titanio), como detallan Bambill *et al.* (2006).

Los grupos de reproductores se conformaron a partir de ejemplares silvestres obtenidos mediante pesca de arrastre en la zona costera aledaña a la ciudad de Mar del Plata. El grupo 1 (B1) se formó en 1998 con 6 hembras:13 machos (relación de sexos 1:2.2), siendo los pesos en promedio de 3461 ± 861 g para hembras y de 1472 ± 354 g para machos, y las tallas medias de 63.6 ± 6.5 cm para hembras y 48.8 ± 4.7 cm para machos. El grupo de reproductores 2 (B2) se inició en 2001 con 11 hembras:28 machos (relación de sexos 1:2.5) siendo los pesos en promedio de 1416 ± 435 g y 856 ± 431 g, y las tallas medias de 50.0 ± 8.5 cm y 40.0 ± 7.1 cm para hembras y machos, respectivamente.

La maduración final y los desoves de los peces se lograron simulando los cambios naturales de fotoperiodo y temperatura del agua por un periodo de 10 meses, alcanzando en febrero y marzo 19–20°C y 16 h L:08 h O (fig. 1). El fotoperiodo de la sala de reproductores se reguló mediante un temporizador y la temperatura del agua de cada tanque se controló por medio de una unidad intercambiadora de temperatura.

Los reproductores se alimentaron diariamente a saciedad con calamar fresco (*Illex argentinus*), anchoíta (*Engraulis anchoita*), jurel (*Trachurus lathami*) y dos especies de pejerreyes (*Odonthestes argentinensis* y *Sorgentinia incisa*). Durante los dos meses previos al desove, se alimentó cuatro veces por semana con los productos frescos anteriormente mencionados, y el resto de la semana con una dieta peletizada húmeda elaborada en la EEM con agregados de vitaminas y minerales (Vitafac Super Reproductores, Roche Vitaminas Argentina SA). Los parámetros de temperatura, salinidad y pH se midieron diariamente, registrándose valores de 33–36 ppm de salinidad y de 7.30–8.40 para pH.

Material and methods

Broodstock management

The Mariculture Experimental Station has a fully equipped broodstock room with two tanks (5 m diameter, 80 cm water depth), each one connected to a closed recirculation system, consisting of a settler, a foam skimmer, a biological filter, a heating/cooler system (automatic, titanium) and four UV lights, as described by Bambill *et al.* (2006). The settler and the foam skimmer removed solid wastes. Effluent water was bio-filtered for a biological conversion of ammonia to nitrate.

The broodfish were captured by a bottom net in the coastal area near the city of Mar del Plata (Argentina). Broodstock 1 (B1) was formed in 1998 by 6 females and 13 males (sex ratio 1:2.2); mean body weights were 3461 ± 861 g for females and 1472 ± 354 g for males, and mean sizes were 63.6 ± 6.5 cm for females and 48.8 ± 4.7 cm for males. Broodstock 2 (B2) was stocked in 2001 using 11 females and 28 males (sex ratio 1:2.5); mean body weights were 1416 ± 435 g for females and 856 ± 431 g for males, and mean sizes were 50.0 ± 8.5 cm for females and 40.0 ± 7.1 cm for males.

Final maturation of broodfish was achieved by the use of a photoperiod and water temperature regimen simulating natural seasonal changes over a 10-month period, reaching 19–20°C and 16 h L:08 h D by February–March (fig. 1). A timing device was used to regulate the photoperiod of the broodstock room (hours of light), and a heating/cooler system was used to control the water temperature in each broodfish tank.

Broodstock were fed fresh squid (*Illex argentinus*), anchovy (*Engraulis anchoita*), horse mackerel (*Trachurus lathami*) and silversides (*Odonthestes argentinensis* and *Sorgentinia incisa*) to satiation daily. Two months before the spawning, broodfish were fed fresh fish four times a week and the rest of the week, a station-made moist pellet supplemented

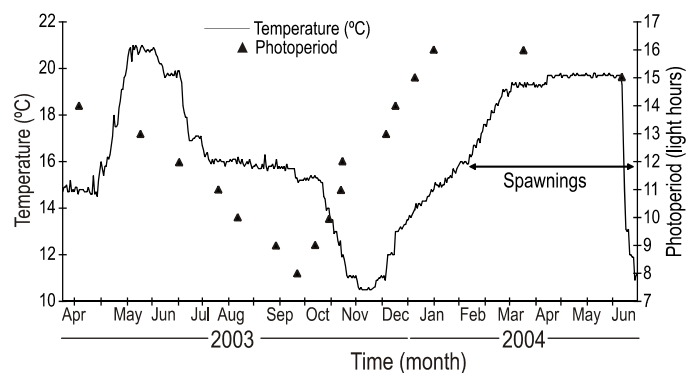


Figura 1. Condiciones de fotoperiodo y temperatura aplicados para los reproductores salvajes de *Paralichthys orbignyanus* durante la estación de desoves 2004.

Figure 1. Photoperiod and temperature conditions used for *Paralichthys orbignyanus* wild broodstock during the 2004 spawning season.

Biopsia gonadal

La maduración gonadal de las hembras fue evaluada mediante canulación. El diámetro de los ovocitos ($n = 50$) se midió mediante un analizador de imágenes (Nikon V-12B, Japón) y un calibre electrónico (Mitutoyo, Japón).

Recolección de huevos

Los huevos se recolectaron por rebalse de cada tanque de reproductores en un colector de malla de 300 μm que se revisó diariamente, obteniendo todos los huevos provenientes de los desoves espontáneos. Posteriormente éstos se ubicaron en jarras graduadas para su posterior separación. Los huevos flotantes son esféricos, translúcidos y generalmente fecundados. Aquellos que se acumulan en el fondo del recipiente se consideran no viables (Bromage 1996, Aristizábal *et al.* 1997). La recolección y separación de los huevos, las mediciones de la tasa de fecundación (TF) y el diámetro de los huevos (DH) (los valores se presentan como promedio \pm DE) se mencionan en detalle en Radonic *et al.* (2005b). El tiempo estimado de desove y el estadio embrionario se determinaron en base a la metodología descrita por Oka y Bambill (2003).

Tasa de eclosión, índice de actividad larval, supervivencia al tercer día posterior a la eclosión y largo total larval

La calidad de las diferentes camadas de huevos se determinó mediante la aplicación de diversos parámetros. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para evaluar la tasa de eclosión (TE) con base en las larvas eclosionadas (LE):

$$TE = \frac{LE}{LE + \text{Larvas muertas} + \text{Huevos no eclosionados}} \times 100$$

y el índice de actividad específica (IAE):

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

donde N es el número total de larvas, h_i la mortalidad acumulada al día i , y k el número de días hasta la muerte de todas las larvas por inanición (Radonic *et al.* 2005). La supervivencia al tercer día posterior a la eclosión (S-3dpe, %) se determinó de acuerdo con Furuita *et al.* (2000). El largo total (LT) de 20 larvas recién eclosionadas se midió desde la punta del hocico hasta el extremo posterior de la aleta caudal. La TE, S-3dpe, IAE y LT se muestran como promedio \pm DE. La fecundidad se calculó en base al número total de huevos recolectados de cada tanque a lo largo de todo el periodo reproductivo, por kilogramo medio de hembra.

with vitamins and minerals (Vitafac Super Reproductores, Roche Vitaminas Argentina SA). Temperature, salinity and pH were measured daily. Salinity ranged from 33 to 36 ppt and pH from 7.30 to 8.40.

Gonadal biopsy

Gonadal maturation in females was evaluated by canulation. Oocyte diameter ($n = 50$) was measured using a profile projector (Nikon V-12B, Japan) and an electronic caliper (Mitutoyo, Japan).

Egg collection

The egg net (300 μm), suspended beneath the overflow outlet and inside the biological filter, was checked daily to collect the eggs obtained from natural spawning. They were washed and placed in graduated cylinders to separate buoyant and non-buoyant eggs. Fertilized, spherical and translucent eggs were considered viable, whereas sinking eggs were nonviable (Bromage 1996, Aristizábal *et al.* 1997). Egg collection and separation, and fertilization rate (FR) and egg diameter (ED) measurements (data given as mean \pm SD) were performed according to Radonic *et al.* (2005b). The estimated spawning time and embryonic stage were determined following Oka and Bambill (2003).

Hatching rate, larval survival on the third day after hatching, specific activity index and larval body length

Several parameters were used to evaluate the quality of different egg batches. The hatching rate (HR) and specific activity index (SAI) were evaluated based on the following equations:

$$HR = \frac{\text{Hatched larvae}}{\text{Hatched larvae} + \text{Dead larvae} + \text{Nonhatched eggs}} \times 100$$

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

where N is the total number of larvae, h_i is the cumulated mortality by the i -th day, and k is the number of days elapsed until all larvae died due to starvation (Radonic *et al.* 2005). Survival at three days post-hatching (S-3dph, %) was calculated according to Furuita *et al.* (2000). The total length (TL) of 20 newly hatched larvae was measured from the tip of the snout to the posterior margin of the caudal fin. The HR, S-3dph, SAI and larval TL data are shown as mean \pm SD. Fecundity was determined as the number of total eggs collected from each tank throughout the entire reproductive season, per mean kilogram weight of female.

Análisis estadísticos

Los valores del total de huevos, huevos flotantes, TF, fecundidad, DH, TE, S-3dpe, IAE y LT fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Esta información fue comparada con la de Bambill *et al.* (2006) sobre desoves obtenidos por masaje abdominal durante la temporada reproductiva 2003.

Resultados

La maduración gonadal para B1 fue evaluada el 12 y el 25 de febrero de 2004, con temperaturas de agua de 15.9°C y 17.6°C, respectivamente. El 25 de febrero se observaron ovocitos vitelados que midieron $410 \pm 7.7 \mu\text{m}$, con citoplasmas cargados de glóbulos y vesículas de vitelo distribuidas uniformemente.

La época reproductiva para B1 se extendió del 3 de febrero al 15 de junio (133 días), obteniéndose un mínimo de 217,530 huevos en total en febrero y un máximo total de 3,608,224 huevos en mayo (fig. 2a, tabla 1). En mayo, cinco desoves de un total de 15 resultaron con el 100% de los huevos fecundados naturalmente (15,000 a 452,667 huevos fecundados). A pesar de que la temperatura del agua en abril fue de 19.7°C, se registraron 13 desoves cuando la temperatura se incrementó de 15.7°C a 19.4°C durante febrero y marzo. Se registró un DH medio de 882.5 μm y una TE media de 76.9%. La S-3dpe larval fue de 38.3% y el IAE de 6.1.

La temporada reproductiva para B2 duró del 25 de febrero al 25 de mayo (90 días), obteniéndose un mínimo de 26,567 huevos en total en febrero y un máximo total de 1,729,305 huevos en mayo (fig. 2b, tabla 2). De marzo a mayo, una vez alcanzados los 19.7°C, los desoves se caracterizaron por tener tasas de fecundación mayores a 80%. En la temporada reproductiva se registró un DH medio de 866.4 μm y una TE media de 66.4%. La S-3dpe larval fue de 67.8% y el IAE de 10.5. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el

Statistical analysis

The data obtained for total and buoyant eggs, FR, fecundity, ED, HR, S-3dph, SAI and larval TL were statistically assessed using the Kruskal-Wallis nonparametric test. These data were then compared with those reported by Bambill *et al.* (2006) for spawnings obtained by hand stripping during the 2003 reproductive season.

Results

Gonadal maturation for B1 was assessed on 12 and 25 February 2004 at water temperatures of 15.9°C and 17.6°C, respectively. On 25 February, yolked oocytes were observed, measuring $410 \pm 7.7 \mu\text{m}$ and having the cytoplasm filled with evenly-distributed vesicles and yolky globules.

The spawning season for B1 lasted from 3 February to 15 June (133 days), yielding a minimum of 217,530 total eggs in February and a maximum of 3,608,224 total eggs in May (fig. 2a, table 1). In May, 5 of the 15 batches yielded 100% of naturally fertilized eggs (15,000–452,667 fertilized eggs). Although the spawning water temperature was 19.7°C by April, 13 egg batches were recorded when the temperature was increasing from 15.7°C to 19.4°C during February and March. Average ED and HR were 882.5 μm and 76.9%, respectively, while S-3dph was 38.3% and SAI, 6.1.

The spawning season for B2 lasted from 25 February to 25 May (90 days), yielding a minimum of 26,567 total eggs in February and a maximum of 1,729,305 total eggs in May (fig. 2b, table 2). Between March and May, when water temperature reached 19.7°C, spawnings were characterized by a FR higher than 80%. Average ED and HR were 866.4 μm and 66.4%, respectively, while S-3dph was 67.8% and SAI was 10.5. No significant differences ($P > 0.05$) in total egg production, FR, ED, HR, S-3dph and SAI were found between B1 and B2, although there were significant differences ($P < 0.01$) in buoyant egg production, which was higher for B2. The

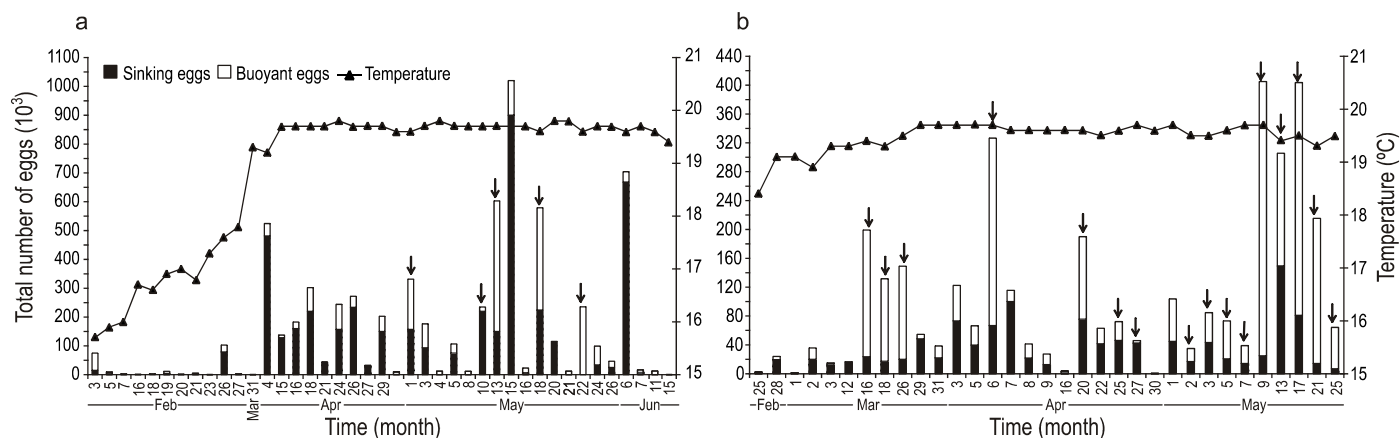


Figura 2. Huevos flotantes y no viables y temperatura final del agua durante la estación reproductiva 2004. (a) Grupo reproductor B1. (b) Grupo reproductor B2. Las flechas indican 100% de huevos fertilizados y flotantes.

Figure 2. Buoyant and sinking eggs and final spawning water temperature during the 2004 reproductive period for (a) broodstock B1 and (b) broodstock B2. Arrows indicate 100% buoyant fertilized eggs.

Tabla 1. Producción total de huevos correspondiente al grupo de reproductores B1 durante la estación reproductiva 2004: TE = huevos totales, BE = huevos flotantes, FR = tasa de fecundación, ED = diámetro del huevo, HR = tasa de eclosión, S-3dph = supervivencia al tercer día posterior a la eclosión, y SAI = índice de actividad específica.

Table 1. Total egg production of broodstock 1 during the 2004 spawning season: TE = total eggs, BE = buoyant eggs, FR = fertilization rate, ED = egg diameter, HR = hatching rate, S-3dph = survival at 3 days post-hatching, and SAI = specific activity index.

Date (m/yr)	Batches	TE	BE (%)	FR (%)	ED (µm)	HR (%)	S-3dph (%)	SAI
02/2004	11	217,530	45.1	27.0	938.3 ± 100.1 (868–1123)	50.0 ± 1.4 (49.0–51.0)	61.1 ± 39.2 (33.3–88.8)	14.6 ± 9.3 (8.0–21.2)
03/2004	1	666	0.0	0.0	–	–	–	–
04/2004	10	1,953,654	17.3	0.0	842.8 ± 14.7 (830–867)	–	–	–
05/2004	15	3,608,224	43.6	78.5	866.5 ± 12.3 (849–878)	83.6 ± 11.3 (58.8–98.0)	30.8 ± 18.6 (3.3–53.3)	3.3 ± 0.9 (0.6–6.0)
06/2004	4	734,666	4.9	0.0	–	–	–	–
Total	41	6,514,074	31.9	19.3	882.5 ± 76.4	76.9 ± 17.0 (49.0–98.0)	38.3 ± 25.7 (3.3–88.8)	6.1 ± 6.6 (0.6–21.2)

Tabla 2. Producción total de huevos correspondiente al grupo de reproductores B2 durante la estación reproductiva 2004. TE = huevos totales, BE = huevos flotantes, FR = tasa de fecundación, ED = diámetro del huevo, HR = tasa de eclosión, S-3dph = supervivencia al tercer día posterior a la eclosión, y SAI = índice de actividad específica.

Table 2. Total egg production of broodstock 2 during the 2004 spawning season. TE = total eggs, BE = buoyant eggs, FR = fertilization rate, ED = egg diameter, HR = hatching rate, S-3dph = survival at 3 days post-hatching, and SAI = specific activity index.

Date (m/yr)	Batches	TE	BE (%)	FR (%)	ED (µm)	HR (%)	S-3dph (%)	SAI
02/2004	2	26,567	19.6	8.7	866.0 ± 9.9 (859–873)	–	–	–
03/2004	9	641,762	71.6	94.5	(864.6 ± 60.7) (731–918)	50.3 ± 30.6 (0.0–96.2)	96.2 ± 3.1 (91.3–100.0)	19.7 ± 2.8 (15.6–23.2)
04/2004	14	1,075,522	51.3	81.1	861.9 ± 34.1 (811–902)	77.9 ± 14.4 (58.5–96.6)	63.8 ± 28.2 (22.2–90.9)	11.1 ± 7.3 (1.6–19.7)
05/2004	10	1,729,305	76.0	95.5	873.2 ± 26.9 (804–895)	70.8 ± 26.3 (4.5–96.0)	53.4 ± 21.5 (3.3–83.3)	5.1 ± 3.4 (0.5–10.2)
Total	35	3,473,156	67.1	62.0	866.4 ± 37.9	66.4 ± 30.0 (0.0–96.6)	67.8 ± 26.9 (3.3–100.0)	10.5 ± 7.5 (0.5–23.2)

número total de huevos, TF, DH, TE, S-3dpe y IAE ($P > 0.05$), aunque se hallaron diferencias significativas en el número de huevos flotantes para ambos grupos de reproductores ($P < 0.01$), siendo mayor para el grupo B2. Las fecundidades estimadas para B1 y B2 fueron de 313,780 y 222,353 huevos totales/kg peso hembra, respectivamente, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$).

En la tabla 3 se presentan los resultados de la producción de huevos correspondiente a los periodos de desove de 2004 (trabajo actual) y 2003 (desoves por masaje abdominal, Bambill *et al.* 2006). Se hallaron diferencias estadísticas significativas en el número total de huevos, fecundidad, DH, TE y LT de larvas ($P < 0.0001$), mientras que no se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en el porcentaje de huevos viables, TF, S-3dpe e IAE.

estimated fecundity for B1 and B2 was 313,780 and 222,353 total eggs/kg female, respectively, and no significant differences were found ($P > 0.05$).

The results obtained for egg production during the spawning seasons 2004 (present study) and 2003 (hand-stripped spawnings, Bambill *et al.* 2006) are shown in table 3. Highly significant statistical differences ($P < 0.0001$) were obtained for the total number of eggs, fecundity, ED, HR and larval TL, whereas no significant differences ($P > 0.05$) were found for buoyant eggs, FR, S-3dph and SAI.

Discussion

The 10-month photothermal regimen and the final water temperature of 19–20°C used in this study for *Paralichthys*

Discusión

El régimen fototérmico y la temperatura final del agua de 19–20°C, aplicados a reproductores del lenguado *Paralichthys orbignyanus* fueron efectivos para la obtención de desoves espontáneos y viables. Entre febrero y mediados de junio de 2004, la obtención de huevos fecundados y de larvas vitelinas permitió la producción masiva de semillas y posterior engorde de juveniles de esta especie (Müller *et al.* 2006a). Según Furuita *et al.* (2000), Smith y Denson (2000), Izquierdo *et al.* (2001), Schreck *et al.* (2001), Watanabe y Carroll (2001) y Rueda-Jasso *et al.* (2005), otros parámetros tales como tamaño de los tanques, buenas condiciones nutricionales y de cultivo, calidad del agua y mínimos niveles de estrés, aplicados a reproductores, han demostrado influir en el comportamiento reproductivo y producción de huevos en otras especies de lenguado.

Desde 1998 y bajo las condiciones presentadas en este trabajo, no se han registrado ni mortalidad ni enfermedades en los grupos de reproductores (Bambill *et al.* 2006). Cerqueira *et al.* (1997) reporta una mortalidad total de reproductores de *P. orbignyanus* luego de 30 días de cautiverio y mantenidos en tanques de 150 L de capacidad. Robaldo (2003) registró una supervivencia de 64% cuando mantuvo ejemplares de *P. orbignyanus* 6.5 meses en cautiverio, aclimatados en tanques de 3000 L y condiciones de cultivo apropiadas. Las principales causas de mortalidad fueron ayuno e infección por el parásito dinoflagelado *Amyloodinium cf. ocelatum*. Por su parte, Silva (1994) reportó alta mortalidad durante la aclimatación de ejemplares salvajes de *P. microps* recién capturados.

En este estudio, una vez alcanzada la temperatura final del agua de 19–20°C se registraron huevos fecundados con desoves espontáneos liberados con una frecuencia de 1 a 3 días. Sin embargo, se recolectaron pequeños desoves una vez que la temperatura superó los 15°C, sugiriendo un efecto de la temperatura en la liberación de huevos. Este comportamiento también fue observado por Watanabe *et al.* (2001) para el lenguado *P. lethostigma* sometido a un prolongado régimen fototérmico. Bromage *et al.* (2001) citan a la temperatura como uno de los factores que inducen la maduración de carpas, bagres y otros peces tropicales y subtropicales. En otras especies de lenguado se ha demostrado que las variaciones de fotoperíodo y temperatura inducen desoves espontáneos en especies tales como *P. microps* (Silva 1994), *P. olivaceus* (Tsujigado *et al.* 1989, Ikenoue y Kafuku 1992, Watanabe 1996), *Scophthalmus maximus* (Devauchelle *et al.* 1988, Forés *et al.* 1990, Peleteiro *et al.* 1993), *Solea senegalensis* (Anguis y Cañavate 2005), *P. lethostigma* (Watanabe *et al.* 2001) e *Hippoglossus hippoglossus* (Holmefjord *et al.* 1993, Olsen *et al.* 1999).

Asimismo, se observó una importante variabilidad en las tasas de fecundación de los grupos de reproductores estudiados, condición frecuente en especies de peces planos. Houghton *et al.* (1985) y Bromley *et al.* (1986) presentan tasas de huevos no viables de 49% para solea y 53–66% para

Tabla 3. Estaciones reproductivas 2003 (masaje abdominal, Bambill *et al.* 2006) y 2004 (espontáneo, este estudio) para reproductores de *Paralichthys orbignyanus*.

Table 3. Data for the 2003 (hand stripping, Bambill *et al.* 2006) and 2004 (natural, this paper) spawning seasons of *Paralichthys orbignyanus* broodstock.

	2003	2004 (B1 and B2)
Sex ratio (female:male)	1:0.7	1:2.2 and 2.5
Female weight (g)	3,747 ± 343	1,096 ± 1334
Spawning days	27	133
Water temperature (°C)	15 ± 1	19–20
Number of spawnings	18	76
Total number of eggs*	3,253,000	9,987,230
Viable eggs (%)**	50.3	43.8
Fertilization rate (%)**	51 ± 24.9	48.1 ± 48.5
Fecundity (total eggs/kg female)*	293,063	534,076
Egg diameter (µm)*	818.4 ± 30.1	874.2 ± 55.5
Hatching rate (%)*	9.5 ± 11.8	71.9 ± 23.1
Survival at 3 days post-hatching**	68.3 ± 24.7	62.0 ± 28.8
Specific activity index**	13.2 ± 7.6	10.1 ± 6.9
Yolked-sac larva total length*	2.19 ± 0.10	2.34 ± 0.10

* Significant differences ($P < 0.0001$)

** Nonsignificant differences ($P > 0.05$)

orbignyanus broodstock successfully induced natural spawnings. From February to mid-June 2004, the production of viable eggs and yolk-sac larvae allowed seed mass culture and further juvenile on-growing of this species (Müller *et al.* 2006a). According to Furuita *et al.* (2000), Smith and Denson (2000), Izquierdo *et al.* (2001), Schreck *et al.* (2001), Watanabe and Carroll (2001) and Rueda-Jasso (2005), other parameters, such as tank dimensions, good nutritional status, husbandry, water quality and minimal stress levels, have been found to influence the reproductive behaviour and the production of good egg batches in other flatfish species.

Since 1998, neither broodstock mortality nor disease outbreaks have been recorded under the conditions presented in this study (Bambill *et al.* 2006). Cerqueira *et al.* (1997) reported total mortality of *P. orbignyanus* broodstock after 30 days of capture from the wild when kept in small volume tanks (150 L). Robaldo (2003) registered a 64% survival rate for *P. orbignyanus* broodstock after 6.5 months in captivity, despite being kept in 3000-L tanks, under good husbandry conditions; the main causes of mortality were starvation and infestation by the dinoflagellate *Amyloodinium cf. ocelatum*. Silva (1994) also recorded high mortality during the acclimation of newly-caught wild *P. microps* specimens.

In the present study, when water temperature was 19–20°C, fertilized eggs from natural tank egg release were collected at a

rodaballo, respectivamente. Entre las especies del género *Paralichthys*, el lenguado chileno produjo 51–66% de huevos no viables (Silva 1994), mientras que en el lenguado japonés esta tasa varió entre 47% y 93% (Tsujigado *et al.* 1989, Mihelakakis *et al.* 1995). Por su parte, Watanabe *et al.* (1998, 2001) registraron una producción de huevos no viables de 49.6% y 62% para *P. dentatus* y *P. lethostigma*, respectivamente.

Los valores de fecundidad registrados en este estudio, son similares a los citados para otros peces planos, considerando que el tamaño, edad y genotipo de los reproductores, así como las tasas de alimentación diarias y estacionales pueden influir en el número de huevos producidos (Bromage 1996). Cerqueira *et al.* (1997) y Bambill *et al.* (2006) mencionan fecundidades por masaje abdominal para hembras de *P. orbignyanus* de 224,000 y 280,000 huevos/kg peso y de 185,951 y 399,118 huevos/kg peso, respectivamente.

La relación de sexos aplicada durante la temporada 2004 favoreció la producción de un importante número de huevos fecundados. En especies del género *Paralichthys* la proporción de sexos varía entre 1:1 en *P. olivaceus* (Watanabe 1996), a 1 hembra:2 machos para *P. dentatus* y *P. lethostigma*, aunque la tasa óptima no ha sido aún determinada (Watanabe y Carroll 2001). Por su parte, en los lenguados chilenos *P. microps* y *P. adspersus* se lograron desoves espontáneos empleando 2–3 machos por hembra (Silva 2001).

Comparando la producción de huevos y larvas obtenida por desoves naturales (2004) y por masaje abdominal (2003), se concluiría que los parámetros DH, TE y LT de larvas serían criterios apropiados para determinar la calidad de huevos y larvas en *P. orbignyanus*. Estos indicadores de calidad junto con S-3dpe e IAE son mencionados como determinantes de la calidad de los huevos de peces marinos por Kjørsvik *et al.* (1990, 2003), Bromage (1996), Furuita *et al.* (2000) y Thorsen *et al.* (2003).

En conclusión, los resultados obtenidos de este estudio señalan la importancia de la temperatura (19–20°C) y la relación de sexos de 1 hembra:2–3 machos para lograr huevos fecundados con desoves espontáneos en *P. orbignyanus*. Este protocolo de trabajo podría aplicarse en un futuro como práctica estandarizada para el cultivo a nivel industrial de la especie. Sin embargo, se requieren de futuras investigaciones de largo plazo en conjunto con programas específicos de temperatura, para una mejor comprensión de la influencia de este parámetro en la maduración gonadal y desove de esta especie. Además, es preciso estudiar la fecundidad y calidad de huevos en parejas desovantes aisladas.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por INIDEP y la Agencia de Cooperación de Ultramar de Japón (OFCF). Agradecemos a A Estévez (IRTA, España), E Aristizábal (INIDEP), a los evaluadores anónimos por la revisión de este manuscrito, y a D Hernández (INIDEP) quién realizó los análisis estadísticos. Contribución INIDEP No. 1341.

frequency of 1–3 days. Nevertheless, the production of a small number of egg batches was reported when water temperature increased above 15°C, suggesting an effect of this parameter on egg release. This behaviour was also observed by Watanabe *et al.* (2001) for the southern flounder *P. lethostigma* under an extended photothermal regime. Bromage *et al.* (2001) cited temperature as one of the factors inducing the maturation of carp, catfish and other tropical and subtropical species. Photothermal regimes have been mentioned to induce natural spawning of other flatfish such as *P. microps* (Silva 1994), *P. olivaceus* (Tsujigado *et al.* 1989, Ikenoue and Kafuku 1992, Watanabe 1996), *Scophthalmus maximus* (Devauchelle *et al.* 1988, Forés *et al.* 1990, Peleteiro *et al.* 1993), *Solea senegalensis* (Anguis and Cañavate 2005), *P. lethostigma* (Watanabe *et al.* 2001) and *Hippoglossus hippoglossus* (Holmefjord *et al.* 1993, Olsen *et al.* 1999).

In this study, the fertilization rate varied considerably, a condition that has frequently been mentioned for other flatfish species. Houghton *et al.* (1985) and Bromley *et al.* (1986) cited nonviable egg rates of 49% for sole and of 53–66% for turbot, respectively. Among *Paralichthys* species, the small eye flounder produced 51–66% of nonviable eggs (Silva 1994), whereas for Japanese flounder this rate varied between 47% and 93% (Tsujigado *et al.* 1989, Mihelakakis *et al.* 1995). Watanabe *et al.* (1998, 2001) recorded 49.6% and 62% nonviable egg production for *P. dentatus* and *P. lethostigma*, respectively.

The fecundity values reported here are similar to those mentioned for flatfish, considering that broodstock size, age and genotype, as well as the daily and seasonal feeding rates can influence the number of eggs produced (Bromage 1996). For *P. orbignyanus*, Cerqueira *et al.* (1997) and Bambill *et al.* (2006) recorded hand-stripped female fecundities of 224,000 and 280,000 eggs/kg and of 185,951 and 399,118 eggs/kg, respectively.

The sex ratio used during the 2004 spawning season favoured the production of an important number of fertilized eggs. The sex ratio for *Paralichthys* species varies from 1 female:1 male in the case of *P. olivaceus* (Watanabe 1996) to 1 female:2 males for *P. dentatus* and *P. lethostigma*, although an optimal ratio has not yet been determined (Watanabe and Carroll 2001). Spontaneous spawning of small-eye flounder *P. microps* and Chilean flounder *P. adspersus* was achieved with 2–3 males per female (Silva 2001).

The comparison of egg and larval production during the spawning seasons 2004 (present study) and 2003 (hand-stripped spawnings) showed that ED, HR and larval TL are good criteria for *P. orbignyanus* egg and larval quality. According to Kjørsvik *et al.* (1990, 2003), Bromage (1996), Furuita *et al.* (2000) and Thorsen *et al.* (2003), these parameters as well as S-3dph and SAI are used as indicators of egg quality for marine fish species.

In summary, the results obtained in this study indicate the importance of temperature (19–20°C) and of the sex ratio of 1 female:2–3 males to induce the natural spawning of *P. orbignyanus*. This protocol could be used in the future as a

Referencias

- Anguis V, Cañavate JP. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a natural fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133–145.
- Aristizábal EO, Müller MI, Bambill GA, López AV, Sabatini M, Costagliola M, Incorvaia S, Vega A, Carrizo JC, Manca E. 1997. Producción de alimento vivo y cría de besugo. Periodo 1995–1996. Informe Técnico Interno INIDEP 83, 92 pp.
- Bambill GA, Pérez FAR, Müller MI, López AV, Aristizábal EO, Radonic M, Vega AG. 2000. Larvicultura del lenguado argentino *Paralichthys patagonicus*. IV Jornadas de Ciencias del Mar, 11–15 septiembre 2000, Puerto Madryn, Argentina: 36.
- Bambill GA, López AV, Müller MI, Radonic M, Boccanfuso JJ. 2003. Larvicultura del lenguado argentino *Paralichthys orbignyanus* (Abstract). V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Mar del Plata, Argentina: 70.
- Bambill G, Oka M, Radonic M, López AV, Müller MI, Boccanfuso JJ, Bianca FA. 2006. Broodstock management and induced spawning of wild black Argentine flounder *Paralichthys orbignyanus* in captivity. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 41(1): 45–55.
- Bromage NR. 1996. Broodstock management and seed quality: General considerations. In: Bromage NR, Roberts RJ (eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 1–24.
- Bromage N, Porter M, Randall C. 2001. The environmental regulation of maturation in farm finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63–98.
- Bromley PJ, Sykes PA, Howell BR. 1986. Egg production of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) spawning in tank conditions. *Aquaculture* 53: 287–293.
- Cerqueira VR, Mioso R, Macchiavello JAG, Brügger AM. 1997. Induced spawning of the Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). *Bol. Inst. Pesca* 24: 247–254.
- Cousseau MB, Perrotta RG. 1998. Peces marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, pp. 142–143.
- Devauchelle N, Alexandre JC, Le Corre N, Letty Y. 1988. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in captivity. *Aquaculture* 69: 159–184.
- Forés R, Iglesias J, Olmedo M, Sánchez FJ, Peleteiro JB. 1990. Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by a sudden change in the photoperiod. *Aquacult. Eng.* 9: 357–366.
- Furuita H, Tanaka H, Yamamoto T, Shiraishi M, Takeuchi M. 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 187: 387–398.
- Holmefjord I, Gulbrandsen J, Lein I, Refstie T, Lèger P, Harboe T, Huse I, Sorgeloos P, Bolla S, Olsen Y, Reitan K, Vadstein O, et G. 1993. An intensive approach to Atlantic halibut fry production. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 275–283.
- Houghton RG, Last JM, Bromley DPJ. 1985. Fecundity and egg size of sole *Solea solea* (L.) spawning in captivity. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 42: 162–165.
- Ikenoue H, Kafuku T. 1992. Flatfish (*Paralichthys olivaceus*). In: *Modern Methods of Aquaculture in Japan* (2nd rev. ed.). Part III. *Marine Aquaculture*, pp. 144–149.
- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25–42.
- Kjørsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I. 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* 26: 71–113.
- Kjørsvik E, Hoehne-Reitan K, Reitan KI. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 227: 9–20.
- standard practice in order to achieve the culture of this species at an industrial level. Nevertheless, further research should be carried out over extended periods of time, together with the application of specific temperature programs for a better understanding of how temperature affects gonadal maturation and spawning of this species. Moreover, studies on fecundity and egg quality should be done on individual spawning pairs.

Acknowledgements

This research was funded by INIDEP and by the Overseas Fisheries Cooperation Foundation (OFCF) of Japan. We would like to thank A Estévez (IRTA, Spain), E Aristizábal (INIDEP) and the anonymous reviewers for the revision of the manuscript, as well as D Hernández (INIDEP) who contributed with the statistical analysis. This is INIDEP contribution No. 1341.

Kumagai A. 1999. Broodstock management and egg collection of Japanese flounder. Hakatajima Station, Annual Report of JASFA (in Japanese), pp. 37–40.

López-Cazorla A. 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenyns 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiologia* 537: 81–87.

Mellito da Silveira MP, Cousin JCB, Haimovici M. 1995. Estructura ovárica e testicular do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839). *Atlántica (Rio Grande)* 17: 135–152.

Mihelakakis A, Yoshimatsu T, Kitajima C. 1995. Change in egg size of Japanese flounder during one spawning season. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 40: 53–59.

Militelli MI. 2004. Actividad reproductiva de las principales especies de peces óseos en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay (ZCPAU) y en El Rincón. Diciembre 2003. Informe Técnico Interno INIDEP No. 59, 21 pp.

Müller MI, Radonic M, López AV, Bambill GA, Oka M, Odai M, Boccanfuso JJ, Bianca FA, Cadaveira M. 2006a. Engorde a altas densidades del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) en Argentina. Primera Conferencia Latino Americana sobre Cultivo de Peces Nativos y Tercera Conferencia Mexicana sobre Cultivo de Peces Nativos. 18–20 octubre 2006, Morelia, México: 39.

Müller MI, Radonic M, López AV, Bambill GA. 2006b. Crecimiento y rinde en carne del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) cultivado en Argentina. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 6 diciembre 2006 a 15 enero 2007, España, pp. 267–273.

Oka M, Bambill GA. 2003. Egg development of lenguado *Paralichthys orbignyanus*. In: Oka M (ed.), *Technological Development of Seed Production of Besugo and Lenguado in the Argentine Republic*. Internal Report (Jan. 2000–Aug. 2003). Overseas Fishery Cooperation Foundation, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, pp. 37–41.

Olsen Y, Evjemo JO, Olsen A. 1999. Status of the cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/Europe. *Aquaculture* 176: 3–13.

Peleteiro JB, Rodríguez-Ojea G, Iglesias J. 1993. Individual spawning control in different turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstocks under artificial and natural photoperiod. ICES Symposium on Mass Rearing of Juvenile Fish, 11 pp.

Radonic M, Bambill GA, Oka M, López AV, Müller MI, Boccanfuso JJ. 2005a. Broodstock management and induced spawning of wild

- black Argentine flounder *Paralichthys orbignyanus* in captivity. Aquaculture America 2005. 17–20 January, New Orleans, USA.
- Radonic M, López AV, Oka M, Aristizábal EO. 2005b. Effect of the incubation temperature on the embryonic development and hatching time of eggs of the red porgy *Pagrus pagrus* (Linne, 1758) (Pisces: Sparidae). Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 40: 91–99.
- Robaldo RB. 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) no ambiente em cativeiro. Doctoral thesis, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil, 190 pp.
- Rueda-Jasso RA, Conceição LEC, De Coen W, Rees JF, Sorgeloos S. 2005. Diet and weaning age affect the growth and condition of Dover sole (*Solea solea* L.). Cienc. Mar. 31: 477–489.
- Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture 197: 3–24.
- Silva A. 1994. Spawning of the Chilean flounder *Paralichthys microps* Gunther, 1881 in captivity. J. World Aquacult. Soc. 25: 342–344.
- Silva A. 2001. Advances in the culture research of small-eye flounder, *Paralichthys microps*, and Chilean flounder, *P. adspersus*, in Chile. J. Appl. Aquacult. 11: 147–164.
- Smith TIJ, Denson MR. 2000. Controlled spawning of southern flounder *Paralichthys lethostigma*: Issues and progress. UJNR Tech. Rep. 28: 97–108.
- Smith TIJ, McVey DC, Jenkins WE, Denson MR, Heyward LD, Sullivan CV, Berlinsky DL. 1999. Broodstock management and spawning of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. Aquaculture 176: 87–99.
- Thorsen A, Trippel EA, Lambert Y. 2003. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish. J. Northwest Atl. Fish. Soc. 33: 55–70.
- Tsujigado A, Yamakawa T, Matsuda H, Kamiya N. 1989. Advanced spawning of the flounder *Paralichthys olivaceus* in an indoor tank with combined manipulation of water temperature and photoperiod. Int. J. Aquat. Fish. Technol. 1: 351–356.
- Wasielesky W, Miranda K, Bianchini A. 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. Braz. Biol. Technol. 38: 385–395.
- Watanabe T. 1996. Intensive marine farming in Japan. In: Sheperd CJ, Bromage NR (eds.), Intensive Fish Farming. Blackwell Science, London, pp. 239–267.
- Watanabe WO, Carroll P. 2001. Progress in controlled breeding of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, and southern flounder, *P. lethostigma*. J. Appl. Aquacult. 11: 89–111.
- Watanabe WO, Ellis EP, Ellis SC, Feeley MW. 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. J. World Aquacult. Soc. 29: 393–404.
- Watanabe OW, Carroll PM, Daniels HV. 2001. Sustained, natural spawning of southern flounder *Paralichthys lethostigma* under an extended photothermal regime. J. World Aquacult. Soc. 32: 153–166.

Recibido en junio de 2006;
aceptado en abril de 2007