

## Reproductive cycle of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* in La Paz Bay, Mexico

### Ciclo reproductivo de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en la bahía de La Paz, México

JA Estrada-Godínez<sup>1</sup>, M Maldonado-García<sup>1\*</sup>, V Gracia-López<sup>1</sup>, M Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, CP 23090, La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>2</sup> Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Castellón, España.

\* Corresponding author. E-mail: minervam04@cibnor.mx

**ABSTRACT.** The leopard grouper *Mycteroperca rosacea* is an endemic species from the northwestern coast of Mexico and, like other serranid fishes, it has a high commercial value; hence, it is a good candidate for cultivation. This study aimed to describe the reproductive cycle of the leopard grouper in the wild as a step toward evaluating its aquaculture and restocking potential. From March 2008 to February 2009, 197 specimens were collected in the Gulf of California, Mexico. Overall sex ratio was 3.6 females to 1.0 male. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in total length and body weight were found between sexes. Group-synchronous ovarian development was observed with one yearly spawning period from May to June. Males matured two months earlier than females. The reproductive cycle was divided into four periods: (1) maturation, (2) spawning, (3) post-spawning, and (4) resting. Significant variations in the gonadosomatic index, hepatosomatic index, visceral fat index, and condition factor were observed throughout the study period. In addition, nine individuals were classified as immature bisexuals and one grouper presented evidence of sex change.

*Key words:* *Mycteroperca rosacea*, reproductive cycle, gonadal development, temperature, photoperiod.

**RESUMEN.** La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es una especie endémica de la costa del noroeste de México y, al igual que otras especies de serránidos, tiene un alto valor comercial; por lo tanto, es una buena candidata para cultivo. El objetivo de este estudio fue describir el ciclo reproductivo de la cabrilla sardinera en el medio natural como un paso hacia la evaluación de su potencial acuícola y repoblamiento. De marzo de 2008 a febrero de 2009, 197 especímenes fueron recolectados en el golfo de California, México. La proporción de sexos total fue de 3.6 hembras a 1.0 macho. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la longitud total y el peso corporal entre los sexos. Se observó un desarrollo ovárico del tipo sincrónico por grupo con un periodo de puesta anual de mayo a junio. Los machos maduraron dos meses antes que las hembras. Se describieron cuatro periodos dentro del ciclo reproductivo: (1) maduración, (2) desove, (3) posdesove y (4) reposo. Se observaron diferencias significativas en el índice gonadosomático, el índice hepatosomático, el índice de grasa visceral y el factor de condición durante todo el periodo de estudio. Además, se clasificaron a nueve individuos como bisexuales inmaduros y se encontró una cabrilla con evidencia de cambio de sexo.

*Palabras clave:* *Mycteroperca rosacea*, ciclo reproductivo, desarrollo gonádico, temperatura, fotoperiodo.

## INTRODUCTION

The leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877) is an important fishing resource and, due to its high market value, it has been proposed as a suitable candidate for aquaculture production (Díaz-Uribe *et al.* 2001). This also has ecological implications because it is an endemic species from the northwestern coast of Mexico and it is classified as a vulnerable species (A2ad+4ad) in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List (Craig and Sadovy 2008).

The leopard grouper is found from the southwest coast of the Baja California Peninsula to the coast of Jalisco, Mexico (Thompson *et al.* 2000), inhabiting shallow rocky areas close to shore and around islands at depths of less than 50 m. Juveniles feed on fish and benthic crustaceans and adults feed

## INTRODUCCIÓN

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877) es un recurso importante para la pesca y, debido a su alto valor en el mercado, ha sido propuesta como una especie candidata apropiada para la producción acuícola (Díaz-Uribe *et al.* 2001). Esto también tiene implicaciones ecológicas debido a que es una especie endémica de las costas del noroeste de México y está clasificada como una especie vulnerable (A2ad+4ad) dentro de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Craig y Sadovy 2008).

La cabrilla sardinera se encuentra desde la costa suroeste de la península de Baja California hasta las costas de Jalisco, México (Thompson *et al.* 2000), y habita áreas rocosas poco profundas, cercanas a las costas y alrededor de las islas a

on schools of herrings, anchovies, and other fishes (Heemstra and Randall 1993).

The leopard grouper reaches sexual maturity around three to five years of age with sizes exceeding 300 mm in total length (Aburto-Oropeza *et al.* 2008), though there have been reports of individuals attaining sexual maturity at two years of age but with a similar total length (290 mm) (Díaz-Urbe *et al.* 2001).

This species forms breeding aggregations involving several hundred individuals. These aggregations can be seen between March and June and show no matching to any lunar phase. Males and females participate in an elaborate courtship ritual during the day, culminating in spawning just before sunset. During spawning, more than 40 males surround a single female to form a spawning ball. The group swims frantically to the surface and simultaneously releases eggs and sperm in all directions, covering a relatively large area. Prolonged duration of these aggregations increases their vulnerability to fishing (Aburto-Oropeza *et al.* 2008).

The leopard grouper is a gonochorist species, according to histological observations and population information (Erisman *et al.* 2008); however, individuals with both male and female germ cells, at advanced stages of development, have been recorded in captivity (Kiewek-Martínez *et al.* 2010), similar to other hermaphroditic species. To date, there is a lack of information about the conditions of temperature and photoperiod and their relationship to the reproductive cycle of this species. These are two of the main factors regulating the teleost reproductive cycles (Munro 1990).

This study aimed to describe the reproductive cycle and gonadal development of this species in the wild throughout one year and relate them to the temperature and photoperiod conditions, thereby contributing to the knowledge necessary for its eventual reproductive management, for both aquaculture and conservation purposes.

## MATERIAL AND METHODS

Leopard grouper breeders were collected from several locations between San Evaristo and San José Island at the northern end of La Paz Bay in the Gulf of California, Mexico, from March 2008 to February 2009 (fig. 1). Water temperature was taken at the sampling location and photoperiod data were gathered for the area from the following website: <http://www.usno.navy.mil/USNO/astronomical-applications/data-services/rs-one-day-world>.

Leopard groupers were caught using lines and hooks and live sardine as bait. All individuals were sacrificed immediately after capture, and the gonads and liver were removed at this time.

### Somatic indexes

Total length ( $L_t$ , mm), body weight without gonad ( $W_b$ , g), gonad weight ( $W_g$ , g), liver weight ( $W_h$ , g), and visceral fat

profundidades por encima de los 50 m. Los jóvenes se alimentan de peces y crustáceos bentónicos y los adultos se alimentan de bancos de arenques, anchovetas y otros peces (Heemstra y Randall 1993).

La cabrilla sardinera alcanza la madurez sexual alrededor de los tres a cinco años de edad, a tallas superiores a los 300 mm de longitud total (Aburto-Oropeza *et al.* 2008); aunque se han reportado individuos que alcanzan la madurez sexual a los dos años de edad, pero con tallas similares (290 mm) de longitud total (Díaz-Urbe *et al.* 2001).

Esta especie forma agregaciones de desove de varios cientos de individuos. Dichas agregaciones pueden ser observadas entre marzo y junio sin que haya una sincronización con las fases lunares. Tanto los machos como las hembras participan en un elaborado ritual de cortejo durante el día que culmina con el desove justo antes del atardecer. Durante el desove, más de 40 machos rodean a una sola hembra para formar una bola de desove. El grupo nada frenéticamente hacia la superficie y libera los huevos y el esperma en todas las direcciones, cubriendo un área relativamente grande. La duración prolongada de dichas agregaciones incrementa su vulnerabilidad a la pesca (Aburto-Oropeza *et al.* 2008).

La cabrilla sardinera es una especie gonocórica, según observaciones histológicas e información poblacional (Erisman *et al.* 2008); sin embargo, se han registrado individuos con células germinales tanto femeninas como masculinas, en avanzado estado de desarrollo, en condiciones de cautiverio (Kiewek-Martínez *et al.* 2010), similar a lo observado para otras especies hermafroditas. Hasta ahora, se carece de información acerca de las condiciones de temperatura y fotoperiodo y su relación con respecto al ciclo reproductivo de esta especie. Estos dos factores son los que regulan principalmente los ciclos reproductivos en los peces teleósteos (Munro 1990).

El objetivo de este estudio fue describir el ciclo reproductivo y desarrollo gonádico de esta especie en el medio natural a lo largo de un año y relacionarlos con las condiciones de temperatura y fotoperiodo, y, con ello, contribuir al conocimiento necesario para su manejo reproductivo eventual, tanto para propósitos de producción acuícola como de conservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron reproductores de cabrilla sardinera en varios puntos entre San Evaristo e isla San José, al norte de la bahía de La Paz en el golfo de California, México, de marzo de 2008 a febrero de 2009 (fig. 1). La temperatura del agua se tomó en los lugares de muestreo y los datos de fotoperiodo para el área de estudio se obtuvieron de la siguiente página web: <http://www.usno.navy.mil/USNO/astronomical-applications/data-services/rs-one-day-world>.

Las cabrillas fueron capturadas con el uso de líneas y anzuelos, y sardina viva como carnada. Todos los individuos fueron sacrificados inmediatamente después de su captura y se les extrajo la gónada y el hígado en ese momento.

weight ( $W_{vf}$ , g) were recorded for each individual and the following somatic indexes were estimated:

$$\text{Condition factor (K)} = (W_t/L_t^3) \times 100,000$$

$$\text{Gonadosomatic index (GSI)} = (W_g/W_t) \times 100$$

$$\text{Hepatosomatic index (HSI)} = (W_h/W_t) \times 100$$

$$\text{Visceral fat index (VFI)} = (W_{vf}/W_t) \times 100$$

### Gonadal development

Ovaries and testes were processed using standard histological techniques to determine cellular types, annual variability, and the stages of gonadal development. Gonads were fixed in Davidson's AFA solution (acetic acid, formalin, and ethanol), and then subjected to a dehydration process under different ethanol concentrations and embedded in paraffin. Four- $\mu\text{m}$ -thick sections were made by microtome (Leica RM 2155) and they were mounted and stained with Harris's hematoxylin-eosin.

The relative abundance of each stage of oocyte development was determined by counting the cell types found in a total area of 11.2 mm<sup>2</sup> in each ovary. The total area was composed of nine areas of 1.24 mm<sup>2</sup> randomly selected from each gonadal lobe (Maldonado-García *et al.* 2005). Observations were made under an optical microscope (Olympus BX4). Images were captured using a digital camera (Media Cybernetics CoolSNAP-Pro colour) mounted on the microscope and processed using Image-Pro Plus software (version 5.0, Media Cybernetics).

Oocyte area was determined for the stages of development using Sigma Scan Pro software (version 5.0, SPSS Inc. 1987–1999). Theoretical diameter (TD) was calculated using the following formula (Briarty 1975, Saout *et al.* 1999):

$$\text{TD} = \sqrt{4A/\pi} \quad (1)$$

where  $A$  is the oocyte area.

### Statistical analysis

Differences in the sex ratio were verified by  $\chi^2$  tests with Yates's correction factor. The results of the somatic indexes (GSI, HSI, and VFI) were expressed as percentages and arcsine square-root transformed. One-way analysis of variance (ANOVA) for comparison of means and Duncan's tests to determine significant differences ( $P < 0.05$ ) between sampling months were performed. Pearson's correlation tests were made between GSI, HSI, VFI and K throughout the period of study. Analyses were performed using XLSTAT software for Windows (version 7.5.2, Addinsoft 1995–2004) and graphic plots were made using Sigma Plot software for Windows (version 11.0, Systat Software Inc. 2008).

### Índices somáticos

Se registró la longitud total ( $L_t$ , mm), el peso corporal sin la gónada ( $W_t$ , g), el peso de la gónada ( $W_g$ , g), el peso del hígado ( $W_h$ , g) y el peso de la grasa visceral ( $W_{gv}$ , g) de cada individuo y se estimaron los siguientes índices somáticos:

$$\text{Factor de condición (K)} = (W_t/L_t^3) \times 100,000$$

$$\text{Índice gonadosomático (IGS)} = (W_g/W_t) \times 100$$

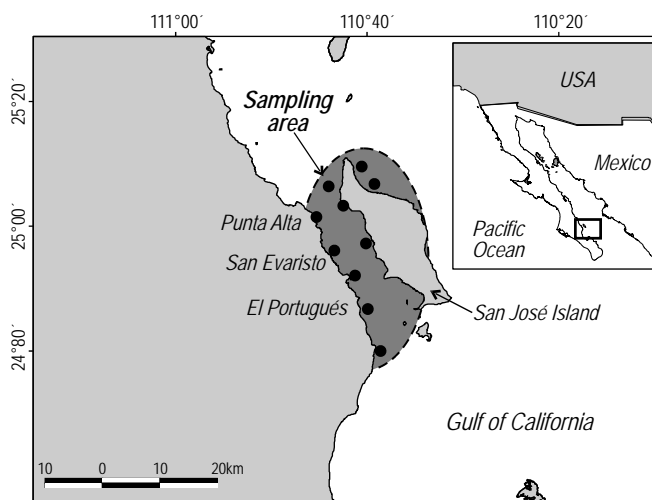
$$\text{Índice hepatosomático (IHS)} = (W_h/W_t) \times 100$$

$$\text{Índice de grasa visceral (IGV)} = (W_{gv}/W_t) \times 100$$

### Desarrollo gonádico

Los ovarios y los testículos se procesaron mediante técnicas histológicas estándar para determinar los tipos celulares, la variabilidad anual y los estadios de desarrollo gonádico. Las gónadas se fijaron en solución Davidson AFA (ácido acético, formalina y etanol), y después se pasaron por un proceso de deshidratación bajo diferentes concentraciones de etanol y se embecieron en parafina. Se hicieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor con un microtomo (Leica RM 2155) y éstos se montaron y tiñeron con hematoxilina-eosina de Harris.

La abundancia relativa de cada estadio de desarrollo de los ovocitos se determinó mediante el conteo del tipo de células encontradas dentro de un área total de 11.2 mm<sup>2</sup> en cada ovario. El área total estuvo integrada por nueve áreas de 1.24 mm<sup>2</sup> seleccionadas al azar de cada lóbulo de las gónadas (Maldonado-García *et al.* 2005). Se hicieron observaciones en un microscopio óptico (Olympus BX4). Se capturaron imágenes con una cámara digital (CoolSNAP-Pro colour, MediaCybernetics) montada sobre el microscopio y se procesaron con el *software* Image-Pro Plus (versión 5.0, Media Cybernetics).



**Figure 1.** Map showing the collection sites of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* breeders.

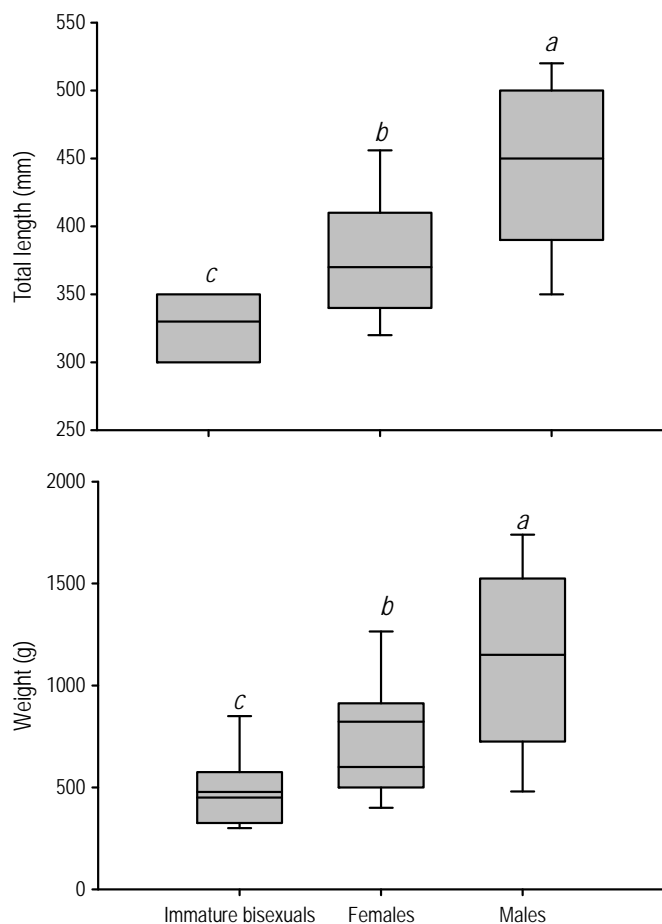
**Figura 1.** Mapa que indica los sitios donde se recolectaron los reproductores de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*.

## RESULTS

### Length, weight, and sex ratio

A total of 197 groupers were collected, of which 146 were females (74.1%), 41 were males (20.8%), 9 were classified as immature bisexuals (4.6%), and one was found in the process of changing sex (0.51%). Significant differences ( $P < 0.05$ ) in total length and body weight were found between captured groupers, males being significantly larger and heavier than females and immature bisexuals (fig. 2).

The total sex ratio was 3.6:1.0 (female:male), showing significant differences ( $\chi^2 = 3.84$ , d.f. = 1,  $P < 0.05$ ) from the expected 1:1. Statistical analysis ( $\chi^2$ ) by month revealed that during the first six months of sampling (from March to September 2008) no significant differences ( $P < 0.05$ ) regarding sex ratio were found (table 1). In August and November 2008, no males were captured. In the analysis by length class,



**Figure 2.** Differences in total length (mm) and body weight (g) of immature bisexual, female, and male *Mycteroperca rosacea*. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Figura 2.** Diferencias en la longitud total (mm) y peso corporal (g) de bisexuales inmaduros, hembras y machos de *Mycteroperca rosacea*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Se determinó el área de los ovocitos para los estadios de desarrollo por medio del *software* Sigma Scan Pro (versión 5.0, SPSS Inc. 1987–1999). Se calculó el diámetro teórico (DT) mediante la siguiente fórmula (Briarty 1975, Saout *et al.* 1999):

$$DT = \sqrt{4A/\pi} \quad (1)$$

donde  $A$  es el área del ovocito.

### Análisis estadístico

Las diferencias en la proporción de sexos se verificaron por medio de pruebas de  $\chi^2$  con factor de corrección de Yates. Los resultados de los índices somáticos (IGS, IHS e IGV) fueron expresados como porcentajes y se transformaron por medio del arco-seno de la raíz cuadrada. Se realizaron análisis de variación (ANDEVA) de una sola vía para la comparación de medias y pruebas de Duncan para determinar las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los meses de muestreo. Se hicieron pruebas de correlación de Pearson entre el IGS, el IHS y el IGV y la  $K$  a través del periodo de estudio. Los análisis se realizaron con el *software* XLSTAT para Windows (versión 7.5.2, Addinsoft 1995–2004) y las gráficas se elaboraron con el *software* Sigma Plot para Windows (versión 11.0, Systat Software Inc. 2008).

## RESULTADOS

### Talla, peso y proporción de sexos

Se recolectó un total de 197 cabrillas sardineras, de las cuales 146 fueron hembras (74.1%), 41 fueron machos (20.8%), nueve se clasificaron como bisexuales inmaduros (4.6%) y se encontró un individuo en proceso de cambio de sexo (0.51%). Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la longitud total y el peso corporal de las cabrillas sardineras capturadas; los machos fueron significativamente más grandes y pesados que las hembras y los individuos bisexuales inmaduros (fig. 2).

La proporción total de sexos fue de 3.6:1.0 (hembras a machos), y fue significativamente diferente ( $\chi^2 = 3.84$ , g.l. = 1,  $P < 0.05$ ) de la proporción esperada de 1:1. El análisis estadístico ( $\chi^2$ ) por mes reveló que, durante los primeros seis meses de muestreo (de marzo a septiembre de 2008), no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a la proporción de sexos (tabla 1). En agosto y noviembre de 2008 no se capturaron machos. En el análisis por clases de longitud, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las clases de 280–322, 333–385, 386–438, 545–597 y 598–650 mm, y las hembras fueron más abundantes dentro de estas clases. En las clases de tallas más grandes (651–703 y 704–756 mm), solamente se registraron machos (tabla 2).

**Table 1.** Sex ratio and  $\chi^2$  values with Yates's correction factor for *Mycteroperca rosacea*, from March 2008 to February 2009. The asterisk indicates significant differences from the 1:1 ratio ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 1.** Proporción de sexos y valores de  $\chi^2$  con el factor de corrección de Yates para *Mycteroperca rosacea*, de marzo de 2008 a febrero de 2009. El asterisco indica diferencias significativas de la proporción 1:1 ( $P < 0.05$ ).

Month	Females	Males	Total	$\chi^2$	Ratio (F:M)
March	7	3	10	1.225	2.3:1.0
April	8	2	10	3.025	4.0:1.0
May	9	5	14	0.875	1.8:1.0
June	8	10	18	0.34722222	0.8:1.0
July	9	11	20	0.3125	0.8:1.0
August	17	0	17		
September	14	1	15	10.41666667	14.0:1.0*
October	12	2	14	6.446428571	6.0:1.0*
November	18	0	18		
December	14	1	15	10.41666667	14.0:1.0*
January	17	2	19	11.06578947	8.5:1.0*
February	13	4	17	4.25	3.2:1.0*
Total	146	41	187	48.3802736	3.6:1.0

significant differences ( $P < 0.05$ ) were found in the classes 280–332, 333–385, 386–438, 545–597, and 598–650 mm, the females being more abundant in these classes. In the larger length classes (651–703 and 704–756 mm), only males were recorded (table 2).

### Gonadal development

Based on the images gathered, five stages of ovarian development were identified: (I) primary growth, (II) secondary growth, (III) vitellogenesis, (IV) final maturation, and (V) spawned. They are described in table 3 and illustrated in figure 3.

### Desarrollo gonádico

Con base en las imágenes obtenidas, se identificaron cinco estadios de desarrollo ovárico: (I) crecimiento primario, (II) crecimiento secundario, (III) vitelogénesis, (IV) maduración final y (V) desovado. Estos estadios de desarrollo ovárico se describen en la tabla 3 e ilustran en la figura 3.

Para los machos, según el tipo de célula espermática más avanzada que se encontró, se propusieron tres estadios de desarrollo testicular: (I) regresión, (II) maduro y (III) pospuesta. Éstos se describen en la tabla 4 e ilustran en la figura 4.

**Table 2.** Sex ratio and  $\chi^2$  values with Yates's correction factor by length class for *Mycteroperca rosacea*. The asterisk indicates significant differences from the 1:1 ratio ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 2.** Proporción de sexos y valores de  $\chi^2$  con el factor de corrección de Yates por clase de longitud para *Mycteroperca rosacea*. El asterisco indica diferencias significativas de la proporción 1:1 ( $P < 0.05$ ).

Total length (mm)	Females	Males	Total	$\chi^2$	Ratio (F:M)
280–332	31	3	34	22.24264706	10.30:1.0*
333–385	64	6	70	47.23214286	10.70:1.0*
386–438	24	7	31	8.782258065	3.43:1.0*
439–491	13	10	23	0.27173913	1.30:1.0
492–544	10	9	19	0.013157895	1.11:1.0
545–597	3	1	4	0.5625	3.00:1.0*
598–650	1	2	3	0.75	0.50:1.0*
651–703		1	1		
704–756		2	2		
Total	146	41	187	79.85444501	3.56:1.0

**Table 3.** Description of the stages of ovarian development in *Mycteroperca rosacea*. Different letters in the diameter column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.** Descripción de los estadios de desarrollo ovárico en *Mycteroperca rosacea*. Las letras diferentes en la columna de diámetro (*Diameter*) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Development stage	Oocyte stage	Description	Diameter ( $\mu\text{m} \pm \text{SE}$ )
Primary growth (I)	Chromatin nucleus	The nucleus is in the center of the oocyte, presenting a large nucleolus inside, and there is scant cytoplasm around the nucleus.	10.08 $\pm$ 0.35g
	Early perinucleolus	The oocyte volume increases, and the nucleus presents a large nucleolus and several smaller nucleoli.	35.00 $\pm$ 0.94f
	Late perinucleolus	The nucleus increases in size and has several nucleoli arranged at the periphery.	68.30 $\pm$ 1.6e
Secondary growth (II)	Cortical alveoli	They are the first structures to be observed within the ooplasm. At the beginning they appear as tiny droplets arranged at the periphery of the oocyte, but gradually they spread into the nucleus and become larger. The oocyte increases in sizes and the zona radiata just begins to appear.	93.90 $\pm$ 1.6d
	Lipidic inclusions	These structures start to appear at the same time as the cortical alveoli, but their chemical nature is different. They are originated close to the nucleus as droplets full of liquid.	152.60 $\pm$ 2.7c
Vitellogenesis (III)	Early yolk granules	Small droplets of yolk begin to appear within the ooplasm and they are stained magenta, attached to the zona radiata, but the zona radiata is thinner compared with that of the oocytes with late yolk granules.	212.50 $\pm$ 2.6b
	Late yolk granules	The yolk granules fuse and increase in size and number to fill all the ooplasm. The zona radiata is quite thick. The nucleus is still in a central position.	376.30 $\pm$ 4.9a
Final maturation (IV)	Migration of the nucleus	The nucleus migrates to the animal pole of the oocyte, yolk granules fuse and begin to merge and form the oil droplet in the center of the ooplasm.	375.70 $\pm$ 3.3a
	Hydration or spawning	The oocyte loses its shape due to the histological process. The yolk and lipids are fused forming a fluid and continuous mass and the oil droplet. The follicle becomes thinner due to a rapid increase in cell volume and the zona radiata remains visible.	
Spawned (V)		After spawning, the oocytes that were not ovulated begin a process of degeneration or atresia. The follicle shrinks, the nucleus breaks unloading its content into the cytoplasm, the yolk becomes thinner and vacuolated as a sign that it is degenerating, and eventually only the follicles are completely shrunk.	

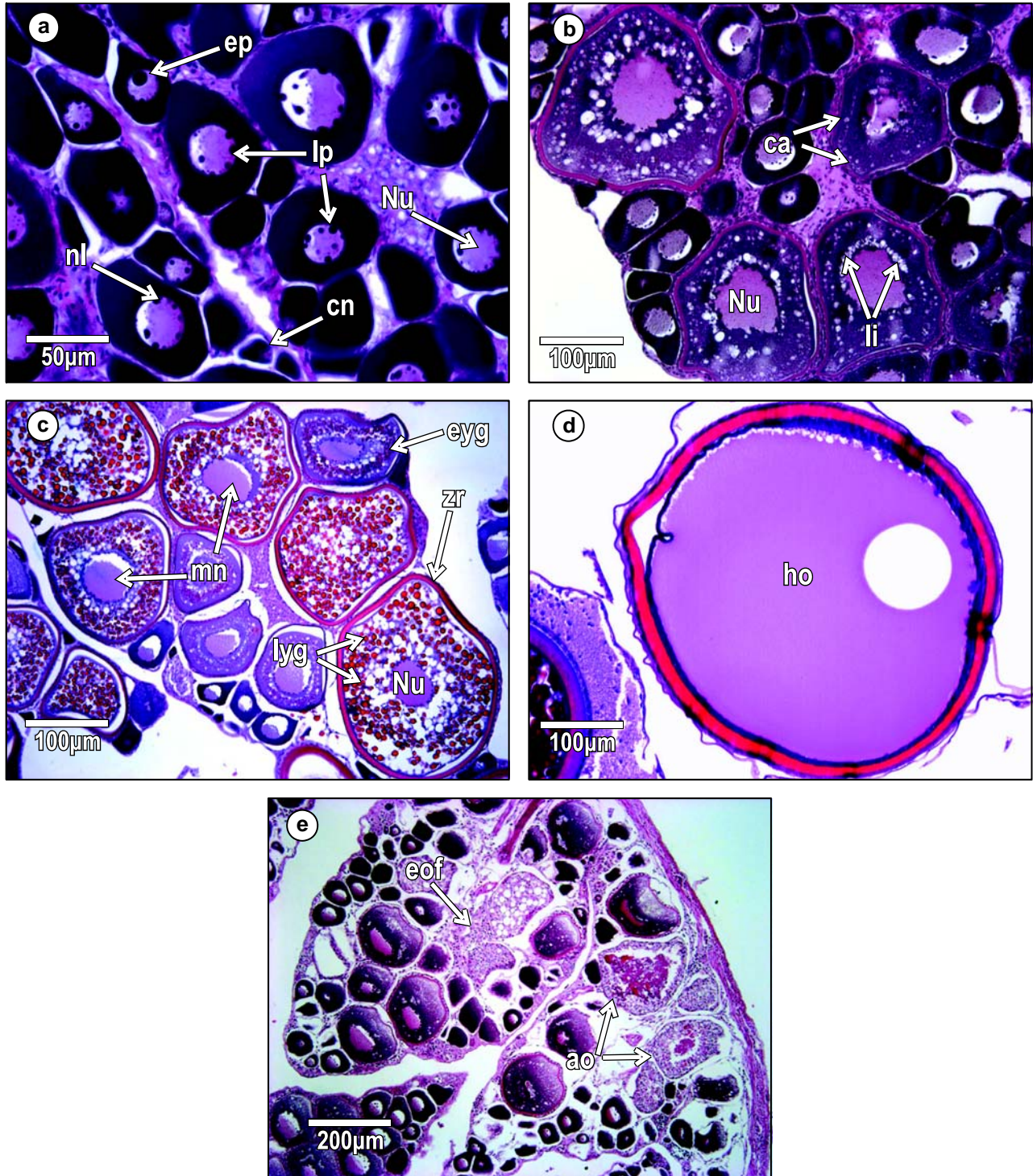
In males, according to the more advanced type of sperm cells found, three stages of testicular development were defined: (I) regressed, (II) mature, and (III) spent. They are described in table 4 and illustrated in figure 4.

### Immature bisexuals

Nine immature bisexual individuals were recorded in March ( $n = 1$ ), May ( $n = 3$ ), October ( $n = 1$ ), and December ( $n = 1$ ) 2008, and in January ( $n = 1$ ) and February ( $n = 2$ ) 2009. The gonads were small and compact with a thin wall.

### Bisexual inmaduro

Se registraron 9 individuos bisexuales inmaduros en marzo ( $n = 1$ ), mayo ( $n = 3$ ), octubre ( $n = 1$ ) y diciembre ( $n = 1$ ) de 2008, y en enero ( $n = 1$ ) y febrero ( $n = 2$ ) de 2009. Las gónadas fueron pequeñas y compactas con una pared delgada. Las lamelas gonádicas estuvieron constituidas principalmente por ovocitos en crecimiento primario y áreas dispersas de espermatogonias y espermatocitos (fig. 5). Por lo tanto, no hubo evidencia de una maduración sexual previa.



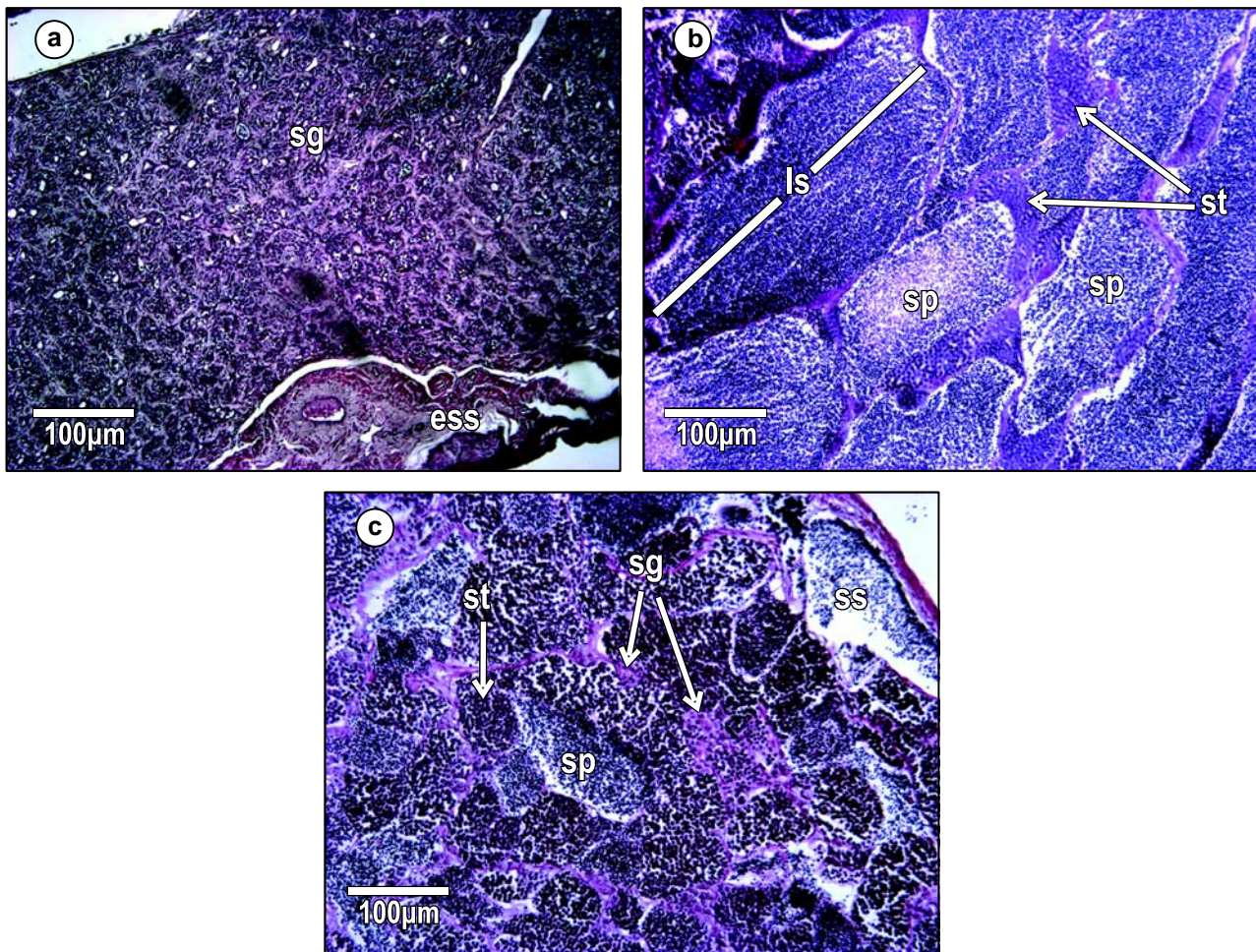
**Figure 3.** Stages of ovarian development in *Mycteroperca rosacea*: (a) primary growth, (b) secondary growth, (c) vitellogenesis, (d) final maturation, and (e) spawned. Hematoxylin-eosin stain. Nu = nucleus, cn = cortical nucleolus, ep = early perinucleolus, lp = late perinucleolus, nl = nucleolus, ca = cortical alveolus, li = lipid inclusions, eyg = early yolk granules, lyg = late yolk granules, mn = migration of the nucleus, zr = zona radiata, ho = hydrated oocyte, and eof = empty ovarian follicles.

**Figura 3.** Estadios de desarrollo ovárico en *Mycteroperca rosacea*: (a) crecimiento primario, (b) crecimiento secundario, (c) vitelogénesis, (d) maduración final y (e) desovado. Tinción con hematoxilina-eosina. Nu = núcleo, cn = nucléolo cortical, ep = perinucleolo temprano, lp = perinucleolo tardío, nl = nucleolo, ca = alveolo cortical, li = inclusiones lipídicas, eyg = gránulos de vitelo primarios, lyg = gránulos de vitelo tardíos, mn = migración del núcleo, zr = zona radiata, ho = ovocito hidratado, ao = ovocito atrésico, eof = folículos ováricos vacíos.

**Table 4.** Description of the stages of testicular development in *Mycteroperca rosacea*.

**Tabla 4.** Descripción de los estadios de desarrollo testicular en *Mycteroperca rosacea*.

Development stage	Description
Regressed	The testes are dominated by large areas of spermatogonia; sometimes a few spermatocyst and empty lobules can be observed. Sperm sinuses are present but they are compressed. Sometimes small amounts of spermatozooids can be found within the sinus or spread into the lobular spaces.
Mature	The testes are larger and they are dominated by more advanced spermatid development stages. There is a large amount of spermatozooids within the lobular spaces and within the sperm sinuses. The spermatid cells in less advanced stages are relatively less abundant. Flowing semen can be obtained by gentle abdominal pressure.
Spent	The testes have a thick wall and they contain lobular spaces and sperm sinuses partially filled with spermatozooids. The lobules are well separated and they are smaller than in the mature stage. Some spermatogonia can be observed through the lamellae.



**Figure 4.** Testicular development stages in *Mycteroperca rosacea*: (a) regressed, (b) mature, and (c) spent. Hematoxylin-eosin stain. Ess = empty spermatic sinus, ls = lobular space, sg = spermatogonia, st = spermatocysts, sd = spermatids, sp = spermatozooids, and ss = spermatic sinus.

**Figura 4.** Estadios de desarrollo testicular en *Mycteroperca rosacea*. (a) regresión, (b) maduro y (c) pospuesta. Tinción con hematoxilina-eosina. Ess = senos espermáticos vacíos, ls = espacio lobular, sg = espermatogonias, st = espermatocistos, sd = espermátides, sp = espermatozoides, ss = seno espermático.



Gonadal lamellae consisted mostly of primary growth oocytes and scattered areas of spermatogonia and spermatocytes (fig. 5). Therefore, there was no evidence of prior sexual maturation.

### Sexual transition

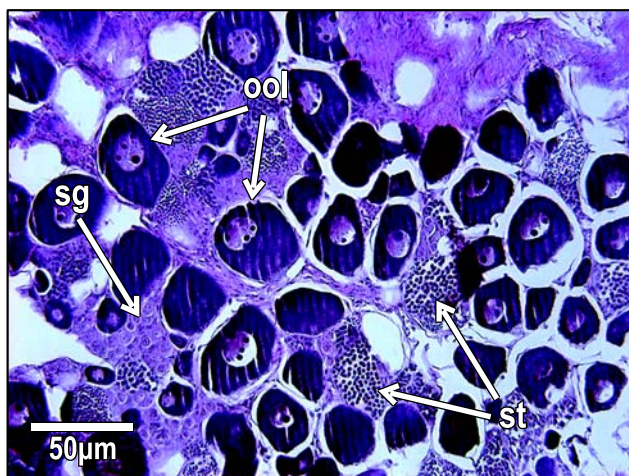
In July 2008, shortly after the spawning period, a fish (305 mm TL and 325 g) with evidence of sex change was caught. Histological analysis showed the presence of atretic oocytes and degenerated post-ovulatory follicles, as well as spermatogenic tissue in early stages of development, mainly spermatocytes (fig. 6). Such features are observed in protogynous hermaphrodite species.

### Reproductive cycle

According to the variation in somatic indexes and stages of gonadal development found throughout the period of study, the reproductive cycle of the leopard grouper was divided into four periods: (1) maturation, (2) spawning, (3) post-spawning, and (4) resting. The features of each period are described in table 5.

#### Maturation period

Two maturation periods were observed, the first from March to April 2008 and the second from January to February 2009. Gonad growth and gamete maturation occurred during this period. Both water temperature and photoperiod tended to increase gradually. In fact, the beginning of the maturation period coincided with an upward shift



**Figure 5.** Immature bisexual stage in *Mycteroperca rosacea*. Hematoxylin-eosin stain. Sg = spermatogonia, st = spermatocysts, and ool = primary growth oocytes.

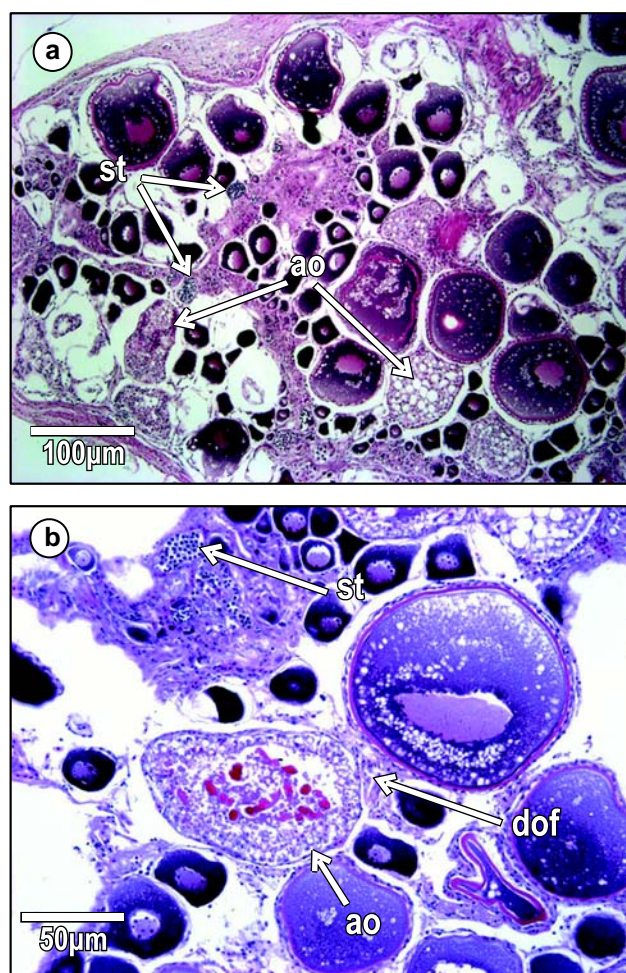
**Figura 5.** Estadio bisexual inmaduro en *Mycteroperca rosacea*. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Sg = espermatogonias, st = espermatocistos, ool = ovocitos en crecimiento primario.

### Transición sexual

En julio de 2008, poco después del periodo de desove, se capturó un pez (305 mm LT y 325 g) con evidencia de cambio de sexo. Los análisis histológicos mostraron la presencia de ovocitos atréticos y folículos posovulatorios degradados, así como de tejido espermatogénico en los primeros estadios de desarrollo, principalmente espermatocitos (fig. 6). Tales características se observan en las especies hermafroditas protogínicas.

### Ciclo reproductivo

De acuerdo con las variaciones en los índices somáticos y en los estadios de desarrollo gonádico encontrados durante



**Figure 6.** Sexual transition in *Mycteroperca rosacea* visualized at (a) 10X and (b) 20X. Hematoxylin-eosin stain. Ao = atretic oocytes, st = spermatocysts, and dof = degenerating ovarian follicles.

**Figura 6.** Transición sexual en *Mycteroperca rosacea* con un enfoque de (a) 10X y (b) 20X. Tinción con hematoxilina-eosina. Ao = ovocitos atréticos, st = espermatocitos, dof = folículos ováricos degradados.

**Table 5.** Description of the different periods of the reproductive cycle of *Mycteroperca rosacea*.

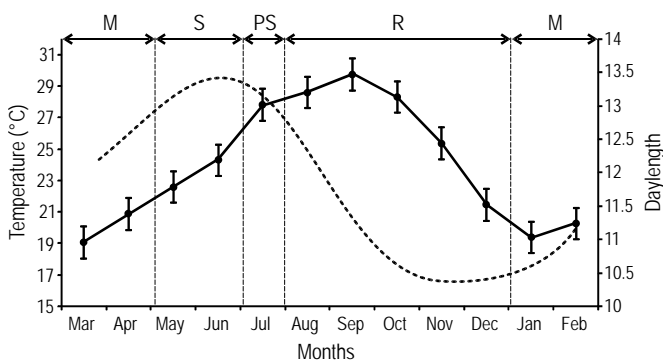
**Tabla 5.** Descripción de los diferentes periodos del ciclo reproductivo de *Mycteroperca rosacea*.

Period	Description
Maturation	The vitellogenesis process begins, followed by the final maturation of oocytes in females. The males are already mature and flowing semen can be obtained.
Spawning	The eggs are delivered into the surrounding water and they are fertilized by the males.
Post-spawning	Both the vitellogenic oocytes that were not delivered and the empty follicles undergo a process of atresia. Some flowing semen can still be obtained from a few males but most of them are spawned or spent.
Resting	Only oogonia and oocytes in primary growth are observed in the female gonads, while the males are in the regressed stage.

in these parameters (fig. 7). In the maturation period of 2008, females showed a high percentage ( $82.2 \pm 5.3\%$ ) of vitellogenic oocytes, and fewer secondary growth oocytes ( $14.6 \pm 2.7\%$ ) and primary growth oocytes ( $2.8 \pm 3.1\%$ ). At the same time, a high percentage ( $58.3 \pm 11.8\%$ ) of mature males and a few immature males ( $41.7 \pm 11.8\%$ ) were observed. In the maturation period of 2009, primary growth oocytes were the most abundant ( $51.5 \pm 7.3\%$ ), followed by secondary growth oocytes ( $31.8 \pm 2.2\%$ ), but a significant proportion of vitellogenic oocytes ( $16.7 \pm 9.5\%$ ) were also observed. There was no change in the proportion of mature and immature males regarding 2008 (fig. 8).

#### Spawning period

Only one spawning period occurred from May to July 2008, when water temperature ranged from 21 to 25 °C and photoperiod was 13–13.5 h of daylight (the highest recorded over the year) (fig. 7). These results mean fish were mobilizing stored energy mostly to support gonad



**Figure 7.** Variations in water temperature (solid line) and photoperiod (dotted line) at the collecting sites from March 2008 to February 2009. Error bars indicate standard deviation. M = maturation period, S = spawning period, PS = post-spawning period, and R = resting period.

**Figura 7.** Variaciones de la temperatura del agua (línea continua) y el fotoperiodo (línea punteada) en los lugares de captura de marzo de 2008 a febrero de 2009. M = periodo de maduración, S = periodo de desove, PS = periodo de posdesove, R = periodo de reposo. Las barras de error indican la desviación estándar.

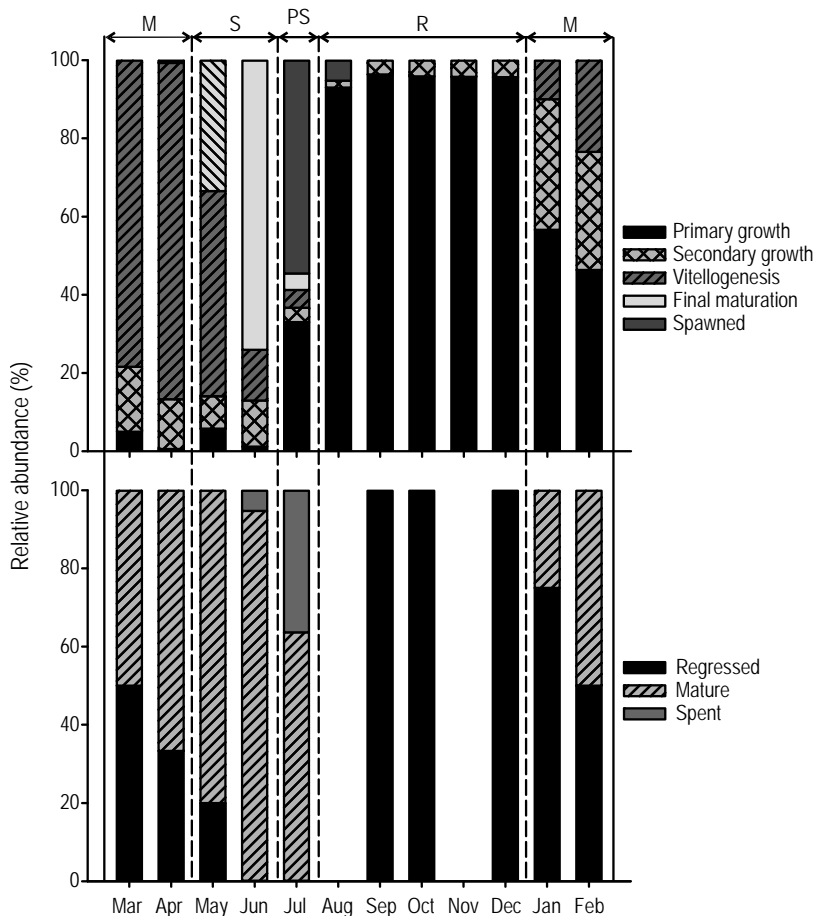
el periodo de estudio, el ciclo reproductivo de la cabrilla sardinera se dividió en cuatro periodos: (1) maduración, (2) desove, (3) posdesove y (4) reposo. Las características de cada periodo se describen en la tabla 5.

#### Periodo de maduración

Se observaron dos periodos de maduración: el primero de marzo a abril de 2008 y el segundo de enero a febrero de 2009. El crecimiento gonádico y la maduración de los gametos se observaron durante este periodo. Tanto la temperatura del agua como el fotoperiodo tendieron a incrementarse gradualmente. De hecho, el inicio del periodo de maduración coincidió con un cambio a la alza en esos parámetros (fig. 7). En el periodo de maduración de 2008, las hembras presentaron un alto porcentaje ( $82.2 \pm 5.3\%$ ) de ovocitos vitelogénicos, menos ovocitos en crecimiento secundario ( $14.6 \pm 2.7\%$ ) y ovocitos en crecimiento primario ( $2.8 \pm 3.1\%$ ). Al mismo tiempo, se observó un alto porcentaje ( $58.3 \pm 11.8\%$ ) de machos maduros y unos cuantos inmaduros ( $41.7 \pm 11.8\%$ ). En el periodo de maduración de 2009, los ovocitos en crecimiento primario fueron los más abundantes ( $51.5 \pm 7.3\%$ ), seguidos por los ovocitos en crecimiento secundario ( $31.8 \pm 3.2\%$ ), pero también se observó una proporción significativa de ovocitos vitelogénicos ( $16.7 \pm 9.5\%$ ). No hubo cambios en la proporción de machos maduros e inmaduros con respecto al 2008 (fig. 8).

#### Periodo de desove

Sólo se observó un periodo de desove, que se presentó de mayo a julio de 2008, cuando la temperatura del agua varió entre 21 y 25 °C y el fotoperiodo fue de 13 a 13.5 h de luz (el más alto registrado durante el año) (fig. 7). Estos resultados sugieren que los peces estaban movilizando su energía almacenada principalmente para apoyar el desarrollo gonádico. Durante este periodo, tanto los ovocitos vitelogénicos ( $32.7 \pm 27.9\%$ ) como los ovocitos en maduración final ( $53.7 \pm 28.7\%$ ) predominaron en las hembras. La mayoría de los machos capturados en este periodo presentaron esperma fluyente (machos maduros) ( $87.3 \pm 10.4\%$ ) por medio de un leve masaje abdominal y también se empezaron a observar



**Figure 8.** Relative abundance of oocyte types in females and development stages of male *Mycteroperca rosacea*, from March 2008 to February 2009. M = maturation period, S = spawning period, PS = post-spawning period, and R = resting period.

**Figura 8.** Abundancia relativa de los tipos de ovocitos encontrados en hembras y estadios de desarrollo de machos de *Mycteroperca rosacea*, de marzo de 2008 a febrero de 2009. M = periodo de maduración, S = periodo de desove, PS = periodo de posdesove, R = periodo de reposo.

development. During this period, both vitellogenic oocytes ( $32.7 \pm 27.9\%$ ) and final maturation (hydrated) oocytes ( $53.7 \pm 28.7\%$ ) predominated in females. Most males caught throughout this period released sperm (mature males) ( $87.3 \pm 10.4\%$ ) after gentle abdominal massage and some spent males began to be observed too (fig. 8). Factor K in this period was lower than in the maturation period for both sexes, but the GSI and HSI percentages were high unlike those of the VFI, which reached the lowest level (fig. 9). In fact, a significant positive correlation was found between GSI and HSI ( $GSI = 0.241 - 0.2310 HSI$ ;  $P = 0.000142$ ), while significant negative correlations were found between GSI and VFI ( $GSI = -0.599 + 0.5920 VFI$ ;  $P = 1.086 \times 10^{-19}$ ), and GSI and K ( $GSI = -0.151 + 1.2899 K$ ;  $P = 0.0384$ ) throughout the entire cycle in both sexes.

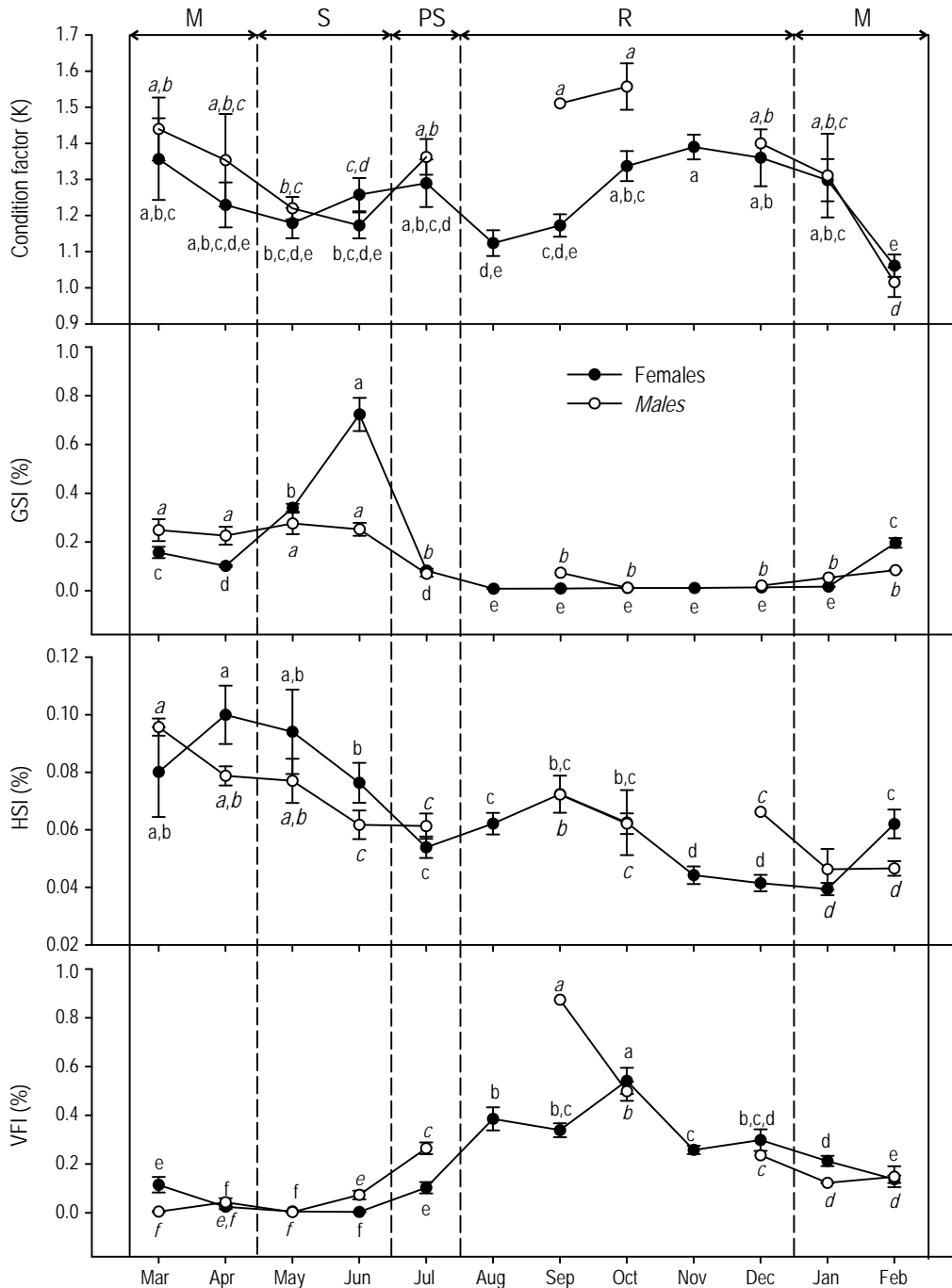
#### Post-spawning period

The post-spawning period lasted only one month (July) and was the shortest of the reproductive cycle. The photoperiod began to decline gradually, but water temperature kept

unos machos en pospuesta (fig. 8). El factor K en este periodo fue menor que del periodo de maduración en ambos sexos, pero los porcentajes del IGS y el IHS fueron altos a diferencia del IGTV, el cual alcanzó su nivel más bajo (fig. 9). De hecho, se encontró una correlación positiva significativa entre el IGS y el IHS ( $IGS = 0.241 - 0.2310 IHS$ ;  $P = 0.000142$ ), mientras que se observó una correlación negativa entre el IGS y el IGTV ( $IGS = -0.599 + 0.5920 IGTV$ ;  $P = 1.086 \times 10^{-19}$ ), y el IGS y K ( $IGS = -0.151 + 1.2899 K$ ;  $P = 0.0384$ ) durante el ciclo entero en ambos sexos.

#### Periodo de posdesove

El periodo de posdesove fue el más corto del ciclo reproductivo debido a que sólo duró un mes (julio). El fotoperiodo comenzó a declinar gradualmente, pero la temperatura del agua siguió incrementándose hasta alcanzar un promedio de  $27^\circ\text{C}$  (fig. 7). En este periodo se registró el porcentaje más alto de ovocitos atrésicos ( $54.5\%$ ), el estadio de crecimiento primario empezó a incrementarse gradualmente ( $33\%$ ) y aun hubo algunos remanentes de ovocitos vitelogénicos ( $4.6\%$ ) y



**Figure 9.** Monthly changes in somatic indexes (GSI = gonadosomatic index, HSI = hepatosomatic index, and VFI = visceral fat index) of female (normal letters, black circles) and male (italic letters, white circles) *Mycteroperca rosacea*. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). M = maturation period, S = spawning period, PS = post-spawning period, and R = resting period.

**Figura 9.** Cambios mensuales en los índices somáticos (GSI = índice gonadosomático, HSI = índice hepatosomático y VFI = índice de grasa visceral) de hembras (letras normales, círculos negros) y machos (letras cursivas, círculos blancos) de *Mycteroperca rosacea*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). M = periodo de maduración, S = periodo de desove, PS = periodo de posdesove, R = periodo de reposo.

rising until reaching a mean of 27 °C (fig. 7). During this period, we recorded the highest percentage of atretic oocytes (54.5%), the primary growth stage began to increase gradually (33%), and there were still some remnants of vitellogenic

en estadio de maduración final (4.2%). El porcentaje de machos en pospuesta se incrementó (36.4%), pero aún se encontró un alto porcentaje (63.6%) de machos maduros (fig. 8). Tanto el IGS como el IHS se redujeron de manera

oocytes (4.6%) and of the final maturation stage (4.2%). The percentage of spent males increased (36.4%), but a high percentage (63.6%) of mature males were still found (fig. 8). Both GSI and HSI fell significantly, while VFI and K began to increase (fig. 9).

#### Resting period

The resting period was the longest of the cycle, covering five months, from August to December 2008. The highest water temperatures ( $29.8 \pm 1.3$  °C) were recorded during this period, in September, but then began to decline. The photoperiod continued to decline until reaching the minimum number of daylight hours (10.5 h) in December (fig. 7). Primary growth oocytes predominated in females ( $95.3 \pm 1.3\%$ ), while all captured males were immature (fig. 8). In this phase, most of the energy intake from food was intended for functions like body growth or stored as fat in the abdomen, and less was channelled into gonad development and gamete production. This effect caused the GSI to reach the lowest percentage in the cycle, but the VFI and K reached the highest percentages (fig. 9).

## DISCUSSION

Variability in the population sex ratio is determined by several factors including environmental, genetic, behavioral, physiological, and evolutionary components, with the 1:1 ratio occurring more commonly in nature (Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2010). However, Alonzo and Mangel (2005) mentioned that important commercial fish populations usually present differences in size, weight, and sex ratios due to the effect of size selectivity on species when one sex has a higher growth rate than the other. In this study, we found a sex ratio of 3.6:1.0 (female:male), which is similar to the sex ratios reported for other serranid fish: 2.4:1.0 for *Epinephelus morio* (Collins *et al.* 2002), 3.3:1.0 for *Mycteroperca microlepis* (Brulé *et al.* 2003), and 3.5:1.0 for *M. rubra* (Aronov and Goren 2008).

Significant differences ( $P < 0.05$ ) in total length and body weight were found for *M. rosacea*, males being significantly larger and heavier than females and immature bisexuals. Moreover, in the sex ratio analysis by length class, females were not recorded in the larger classes (651–703 and 704–756 mm), which means that this species shows sexual dimorphism. Erisman *et al.* (2008), however, failed to find differences in the size distribution of mature males and females of this species.

Aburto-Oropeza *et al.* (2008) reported that this species forms aggregations during the spawning period, in which several males surround a female, swim frantically to the surface, and simultaneously release eggs and sperm in all directions. In this study, we collected a higher number of male individuals during the spawning period, almost half of those captured throughout the cycle, but during the rest of the year

significativa, mientras que el IGV y la K empezaron a incrementarse (fig. 9).

#### Periodo de reposo

El periodo de reposo fue el más largo del ciclo reproductivo, con una duración de cinco meses, de agosto a diciembre de 2008. Durante este periodo se registraron las temperaturas del agua más altas ( $29.8 \pm 1.3$  °C), en septiembre, pero después empezaron a declinar. El fotoperiodo se mantuvo con una tendencia a la baja hasta alcanzar el mínimo de horas luz (10.5 h) en diciembre (fig. 7). Los ovocitos en crecimiento primario predominaron en las hembras ( $95.3 \pm 1.3\%$ ), mientras que todos los machos capturados estaban inmaduros (fig. 8). En esta fase, la mayor parte de la energía ingerida fue destinada a funciones como el crecimiento corporal o almacenada como grasa en el abdomen; se destinó menos energía al crecimiento gonádico y a la producción de gametos. Este efecto provocó que el IGS alcanzara su porcentaje más bajo en el ciclo, pero el IGV y la K alcanzaron sus porcentajes más altos (fig. 9).

## DISCUSIÓN

La variabilidad en la proporción de sexos dentro de una población está determinada por varios factores que incluyen componentes ambientales, genéticos, fisiológicos, evolutivos y de comportamiento, y la proporción 1:1 es la que se encuentra comúnmente en la naturaleza (Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2010). Sin embargo, Alonzo and Mangel (2005) mencionaron que las poblaciones de peces de importancia comercial generalmente presentan diferencias en tamaño, peso y proporción de sexos debido al efecto de la selectividad de tallas en aquellas especies en las que uno de los sexos tiene una mayor tasa de crecimiento. En este estudio se encontró una proporción de sexos de 3.6:1.0 (hembras a machos), similar a lo observado en otros peces serránidos: 2.4:1.0 para *Epinephelus morio* (Collins *et al.* 2002), 3.3:1.0 para *Mycteroperca microlepis* (Brulé *et al.* 2003) y 3.5:1.0 para *M. rubra* (Aronov and Goren 2008).

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la longitud total y peso corporal para *M. rosacea*; los machos fueron significativamente más grandes y pesados que las hembras y los individuos bisexuales inmaduros. Además, en el análisis de proporción de sexos por clase de longitud no se registraron hembras en las clases más altas (651–703 y 704–756 mm), lo que significa que hay un dimorfismo sexual en esta especie. Sin embargo, Erisman *et al.* (2008) no encontraron diferencias en la distribución de tallas de machos y hembras maduros de esta especie.

Aburto-Oropeza *et al.* (2008) documentaron que esta especie forma agregaciones durante el periodo de desove, en el cual varios machos rodean a una hembra, nadan frenéticamente hacia la superficie y simultáneamente liberan los huevos y el esperma en todas direcciones. En el presente estudio

they were scarce; this may be because they migrate to other places and only get together during spawning. This behavior has also been documented for other serranid species like *Plectropomus leopardus* and *P. maculatus* on the Great Barrier Reef (Russell 2001), and particularly for species belonging the genus *Mycteroperca* that inhabit the western Atlantic, such as *M. microlepis*, *M. phenax* (Gilmore and Jones 1992), *M. bonaci* (Fine 1990), *M. venenosa* (Beets and Freidlander 1992), and *M. tigris* (Sadovy *et al.* 1994).

Histological analyses of different regions of the leopard grouper ovary (anterior, middle, and posterior) showed homogeneous oocyte development. The frequency of the different stages of development indicated group-synchronous ovarian development (Wallace and Selman 1981), as the presence of two predominant groups of oocytes (primary and secondary growth) was observed during most of the year, except during the spawning period, which was characterized by hydrated and vitellogenic oocytes. This type of ovarian development has also been reported for other epinephelids such as *Epinephelus akaara* (Tseng and Ho 1988), *E. rivulatus* (Mackie 2000), *E. marginatus* (Marino *et al.* 2001), and *E. merra* (Lee *et al.* 2002).

In relation to the testicular development stages, we observed the presence of males with flowing semen from March to July 2008 and some specimens in January and February 2009. This reproductive feature occurs in other teleosts (Piferrer 2001) such as *Dicentrarchus labrax* (Carrillo *et al.* 1989), *Centropomus undecimalis* (Grier and Taylor 1998), and *C. medius* (Maldonado-García *et al.* 2005).

Immature bisexual individuals were not very numerous in the present study. This finding is supported by Erisman *et al.* (2008), who also reported the presence of these individuals. A distinctive feature of immature bisexual fish is the presence of testicular and ovarian tissue without any evidence of prior maturation; therefore, they have not reached sexual maturity. Specifically, they do not present a thick membrane or gonad germ cells in advanced stages of development, and the size of these fish is smaller than that of the smallest mature females or males. This immature bisexual phase can occur in both gonochoristic and hermaphroditic species and has been observed in many species of serranids, including *Epinephelus striatus*, a gonochoristic species (Sadovy and Colin 1995), and *Cephalopholis boenak*, a protogynous hermaphrodite (Chan and Sadovy 2002, Liu and Sadovy 2004). Hence, this bisexual immature stage is not suggestive of sex change (Sadovy and Liu 2008).

It is worth noting the finding, in the present study, of an individual whose gonad features belong to an organism in sexual transition, specifically from female to male: i.e., a protogynous hermaphrodite organism. This characteristic was also reported by Kiewek-Martínez *et al.* (2010) for leopard groupers kept in captivity; however, Erisman *et al.* (2008) did not obtain evidence of sex change in any individual collected in Bahía de los Ángeles throughout their study and, consequently, the leopard grouper is classified as a gonochorist

se recolectó un gran número de machos durante el periodo de desove, casi la mitad de los capturados en todo el ciclo, pero durante el resto del año fueron escasos; esto se puede deber a que tal vez migren a otros lugares y solamente se reúnan durante el desove. Este comportamiento también se ha observado en otras especies de serránidos como *Plectropomus leopardus* y *P. maculatus* en la gran barrera de arrecifes (Russell 2001), y particularmente en especies pertenecientes al género *Mycteroperca* que habitan en el Atlántico oeste, como *M. microlepis*, *M. phenax* (Gilmore y Jones 1992), *M. bonaci* (Fine 1990), *M. venenosa* (Beets y Freidlander 1992) y *M. tigris* (Sadovy *et al.* 1994).

Los análisis histológicos de las diferentes regiones de los ovarios (anterior, media y posterior) apuntaron hacia un desarrollo homogéneo de los ovocitos. Las frecuencias de los diferentes estadios de desarrollo indicaron que el desarrollo ovárico es del tipo sincrónico por grupo (Wallace y Selman 1981), ya que se observaron dos grupos de ovocitos (crecimiento primario y secundario) predominantes durante la mayor parte del año; excepto durante el desove, que se caracteriza por la presencia de ovocitos hidratados y vitelogénicos. Este tipo de desarrollo ovárico también se ha registrado en otros epinefélidos como *Epinephelus akaara* (Tseng y Ho 1988), *E. rivulatus* (Mackie 2000), *E. marginatus* (Marino *et al.* 2001) y *E. merra* (Lee *et al.* 2002).

En relación a los estadios de desarrollo testicular, se observó la presencia de machos con esperma fluyente de marzo a julio de 2008 y algunos especímenes en enero y febrero de 2009. Esta característica reproductiva también se presenta en otros teleósteos (Piferrer 2001) tales como *Dicentrarchus labrax* (Carrillo *et al.* 1989), *Centropomus undecimalis* (Grier y Taylor 1998,) y *C. medius* (Maldonado-García *et al.* 2005).

Los individuos bisexuales inmaduros no fueron muy numerosos en el presente estudio. Este hallazgo coincide con lo encontrado por Erisman *et al.* (2008), quienes también registraron la presencia de estos individuos. La característica distintiva de los peces bisexuales inmaduros es la presencia de tejido testicular y ovárico sin ninguna evidencia de maduración previa; por lo tanto, no han alcanzado la madurez sexual. Específicamente, estos peces no presentan una membrana gruesa o células germinales en estadios avanzados de desarrollo, y las tallas de éstos son menores que las de los machos y hembras maduros más pequeños. Esta fase bisexual inmadura puede presentarse tanto en especies gonocóricas como hermafroditas y se ha observado en muchas especies de serránidos tales como *Epinephelus striatus*, que es una especie gonocórica (Sadovy y Colin 1995), y *Cephalopholis boenak*, que es especie hermafrodita protogínica (Chan y Sadovy 2002, Liu y Sadovy 2004). Por lo tanto, el estadio bisexual inmaduro no es sugerente del cambio de sexo (Sadovy y Liu 2008).

Vale la pena notar el hallazgo, en el presente trabajo, de un individuo cuyas características gonádicas pertenecen a un organismo en transición sexual, específicamente de hembra a

species. We can therefore assume that this species has the potential for sex change, but information about the factors that trigger and govern that behavior is currently not available. This confirms the complexity of sex patterns displayed by teleost fishes and especially those belonging to the family Serranidae, which exhibit great diversity in sexual patterns even within certain genera. Simultaneous hermaphroditism and protogynic sex change are well documented and gonochorism also occurs, but there are no reports of protandry in the family (Sadovy and Domeier 2005, Sadovy and Liu 2008).

Environmental factors, mainly photoperiod and temperature, profoundly affect the reproductive cycle of teleosts, and the response to this influence differs depending on the species (Carrillo *et al.* 1989, Bromage *et al.* 1992). In this study we observed that the spawning period of the leopard grouper occurred when water temperature averaged 22 °C and there was 13 h of light. This is similar to that observed by Kiewek-Martínez *et al.* (2010), who stated that the natural spawning period of the leopard grouper in captivity occurred at water temperatures of 22–23.5 °C.

The maximum GSI and HSI values were also detected during the spawning period, while VFI and K were significantly lower. In terms of VFI and K, inverse correlations were found relative to GSI and HSI. That tendency has been described by Bromage *et al.* (1992), who observed that fishes undergo important modifications because of gonadal growth and differentiation. Some species undergo starvation periods just before spawning when the gonads grow, reducing the levels of energetic reserves and, therefore, VFI and K decrease significantly but recover after spawning.

This variation in the indexes has been described for *E. merra* (Nakamura *et al.* 2007), whose levels of GSI and sex steroids such as estradiol and testosterone were highest during the spawning period and lowest during the growth and resting periods.

In conclusion, the leopard grouper showed group-synchronous ovarian development with a single spawning period throughout the year when water temperature ranged from 21 to 23 °C. This species has the potential for sex change under certain circumstances that are still unknown. This information should be taken into account in fisheries and aquaculture management plans in order to avoid the overexploitation of this species and achieve its complete reproductive manipulation in captivity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT) for funding the project. Thanks to E Calvillo, J Angulo, and M León and his family for assistance in the capture of the specimens. Special thanks to C Rodríguez-Jaramillo and ME Meza-Chávez for their support in the Histology Laboratory at CIBNOR, and to

macho; es decir, un organismo hermafrodita protogínico. Esta característica también fue registrada por Kiewek-Martínez *et al.* (2010) para cabrillas sardineras mantenidas en cautiverio: sin embargo, Erismán *et al.* (2008) no obtuvieron evidencia de cambio de sexo en ningún individuo recolectado en bahía de los Ángeles y, consecuentemente, la cabrilla sardinera está clasificada como una especie gonocórica. Por lo tanto, sólo se puede suponer que esta especie tiene el potencial de cambiar de sexo, pero la información sobre los factores que disparan y gobiernan ese comportamiento no está disponible. Esto confirma la complejidad en los patrones sexuales desplegados por los peces teleosteos y especialmente los pertenecientes a la familia Serranidae, lo que exhibe la gran diversidad en los patrones sexuales aun dentro de ciertos géneros. El hermafroditismo simultáneo y el cambio de sexo protogínico están bien documentados, aunque también se presenta el gonochorismo, pero no existen registros de protandria en la familia (Sadovy y Domeier 2005, Sadovy y Liu 2008).

Los factores ambientales, principalmente el fotoperiodo y la temperatura, afectan profundamente los ciclos reproductivos de los teleosteos, y la respuesta a esta influencia difiere dependiendo de la especie (Carrillo *et al.* 1989, Bromage *et al.* 1992). En el presente estudio se observó que el periodo de desove de la cabrilla sardinera se presenta cuando la temperatura del agua es, en promedio, de 22 °C y el fotoperiodo de 13 h de luz. Esto es similar a lo observado por Kiewek-Martínez *et al.* (2010), quienes establecieron que el periodo natural de desove de la cabrilla sardinera en cautiverio ocurría a temperaturas de 22 a 23.5 °C.

Los valores máximos del IGS y el IHS también se registraron durante el periodo de desove, mientras que el IGV y la K fueron significativamente menores. En términos de IGV y K, se encontró una correlación inversa con respecto al IGS y al IHS. Esta tendencia ha sido descrita por Bromage *et al.* (1992), quienes establecieron que los peces sufren modificaciones importantes debido al crecimiento y diferenciación de las gónadas. Algunas especies pasan por periodos de ayuno justo antes del desove, cuando las gónadas crecen, lo que reduce los niveles de reservas energéticas y, por lo tanto, el IGV y la K se reducen significativamente, pero se recuperan después del desove.

Esta variación en los índices se ha descrito para *E. merra* (Nakamura *et al.* 2007), cuyos niveles de IGS y esteroides sexuales como estradiol y testosterona fueron muy altos durante el periodo de desove; los niveles más bajos se presentaron durante el periodo de crecimiento y reposo.

En conclusión, la cabrilla sardinera mostró un desarrollo ovárico del tipo sincrónico por grupo con un solo periodo de desove durante el año, cuando la temperatura varió entre 21 y 23 °C. Esta especie tiene el potencial de cambiar de sexo bajo ciertas circunstancias que hasta ahora son desconocidas. Esta información debe ser tomada en cuenta en los planes de manejo pesquero y acuícola con el fin de evitar la sobreexplotación de esta especie y lograr su manejo reproductivo completo en cautiverio.

H Acosta-Salmón for his reviews and comments on the manuscript.

## REFERENCES

- Aburto-Oropeza O, Erisman B, Valdez-Ormelas C, Danemann G. 2008. Serránidos de importancia comercial del Golfo de California: Ecología, pesquerías y conservación. *Cienc. Conserv.* 2008(1): 1–23.
- Alonzo SH, Mangel M. 2005. Sex-change rules, stock dynamics, and the performance of spawning-per-recruit measures in protogynous stocks. *Fish. Bull.* 103: 229–245.
- Aronov A, Goren M. 2008. Ecology of mottled grouper (*Mycteroperca rubra*) in the eastern Mediterranean. *Electron. J. Ichthyol.* 2: 43–55.
- Beets J, Friedlander A. 1992. Stock analysis and management strategies for red hind, *Epinephelus guttatus*, in the U.S. Virgin Islands. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 42: 66–80.
- Briarty LG. 1975. Stereology: Methods for quantitative light and electron microscopy. *Sci. Prog.* 62: 1–32.
- Bromage NR, Jones J, Randall C, Thrush M, Davies B, Springate J, Duston J, Barker G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141–166.
- Brulé T, Dénier C, Colás-Marrufo T, Renán X. 2003. Reproductive biology of gag in the southern Gulf of Mexico. *J. Fish. Biol.* 63: 1505–1520.
- Carrillo M, Bromage NR, Zanuy S, Serrano R, Prat F. 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 81: 351–365.
- Chan TTC, Sadovy Y. 2002. Reproductive biology, age and growth in the chocolate hind, *Cephalopholis boenak* (Bloch 1790), in Hong Kong. *Mar. Freshwat. Res.* 53: 791–803.
- Collins LA, Fitzhugh GR, Lombardi-Carlson LA, Lyon HM, Walling WT, Oliver DW. 2002. Characterization of red grouper (Serranidae: *Epinephelus morio*) reproduction from the eastern Gulf of Mexico. National Marine Fisheries Service. Panama City Laboratory. Contribution Series 2002–07.
- Craig MT, Sadovy Y. 2008. *Mycteroperca rosacea*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>.
- Díaz-Uribe JG, Elorduy-Garay JF, González-Valdovinos MT. 2001. Age and growth of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in the southern Gulf of California, Mexico. *Pac. Sci.* 55: 171–182.
- Erisman BE, Rosales-Casián JA, Hastings PA. 2008. Evidence of gonochorism in a grouper, *Mycteroperca rosacea*, from the Gulf of California, Mexico. *Environ. Biol. Fish.* 82: 23–33.
- Fine, JC. 1990. Groupers in love: Spawning aggregations of Nassau groupers in Honduras. *Sea Frontiers* 36: 42–45.
- Gilmore RG, Jones RS. 1992. Color variation and associated behavior in the epinepheline groupers *Mycteroperca microlepis* (Goode and Bean) and *M. phenax* (Jordan and Swain). *Bull. Mar. Sci.* 51: 83–103.
- Grier HJ, Taylor RG. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish. Biol.* 53: 521–524.
- Guerrero-Estévez S, Moreno-Mendoza M. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 20: 101–121.
- Heemstra PC, Randall JE. 1993. *FAO Species Catalogue*. Vol. 16. Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper,

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el financiamiento del proyecto. Nuestro agradecimiento a E Calvillo, J Angulo, M León y su familia por la ayuda en la captura de los especímenes. Agradecemos especialmente a C Rodríguez-Jaramillo y ME Meza-Chávez su apoyo en el Laboratorio de Histología del CIBNOR, y a H Acosta-Salmón su revisión y comentarios a este manuscrito.

- rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. *FAO Fish. Synop.* 125(16):382 p.
- Kiewek-Martínez NM, Gracia-López V, Rodríguez-Jaramillo C. 2010. Evidence of sexual transition in leopard grouper individuals (*Mycteroperca rosacea*) (Streets 1877) held in captivity. *Hidrobiológica* 20: 233–239.
- Lee YD, Park SH, Takemura A, Takano K. 2002. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycles in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawan waters. *Fish. Sci.* 68: 872–877.
- Liu M, Sadovy Y. 2004. The influence of social factor on adult sex change and juvenile sexual differentiation in a diandric protogynous epinepheline, *Cephalopholis boenak* (Pisces: Serranidae). *J. Zool.* 264: 239–248.
- Mackie M. 2000. Reproductive biology of the halfmoon grouper, *Epinephelus rivulatus*, at Ningaloo Reef, western Australia. *Environ. Biol. Fish.* 57: 363–376.
- Maldonado-García MC, Gracia-López V, Carrillo M, Hernández-Herrera A, Rodríguez-Jaramillo C. 2005. Stages of gonad development during the reproductive cycle of the blackfin snook, *Centropomus medius* Günther. *Aquacult. Res.* 36: 554–563.
- Marino G, Azzurro E, Massari A, Finola MG, Mandich A. 2001. Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. *J. Fish. Biol.* 58: 909–927.
- Munro AD. 1990. General introduction. In: Munro AD, Scott AP, Lam TJ (eds.), *Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences*. CRC Press, Boca Raton, 1–12 pp.
- Nakamura M, Alam MA, Kobayashi Y, Bhandari RK. 2007. Role of sex hormones in sex change of grouper. *Fish. Physiol. Biochem. Spec. Issue*: 23–27.
- Piferrer F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229–281.
- Russell M. 2001. Spawning aggregations of reef fishes on the Great Barrier Reef: Implications for management. Queensland, Australia, 37 pp.
- Sadovy Y, Colin PL, Domeier ML. 1994. Aggregation and spawning in the tiger grouper, *Mycteroperca tigris* (Pisces: Serranidae). *Copeia* 2: 511–516.
- Sadovy Y, Colin PL. 1995. Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *J. Fish. Biol.* 46: 961–976.
- Sadovy Y, Domeier ML. 2005. Perplexing problems of sexual patterns in the fish genus *Paralabrax* (Serranidae, Serraninae). *J. Zool.* 267: 121–133.
- Sadovy Y, Liu M. 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish. Fish.* 9: 1–43.
- Saout C, Paulet YM, Duinker A. 1999. Histological study on the early stages of oogenesis in *Pecten maximus*: A new approach



- with quantitative semithin histology. 12th International Pectinid Workshop, Bergen, Norway, pp. 129–130.
- Thompson DA, Lloyd TF, Kerstitch AN. 2000. Reef Fishes of the Sea of Cortez. University of Texas Press, 353 pp.
- Tseng WY, Ho SK. 1988. The Biology and Culture of Red Grouper. Chien Cheng Publisher, Kaohsiu, 134 pp.
- Wallace R, Selman K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325–343.

*Received March 2011;*  
*accepted June 2011.*