JMLS 한국해양생명과학회지[Journal of Marine Life Science]
December 2019; 4(2): 63-69
http://jmls.or.kr

[보 문]

호르몬 처리에 의한 붉바리 *Epinephelus akaara*의 배란유도

박종연[1] · 조재권[2] · 박충국[3] · 한경호[1] · 홍창기[4*]

[1]전남대학교 수산과학과
[2]국립수산과학원 남동해수산연구소
[3]전라남도 해양수산과학원 해양수산과학관
[4]국립수산과학원 남해수산연구소

Induced Ovulation by Hormone Treatments in Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*

Jong-Youn Park[1], Jae-Kwon Cho[2], Chung-Kug Park[3], Kyeong-Ho Han[1], Chang-Gi Hong[4*]

[1]Department of Fisheries Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
[2]South East Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Tongyeong 53085, Korea
[3]Jeonnam Maritime and Fisheries Science Museum, Yeosu 59771, Korea
[4]South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Korea

Corresponding Author
Chang-Gi Hong
South Sea Fisheries Research Institute,
National Institute of Fisheries Science,
Yeosu 59780, Korea
E-mail : cknara@naver.com

Received : December 03, 2019
Revised : December 04, 2019
Accepted : December 09, 2019

본 연구는 붉바리 배란유도를 위해 다양한 호르몬과(ovaprim, pimozide, LHRHa, HCG)과 LHRHa의 농도별 효과를 조사하였다. LHRHa는 50 μgkg^{-1}, 100 μgkg^{-1}, 150 μgkg^{-1}, 200 μgkg^{-1}의 농도로 처리하였다. 호르몬은 등 근육에 주사하였으며, 조사 결과 LHRHa 단독, 그리고 LHRHa와 Pimozide를 혼합하여 투여했을 때 가장 효과적이었으며, 두 실험구 사이의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 LHRHa를 단독으로 사용하는 것이 가장 효율적인 것으로 판단된다. 그리고 LHRHa를 다양한 농도로 처리하여 배란유도 효과를 조사한 결과 100 μgkg^{-1}의 농도로 투여했을 때 가장 우수한 것으로 조사되었다.

This study aims to investigate how ovulation induction of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* varies when treated with different hormonal substances such as ovaprim, pimozide, LHRHa, and HCG. As for LHRHa, we injected it at four different concentrations: 50 μgkg^{-1}, 100 μgkg^{-1}, 150 μgkg^{-1}, and 200 μgkg^{-1}. All hormonal substances including LHRHa were injected into the back muscles. Buoyant, embryonic survival, fertilization, and hatching rate were the highest in LHRHa and LHRHa + pimozide group. When LHRHa was injected at different concentrations, buoyancy and fertilization rate were the highest in 100 μgkg^{-1} group. Embryonic survival and hatching rate were the highest in 150 μgkg^{-1}. Based on these experimental results, we concluded that LHRHa at the concentration of 100 μgkg^{-1} is the most efficient for the ovulation induction in this fish species.

Keywords: Hormone(호르몬), Aquaculture(양식), Ovulation induction(배란유도), Grouper (바리과), Red spotted grouper(붉바리)

서 론

1. 실험구 및 실험어

바리과(Family Serranidae) 어류는 전 세계 3조원 이상의 시장 규모를 가지고 있고, 중화권을 중심으로 고가로 소비되고 있는 어종으로, 아시아 지역에서 주로 양식하고 있다(Kohno et al., 1993; Harikrishnan et al., 2012). 그 중 붉바리, *Epinephelus akaara*는 중국, 대만, 동남아시아, 일본 중부이남 지역으로 대부분 아열대 및 열대 해역의 암초와 산호초가 있는 지역에 분포한다. 국내에서는 남해안 일부 연안, 특히 거문도 해역을 중심으로 남쪽으로는 제주도, 북쪽으로는 소리도 및 욕지도 등지에 분포하고 있다(Kohno et

al., 1993; Harikrishnan et al., 2012). 현재까지 붉바리에 관한 연구로는 산란습성과 초기생활사(Ukawa and Higuchi, 1966), 생식소 발달(Hwang et al., 1988), 정자 동결보존(Qiutao et al., 2011) 등에 관한 연구가 보고되었다. 국내에서는 성장호르몬 발현(Kang et al., 2003), 성숙과 성전환(Lee et al., 1998), 먹이생물(Lee and Hur, 1998), 난질변화(Lee et al., 1997), 난 발생과 자치어 형태 발달(Park et al., 2016), 잡종 수정란 부화(Noh et al., 2015) 등 많은 연구가 보고되었다. 이러한 다양한 연구에도 불구하고 산업체에서 요구하고 있는 붉바리의 양질의 수정란 확보 기술과 초기먹이생물 등 종묘생산에 대한 연구는 미비한 실정이다.

산업적으로 중요한 어류의 종자생산에 있어 가장 중요한 요소 중 하나는 일시에 다량의 우량 수정란을 확보해야 하는 것이다(Hong et al., 2015). 자연산란이 어려운 어류의 수정란 생산을 위해서는 호르몬 처리를 통해 수정란 생산을 하고 있다(Chen, 1990; Tucker et al., 1994). 이러한 이유로 대부분 바리과 어류의 수정란 생산은 삽관법(cannulation)으로 난모세포의 내외의 크기를 확인한 후 호르몬을 처리하여 자연산란을 유도하거나 복부를 압박하여 채란, 채정하여 수정란을 생산한다. 국내에서도 붉바리 대량종자생산을 위해 어미를 해상가두리 또는 육상수조에서 관리하며 산란기에 어미를 선별하여 호르몬 처리 후 복부를 압박하여 수정란을 생산한다. 일반적으로 어류의 인위적인 배란유도를 위해 사용하고 있는 호르몬은 HCG (human chorionic gonadotropin), GnRH (gonadotropin releasing hormone), LHRHa (luteinizing hormone releasing hormone analogue) 등을 사용하는데, 최근에는 Pimozide를 혼합하여 사용하거나 Ovaprim을 이용하기도 한다(Watanabe et al., 1998; Tamaru et al., 1996; Hassin et al., 1997; Park et al., 1998; Marino et al., 2003). 이러한 호르몬 및 호르몬 유도체 처리에 의한 배란유도 방법은 같은 종에 있어서도 어미 사육관리의 환경조건 및 호르몬의 종류와 처리 농도에 따라 반응이 다르기 때문에 우량 수정란 확보를 위해서는 적정 호르몬의 종류와 처리 농도를 결정하는 것이 매우 중요하다(Soyano et al., 1993; Jang, 1996). 하지만 호르몬 종류 및 농도에 따른 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다(Hong et al., 2015).

따라서 본 연구에서는 해상가두리 양식장에서 사육한 붉바리 어미의 안정적인 우량 수정란 확보를 위해서 Ovaprim, HCG, LHRHa 및 Pimozide를 처리하고 배란유도 효과와 호르몬 처리조건에 따른 수정률, 부상률, 난 발생생존율 및 부화율을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 2013년 6월에 전남 여수시 거문도 해역에서 채집한 자연산 붉바리를 해상가두리(5×5×5 m)에서 양성한 후 2014년 6월 성숙한 어미 후보군 중 복부팽만도와 생식공의 발달 정도에 따라 선별하여 2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA)을 200 ppm으로 희석시킨 해수로 마취시켜 호르몬을 처리하였다.

2. 호르몬 종류별 배란유도

적정 호르몬 종류를 구명하기 위해 성숙한 암컷(전장 36.2±5.1 cm, 체중 753.4±53.5 g) 각각 10마리씩 호르몬 종류별로 배란을 유도하였다(Table 1). 호르몬 종류는 Ovaprim [salmon GnRHa (sGnRHa: DArg^6, Pro^{9}Net sGnRH), Domperidone; Syndel Laboratories LTD., Canada], Pimozide (Sigma Co. LLC., USA), LHRHa (desGly^{10}, DAla^6; Sigma Co. LLC., USA) 및 HCG (Daesung Microbiological Labs., LTD, Korea)였으며, 각 호르몬 농도는 Ovaprim는 0.5 mlkg^{-1}, LHRHa + Pimozide은 100 μgkg^{-1} + 1,000 μgkg^{-1}, LHRHa은 100 μgkg^{-1} 및 HCG은 500 IUkg^{-1}였다. 각 종류별 호르몬을 제1극조 하부의 등 근육에 주사하고 48시간 경과 후 복부압박법으로 채란하여 건식법으로 수정시킨 후 부상률 및 수정률을 관찰하였고, 수정란을 대상으로 발생 과정에서 생존율 및 부화율을 계수하였다.

Table 1. Hormones and their concentrations injected to induce ovulation in female *E. akaara*

Hormone treatment	Concentration of injection	TL (cm)	BW (g)	No. of fish	Ref.
Ovaprim	0.5 mlkg^{-1}	36.4±4.5	754.2±58.1	10	Chowdhury et al. (2010) DiMaggio et al. (2013)
LHRHa + Pimozide	100 μgkg^{-1} + 1,000 μgkg^{-1}	35.4±6.9	764.8±42.8	10	De Leeuw et al. (1985) Park et al. (1998) Lim et al. (2012)
LHRHa	100 μgkg^{-1}	36.7±5.3	743.5±61.8	10	Liao and Leano (2008)
HCG	500 μgkg^{-1}	36.3±3.7	750.9±51.2	10	Song et al. (2008)

Each value represents mean ± S.D. TL: total length, BW: body weight, Ref.: reference

Table 2. Concentration of LHRHa injected to induce ovulation in female *E. akaara*

Hormone treatment	Concentration of injection	TL (cm)	BW (g)	No. of fish
LHRHa	50 μgkg^{-1}	35.8±3.5	677.5±51.8	10
LHRHa	100 μgkg^{-1}	35.7±2.2	651.9±70.8	10
LHRHa	150 μgkg^{-1}	35.2±5.7	639.5±81.4	10
LHRHa	200 μgkg^{-1}	36.3±4.9	724.3±42.1	10

Each value represents mean ± S.D. TL: total length, BW: body weight

3. LHRHa 농도별 배란유도

호르몬 종류에 따른 배란유도 효과 결과를 토대로 LHRHa의 농도에 따른 배란유도 효과를 조사하였다. LHRHa의 처리 농도별 실험구는 50 μgkg^{-1}, 100 μgkg^{-1}, 150 μgkg^{-1} 및 200 μgkg^{-1} 구간으로 구분하여 제1극조 하부의 등 근육에 주사하고 48시간 경과 후 복부압박법으로 채란하여 건식법으로 수정시킨 후 부상률 및 수정률을 관찰하였고 수정란을 대상으로 발생과정에서 생존율 및 부화율을 측정하였다(Table 2). 각 실험구에서 암컷(전장 35.8±4.1 cm, 체중 673.3±61.5 g) 각각 10마리씩 호르몬 처리를 하였다.

결 과

1. 호르몬 종류별 배란유도

해상가두리에서 관리된 어미 후보군을 대상으로 호르몬 종류에 대한 배란유도 효과를 조사한 결과 4가지 호르몬 종류에 따른 개체별 평균 채란량은 Ovaprim 0.5 mlkg^{-1} 농도로 처리한 구간에서는 143.8±10.3 ml으로 그 중 70.8±14.6 ml가 부상하였고, LHRHa-Pimozide (LHRHa 100 μgkg^{-1} + Pimozide 1,000 μgkg^{-1}) 처리한 구간에서는 155.8±6.9 ml가 채란되었고 그 중 137.4±8.5 ml가 부상하였다. LHRHa 100 μgkg^{-1} 농도로 처리한 구간에서는 176.0±4.47 ml가 채란되었고 그 중 159.6±6.1 ml가 부상하였고, HCG 500 IUkg^{-1} 농도로 처리한 구간에서는 185.2±8.58 ml가 채란되었고 그 중 72.6±19.1 ml가 부상하였다(Fig. 1).

부상률, 수정률, 발생생존율 및 부화율을 산정한 결과 부상률은 Ovaprim은 49.7±20.3%, LHRHa-Pimozide는 88.2±4.9%, LHRHa는 90.6±2.3%, HCG는 39.2±10.6%로 LHRHa 처리한 실험구가 가장 높았다. 수정률은 Ovaprim은 70.2±10.0%, LHRHa-Pimozide는 88.4±3.4%, LHRHa는 85.9±4.0%, HCG는 75.4±18.0%로 LHRHa-Pimozide 혼합 처리 실험구가 가장 높았다. 발생생존율은 Ovaprim은 65.5±18.9%, LHRHa-Pimozide는 90.2±10.1%, LHRHa는 86.9±3.5%, HCG는 64.2±12.3%로 LHRHa-Pimozide 혼합 처리 실험구가 가장 높았다. 부화율은 Ovaprim은 66.3±20.5%, LHRHa-Pimozide는 85.4±2.5%, LHRHa는 87.5±3.3%, HCG는 53.5±18.2%로 LHRHa 처리 실험구가 가장 높았다(Fig. 2).

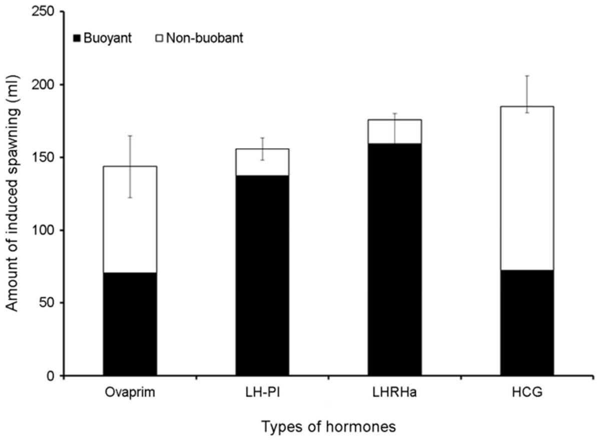

Fig. 1. Amount of spawned eggs by various hormone treatments in *E. akaara*. LH-PI: LHRHa + Pimozide (n=10 of each type of hormone). Ovaprim: 0.5 mlkg^{-1}, LH-PI: LHRHa 100 μgkg^{-1} + Pimozide 1,000 μgkg^{-1}, LHRHa: 100 μgkg^{-1}, HCG: 500 IUkg^{-1}.

2. LHRHa 농도별 배란유도

호르몬 종류에 대한 배란유도 효과 LHRHa 처리 실험구가 가장 효과가 좋았으며, 이를 토대로 LHRHa 농도를 각기 다르게 처리하여 배란을 유도하였다. LHRHa 호르몬 농도에 따른 개체별 평균 채란량은 LHRHa 50 μgkg^{-1} 농도로 처리 실험구에서는 166.8±6.1 ml으로 그 중 139.6±17.3 ml가 부상하였고, LHRHa 100 μgkg^{-1} 처리한 구간에서는 169.2±3.7 ml가 채란되었고 그 중 152.6±4.7 ml가 부상하였다. LHRHa 150 μgkg^{-1} 농도로 처리한 실험구에서는 170.6±12.3 ml가 채란되었고 그 중 151.0±3.7 ml가 부상하였고, LHRHa 200 μgkg^{-1} 농도로 처리한 실험구에서는 173.9±9.9 ml가 채란되었고 그 중 133.8±15.9 ml가 부상하였다(Fig. 3).

부상률, 수정률, 발생생존율과 부화율을 산정한 결과, 부상률은

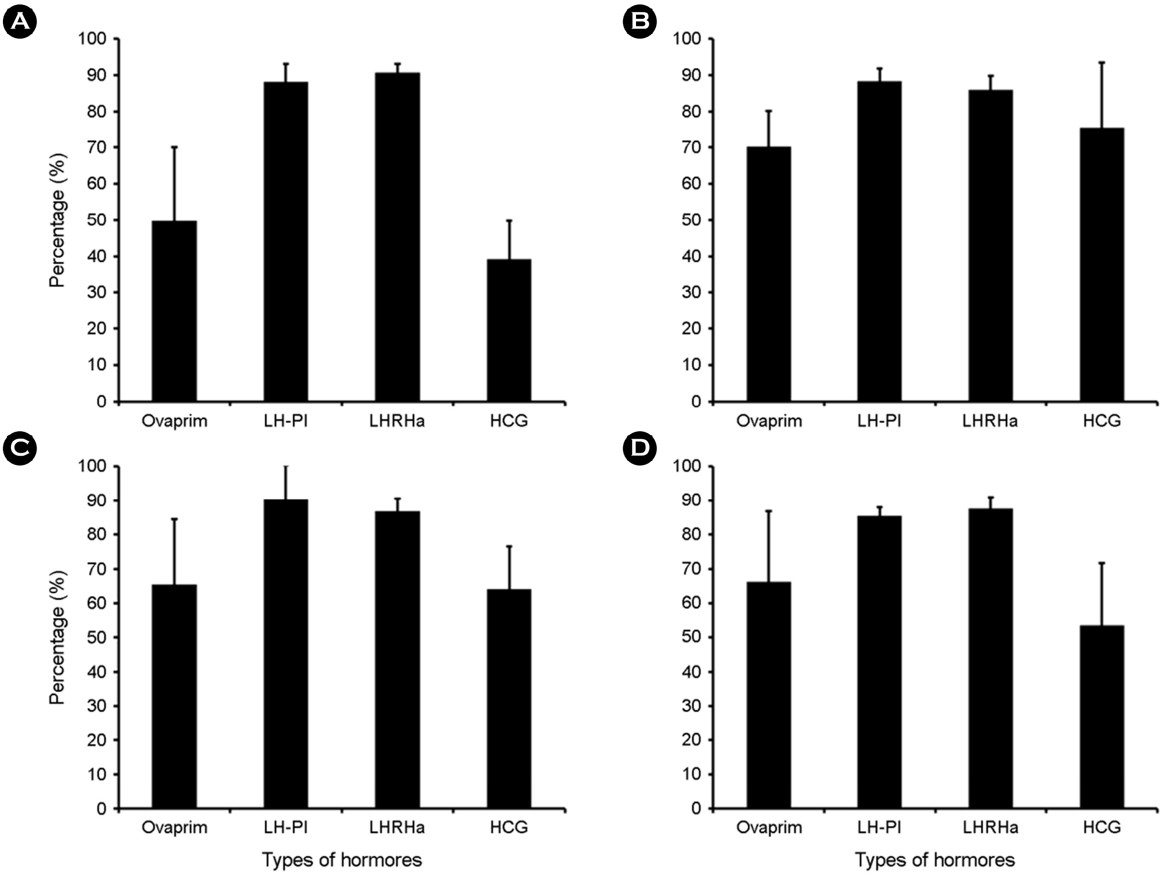

Fig. 2. Buoyancy, fertilization, embryonic survival, and hatching rates of eggs obtained by various hormone treatments in *E. akaara*. LH-PI: LHRHa + Pimozide. Ovaprim: 0.5 $mlkg^{-1}$, LH-PI: LHRHa 100 μgkg^{-1} + Pimozide 1,000 μgkg^{-1}, LHRHa: 100 μgkg^{-1}, HCG: 500 $IUkg^{-1}$. (A): buoyancy rate, (B): fertilization rate, (C): embryonic survival rate, (D): hatching rate.

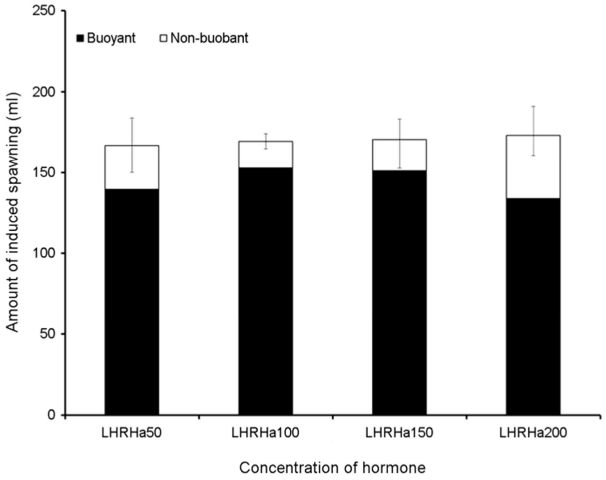

Fig. 3. Amount of spawned eggs by concentration of LHRHa in *E. akaara* (n=10 of each concentration of hormone). LHRHa50: LHRHa 50 μgkg^{-1}, LHRHa100: LHRHa 100 μgkg^{-1}, LHRHa150: LHRHa 150 μgkg^{-1}, LHRHa200: LHRHa 200 μgkg^{-1}.

LHRHa50은 83.7±20.3%, LHRHa100은 90.2±2.7%, LHRHa150은 88.9±6.9%, LHRHa200은 77.5±10.0%로 LHRHa100에서 가장 높았다. 수정률은 LHRHa50은 86.4±2.2%, LHRHa100은 87.8±1.6%, LHRHa 150은 85.5±1.9%, LHRHa200은 83.3±2.7%로 LHRHa100에서 가장 높았으며, 발생생존율은 LHRHa50은 85.1±18.9%, LHRHa-100은 86.6±10.1%, LHRHa150은 89.9±3.5%, LHRHa200은 82.5±12.3%로 LHRHa150에서 가장 높았다. 마지막으로 부화율은 LHRHa-50은 80.1±14.6%, LHRHa100은 84.5±2.5%, LHRHa150은 85.9±3.3%, LHRHa200은 78.7±8.9%로 LHRHa150에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 4).

고 찰

호르몬 및 호르몬 유도제 처리에 의한 배란유도 방법은 같은 종에 있어서도 개체마다 반응이 다르고, 사육관리의 환경조건 및 호르몬의 종류와 처리 농도에 따라 다르기 때문에 우량 수정란 확보를 위해서는 대상 어종에 대한 적정 호르몬의 종류와 처리 농

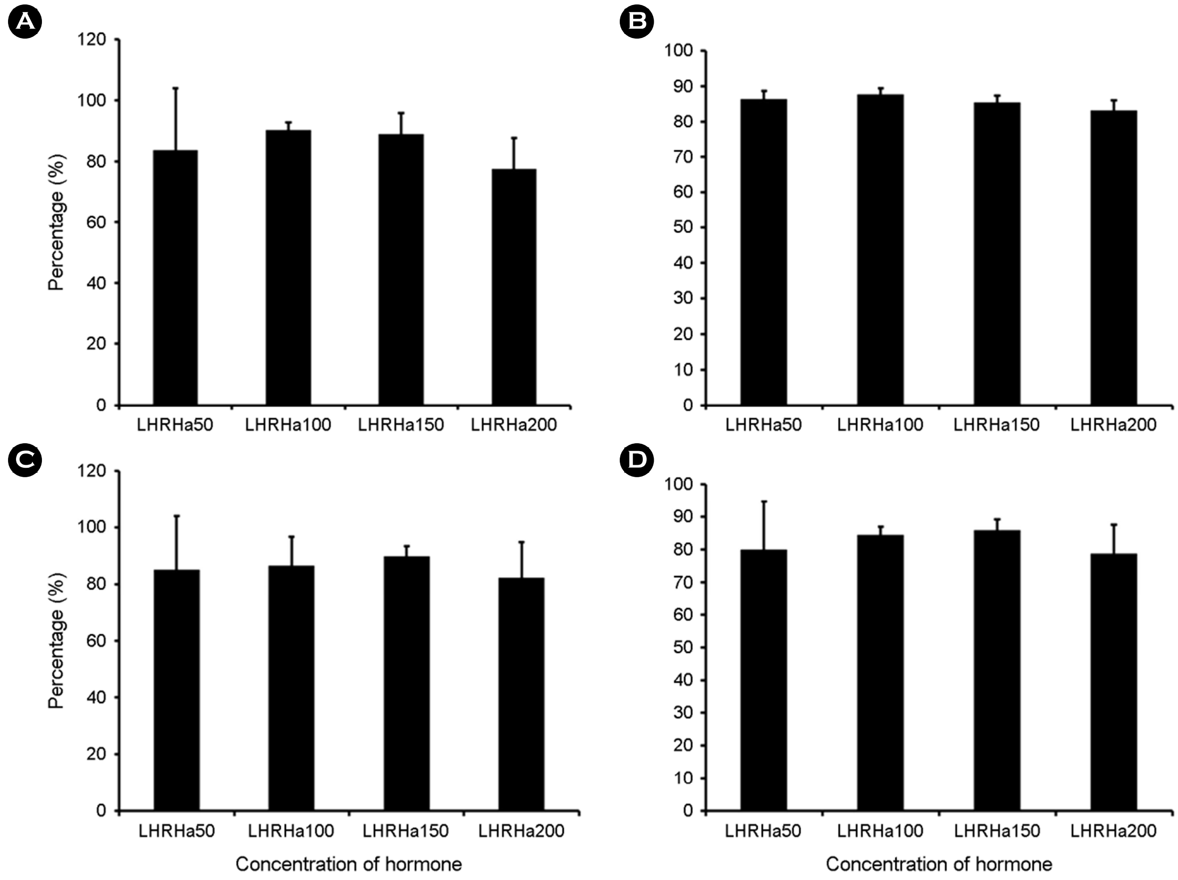

Fig. 4. Buoyancy, fertilization, embryonic survival, and hatching rates of eggs obtained by concentration of LHRHa in *E. akaara*. LHRHa50: LHRHa 50 μgkg^{-1}, LHRHa100: LHRHa 100 μgkg^{-1}, LHRHa150: LHRHa 150 μgkg^{-1}, LHRHa200: LHRHa 200 μgkg^{-1}. (A): buoyant rate, (B): fertilization rate, (C): embryonic survival rate, (D): hatching rate.

도를 결정하는 것이 매우 중요하다(Soyano et al., 1993; Jang, 1996). 일반적으로 어류 종자생산 시 수정란 생산을 위해 HCG, LHRHa 등의 호르몬을 사용하며(Tamaru et al., 1996; Hassin et al., 1997; Marino et al., 2003), 최근에는 Pimozide와 Ovaprim이 이용되기도 한다(Watanabe et al., 1998; Tamaru et al., 1996; Hassin et al., 1997; Park et al., 1998; Marino et al., 2003). HCG는 사용이 간편하고, 난모세포의 최종성숙 및 배란유도에 빠른 효과를 가지고 있어 종묘생산에서 많이 사용되고 있지만(Lam, 1982; Donaldson and Hunter, 1983; Hodson and Sullivan, 1993), 호르몬 처리 이후에 동 개체에 처리제에 대한 내성이 생기고, 생식소에 직접적으로 영향을 주어 난질 저하의 원인이 되며, 수정률 및 부화율에 영향을 주는 문제점이 발생하고 있다(Kwon et al., 1996). 본 연구에서도 HCG를 이용한 배란유도 시 수정률, 부화율 등 난질이 가장 떨어지는 결과를 보여주었다. LHRHa/GnRHa는 면역반응을 유발시키지 않으며, LH의 방출을 유도하여 생식소 발달에 균형 잡힌 자극을 줄 수 있고, 합성이 용이하여 질병감염 우려가 적은 것으로 알려져 있다. 또한 어류 종간 GnRH 구조의 유사함 때문에 광범위하게 사용이 가능하지만(Sherwood et al., 1994; Zohar and Mylonas, 2001), 효과와 반응에 대한 많은 시간이 요구되는 문제점을 가지고 있다(Crim et al., 1988; Zohar et al., 1989). 본 연구에서도 LHRHa를 단독으로 처리하거나 Pimozide와 혼합하여 사용했을 때 난질이 가장 우수한 것으로 나타났으며, LHRHa 호르몬 처리 농도와 성숙까지 걸리는 시간에 밀접한 관계가 있으므로 처리 농도와 성숙시간에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이번 연구에서 붉바리 암컷 어미의 배란 유도 시 LHRHa를 사용한 실험구가 가장 효과적이었고, 다음으로 LHRHa와 Pimozide를 혼합한 실험구가 효과적이었다. Ovaprim과 HCG를 사용한 실험구는 비효율적으로 이러한 결과는 같은 바리과 어류인 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*)와 비슷한 결과를 보여주었다(Hong et al., 2015). Sokolowska et al. (1984)와 Lin et al. (1985)의 연구에서는 LHRHa와 Pimozide를 혼합했을 때가 LHRHa를 단독으로 사용할 때보다 효과적이었지만, 본 연구 결과와 차이가 크지 않아

실질적으로 차이가 없는 것으로 보아 담수어와 해수어의 종 특이성에 의한 것으로 사료된다. 또한 Okumura and Sakae (1993) 연구에서의 물가자미(*Eopsetta grigorjewi*), 참돔(*Pagrus major*)과 같이 난황 축적에서 성숙까지 시간이 걸리는 다회 산란종은 성숙 촉진을 위해 서서히 방출되는 성질의 LHRHa의 호르몬 투여가 효과적이라고 하였다. 본 연구 결과도 다회산란 어종인 붉바리 어미의 성숙 및 배란유도에 LHRHa의 호르몬이 가장 효과적이었다.

결론적으로 본 연구의 결과로 볼 때 붉바리의 종묘생산 시 호르몬 처리는 LHRAa를 투여하는 것이 가장 효과적이었고, 100 $\mu g kg^{-1}$의 농도로 처리하는 것이 가장 안정적으로 수정란을 확보하는데 효율적이라고 판단된다.

사 사

이 논문은 2019년도 국립수산과학원 수산시험연구사업(R-2019004)의 지원으로 수행된 연구입니다.

참고문헌

Chen LC. 1990. Grouper culture. In: Aquaculture in Taiwan. Fishing News Books Oxford 103-107.

Chowdhury M, Chatterjee A, Mondal, A, Chatterji U. 2010. Ovaprim abrogates expression of GnRH receptor-II in the Indian catfish. International Journal of Biology 2.

Crim LW, Nestor JJ Jr, Wilson CE. 1988. Studies of the biological activity of LHRH analogue in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. Gen Comp Endocrinol 71: 372-382.

De Leeuw R, Goos HJ, Richter CJJ, Eding EH. 1985. Pimozide-LHRHa induced breeding of the african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture 44: 295-302.

DiMaggio MA, Broach JS, Ohs CL. 2013. Evaluation of ovaprim and human chorionic gonadotropin doses on spawning induction and egg and larval quality of pinfish, *Lagodon rhomboides*. Aquaculture 414-415.

Donaldson EM, Hunter GA. 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology. Reproduction Vol IXB Academic press Orlando FL 351-403.

Harikrishnan R, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. 2012. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in Epinephelus bruneus against Vibrio alginolyticus infection. Aquaculture 326-329.

Hassin SD, De Monbrison Y, Hanin A, Elizur Y, Zohar, Popper DM. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. Aquaculture 156: 305-316.

Hodson R, Sullivan CV. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected HCG. Aquacult Fish Manage 24: 389-398.

Hong CG, Cho JK, Park JY, Son MH, Park JM, Han KH, Kang HW. 2015. Ovulation induction effect of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by treating hormones. J Kor Soc Fish Mar Sci 27: 981-989.

Hwang SI, Lee YD, Song CB, Rho S. 1988. Gonadal Development and the effects of 17α-methyltestosterone. J Aqua Korean 11: 173-182.

Jang SI. 1996. Induced ovulation by using human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone analogue plus pimozide in yellow puffer, *Takifugu obscurus*. Korean J Aquacult 9: 3-10.

Kang GY, Song CB, Lee JH. 2003. Cloning of growth hormone complementary DNA from red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) and its expression in E.coli. J Aqua Korean 16: 110-117.

Kohno H, Diani S, Supriatna A. 1993. Morphological development of larval and juvenile grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. Japanese Journal of Ichthyology 40: 307-316.

Kwon HC, Choi NJ, Park HY. 1996. Induced ovulation on catfish (*Silurus asotus*) by GnRH-Analogue. Korean J Aquacult 9: 205-213.

Lam TJ. 1982. Application of endocrinology of fish culture. Can. J Aquat Fish Sci 39: 11-137.

Lee CK, Hur SB, Park S, Kim BG. 1997. Qualities of spawned eggs during the spawning period in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J of Aqua 10: 463-472.

Lee CK, Hur SB. 1998. Effect of live food and water temperature on larval survival of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J of Aqua 11: 565-572.

Lee CK, Hur SB, Ko TS, Park S. 1998. Maturation, sex ratio and sex-reversal of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J of Aqua 11: 573-580.

Lee CK, Hur SB. 1997. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J of Aquacult 10: 473-483.

Liao IC, Leano EM. 2008. The Aquaculture of Grouper. AFS WAS FST NTOU 49-60.

Lim SG, Kim KS, Kim YS, Han HG, Kim EO. 2012. Effect of HCG, LHRHa, Ovaprim and Pimozide on Ovulation Induction in

Long Snout Bullhead *Leiocassis longirotris*. Dev Reprod 16: 137-143.

Lin H, Peng RC, Lu LZ, Zhou XJ, Kraak GVD, Peter RE. 1985. Induction of ovulation in the Loach (*Paramisgurnus dabryanus*) using pimozide and [D-ALA6, PRO9-N-Ethylamide]-LHRH. Aquaculture 46: 333-340.

Marino G, Panini E, Longobardi A, Mandich A, Finoia MG, Zohar Y, Mylonas CC. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. Aquaculture 219: 841-858.

Noh CH, Kim KS, Myoung JG, Cho JK, Yun NJ, Lim HG, Bang IC. 2015. The hatchability of fertilized eggs of interspecific hybrid between red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) and brown-marbled grouper (*E. fuscoguttatus*). Kor J Ichthyol 27: 16-20.

Okumura S, Sakae K. 1993. Effect of LHRH-a cholesterol pellet on ovarian maturation and spawning in roundnose flounder, *Eopsetta grigorjewi*. Suisanzoshoku 41:13-18.

Park HY, Lee JY, Lee YJ, Kwon HC. 1998. Induction of ovulation by LHRH-a and pimozide in the bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. Korean J Aquacult 11: 151-158.

Park JY, Cho JK, Son MH, Kim KM, Han KH, Park JM. 2016. Artificial spawning behavior and development of eggs, larvae and juveniles of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in Korea. Dev Reprod 20: 31-40.

Qiutao HE, Gang LU, Kai C, Enhui Z, Qiongshan F, Hansheng W, Jing L, Changjiang H, Qiaoxiang D. 2011. Sperm cryopreservation of the endangered red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, with a special emphasis on membrane lipids. Aquaculture 318: 185-190.

Sherwood NM, Parker DB, McRory JE, Lescheid DW. 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. (in) Sherwood, N.M., Hew, C.L. (eds.), Fish Physioogy. Molecular Endocrinology of Fish Vol 8 Academic Press New York 3-66.

Song YB, Baek HJ, Kim HB, Soyano K, Kim SJ, Lee YD. 2008. Induction of maturation and ovulation with HCG treatment in the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Korean J Aquacult 21: 96-101.

Sokolowska M, Peter RE, Nahorniak CS, Pan CH, Chang JP, Crim LW, Weil C. 1984. Induction of ovulation in goldfish, *Carassius auratus*, by pimozide and analogues of LH-RH. Aquaculture 36: 71-83.

Soyano KT, Nagae SM, Yamauchi K. 1993. Effects of thyroid hormone on gonadotropin-induced steroid production in medaka, *Oryzias latipes*, ovarian follicles. Fish Physiology and Biochemistry 11: 265-272.

Tamaru CS, Carlstrom CT, Fitzgerald Jr. WJ, Ako H. 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper, *Epinephelus microdon* capture from spawning aggregations in the republic of Palau, Micronesia, J World Aqua Soc 27: 363-372.

Tucker Jr. JW, Parsons JE, Ebanks GC, Bush PG. 1994. Induced spawning of Nassau grouper, *Epinephelus striatus*. J World Aqua Soc 22: 187-191.

Ukawa M, Higuchi M. 1966. Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara*. Japan J Ichthyol 13: 156-161.

Watanabe WO, Ellis EP, Ellis SC, Feeley MW. 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. J World Aqua Soc 29: 393-404.

Zohar Y, Goren A, Tosky M, Pagelson G, Leibovitz D, Koch Y. 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparusaurata*: in vivo and in vitro studies. Fish Physiol Biochem 7: 59-67.

Zohar Y, Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.