

HCG 처리에 의한 능성어 *Epinephelus septemfasciatus*의 성숙과 배란유도

송영보 · 백혜자¹ · 김형배² · Kiyoshi Soyano³ · 김세재⁴ · 이영돈*

제주대학교 해양과환경연구소, ¹부경대학교 자원생물학과, ²강원도립대학 해양생물자원개발과,
³Nagasaki University, ⁴제주대학교 생물학과

Induction of Maturation and Ovulation with HCG Treatment in the Seven-band Grouper *Epinephelus septemfasciatus*

Young-Bo Song, Hae-Ja Baek¹, Hyung-Bae Kim², Kiyoshi Soyano³ Se-Jae Kim⁴, and Young-Don Lee*

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-968, Korea

¹Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Department of Marine Bio-resource, Gangwon Provincial University, Gangnung 201-804, Korea

³Marine Research Institute, Nagasaki University, Nagasaki 851-2213, Japan

⁴Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 695-756, Korea

To induce of maturation and ovulation, ovary with different development stage of oocytes of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* (n=51, TL 69.1±1.0 cm, BW 5.8±0.3 kg) rearing indoor-tank in mature and spawning season (June to July) were investigated by cannulation. Female with yolk globule stage oocyte (300~500 μm) was injected with human chorionic gonadotropin (HCG, 500 IU/kg BW). Oocytes developed at diameter 300~700 μm in 24 hrs after the HCG injection, and the distribution ratio of over 800 μm of oocytes diameter in the cannulated eggs were 91.3~98.8% (95.1±3.7%) in 48 hrs after the HCG injection. Ovulation was induced from 7 out of 8 female after the HCG injection. The total volume of stripped eggs was 2,480 mL, and the volume of buoyant eggs was 1,360 mL. The fertilization and hatching rates of buoyant eggs were 56.2~94.9% and 70.7~97.9%, respectively. These results suggested that HCG 500 IU/kg BW effects on maturation and ovulation of female sevenband grouper with yolk globule stage of oocyte.

Key words: *Epinephelus septemfasciatus*, Grouper, Sex maturation, Ovulation, HCG

서 론

바리과 어류에 속하는 능성어 *Epinephelus septemfasciatus*, 자바리 *E. bruneus*, 붉바리 *E. akaara* 등은 우리나라, 일본, 중국, 동남아시아 지역에서 식용어로 기호도가 높아 시장성이 넓다. 그러나 지금까지 바리과 어류의 수정란을 안정적으로 확보하는데 어려움이 있어 종묘생산 등 양식산업화에 애로사항이 있다.

바리과 어류 수정란 대부분은 가두리와 실내수조에서 자연 산란을 통해 확보하고 있으나, *E. tauvina*, *E. fuscoguttatus*, *E. aeneus* 등의 경우 자연 산란된 알은 난질의 저하로 수정률과 부화율이 매우 낮다(Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990; Hassin et al., 1997). 바리과 어류의 사육 수조내 수정률이 낮은

이유 중 하나는 성숙 산란시기에 종 특이적인 산란행동에 적합한 사육수조환경을 조성하는데 어려움이 있기 때문이다(Okumura et al., 2002). 이와 같이 사육 수조내 산란이 이루어지지 않거나 또는 산란이 일어나도 수정률과 부화율이 낮은 문제점을 해결하기 위해 *E. microdon*, *E. aeneus*, *E. marginatus*에 각각 gonadotropin (GTH), human chorionic gonadotropin (HCG), luteinising hormone releasing hormone analogue (LHRHa) 등의 주사로 성숙 및 배란을 유도하여 수정란을 생산하고 있다(Tamaru et al., 1996; Hassin et al., 1997; Marino et al., 2003).

이 연구는 육상 수조식 사육환경에서 능성어의 안정적인 수정란 생산을 하기 위해 적정 호르몬 처리시기와 호르몬 처리에 따른 난성숙 및 배란유무 그리고 배란된 알을 이용하여 인공수정 하였을 때 수정률과 부화율을 조사하였다.

*Corresponding author: leemri@cheju.ac.kr

재료 및 방법

생식소 발달 조사

제주 연안에서 채집하여 제주대학교 해양과환경연구소의 사각콘크리트 수조(5×5×2 m, 유효수량 40 ton)에서 유수식 사육 시스템으로 사육하였다. 먹이는 생사료 단독 또는 자체 제조한 moist pellet을 1회/1일, 어체중의 1~2%를 공급하였다. 생식소 발달 조사는 능성어 어미 총 51마리(전장 69.1±1.0 cm, 체중 5.8±0.3 kg)를 대상으로 실험어의 자연 성숙시기인 6~7월에 조사하였다. 실험어는 200~300 ppm의 2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA)에 마취시킨 후 외부 생식공의 발달정도에 따라 실험어를 선택하여 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 하였다. 난성숙과 배란 유도를 하기 위해 난황주기 단계 이상의 난모세포를 가진 어미를 선별 후 portable reader (Trovan Ltd., U.K.)로 표지 후 수조에 수용하였다.

HCG 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도

성숙유도가 가능한 암컷을 대상으로 HCG (Sigma Co., USA)을 사용하여 난성숙 및 배란 유도를 하였다. HCG처리는 조사대상 51마리 중 성숙유도가 가능한 8마리(평균전장 77.1±3.7 cm, 평균체중 7.9±1.1 kg)를 대상으로 하였다. HCG는 생리식염수에 용해 후 500 IU/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다 (Shein et al., 2004). HCG 처리에 따른 체내 난경변화 조사는 cannulation 방법을 이용하여 HCG 처리 후 24시간 간격으로 생식소내에 있는 난모세포를 추출 및 배란유무를 관찰하였다. 추출된 난모세포는 만능투영기(Mitutoyo, PJ-H 3000F,

Japan)와 현미경을 이용하여 호르몬 처리 후 시간경과에 따른 난모세포의 크기 변화를 조사하였다.

인공수정

인공수정은 건식법(알 1×10⁶개 : 정자 0.1 mL)으로 하였으며, 각각 수정률과 부화율을 조사하였다. 웅성화로 유도된 능성어에서 채취한 신선한 정자(Song et al., 2005)와 HCG 처리로 인공 채란된 알을 이용하여 수정시켰을 때 수정률과 부화율을 각각 3회 조사하였다. 수정률은 각각의 실험구에서 인공수정 후 수정란이 상실기 단계에 도달했을 때를, 부화율은 부화 후 1일째를 기준으로 조사하였다.

모든 실험은 3반복으로 조사하였으며, 실험 결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 SAS 통계프로그램으로 검정하였다.

결과 및 고찰

생식소 발달 조사

6월과 7월에 능성어를 대상으로 생식소 발달을 조사한 결과, cannulation이 가능한 28마리 중 16마리가 주변인기 단계의 미성숙한 난모세포가, 8마리에서 난황주기 단계의 난모세포가 분포하였다. 그리고 4마리에서는 과숙란을 포란하였다(Fig. 1, Table 1).

HCG 처리에 따른 난성숙 및 배란 유도

사육수조에서 사육하는 *E. tauvina*, *E. fuscoguttatus* 등에서는 난모세포의 성숙 및 배란이 유도되지 않거나, 산란행동장애

Table 1. Oocytes distribution, total length and body weight of *E. septemfasciatus* by cannulation

Oocytes distribution	Total length (cm, mean±S.E.*)	Body weight (kg, mean±S.E.)	No. of fish	Remark
Peri-nucleolus	72.4±2.1	6.4±0.6	16	Fig. 1A
Yolk globule	77.0±3.7	7.9±1.1	8	Fig. 1B
Over maturation	71.5±3.9	6.6±0.8	4	Fig. 1D
Non detection	66.7±1.3	5.2±0.2	23	-

*S.E.; standard error of mean.

Table 2. Egg collection by stripping of *E. septemfasciatus* female after HCG injection

Experimental date	Total length (cm)	Body weight (kg)	Spawned eggs (mL)	Sunken eggs (mL)	Buoyant eggs (mL)	Buoyant rate (%)
Jul. 07	69.0	6.3	600	130	470	78.3
Jul. 12	89.0	12.0	710	620	90	12.7
Jul. 12	84.0	10.7	20	20	0	0
Jul. 12	73.0	5.6	180	50	130	72.2
Jul. 21	88.0	11.2	250	20	230	92.0
Jul. 21	60.0	3.7	-	-	-	-
Jul. 29	83.0	8.3	650	150	400	61.5
Jul. 31	71.0	5.3	70	30	40	57.1
Total			2,480	1,020	1,360	

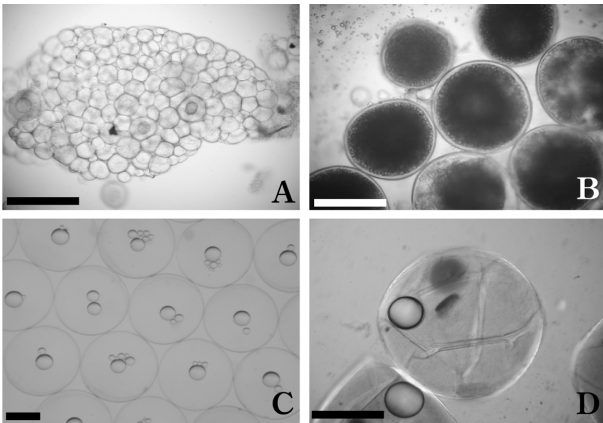


Fig. 1. Oocytes of various developmental stages by cannulation of *E. septemfasciatus*. A, peri-nucleolus oocytes stage; B, yolk globule oocytes stage (HCG injection); C, mature eggs stage; D, over-mature egg stage. Scale bars= 400 μ m.

에 따른 자연 산란된 알은 난질 저하에 따른 수정률 및 부화율이 낮은 등의 문제가 발생하고 있다(Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990). 이와 같이 난질저하 원인은 어미의 건강상태, 성비 불균형 및 산란에 적합한 사육 수심 등 부적합한 환경요인으로 추정하고 있다(Toledo et al., 1993; Okumura et al., 2002). 이와 같은 문제점 해결방안으로 어류의 뇌하수체, HCG, LHRHa 등의 호르몬을 사용하여 어류의 성숙 및 배란 유도를 시도하고 있고, 이때 처리방법으로는 경구투여 및 주사, implantation을 이용하고 있다(Crim et al., 1983; Larsson et al., 1997; Chuda et al., 1997).

이 실험에서 HCG 처리에 따른 능성어의 배란유도시 실험어 8마리 중 7마리가 배란되었다. 능성어 어미 개체당 배란된 알은 70~710 mL였고, 7마리의 총 배란된 알은 2,480 mL이었다. 그리고 배란된 알 중 부상란은 1,360 mL로 부상률은 평균 54.9%이었다(Table 2).

어류의 뇌하수체는 초기에 사용한 방법으로 Luteinizing hormone (LH) 함유량의 변이성, 생리적 거부반응과 질병 감염 등의 우려가 있다(Zohar and Mylonas, 2001). LHRHa/gonadotropic hormone-releasing hormone analogue (GnRHa)는 면역반응을 유발시키지 않으며, LH의 방출을 유도하여 생식소 발달에 균형 잡힌 자극을 줄 수 있고, 합성이 용이하여 질병 감염 우려가 없다. 또한 어류 종간 GnRH 구조의 유사함 때문에 광범위하게 사용이 가능하다(Sherwood et al., 1994; Zohar and Mylonas, 2001). 그러나 때때로 GnRHa는 효과성이 미약하거나 반응을 이끌어내는데 많은 시간을 요구하기도 한다(Crim et al., 1988; Zohar et al., 1989). HCG는 사용이 간편하고, 생식소에 직접적으로 작용하여 난모세포의 최종성숙 및 배란 유도에 빠른 효과를 보여 널리 사용되고 있다(Lam, 1982; Donaldson and Hunter, 1983; Hodson and Sullivan, 1993).

이 연구에서 능성어 암컷에 HCG 500 IU/kg BW를 처리하여 난성숙 및 배란 유도를 할 수 있었다. 자바리와 능성어를 대

상으로 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin 150 IU/kg BW와 HCG 1,000 IU/kg BW를 각각 3회와 1회를 동시에 처리하여 인공배란이 가능하였고(Takaya and Arakawa, 1987), 능성어에 연어 뇌하수체 7 mg/kg BW와 GTH 500 IU/kg BW를 등 근육에 함께 주사하여 48시간 후에 채란이 가능하였다(Kitajima et al., 1991). *E. striatus* 어미에 HCG, LHRHa, 잉어 뇌하수체를 각각 단독 또는 혼합 처리하여 인공배란을 유도하였으며(Watanabe et al., 1998), *E. aeneus* 대상으로 GnRHa를 10 μ g/kg BW/2회 주사 또는 25 μ g/kg BW 또는 75 μ g/kg BW GnRHa pellet를 근육에 삽입하여 산란기 동안 2~3회 산란을 유도하였다(Hassin et al., 1997). *E. fario*는 HCG 2,000 IU/kg BW 이상 처리했을 때 배란 유도가 가능하였고(Kuo et al., 1988), *C. altivelis*에 GTH 500 IU/kg BW를 1일 간격으로 2회 주사 후 인공채란이 가능하였다(Sugama and Ikenoue, 1999). 난성숙 및 배란을 유도하기 위한 호르몬의 종류와 처리 농도는 어종에 따라 차이가 있으며, 동일 어종에서도 차이가 발생하는 것은 호르몬 종류와 처리 농도에 따라 어체의 생리적 반응에 의한 것으로 생각된다.

난성숙 및 배란 유도를 위한 호르몬 처리 시기는 어종에 따라 차이가 있다(Harmin and Crim, 1992). 이 연구에서 능성어 난소 내 300~700 μ m 난황주기 단계 난모세포를 가진 개체 8마리를 대상으로 HCG 처리 후 24시간 경과 시 난경 300~700 μ m 내외의 난모세포들이 분포하였고, 48시간 경과 후에는 91.3~98.8% (95.1 \pm 3.7%)가 1~8개의 유구를 가지는 난경 800 μ m 이상 난모세포이었다(Fig. 1C, 2).

이와 같이 난경 분포에 따라 호르몬 처리가 성숙 및 배란에 미치는 영향을 조사한 실험에서, *E. aeneus*와 *C. altivelis*의 경우 난경 400~500 μ m 난모세포를 가진 개체를 대상으로 LHRHa와 GTH를 처리하여 산란을 유도하였다(Hassin et al., 1997; Sugama and Ikenoue., 1999). *E. marginatus*는 난경 350~450 μ m일 때 GnRHa implant를 삽입한 경우 성성숙 유도가 가능하였고(Marino et al., 2003), *E. fario*와 *E. microdon*은 각각 난경이 550 μ m와 400 μ m 이었을 때 HCG 처리를 통해 성숙 및 배란 유도가 가능하였다(Kuo et al., 1988; Tamaru et al., 1996). 능성어의 경우 난경 440 μ m 이하에서 LHRHa를 처리했을 때는 배란 유도가 되지 않았다(Shein, 2000). 이 연구에서 성 성숙한 능성어 생식소내 난모세포 변화를 조사한 결과 300~500 μ m 내외 크기를 가진 능성어 암컷에 HCG 처리로 성숙 및 배란 유도를 할 수 있었다.

호르몬 처리 후 배란까지 소요시간은 종에 따라 차이를 가진다. 붉바리와 *E. striatus*는 HCG 처리 후 배란까지 소요시간은 각각 38~67시간과 48~51시간이 소요되었다(Tseng and Ho, 1979; Tucker et al., 1991). *E. marginatus*와 능성어에서 GnRHa implant와 LHRHa를 삽입 후 성성숙을 유도 하는데 각각 70~80시간과 36~42시간이 소요되었다(Shein, 2000; Marino et al., 2003). 이 연구에서 능성어에 HCG를 처리 했을 때 24시간 경

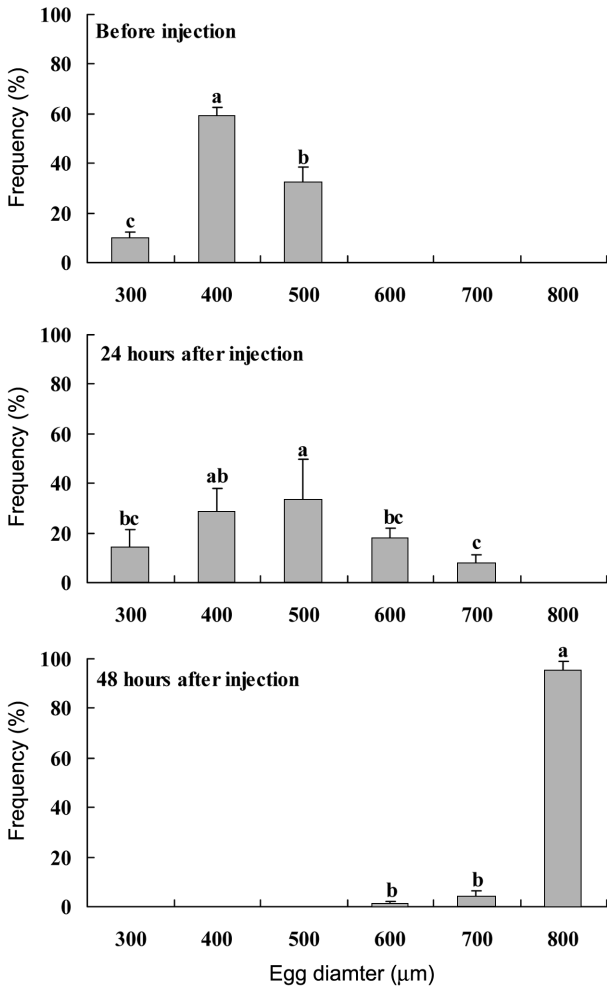


Fig. 2. Changes of egg diameter after HCG injection. Values are means of 200~500 eggs collected by cannulation. Vertical bars denote standard error of mean. Different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

과 후 난경이 증가하기 시작하여 48시간 후에 양질의 알이 배란되었다(Fig. 2). 이와 같은 호르몬 처리 후 배란 유도까지 소요시간 차이는 종에 따른 차이가 있으나, 사육조건, 호르몬 종류와 농도 차이도 하나의 원인으로 생각된다.

수정률 및 부화율

이 연구에서 웅성화로 유도된 능성어에서 배정된 정자를 이용하여 인공수정 시켰을 때, 수정률은 56.2~94.9% ($77.8 \pm 2.9\%$)였으며, 수정란 부화율은 70.0~97.7% ($92.2 \pm 2.1\%$)이었다(Fig. 3).

*E. tauvina*와 *E. fuscoguttatus*의 자연 산란된 알의 수정률 및 부화율은 9~24%이었다(Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990). 능성어에서 자연 산란된 알의 부상률은 3~29%였으며, 수정률은 0~80%이었다(Song et al., 2001). 호르몬을 사용하여 인공채란 했을 때, HCG 처리한 *E. microdon*에서 배란된 알의 수정률은 33~99%였으며, 부화율은 90%이하였고(Tamaru et al., 1996), LHRHa 처리한 능성어에서 인공채란

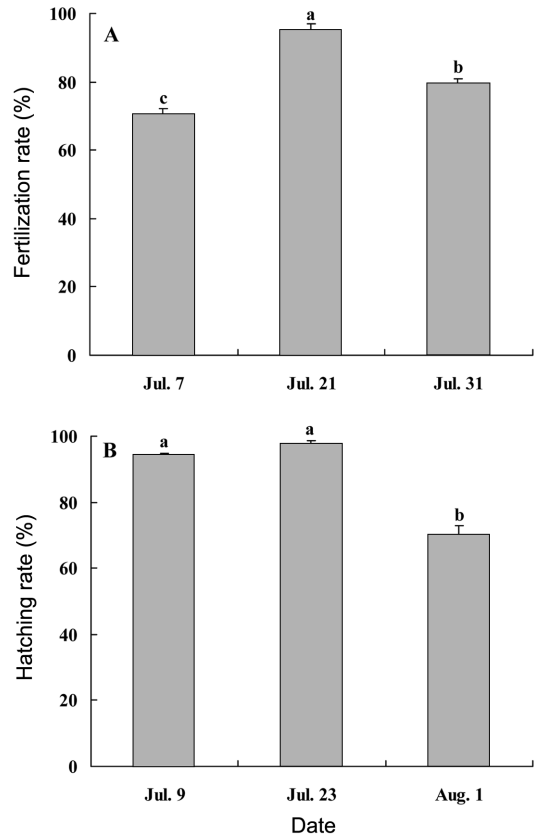


Fig. 3. Fertilization (A) and hatching (B) ratio of the buoyant eggs of *E. septemfasciatus* treatment by HCG injection. Vertical bars denote standard error of mean. Different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

했을 때 수정률 및 부화율은 각각 70%와 80%이었다(Shein, 2000). 이 연구에서 능성어 암컷에 HCG 처리로 배란된 알을 이용하여 인공수정 시켰을 때 수정률 및 부화율은 수조내 자연 산란한 알 보다 수정률과 부상률이 높았다. 이와같이 수조에서 자연 산란이 어렵거나 수정률과 부화율이 낮은 종에서 안정적인 수정란 확보를 위한 방법으로 호르몬 처리 방법이 유용할 것으로 생각된다.

요 약

능성어 암컷의 난모세포 발달에 따른 성숙 및 배란유도를 위하여 제주도 연안에서 채집하여 사육중인 능성어 51마리(전장 69.1 ± 1.0 cm, 체중 5.8 ± 0.3 kg)를 대상으로 암컷의 생식소 발달을 cannulation으로 조사하였다. 난황구기 단계 이상 난모세포(난경 300~500 μm)를 가진 어미를 대상으로 HCG 500 IU/kg BW로 주사하였다. HCG 처리 후 난경변화는 24시간째에 300~700 μm, 48시간째에는 800 μm 이상이 91.3~98.8% ($95.1 \pm 3.7\%$)이었다. HCG 처리 실험구에서는 실험어 8마리 중 7마리가 배란되었고, 총 배란된 알 2,480 mL이었으며, 이중 부상란은 1,360 mL이었다. 수정률과 부화율은 각각 56.2~94.9% ($77.8 \pm 2.9\%$),

70.0~97.7% (92.2±2.1%)이었다. 이들 결과들은 HCG 500 IU/kg BW 농도로 처리했을 때 난황구기 난모세포를 가진 능성어 암컷의 성숙 및 배란에 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(과제번호: KRF-2007-359-F00009).

참 고 문 헌

- Chuda, H., M. Matsuyama, Y. Ikeda and S. Matsuura, 1997. Development of maturation and ovulation-induction method in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 63, 728-733. (in Japanese)
- Crim, L. W., J. J. Nestor Jr. and C. E. Wilson, 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.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter, 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. IX B., Academic Press, Orlando, FL, pp. 351-403.
- Harmin, S. A. and L. A. Crim, 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analogue (GnRH_a) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture*, 104, 375-390.
- Hassin, S. D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar and D. M. Popper, 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* L. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156, 305-316.
- Hodson, R. and C. V. Sullivan, 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.
- Hussain, N. A. and M. Higuchi, 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Aquaculture*, 19, 339-350.
- Kitajima, C., M. Takaya, Y. Tsukashima and T. Arakawa, 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. *Jap. J. Ichthyol.*, 38, 47-55. (in Japanese)
- Kuo, C. M., Y. Y. Ting and S. L. Yeh, 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74, 113-126.
- Lam, T. J., 1982. Application of endocrinology of fish culture. *Can. J. Aquat. Fish. Sci.*, 39, 11-137.
- Larsson, D. G. J., C. C. Mylonas, Y. Zohar and L. W. Crim, 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH_a) induces multiple ovulation of high-quality eggs in a cold-water, batch spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54, 1957-1964.
- Lim, L. C., T. M. Chao and L. T. Khoo, 1990. Observations on the breeding of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.). *Singapore Journal of Primary Industry*, 18, 66-84.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finoia, Y. Zohar and C. C. Mylonas, 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH_a implant, *Aquaculture*, 219, 841-858.
- Okumura, S., K. Okamoto, R. Oonori and A. Nakazono, 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture*, 206, 165-173.
- Shein, N. L., 2000. A new method for induction of ovulation using LHRH analogue in cultured sevenband grouper. MS. thesis, Nagasaki Univ., 53 pp. (in Japanese)
- Shein, N. L., H. Chuda, T. Arakawa, K. Mizuno and K. Soyano, 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish. Sci.*, 70, 360-365.
- Sherwood, N. M., D. B. Parker, J. E. McRory and D. W. Lescheid, 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. (in Sherwood, N. M., Hew, C. L. (eds.), *Fish Physiology. Molecular Endocrinology of Fish*, Vol. VIII, Academic Press, New York, pp. 3-66.
- Song, Y. B., C. H. Lee, J. P. Seo and Y. D. Lee, 2001. Fall meeting of the Korean aquaculture society : abstracts and Proceedings. (in Korean)
- Song, Y. B., H. J. Baek, H. B. Kim, K. J. Lee, K. Soyano and Y. D. Lee, 2005. Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by 17 α -methyltestosterone. *J. Aquacult.*, 18, 167-172.
- Sugama, K. and H. Ikenoue, 1999. Research and development : The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA., 53 pp.
- Takaya, M. and T. Aarakwa, 1987. Hormone treatment for spawning induction of *Epinephelus moara* and *E. septemfasciatus*. *Bull. of Nagasaki Pref. Inst. of Fish.*, 13, 16-18.
- Tamaru, C. S., C. T. Carlstrom, Jr. W. J. Fitzgerald and H. Ako, 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.
- Toledo, J. D., A. Nagi and D. Javellana, 1993. Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. *Aquaculture*, 115, 361-367.
- Tseng, W. Y. and S. K. Ho, 1979. Egg development and early larval rearing of red grouper (*Epinephelus akaara*, Temminck & Schlegel). *Quarterly J. Taiwan Museum*, 32, 209-219.
- Tucker, Jr. J. W. J. E. Parsons, G. C. Ebanks and P. G. Bush, 1991. Induced spawning of Nassau grouper, *Epinephelus striatus*. *J. World Aqua. Soc.*, 22, 187-191.
- Watanabe, W. O., E. P. Ellis, S. C. Ellis and M. W. Feeley, 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer

- flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. J. World Aqua. Soc., 29, 393–404.
- Zohar, Y., and C. C. Mylonas, 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99–136.
- Zohar, Y., A. Goren, M. Tosky, G. Pagelson, D. Leibovitz and Y. Koch, 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo and in vitro studies. *Fish. Physiol. Biochem.*, 7, 59–67.
-

원고접수 : 2008년 1월 14일

심사완료 : 2008년 4월 23일

수정본 수리 : 2008년 5월 17일