

능성어 (*Hyporthodus septemfasciatus*) ♀ × 대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*) ♂ 수정란의 난발생

노충환* · 윤낙진¹

한국해양과학기술원, ¹청솔수산

Embryonic Development of Fertilized Eggs of Convict Grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*) ♀ × Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) ♂ by Choong Hwan Noh* and Nak Jin Yoon¹ (Korea Institute of Ocean Science & Technology, 385 Haeyang-ro, Yeongdo-gu, Busan 49111, Republic of Korea; ¹Cheong Sol Fisheries Co., Muan, Jeonnam 58509, Republic of Korea)

ABSTRACT The embryonic development and hatchability of the artificially fertilized eggs of convict grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*) ♀ × giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) ♂ (CGGG) were compared to those of the maternal pure species (convict grouper ♀ × ♂, CG) to establish a novel grouper hybrid for aquaculture industry. The fertilized eggs were divided into nine 5-L beakers (3,000~5,000 eggs/beaker) filled with UV sterilized seawater and incubated at a temperature range of 23.5~24.8°C (32.1~32.8 psu). The percentages of fertilization and hatching of CGGG were 69.4±1.5% and 59.0±5.1%, respectively and were significantly lower than those of CG ($p < 0.05$). The CGGG proceeded normal embryonic development similar to that of CG, but showed an irregular cleavage, immature embryonic body and spinal deformity in hatched larvae. The incubation time from fertilization to hatching of CGGG was 31 hrs, which was approximately 2 hrs slower than that of CG. Our study provided the possibility of mass production of grouper hybrid CGGG larvae.

Key words: *Hyporthodus septemfasciatus*, *Epinephelus lanceolatus*, grouper hybrid, embryonic development, hatched larvae deformity

서 론

바리과(family Serranidae)에 속하는 어종은 자원량 감소에 따라 우리나라 뿐만 아니라 아시아 아열대 지역의 국가(중국, 대만 그리고 동남아)와 지중해 연안국을 중심으로 양식 생산 수요량이 많다(Pierre *et al.*, 2008).

이 중 능성어(convict grouper, *Hyporthodus septemfasciatus*)는 우리나라의 남해안과 제주도, 일본의 남부 그리고 중국의 일부 해역에서 서식하는 어종으로(Kim *et al.*, 2005), 선호하는 서식수온은 15.9~24.1°C(평균 20.3°C)이다(Heemstra and Randall, 1993). 우리나라에서 능성어에 관한 연구는 성숙과

배란 유도를 통한 수정란 생산(Kim *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2008) 그리고 난 발생 및 종자 대량 생산(Lee and Go, 2003; Lee *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2015) 등의 연구가 수행되었다. 위 연구들을 통하여 현재 우리나라에서 능성어의 수정란 및 종자 생산 기술이 산업화 수준에 도달하였다. 능성어는 거문도 해역의 해상가두리에서 종자 입식 후부터 상품어 크기(0.8~1.2 kg)까지 사육하는데 약 2년이 소요되어, 산업 생산성 향상을 위해 성장을 향상시키기 위한 육종 연구가 필요하다.

종간 교잡은 교잡강세(hybrid vigor)를 통해 성장, 질병내성 그리고 환경내성 향상 등 산업적으로 유용한 형질을 발현시킬 수 있는 매우 유용한 육종 도구로서(Bartley *et al.*, 2001), 최근까지 바리과 및 어종에서 성공적으로 유도되어 산업화되었다(Glamuzina *et al.*, 2001; Ch'ng and Senoo, 2008; Koh *et al.*, 2010; Kiriyaikit *et al.*, 2011).

*Corresponding author: Choong Hwan Noh Tel: 82-51-664-3333, Fax: 82-51-955-3981, E-mail: chnoh@kiost.ac.kr

바리과에서 성장 향상을 위한 교잡은 주로 대왕바리 수컷을 이용한다. 대왕바리 (giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*)는 선호하는 서식수온이 24.3~29.1°C (평균 28.1°C)인 아열대 및 열대 어종으로 (Kaschner *et al.*, 2016), 성장이 빨라 1년째에 체중이 3 kg 그리고 4년째에 체중이 약 20 kg에 도달한다 (Vatanakul *et al.*, 1995; Sadovy *et al.*, 2003).

저자들은 이전 연구에서 능성어 암컷과 대왕바리 수컷 간 교잡 수정란의 난 발생 실험을 수행하였으며, 비록 능성어의 난질이 불량하여 수정률(12.3%)과 부화율(6.7%)이 매우 낮았지만 부화 가능성을 확인할 수 있었다.

이에 이번 연구는 능성어와 성장이 빠른 대왕바리 간 교잡 자손의 대량생산 가능성을 확인하기 위한 연구의 일환으로, 이 두 어종간 교잡 수정란의 발생 양상, 부화율, 기형 발생률 그리고 부화 소요시간을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 친어 및 배우자 생산

능성어 순종(능성어 ♀ × ♂, CG)과 교잡(능성어 ♀ × 대왕바리 ♂, CGGG) 수정란 생산을 위해, 능성어의 알과 정액 그리고 대왕바리의 정액을 사용하였다.

친어는 경남수산자원연구소에서 관리 중인 4~6세의 능성어 14마리(암컷 11마리; 평균 체중 5.4 kg, 수컷 3마리; 평균 체중 6.8 kg) 그리고 2014년 대만으로부터 수입한 대왕바리 수컷 1마리(약 48 kg)를 사용하였다.

능성어의 알과 정액 생산을 위해 생식공 삽관(cannulation)을 통해 성숙 중인 알(egg diameter 400~500 μm)을 가진 것으로 확인된 암컷과 복부를 눌러 정액이 흘러나오는 수컷의 등근육에 각각 Ovaprim® (salmon gonadotropin releasing hormone analog + domperidon, Western Chemical Inc., USA)을 0.5 mL/kg BW와 HCG (Daihan Pharmaceutical Co., Korea)를 500 IU/kg BW의 농도로 주사하였다. 대왕바리 수컷은 마취 후 복부 압박 시 정액이 충분히 흘러나와 호르몬 주사는 하지 않았다.

능성어 채란은 암컷의 복부 및 알 상태에 따라 호르몬 주사 후 24~48시간에 실시하였다. 능성어 채정은 채란 직후에 실시하여 수정에 바로 사용하였으며, 대왕바리 채정은 능성어 채란 전 약 24시간 이내에 실시하여 1.5 mL 또는 15 mL 튜브에 담아 4°C가 유지되는 냉장고에 보관하면서 수정에 사용하였다.

2. 수정란 생산 및 발생

채란 후 육안으로 관찰하여 난질이 뛰어난 능성어 암컷으로부터 얻은 알을 사용하였으며, CGGG와 CG 수정란은 모두 세 번

(교배 I~III) 생산하였다. CGGG와 CG 수정란은 1마리(교배 I) 또는 2마리(교배 II와 III)의 능성어 암컷으로부터 얻은 알에 대왕바리와 능성어 정액을 각각 건식법으로 수정하여 생산하였다.

수정할 때의 수온은 교배 I에서 22.3°C, 교배 II에서 24.3°C 그리고 교배 III에서 23.7°C였다.

CGGG와 CG의 수정란은 세란 후 각각 5-L 비이커에 약 5분 동안 두어 가라앉지 않은 것만 네트로 걸어낸 후, 각각 자외선으로 소독한 여과해수가 채워진 5-L의 유리 비이커 9개(3개 비이커/교배)에 시약 스포를 사용하여 3,000~5,000 수정란/비이커의 밀도로 나누어 수용하였다. 각 교배의 실험은 3반복으로 수행하였다.

수정란이 수용된 비이커는 온도 조절이 되는 배양기 (multi-room incubator, 125 liter × 4 rooms, Daihan Scientific Co., Korea)에 설치하였다. 수정란 발생 동안 배양기 온도를 24°C로 설정하여 비이커 내 수온은 23.5~24.8°C가 유지되었으며, 염분은 32.1~32.8 psu였다.

수정란을 수용한 비이커에 매우 약하게 에어레이션하여 산소를 공급하고 해수의 유동을 일으켰으며, 수질 유지를 위해 3~6 시간마다 같은 배양기에 보관한 해수를 이용하여 사이폰으로 매번 비이커 해수의 약 80%를 교환하였다.

3. 자료 수집 및 분석

수정 후부터 부화까지 각 발생단계에서 비이커의 에어스톤을 제거한 후 충분한 양이 부상했을 때 수정란을 수집하여 검경하였다. 수집 후 약 50개의 수정란을 디지털 카메라가 부착된 현미경 (EVOS®XL Core Imaging System, Life Technologies, USA)으로 관찰한 후 사진으로 기록하였으며, 관찰한 수정란들은 생존율에 영향을 미칠 수 있으므로 계수 후 버렸다. 각 발생단계에서 기형을 관찰하였고, 기형률은 부화자어를 대상으로만 조사하였다.

부화율을 구하기 위해 해수교환 때마다 사이폰으로 수집한 비이커 바닥에 가라앉은 수정란을 10% 중성 포르말린 용액 (Sigma-Aldrich, USA)에 고정하였다. 첫 부화가 시작된 후 12 시간 동안 부화하지 않은 수정란은 사란으로 간주하였다. 부화율은 수정률을 반영한 값, 즉 [부화자어 수 / (수정란 수 × 수정률)]의 공식으로 구하였다.

발생시간은 CGGG의 교배 I~III 그리고 CG의 교배 I과 II 실험구 중 한 비이커의 발생란을 대상으로 발생단계 검경 시에 조사하였으며, 수정란의 약 50%가 각 발생단계에 도달하는데 소요된 시간으로 구하였다.

수정률, 부화율, 기형률 그리고 발생시간의 유의성은 IBM SPSS Statistics Version 21 Program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 independent t-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

세 번의 교배 실험에서 수정률은 CGGG가 $69.4 \pm 1.5\%$ 로 CG ($93.8 \pm 1.2\%$)에 비해 유의하게 낮았고, 부화율 역시 CGGG가 $59.0 \pm 5.1\%$ 로서 CG ($79.0 \pm 1.6\%$)에 비해 유의하게 낮았다 (Table 1, $p < 0.05$). 이전 연구에서 바리과 어종의 교잡종과 순종의 수정률과 부화율은 대상종에 따라 서로 달랐다. 붉바리 (*E. akaara*) ♀ × 갈색점바리 (*E. fuscoguttatus*) ♂의 수정률과 부화율은 각각 76.7%와 9.8%로서 붉바리 순종(각각 90.9%와 36.3%)에 비해 낮았고 (Noh *et al.*, 2015), 자바리 (*E. moara*)

♀ × 대왕바리 ♂의 부화율은 4.5%로서 자바리 순종 (64.4%)에 비해 크게 낮았다 (Chen *et al.*, 2018). 그러나 goldblotch

Table 1. Percentages of fertilization, hatching and embryonic deformity of CG (*Hyporthodus septemfasciatus* ♀ × ♂) and CGGG (*H. septemfasciatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)

	CG (n=3)	CGGG (n=3)
Fertilization (%)	$93.8 \pm 1.2^*$	69.4 ± 1.5
Hatching (%)	$79.0 \pm 1.6^*$	59.0 ± 5.1
Deformity of just hatched larvae (%)	2.2 ± 1.1	$6.2 \pm 1.6^*$

*Superscripts after values (mean ± SE) indicate results of independent-samples t-test at the 0.05 level

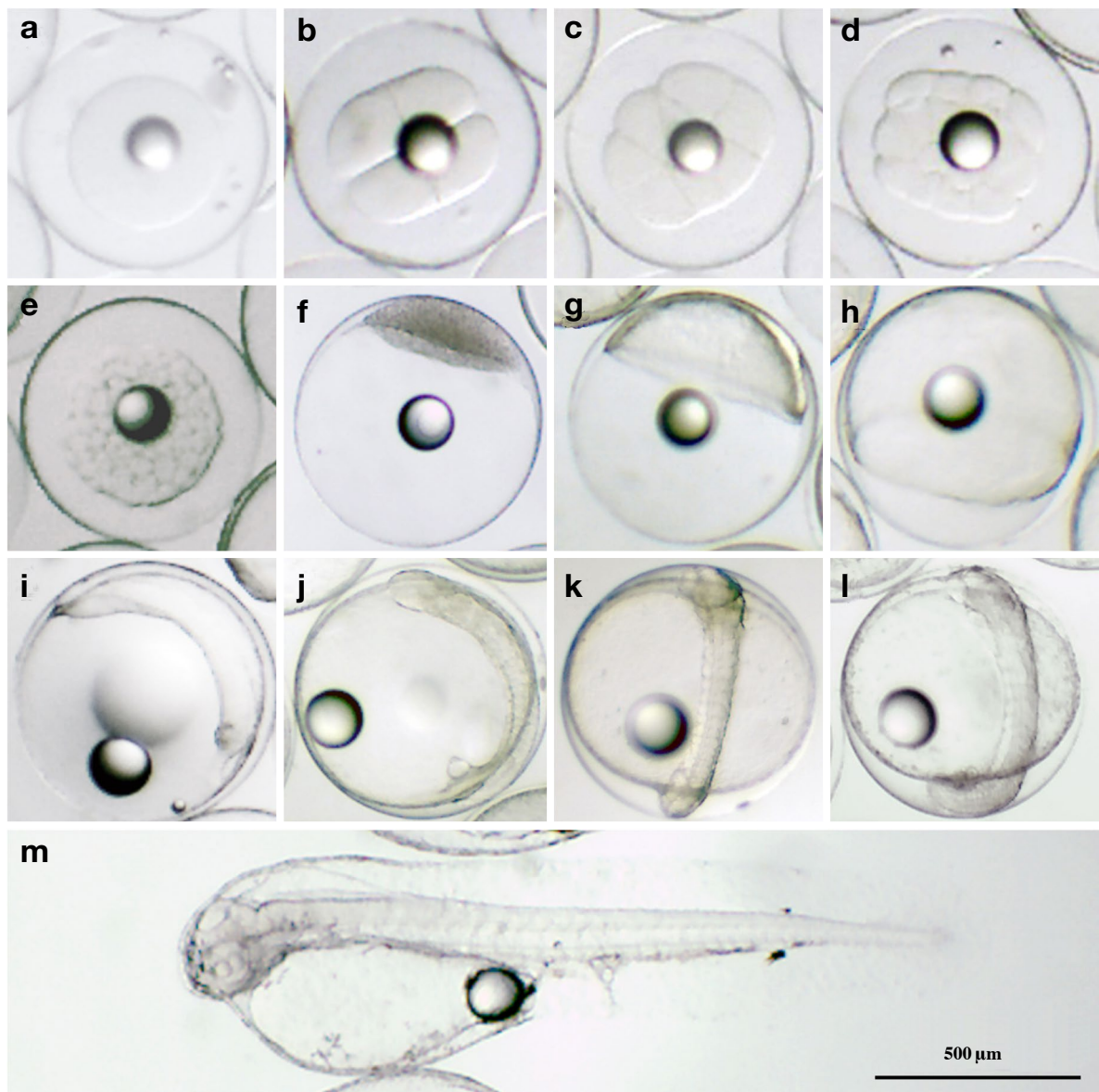


Fig. 1. Embryonic development of CGGG (*Hyporthodus septemfasciatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). a, fertilized egg; b, 4-cell stage; c, 8-cell stage; d, 16-cell stage; e, morula stage; f, blastula stage; g, early gastrula stage; h, middle gastrula stage; i, embryonic body formation; j, Kupffer's vesicle appearance; k, tail-bud stage; l, heart-beating stage; m, hatched larva.

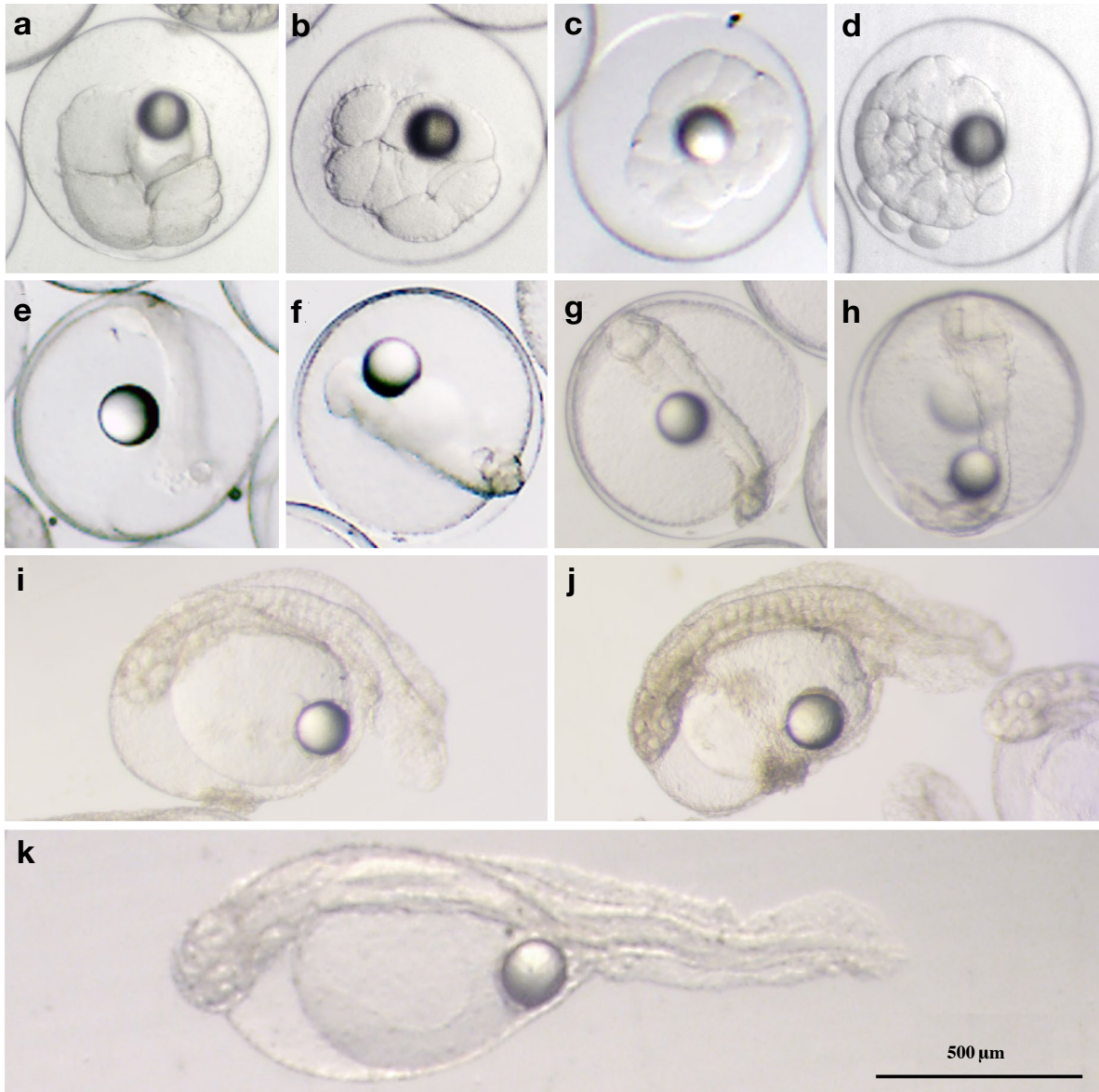


Fig. 2. Deformities observed in embryonic development of CGGG (*Hyporthodus septemfasciatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). a~d, irregular cleavage; e~h, immature embryonic body; i~k, spinal deformity of hatched larvae.

grouper (*E. costae*) ♀ × dusky grouper (*E. marginatus*) ♂ 그리고 dusky grouper ♀ × white grouper (*E. aeneus*) ♂의 수정률과 부화율은 각 교잡에 사용한 암컷 순종과 차이가 없었다 (Glamuzina *et al.*, 2001; Kiriya *et al.*, 2011). 이번 연구에서 CG 수정란은 채란 직후 갓 짠 정액을 사용한 것에 비해 CGGG 수정란은 채란 후 24시간 이내에 짠 후 냉장 보관하였던 정액을 사용하였다. 따라서 CGGG의 낮은 수정률과 부화율은 교잡에 따른 유전 요인에 의해 주로 영향을 받았으며, 수정에 사용한 정액의 질에 의한 영향도 일부 있었을 것으로 판단한다.

CGGG는 부화까지 CG와 난발생 양상이 동일하였다 (Fig. 1). 그러나 난발생 기간 중 CGGG는 CG와 동일한 유형의 기

형이 관찰되었지만 빈도가 다소 높았다. CGGG에서 관찰된 기형 유형은 발생 초기에 비균등 난할 (irregular cleavage, Fig. 2-a~d), 배체 형성기의 체형 기형 (immature embryonic body, Fig. 2-e~h) 그리고 부화자어의 척추 기형 (spinal deformity, Fig. 2-i~k)이었다. 이번 연구에서 부화자어의 기형률은 CGGG가 $6.2 \pm 1.6\%$ 로서 CG ($2.2 \pm 1.1\%$)에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, Table 1). 어류에 있어 난발생 기간 중 기형은 일반적으로 관찰되는 현상으로서, 자연에서 10% 이하인 것으로 알려졌다 (Klumpp and Von Westernhagen, 1995). 이러한 기형은 친어의 생리적 요인에 따라 배우자의 질이 불량한 경우 (Bonnet *et al.*, 2007), 난발생 기간 중 수온 (Koo and Johnston, 1978;

Van Der Wal, 1985; Bermudes and Ritar, 1999), 염분(Haddy and Pankhurst, 2000) 그리고 pH(Zelennikov, 1997; Randall and Tsui, 2002)의 적정 범위를 벗어난 경우에 발생한다고 보고되었다. 그리고 친어 또는 발생란이 화학물질의 영향을 받은 경우에도 난발생 중 기형이 발생하는 것으로 알려졌다(Von Westernhagen, 1988; Keinänen *et al.*, 2003; Finn, 2007; Hano *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

능성어를 대상으로 수행한 이전 연구에서 25°C와 32 psu에서 부화율이 가장 높았고, 기형률이 가장 낮은 것으로 보고되었다(Cho *et al.*, 2015). 이번 연구에서 난발생 수온(23.5~24.8°C)과 염분(32.1~32.8 ppt)은 이전 연구와 비슷하고, CG의 기형률이 낮았다. 따라서 CGGG의 기형률이 CG에 비해 상대적으로 높은 것은 수온과 염분도에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그러나 능성어와 대왕바리는 서식 및 산란수온이 서로 다르며, CGGG의 적정 난발생 수온에 대한 조사가 이번 연구에서는 이루어지지 않았다. 따라서 수온이 CGGG의 높은 기형률에 영향을 미쳤을 가능성도 완전히 배제할 수는 없을 것이다.

바리와 어류 교잡에서 난 발생 중 기형에 관한 보고가 다수 있었다. 그 중에서 goldblotch grouper ♀ × dusky grouper ♂와 dusky grouper ♀ × white grouper ♂에서 비균등 난할이 각각 20%와 25%, 기형 부화자어가 각각 22%와 25%였다고 보고되었다(Glamuzina *et al.*, 1999, 2001). 그러나 위의 두 연구에서는 난 발생 중 기형률을 순종과 비교하지 않아 교잡에 따른 영향을 파악할 수 없었다. 최근에 연구에서 갈색등근바리(*E. coioides*) ♀ × 대왕바리 ♂의 난발생 중 기형 현상은 없었고(Liu *et al.*, 2016), 이와 달리 자바리 ♀ × 대왕바리 ♂의 부화자어 기형이 85~90%로서 자바리 순종(10~12%)에 비해 매우 높은 것으로 보고되었다(Chen *et al.*, 2018). 참고할 수 있는 많은 연구 결과가 없지만 일반적으로 바리와 교잡종의 난 발생 중 기형은 순종에 비해 높으며, 이는 중간 교잡에 따른 유전 요인에 크게 영향을 받는 것으로 간주할 수 있다.

수정란의 발생시간은 상실기 이전을 제외하고 CGGG가 CG에 비해 느린 경향을 보였으며, 포배기와 부화시기에는 유의한 차이가 나타났다(Table 2, $p < 0.05$). 이전의 연구에서 바리와 어류의 교잡 수정란의 발생시간은 dusky grouper ♀ × white grouper ♂와 자바리 ♀ × 대왕바리 ♂이 암컷 순종(각각 dusky grouper ♀ × ♂와 자바리 ♀ × ♂)에 비해 각각 5시간과 1시간 더 빨랐으며(Glamuzina *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2018), 갈색등근바리 ♀ × 대왕바리 ♂은 암컷 순종(갈색등근바리 ♀ × ♂)과 차이가 없는 것으로 보고되었다(Kiriyakit *et al.*, 2011). 어류에 있어서 교잡 수정란의 발생시간은 부모 어종의 중간이거나 어느 한쪽과 비슷하며, 어떤 경우에는 부모 어종보다 더 느리다고 알려져 있다(Chevassus, 1983). 이번 연구에서 CGGG의 발생시간이 CG에 비해 느리게 조사된 것은 발생란의 사망과 관련이 있을 수도 있다. 저자들이 수행한 이전의 연구에서 붉바리 ♀ ×

Table 2. Incubation times (hrs:min) of CG (*Hyporthodus septemfasciatus* ♀ × ♂) and CGGG (*H. septemfasciatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) to reach the embryonic developmental stages

	CG (n=2)	CGGG (n=3)
8~16 cells	02:15 ± 00:09	02:07 ± 00:04
Morula	03:28 ± 00:08	03:16 ± 00:06
Blastula	06:13 ± 00:07	07:14 ± 00:10*
Gastrula	08:12 ± 00:12	08:22 ± 00:19
Embryo formation	11:53 ± 00:13	12:37 ± 00:17
Optic vesicle formation	18:43 ± 00:13	19:07 ± 00:02
Tail beating	22:23 ± 00:07	23:47 ± 00:32
Hatching	29:54 ± 00:14	31:47 ± 00:09*

*Superscripts after values (mean ± SE) indicate results of independent-samples t-test at the 0.05 level.

갈색점바리 ♂의 수정란은 상실기에서 낭배기로 이행하는 기간 중 사망률이 급격하게 높아졌다(Noh *et al.*, 2015). 이번 연구에서 발생단계별 사망률은 조사하지 않았지만, CGGG는 CG에 비해 포배기 이후부터 바닥에 가라앉은 사란들이 다소 많은 것으로 관찰되었다. 수정란이 죽더라도 일정 시간 부상력을 보유하는 점과 본 실험에서 발생시간을 수정란의 50%가 각 발생단계에 도달한 시간으로 구한 점을 감안하면, 사망 직후의 수정란이 현미경 관찰 시에 다수 포함되어 발생시간이 실제보다 느린 것으로 조사되었을 가능성도 있다.

이상의 결과에서 능성어 암컷과 대왕바리 수컷의 교잡 수정란은 다른 바리와 어종의 교잡종에 비해 수정률과 부화율이 높고, 기형률은 낮아 부화자어의 대량생산 가능성이 높다고 할 수 있다. 이 교잡종의 산업적 활용성을 파악하기 위해서는 향후 종자생산 기술, 적정 사육수온 및 생산기술 등 양식 분야 연구가 필요할 것으로 판단한다.

요 약

이번 연구에서 바리와 어종의 새로운 교잡종을 생산하기 위한 연구의 일환으로 능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*) ♀ × 대왕바리(*Epinephelus lanceolatus*) ♂(CGGG)의 발생 양상, 부화율, 기형 발생률 그리고 부화 소요시간을 조사하고, 교잡종의 모계어종의 순종(능성어 ♀ × ♂, CG)과 비교하였다. CGGG와 CG 수정란은 자외선 살균 해수가 채워진 5-L 용량의 비이커 9개에 3,000~5,000개/비이커의 밀도로 수용되었으며, 발생 기간 중 수온은 23.5~24.8°C 그리고 염분은 32.1~32.8 ppt였다. CGGG의 수정률과 부화율은 각각 $69.4 \pm 1.5\%$ 와 $59.0 \pm 5.1\%$ 로서 CG에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$). CGGG는 비균등 난할, 배체 체형 기형 그리고 부화자어의 척추 기형이 높게 출현한 것을 제외하고, CG와 동일한 난발생 양상을 보였다. CGGG의 부화까지 소요 시간은 CG에 비해 약 2시간 느렸다($p < 0.05$). 이상의 결과에서 CGGG는 수정률, 부화율 그리고 기

형률 등 발생능력이 CG에 비해 낮았지만 부화자어의 대량생산이 가능할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청의 Golden Seed 프로젝트(213008-05-3-SB430)와 한국해양과학기술원의 주요사업(E99722)의 지원에 의해 수행되었습니다. 이 논문을 세심하게 검토해주신 세 분의 심사위원께 감사드립니다.

REFERENCES

- Bartley, D.M., K. Rana and A.J. Immink. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 325-337.
- Bermudes, M. and A.J. Ritar. 1999. Effects of temperature on the embryonic development of the striped trumpeter (*Latris lineata* Bloch and Schneider, 1801). *Aquaculture*, 176: 245-255.
- Bonnet, E., A. Fostier and J. Bobe. 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, 67: 786-794.
- Chen, Z.-F., Y.-S. Tian, P.-F. Wang, J. Tang, J.-C. Liu, W.-H. Ma, W.-S. Li, X.-M. Wang and J.-M. Zhai. 2018. Embryonic and larval development of a hybrid between kelp grouper *Epinephelus moara* ♀ × giant grouper *E. lanceolatus* ♂ using cryopreserved sperm. *Aquacult. Res.*, 49: 1407-1413.
- Chevassus, B. 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture*, 33: 245-262.
- Ch'ng, C.L. and S. Senoo. 2008. Eggs and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × giant grouper *E. lanceolatus*. *Aquacult. Sci.*, 56: 505-512.
- Cho, J.K., C.G. Hong, J.Y. Park, M.H. Son, C.K. Park and J.M. Park. 2015. Effects of water temperature and salinity on the egg development and larvae of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Korean J. Ichthyol.*, 27: 21-25. (in Korean)
- Finn, R.N. 2007. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquat. Toxicol.*, 81: 337-354.
- Glamuzina, B., V. Kožul, P. Tutman and B. Skaramuca. 1999. Hybridization of Mediterranean groupers: *Epinephelus marginatus* ♀ × *E. aeneus* ♂ and early development. *Aquacult. Res.*, 30: 626-628.
- Glamuzina, B., N. Glavić, B. Skaramuca, V. Kožul and P. Tutman. 2001. Early development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ × *E. marginatus* ♂. *Aquaculture*, 198: 55-61.
- Haddy, J.A. and N.W. Pankhurst. 2000. The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilisation and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture*, 188: 115-131.
- Hano, T., Y. Oshima, S.G. Kim, H. Satone, Y. Oba, T. Kitano, S. Inoue, Y. Shimasaki and T. Honjo. 2007. Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere*, 69: 927-933.
- Heemstra P.C. and J.E. Randall. 1993. *FAO Species Catalogue Vol. 16 Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae) An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date.* FAO Fish Synopsis, No. 125. FAO, Rome, pp. 227-228.
- Kaschner, K., K. Kesner-Reyes, C. Garilao, J. Rius-Barile, T. Rees and R. Froese. 2016. *AquaMaps: Predicted range maps for aquatic species.* World wide web electronic publication, www.aquamaps.org, Version 08/2016.
- Keinänen, M., C. Tigerstedt, P. Kålx and P.J. Vuorinen. 2003. Fertilization and embryonic development of whitefish (*Coregonus lavaretus lavaretus*) in acidic low-ionic-strength water with aluminum. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 314-329.
- Kim, B.H., K.M. Kim, Y.D. Lee, C.B. Song and S. Rho. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. I. The effect of HCG on ovulation induction. *J. Aquacult.*, 10: 55-61. (in Korean)
- Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.K. Kim and J.H. Kim. 2005. *Illustrated book of Korean fishes.* Kyo-Hak Publishing Co., Seoul. pp. 276-286. (in Korean)
- Kiryakit, A., W.G. Gallardo and A.N. Bart. 2011. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* × *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 320: 106-112.
- Klumpp, D.W. and H. Von Westernhagen. 1995. Biological effects of pollutants in Australian tropical coastal waters: embryonic malformations and chromosomal aberrations in developing fish eggs. *Mar. Pollut. Bull.*, 30: 158-165.
- Koh, I.C.C., S.R.M. Shaleh, N. Akazawa, Y. Oota and S. Senoo. 2010. Egg and larval development of a new hybrid orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* × giant grouper *E. lanceolatus*. *Aquacult. Sci.*, 58: 1-10.
- Koo, T.S.Y. and M.L. Johnston. 1978. Larva deformity in striped bass, *Morone saxatilis* (walbaum), and blueback herring, *Alosa aestivalis* (mitchill), due to heat shock treatment of developing eggs. *Environ. Pollut.*, 16: 137-149.
- Lee, Y.D. and K.M. Go. 2003. Aquatic industrialization by development of reproductive technology of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ministry of Oceans and Fisheries. pp. 99. (in Korean)
- Lee, Y.D., Y.B. Song, B.S. Lim, S.R. Oh. and H.B. Kim. 2008. Grouper aquaculture research in Jeju Island, *Bull. of Mar. Environ. Res. Inst.* 32: 49-60. (in Korean)
- Liu, Q.H., Z.Z. Xiao, X.Y. Wang, S.H. Xu, S.G. Guan, C.A. Xu, H.S. Zhang and J. Li. 2016. Sperm cryopreservation in different

- grouper subspecies and application in interspecific hybridization. *Theriogenology*, 85: 1399-1407.
- Noh, C.H., K.S. Kim, J.G. Myoung, J.K. Cho, N.J. Yun, H.G. Lim and I.C. Bang. 2015. The hatchability of fertilized eggs of interspecific hybrid between red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) and brown-marbled grouper (*E. fuscoguttatus*). *Korean J. Ichthyol.*, 27: 16-20. (in Korean)
- Pierre, S., S. Gaillard, N. Prévot-D'Alvise, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon, D. Leung-Tack and J.P. Grillasca. 2008. Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aqua. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 18: 297-308.
- Randall, D.J. and T.K.N. Tsui. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.*, 45: 17-23.
- Sadovy, Y.J., T.J. Donaldson, T.R. Graham, F. McGilvray, G.J. Muldoon, M.J. Phillips, M.A. Rimme, A. Smith and B. Yeeting. 2003. While stocks last: The live reef food fish trade. *Asian Development Bank, Manila*. pp. 95.
- Song, Y.B., H.J. Baek, H.B. Kim, K. Soyano, S.J. Kim and Y.D. Lee. 2008. Induction of maturation and ovulation with HCG treatment in the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Korean J. Ichthyol.*, 21: 96-101. (in Korean)
- Van Der Wal, E.J. 1985. Effects of temperature and salinity on the hatch rate and survival of Australian bass (*Macquaria novemaculeata*) eggs and yolk-sac larvae. *Aquaculture*, 47: 239-244.
- Vatanakul, V., J. Kongkumnerd, S. Rojanapitayakul, R. Yashiro and P. Panichasuke. 1995. Brood stock development of giant grouper *Epinephelus lanceolatus*, *Library, enaca*, pp. 1-6.
- Von Westernhagen, H. 1988. 4 Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. *Fish Physiol.* In: Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds.), *Academic Press, London*, pp. 253-346.
- Zhang, Z., J. Hu, H. Zhen, X. Wu and C. Huang. 2008. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 8133-8139.
- Zelennikov, O.V. 1997. The effect of acidification on oogenesis of rainbow trout during sex differentiation. *J. Fish Biol.*, 50: 18-21.