

Inducción del desove con HCG y desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera,  
*Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877)

Hormone induced spawning (HCG), and embryonic and larval development of the leopard grouper,  
*Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877)

Vicente Gracia-López\*  
Jesús Rodríguez-Romero  
José M. Pérez-Ramírez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)  
Mar Bermejo 195  
Col. Playa Palo Sta. Rita  
La Paz, CP 23090, Baja California Sur, México  
\* E-mail: vinny@cibnor.mx

Recibido en julio de 2003; aceptado en noviembre de 2003

## Resumen

Se obtuvo el desove de dos hembras silvestres de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, mediante el uso de la hormona Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) inoculada en dos dosis: la primera de 1000 UI/kg y la segunda de 500 UI/kg, separadas por 24 h. De las cuatro hembras tratadas, dos tuvieron una respuesta positiva al desove, liberando aproximadamente 40,000 huevos/pez, que fueron fecundados con el esperma de los machos que se encontraban maduros. La tasa de fecundación obtenida de las dos hembras fue de 10% y 0%. Se describe el desarrollo embrionario completo, así como las características morfológicas de los huevos y las larvas hasta la primera alimentación. Los huevos esféricos, transparentes y pelágicos, presentaron un diámetro de  $872.8 \pm 15.4 \mu\text{m}$  (rango de 850.4 a 912.5  $\mu\text{m}$ ) y una gota lipídica con un diámetro de  $177.3 \pm 7.0 \mu\text{m}$ .

*Palabras clave:* reproducción, cabrilla, cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*.

## Abstract

Induced spawning of two wild females of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, was obtained using Human Chorionic Gonadotropin (HCG) supplied in two dosages: a first injection of 1000 IU/kg and a second of 500 IU/kg, 24 h apart. Of the four treated females, two had a positive spawning response, releasing approximately 40,000 eggs/fish. These were fertilized with mature male sperm. The fertilization rate obtained for each female was 10% and 0%. Complete embryonic development, and the morphology of eggs and larvae are described until the first feeding. Eggs were spherical, buoyant and transparent, with a diameter of  $872.8 \pm 15.4 \mu\text{m}$  (ranging from 850.4 to 912.5  $\mu\text{m}$ ) and an oil droplet diameter of  $177.3 \pm 7.0 \mu\text{m}$ .

*Key words:* reproduction, grouper, leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*.

## Introducción

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, es una de las cinco especies del género *Mycteroperca* en el Pacífico oriental (Rosenblatt y Zahuranec, 1967). Se distribuye en la costa sur oriental de la Península de Baja California, y a lo largo de todo el Golfo de California hasta Jalisco, México. Se encuentra en áreas rocosas cerca de la línea de costa y en las islas, a profundidades de 0 a 50 m. Poco se sabe de la biología de esta especie y los estudios realizados se han basado en el comportamiento alimenticio. Los individuos adultos de cabrilla sardinera se alimentan de bancos de arenque, *Harengula thrissina* (Jordan y Gilbert, 1882), anchovetas, *Cetengraulis mysticetus* (Günther, 1867), y otros peces. Los juveniles se alimentan durante el día de peces y crustáceos bentónicos

## Introduction

The leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, is one of the five species of the genus *Mycteroperca* found in the Pacific (Rosenblatt and Zahuranec, 1967). It is distributed along the southeast coast of the Baja California peninsula and throughout the Gulf of California down to Jalisco, Mexico. It occurs in rocky areas near the coastline and islands, at depths of 0–50 m. There is little knowledge about the biology of this species and studies have focused on its feeding behavior. Adult individuals feed mainly on flatiron herring, *Harengula thrissina* (Jordan and Gilbert, 1882), Pacific anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Günther, 1867), and other fishes. Juveniles feed throughout the day on benthic fishes and crustaceans (Hobson, 1968). There are no reports on the aquaculture of this species.

(Hobson, 1968). No se ha llevado a cabo ningún estudio sobre el cultivo de esta especie.

La cabrilla sardinera, *M. rosacea*, es un pez comercial apreciado en el mercado del noroeste de México. Como otras especies del mismo género, es un buen candidato para la acuicultura. En Asia, los cultivos de meros, principalmente del género *Epinephelus*, dependen enteramente de la producción silvestre de semilla (Tookwinas, 1990). Por ello, para lograr una producción estable de juveniles de cabrilla sardinera es esencial llevar a cabo estudios sobre la reproducción artificial en cautiverio y el cultivo larvario.

Watanabe *et al.* (1995) realizaron un estudio completo acerca de los efectos del uso de diferentes hormonas solas o en combinación (HCG, LHRH-a y CPH) para la inducción al desove del mero de Nassau, *Epinephelus striatus* (Bloch, 1792), obteniendo tasas de fertilización superiores a 50%. Glamuzina *et al.* (2000) hicieron la descripción y la ilustración del desarrollo embrionario del mero *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). También existen reportes realizados por Colin *et al.* (1996) acerca de la cría de larvas hasta los estadios juveniles del mero americano, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828). Sin embargo, hay poca información concerniente a la inducción al desove y la embriogenia en especies del género *Mycteroperca*. Roberts y Schlieder (1983) reportaron la inversión de sexos, la maduración, el desove y la embriogenia de *M. microlepis* (Goode y Bean, 1879).

## Material y métodos

Se capturaron cabrillas adultas ( $n = 8$ ) con anzuelo en la Isla San José, Baja California Sur (México), entre junio y julio de 2001, y se transportaron al laboratorio en tanques cilíndricos de 500 L con aireación suplementaria. Los peces fueron anestesiados con 50 mg L<sup>-1</sup> de tricaina metanosulfonato (MS-222), identificados con marcas en la musculatura dorsal (Spaghetti FloyTags) y pesados. Se tomaron muestras de esperma de los machos aplicando una ligera presión abdominal para observar la motilidad espermática. De cada una de las hembras se obtuvo una muestra de gónada mediante la introducción de una cánula de polietileno (1.6 mm d.e.; 0.8 mm d.i.) en el oviducto, misma que se preservó en formol al 4%, determinándose la madurez gonadal (diámetro del ovocito, grado de madurez). Las cuatro hembras maduras fueron inducidas a desovar con dos inyecciones de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG); a la primera inyección de 1000 IU kg<sup>-1</sup> le siguió 24 h más tarde una segunda inyección de 500 IU kg<sup>-1</sup>. Los cuatro machos maduros (con presencia de esperma fluyente) y las cuatro hembras inyectadas, fueron mantenidos en un tanque de 16 m<sup>3</sup> bajo flujo continuo de agua con temperatura media de 28.5°C y 36 ppm de salinidad. Se determinó el momento de la puesta con base en la inflamación del abdomen y el grosor de la papila urogenital de las hembras. Cuando los reproductores estuvieron listos para el desove, los óvulos y el esperma se obtuvieron por presión abdominal. Los huevos fueron fecundados por el método seco y transferidos a un tanque de 500 L.

The leopard grouper, *M. rosacea*, is an important commercial fish and has a high market value in the northwestern part of Mexico. Like other groupers, this species could be a new candidate for aquaculture. In Asia, the culture of groupers, mainly *Epinephelus*, relies entirely on wild seed, which fluctuates and is scarce (Tookwinas, 1990). Studies on the artificial reproduction of groupers have therefore become essential to achieve a stable juvenile production.

Watanabe *et al.* (1995) studied the effect of different hormones (alone or in combination, HCG, LHRH-a and CPH) on the induced spawning of the Nassau grouper, *Epinephelus striatus* (Bloch, 1792), and obtained fertilization rates higher than 50%. Glamuzina *et al.* (2000) described the embryonic development of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Loer, 1834). Colin *et al.* (1996) reported the development from eggs to larvae obtained from artificial reproduction of the red grouper, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828). However, there is little information concerning the induction, spawning and embryology of the genus *Mycteroperca*. Roberts and Schlieder (1983) reported the induced sex inversion, maturation, spawning and embryology of *M. microlepis* (Goode and Bean, 1879).

## Material and methods

Adult leopard groupers ( $n = 8$ ) were captured by hook and line at San José Island, Baja California Sur (Mexico), between June and July 2001. Fish were transported to the laboratory in 500-L cylindrical tanks with supplemental aeration. Fish were anaesthetized with 50 mg L<sup>-1</sup> of tricaine methane-sulfonate (MS-222), tagged in the dorsal musculature (Spaghetti Floy Tags), and weighed. Milt samples were taken to observe sperm motility by applying gentle pressure to the fish abdomen. For each of the females, a gonad sample was obtained by introducing a polyethylene cannula (1.6 mm e.d.; 0.8 mm i.d.) into the oviduct and preserved in 4% formalin in seawater. From these samples, gonad maturity was determined. The four mature females were induced to spawn with two injections of Human Chorionic Gonadotropin (HCG). The first injection (1000 IU kg<sup>-1</sup>) was followed 24 h later with a second injection (500 IU kg<sup>-1</sup>). The four mature males (presence of milt) and the four induced females were maintained in a 16-m<sup>3</sup> flow-through seawater tank at a temperature of 28.5°C and salinity of 36 ppt. The time of stripping was determined based on the abdominal inflation and the protrusion of the urogenital region. When ready to spawn, eggs and sperm were obtained by stripping males and females. Eggs were fertilized using the dry method and transferred to a 500 L tank. Before stocking the eggs, tanks were chlorinated and filled with UV sterilized and filtered (<1 µm) seawater. From day 2 after hatching, sieved rotifers (size <60 µm) and phytoplankton, *Nannochloropsis oculata*, were added to the tanks at concentrations of 10 Rot mL<sup>-1</sup> and 250,000 cells mL<sup>-1</sup>, respectively. Egg and larva samples were observed under a compound microscope (Olympus BX41; magnification = 4×) and

Los tanques fueron clorados y llenados con agua de mar filtrada (<1 µm) y esterilizada (UV) antes de depositar los huevos en ellos. Desde el día 2 después de la eclosión se adicionaron rotíferos tamizados (<60 µm) a una densidad de 10 Rot mL<sup>-1</sup> y microalgas *Nannochloropsis oculata* a una concentración de 250,000 cel mL<sup>-1</sup>. Las muestras de huevos y larvas fueron observadas bajo en un microscopio óptico (Olympus BX41; aumento = 4×) y se les tomaron fotografías usando una cámara digital (Coolsnap-Pro). Se registraron las características morfológicas de huevos y larvas, y la duración de cada estadio embrionario (tabla 1). Se midieron el diámetro y la gota lipídica de 100 huevos a las 3, 6, 12, 24 y 36 h. Se midió la longitud total, la longitud notocordal, el diámetro de la gota lipídica y la longitud del saco vitelino de 30 larvas. Las larvas fueron medidas al eclosionar y a las 8, 33, 60 y 79 horas después de la eclosión (h.a.h.).

### Resultados

El rango de peso de los machos maduros fue de 2.9 a 4.6 Kg y el de las hembras de 2.2 a 3.7 Kg. De los 40,000 huevos obtenidos de la hembra de mayor tamaño (3.7 Kg) sólo se fecundaron 4,000, 43 h después de la primera inyección. El

photographed with a digital camera (Coolsnap-Pro). The morphological characteristics of eggs and larvae, and duration of each embryonic stage were recorded (table 1). The egg and oil droplet diameter of 100 eggs was measured at 3, 6, 12, 24 and 36 h. Larvae were measured (*n* = 30) at 0, 8, 33, 60 and 79 hours after hatching (h.a.h.) for total and notochord length, oil globule diameter and yolk sac length.

### Results

Male weight ranged from 2.9 to 4.6 kg and female weight from 2.2 to 3.7 kg. Of the 40,000 eggs obtained from the largest female (3.7 kg), 4,000 were fertilized 43 h after the first injection. Eggs were counted using the volumetric method (*n* = 30). The mean diameter of fertilized eggs was 872.8 ± 15.4 µm (ranging from 850.4 to 912.5 µm). Fertilized eggs were spherical, transparent and buoyant, with an oil droplet diameter of 177.3 ± 7.0 µm at the center of the egg. Egg and oil droplet diameters did not show significant differences (*P* > 0.05) at 3, 6, 12, 24 and 36 h. Table 1 presents the embryonic development stages of leopard grouper from fertilization (0 h) to larvae (48–119 h), and the morphological characteristics and total length of the larvae (figs. 1, 2).

**Tabla 1.** Desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, a 21.5°C (19–26°C). TL = longitud total, NL = longitud notocordal, OD = diámetro de gota lipídica y YL = longitud de saco vitelino.

**Table 1.** Embryonic and larval development of leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, at 21.5°C (19–26°C). TL = total length, NL = notochord length, OD = oil droplet diameter, and YL = yolk sac length.

Hora <sup>a</sup>	d + h.a.h. <sup>b</sup>	Etapa	Descripción
0 h		Fertilización	
1 h 05'		2 células	Primera división ( <i>first cleavage</i> )
1 h 12'		4 células	Segunda división ( <i>second cleavage</i> )
1 h 19'		8 células	Tercera división ( <i>third cleavage</i> )
1 h 27'		16 células	
1 h 35'		32 células	
1 h 48'		64 células	
2 h 45'		Mórula (fig. 1a)	
5 h 45'		Blástula	
11 h		Gástrula (fig. 1b)	
23 h 30'		Embrión temprano (fig. 1c)	Formación del embrión. Organogénesis. Vesícula de Kupffer visible ( <i>Embryonic formation. Organogenesis. Eye and Kupffer's vesicle visible</i> )
35 h 45'		Embrión tardío (fig. 1d)	Latidos cardíacos visibles. Movimiento del embrión ( <i>C-shaped embryo. Heart beat. Embryonic movement</i> )
40 h		Eclosión	
48 h	0 + 8	Larva (fig. 2a)	TL 2119, NL 1995, OD 153, YL 1003
73 h	1 + 9	Larva (fig. 2b)	TL 2553, NL 2369, OD 116, YL 692
100 h	2 + 12	Larva (fig. 2c)	TL 2609, NL 2386, OD 82, YL 322
119 h	3 + 7	Larva (fig. 2d)	TL 2713, NL 2532, OD 0, YL 0

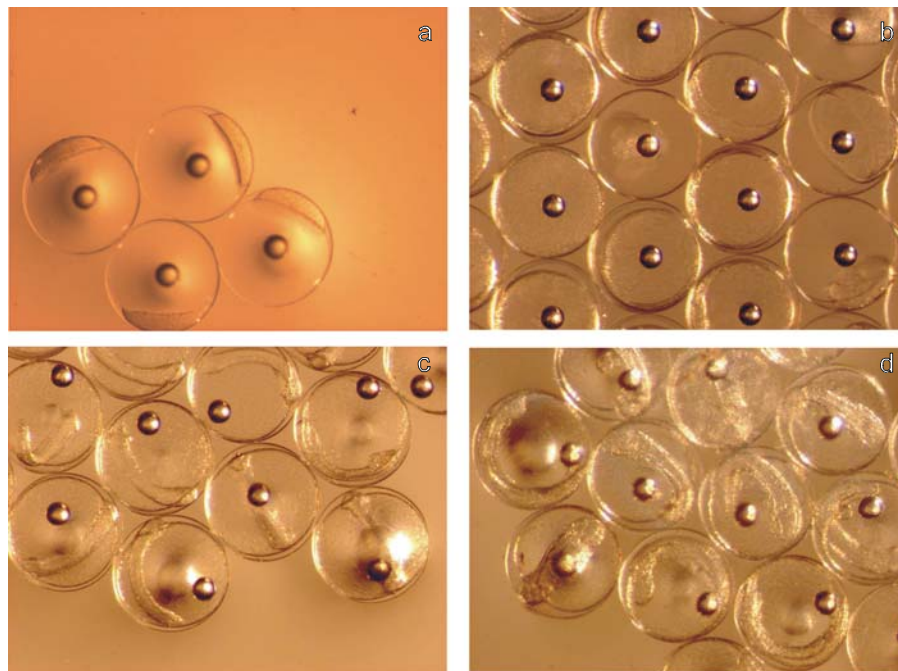
<sup>a</sup> Desde fertilización; <sup>b</sup> días + horas después de eclosión (<sup>a</sup> hours from fertilization; <sup>b</sup> days + hours after hatching).

conteo de los huevos se realizó mediante el método volumétrico ( $n = 30$ ). El diámetro medio de los huevos fue de  $872.8 \pm 15.4 \mu\text{m}$  (con un intervalo de  $850.4\text{--}912.5 \mu\text{m}$ ). Los huevos fecundados eran esféricos, transparentes y flotantes. Tenían una gota lipídica en el centro del huevo con un diámetro de  $177.3 \pm 7.0 \mu\text{m}$ . Los diámetros del huevo y de la gota lipídica, no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) a las 3, 6, 12, 24 y 36 h. En la tabla 1 se pueden observar las diferentes etapas del desarrollo embrionario de la cabrilla sardinera a partir de la fertilización (0 h) hasta la obtención de larvas (48–119 h), así como sus caracteres morfológicos y longitud total de las larvas (figs. 1, 2). La eclosión ocurrió 40 h después de la fecundación. La larva recién eclosionada carecía de boca, tracto digestivo y no presentaba pigmentación en los ojos. La longitud total y notocordal fue  $1985 \pm 44.5$  y  $1865 \pm 37.6 \mu\text{m}$ , respectivamente. La longitud del saco vitelino fue de  $1195 \pm 25.8 \mu\text{m}$ . A las 8 h.a.h., la boca y el tracto digestivo no eran distinguibles y un largo pliegue rodeaba el cuerpo y se observaban tres áreas pigmentadas. A las 33 h.a.h., se apreciaban las cápsulas ópticas y los rudimentos de la boca, el tracto digestivo empezó a distinguirse y fue más evidente en la parte posterior, donde se apreciaba el recto y el ano. La apertura de la boca se hizo evidente hacia el tercer día, y el área pigmentada en la zona ventral empezó a aumentar. A las 60 h.a.h. el tracto digestivo estaba mejor formado y las cápsulas ópticas y los ojos continuaban desarrollándose, las aletas pectorales aparecieron y el pliegue que rodeaba el cuerpo se estrechó en la parte posterior. Las áreas pigmentadas en la notocorda aumentaron de tamaño. A las 79 h.a.h., no se observaba vitelo ni gota lipídica (tabla 1).

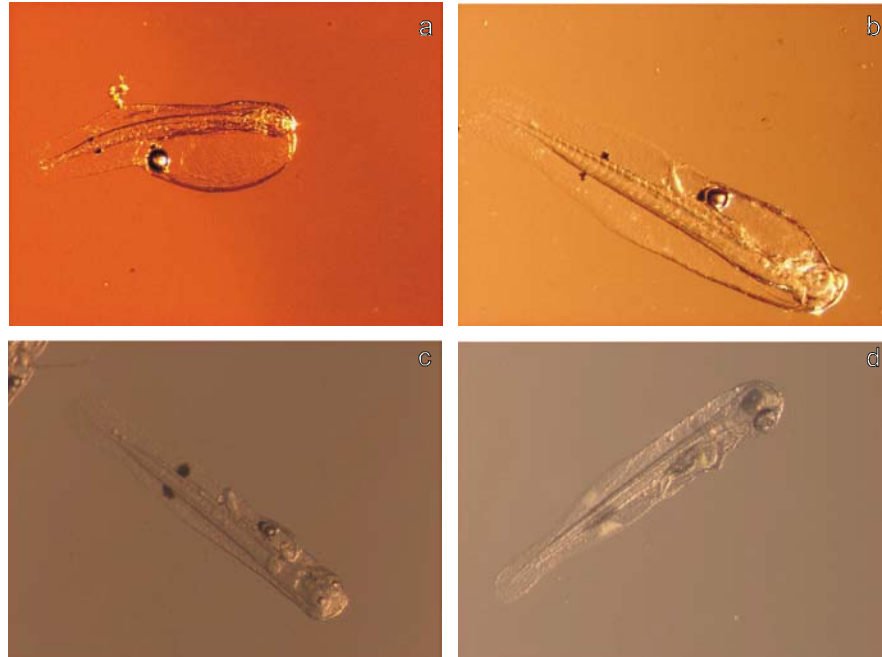
Hatching occurred 40 h after fertilization. In the newly hatched larvae the mouth, digestive tract and pigmented eyes were absent; total and notochord lengths were  $1985 \pm 44.5$  and  $1865 \pm 37.6 \mu\text{m}$ , respectively. Yolk sac length was  $1195 \pm 25.8 \mu\text{m}$ . At 8 h.a.h., the mouth and digestive tract were not differentiated; a large fin fold surrounding the body and three pigmented areas could be appreciated. At 33 h.a.h., optic capsules and rudiments of the mouth could be seen; the digestive tract was distinctive and more evident in the posterior region where the rectum and the anus were visible. The mouth opened on the third day. The pigmented area in the ventral zone increased. At 60 h.a.h., the digestive tract formed and optic capsules and eyes continued development; pectoral fins appeared and fin fold constricted in the posterior part of the body. Pigmented spots in the notochord area increased in size. At 79 h.a.h., there was no yolk sac and oil globule, and the digestive tract was completely formed (table 1).

### Discussion

The use of hormones for induced spawning has been implemented in some fish species, and HCG has demonstrated to be an effective spawning agent for *E. striatus* (Watanabe *et al.*, 1995). Also, LHRH-a has been successfully used to spawn *E. salmoides* (Lacepède, 1802) (Kungvankij *et al.*, 1986). The egg diameter of the leopard grouper was found to be smaller than that reported for *M. microlepis* ( $920 \mu\text{m}$ ; Roberts and Schlieder, 1983), similar to *E. marginatus* ( $888 \mu\text{m}$ ; Spedicato *et al.*, 1995), and bigger than eggs of *E. microdon* (Bleeker, 1849) ( $769\text{--}832 \mu\text{m}$ ; Tamaru *et al.*, 1996). In this study, the



**Figura 1.** Diferentes etapas del desarrollo embrionario de la cabrilla sardinera: (a) mórula, (b) gástrula, (c) embrión temprano y (d) embrión tardío.  
**Figure 1.** Different stages of egg development of leopard grouper: (a) morula, (b) gastrula, (c) early embryo, and (d) late embryo.



**Figura 2.** Desarrollo de la larva de la cabrilla sardinera: (a) 8 horas después de eclosión (h.a.h.), (b) 33 h.a.h., (c) 60 h.a.h. y (d) 79 h.a.h.  
**Figure 2.** Larval development of leopard grouper: (a) 8 hours after hatching (h.a.h.), (b) 33 h.a.h., (c) 60 h.a.h., and (d) 79 h.a.h.

## Discusión

El uso de hormonas para la inducción del desove ha sido practicado en varias especies de peces. La HCG ha demostrado ser un agente efectivo para la inducción al desove de *E. striatus* (Watanabe *et al.*, 1995). También la hormona LHRH-a se ha empleado con éxito en el mero *E. salmoides* (Lacepède, 1802) (Kungvankij *et al.*, 1986). El diámetro de los huevos de cabrilla sardinera fue menor que los reportados para *M. microlepis* (920 µm; Roberts y Schlieder, 1983), parecidos a los de *E. marginatus* (888 µm; Spedicato *et al.*, 1995) y más grandes que los huevos de *E. microdon* (Bleeker, 1849) (769–832 µm; Tamaru *et al.*, 1996). En este estudio, la duración del desarrollo embrionario (desde la fecundación hasta la eclosión) fue de 40 h, a una temperatura de 21.5°C, similar a *M. microlepis* que eclosionó a las 45 h a 21°C (Roberts y Schlieder, 1983). Generalmente el desarrollo es más rápido a altas temperaturas, lo cual se ha visto en huevos de *E. marginatus* que eclosionaron después de 30 h a una temperatura de 23°C (Glamuzina *et al.*, 2000). La longitud media de las larvas de cabrilla sardinera (1.98 mm) fue similar a la reportada para *M. microlepis* (2.05 mm; Roberts y Schlieder, 1983). Estas longitudes parecen estar dentro del intervalo normal (1.4–2.25 mm) de longitudes de las larvas de Epinephelinae (Hussain y Higuchi, 1980; Glamuzina *et al.*, 2000). El patrón de pigmentación y las características morfológicas generales de las larvas fueron similares a las descritas en otras cabrillas del género *Epinephelus* (Hussain y Higuchi, 1980).

duration of the embryonic development process (from fertilization to hatching) was 40 h at 21.5°C, similar to *M. microlepis* that hatched in 45 h at 21°C (Roberts and Schlieder, 1983). Generally, it seems that development is faster at higher temperatures; this has been shown for *E. marginatus* eggs, which hatched after 30 h at 23°C (Glamuzina *et al.*, 2000). Mean total length of leopard grouper larvae (1.98 mm) was similar to that reported for *M. microlepis* (2.05 mm; Roberts and Schlieder, 1983). These lengths seem to be in the usual range (1.4–2.25 mm) of Epinephelinae larvae (Hussain and Higuchi, 1980; Glamuzina *et al.*, 2000). Pigmentation patterns and general morphological characteristics of the larvae were similar to those described for other groupers of the genus *Epinephelus* (Hussain and Higuchi, 1980).

## Acknowledgements

The authors express their sincere appreciation to many people who gave time, advice, and support. Nilda Margarita Kiewek and Ira Fogel at CIBNOR in La Paz, B.C.S., Mexico, provided the editing of the English text. This study was supported by the Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC), project 200007006.

English translation by the authors.

## Agradecimientos

Los autores expresan su más sincero agradecimiento a las personas que dieron su tiempo y ayuda en la elaboración de

este estudio. Nilda Margarita Kiewek y Ira Fogel del CIBNOR en La Paz, B.C.S., Mexico, editaron el texto en inglés. Este estudio fue financiado por el Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC), proyecto 200007006.

## Referencias

- Colin, P.L., Koenig, C.C. and Laroche, W.A. (1996). Development from egg to juvenile of the red grouper, *Epinephelus morio* (Pisces: Serranidae) in the laboratory. In: F. Arreguín-Sánchez, J.L. Munro, M.C. Balgos and D. Pauly (eds.), Biology, Fisheries and Culture of Tropical Groupers and Snappers. ICLARM Conf. Proc., 48: 399–414.
- Glamuzina, B., Glavic, N., Tutman, P., Kozul, V. and Skaramuca, B. (2000). Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper *Epinephelus costae* (Steindachner, 1878) (Pisces, Serranidae). *Scientia Marina*, 64(3): 341–345.
- Hobson, E.S. (1968). Predatory behavior of some shore fishes in the Gulf of California. US Fish Wildlife Service, Bureau Sport Fisheries. Wildlife Research Rep. 73, 92 pp.
- Hussain, N.A. and Higuchi, M. (1980). Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Aquaculture*, 19: 339–350.
- Kungvankij, P., Tiro, L.B., Pudadera, B.P. and Potestas, I.O. (1986). Induced spawning and larval rearing of grouper (*Epinephelus salmoides*, Maxwell). In: J.L. Maclean, L.B. Dizon and L.V. Hosillos (eds.), The First Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Soc., Manila, Philippines.
- Roberts, D.E. Jr. and Schlieder, R.A. (1983). Induced sex inversion, maturation, spawning and embryogeny of the protogynous grouper, *Mycteroperca microlepis*. *J. World Maricult. Soc.*, 14: 639–649.
- Rosenblatt, R.H. and Zahuranec, B.J. (1967). The eastern Pacific grouper of the genus *Mycteroperca*, including a new species. *Calif. Fish Game*, 53(4): 228–245.
- Spedicato, M.T., Lembo, G., Di Marco, P. and Marino, G. (1995). Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options Mediterr.*, 16: 131–148.
- Tamaru, C.S., Carlstromtrick, C., Fitzgerald, W.J. and Ako, H. (1996). Induced final maturation and spawning of the marbled grouper, *Epinephelus microdon*, captured from spawning aggregations in the Republic of Palau, Micronesia. *J. World Aquacult. Soc.*, 27(4): 363–372.
- Tookwinas, S. (1990). Review of knowledge on grouper aquaculture in southeast Asia. In: *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti, 20 February–4 March, 1989. ACUACOP, IFREMER, Actes de Colloque, 9: 429–435.
- Watanabe, W.O., Ellis, S.C., Ellis, E.P., Head, W.D., Kelley, C.D., Moriwake, A., Lee, C.S. and Bienfang, P.K. (1995). Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture*, 138: 205–209.