

## Opérations de marquages de mérours capturés sur le littoral du Parc Régional Marin de la Côte Bleue (Méditerranée N.-O., France) (mise au point et application d'une technique opérationnelle)

*Tagging and release operations of mediterranean brown groupers on the  
Regional Marine Park of the Blue Coast (N. W. Mediterranean Sea, France)  
(creation and use of an operating method)'*

**Frédéric Bachet, Jean-Yves Jouvenel**

Parc Régional Marin de la Côte Bleue, Maison de la Mer, le Port, B.P. 37, F. 13960 Sausset-les-Pins.

**Mots clés :** *Epinephelus* sp., marquage, réserve, écologie, Méditerranée.

**Key words:** *Epinephelus* sp., tagging, protected area, ecology, Mediterranean sea.

**RESUME :** Entre janvier 1988 et juillet 1998, un certain nombre de mérours capturés devant la Côte Bleue par les pêcheurs professionnels ont été confiés au Parc Régional Marin afin qu'ils soient relâchés dans les espaces protégés de Carry-le-Rouet et de Cap Couronne. Sur l'ensemble de ces mérours, 6 n'ont pas survécu à leur capture et 15 ont pu être relâchés dont 13 marqués au moyen d'une attache TextagTM portant un codage de couleurs. Quinze des 21 mérours signalés ont été pêchés entre 1992 et 1995. Au total 3 espèces ont été rencontrées lors de ces opérations: *Epinephelus marginatus*, *E. costae* et très récemment, *E. caninus*. En ce qui concerne *E. marginatus*, les individus capturés présentent un poids moyen de  $2,10 \pm 2,30$  kg pour une taille moyenne de  $43,34 \pm 5,10$  cm.

**ABSTRACT:** Between January 1988 and July 1998, some groupers have been caught in the Blue Coast area by professional fishermen. Fish were given to be released in protected areas by the Regional Marine Park. Among these groupers, 6 didn't survive, 15 were released and 13 of these, tagged with a colour coded Textag. Fifteen of the 21 groupers were caught between 1992 and 1995. Three species were listed in this programm: *Epinephelus marginatus*, *E. costae* and recently *Epinephelus caninus*. For *E. marginatus*, individuals caught shown a mean weight of  $2,10 \pm 2,30$  kg for a mean total length of  $43,34 \pm 5,10$  cm.

## INTRODUCTION

En 1989, à l'occasion du colloque international sur les "Espèces marines à protéger en Méditerranée" le mérour brun de Méditerranée, *Epinephelus marginatus*, était considéré comme une espèce rare sur les côtes métropolitaines françaises. En effet jusqu'en 1988, date d'une première prise au filet devant Carry-le-Rouet, ce poisson n'était quasiment jamais observé et jamais capturé sur la Côte Bleue.

Le Parc Régional Marin de la Côte Bleue (P.R.M.C.B.) s'est efforcé depuis le commencement des activités du Groupe d'Étude du Mérour (G.E.M.) d'apporter son concours à la protection et à l'avancement des connaissances sur le mérour.

C'est en particulier en développant une relation de confiance avec les pêcheurs professionnels aux petits métiers exerçant sur la Côte Bleue qu'une série d'opérations d'enquête et de marquage sur plusieurs individus a pu débuter en 1988.

Après 10 années, un premier bilan est proposé, dont les objectifs peuvent se résumer en trois points : 1) la diffusion de la méthodologie utilisée dans ces opérations de marquages et de lâchers ; 2) la publication des données biométriques et écologiques ; et 3) la mise à disposition d'une planche récapitulative des codages de couleurs et des types de marques utilisés dans l'éventualité d'une recapture de ces poissons.

## MATERIELS ET METHODES

### A - Marquages.

Les poissons qui ont été confiés au Parc Marin n'ont pas tous pu bénéficier du protocole de marquage tel qu'il va être décrit. En effet, les contraintes logistiques imposées par ce type d'opération imposent en particulier d'avoir à

disposition un équipement permettant de garder les poissons pendant une certaine période (3 jours à 10 mois), ce qui malheureusement n'a pas pu être réalisé pour la totalité des mérours.

Le protocole de marquage a été conservé dans ses grandes lignes, cependant quelques

améliorations sont apparues au cours du temps le rendant aujourd'hui réellement efficace et pratique. Initialement, des marques de type Floy-Tag étaient implantées dans le tissu musculaire au moyen d'un trocart sur les mérous relâchés dans le Parc Marin. Jugeant cette pratique trop traumatisante surtout sur de jeunes individus une technique présentant moins d'inconvénients pour le poisson a été mise au point.

Après sa capture, le poisson est transporté dans un récipient de 50 L où lui est administré un traitement antibiotique par balnéation. Ensuite il est déposé pour une convalescence dans un aquarium de stabulation (600 L) en fonctionnement. Son séjour, pendant lequel il est nourri (céphalopodes congelés), est de durée variable ce qui permet de planifier et de préparer plus aisément le lâcher. Le marquage proprement dit est réalisé sous anesthésie. Le produit (1,2-propanediol ou Quinaldine) est dissout dans l'eau. Après avoir été pesé, le poisson est déposé sur une serviette mouillée où il est également mesuré. En fonction de l'évolution des recherches promues par le G.E.M., certains mérous ont fait l'objet de prélèvements de tissu musculaire (2 individus) ou de nageoire pelvienne (11 individus) destinés aux études génétiques sur les populations de mérous de Méditerranée ; la quasi-totalité ont subi un prélèvement d'écaillés destiné à des travaux de scalimétrie.

Le marquage est réalisé avec un pistolet à porte-étiquettes de marque Textag, dont l'aiguille enduite de pommade antibiotique est plantée au niveau du bord inférieur du préopercule gauche ou droit (Figure 1). La marque est posée instantanément

par simple pression sur la gâchette. La pièce osseuse, peu charnue, cicatrise très vite autour du Nylon et le poisson ne semble pas du tout gêné. Le Textag ne pénètre pas dans la cavité branchiale puisque des tubes colorés constituant le codage de la marque le maintiennent à l'extérieur. Le poisson par le mouvement de sa nageoire pectorale, nettoie involontairement la marque de couleur qui reste donc facilement reconnaissable. Très léger, résistant à l'arrachement, non traumatisant, permettant une identification à distance, ce dispositif a également les avantages de réaliser un nombre important de combinaisons et d'éviter de défigurer le mérou. Une fois la marque posée, le poisson est remis dans le bidon où l'eau est très aérée par un fort bullage.

### B - Lâchers.

Après son complet réveil, le mérou est transporté jusqu'à son site de lâcher : zones marines protégées de Carry-le-Rouet et de Cap Couronne. Il est ensuite enveloppé d'un sac polyéthylène transparent dans lequel il est accompagné en immersion jusqu'au fond où il est libéré à proximité de roches présentant des cavités. A cette occasion, des clichés du mérou en entier ainsi que de sa marque sont pris pendant que celui-ci redécouvre son environnement naturel. Après une dernière vérification de son comportement (ventilation, position, etc. ...) les opérateurs quittent le lieu du lâcher. Les principales informations recueillies sont rassemblées sur une fiche signalétique : date, lieu et mode de capture, identité du pêcheur, espèce, poids, taille etc.

## RESULTATS

### A - Diversité des captures.

En tout, ce sont 21 mérous appartenant à 3 espèces différentes (*E. marginatus*, *E. costae* et *E. caninus*) qui ont pu faire l'objet d'une enquête, 15 spécimens ont pu être relâchés, dont 13 marqués selon la procédure décrite antérieurement.

L'espèce *E. marginatus*, le mérou brun de Méditerranée représente la plus grande partie des poissons rencontrés : 18 spécimens dont 13 marqués et relâchés (Tableau I).

L'espèce *E. costae*, la badèche, n'a été capturée qu'à deux reprises et seule une des deux prises a survécu et a pu être relâchée.

Enfin, le relativement rare mérou gris, *E. caninus*, a été pêché en 1998 à la palangre au large de Carro. Il a pu être marqué et relâché dans un site analogue à celui de sa capture.

### B - Chronologie des captures.

Depuis 1988, 21 mérous ont été signalés. Toutefois, ces signalements ne sont pas

uniformément distribués dans le temps au cours de cette dernière décennie (Figure 2). En effet, seulement 2 mérous ont été capturés entre 1988 et 1992 alors que 15 l'ont été pendant les 4 autres années qui ont suivi. La tendance observée pour 1997 et le début de 1998 montre une baisse du nombre de signalements. Cependant il est important de préciser que ces relevés ne représentent pas la totalité des captures sur la Côte Bleue : (i) une partie des pêcheurs ne collaborent certainement pas ; (ii) lorsque le mérou est remonté mort, les professionnels ne le signalent généralement pas pensant que c'est inutile ; (iii) dans certains cas, les pêcheurs ont rejeté les mérous directement sur le site de capture sans signaler leur prise.

En ce qui concerne un éventuel effet de la période sur la pêche de cette espèce, nous pouvons constater que deux fois plus de poissons ont été signalés en saison froide (14 individus contre 7).

Figure 1 – Pose de la marque codée, au moyen du pistolet à Textag™ sur un mérou anesthésié (photo P.R.M.C.B.).

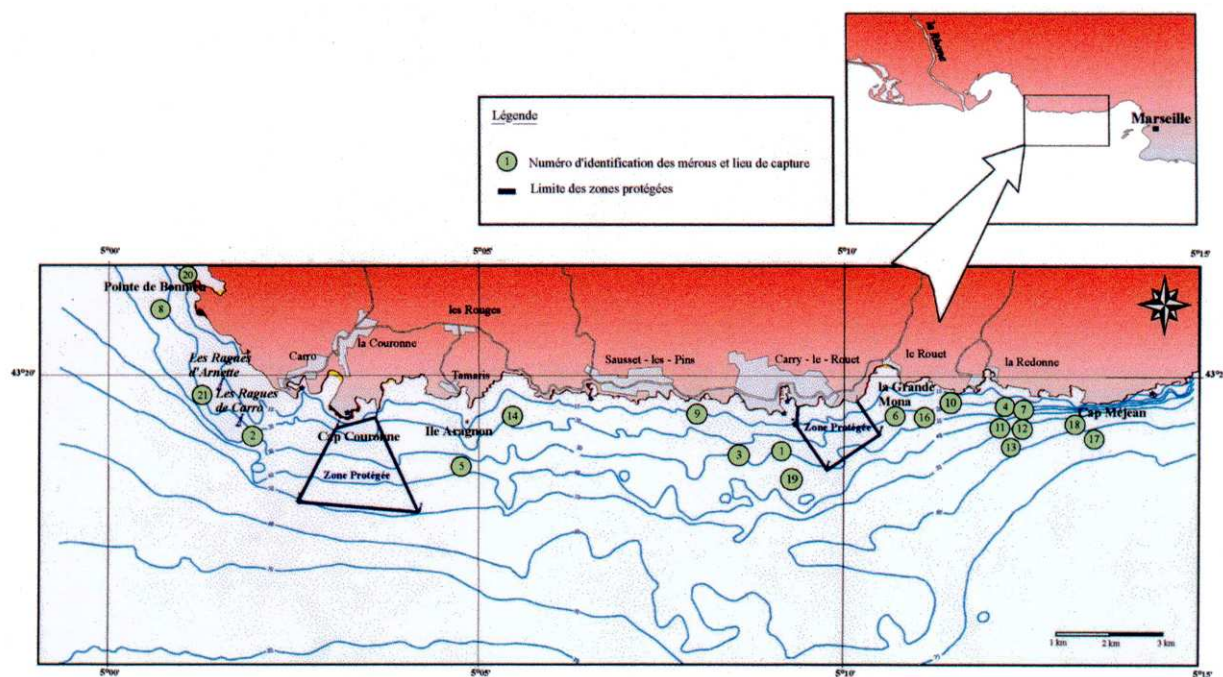


Figure 3 – Localisation des captures de mérous et des zones marines protégées du Cap Couronne et de Carry-le-Rouet sur le littoral du Parc Régional Marin de la Côte Bleue.

| Espèce                        | N°<br>Fiche | Capture          | Prof.<br>(m) | Engin    | Taille<br>(cm) | Poids<br>(kg) | Prélèvements<br>pratiqués | Date du<br>lâcher | Lieu du<br>lâcher |          |          |       |
|-------------------------------|-------------|------------------|--------------|----------|----------------|---------------|---------------------------|-------------------|-------------------|----------|----------|-------|
| <i>E. marginatus</i>          | 18          | 1                | 30/01/88     | 20       | FMN            | 44            | 1,80                      | -                 | †                 |          |          |       |
|                               |             | 2                | 01/06/89     | 28       | PAL            | n.c.          | 10,50                     | -                 | †                 |          |          |       |
|                               |             | 4                | 28/01/92     | 15       | FMN            | 40            | 1,30                      | -                 | 01/02/92          | Carry    |          |       |
|                               |             | 5                | 08/03/92     | 35       | FTR            | 40            | 1,05                      | E-N-M-B           | 10/04/92          | Carry    |          |       |
|                               |             | 6                | 15/07/92     | 15       | FMN            | n.c.          | 5,00                      | -                 | 15/07/92          | Carry    |          |       |
|                               |             | 7                | 12/01/93     | n.c.     | FMN            | 50            | 2,40                      | E-N               | 23/01/93          | Carry    |          |       |
|                               |             | 8                | 04/05/93     | 21       | FMN            | 40            | 1,20                      | E-N-M-B           | †                 |          |          |       |
|                               |             | 9                | 11/05/93     | 8        | FMN            | 36            | 0,64                      | E-N               | 05/06/93          | Carry    |          |       |
|                               |             | 10               | 16/12/93     | 15       | FMN            | 38            | 0,85                      | E-N               | 08/06/94          | Carry    |          |       |
|                               |             | 11               | 20/12/93     | 20       | FMN            | 49,5          | 1,82                      | E-N               | 22/01/94          | Carry    |          |       |
|                               |             | 12               | 15/01/94     | n.c.     | FMN            | 54            | 2,54                      | E-N               | 22/01/94          | Carry    |          |       |
|                               |             | 14               | 27/06/94     | 19       | FTR            | 43            | 0,96                      | E-N               | 16/07/94          | Carry    |          |       |
|                               |             | 15               | 19/10/94     | Aquarium | LIG            | 46            | 1,10                      | E                 | 19/10/95          | Carry    |          |       |
|                               |             | 16               | 01/02/95     | 15       | FMN            | 44            | 1,30                      | -                 | †                 |          |          |       |
|                               |             | 17               | 03/02/95     | 40       | FMN            | 48            | 1,50                      | -                 | †                 |          |          |       |
|                               |             | 18               | 25/01/97     | n.c.     | FMN            | 42            | 1,70                      | -                 | 25/01/97          | Carry    |          |       |
|                               |             | 19               | 01/04/97     | n.c.     | FMN            | 42            | 1,40                      | E-N               | 21/07/97          | Carry    |          |       |
|                               |             | 20               | 25/07/97     | 5        | FTR            | 36            | 0,85                      | E-N               | 08/08/97          | Couronne |          |       |
|                               |             | <i>E. costae</i> | 2            | 3        | 16/01/92       | 30            | FMN                       | 42                | 1,00              | E        | 21/01/92 | Carry |
|                               |             |                  |              | 13       | 01/05/94       | n.c.          | FMN                       | 35                | 0,50              | -        | †        |       |
| <i>E. caninus</i>             | 1           | 21               | 23/07/98     | 25       | PAL            | 54            | n.c.                      | E-N               | 23/07/99          | Couronne |          |       |
| Effectif total pris en charge |             |                  |              |          |                |               |                           | 21                |                   |          |          |       |
| Effectif total relâché        |             |                  |              |          |                |               |                           | 15                |                   |          |          |       |

Tableau I. - Tableau récapitulatif des captures et lâchers de mérous (*Epinephelus sp.*) dans le Parc Régional Marin de la Côte Bleue (Abréviations des prélèvements : n.c. : non communiqué ; PAL : palangre ; FTR : filet trémail ; FMN : filet monofilament en Nylon ; LIG : pêche à la ligne ; E : écaille ; N : nageoire ; M : muscle ; B : branchies ; († : mort avant le lâcher).

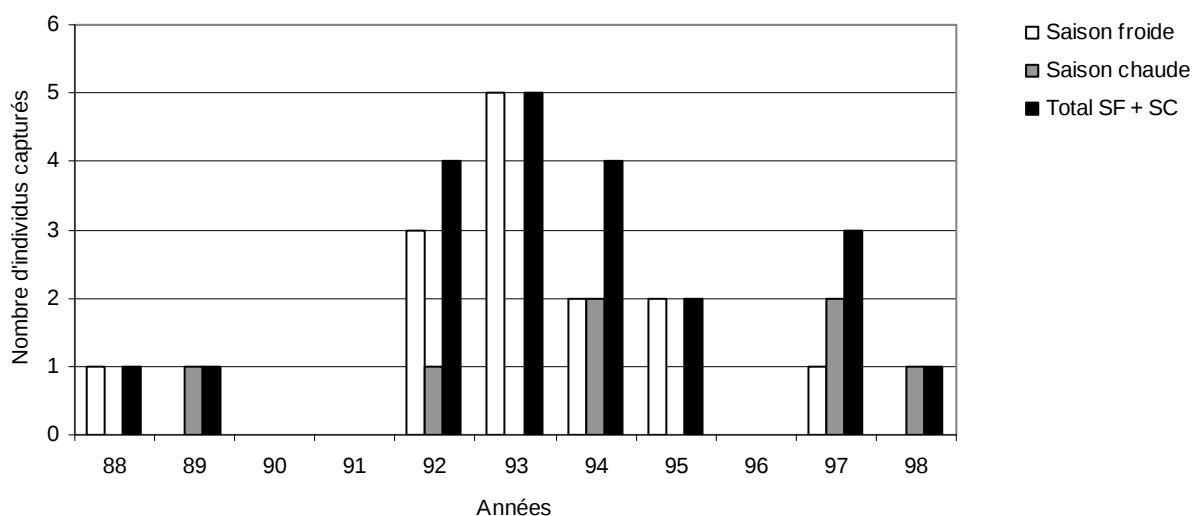


Figure 2 – Évolution quantitative des captures déclarées de mérous dans le Parc Régional Marin de la Côte Bleue de 1988 à 1998 (SF = saison froide ; SC = saison chaude).

**C - Positions et modes des captures.**

Les profondeurs de captures s'échelonnent pour *E. marginatus* de 5 à 40 m. La profondeur moyenne est d'environ 20 m (Tableau II) ; les deux autres espèces ont été prises en dessous de 25 m. La répartition des captures sur le littoral du Parc Marin est assez hétérogène (Figure 3). En effet, 50% de ces captures sont concentrées sur 3,5 km de côte sur les 25 km que compte le Parc Régional Marin. Cette zone privilégiée est située entre l'anse du Rouet et le Cap Méjean. Le reste du contingent est étalé de manière assez régulière.

D'un point de vue halieutique, 15 captures ont été réalisées au filet maillant monofilament en Nylon. Ces filets, calés perpendiculairement au rivage, peuvent faire de 5 à 8 m de haut sur 1 à 2 km de

long. A trois occasions des mérours se sont piégés dans des filets trémail. Le trémail cible plutôt le poisson de roche. Il est très bas (moins de 2 m), résistant et pêche les poissons benthiques tels que les rascasses, les congres et les rougets. Les palangres, bien que très efficaces pour pêcher les grands carnassiers tels que le mérour sont peu utilisées sur la Côte Bleue. Seuls 2 individus, dont un *E. caninus*, ont été capturés de cette façon.

**D - Biométrie.**

A la demande du G.E.M., plusieurs informations ont été relevées pour chaque signalement. Les principaux renseignements portent sur la date et le mode de capture, le poids et la taille des individus (Tableau II).

| Espèce               | Prof. (m)<br>min - max | Prof. moy<br>± σ (m) | Taille (cm)<br>min - max | Taille moy.<br>± σ (cm) | Poids (kg)<br>min - max | Poids moy.<br>± σ (kg) |
|----------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>E. marginatus</i> | 5,0 - 40,0             | 19,6 ± 9,8           | 36,0 - 87,0              | 43,3 ± 5,1              | 0,6 - 10,5              | 2,1 ± 2,3              |
| <i>E. costae</i>     | 30,0                   | -                    | 35,0 - 42,0              | 38,5                    | 0,5 - 1,0               | 0,7                    |
| <i>E. caninus</i>    | 25,0                   | 25,0                 | 54,0                     | 54,0                    | n.c.                    | n.c.                   |

Tableau II.- Données écologiques et biométriques des mérours (*Epinephelus* sp.) pris en charge dans le cadre du programme de marquage et de lâcher du P.R.M.C.B. (n.c. = non communiqué).

| Espèce                                      | N° Fiche | Date du lâcher | Lieu du lâcher | Codage couleur |
|---------------------------------------------|----------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Parc Régional Marin de la Côte Bleue</b> |          |                |                |                |
| <i>E. costae</i>                            | 3        | 16/01/92       | Carry-le-Rouet | - J -          |
| <i>E. marginatus</i>                        | 4        | 01/02/92       | Carry-le-Rouet | - B / J -      |
| <i>E. marginatus</i>                        | 5        | 08/03/92       | Carry-le-Rouet | - B / J / N -  |
| <i>E. marginatus</i>                        | 7        | 23/01/93       | Carry-le-Rouet | - BE / N / J - |
| <i>E. marginatus</i>                        | 9        | 05/06/93       | Carry-le-Rouet | - J / N / O -  |
| <i>E. marginatus</i>                        | 10       | 08/06/94       | Carry-le-Rouet | - J / O -      |
| <i>E. marginatus</i>                        | 11       | 22/01/94       | Carry-le-Rouet | - BE / N -     |
| <i>E. marginatus</i>                        | 12       | 22/01/94       | Carry-le-Rouet | - J / N -      |
| <i>E. marginatus</i>                        | 14       | 16/07/94       | Carry-le-Rouet | - BE / J -     |
| <i>E. marginatus</i>                        | 15       | 19/10/95       | Carry-le-Rouet | - B -          |
| <i>E. marginatus</i>                        | 19       | 21/07/97       | Carry-le-Rouet | - N / J -      |
| <i>E. marginatus</i>                        | 20       | 08/08/97       | Cap Couronne   | - O / V -      |
| <i>E. caninus</i>                           | 21       | 23/07/98       | Cap Couronne   | - O -          |
| <b>Opérations extérieures au P.R.M.C.B.</b> |          |                |                |                |
| <i>E. marginatus</i>                        |          | 19/01/96       | La Ciotat      | - J / N / J -  |
| <i>E. marginatus</i>                        |          | 19/01/96       | La Ciotat      | - N / J / R -  |
| <i>E. marginatus</i>                        |          | 05/12/92       | Monaco         | - B / R -      |
| <i>E. marginatus</i>                        |          | 04/09/98       | Monaco         | - J / B / R -  |
| <i>E. marginatus</i>                        |          | 15/04/93       | Solenzara      | - N / V -      |

Tableau III.- Codages utilisés sur les mérours relâchés dans les zones marines protégées de Cap Couronne, de Carry-le-Rouet et à l'occasion d'opérations extérieures. Le codage des couleurs est indiqué de gauche à droite, de l'ouïe vers l'extérieur (Abréviations utilisées : B = blanc ; BE = bleu ; J = jaune ; N = noir ; O = orange ; R = rouge ; V = vert).

- Mérous bruns :

En ce qui concerne *E. marginatus*, le poids des spécimens pêchés se situe dans une fourchette de 1 à 2 kg (poids moyen 2,1 kg) mis à part l'exceptionnel mérou de 10,5 kg. Ces poissons avaient donc une taille comprise entre 35 et 50 cm (taille moyenne 43,3 cm), leurs âges approximatifs seraient alors de 3 à 6 ans.

- Badèches :

Au nombre de 2, les spécimens capturés faisaient 42,0 et 35,0 cm pour des poids respectifs de 1,0 et 0,5 kg. Cette espèce présente en effet une morphologie moins "massive" que son congénère *E. marginatus*.

- Mérou gris :

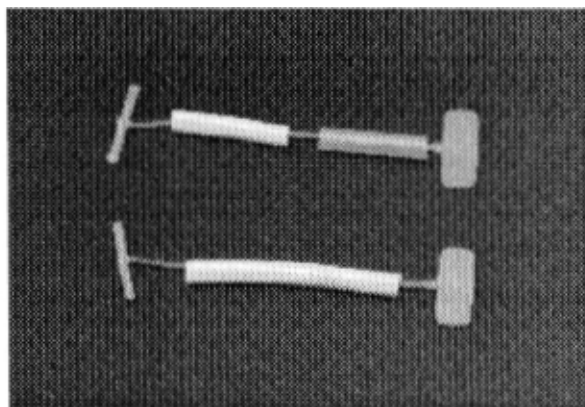
L'unique individu d'*E. caninus* qui a été signalé dans le cadre de cette campagne n'a pu être pesé.

Sa taille atteint les 54,0 cm, ce qui en fait le mérou le plus grand qui ait été relâché.

### E - Codages utilisés.

La figure 4 présente deux marques Textag codées utilisées dans cette campagne décennale de lâchers. Chaque marque utilisée a son double conservé au P.R.M.C.B. L'emplacement de la marque, sur l'opercule droit ou gauche a été noté; l'extérieur de celle-ci est repéré par l'extrémité la plus large du Textag. Sur les 15 mérous relâchés, 2 individus n'ont pas été marqués : n°6 et 18 capturés les 15/07/92 et 25/01/97. Les autres ont reçu un marquage à 1, 2 ou 3 couleurs (Tableau III). Il est utile de préciser que cette technique de marquage a été utilisée à notre connaissance sur trois autres sites : le golfe de la Ciotat, la Principauté de Monaco et Solenzara.

Figure 4 - Marque Textag<sup>TM</sup> utilisée sur les mérous relâchés dans les zones marines protégées de Cap Couronne, de Carry-le-Rouet et à l'occasion d'opérations extérieures.



## CONCLUSION

Le Parc Régional Marin de la Côte Bleue compte poursuivre les opérations de marquages et de lâchers telles qu'elles viennent d'être décrites, dans un contexte qui paraît aujourd'hui assez favorable concernant la protection et l'étude des populations des différentes espèces de mérous.

Dans le cadre de leur protection, son objectif est aussi de collecter et de diffuser le maximum d'informations susceptibles de faire progresser l'état des connaissances sur ces espèces. Avec ce premier bilan décennal qui réunit les principales

données recueillies sur le terrain, le P.R.M.C.B. espère avoir accompli sa mission.

Ces travaux montrent que ces opérations de marquages / lâchers peuvent être réalisées régulièrement et de manière fiable en différents sites de notre littoral méditerranéen. Le point faible de ces opérations est la difficulté d'effectuer un suivi après lâcher qui nécessite la présence et la disponibilité de personnel à toutes les périodes de l'année.

## REMERCIEMENTS

Le Parc Régional Marin de la Côte Bleue tient à exprimer sa reconnaissance aux membres du Groupe d'Étude du Mérou qui en diverses occasions ont apporté leurs compétences scientifiques et techniques ainsi qu'à l'ensemble

des pêcheurs professionnels qui ont apporté leur collaboration indispensable à cette campagne :

A. Bozonnat, B. Flambard, Bernard, C. Fasciola, J. Fallon, M. Fouque, J. Giberti, J. Malaussena, M. Malvery, G. Peselli, G. Piala, G. et R. Raffini.

## Some observations on the sexual condition and gonad maturation of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in captivity.

*Quelques observations sur la condition sexuelle et la maturation des gonades du mérou noir Epinephelus marginatus (Lowe, 1834) en captivité.*

**Monica Contegiacomo, Pierluigi Carbonara,  
Giuseppe Lembo, Maria Teresa Spedicato**

COISPA Tecnologia & Ricerca, C.P. 62, 70042 Mola di Bari, Italy.  
e-mail: coispa@eostel.it

**Key words:** *Epinephelus marginatus*, broodstock, sexual condition, gonadic maturation.

**Mots clés :** *Epinephelus marginatus*, parc à géniteurs, condition sexuelle, maturation gonadique.

**ABSTRACT:** The sexual and reproductive pattern of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* rises several problems for broodstock formation and management in captivity. In this work some observations are reported, concerning the sex condition and gonad maturation of the dusky grouper breeders belonging to the broodstock established at the COISPA's laboratory (Mola di Bari, Italy). The fishes were maintained in 16 m<sup>3</sup> tanks (water renewal: about 5 - 6 volumes.day<sup>-1</sup>) and fed squid *ad libitum*. Since 1994 to 1998, every dusky grouper was checked during the spawning season, for evaluating sex and maturity of gonads. After a gentle abdomen pressure, fish were also examined by cannulation, in order to take a gonadic biopsy. Functional females with maturing oocytes (vitellogenic stages) were found in the range of 2.5 - 11 kg. Four individuals reached the first maturity in captive condition at size ranging from 3 to 4.9 kg. In one fish, weighing 11.1 kg, a spontaneous sex inversion occurred, probably after a transition phase lasting at least 2 years. Another fish (weight : 18.5 kg) probably sex-reverted after 3 years. Balanced sex ratio as well as social compositions of the reared group appears to represent key factors in the broodstock management of dusky grouper.

**RESUME :** Le modèle sexuel et reproductif du mérou noir *Epinephelus marginatus* pose de nombreux problèmes pour la formation d'un parc à géniteurs et pour sa gestion en captivité. Dans cette étude, quelques observations sont rapportées, concernant la condition sexuelle et la maturation des gonades des reproducteurs de mérous noirs conservés dans le parc à géniteurs du laboratoire de la COISPA (Mola di Bari, Italie). Les poissons sont maintenus dans des bacs de 16 m<sup>3</sup> (renouvellement d'eau : 5 - 6 volumes.jour<sup>-1</sup> environ) et nourris *ad libitum* avec des calmars. De 1994 à 1998, chaque mérou noir a été contrôlé pendant la saison reproductive, pour évaluer le sexe et la maturité des gonades. Après une légère pression abdominale, les poissons ont été aussi examinés avec un cathéter, afin de prélever une biopsie gonadique. Des femelles fonctionnelles, avec les ovocytes en maturation (stades vitellogénétiques), ont été trouvées dans une gamme de poids de 2.5 - 11 kg. Quatre spécimens ont atteint leur première maturité au poids de 3 à 4.9 kg. Pour un poisson, pesant 11.1 kg, une inversion sexuelle spontanée s'est produite, probablement après une phase de transition intersexuelle d'au moins deux ans. Une inversion sexuelle s'est probablement produite après 3 ans pour un autre poisson (poids : 18.5 kg). Un sex-ratio équilibré ainsi que la composition sociale du groupe en élevage semblent représenter des facteurs clés dans la gestion d'un parc à géniteurs de mérous noirs.

## INTRODUCTION

Like all the species of the *Epinephelus* genus, also the dusky grouper *Epinephelus marginatus* is a proterogynous hermaphrodite fish (Smith, 1975) that first matures as female at the size of 4 - 5 kg (10 -12 years old, according to Kara and Derbal, 1995). Earlier reproductive activity has been reported by Spartà (1935) and Barnabé (1974) in fish weighing 2 and 1.62 kg respectively. Recent observations on the ovarian maturation of wild dusky grouper females captured in the Strait of Sicily (Italy) documented a multi-spawning pattern

and a high rate of size independent oocytes' atresia at the onset and at the end of the reproductive period (Massari *et al.*, in press). Sex inversion generally occurs much later, in individuals weighing more than 9 kg (Bruslè, 1985), although various social and environmental factors may affect or shift this process in wild (Shapiro, 1987). Such old individuals have become rather rare along the Mediterranean coastal areas. Thus, this sexual and reproductive pattern rises several problems for broodstock formation and

management in captivity. Indeed, the males' availability could be effectively circumvented by the artificial sex inversion (Spedicato *et al.*, 1998 ; Spedicato *et al.*, in press a), but females need to be hormone induced even if fanned for long time (Spedicato *et al.*, 1995 ; Spedicato *et al.*, in press b).

Broodstock of *Epinephelus* species has been formed in several geographical areas of Asia and Middle East. In these contexts, the occurrence of natural spawning both in tanks and floating cages has been reported for many grouper species. Namely it has been documented for *E. akaara* in Japan (Ukawa *et al.*, 1966), *E. tauvina* in Kuwait (Hussain, Higuchi, 1980), *E. malabaricus* in the

Philippines and Thailand (Ruangpanit *et al.*, 1986), *E. fuscoguttatus* in Indonesia and Singapore (Lim *et al.*, 1990) and for *E. suillus* in Malaysia (Toledo *et al.*, 1993). Nevertheless, hormone induced reproduction is widely practised in different part of the world (Tamaru *et al.*, 1995). In contrast little information is available on the environmental and social requirements for the maintenance of *E. marginatus* broodstock, as well as on the reproductive behaviour of this fish in captivity.

This paper describes some preliminary observations related to the sex condition and gonad maturation of dusky groupers, belonging to the broodstock established at the COISPA's laboratory since 1994 (Spedicato, Lembo, 1996).

## MATERIALS AND METHODS

The dusky groupers were caught in the North Ionian Sea by long line, mainly in the early spring and late summer seasons. They were recovered by gas disease and external wound applying the protocol reported in Spedicato *et al.* (1995). Afterward, the fishes were maintained in 16 m<sup>3</sup> tanks with a water renewal of about 5 - 6 volumes.day<sup>-1</sup>. The rearing density was about 4 - 5 kg.m<sup>3</sup> and the characteristics of the seawater were as follows : t° = 16 - 18°C ; pH = 7,4 ; S ‰ = 34 ppt ; minimum level of oxygen 6 ppm. The fishes were mainly fed with squids *ad libitum*, as it is considered a suitable food for breeders (Watanabe *et al.*, 1984).

Each individual was marked by an external tag as well as by a Passive Integrated Transponder and biometrics data (length, weight) were periodically collected. Since 1994 to 1998 every fish was checked during the spawning season, before starting the hormone induction and thereafter for 2 - 3 times, in order to evaluate sex and maturity conditions. After a gentle abdomen pressure, fish were examined by cannulation using a polyethylene tube and both fresh and preserved (1 % of formalin in 1.1% NaCl solution, according to Francescon *et al.*, 1992) samples of gonadic biopsies were observed under light microscope. The data here reported concern 15 individuals.

## RESULTS

Functional females with maturing oocytes (vitellogenic stages) were found in the range of 2.5 - 18.6 kg. Among this group 1 individual, reared from the size of 1.8 kg, reached its first maturity after 4 years in captivity at the weight of 3.6 kg (oocyte diameter before hormone administration in the range : 300 - 430 µm). Comparable behaviour was displayed by other 3 fishes, that were first maturing after 3 - 4 years of farming, at the size of 3.0, 3.6 and 4.9 kg respectively (oocyte diameter before hormone treatment in the range : 370 - 518 µm). Conversely 1 fish was not yet matured at the size of 4.7 kg and after four years.

Two females, weighing 2.5 kg and 8.5 kg in the first year of rearing (1995) showed maturation activity over the 4 years of observation.

Six dusky groupers, weighing from 2.8 to 11 kg, displayed a female condition (oocyte diameter in the range : 300 - 575 µm) in the first year of rearing. However, in the subsequent years (up to

1998 spawning season) sex could not be assessed either by stripping or by gonadal biopsy.

The sexuality of another fish weighing 18.6 kg was not determinable during 3 years of rearing (1995 - 1997), after that it was found to be a functional female (oocyte diameter before hormone administration in the range : 506 - 620 µm). For this subject a sex reversion to the female condition could be supposed.

All the fishes with maturing oocytes produced eggs following hormone treatments.

Sex and maturation condition of 1 dusky grouper was not determinable (no gonadal tissue in the samples) either by stripping and gonadal biopsy for two consecutive years (1994 and 1995), but this fish resulted to be a fluent male (the lone among the 15 breeders analysed) at the 3rd year of rearing (weight : 11.1 kg). In this case a spontaneous sex inversion occurred, probably after a transition phase lasting at least 2 years.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Microscopic examination of gonadal biopsies by catheter has been considered a fast and scarcely traumatic technique to assess the sex, the stage of

gonadal maturity and the gametogenic response to hormonal treatment in hermaphrodite fish, like *Sparus aurata* (Francescon *et al.*, 1992). Although

such approach has demonstrated to produce effective diagnoses in maturing females, as well as the stripping in maturing male, it could present limitations for grouper, when an intersexual phase occurs. In such cases, more reliable results could be achieved coupling the gonadal biopsy with histological samples obtained by surgery, as reported for *E. microdon* (Debas *et al.*, 1990).

The analysed data highlight that immature fishes may reach the age / size of first reproduction in captivity. Moreover, sex inversion and sex reversal seem to occur in captive condition, but following a transition process that lasts more than one reproductive season. Furthermore, male does not show the typical behaviour and the silver colour pattern described in wild by Zabala *et al.* (1997). Phenomena of sex inversion and sex reversal has been reported in captive *E. microdon*, a polynesian grouper used as model species, and have been

related to initial unbalanced sex-ratio and to social factors (Debas *et al.*, 1990). Nevertheless, transition phases as long as those observed for *E. marginatus* were not described for the polynesian grouper. In our experimental conditions potential breeders could spend some years without showing gonadic maturation at all, either as female and male. In addition, the period of the transition phase was rather long in comparison with the observations carried out in wild (Bruslé, 1985). Balanced sex ratio as well as social compositions of the reared group appears to represent key factors in the broodstock management of the dusky grouper. Moreover, further investigations are necessary in order to ascertain the proper structure of the social group and the influence in farming conditions of the environmental parameters on sex, maturation and spawning.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The Italian Ministry of Agricultural Policy funded this work as a part of a research program (National Law 41 / 82).

## REFERENCES

- Barnabé G., 1974 - La reproduction du mérrou *Epinephelus gigas* : observations préliminaires de terrain. *Aquaculture*, **4** : 363-367.
- Bruslé J., 1985 - *Exposé synoptique des données biologiques sur les mérours Epinephelus aeneus (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et Epinephelus guaza (Linnaeus, 1758) de l'océan Atlantique et de la Méditerranée*. FAO, Synopsis sur les pêches, **129**, 64 pp.
- Debas L., A. Fostier, J. Fuchs, M. Weppe, G. Nedelec, A. Bennett, C. Cauty, B. Jalabert, 1990 - The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. In : *Advances in Tropical Aquaculture*, J. Barret (ed.), IFREMER Press, Tahiti, pp : 543-557.
- Francescon A., A. Barbaro, P. Belvedere, G. Bozzato, B. Cavalloni, E. Cardellini, G.F. Antonini, 1992 - Quick assessment in vivo of ovarian maturity in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Riv. ital. Acquacolt.*, **27** : 45-54.
- Hussain N.A., M. Higuchi, 1980 - Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Aquaculture*, **19** : 339-350.
- Kara M.H., F. Derbal, 1995 - Morphométrie, croissance et mortalité du mérrou *Epinephelus marginatus* (Serranidae) des côtes de l'est algérien. *Cah. Biol. mar.*, **36** (3) : 229-237.
- Lim L.C., T.M. Chao, L.T. Khoo, 1990 - Observations on the breeding of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.). *Singapore J. Primary Ind.*, **18** : 66-84.
- Massari A., G. Marina, P. Di Marco, E. Azzurro, A. Mandich, in press - Ovarian maturity stages and periodicity of reproduction in the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe 1834). In : *33rd International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Ruangpanit N., S. Maneewong, T. Tattanont, P. Kraisiingdecha, P. Akkayanont, S. Rojanapitayagui, 1986 - Preliminary study on rearing fry of grouper, *Epinephelus malabaricus*. In : *Report of Thailand and Japan Joint Coastal Aquaculture Research Project No 2*, Japan international Cooperation Agency, pp : 35-38.
- Shapiro D.Y., 1987 - Reproduction in groupers. In : *Tropical snappers and groupers. Biology and fisheries managements*. J.J. Polovina, S. Raiston (eds), Westview Press, Boulder, CO, pp : 295-327.
- Smith C.L., 1975 - The evolution of hermaphroditism in fishes. In : *Intersexuality in the Animal Kingdom*. R. Reinboth (ed.), Springer-Verlag, Berlin and New York, pp : 293-310.
- Spartà A., 1935 - Contributo alla conoscenza dello sviluppo nei Percidi. Uova ovariche mature di *Epinephelus guaza* (L.) e stadii post-embrionale e larvali di *E. alexandrinus* C.V., *Mem. R. Com. talassogr. ital.*, **224** : 1-15.

- Spedicato M.T., G. Lembo, P. Di Marco, G. Marino, 1995 - Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options méditerran.*, **16** : 131-148.
- Spedicato M.T., G. Lembo, 1996 - Formazione di uno stock de riproduttori di *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) : risultati preliminari. *Biol. mar. Mediterr.*, **3** (1) : 430-431.
- Spedicato M.T., M. Contegiacomo, P. Carbonara, G. Lembo, C. Boglione, 1998 - Artificial reproduction of *Epinephelus marginatus* aimed at the development of restocking techniques. *Biol. mar. Mediterr.*, **5** (3) :1248-1257.
- Spedicato M.T., M. Contegiacomo, P. Carbonara, G. Lembo, in press a - Ovarian maturation and spawning in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) induced by hormone treatments. In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Spedicato M.T., M. Contegiacomo, P. Carbonara, G. Lembo, in press b - Induced sexreversal in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Tamaru C.S., F. Cholik, J. Ching Ming Kuo, W.J.Jr Fitzgerald, 1995 - Status of the culture of milkfish (*Chanos chanos*), striped mullet (*Mugil cephalus*) and grouper (*Epinephelus* sp.). *Rev. Fish. Sci.*, **3** (3) : 249-273.
- Toledo J.D., A. Nagai, D. Javellana, 1993 - Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. *Aquaculture*, **115** : 361-367.
- Ukawa M., M. Higuchi, S. Mito, 1966 - Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara* (Temminck and Schiegl). Japan. *J. Ichthyol.*, **13** : 156-161.
- Watanabe T., T. Arakawa, T. Kitajima, S. Fujita, 1984 - Effect of nutritional quality or broodstock diets on reproduction of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50** : 495-501.
- Zabala M., A. Garcia-Rubies, P. Louisy, E. Sala, 1997 - Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 65-77.

## Early development of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) from natural spawns.

Développement des œufs et des larves du mérou brun  
(*Epinephelus marginatus*), provenant de pontes naturelles.

Luis Dantart<sup>1</sup>, Patricia Rovira<sup>1</sup>, Bernat Hereu<sup>1</sup>, Alain Duday<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal, 645,  
08028 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Centre Régional Universitaire de Formation Permanente, Université de Montpellier II,  
Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, 1 Quai de la Daurade, F. 34200 Sète.

**Key words:** grouper, *Epinephelus marginatus*, egg and larva development, culture conditions, feeding, Mediterranean sea.

**Mots clés :** mérou, *Epinephelus marginatus*, développement des œufs et des larves, conditions de culture, nutrition, Méditerranée.

**ABSTRACT:** The developing eggs and early larvae of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) are described and illustrated in this paper. Underwater collection of spawns was conducted when scuba diving in summer 1998 in the Medes Islands Marine Reserve (NE Spain). The fertilised eggs were pelagic, transparent and spherical, measuring 0.8 mm in diameter. Newly hatched larvae, measuring 1.4 mm in total length 25 hours 40 minutes after spawning had a large elliptical yolk sac from which the tau protruded. Larvae reared at 20°C were kept for 258 hours after hatching and reached 3.2 mm total length. The same developmental stage was reached in only 86 hours when reared at 25°C. Attempts to rear larvae with freshly caught small zooplankton (20 - 60 µm mesh size) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) were unsuccessful, although some preying behaviour was observed. Motility for the capture of prey appeared to be lower at 20°C than at 25°C.

## INTRODUCTION

The dusky grouper *Epinephelus marginatus* is one of the biggest and most attractive species of the Serranidae family in the Mediterranean. Although the species is distributed throughout the Mediterranean, indiscriminate fishing has made it scarce on our coasts. The recovery of stocks to support biodiversity has been chosen as a priority by marine reserve managers (Boudouresque *et al.*, 1991). This proposal is made more difficult by the fact that the biology of the dusky grouper is still partially unknown. Their reproductive biology, larval development and migratory aspects are among these unknown topics. The only information available on the larval biology of the species was provided by Spartà (1935) and Barnabé (1974).

Dusky grouper spawning was observed for the first time in summer 1996 in the Medes Islands Marine Reserve (Zabala *et al.*, 1997). Knowledge of the reproductive habits of the species provided the opportunity to collect the eggs *in situ* at the time of spawning. The material collected was used to attempt to develop and rear larvae in the last two summers (1997 and 1998).

This paper describes preliminary results on the development of the dusky grouper. The proposed objectives were the description of the eggs and larval stages and an approach to optimum rearing conditions. A knowledge of the biological cycle of the dusky grouper will be useful in applications for aquaculture, resettlement and close season fisheries management.

## MATERIAL AND METHODS

The observation of reproductive behaviour and the capture of the eggs was carried out during scuba diving after spawning. The eggs were collected immediately in large plastic bags so as to protect them from other fish predators such as the saddled bream (*Oblada melanura*). They were kept in the bags for 10 to 20 minutes to ensure fertilisation. All

the eggs were obtained during the period 20 minutes before and 20 minutes after sunset. The contents of the bags was concentrated using 500 µm filters to reduce the volume of water in the egg samples. The eggs were transferred to the laboratory rearing tank no more than 2 hours after fertilisation.

The study was carried out in 120 litres tanks. Subgroups of eggs were placed in each of four cylindrical compartments in each tank. These were opaque cylinders 19 cm in diameter and 25 cm in height, closed at the lower entrance by a 400  $\mu\text{m}$  Nylal mesh (Fig. 1). The water in the tanks was sterilised and filtered continuously, with a slight flow between the compartments. Salinity was kept

at around 37.5‰. 25% of the water in the tanks was renewed every day after the larvae opened their mouths. Very moderate aeration was maintained throughout the experiment, avoiding the formation of turbulence inside the cylinders. The quality of the water in the tanks was monitored constantly using analysis by  $\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_3 - \text{NH}_4$ .

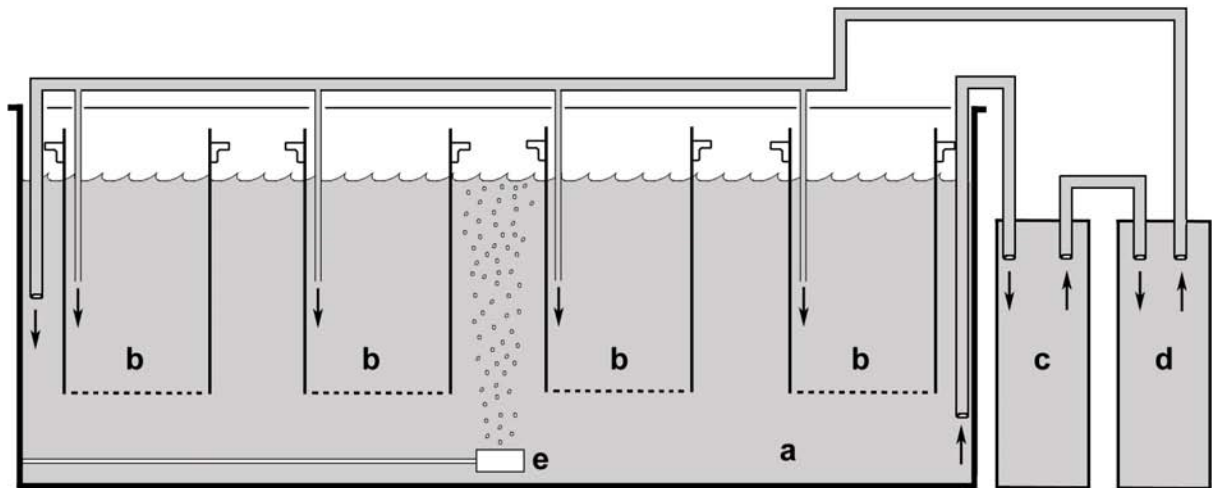


Figure 1 - a, tank (120 litres) ; b, dark compartments formed by cylinders of opaque plastic, 19 cm in diameter and 25 cm in depth (the lower entrance is closed by a 400  $\mu\text{m}$  mesh Nylal net) ; c, filter (100 litres.hour<sup>-1</sup>) ; d, UV steriliser ; e, aerator.

Two experiments were carried out in different temperatures and lighting conditions. The first was at 20°C with slight illumination until the mouth opened, when the lighting was changed to intense. The second was at 25°C in total darkness until resorption of the vitellus, when the lighting was changed to highly intense for the subsequent phases.

Feeding tests were carried out from the moment when the larvae began opening their mouths. They were given small prey such as laboratory-reared rotifers (*Brachionus plicatilis*) of some 240  $\mu\text{m}$ , and zooplankton *in situ* collected three times daily. The latter were rich in copepodites and were filtered at between 20 and 60  $\mu\text{m}$ .

Every few hours before and during hatching, and at longer intervals in the following days, a sample of eggs or larvae was taken from one of the compartments and described and photographed using an optical microscope. On each occasion

some samples were fixed in formalin for subsequent study.

Different body measurements were taken for the study of growth (Fig. 2). These were body length (BL), taken at the midline of the body from the tip of the snout to the end of the notochord (in mm), the total length (TL), the distance on the midline of the body from the tip of the snout to the posterior tip of the body (in mm), body depth (BD) as the maximum depth of the head measured at the level of the otolith sacs (in  $\mu\text{m}$ ), pre-anal length (PAL) as the distance from the tip of the snout to the anus (in  $\mu\text{m}$ ), eye diameter (ED), the maximum diameter of the eye (in  $\mu\text{m}$ ), the horizontal (HYD) and vertical (VYD) yolk sac diameter (in  $\mu\text{m}$ ) and the oil globule diameter (OGD) (in  $\mu\text{m}$ ).

Eggs and larva specimens are stored in the Centre of Animal Biodiversity Resources, University of Barcelona, Spain.

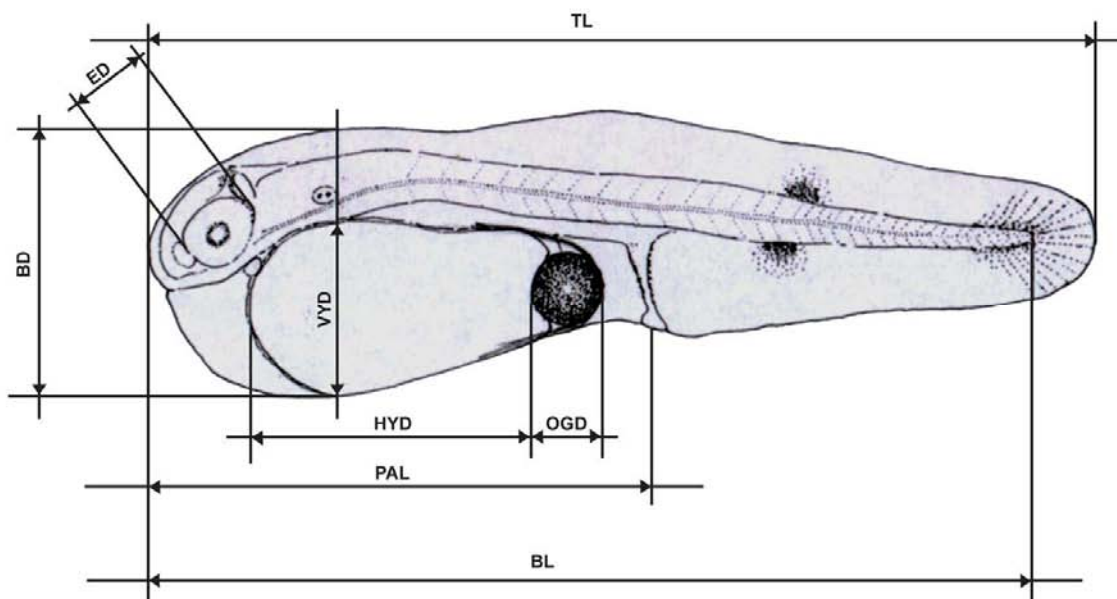


Figure 2 - BL (body length), the distance along the midline of the body from the tip of the snout to the tip of the notochord (in mm) ; TL (total length), the distance along the midline of the body from the tip of the snout to the posterior tip of the body (in mm) ; BD (body depth), maximum depth of the body at the otolith sacs (in mm) ; PAL (preanal length), the distance along the midline of the body from the tip of the snout to the anus (in mm); ED (eye diameter), maximum eye diameter (in  $\mu\text{m}$ ) ; HYD (horizontal yolk sac diameter) (in  $\mu\text{m}$ ) ; VYD (vertical yolk sac diameter) (in  $\mu\text{m}$ ) ; OGD (oil globule diameter) (in  $\mu\text{m}$ ).

## RESULTS

### Description of larval stages

Fig. 3 presents diagrams of the forms of development observed in the fertilised eggs and larvae after hatching.

The eggs are spherical, with a diameter of between 750 and 810  $\mu\text{m}$ . They have a single lipid globule of some 150  $\mu\text{m}$  located in the posterior of the vitellicle. No pigmentation is visible in the hours after fertilisation of the eggs. The fertilised eggs remain on the surface while the whitish non-viable eggs sink, with the vitellus sometimes divided into

various globules. It was estimated that above 90% of the eggs were fertilised.

Development of the embryos up to hatching is typical of that of the Teleostei. Hatching occurs some 25 hours after fertilisation at 25°C or 34 hours at 20°C, with a duration of approximately 2 hours. It was calculated that above 85 - 90% of the eggs hatched. The recently hatched larvae measure 1.4 mm in total length (TL). Table I presents body measurements at different stages in larva development.

| Time (hours) | BL (mm) | TL (mm) | BD (mm) | PAL (mm) | ED ( $\mu\text{m}$ ) | HYD ( $\mu\text{m}$ ) | VYD ( $\mu\text{m}$ ) | OGD ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------|---------|---------|---------|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 16           | -       | 0.79    | -       | -        | -                    | -                     | -                     | -                     |
| 25           | -       | 1.40    | -       | -        | -                    | 848                   | -                     | 171                   |
| 37           | 1.91    | 2.01    | 0.61    | 1.10     | 162                  | 747                   | 393                   | 162                   |
| 40           | 2.01    | 2.14    | 0.62    | 1.15     | 182                  | 636                   | 393                   | 162                   |
| 44           | 2.12    | 2.22    | 0.58    | 1.18     | 182                  | 575                   | 242                   | 122                   |
| 51           | 2.38    | 2.52    | 0.50    | 1.21     | 212                  | 555                   | 232                   | 131                   |
| 62           | 2.53    | 2.68    | 0.47    | 1.23     | 212                  | 323                   | 181                   | 80                    |
| 70           | 2.62    | 3.02    | 0.44    | 1.22     | 220                  | 178                   | 164                   | 82                    |
| 85           | 2.45    | 2.56    | 0.52    | 1.21     | 223                  | -                     | -                     | -                     |
| 92           | 2.26    | 2.41    | 0.58    | 1.18     | 220                  | -                     | -                     | -                     |
| 110          | 2.32    | 2.49    | 0.56    | 1.20     | 232                  | -                     | -                     | -                     |

Table I - Body measurements of *Epinephelus marginatus* larvae at 25°C. BL : body length ; TL : total length ; BD : body depth ; PAL : pre-anal length ; ED : eye diameter ; HYD : horizontal yolk diameter ; VYD : vertical yolk diameter ; OGD : oil globule diameter.

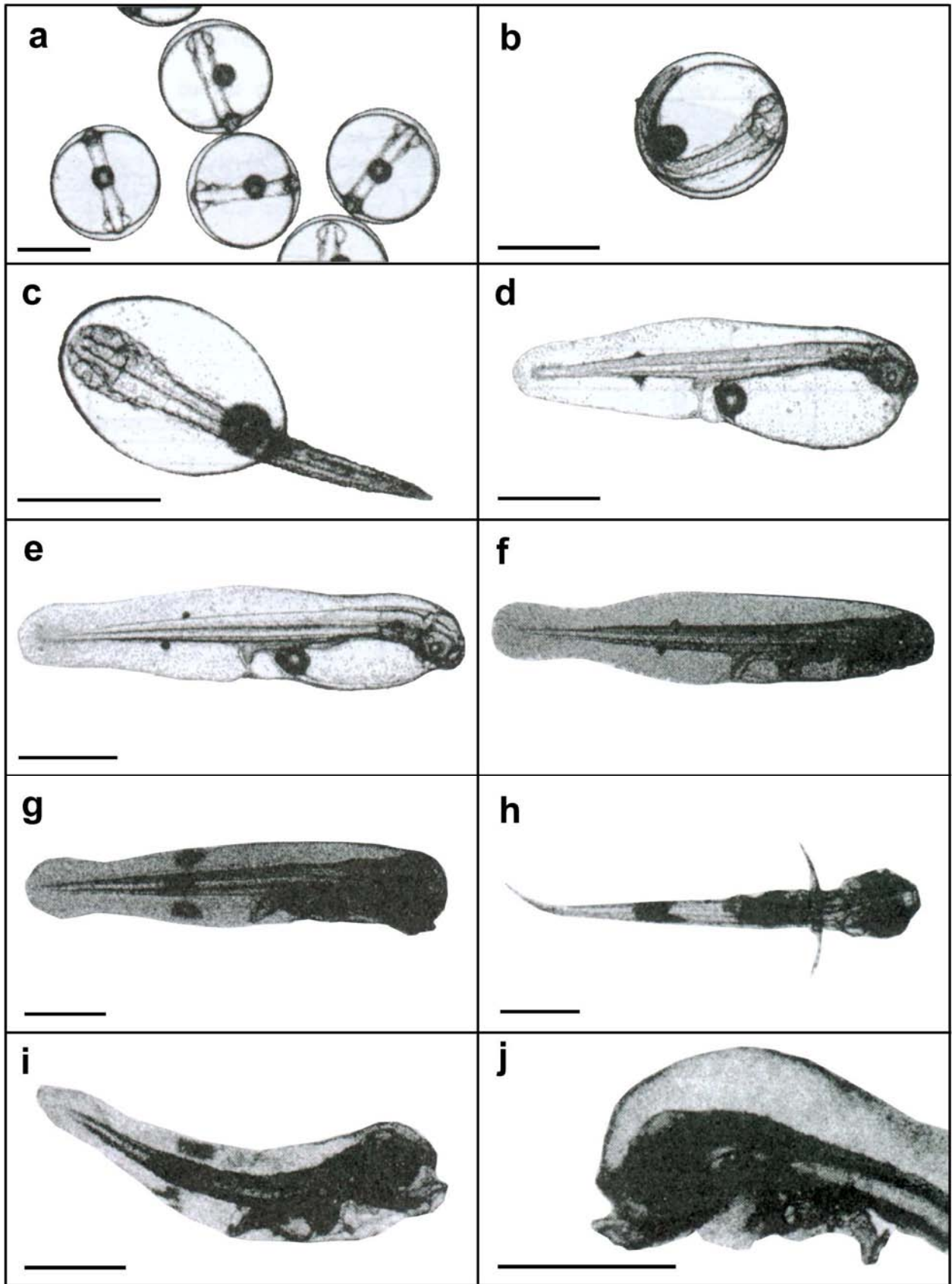


Figure 3 - Different stages of eggs and larvae of dusky grouper in the development at 25°C : a, eggs at 16 hours ; b, pre-hatching egg at 24 h. ; c, new-hatched larva at 26 h. ; d, larva at 37 h. ; e, larva at 51 h. ; f, larva at 62 h. ; g, larva at 86 h. ; h, dorsal view at 86 h. ; i, larva at 110 h. ; j, cephalic area. Scale bars 500 µm.

At this stage the larva has a large vitellicle, which occupies nearly 60% of its total body length. The lipid globule is located in the posterior extreme of the vitellicle. There is no pigmentation on the body. The otolith sacs and the ocular vesicles are now visible. The body develops considerably in the following 12 hours, with a rapid decrease in the vitellicle, which comes to represent only 35% of the TL. At this point in development pigmentation appears towards the median area of the caudal region. It begins as two patches of melanophores above and below the notochord, which later increase in size and unite around the notochord. These two patches of melanophores may be situated one above the other or asymmetrically on the anteroposterior axis.

The pectoral fins begin to form simultaneously at the anal opening. Great changes are observed in the morphology of the larva when the vitellicle is completely reabsorbed. These consist of

pigmentation of the eyes, opening of the mouth and the appearance of the second area of body pigmentation. During this phase the mean of the maximum diameter of the eyes is 270 µm. The second area of body pigmentation develops progressively under the notochord and above the digestive tract, finally covering the latter completely. The radii of the pectoral fin are observed next. The last phase of development appears in a tendency to widening of the cephalic area. This gives the larva a very typical appearance, but since development was interrupted at this point the tendency remains unconfirmed.

#### Developmental conditions

**Temperature.** Two experiments carried out at different temperatures permitted the observation of considerable differences in development chronology (Table II). At 20°C the larvae are less active and less developed than those at 25°C.

| Stage          | Description                                                  | Time of development (h) |         |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|---------|
|                |                                                              | 20°C                    | 25°C    |
| Fertilisation  |                                                              | 0                       | 0       |
| Fertilised egg | Egg with oil globule                                         | 2                       | 2       |
| Embryo         | Embryo development finished, somite structure totally formed | 24                      | 16      |
| Pre-larva      | Hatching, otolith sacs formed                                | 33 - 35                 | 24 - 26 |
| Larva          | Posterior chromatophores                                     | 64                      | 37      |
|                | Pectoral fin development and anus opening                    | 93                      | 62      |
|                | Eye pigmentation                                             | 110                     |         |
|                | Mouth opening                                                | 120                     | 70 – 85 |
|                | Third chromatophore above stomach                            | 133                     |         |
|                | Caudal fin development                                       | 143                     | 110     |
|                | Anterior head structure formation                            | 243                     | -       |

Table II.- Differences in development time in *Epinephelus marginatus* at 20 and 25°C.

**Light.** In darkness the larvae remained immobile in groups on the surface. Flashes of light at irregular intervals caused both brusque and long movements, apparently linked to preying behaviour. In tanks with permanent light the larvae dispersed themselves in the water column and presented less intense movement.

**Feeding.** Considering the small mouth of the larvae

they were fed with laboratory-reared *Brachionus plicatilis* of some 240 µm and marine zooplankton between 20 and 60 µm. The feeding tests were carried out at different concentrations and hunting forays were observed. Their success was not demonstrated however, as the stomachs were always empty. It is probable that the larvae died of starvation.

## DISCUSSION

The high fertilisation rate (calculated at over 90%) of the eggs captured could be explained by the fact that they were laid naturally. Artificial fertilisation carried out with dead animals presents a relationship between the fertilisation rate and the time elapsed from death with values descending to 50% after 3 hours (Colin *et al.*, 1987) and 30% after 7 - 9 hours (Barnabé, 1974).

The collection method used could also have influenced the viability of the eggs laid. Scuba diving operations showed that emission of eggs was followed immediately by intense predation by

smaller fish (mainly saddled breams, *Oblada melanura*). Although the effect of this predation cannot be measured, the quantity, speed and feeding frenzy of these fish may decimate the gametes even before fertilisation occurs (Zabala *et al.*, 1997). This could explain the low recruitment rate in this area. The transparent aspect of the eggs could be a strategy to avoid predators. The observations here do not confirm this hypothesis. The high hatching rate (85 - 90%) of the eggs could partially alleviate the effects of the predators.

There is little information about the eggs and larval stages of the Mediterranean species of *Epinephelus* (Spartà, 1935 ; Barnabé, 1974 ; Skaramuca *et al.*, 1989 ; Zabala *et al.*, 1997). The values for diameters presented by these authors are between 670 and 750 µm in non-hydrated or fixed eggs (Barnabé, 1974 ; Zabala *et al.*, 1997), to values of 885 µm in eggs obtained by plankton nets (Skaramuca *et al.*, 1989). The diameters of the eggs in the experiment described here are within this range.

According to Spartà (1935) pigmentation in 3.6 mm *Epinephelus alexandrinus* larvae is similar to that observed in the final larval stages of *E. marginatus*. This leads to the supposition that pigmentation patterns are identical in the larval stages of both species. Their separation may therefore be difficult. During the period of vitellus resorption there is an increase in total body length (TL) and a decrease in height (BD). This tendency reverses at the moment of metamorphosis when there is a slight decrease in TL and an increase in BD, giving the larva a more robust appearance.

There is still a great lack of information about the period between the last stage discussed above and the recruitment of juveniles.

Temperature appears to be the factor which has most influence on the larval development (Barnabé, 1974 ; Colin *et al.*, 1987 ; Gracia, 1996). The time to hatching for *Epinephelus marginatus* is short, and depends directly on the temperature (Colin *et al.*, 1987). There was a 9 hour difference in hatching between the two experiments carried out at 20 and 25°C. The experiments of Colin *et al.* (1987), with *Epinephelus guttatus* corroborate these results with a difference of 4 hours for 1°C. This information does not concur with the values presented by Barnabé (1974) where a temperature range of 22 - 26°C gave hatching at some 38 - 43 hours after fertilisation. This period is significantly longer than that obtained in the experiment described here. The temperature also has an effect on the speed of morphological changes in the larvae. On the days when the study was carried out in the marine reserve the temperature at the surface varied between 22 and 25°C first thing in the morning, and later increased. The second experiment is therefore more in line with authentic conditions.

Simultaneous manipulations of eggs and larvae were carried out to check their potential resistance to changes in temperature. Eggs taken from 23 °C and changed to below 15°C for transportation were unable to the support change and died, presenting a whitish vitellus divided into various granules. On the other hand a small group of larvae in the second experiment were changed at 90 hours from 25°C to 27°C, decreasing progressively to 20°C and then rising again finally to 22°C over a 24 hour period. Mortality recorded was below 10%.

The above experiment demonstrated that the larvae modify their motility as a function of temperature, with greater activity at higher temperatures. With the objective of facilitating the critical step from vitellary to autonomous feeding, the second experiment was carried out in complete darkness until the mouth opened, in the hope of observing the larvae attempting to save energy. The combination of the two factors (darkness and high temperature) in the same experiment cannot permit the quantification of the effect of each on motility. However, there was a clear increase in strike behaviour compared to the first experiment. Microscopic study of the digestive tract is impeded by the pigmentation appearing above it, so it was impossible to confirm the success of the hunting forays. Various authors estimate the size of the prey as 40% of mouth size (Cardona, 1993).

Therefore the mouth size (below 100 µm), as measured in larvae fixed in formalin, showed that the prey provided in the experiment with rotifers (*Brachionus plicatilis*) was too large (above 200 µm), whilst the plankton (from 20 to 60 µm) provided was much more suitable. Food became scarce by the end of the second experiment so results are unavailable for food at a high temperature (25°C). However, it is evident that the second experiment clearly provides the ideal conditions for raising the dusky grouper.

Studies using other types of food such as the trochophores of various bivalve species could facilitate the rearing of the dusky grouper in captivity, even if not on a scale for commercial purposes at least in numbers sufficient for its re-introduction into many areas of our shore where it is now very scarce.

## CONCLUSIONS

This paper presents data on the spawning activity of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) from natural spawns. In the light of the results obtained it may be concluded that the following critical moments occur during the first phases of reproduction of the dusky grouper in the Medes Islands Marine Reserve :

- heavy predation at spawning by other small fish

- heavy mortality during the transition from vitellary to autonomous feeding

These two phenomena, together with other factors such as the state of marine currents, are critical in the explanation of the absence of recruitment in the study area.

Temperature is the most important factor affecting the chronology of larval development. The

optimum rearing conditions for larvae in captivity appear to be 25°C in darkness until the mouth opens.

All larvae were dead 6 - 9 days after hatching, with starvation the probable cause. Prey sizes (with nauplius and copepods considered more suitable

than rotifers) and possible lack of larva motility for prey capture appear to account for this failure.

Future applications in aquaculture and the reconstruction of natural populations will be greatly facilitated when solutions are found to the problem posed by this critical phase in development.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was realised within the framework of the monitoring program of the Medes Islands Marine Reserve financed by the Fisheries Ministry of the "Generalitat de Catalunya". We

acknowledge with pleasure the field assistance of Rafel Coma, David Diaz, Marc Mari, Gregori Muñoz-Ramos, Emilià Pola, Xavi Torres and Mikel Zabala.

## REFERENCES

- Barnabé G., 1974 - La reproduction du mérou *Epinephelus gigas* : observations préliminaires de terrain. *Aquaculture*, **4** : 363-367.
- Boudouresque, C.F., M. Avon, V. Gravez (eds), 1991 - *Les espèces marines à protéger en Méditerranée*. GIS Posidonie Publ., Marseille, 448 pp.
- Cardona L., 1993 - Alimentación larvaria de peces. In : *Acuicultura marina : fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. F. Castelló (ed.), Publicacions Universitat de Barcelona, pp: 357-361.
- Colin P.L., D.Y. Shapiro, D. Weiler, 1987 - Aspects of the reproduction of two groupers, *Epinephelus guttatus* and *E. striatus* in West Indies. *Bull. mar. Sci.*, **40** (2) : 220-230.
- Gracia V., 1996 - *Estudio de la biología y posibilidades de cultivo de diversas especies del género Epinephelus*. Thesis Doctoral unpublished. Universitat de Barcelona, 279 pp.
- Skaramuca B., D. Musin, V. Onofri, M. Caric, 1989 - A contribution to the knowledge on the spawning time of the dusky grouper (*Epinephelus guaza* L.). *Acta Biol. Iugosi (E. Ichthyol.)*, **21** (1) : 79-85.
- Spartà A., 1935 - Contributo alla conoscenza dello sviluppo nei Percidi. Uova ovariche mature di *Epinephelus guaza* (L.) e stadii post-embrionale e larvali di *E. alexandrinus* C.V., *Mem. R. Com. talassogr. ital.*, **224** : 1-15.
- Zabala M., A. Garcia-Rubies, P. Louisy, E. Sala, 1997 - Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 65-77.

## Réalisation d'une interface informatisée pour la photo-identification du mérrou brun de Méditerranée *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Seranidae).

Software development for dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Seranidae) photo-identification.

Daniel Garcia <sup>1</sup>, Frédéric Alazard <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chemin de l'entracte 06160 Juan-les-Pins, France.

<sup>2</sup> 42 Avenue Julien 06100 Nice, France.

e-mail : association.manati@caramail.com

**Mots clefs :** Mérrou brun, *Epinephelus marginatus*, photo-identification, interface, système de gestion de base de données.

**Key words:** Dusky grouper, *Epinephelus marginatus*, photo-identification, interface, database management system.

**RESUME :** RECOMERO® est un logiciel de photo-identification développé dans le cadre du D.E.S.S. compétence complémentaire en informatique de Corte. Ce logiciel est basé sur la reconnaissance des individus au sein d'une population de mérrous en utilisant les taches qui ornent le contour de l'œil de l'animal. Plus précisément, une interface graphique proposera une photo ou une vidéo sous-marine de mérrou. L'utilisateur pourra alors directement cliquer sur les taches afin que le logiciel détermine la surface et le barycentre de celles-ci. Ces informations seront conservées dans une base de données et éventuellement réutilisées pour une identification ultérieure du même individu. Dès lors que l'utilisateur a saisi une tache, celle-ci s'affiche sur un patron standard. Lorsque l'ensemble des taches sera saisi, ce patron pourra servir aux plongeurs pour une identification visuelle rapide de l'individu. Notons que l'interface graphique proposée n'est qu'une ébauche. Pour envisager un outil efficace, il s'agira de procéder à une série de tests qui permettront de valider le logiciel. Le logiciel s'intègre dans un cadre plus large. Associé à une base de données classique contenant toutes les informations recueillies par les scientifiques, ce logiciel jouera le rôle de système expert. Ainsi, il sera possible de s'assurer de l'identité de l'individu lors de la saisie des informations.

**ABSTRACT:** RECOMERO® is a software of photo-identification elaborated for the D.E.S.S. of "Compétence Complémentaire en Informatique" of Corte. This software is based on individual recognition. It used stains which are around the eyes of the groupers. More precisely, a graphic interface will suggest a picture or a video submarine of a grouper. The user will directly click on the stains in order to decide by the software the area and the barycentre of these. This data will be retained in a database and will perhaps be used again for a further identification of the same individual.

Since the user has clicked a stain, this latter will appear on a standard pattern. When all of the stains are captured, this pattern will be saved to the scuba diver for a quick visual identification of the individual.

We can notice that the proposed interface is just a draft. In order to have an efficient software we have to practise several tests which will valide the software. This software is a part of several applications. Combined to a basic database which contains the collected information by the scientist, this software will be an expert system. Then, it will be possible to check someone's identity during the capture of datas.

## INTRODUCTION

C'est au cours de différentes visites sur l'île des Embiez que s'est révélé le besoin de développer un outil global de gestion permettant aux chercheurs qui s'intéressent aux mérrous de conserver une trace de leurs observations et d'effectuer des opérations sur les données récoltées. Pour mener à bien ce projet, l'utilisation de l'informatique qui offre un support inaltérable et facilement manipulable s'est logiquement imposée. Une base de données regroupant l'ensemble des

observations et mesures réalisées en plongée constituera l'élément principal de cet outil global. Or, comme dans tout système de gestion de base de données, le principal souci est d'éviter les doublons. Ici, on veillera tout particulièrement à ne pas entrer deux mérrous différents sous le même nom ou au contraire entrer deux identifiants différents pour un même individu.

Afin d'éviter ces erreurs de saisie qui remettraient en cause la validité de l'outil de gestion, une phase

préliminaire d'identification de l'individu est nécessaire. Différentes méthodes ont été expérimentées pour identifier les mérours. Parmi celles-ci, il existe une méthode d'identification visuelle mise au point par Patrick Lelong sur les individus des Embiez basée sur les taches qui ornent le contour de l'œil du mérour.

Le logiciel RECOMERO® propose d'automatiser en partie cette phase d'identification en utilisant la

méthode mise au point par Patrick Lelong. Dans un premier temps, une interface a été développée dans le but d'évaluer la possibilité d'utiliser les documents iconographiques réalisés dans diverses conditions d'observation. Cette interface a été présentée au premier symposium sur le mérour de Méditerranée qui s'est déroulé sur l'île des Embiez en novembre 1998.

## MATERIEL ET METHODES

L'interface développée dans le cadre du D.E.S.S. Compétence Complémentaire en Informatique de l'université de CORTE a été réalisée avec Delphi SQL version 2. Delphi est un logiciel de programmation événementielle permettant de réaliser des IMH (Interfaces Homme Machine) conviviales et intuitives. La version utilisée permet, en outre, de lier l'interface à une base de données. Les documents iconographiques utilisés ont été choisis parmi des sources diverses en relation avec les Embiez. On distingue parmi ces sources des photographies sous-marines, des photographies réalisées dans les aquariums de l'Institut Océanographique Paul Ricard, une vidéo sous-marine au format broadcast standard bêta-CAM, une vidéo au format amateur Hi8 réalisée dans les aquariums de l'Institut Océanographique Paul Ricard.

Une partie des documents correspondant aux critères d'utilisation que nous évoquerons dans le prochain chapitre a été numérisée. Les photographies ont été stockées sur CD-ROM en utilisant un scanner de diapositives. Les séquences vidéo qui présentaient un intérêt pour le test ont été numérisées au format AVI en utilisant une carte d'acquisition vidéo. Les images exploitables, les plus pertinentes, ont été extraites de ces séquences.

Notons que, dans un premier temps, le logiciel de photo-identification exploitera uniquement des images fixes.

Finalement, un échantillon représentatif a été choisi parmi le stock d'images numérisées. Les images retenues illustrent les divers facteurs pouvant intervenir sur le traitement informatique de l'image. Ces facteurs regroupent la nature du document d'origine, photo ou vidéo, le lieu de la prise de vue, en aquarium ou en plongée, la proximité du poisson, la turbidité de l'eau, l'attitude de l'animal, la netteté du document de départ.

Dans tous le cas, les images retenues correspondent aux critères permettant leur traitement par le logiciel.

### Description de l'interface

L'interface est divisée en deux parties, la première occupant la gauche de l'écran est dédiée au traitement de l'image, la seconde, à droite, stocke les informations concernant l'animal observé.

Dans la zone concernant le traitement de l'image,

l'élément principal est une fenêtre destinée à recevoir les documents iconographiques préalablement numérisés. Un ascenseur permet d'ajuster le traitement de l'image à la netteté de la photographie. La partie de droite regroupe les champs qui recevront les valeurs stockées ultérieurement dans la base de données. On distingue les champs visibles de ceux qui ne sont pas affichés à l'écran.

Les champs visibles sont renseignés manuellement, c'est le cas du champ de saisie "Nom du Mérour", ou sont calculés automatiquement comme les champs "Surface de la tache traitée" et "Barycentre de la tache".

Le numéro d'identification de la tache traitée et le nombre de taches sont des informations qui sont transparentes pour l'utilisateur donc invisibles à l'écran mais qui néanmoins seront stockées.

Dans la partie supérieure de cette zone dédiée aux informations, une interprétation graphique du traitement informatique des taches, permet à l'utilisateur de visualiser le résultat de ce traitement sur un patron standard représentant un profil de mérour (Fig. 1).

### Méthodes

#### - Critères de validité d'une prise de vue

Seuls les documents illustrant un mérour de profil pourront être utilisés. Dans le cas où l'animal est observé légèrement de biais, un algorithme mathématique de redressement de l'image tel que ceux qui sont utilisés en cartographie permettra de rendre l'image exploitable. Cependant, cette manipulation sera employée uniquement dans le cas où les prises de vues d'un animal donné seront particulièrement rares ou difficiles à obtenir. D'autre part, le mérour change régulièrement de livrée (Zabala *et al.*, 1997) et parmi les diverses livrées qu'adopte le mérour, seule la livrée cryptique se prête au traitement informatique des taches.

#### - Description de l'utilisation de l'interface.

Une zone de commentaire guide l'utilisateur dans sa démarche de saisie.

La première étape consiste à cliquer sur l'œil puis sur l'extrémité de l'ouïe du poisson. Ces premières opérations permettent de calculer la distance entre l'œil et l'extrémité de l'ouïe. Cette mesure morphométrique servira d'étalon et permettra de standardiser le traitement des divers documents.



Figure 1 - Présentation générale de l'interface. / General presentation of the interface.

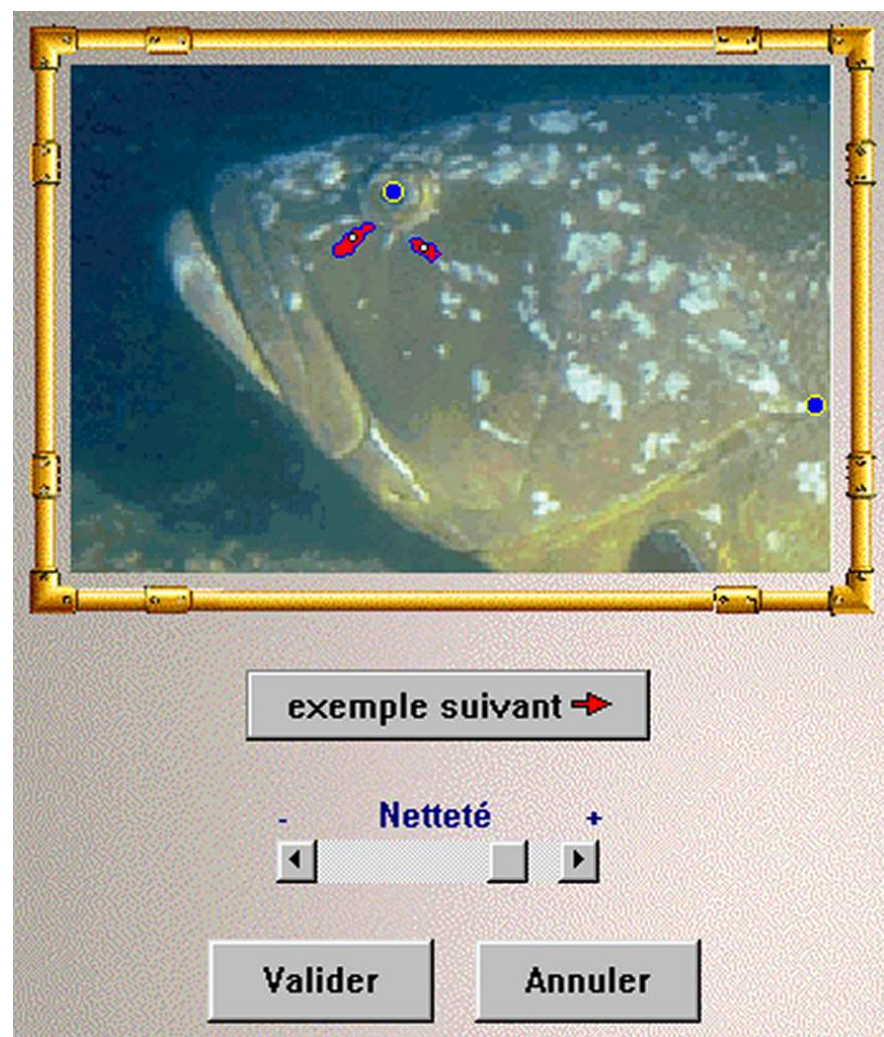


Figure 2 - Saisie d'une tâche. On remarque le calibrage par le pointage de l'œil et de l'extrémité de l'opercule (Points bleu). / Seizing a stain: calibration is carried out on the eye and extremity of the gills (blue point).

Ces deux opérations permettront par la même occasion de localiser les coordonnées des taches qui ornent le contour de l'œil du mérou dans un repère orthonormé dont l'origine sera le centre de l'œil.

Lorsque ces opérations préliminaires sont effectuées, l'opérateur clique sur les taches qu'il considère utiles pour identifier l'individu. La tache est alors colorée en rouge et cerclée de bleu pour signifier que le traitement est terminé. L'utilisateur peut alors manipuler l'ascenseur pour cerner au mieux la tache. Lorsque l'utilisateur est satisfait du résultat, il valide la tache qu'il vient de travailler. S'il n'arrive pas à obtenir un résultat convenable, il annule l'opération (Fig. 2).

Lorsqu'une tache est validée, les champs concernés sont remplis. Ainsi, pour chaque tache, la valeur de la surface, calculée en unités arbitraires, et les coordonnées du barycentre sont stockées dans la base de données en vue d'une identification ultérieure de l'animal (Fig. 3). Pratiquement, l'utilisateur qui traitera un nouveau document pourra interroger la base de données afin de savoir si l'individu observé n'a pas déjà été entré. Lorsque les taches les plus caractéristiques auront été traitées, une requête, transparente pour l'utilisateur sera adressée à la base. Finalement, c'est l'utilisateur qui décidera, après avoir comparé le résultat de la requête avec le document traité d'entrer ou pas un nouvel individu.



Figure 3 - La tâche saisie est validée. Celle-ci est reportée directement sur le patron de droite avec remplissage automatique des champs de positions et de surface. / The seized stain is validated. It is transferred directly to the pattern on the right and position and surface values are filled in automatically.

## RESULTATS

Reconsidérons l'objectif de cette première interface lequel visait à étudier la possibilité d'exploiter les documents iconographiques réalisés lors d'une observation. Les tests effectués avec le lot d'images sélectionnées permettent d'affirmer qu'il est possible d'appliquer avec succès le traitement informatique que propose le logiciel RECOMERO©. On notera que les meilleurs résultats ont été obtenus avec des photographies

ou des diapositives scannées. Cependant, l'utilisation de la vidéo sous-marine présente de nombreux avantages. Elle permet en outre d'obtenir au moins quelques plans exploitables sur l'ensemble des images fixes qui constituent une séquence. D'autre part, la différence de qualité du traitement informatique ne justifie pas de privilégier la photographie plutôt que la vidéo sous-marine. En effet, traditionnellement, les travaux de

traitement de l'image sont réalisés sur des zones réduites afin de limiter le temps de calcul. De plus l'algorithme de reconnaissance de formes du logiciel utilise une procédure récurrente qui, bien que très pratique et très rapide, a tendance à monopoliser les capacités de l'ordinateur et ne permettrait pas de traiter des images plein écran.

Dans ces conditions, la définition de l'image numérisée, son "grain", n'est pas un critère déterminant et les résultats obtenus avec les séquences vidéo sont assez satisfaisants pour que les films sous-marins constituent la principale source d'images.

## DISCUSSION

L'interface décrite dans cette publication a été présentée au premier symposium international sur les mérours de Méditerranée qui s'est déroulé du 5 au 7 novembre. Ce symposium a regroupé des spécialistes du mérou qui ont pu donner leur avis sur cette interface laquelle a été, dans l'ensemble, très appréciée. Les différentes remarques ont été regroupées en vue d'en améliorer l'ergonomie, l'efficacité, la facilité d'utilisation.

Le premier souci est la difficulté d'obtenir des images utilisables. Un premier élément de réponse consiste à utiliser la vidéo sous-marine dont les avantages ont été évoqués dans le chapitre précédent. Notons que les films déjà réalisés pourront servir de base de départ pour entrer les premiers individus. D'autre part, le mérou change régulièrement de livrée ce qui ne facilitera pas la tâche du plongeur qui souhaitera obtenir une image correspondant aux critères du traitement informatique proposé. Il faut savoir que le mérou, lorsqu'il se repose sur le fond, adopte une livrée cryptique standard laquelle fait ressortir distinctement les taches. (Zabala *et al.*, 1997). C'est, en outre, lorsque le poisson sera au repos que l'on aura le plus de chance d'obtenir les meilleures prises de vues.

Nous avons vu que pour chaque tache, deux valeurs seront stockées dans la base de données, il s'agit du barycentre et de la surface de la tache. On peut se demander si ces deux mesures seront assez discriminantes pour distinguer deux mérours très ressemblants et s'il ne serait pas plus judicieux de garder en mémoire des points caractéristiques des taches afin de conserver la forme de celles-ci. D'autre part, les taches du

mérou se disloquent lors de sa croissance. Cette fragmentation des taches risque de remettre en cause la validité de la méthode au cours du temps, elle devra donc être prise en compte dans la prochaine interface. C'est pourquoi, dans une nouvelle approche, les taches ne seront pas considérées comme des entités individuelles mais comme faisant partie d'ensembles. Ces ensembles sont d'ores et déjà bien identifiés. Il s'agit des "larmes", taches allongées verticalement sous l'œil du mérou et du "Y", composé de plusieurs taches alignées selon deux axes qui dessinent un Y. Ainsi, ce sont les caractéristiques de ces ensembles qui seront comparées et les chances de reconnaître un même mérou à plusieurs années d'intervalle seront plus importantes.

Enfin, lors de la présentation de l'interface, les auditeurs ont évoqué la possibilité de réduire le travail de l'utilisateur en automatisant la saisie des taches. Cet aspect sera envisagé pour la suite du développement. De plus, comme il est possible de localiser les ensembles cités : les larmes et le Y, la zone située sous l'œil du mérou pourra être divisée en différents secteurs correspondant aux emplacements où l'on trouve habituellement ces ensembles de taches. Cette méthode a été utilisée avec succès pour identifier des baleines à bosses (Mizroch *et al.*, 1990). Ainsi, non seulement les taches seront déterminées automatiquement mais de plus ces taches seront automatiquement classées par ensemble. Il appartiendra finalement à l'utilisateur de vérifier visuellement le résultat du traitement et éventuellement d'y apporter des corrections.

## CONCLUSION

Pour résumer, cette étude laisse envisager des résultats prometteurs pour l'identification assistée par ordinateur des mérours de Méditerranée. En effet, les documents sélectionnés ont, dans l'ensemble, subi avec succès le traitement informatique. Le moyen le plus sûr d'obtenir une base de travail est d'utiliser la vidéo sous-marine qui permet d'obtenir des prises de vue des individus les plus farouches plus facilement qu'avec un appareil photographique. D'autre part, les évolutions de ce logiciel d'identification permettront de prendre en compte les nouvelles données apportées par les recherches les plus

actuelles. Ainsi, la future interface tiendra compte de la dislocation des taches du mérou avec sa croissance et les taches ne seront plus considérées comme des entités individuelles mais comme faisant partie de deux ensembles : les larmes sous l'œil et le Y. La saisie des taches sera automatisée et le logiciel sera en mesure de déterminer à quel ensemble appartiendra chaque tache traitée. Finalement, l'utilisateur aura la possibilité de valider le traitement informatique ou d'y apporter d'éventuelles corrections.

Cette identification visuelle basée sur les taches qui ornent le contour de l'œil du mérou, sera

couplée à un système complémentaire qui permettra de localiser d'éventuelles marques, blessures ou anomalies sur le corps de l'animal. On notera qu'une entaille sur la nageoire caudale

pourra être observée pendant plusieurs années ce qui représente un temps assez long pour qu'elle soit considérée comme un critère d'identification.

## REMERCIEMENTS

Cette interface a été réalisée grâce à la collaboration de Monsieur Patrick Lelong que nous tenons tout particulièrement à remercier pour sa disponibilité et ses précieux conseils. Nous remercions également Patrice Francour pour son

soutien, ainsi que l'ensemble des scientifiques présents lors de ce symposium qui nous ont fait part de leurs remarques afin d'améliorer le logiciel. Nous remercions également Thomas Benevent pour la traduction en anglais du résumé.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mizroch S.A., J.A. Beard, M. Lynde, 1990 – Computers assisted photo-identification of humpback whales. In : *Individual recognition of cetaceans : Use of photo-identification and other techniques to estimate population parameters*. P.S. Hammond, S.A. Mizroch, G.P. Donovan (eds), Report int. Whaling Com., Cambridge, Special Issue, **12**, pp : 63-70.

Zabala M., P. Louisy, A. Garcia-Rubies, V. Gracia, 1997 – Socio-behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. Mar.*, **61** (1) : 79-98.

## Sex steroids during gonad maturation and sex change in wild *Epinephelus marginatus*.

*Stéroïdes sexuels, cycle reproducteur et inversion sexuelle  
chez le mérou brun Epinephelus marginatus.*

Alberta Mandich<sup>1</sup>, Alessandra Massari<sup>1</sup>, Sergio Bottero<sup>1</sup>,  
Henk Goos<sup>2</sup>, Giovanna Marino<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale ed Applicata, Università di Genova,  
V.le Benedetto XV 5, 16132 Genova, Italia.

<sup>2</sup> Department of Experimental Zoology, University of Utrecht, Padualaan 8,  
3584 CH Utrecht, The Netherlands.

<sup>3</sup> ICRAM, Via di Casalotti 300, 00166-Roma, Italia.

**Key words:** *E. marginatus*, maturity stages, sex inversion, sex steroids.

**Mots clés :** *E. marginatus*, stades de maturation, inversion sexuelle, stéroïdes sexuels.

**ABSTRACT:** Till now, few endocrinological studies on sexual steroids in ambisexual fish are available and none on the protogynous hermaphrodite *Epinephelus marginatus*. This study reports on plasma levels of sex steroids during the reproductive period in relation to sex, maturity stages and sex inversion in a wild population of *E. marginatus*. Gonad specimens were submitted to histological studies and to RIAs for sex steroids such as estradiol-17 $\beta$ , testosterone, 11-ketotestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. High estradiol-17 $\beta$  and testosterone plasma levels were observed in mature females with oocytes at different stages of development. Plasma levels of 11-ketotestosterone were higher in males than in transitionals and in vitellogenic females. Estradiol-17 $\beta$  levels were lower in males than in transitionals. Increasing values of 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione were observed from the beginning of sex change.

**RESUME :** Jusqu'à présent, peu d'études endocrinologiques sont disponibles concernant les stéroïdes sexuels des poissons ambisexuels, et aucune sur l'espèce hermaphrodite protérogyne *Epinephelus marginatus*. Dans ce travail, nous décrivons les variations des concentrations en stéroïdes sexuels en relation avec la sexualité, les stades de maturation des gonades et l'inversion sexuelle pendant le cycle reproducteur dans une population naturelle d'*E. marginatus*. Les gonades ont été traitées pour l'examen histologique et le plasma pour l'analyse radioimmunologique des stéroïdes sexuels suivants : oestradiol-17 $\beta$ , testostérone, 11-ketotestostérone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. Des ovocytes à différents stades de développement ont été observés chez les femelles mûres pendant la saison reproductive avec des valeurs élevées d'oestradiol-17 $\beta$  et de la testostérone plasmatiques. Les concentrations plasmatiques de 11-ketotestostérone étaient plus hautes pour les mâles que pour les femelles en vitellogénèse. Chez les individus en transition, les valeurs d'oestradiol-17 $\beta$  étaient plus basses que chez les femelles, mais plus hautes que chez les mâles. Une augmentation du 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione plasmatique a été observé parmi les individus en transition au début de l'inversion sexuelle.

Steroid hormones have been implicated in natural sex change in fish, being sex inversion accompanied by a modification in gonadal steroidogenesis. (Chang, Yeung, 1989). Despite of the numerous studies on seasonal cycles of sex hormones in gonochoristic species, few studies on sex steroids fluctuations in hermaphrodite species are available. In some protogynous fish, the intersexual stage appears to be characterised by a rapid drop in plasma levels of 17 $\beta$ -estradiol, a surge of 11-ketotestosterone and a rise of 11 $\beta$ -hydroxy-androstenedione (Nakamura *et al.*, 1989; Debas *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1998). Till now no information are available on the sex

steroids pattern in the protogynous hermaphrodite *Epinephelus marginatus*. Aim of this study was to examine changes in plasma oestrogen and androgen levels in females and males during the reproductive season. Sex steroid levels during the process of natural sexual succession in a wild population of *E. marginatus* were also studied. Blood samples of *E. marginatus* (n = 91) were collected from the branchial arteries, within 15' after capture, during three spawning seasons (May-August 1995-1997). The blood was kept on ice before centrifugation at 3000 x g for 10' and plasma was frozen at - 20°C. Estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and testosterone (T) levels were measured by

radioimmunoassays (D.P.C., Los Angeles). RIAs for 11-ketotestosterone (11-KT) and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione (11-OHA) were performed at the Department of Experimental Zoology, University of Utrecht, The Netherlands. Gonad specimens were fixed in Bouin's fluid for 24 hrs, embedded in resin (Kulzer 7100), cut at 2  $\mu$ m thickness and stained with toluidine blue and

gentian violet for the identification of maturity stages.

Vitellogenic females showed a significant increase in E<sub>2</sub> plasma levels from May to July with no significant fluctuations in T plasma levels. Both steroids significantly decreased at the end of the reproductive season (Fig.1).

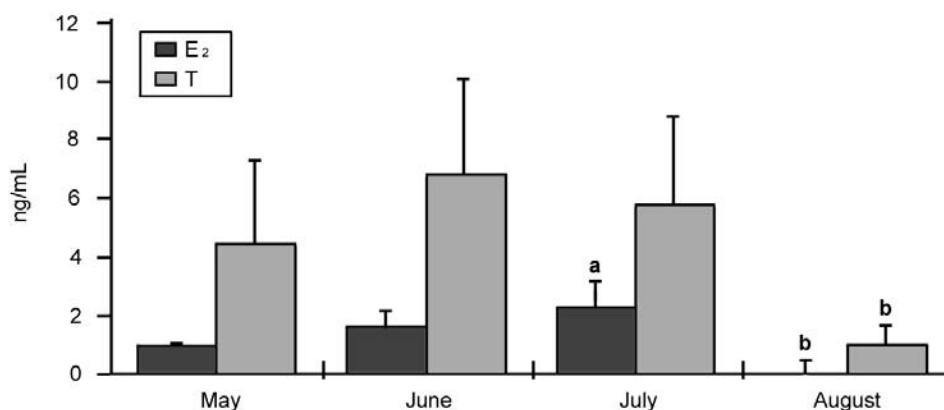


Figure 1 – Plasma levels of 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and testosterone (T) in *E. marginatus* females during the spawning season. Values are mean  $\pm$  S.D. (a) May vs. July ( $P \leq 0.001$ ); (b) August vs. others ( $P \leq 0.001$ ). / Concentrations des oestradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) et testostérone (T) plasmatiques chez les femelles de *E. marginatus* pendant la reproduction. Valeurs moyennes  $\pm$  D.S. (a) Mai vs. Juillet ( $P \leq 0.001$ ) ; (b) Août vs. autres ( $P \leq 0.001$ ).

E<sub>2</sub> plasma levels remained low through the reproductive period in males. T and 11-KT values were high in maturing and mature males and decreased in spermiating males. In transitionals (Fig.2), E<sub>2</sub> levels were lower than in females but

higher than in males. A significant increase of 11-OHA plasma values was observed in early transitionals followed by a significant increase of 11-KT and 11-OHA at the end of sex change.

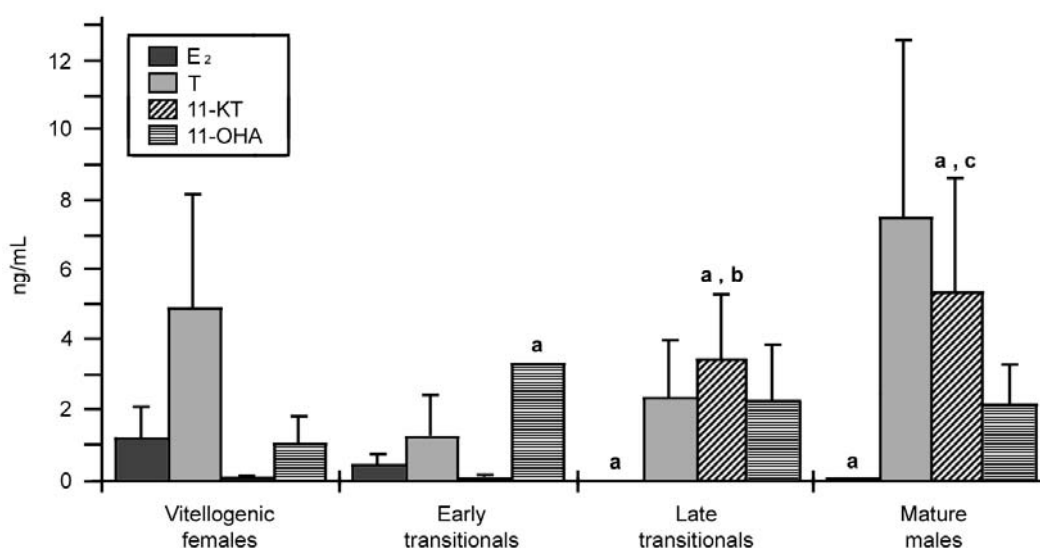


Figure 2 – Mean concentrations ( $\pm$  S.D.) of 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione (11-OHA) during sex inversion in *E. marginatus*. (a) others vs. females ( $P \leq 0.001$ ); (b) early transitionals vs. late transitionals ( $P \leq 0.001$ ); (c) early transitionals vs. males ( $P \leq 0.001$ ). / Oestradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), testostérone (T), 11-ketotestostérone (11-KT) et 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione (11-OHA) pendant l'inversion sexuelle d'*E. marginatus*. Valeurs moyennes  $\pm$  D.S. (a) autres vs. femelles ( $P \leq 0.001$ ) ; (b) transition précoce vs. transition tardive ( $P \leq 0.001$ ) ; (c) transition précoce vs. mâles ( $P \leq 0.001$ ).

Protogynous hermaphroditism, multiple spawning pattern and asynchronous oocyte maturation contribute to make difficult to utilise  $E_2$  and T plasma values to check female maturity *in vivo*. In transitionals, the gradual decrease of  $E_2$  plasma levels during the first phase of sex inversion corresponds to the degeneration of vitellogenic oocytes. 11-KT gradually increases in parallel to

the increased number of spermatogonia so the latest stage of sex inversion is significantly marked by the rise of this androgen. The significant increase of 11-OHA plasma levels at the beginning of sex inversion points this steroid as an indicator of the beginning of sex change of *E. marginatus* as observed in other hermaphrodite teleosts (Chang, Yeung, 1989; Debas *et al.*, 1990).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant of the Italian Ministry for Agricultural Policy. Law 41 / 82.

## REFERENCES

- Chang S.T.H., W.S.B. Yeung, 1989 - Sex steroids in intersexual fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, **7** : 229-235.
- Debas L., A. Fostier, J. Fuchs, M. Weppe, G. Nedelec, A. Bennett, C. Cauty, B. Jalabert, 1990 - The sexuality of cultured hermaphroditic fish species: analysis of morphological and endocrinological features in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon*, as a basis for further research to control reproduction in the grouper. In : *Advances in Tropical Aquaculture*. J. Barret (ed.), IFREMER Press, Tahiti, pp : 543-557.
- Johnson A.K., P. Thomas, R.R. Wilson Jr, 1998 - Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *J. Fish Biol.*, **52** : 502-518.
- Nakamura M., T.F. Hourigan, K. Yamauchi, Y. Nagahama, E. G. Grau, 1989 - Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Environ. Biol. Fishes*, **24** : 117-136.

**Induced spawning and first larval rearing in *Epinephelus marginatus*.**  
***Reproduction induite et premier élevage des larves d'*Epinephelus marginatus*.***

**Giovanna Marino<sup>1</sup>, Ernesto Azzurro<sup>1</sup>, Clara Boglione<sup>2</sup>,  
Alessandra Massari<sup>3</sup>, Alberta Mandich<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ICRAM, Via di Casalotti 300, 00166-Roma, Italia.

<sup>2</sup> Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura, Università di Tor Vergata,  
Via della Ricerca Scientifica s.n.c., 00133 Roma, Italia.

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale ed Applicata, Università di Genova,  
V.le Benedetto XV 5, 16132 Genova, Italia.

**Key words:** *Epinephelus marginatus*, induced spawning, GnRHA-Dep, larval rearing.

**Mots clés :** *Epinephelus marginatus*, induction hormonale, GnRHA-Dep, élevage de larves.

**ABSTRACT:** From 1995 up to 1998 reproductive condition of forty wild dusky grouper females belonging to ICRAM broodstock were monitored by ovarian biopsies. Attempts to induction of final maturation and spawning have been conducted with various hormone preparations. Human chorionic gonadotropin (hCG) at 500 - 2000 UI / Kg dosage was given in multiple injections alone and in combination with sea bass pituitary (7 - 9 mg / Kg). Gonadotropin-releasing hormone analog (GnRHa) in microspheres (Triptoreline, Decapeptyl, Ipsen Biotech) were used at 40 - 50 µg / Kg in single injection. hCG, in synergy with pituitary, induced ovulation of healthy eggs. Multiple spawning was induced in 50% of females injected with GnRHa. Ovulation time ranged between 66 - 85 hours, according to oocyte maturity stage and temperature (17.7°C - 24.2°C). Fertilisation rate ranged between 80 - 89.5%. Embryonic development lasted 50 - 52.5 hours. Preliminary larval rearing trials were carried out in 500 L incubators using green algae, cryopreserved oyster trochophores and baby rotifers (*Brachionus plicatilis*). Larval survival was approximately 90% after 6 days from hatching. The first critical period was observed between 13<sup>th</sup> - 15<sup>th</sup> days with 100% mortality. Further studies to identify physiological, metabolic and trophic parameters are necessary to set up suitable larval rearing techniques.

**RESUME :** De 1995 à 1998, les conditions génésiques de quarante femelles sauvages de mérou brun ont été suivies, au moyen de biopsies des ovaires. Des essais visant à induire le stade de maturation final et la reproduction ont été réalisés, avec diverses préparations hormonales. De la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) a été administrée à la dose de 500 - 2000 UI / Kg, en plusieurs injections, seule ou en combinaison avec des hormones hypophysaires de bar (7 - 9 mg / Kg). Un analogue de l'hormone ayant pour propriété de libérer la gonadotrophine (GnRHa) a été administré en microsphères (Triptoreline, Decapeptyl, Ipsen Biotech) à la dose de 40 - 50 µg / Kg en une seule injection. hCG, combinée avec l'hormone hypophysaire a déclenché l'ovulation des oeufs sains. Le GnRHa a déclenché des pontes multiples chez 50% des femelles traitées. Le temps d'ovulation a été compris entre 66 et 85 heures, suivant le stade de maturité de l'ovocyte et la température (17,7°C - 24,2°C). Le taux de fécondation a oscillé entre 80 et 89,5%. Le développement embryonnaire a duré de 50 à 52,5 heures. Des essais préliminaires d'élevage de larves ont été réalisés dans des incubateurs de 500 L, avec des algues vertes, des trochophores d'huîtres conservés par le froid et de jeunes rotifères (*Brachionus plicatilis*). Le taux de survie des larves a été d'environ 90%, 6 jours après l'éclosion. La première période critique a été observée entre le 13<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour, avec un taux de mortalité de 100%. Il faudra réaliser d'autres études pour identifier des paramètres physiologiques, métaboliques et trophiques et mettre au point des techniques appropriées pour l'élevage de larves.

Induced spawning and larval rearing techniques have been developed in Southeast Asia for several tropical groupers (Kuo *et al.*, 1988; Fukuhara, 1989; Chao, Lim, 1991; Lim, 1993; Toledo *et al.*, 1993), but up to now standardised methods are still lacking. Hormone-induced spawning trials have been recently experimented for some Mediterranean groupers, such as *Epinephelus*

*aeneus* (Hassin *et al.* 1997) and *Epinephelus marginatus* (Spedicato *et al.*, 1995, in press; Marino *et al.*, 1998). This paper briefly described the experiences on broodstock management, induced spawning and first larval rearing carried out from 1995 to 1998, on three dusky grouper broodstocks.

### Broodstock management and hormone induced spawning

Forty breeders (2.5 - 16 Kg body weight, BW) were caught by long-line around Lampedusa Island, individually tagged and stocked in three outdoor covered tanks (40 - 70 m<sup>3</sup>) containing artificial holes. Groupers were maintained under natural daylength and daily fed at 0.5 - 3% BW on fresh trash fish and squid. Twenty seven females were monitored from 1995 to 1998 to assess sex and reproductive condition. Fish were anaesthetised in a 0.15 mL.L<sup>-1</sup> solution of 2-phenoxy-ethanol and subjected to ovarian biopsies and sex steroid analyses (not shown). Ovarian tissue fragments were suspended in 0.9% NaCl for the measurement of largest oocytes diameters and fixed in Bouin's solution for staging vitellogenic oocytes. Different hormone preparations were used in females showing vitellogenic oocytes. In 1995 females were treated with hCG given in multiple injections, 24h apart, at 2000 UI / Kg dosage. hCG efficiency was previously verified *in vitro* by assaying 17 $\beta$  estradiol production by vitellogenic follicles (Mandich *et al.*, 1998); hCG was also used in combination with sea bass pituitary extracts (7 - 10 mg / Kg), according to previous experiences on tropical grouper (Tucker, 1994). In 1996 - 1998, long acting GnRHa was chosen on the basis of the multispawner pattern identified in wild females (Massari *et al.*, in press). GnRHa in microspheres (Triptoreline, Ipsen, Biotech) was given in a single injection at 40 - 50  $\mu$ g / Kg dosage.

In most females, oocytes did not go over the early beginning of vitellogenesis and showed any response to hormone treatments. Interruption of vitellogenesis has been already observed in young *E. marginatus* in the wild (Massari *et al.*, in press) and in *E. aeneus* in captivity (Hassin *et al.*, 1997), but never reported in sexually mature grouper females. Among other factors, the strongly female biased sex ratio of captive groupers might affect, in same way, the hormonal control of ovarian maturation (Zohar, 1989).

In captive dusky groupers, reactivity to hormones was limited at oocytes larger than 350  $\mu$ m, in advanced vitellogenesis. Multiple doses of hCG did

not result in natural spawning and eggs overripening was observed. In combination with sea bass pituitary extracts, hCG seem to be more effective, inducing ovulation of healthy eggs (3 out of 5 females).

Long acting controlled delivery systems of GnRHa seem to be the more appropriate way to induce final oocyte maturation and ovulation in dusky grouper, being effective in 13 out of 20 treated females.

### Artificial reproduction and first larval rearing

Since hormonal induction did not result in natural spawning, eggs were obtained by stripping from mature females. Stripping time was established in 68 - 70 hrs at 18 - 19°C. Eggs were mixed (2 min) with 0.5 mL of milt, washed with clean sea water and transferred to incubators tanks. Mean eggs diameter was 839  $\pm$  9.9  $\mu$ m and mean dry weight was approximately 66  $\mu$ g. Embryonic development lasted 50 - 52.5 hours at 18 - 18.5°C, as illustrated in Fig. 1. Fertilised eggs incubated under controlled temperature (18 - 19°C), at 20 eggs / L density, with low aeration supply, showed the best percentage of hatching (85 - 89.5%).

Preliminary larval rearing trials (n = 4) were carried out in 500 L incubators at an initial larval density of 16.5 larvae / L. Static condition were maintained until d3 from hatching. On d4 - d6, water was exchanged by slow through-flowing (30%) and then increased up to 100% on d7. Cultured microalgae and live preys were added in tanks from the first day of larval rearing. *Nannochloropsis oculata*, were used to provide shading effect (Lim, 1993). Cryopreserved oyster trochophores (*Cassostrea gigas*, 20 - 40  $\mu$ m, Trocofeed, Canada) were thawed in 30°C seawater (Messina *et al.*, in press) and used as initial food since d3. Small rotifers strains (*Brachionus plicatilis*, mean lorica length 135  $\mu$ m) were grown at 22 ppt salinity, fed on *Nannochloropsis oculata* and introduced in the tanks from day 4. Larval survival was approximately 80 - 90% at d6 and 30% at d8. The first critical period was observed between 13d - 15d with 100% mortality. Further studies to develop appropriate size larval food and adequate larval rearing condition are need.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research is funded by the Italian Ministry for Agricultural Policies. Law 41 / 82. The authors wish

to thank Prof. S. Cataudella for encouraging and supporting this research.

## REFERENCES

- Chao T.M., L.C. Lim, 1991 - Recent developments in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. *Singapore J. Primary Ind.*, **19** (2) : 78-93.
- Fukuhara O., 1989 - A review of the culture of grouper in Japan. *Bull. Nansei reg. Fish. Res. Lab.*, **22** : 47-57.

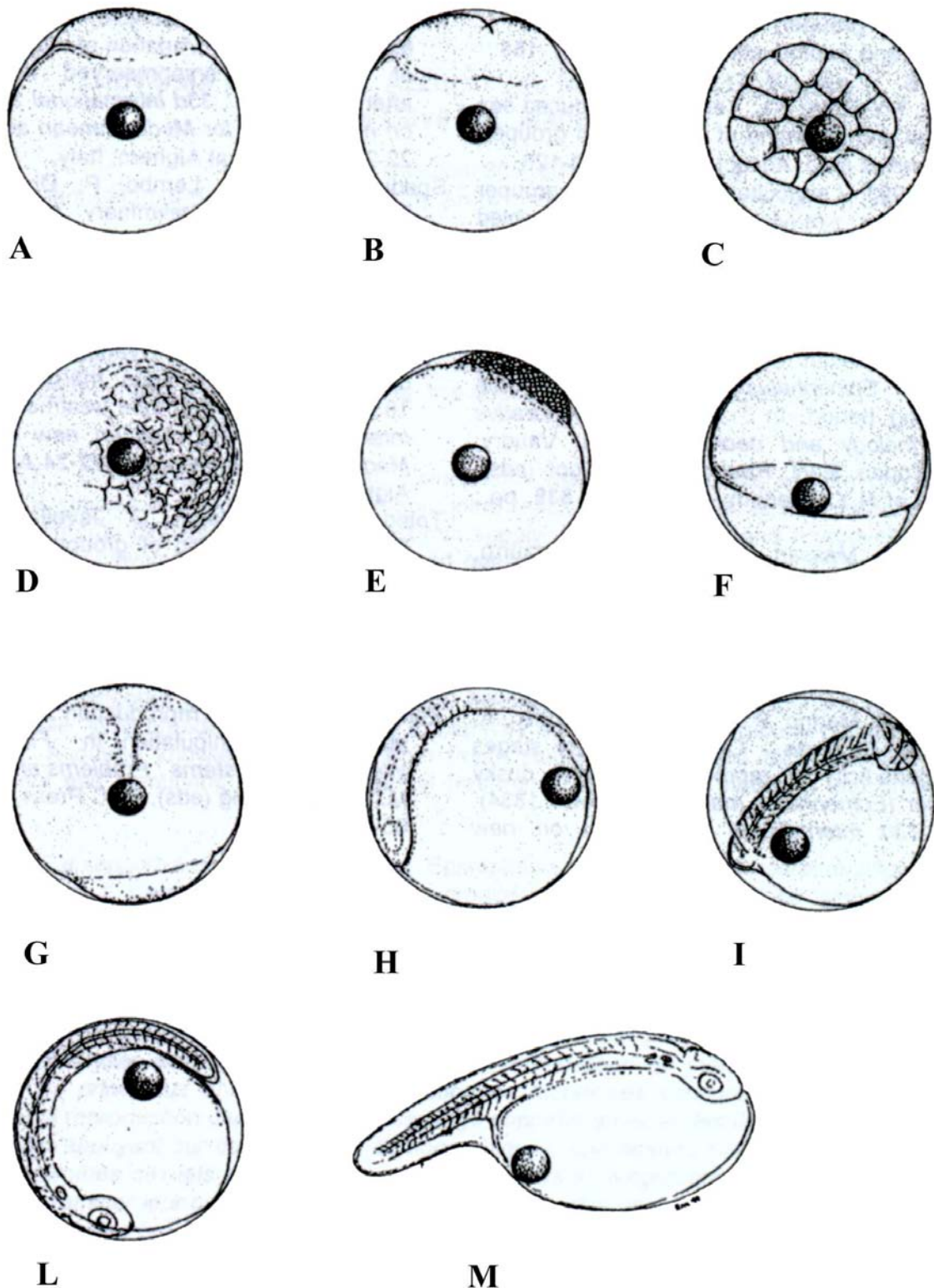


Figure 1 - Embryonic development of *E. marginatus* at 18 - 18.5°C. A) egg 1.15 h after fecondation; B) two celled ovum, 1.30 h; C) sixteen celled ovum, 3.20 h; D) first morula stage, 5.10 h; E) blastula stage, 11.45 h; F) late gastrula stage, 18.30 h; G) appearance of embryo, 20 h; H) formation of optic vesicles, 24.35 h; I) beginning of heartbeat, 44.30 h; L) beginning of embryo motility, 47 h; M) newly hatched larva, 51 h after fertilisation. / *Embryogénèse d'E. marginatus* à 18 - 18.5°C. A) oeuf fécondé depuis 1 h 15 ; B) stade deux blastomères, 1 h 30 ; C) stade seize blastomères, 3 h 20 ; D) premier stade morula, 5 h 10 ; E) stade blastula, 11 h 45 ; F) gastrula avancée, 18 h 30 ; G) l'embryon devient visible, 20 h ; H) formation des vésicules optiques, 24 h 35 ; I) début des battements cardiaques, 44 h 30 ; L) début de motilité embryonnaire, 47 h ; M) larve venant d'éclore, 51 h après la fécondation.

- Hassin S., D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar, D.M. Popper, 1997 - Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus*. 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, **156** : 305-316.
- Kuo C.M., Y.Y. Ting, S.L. Yeh, 1988 - Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, **74** :113-126.
- Lim L.C., 1993 - Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* and brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* in Singapore. *J. World Aquacult. Soc.*, **24** (2) : 262-274.
- Mandich A., G. Marino, A. Massari, 1998 – *In vitro* steroid secretion by ovarian follicles of the groupers *Epinephelus marginatus* during the spawning period. In : *Trends in comparative endocrinology and neurobiology*. H. Vaudry, M.C. Tonon, E.W. Roubos, A. de Loof (eds), Annals of N.Y. Academy of Science, **839**, pp : 586-588.
- Marino G., A. Massari, P. Di Marco, E. Azzurro, M.G. Finoia, A. Mandich, 1998 - Reproduction of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe, 1834) in the wild and under controlled conditions. *Biol. mar. Mediterr.*, **5** (3) : 1042-1051.
- Massari A., G. Marino, P. Di Marco, E. Azzurro, A. Mandich, in press - Ovarian maturity stages and periodicity of reproduction in the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe 1834). In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Messina C.M., G. Maricchiolo, A. Massari, A. Mandich, in press - Variation of nutritional value of commercial cryopreserved trochophores after thawing. In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Spedicato M.T., G. Lembo, P. Di Marco, G. Marino, 1995 - Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options méditerran.*, **16** : 131-148.
- Spedicato M.T., M. Contegiacomo, P. Carbonara, G. Lembo, in press - Ovarian maturation and spawning in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) induced by hormone treatments. In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Toledo J.D., A. Nagai, D. Javellana, 1993 - Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. *Aquaculture*, **115** : 361-367.
- Tucker J.W., 1994 - Spawning by captive Serranid fishes : a review. *J. World Aquacult. Soc.*, **25** (3) : 345-359.
- Zohar Y., 1989 - Fish reproduction : Its physiology and artificial manipulation. In : *Fish culture in Warm Water Systems : Problems and Trends*. M. Shilo, S. Sarig (eds), CRC Press, Florida, pp : 65-119.

## The reproduction of dusky grouper: a multidisciplinary approach. *La reproduction du mérrou brun : une approche multidisciplinaire.*

Giovanna Marino <sup>1</sup>, Ernesto Azzurro <sup>1</sup>, Alessandra Massari <sup>2</sup>,  
Maria Grazia Finoia <sup>1</sup>, David Di Cave <sup>3</sup>, Alberta Mandich <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ICRAM, Via di Casalotti 300, 00166-Roma, Italia.

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale ed Applicata, Università di Genova,  
V.le Benedetto XV 5, 16132 Genova, Italia.

<sup>3</sup> Cattedra di Parassitologia, Dip. Sanità Pubblica e Biologia Cellulare,  
Via di Tor Vergata 135, 00133 Roma, Italia.

**Key words:** *Epinephelus marginatus*, sexuality, reproduction, broodstock.

**Mots clés :** *Epinephelus marginatus*, induction sexualité, reproduction, stock de reproducteurs.

**ABSTRACT:** Compared to other teleost, *Epinephelus marginatus* exhibits a quite complex sexual pattern. This species is a protogynous hermaphrodite, reaching late the first sexual maturity. Males are large and territorial individuals, with a limited milt supply. Social structure and reproductive behaviour seem to affect spawning, sexual succession and gametes release. This paper briefly summarises the results obtained within the research program "Scientific support to set up artificial reproduction techniques for *Epinephelus marginatus*" (1994 - 1998) aimed to carefully investigate the reproductive biology of dusky grouper in the wild and to identify the main constraints in developing induced breeding techniques. Aspects of sexuality and reproduction of a wild population caught off Pelagic Islands (n = 425), were investigated using demography data, histological analysis of the gonads and related sex steroids profile. Wild breeders were adapted to captivity and monitored for sexual condition and gonad maturation. Acquired knowledge, coming from these studies, was utilised for improving broodstock management and identifying suitable hormonal treatments of spawning induction and precocious sex inversion.

**RESUME :** Par rapport à d'autres téléostéens, *Epinephelus marginatus* a des caractéristiques sexuelles très complexes. Il s'agit d'une espèce hermaphrodite protogyne qui atteint tardivement la première maturité sexuelle. Les mâles sont de gros poissons attachés à un territoire qui produisent peu de laitance. La structure sociale et le comportement procréateur semblent avoir une incidence sur le frai, sur l'évolution sexuelle et sur la libération des gamètes. Ce document résume brièvement les résultats obtenus dans le cadre du programme de recherche "Soutien scientifique à la mise au point de techniques de reproduction artificielle d'*Epinephelus marginatus*" (1994 - 1998), un programme dont l'objet est d'analyser attentivement la biologie de la reproduction du mérrou brun en milieu naturel et d'identifier les principaux obstacles à l'élaboration de techniques d'induction de la reproduction. La sexualité et la reproduction d'une population sauvage capturée au large des îles Pelagie (n = 425) ont été étudiées en s'appuyant sur des données démographiques, une analyse histologique des gonades et le profil des stéroïdes sexuels en dérivant. Les reproducteurs sauvages ont été adaptés à la captivité et suivis pour examiner leur condition sexuelle et la maturation des gonades. Les connaissances acquises à travers ces études ont été utilisées pour améliorer la gestion du stock de reproducteurs et identifier des traitements hormonaux appropriés d'induction de la ponte et d'inversion de sexe précoce.

Like most species belonging to the sub-family *Epinephelinae* (Serranidae, Perciformes), *E. marginatus* exhibits a rather complex sexual and reproductive pattern. This species is a protogynous hermaphrodite, reaching late the first sexual maturity (Bouain, Siau, 1983; Bruslé, 1985; Massari *et al.*, in press). Males are large and territorial individuals with a limited milt supply. Social structure and reproductive behaviour seem to affect spawning, sexual succession and

gametes release (Chauvet, Francour, 1990; Zabala *et al.*, 1997a, 1997b). This reproductive pattern renders dusky grouper vulnerable to fishing (Marino *et al.*, in press) and lead to logistical difficulties in broodstock formation and management (Di Marco *et al.*, in press). Thus, a deep knowledge on the reproductive biology is required in order to develop simulation models of fishing impact and reproduction techniques for enhancement of stocks (FAO, 1997). Our study

was aimed to carefully investigate the reproductive biology of dusky grouper in the wild and to identify the main constraints in developing induced breeding techniques in captivity.

#### **Sexual and reproductive pattern of dusky grouper in the wild**

Aspects of sexuality and reproduction of a wild population caught off Pelagie Islands (n = 425, from 1994 to 1997), were investigated using demographic data, histological and histochemical analyses of the gonads and related sex steroids profile.

Briefly, our results confirmed *E. marginatus* as a protogynous species, with "undelimited type 2" gonad (Sadovy, Shapiro, 1987). The first sexual maturity is reached late, at 36.7 cm SL in females (5th year of age) and at 81 cm SL in males (14th - 17th year of age). The reproductive season lasts from May to August with several spawning peaks. Females begin vitellogenesis in April and, in May, the 66% of females are already mature. In June and July, all females present mature or running gonads with vitellogenic healthy oocytes and rare atretic follicles. Dusky grouper females are multispawner fish, with a group synchronous oocyte development, as indicated by the simultaneous presence in the same ovary of both postovulatory follicles and new groups of yolked oocytes (Massari *et al.*, in press). This is also confirmed by sex steroids pattern, showing in vitellogenic females several peaks of both 17  $\beta$ -estradiol and testosterone (Mandich *et al.*, 1999). The female biased sex ratio (3 : 1) is in accordance with the hypothesis of a polygynic social structure. The sex-size frequency distribution, with most of females smaller than males, is typical of protogynous monandric, incompletely metagonous species (Marino *et al.*, in press). Histological evidences of remnants of a prior ovarian state clearly indicate that all male gonads have gone through a functional female phase and confirm the monandric pathway. Compared to other groupers, sex change in *E. marginatus* occurs in a very narrow range of sizes (15.2% of the max. standard length) and is accomplished through a three-phase process within the reproductive season. Our set of data indicates *E. marginatus*, among protogynous species, particularly vulnerable to overexploitation for reproductive failure.

#### **Main constraints and recent advances in controlled reproduction in captivity**

The capture of wild dusky groupers is extremely difficult since they inhabit deep waters and suffer serious trauma and damages due to rapid decompression (Di Marco, Marino, in press), increasing in severity with fish size (Di Marco *et al.*, in press). The difficulties in keeping alive large groupers lead to the formation of captive broodstock without males or with a strongly un-balanced sex ratio and made it necessary to develop alternative methods to obtain semen for eggs fertilisation. In 1997 and in 1998, male breeders were developed inducing precocious sex inversion in juveniles by means of 17 $\alpha$ -methyltestosterone administration (Marino *et al.* 1998). The successful fertilisation of *E. marginatus* eggs, with milt produced by hormone sex inverted fish, indicated the reliability of this technique. In 1996 - 1998, the feasibility of cryopreserving semen (coming from both natural and sex inverted males) was assessed using a simple method: semen was cryopreserved in cryovials after dilution 1 : 2 with fetal bovine serum (as extender) and addition of dimethylsulfoxide (1 : 7.5) as cryoprotectant and stored in LN2 for 7, 15 and 30 days. Independently from the frozen storage period, motility was very high and spermatozoa maintained the fertilisation ability.

As far as females are concerned, the reproductive condition of captive dusky groupers strongly differs from wild ones. In the wild, all females reach the final stages of vitellogenesis, and spontaneous ovulation and spawning usually occur whilst in captivity, only few females undergo vitellogenesis and do not spawn spontaneously. Hormonal failure, due to social and / or environmental inappropriate conditions, could probably be involved, as suggested for other hermaphrodite teleosts by Zohar (1989). Data collected in four years of induced spawning trials (Marino *et al.*, 1998) clearly indicate that the ovarian condition of captive females (the "group synchronous pattern" of maturation) needs to be periodically monitored, to correctly schedule hormone treatments. Moreover, sustained administration of gonadotropin-releasing hormone analogs would be preferred to induce final oocyte maturation and ovulation.

## **REFERENCES**

- Bouain A., Y. Siau, 1983 - Observations on the female reproductive cycle and fecundity of three species of groupers (*Epinephelus*) from the Southeast Tunisian seashores. *Mar. Biol.*, **73** (2) : 211-220.
- Bruslé J., 1985 - *Exposé synoptique des données biologiques sur les mérous Epinephelus aeneus (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et Epinephelus guaza (Linnaeus, 1758) de l'océan Atlantique et de la Méditerranée*. FAO, Synopsis sur les pêches, **129**, 64 pp.

- Chauvet C., P. Francour, 1989 - Les mérours *Epinephelus guaza* du Parc National de Port-Cros (France) : Aspects socio-démographiques. *Bull. Soc. zool.*, **114** (4) : 5-13.
- Di Marco P., G. Marino, in press - Effects of capture stress on some blood components in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1843). *Biol. mar. Mediterr.*
- Di Marco P., L. Mechelli, M.G. Finoia, G. Marino, in press - Difficulties and progress in the collection of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) from the wild. In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- FAO Fisheries Department, 1997 - *Aquaculture development*. FAO Tech. Guidel. Respons. Fish., **5**, Rome, 40 pp.
- Mandich A., A. Massari, S. Bottero, H. Goos, G. Marino, 1999 - Sex steroids during gonad maturation and sex change in wild *Epinephelus marginatus*. In : *Symposium international sur les Mérours de Méditerranée*. Proc. of a Symposium, 5-7 nov. 1998, at Ile des Embiez, France, Mém. Inst. Océanogr. P. Ricard, pp : 131-133.
- Marino G., A. Massari, P. Di Marco, E. Azzurro, M.G. Finoia, A. Mandich, 1998 - Reproduction of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe, 1834) in the wild and under controlled conditions. *Biol. mar. Mediterr.*, **5** (3) : 1042-1051.
- Marino G., A. Massari, P. Di Marco, E. Azzurro, M.G. Finoia, A. Mandich, in press - Sex ratio, sexual maturity and sex change in *Epinephelus marginatus*. *Biol. mar. Mediterr.*,
- Massari A., G. Marino, P. Di Marco, E. Azzurro, A. Mandich, in press - Ovarian maturity stages and periodicity of reproduction in the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe 1834). In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Sadovy Y., D.Y. Shapiro, 1987 - Criteria for diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, **1987** (1) : 136-156.
- Zabala M., A. Garcia-Rubies, P. Louisy, E. Sala, 1997a - Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 65-77.
- Zabala, M., P. Louisy, A. Garcia-Rubies, V. Gracia, 1997b - Socio-behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 79-98.
- Zohar Y., 1989 - Fish reproduction : Its physiology and artificial manipulation. In : *Fish culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. M. Shilo, S. Sarig (eds), CRC Press, Florida, pp : 65-119.

## Induced sex change of dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Changement de sexe induit chez le mérou brun, Epinephelus marginatus.*

Giovanna Marino <sup>1</sup>, Giulia Maricchiolo <sup>1</sup>, Ernesto Azzurro <sup>1</sup>,  
Alessandra Massari <sup>2</sup>, Alberta Mandich <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ICRAM, Via di Casalotti 300, 00166-Roma, Italia.

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale ed Applicata, Università di Genova,  
V.le Benedetto XV 5, 16132 Genova, Italia.

**Key words:** *Epinephelus marginatus*, sex change, 17 $\alpha$ -methyltestosterone.

**Mots clés :** *Epinephelus marginatus*, changement de sexe, 17 $\alpha$ -méthyl-testostérone.

**ABSTRACT:** As protogynous hermaphrodite species, *Epinephelus marginatus* matures first as female and changes sex in the later stage of life. The monandric sexual pattern and the difficulties in capturing and managing the large males lead to a shortage of males in captive broodstock. In this study, precocious sex inversion techniques were tested in order to obtain dusky grouper male breeders, for artificial reproduction purposes. Sex inversion was induced in thirty wild juveniles both by oral administration and intramuscular injection of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. Four protocols were tested according to MT administration technique and social composition of the groups. Sex inversion was observed in 50% MT injected fish after 16 weeks of treatment and a mean MT accumulated dose of 30.6 mg/Kg BW. Oral administration of MT feed blocks induced sex inversion in 72% of treated fish, after 14 - 18 weeks; individual feeding method resulted to be the most effective (100%), although very laborious. Conversely, when MT feed-blocks were released in tanks, only 25% of fish sex inverted. In this case, social interactions strongly conditioned MT uptake by subordinate. Semen obtained by artificial sex inverted juveniles was effective in egg fertilisation (62%).

**RESUME :** En tant qu'espèce hermaphrodite protogyne, *Epinephelus marginatus* est femelle au début de sa maturation puis change de sexe à un stade plus tardif. La caractéristique sexuelle monandrique et les difficultés à capturer et gérer les gros mâles ont entraîné une pénurie de mâles dans les stocks de reproducteurs élevés en captivité. Dans le cadre de cette étude, des techniques d'inversion de sexe précoce ont été évaluées pour obtenir des reproducteurs mâles de mérou brun, à des fins de reproduction artificielle. On a déclenché une inversion de sexe chez trente juvéniles sauvages en leur administrant par voie orale ou intramusculaire du méthyl-testostérone 17 $\alpha$  (MT). On a testé quatre protocoles correspondant à la technique d'administration du MT et à la composition sociale des groupes. Les poissons auxquels avaient été injecté du MT ont changé de sexe au bout de seize semaines de traitement, après avoir reçu une dose moyenne cumulée de 30,6 mg/kg PC de MT. L'administration par voie orale a donné un résultat positif chez 13 des 18 poissons traités, au bout de 14 à 18 semaines ; l'alimentation individuelle, par granulés d'aliments contenant du méthyl-testostérone, s'est avérée la méthode d'alimentation la plus efficace (100% de réussite), mais elle a été très laborieuse. En revanche, pour les poissons nourris en réservoir, le taux de réussite de l'inversion a été limité à 25 pour cent. Dans ce cas, les interactions sociales ont fortement conditionné la consommation des blocs d'aliments contenant du MT, par les poissons subalternes. La laitance des poissons soumis à une inversion artificielle a effectivement fécondé les œufs (taux de réussite, 62%).

*Epinephelus marginatus* is a protogynous monandric teleost, incompletely metagonous, in which natural sex change usually occurs in old and big individuals, mainly between 14 - 17 years of age at a mean size of 65 cm standard length (Bruslè, 1985; Chauvet, 1988; Marino et al., in press). In the wild the availability of males is limited and the constitution of sexually balanced broodstock in captivity is still problematic. In several groupers, hormonal sex inversion of juveniles has been used to obtain male breeders

and to overcome semen shortage for artificial reproduction. Sex inversion has been already achieved in *Epinephelus tauvina* (Chao, Lim, 1991), in *Epinephelus fario* (Yeh et al., 1987; Kuo et al., 1988; Chao, Chow, 1990); in *Epinephelus suillus* (Tan Fermin et al., 1994), in *Epinephelus aeneus* (Hassin et al., 1997) and in *Mycteroperca microlepis* (Roberts, Schlieder, 1983) by dietary supplementation, injection and silastic implantation of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT). Preliminary experiences of precocious sex change in dusky

grouper, *E. marginatus*, have been recently reported by Marino *et al.* (1998) and Spedicato *et al.* (in press).

For the purposes of this study, thirty dusky groupers, ranging between 1 and 2.5 Kg body weight (BW), were captured in the wild and acclimated to captivity for 6 - 12 months. Fish were randomly separated into four groups (I - IV) and kept grouped or isolated in 1.2 - 5 m<sup>3</sup> PVC tanks. 17  $\alpha$ -methyltestosterone (MT, Sigma) was suspended in corn oil and given by intramuscular injections at 2 mg/Kg BW dosage to group I. For oral treatments MT was included in feed blocks at 1 mg/Kg BW and individually administered (group II) or released in the tanks (group III and IV).

During the trials, fish belonging to group III were kept together and group IV fish were kept isolated in the same tank. Sperm motility was used as indicator of milt quality.

Sex inversion from immature females to mature males was successfully achieved both by oral administration and injections of 17  $\alpha$ -methyltestosterone. Natural spermiation was observed in 16 out of 25 treated specimens (Tab. I). Expressible milt volume ranged from 10 to 100  $\mu$ L / fish. Sperm density ranged between  $14 \times 10^6$  and  $7.7 \times 10^9$  spermatozoa / mL and the motility of spermatozoa was always higher than 50%. Semen from sex inverted juveniles was effective to fertilise eggs (62%) obtained by GnRHa induced females.

| Group                             | I       | II      | III  | IV      |
|-----------------------------------|---------|---------|------|---------|
| Fish (n)                          | 7       | 4       | 7    | 7       |
| Occurrence of inversion (%)       | 42.8    | 100     | 25.0 | 71.4    |
| Time of inversion (weeks)         | 16 - 17 | 14 - 15 | 15   | 14 - 23 |
| Mean MT dose (mg / Kg)            | 30.6    | 85      | 92.1 | 59.6    |
| Sperm quality (% of motile cells) | >50     | >50     | >80  | >50     |

Tab. I - Summary of methyltestosterone treatments for the induction of precocious sex inversion in *Epinephelus marginatus*. / Résumé des traitements à base de méthyl-testostérone pour l'induction d'une inversion de sexe précoce chez *Epinephelus marginatus*.

Group I: Injection treatment (2 mg / Kg BW). Grouped fish. / Traitement par injection (2 mg / kg PC). Poissons en groupe.

Group II: Oral treatment (1 mg / Kg BW). Feed blocks from the farmer's hand. Grouped fish. / Traitement par voie orale (1 mg / kg PC). Granulés donnés à la main par l'éleveur. Poissons en groupe.

Group III: Oral treatment (1 mg / Kg BW). Feed blocks in tank. Grouped fish. / Traitement par voie orale (1 mg / kg PC). Granulés placés dans le réservoir. Poissons en groupe.

Group IV: Oral treatment (1 mg / Kg BW). Feed blocks in tank. Isolated fish. / Traitement par voie orale (1 mg / kg PC). Granulés placés dans le réservoir. Poissons isolés.

Using oral doses of MT, at 1 mg / Kg BW, sex inversion was completed after at least 15 weeks of treatment. The "individual" treatment turned to be the most effective method of giving hormone (100% of spermiating males). On the contrary, the "feed-blocks administration in tanks" in grouped fish (group III) showed limited results since, at the end of the treatment (18 weeks), 3 out of 4 fish presented gonads with no sign of spermatogenesis. However, the same treatment was effective when fish were kept isolated (71.4%). These differences, between isolated and grouped fish, can be referred to social hierarchies, arisen among the grouped fish and causing lower food uptake and hence MT intake by subordinate specimens.

It can be concluded that, for large-scale male production, MT oral administration methods showed some limits, being the grouped treatment

partially ineffective and the individual one too much laborious and suitable only at experimental level.

Intramuscular injection of MT was effective in inducing sex change in 3 out of 7 treated fish, after 16 weeks of treatment and a mean MT accumulated dose of 30.6 mg / Kg BW. The impaired health status of treated fish, probably due to handling stress for injections, could be considered as the cause of a lower response to hormone. Similar difficulties were also encountered by Tan-Fermin *et al.* (1994) with *E. suillus* juveniles treated by MT injection.

The application of a controlled MT delivery system (prepared by the Centre of Marine Biotechnology, Baltimore) overcame the problem of repeated handling and stress for fish. This method, which allow longer interval between injections by a sustained release of MT, was successfully experimented in 1998 (Marino *et al.*, in prep.).

## REFERENCES

- Bruslé J., 1985 - *Exposé synoptique des données biologiques sur les mérours Epinephelus aeneus (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et Epinephelus guaza (Linnaeus, 1758) de l'océan Atlantique et de la Méditerranée*. FAO, Synopsis sur les pêches, 129, 64 pp.
- Chao T.M., M. Chow, 1990 - Effects of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.) (Singapore J. Primary Ind., **18** : 1-14).
- Chao T.M., L.C. Lim, 1991 - Recent developments in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. *Singapore J. Primary Ind.*, **19** (2) : 78-93.
- Chauvet C., 1988 - Etude de la croissance du mérour *Epinephelus guaza* (Linné, 1758) des côtes tunisiennes. *Aquat. Living Resour.*, **1** (4) : 277-288.
- Hassin S., D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar, D.M. Popper, 1997 - Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus*. 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, **156** : 305-316.
- Kuo C.M., Y.Y. Ting, S.L. Yeh, 1988 - Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, **74** : 113-126.
- Marino G., G. Maricchiolo, A. Massari, A. Mandich, in press - Hormonal induction of precocious sex inversion in dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Roberts D.E.Jr., R.A. Schlieder, 1983 - Induced sex inversion, maturation, spawning and embryogeny of the protogynous grouper *Mycteroperca microlepis*. *J. World Maricult. Soc.*, **14** : 639-649.
- Spedicato M.T., M. Contegiacomo, P. Carbonara, G. Lembo, in press - Induced sex-reversal in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In : *33d International Symposium on new species for Mediterranean aquaculture*. 22-24 April 1998 at Alghero, Italy.
- Tan-Fermin J.D., L.M.B. Garcia, A.R. Castillo Jr., 1994 - Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus*, (Valenciennes) by injections of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Japan. J. Ichthyol.*, **40** (4) : 413-420.
- Yeh S.L., Y.Y. Ting, C.M. Kuo, 1987 - Induction of sex reversal and spawning of grouper *Epinephelus fario*. *Bull. Taiwan Fish. Res. Inst.*, **43** : 143-152.