

# 능성어 *Epinephelus septemfasciatus*의 성 성숙 유도와 초기 발생

지도교수 이 영 돈

송 영 보

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2004년 6월

송영보의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장	노	섬	인
위	원	이	정 의 인
위	원	김	형 배 인
위	원	이	경 준 인
위	원	이	영 돈 인

제주대학교 대학원

2004년 6월

Induction of Sexual Maturation and Early  
Development of The Sevenband Grouper,  
*Epinephelus septemfasciatus*

Young-Bo Song

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL  
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE  
DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

June 2004

박사학위논문

능성어 *Epinephelus septemfasciatus*의  
성 성숙 유도와 초기 발생

제주대학교 대학원

수산생물학과



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

송 영 보

2004년 6월

# 목 차

ABSTRACT .....	i
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 어미사육 및 환경조절 .....	4
1) 어미관리 .....	4
2) 사육시설 .....	4
3) 광주기 및 수온 조절 .....	5
2. 난 성숙 및 배란 유도 .....	8
1) 난모세포 발달단계 .....	8
2) 호르몬 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도 .....	8
3. 기능적 응성화 유도 .....	12
1) 호르몬 처리에 의한 응성화 유도 .....	12
2) 정자형성 및 배정 (spermatin) 유도 .....	13
3) Testosterone과 11-ketotestosterone 변화 .....	17
4. 수정 .....	18
1) 정자 냉동보존 .....	18
(1) 정자 .....	18
(2) 희석액과 동해방지제 .....	20

(3) 냉동보존 평가 .....	20
2) 인공수정 .....	24
(1) 정자의 수정률과 수정란 부화율 .....	24
(2) 해동정자의 수정률과 수정란 부화율 .....	24
5. 수정란 및 자어 발달 .....	25
1) 난 발생 및 부화 .....	25
2) 수온과 염분에 따른 부화율 .....	25
3) 자어의 형태발달과 성장 .....	26
(1) 수온별 난황흡수 및 개구시간 .....	26
(2) 부화자어의 전장과 구경 변화 .....	26
6. 자료 분석 .....	27



III. 결과 .....	30
1. 어미사육 환경조절과 성숙유도 .....	30
2. 난 성숙 및 배란 유도 .....	33
1) 난모세포 발달단계 .....	33
2) 호르몬 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도 .....	35
(1) LHRHa .....	35
(2) hCG .....	35
3. 기능적 응성화 유도 .....	42
1) 성전환과 정자형성 .....	42
2) 배정 유도 .....	47
3) Testosterone과 11-ketotestosterone 변화 .....	49

4. 수정 .....	52
1) 정자 냉동보존 .....	52
(1) 정자의 구조 및 크기 .....	52
(2) 혈장과 희석액의 물리적 특성 .....	52
(3) 냉동정자의 특성 .....	52
2) 인공수정 .....	57
(1) 정자의 수정률과 수정란 부화율 .....	57
(2) 해동정자의 수정률과 수정란 부화율 .....	57
5. 수정란 및 자어 발달 .....	60
1) 난 발생 .....	60
2) 수온과 염분에 따른 부화율 .....	61
3) 자어의 형태발달과 성장 .....	67
(1) 난황흡수 및 개구시간 .....	67
(2) 부화자어의 구경 변화 .....	67
(3) 자어의 형태 발달 .....	70
(4) 자어 성장 .....	70
IV. 고찰 .....	74
V. 요약 .....	90
VI. 참고문헌 .....	92

# ABSTRACT

The larviculture technique need to be developed to recover the stock of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, which has been declined in Jeju Island, Korea, due to overfishing, and to commercial production of the species. This study was investigated to develop the broodstock management, induction of ovulation, sex reversal of female to functional male, cryopreservation of spermatozoa, fertilization, and larval development of the species.

## 1. Broodstock management

Total 21 brood fishes (66.6±4.4 cm TL, 5.30±1.24 kg BW) were reared in semi-closed recirculation system under the control of photoperiod and temperature from December 2001 to May 2002. The condition of photoperiod and temperature at the beginning of the experiment were 9.5 light (L)/13.5 dark (D) and 15.2±0.8°C, respectively. Thereafter, the condition of photoperiod and temperature were gradually increased and reached 14 L/10 D and 21.0±0.5°C, respectively, in March 2002. As the results, the fish were successfully matured between April and May 2002.

## 2. Induction of oocyte maturation and ovulation

The ovary maturity of the broodstocks was checked using a cannulation. For the induction of spawning, fish with oocytes over 400  $\mu\text{m}$  were chosen and injected with human chorionic gonadotropin (hCG, 500 IU/kg BW). Before

the hCG injection, oocyte diameters of the fish ranged from 300 to 500  $\mu\text{m}$  (average  $461.1 \pm 6.6 \mu\text{m}$ ). Oocyte diameters of the fish reached 300~700  $\mu\text{m}$  (average  $509.6 \pm 11.8 \mu\text{m}$ ) at 24 h after the hCG injection, and the rate of oocytes with diameter over 800  $\mu\text{m}$  in the ovaries was 91.3~98.8% at 48 h after the injection. Ovulation was induced from 7 out of 8 fishes injected with the hCG, and the average ovulation rate was 87.5%. The total volume of stripped eggs from the fish was 2,480 mL, and the volume of buoyant eggs was 1,360 mL which resulted in the buoyant rate of 54.9%.

### **3. Induction of sex reversal to functional male**

Sex reversal to a functional male was induced by  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT, 0.5~2.0 mg/kg BW) injection and/or its insertion by using silicon tube. Sperm were obtained from MT treated groups with a dose of 1.0~2.0 mg MT/kg BW at the early growing stage (March), the mature stage (April to May), and the resting stage (September to January) of gonads.

### **4. Sperm cryopreservation and fertilization**

The spermatozoa of *E. septemfasciatus* is divided into head and tail part. The head was spherical shape and the size was 1.3~1.5  $\mu\text{m}$ . After cryopreservation in a diluent of 5% glucose and a cryoprotectant of dimethylsulfoxide (DMSO), lower motility was observed in the thawed sperm compared to the control sperm in fresh semen ( $P < 0.05$ ). However, the fertilization and hatching rates were 94.9~97.6% and 94.2~97.0%, respectively, in the control and GDS (thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as a diluent and DMSO as a cryoprotectant) groups. The fertilization and

hatching rates were not significantly different between the control and the GDS groups ( $P>0.05$ ).

## 5. Larvae development

The fertilized egg of *E. septemfasciatus* was separative-floating spheres, and 790~890  $\mu\text{m}$  (average  $821.8\pm 2.0 \mu\text{m}$ ) in diameter with 170~230  $\mu\text{m}$  oil globules (average  $192.9\pm 0.93 \mu\text{m}$ ). Hatching began approximately 35 h after the fertilization at a water temperature of  $25.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ . The average total length of newly hatched larvae was  $1.75\pm 0.03 \text{ mm}$ . Most of the yolk and oil globules were absorbed within 3 days after hatching (DAH). The larvae reached 2.72 mm in total length (TL), and their mouths and anuses were opened at 3~4 DAH. The mouth diameters of the larvae were 0.209~0.238 mm at 3~4 DAH. The larvae reached 3.24~4.15 mm TL at 11~17 DAH, and began to metamorphose at the time the second dorsal and pelvic spines appeared and elongated. The abdominal cavity was densely lined with melanophores. The larvae reached 5.12 mm TL at 24 DAH.

# I. 서론

능성어 *Epinephelus septemfasciatus*는 농어목 (Perciformes) 능성어과 (Serranidae) 능성어속 (*Epinephelus*)에 속하며, 전 세계적으로 능성어류 (Epinephelinae) 중 해산종은 15속 159종이 보고 되었다 (FAO, 1993). 능성어는 우리나라의 제주도를 포함한 남해안에 분포하고, 국외에는 일본 홋카이도 이남의 일본 해역과 남중국해, 인도양 해역에 분포하고 있다 (Kim et al., 2001). 현재까지 우리나라에 분포하는 능성어류는 능성어를 포함하여, 자바리 *E. bruneus*, 붉바리 *E. akaara*, 홍바리 *E. fasciatus*, 구실우럭 *E. chlorostigma*, 닳줄바리 *E. poecilonotus*, 종대우럭 *E. latifasciatus* 등 11종이 보고 되었다 (Kim et al., 2001).

능성어류는 대부분 아열대와 열대지방의 암초와 산호초가 발달한 지역에 서식하는 육식성 어종으로 우리나라, 일본, 중국, 동남아시아 지역에서 식용어로 기호도가 높다. 능성어는 제주도에서 자바리와 함께 지역 특산품으로 알려져 있으나, 최근 급격한 자원 감소로 자원회복 방안이 필요한 시점이다. 우리나라 해산어류 양식산업의 경쟁력 향상을 위해 넙치 *Paralichthys olivaceus*와 조피볼락 *Sebastes schlegeli*과 함께 능성어와 같은 지역 특산종의 종묘생산 기술개발로 양식품종 다양화가 요구된다.

능성어류의 자연산란 특성은 산란시기에 달주기 (lunar cycle)에 따라 산란리듬을 가지는 *E. polyphekadion* (Rasem et al., 1997), *E. merra* (Lee et al., 2002)와 연중 산란하는 *E. suillus* (Toledo et al., 1993), 그리고 일정기간 동안 산란하는 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), 붉바리 (Kim and Park, 1993; Okumura et al., 2002)와 같이 서식장소와 종에 따라 다양하다.

수정란 생산을 위한 능성어류 어미관리는 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), *E. suillus* (Toledo et al., 1993), 붉바리 (Okumura et al., 2002) 등에서 가두리와 실내수조 사육방법으로 수행하였다. 실내사육에서 *E. tauwina* (Hussain and Higuchi, 1980), *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), *E. aeneus* (Hassin et al., 1997) 등의 자연산란된 알은 난질의 불균형으로 수정률과 부화율은 매우 낮았다.

육상수조 사육에서 균일한 난질 확보를 위해 능성어 (Kitajima et al., 1991), *E. microdon* (Tamaru et al., 1996), *E. aeneus* (Hassin et al., 1997), *E. marginatus* (Marino et al., 2003) 등에 각각 뇌하수체 (pituitary homogenate), gonadotropin (GTH), human chorionic gonadotropin (hCG), luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa)/gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) 등을 사용하여 인공배란을 유도하였다.



능성어류의 성 특성은 암컷에서 수컷으로 성전환이 일어나는 자성선속형 자웅동체어 (protogynous hermaphrodite)이다. 능성어류 성전환이 일어나는 시기는 *E. tauwina* (Chao and Lim, 1991)와 *E. marginatus* (Glamuzina et al., 2000)는 각각 생후 7년과 14년에 일어나고, *E. mario* (Randall and Heemstra, 1991)는 체중 11 kg, 능성어 (Tsuchihashi et al., 2003)는 체중 6 kg부터로 종에 따라 차이가 있다. 능성어류 수컷 확보를 위해 *E. tauwina* (Chao and Chow, 1990), 붉바리 (Hwang et al., 1998), *E. fario* (Kuo et al., 1988), *E. coioides* (Yeh et al., 2003)는 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT)와 옹성호르몬 합성제 등을 사용하여 성전환을 유도하였다.

어류의 방란·방정시기 및 성비의 불균형으로 자연조건에서 채란 및 정자 확보가 어려워 그 대책으로 담수어류인 *Sarotherodon mossambicus* (Harvery, 1983), 잉어 *Cyprinus carpio* (Kurokura et al., 1984), 무지개송

어 *Salmo gairdneri* (Stoss and Holtz, 1983; Baynes and Scott, 1987)에서 정자 냉동보존을 수행하였고, 해산어류로서 *E. tauvina* (Chao et al., 1992), 자주복 *Takifugu rubripes* (Chang et al., 1998), 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli* (Lim et al., 1997), 넙치 (Zhang et al., 2003) 등에서 정자 냉동보존을 수행하였다.

능성어류 중 *E. suillus* (Duray, 1994; (Duray et al., 1997), 붉바리 (Kayano, 1996), *E. tauvina* (Chen et al., 1997), *E. aeneus* (Hassin et al., 1997), *Cromileptes altivelis* (Sugama and Ikenoue, 1999) 등에서 종묘생산을 위한 먹이계열 및 자어 행동과 성장에 관한 연구들이 수행되었으나, 현재까지도 능성어류의 대량종묘생산은 어려운 실정이다. 국내의 능성어류 양식은 일부 남해안에서 자연산 치어를 채포하여 사육하고 있으며, 능성어류의 번식생물학적 연구는 실내 사육수조에서 붉바리 자연산란 (Kim and Park, 1993; Kim and Kim, 1993), hCG를 사용한 능성어 배란 유도 (Kim et al., 1997), 붉바리 생식주기와 성전환 유도 (Hwang et al., 1998) 등이 연구가 수행되었으나 상업적 대량종묘 생산은 어려운 실정이다.

이 연구는 능성어 종묘생산 기술개발을 위하여 사육 환경 조절을 통한 어미의 성 성숙 유도를 수행하였고, 난모세포 성숙과 배란 유도를 위한 호르몬 처리시기와 적정농도를 파악하였으며, 안정적 정자 확보를 위한 성전환 유도와 정자 냉동보존 방법을 조사하였다. 이들 결과를 바탕으로 수정란 발생과 자어 형태 발달에 관한 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 어미사육 및 환경조절

#### 1) 어미관리

실험어는 1992년 10월 제주 연안에서 채집하여 한라수산 (제주도 북제주군 조천읍 소재)에서 사육한 능성어 어미 총 51마리 (Table 1)를 이용하였다. 광과 수온 조절로 성 성숙 유도를 위해 제주대학교 해양과환경연구소에서 21마리 (평균전장  $66.6 \pm 4.4$  cm, 평균체중  $5.30 \pm 1.24$  kg)를 사육밀도  $1.38 \sim 1.67$  kg/m<sup>2</sup>로 사육 관리하였고, 30마리 (평균전장  $70.7 \pm 1.6$  cm, 평균체중  $6.12 \pm 0.38$  kg)는 자연조건에서 성 성숙 유도를 위해 한라수산에서 사육 하였다.

먹이는 주로 냉동된 고등어 *Scomber japonicus*와 전갱이 *Trachurus japonicus*를 단독 또는 배합사료와 생사료를 사용하여 자체 제조한 moist 펠렛 (moist pellet)을 1회/1일, 어체중의 1~2%를 공급하였다.

#### 2) 사육시설

광과 수온 조절 실험구는 사각콘크리트 수조 (5×5×2 m, 유효수량 40 ton) 4개를 이용하여 반순환 여과시스템 (Fig. 1)으로 사육하였다. 자연수 환수율은 2주간 순치기간 동안 1일 12회전하였고 그 후부터 사육조절 수온을 유지 하기위해 자연수 환수율을 1일 2회전하였다. 사육수 회전율은 일일 20회전 내외로 하였다.

자연조건인 대조구 실험어 실내 사육은 사각콘크리트 수조 (6×6×1.5 m, 유효수량 45 ton) 2개를 이용하였고, 지하해수와 자연수를 혼합하여 환수율을 1일 15회전하였다.

### 3) 광주기 및 수온 조절

제주도 연안에 서식하는 능성어 산란 시기 (Song et al., 2001)인 7~8월을 기준으로 광주기와 수온 조절표를 만들어 사육 관리하였다. 사육수조의 광주기를 인위적으로 조절하기 위해 수조 윗부분을 차광막과 검정 비닐로 덮어서 외부의 빛을 차광하였고, 수조위에 100 W 백열등을 설치하여 명조건시 수면조도가 500~750 lx를 유지하도록 24시간 연속 타이머를 이용하여 광주기를 조절하였다. 수온 조절은 보일러 및 열 교환기를 이용하여 사육 수온 변화가 1.0℃ 내외가 되도록 조절하였고, 실험기간은 2001년 12월부터 2002년 5월까지 이었다.



Table 1. Total length and body weight of *E. septemfasciatus*

MERI <sup>1)</sup> (n=21)		Halla Aquafarm (n=30)	
Total length (cm)	Body weight (kg)	Total length (cm)	Body weight (kg)
69.3	4.15	72.0	6.38
65.8	4.53	68.0	5.40
62.3	5.09	84.0	9.66
62.3	3.39	70.0	5.92
69.7	5.51	73.0	5.60
71.2	6.21	78.0	8.84
65.7	5.71	75.0	6.00
63.4	5.07	70.0	5.14
74.2	6.43	76.0	6.50
69.3	5.61	71.0	4.86
69.5	5.07	73.0	5.78
64.0	5.29	79.0	8.50
65.6	4.73	88.0	11.22
59.6	2.95	76.0	7.16
74.2	7.29	72.0	6.10
63.8	5.53	80.0	8.46
69.8	7.35	82.0	8.82
65.8	5.41	58.0	3.30
70.3	6.73	67.0	5.52
59.8	4.61	58.0	3.38
63.2	4.71	61.0	3.66
		62.0	3.86
		58.0	3.74
		60.0	4.08
		59.0	3.96
		61.0	3.66
		75.0	6.80
		82.0	8.32
		71.0	6.98
		63.0	6.12

<sup>1)</sup>MERI: Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University.

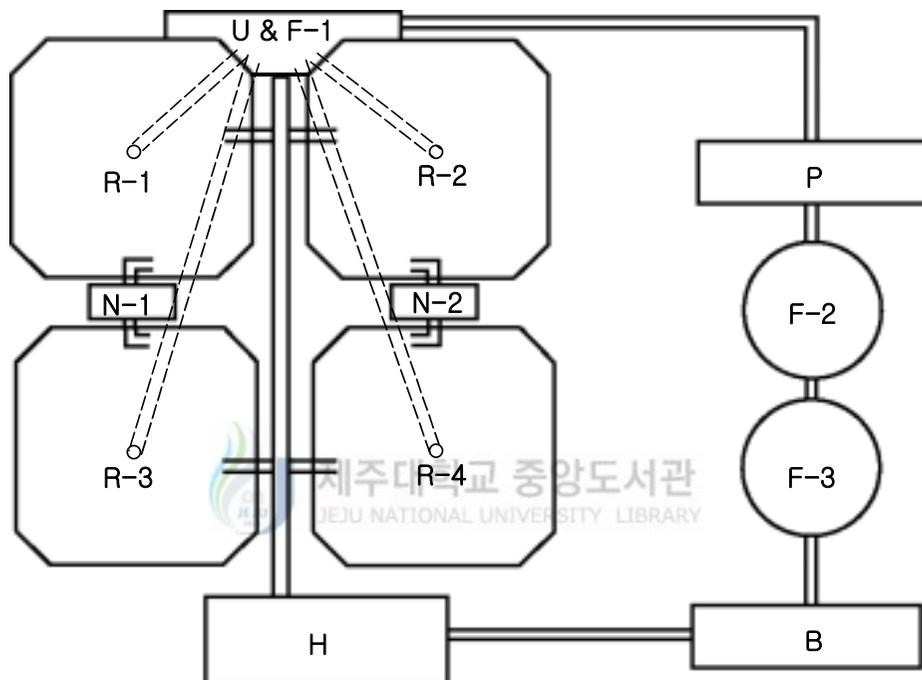


Fig. 1. Schematic diagram of semi-closed recirculation system for photoperiod and water temperature control. B, boiler; F, bio-chemical filter chambers; H, heat exchanger; P, pump; R, rearing tanks; N, physical filter chamber; U, ultraviolet lamp.

## 2. 난 성숙 및 배란 유도

성 성숙과 배란 유도를 하기 위해 광주기와 수온 조절한 실험어와 자연조건에서 사육한 실험어를 대상으로 난모세포의 성숙도를 조사하였다. 성숙유도가 가능한 암컷을 대상으로 생식소자극호르몬-방출호르몬 (LHRHa: desGly<sup>10</sup> [D-Ala<sup>6</sup>] - luteinizing hormone releasing hormone ethylamide, Sigma Co., USA)과 태반성 성선자극호르몬 (hCG: human chorionic gonadotropin, Sigma Co., USA)을 사용하여 난 성숙 및 배란 유도를 하였다.

### 1) 난모세포 발달단계

암컷의 난모세포 발달정도는 생식소내 난모세포를 추출하여 조사하였다. 실험어는 200~300 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 외부 생식공의 발달정도에 따라 실험어를 선택하여 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 하였다. 난 성숙과 배란 유도를 하기 위해 400  $\mu$ m 이상 난모세포를 가진 어미를 선별 후 격리 수용하거나 portable reader (Trovan Ltd.)로 표지 후 수조에 수용하였다. 조사 후 실험어는 질병 감염 예방을 위해 150 ppm의 oxytetracycline-HCl로 1시간 약욕 하였다 (Fig. 2).

### 2) 호르몬 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도

LHRHa는 Shein (2000)의 방법에 따라 에틸알코올에 녹인 LHRHa 용해액과 cocoa butter (EA, Japan)를 1:9 비율로 혼합 후 50  $\mu$ g LHRHa/kg BW

농도로 1회 근육주사 하였다. LHRHa 처리는 2002년 5월과 2003년 7월에 평균전장 73.5±3.8 cm, 평균체중 6.51±1.19 kg인 어미 5마리를 대상으로 하였다 (Table 2).

hCG는 Kim et al. (1997)의 방법에 따라 생리식염수에 용해 후 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. hCG처리는 2003년 7월 7일부터 7월 31일까지 평균전장 74.3±4.1 cm, 평균체중 7.32±1.21 kg인 어미 8마리를 대상으로 하였다 (Table 2). 호르몬 주사 후 24시간 간격으로 5일간 난경변화 및 배란 유무를 관찰하였다.





Fig. 2. Examination steps for sexual development of *E. septemfasciatus* by cannulation method. A, experimental fish in tank; B, weight measurement; C, anesthetization in 200~300 ppm 2-phenoxyethanol; D, cannulation; E, tagging with microchip; F, treatment with 150 ppm oxytetracycline-HCl.

Table 2. Hormone treatments to induce ovulation of *E. septemfasciatus*

Treatment	Total length (cm)	Body weight (kg)	Experimental period
	71.0	5.72	
LHRHa:	70.0	5.78	Apr. 21~May 12 2002
50 $\mu$ g/kg BW	66.0	4.50	
	72.5	5.36	
LHRHa:	88.0	11.18	
50 $\mu$ g/kg BW	69.0	6.28	
	89.0	11.98	
	84.0	10.74	
hCG:	88.0	11.18	Jul. 5~31 2003
500 IU/kg BW	73.0	5.60	
	71.0	5.34	
	60.0	3.65	
	60.0	3.78	



### 3. 기능적 응성화 유도

#### 1) 호르몬 처리에 의한 응성화 유도

안정적인 정자 확보를 위하여 제주도 연안에서 채집된 미성숙한 능성어를 대상으로 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT, Sigma Co., USA)을 사용하여 기능적 응성화를 유도하였다.

기능적 응성화 유도 실험은 2001년부터 2003년까지 5회 실시하였다. 실험어는 전장 28.2~65.0 cm, 체중 0.58~3.92 kg이었고, MT 처리 농도는 Chao and Lim (1991)의 방법에 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg BW로 하였다. MT 처리는 근육주사와 복강내 implantation 방법을 이용했으며, 성전환 및 배정 유무를 조사하였다.

근육주사 방법은 MT를 에틸알코올 (95%)에 용해시켜 cocoa butter와 1:9비율로 혼합 후 어체의 등 근육 제1극조 아래 부분에 주사하였다. 대조구 실험어는 cocoa butter만을 주사하였다. MT 처리는 2001년 9월에 주 1회씩 5주간 5회 주사한 다음 5주 후 (Table 3), 2002년 3월과 2003년 1월, 4월, 5월의 실험에서는 주 1회씩 4주간 4회 주사한 다음 4주 후 (Table 4, 5)부터 생식소의 조직 관찰 및 배정 유무를 조사하였다.

Implantation은 silastic capsule을 제작하여 복강내 삽입하였다. Silastic capsule 제조는 MT를 에틸알코올 (95%)에 용해시킨 cocoa butter와 2:8 비율로 혼합 후 실리콘튜브에 삽입하여 양쪽 끝을 봉입하였다. 제작한 silastic capsule를 어체 가슴지느러미 밑 부분을 절개 후 삽입하고, 접착제를 이용하여 절개부위를 봉하였다. MT 처리 농도는 1 kg당 2.0 mg로 1회 처리하였으며, MT 처리 8주 후부터 배정 유무를 매주 조사하였다 (Table 5).

## 2) 정자형성 및 배정 (spermatin) 유도

MT 처리 전과 처리 후 성전환과 생식소 발달단계를 탐색하기 위해 실험 시작과 종료 때 체중과 생식소 중량을 조사하였고, 생식소중량지수 (gonadosomatic index, GSI)는 ‘생식소 중량×100/어체중’으로 계산하였다.

생식소는 Bouin's solution에 고정하였고, paraffin 절편법에 의해 조직표본을 제작하였다. 그리고 Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색 하여 MT 처리에 따른 생식소의 변화를 조직학적으로 조사하였다.

기능적 응성화 유도를 파악하기 위하여 MT처리 8주 후부터 실험어를 200~300 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 복부 압박법으로 배정 유무를 확인하였다.



Table 3.  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments for sex reversal of immature *E. septemfasciatus* conducted from September to November 2001

Treatment	Total length (cm)	Body weight (kg)
Control <sup>1)</sup>	34.7	0.74
	28.2	0.58
0.5 mg MT/kg BW	37.0	0.82
	30.0	0.64
1.0 mg MT/kg BW	41.0	1.17
	32.8	0.59
2.0 mg MT/kg BW	38.7	1.01
	35.3	0.61

<sup>1)</sup>Treated with cocoa butter only.

Table 4.  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments for sex reversal of immature *E. septemfasciatus* conducted from March to May 2002

Treatment	Total length (cm)	Body weight (kg)
Control <sup>1)</sup>	39.5	0.93
	40.0	1.32
	47.0	1.80
0.5 mg MT/kg BW	33.0	0.72
	40.5	1.29
	44.2	1.72
1.0 mg MT/kg BW	42.0	1.34
	30.7	0.93
	43.5	1.72
	43.5	1.77
2.0 mg MT/kg BW	43.0	1.40
	41.3	1.30
	44.8	1.76

<sup>1)</sup>Treated with cocoa butter only.

Table 5.  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments for sex reversal of immature *E. septemfasciatus* conducted in 2003

Treatment	Methods	Total length (cm)	Body weight (kg)	Experimental period
1.0 mg MT/kg BW	Injection	53.0	2.35	Jan. 9~ Feb. 28
		48.0	1.90	
		49.0	1.89	
		52.0	2.35	
		55.0	2.39	
		51.0	2.54	
		48.0	1.84	
2.0 mg MT/kg BW	Implantation	44.5	1.28	Jan. 9~ Mar. 14
		45.0	1.38	
		51.0	1.97	
		53.0	2.31	
2.0 mg MT/kg BW	Injection	45.0	1.60	Apr. 5~ May 31
		57.0	2.70	
1.0 mg MT/kg BW	Injection	46.0	1.62	
		63.0	3.22	
2.0 mg MT/kg BW	Injection	38.5	0.96	May 2~ Jul. 18
		65.0	3.92	
		56.0	2.80	
		52.5	2.20	

### 3) Testosterone과 11-ketotestosterone 변화

기능적 음성화 유도과정 중 Testosterone (T)과 11-ketotestosterone (11-KT)의 농도 변화는 2002년 3월부터 5월까지 MT처리를 실시한 실험어를 대상으로 조사하였다. 혈액 샘플은 각 실험어를 격리 수용한 다음 2주 간격으로 실험어의 미부동맥에서 주사기를 이용하여 5 mL 채취하였으며, 채취된 혈액은 원심분리 (5,000×G, 10분) 후 혈장을 -70℃의 냉동고에 분석시 까지 냉동보관 하였다.

T와 11-KT의 추출을 위하여 각 분석대상 호르몬 당 혈장 250  $\mu$ L를 채취한 다음, 2 mL의 deathlyether를 첨가하여 혼합한 후 5~10분간 정체시킨 뒤 -70℃의 냉동고에서 15분간 결빙시켰다. 이후 상층의 유기 용매층 (free steroid)만을 시험관에 옮겨 원심 농축기로 완전 건조시켰으며, 앞의 추출과정을 2회 반복 실시하였다. 완전 건조된 스테로이드 추출물은 1 mL의 0.1% gel-PBS (pH 7.5)에 다시 용해 한 후, Aida et al. (1984)의 방법에 따라 방사면역측정법 (RIA, radioimmunoassay)으로 분석하였다.

방사면역측정은 0.0075~3.84 ng/mL까지 10단계로 만들어진 표준과 시료를 각각 200  $\mu$ L에  $^3$ H로 방사 표지된 스테로이드 (Amersham)를 100  $\mu$ L (약 12,000 cpm)씩 첨가 후 희석 항체를 200  $\mu$ L씩 넣고 교반시켜 4℃에서 12시간동안 반응시켰다. 항원 항체의 결합형과 유리형을 분리하기 위하여 DCC (dextran coated charcoal)를 250  $\mu$ L씩 첨가하여 4℃에서 15분간 방치한 후 원심분리 (4℃, 2,000×G, 15분) 한 뒤, 결합형 상등액을 취하여 여기에 3 mL의 scintillation cocktail (optiphase, WALLAC)를 넣고 액체섬광계측기로 측정하였다.

## 4. 수정

### 1) 정자 냉동보존

응성화로 유도된 능성어 (평균전장  $47.8 \pm 2.1$  cm, 평균체중  $2.10 \pm 0.20$  kg) 4마리 (Table 6)에서 정자를 채취하여 냉동보존 실험을 실시하였다. 실험은 정자의 형태적 특징 그리고 희석액과 동해방지제 종류에 따른 냉동정자의 해동 후 운동성을 조사하였다.

#### (1) 정자

정자 채취는 실험어의 생식소를 적출한 후 절편을 제작하였다. 절편된 정소에 희석액을 첨가 후 고무볼로 압박해서 정자를 채취하고 희석액을 첨가하면서 상층액을 수거하였다. 수거된 용액을 원심분리 ( $3,000 \times G$ , 5분) 하고 나서 상층액을 제거한 후 다시 희석액 (5 mL) 첨가하고 원심분리 ( $3,000 \times G$ , 30초)를 실시하였다. 이후 상층액만 채취하여 재차 원심분리 ( $3,000 \times G$ , 5분) 후 최하층에 sperm pellet을 채취하여 실험에 사용하였다.

정자의 형태적 특징 조사하기 위해 정자를 2.5% glutaraldehyde 용액에 90분 동안 전고정을 하였다. 전고정 후 2% osmium tetroxide 용액에 1시간 동안 후고정을 하였다. 그리고 저농도 에틸알코올 (50%)로부터 에틸알코올 계열하에서 탈수하고, isoamilacetate를 사용하여 치환시켰다. 형태적 특징은 주사전자현미경 (scanning electron microscope)을 이용하여 조사하였다.

능성어 정액의 삼투압 농도와 pH 측정은 정액량의 부족으로 정장을 이용한 조사는 불가능하였다. 따라서 MAF (1997)방법에 따라 혈장을 사용하여 측정하였다. 혈장의 삼투압 농도와 pH는 각각 삼투압 측정기 (The Advanced™ Osmometer)와 pH 측정기 (Mettler Toledo)를 이용하여 조사하였다.

Table 6. Measurements of functional male of *E. septemfasciatus* for cryopreservation test

Total length (cm)	Body weight (kg)	Gonad weight (g)
45.0	1.70	5.50
48.0	2.00	3.60
48.0	2.10	3.70
50.0	2.50	3.90

## (2) 희석액과 동해방지제

정자 냉동보존에 적합한 희석액 (diluent)과 동해방지제 (cryoprotectant)를 탐색하기 위하여 4가지 희석액과 2가지 동해방지제를 사용하였다. 희석액은 5% glucose 와 marine fish ringer solution (MFRS), Ham's F-10, 참돔용 링거액 (*Pagrus major* ringer solution, PMRS)을 사용하였다 (Table 7). 희석액의 삼투압 농도와 pH는 각각 삼투압 측정기 (The Advanced™ Osmometer)와 pH 측정기 (Mettler Toledo)를 이용하여 조사하였다.

정자 냉동보존에 사용한 동해방지제는 dimethylsulfoxide (DMSO)와 Test Yolk Buffer (TYB, Irvine Scientific)를 사용하였다.

## (3) 냉동보존 평가

정자 냉동보존 과정에서 동해피해 방지를 위한 각각의 희석액과 동해방지제 종류의 혼합비율은 Chang et al. (1999a)와 Trounson and Gardner (2000) 등의 방법을 응용하여 설정하였다 (Table 8). 모든 실험구의 평형시간은 1분 이내로 하였고 정자 냉동에는 0.5 mL 용량의 정자보존용 straw를 이용하였다. 각 실험에서 정자가 주입된 0.5 mL 정자보존용 straw를 액체질소 증기 (-76℃)로 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소 (-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다. 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 7일간 저장한 후  $30.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 항온수조를 이용하여 10초 이내에 해동시켰다.

냉동보존된 정자의 운동성 평가는 각 실험구별 정자를 해동 후 자연해수와 1:9의 비율로 희석한 후 Makler counting chamber (Sefi-Medical In.)를 이용하여 광학현미경과 모니터 하에서 해동 후 시간경과에 따른 정자 운동성을 조사하였다. 정자의 운동성 파악은 Strussmann et al. (1994)의 정자 활성 지수 (sperm activity index) 측정 방법을 변형하여 1단계의 정자 수만을 3~5회 측정하여 평균을 구하였다 (Table 9).

Table 7. Constituents of the diluents used for sperm cryopreservation of *E. septemfasciatus*

Diluents	Constituent
5% glucose	Glucose, 5g/100 mL DW <sup>1)</sup>
MFRS <sup>2)</sup> (g/L DW)	CaCl <sub>2</sub> , 0.346; KCl, 0.597; MgCl <sub>2</sub> , 0.017; NaCl, 13.5; NaHCO <sub>3</sub> , 0.025
Ham's F-10 <sup>3)</sup> (mM/L DW)	NaCl, 126.60; KCl, 3.82; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.62; NaHPO <sub>4</sub> , 1.31; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.61; NaHPO <sub>4</sub> , 14.28; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.30; Phenol Red, 0.03; Arginine, 0.11; Aspartic acid, 0.10; Glycine, 0.14; Isoleucine, 0.02; Leucine, 0.10; Lysine, 0.20; Methionine, 0.03; Phenylalanine, 0.03; Proline, 0.10; Serine, 0.10; Threonine, 0.03; Tyrosine, 0.12; Valine, 0.03; Sodium Pyruvate, 1.00; Calcium Lactate, 1.00; Glucose, 6.11; Arginine, 1.21; Glutamine, 1.0; Thymidine 3.00
PMRS <sup>4)</sup> (g/L DW)	NaCl, 10; KCl, 0.22; CaCl <sub>2</sub> , 0.25; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.74; HEPES, 1.19; streptomycin, 0.1; glucose, 0.9; penicillin G 10 IU

<sup>1)</sup>DW, distilled water; <sup>2)</sup>MFRS (marine fish ringer solution), Chang et al., 1999; Ham's F-10<sup>3)</sup>, Trounson and Gardner, 2000; <sup>4)</sup>PMRS, *Pagrus major* ringer solution.

Table 8. Diluents and cryoprotectants tested for sperm cryopreservation of *E. septemfasciatus*

Treatment group	Composition			Mixture rate (each volume)
	Diluents	Cryoprotectant	Sperm	
GTS	5% glucose	TYB <sup>1)</sup>	sperm pellet	0.25:0.5:0.25
MTS	MFRS <sup>2)</sup>	TYB	sperm pellet	0.25:0.5:0.25
HTS	Ham's-F10 <sup>3)</sup>	TYB	sperm pellet	0.25:0.5:0.25
GDS	5% glucose	DMSO <sup>4)</sup>	sperm pellet	0.60:0.05:0.35
MDS	MFRS	DMSO	sperm pellet	0.60:0.05:0.35
HDS	Ham's-F10	DMSO	sperm pellet	0.60:0.05:0.35
PDS	PMRS <sup>4)</sup>	DMSO	sperm pellet	0.75:0.05:0.20

<sup>1)</sup>TYB (test yolk buffer), Trounson and Gardner, 2000; <sup>2)</sup>MFRS (marine fish ringer solution), Chang et al., 1999;

<sup>3)</sup>Ham's-F10, Trounson and Gardner, 2000; <sup>4)</sup>DMSO (dimethylsulfoxide), MAF, 1997; <sup>5)</sup>PMRS (*Pagrus major* ringer solution).

Table 9. Numerical criteria used for the evaluation of sperm motility in the cryopreservation experiment

Criterion	Sperm motility
I	Forward movement rapidly
II	Forward movement slowly
III	Vibrating movement moderately
IV	Immobile sperm

## 2) 인공수정

인공수정은 건식법 (알  $1 \times 10^6$ 개 : 정자 0.1 mL)으로 하였으며, 각각 수정률과 부화율을 조사하였다.

### (1) 정자의 수정률과 수정란 부화율

용성화로 유도된 능성어에서 채취한 신선한 정자와 hCG 처리로 인공 채란된 알을 이용하여 수정시켰을 때 수정률과 부화율을 각각 5회와 3회 조사하였다. 수정률은 각각의 실험구에서 인공수정 후 수정란이 상실기 단계에 도달했을 때를 기준으로 하였고, 부화율은 부화 후 1일째를 기준으로 조사하였다.

### (2) 해동정자의 수정률과 수정란 부화율

냉동보존된 정자의 해동 후 인공수정에 따른 수정률과 부화율 조사는 GDS와 PDS 실험구의 해동정자와 어체에서 채취한 신선한 정자를 사용하였다. 인공수정은 2003년 7월 21일 채란된 알을 이용하였고, 각각의 실험구 수정률과 부화율은 3반복 실험하였다.

## 5. 수정란 및 자어 발달

### 1) 난 발생 및 부화

성숙된 능성어 암컷을 이용하여 인공 채란된 알과 기능적 수컷에서 얻은 정자를 이용하여 건식법으로 수정 후 수정란의 난경 및 유구경 그리고 시간경과에 따른 발생 과정을 조사하였다. 실험은 항온실 ( $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ )에서 실시하였으며, 광학현미경 (Zeiss, Germany)과 profile projector (Mitutoyco Co., Japan)를 이용하여 관찰하였다. 수정 후 발생 속도는 8 세포기, 16 세포기, 상실기, 포배기, 낭배기, Kuffer's vesicle 출현 및 배체형성, 부화까지 각 발생단계가 50% 이루어졌을 때를 기준으로 하였다. 수정란은 1,000 mL 비이커에 수용하여 3반복 실험하였다.



### 2) 수온과 염분에 따른 부화율

수온별 난 발생 속도를 구하기 위하여 실험구는  $22^{\circ}\text{C}$ 와  $25^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다. 수정란은 각 실험구당 250 mL 비이커에 100개의 수정란을 수용하여 관찰하였다. 수온에 따른 발생 속도는 상실기, 포배기, 낭배기 및 배체형성, 부화까지 발생단계별 소요시간을 조사하였다. 부화율은 부화 후 1일째를 기준으로 각 실험구의 부화자어와 사란을 전부 계수하였다.

염분에 따른 수정란의 발생 특성을 파악하기 위하여 34‰와 26‰, 18‰ 해수를 제조하여 부화율에 미치는 영향을 조사하였다. 수정란은 각 실험구 별로 100 mL 비이커에 50개의 수정란을 수용하여 3반복 실험하였다.

### 3) 자어의 형태발달과 성장

#### (1) 수온별 난황흡수 및 개구시간

자어의 난황 흡수율 및 개구시간 조사는 수온 22℃와 25℃ 실험구로 설정하였다. 난황흡수율과 유구흡수율은 20 L 아크릴 수조에 2,000~3,000개의 수정란을 수용한 후 부화된 자어를 대상으로 조사하였다. 난황 및 유구 측정 방법은 사육중인 자어를 대상으로 24시간 간격으로 5~10마리씩을 표본 추출하여 MS 222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma Co., USA)로 마취시킨 다음 profile projector를 이용하여 1  $\mu\text{m}$ 까지 측정하였다 (Fig. 3). 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{난황용적} = \pi/6 \times I h^2 \quad (I: \text{난황장경}, h: \text{난황단경})$$

$$\text{유구용적} = \pi/6 \times d^3 \quad (d: \text{유구경})$$

자어의 개구시간은 난황 흡수율과 동일한 방법으로 조사하였고, 개구시간 판정은 자어 중 약 80% 이상이 개구된 시점을 기준으로 하였다.

#### (2) 부화자어의 전장과 구경 변화

사육경과 시간에 따른 자어의 전장과 구경 변화를 조사하기 위하여 20 L 아크릴 수조와 실내 콘크리트 수조 (7.0×7.0×1.0 m, 유효수량 35 ton)에서 부화된 자어를 정기적으로 채집하여 측정한 후 분석하였다.

실험기간동안 자어 먹이는 부화 후 3일째부터 로티퍼 *Brachionus rotundiformis* (크기: 110~210  $\mu\text{m}$ )를 사육수 mL당 15개체의 밀도로 공급하고, *Nannochloropsis oculata*와 *Isochrysis galbana*를 각각 50만 cell/mL 내외의 밀도로 공급하였다. 부화 후 15일째부터 초기 인공사료 (크기: 150  $\mu\text{m}$ , INVE, USA)와 부화 후 16일째부터 *Artemia* (2~3 개체/mL 사육수)를 로티퍼와 함께 공급하였으며 이후 자어가 성장함에 따라 점차 인공사료의 크기를 증가시켰다 (Fig. 4).

부화자어가 수표면의 표면장력에 의한 사망을 방지하기 위해 수표면에 피드오일 (Feed oil)로 유막을 만들었다. 사육수 환수는 부화 직후부터 3일까지는 지수 상태를 유지하였고, 그 후 매일 사육수의 약 10~30%를 부분 환수하였다 (Fig. 4).

구경 (d)은 자어의 상악장 크기 (upper jaw length, UJL)를 기준으로 설정한 Shirota (1970)의 방법에 따라  $d = \sqrt{2} \times \text{UJL}$  식으로 구하였다. 자어의 전장 및 상악장, 항문장 크기는 부화 후 7일까지는 24시간 간격으로, 이후 자어가 성장함에 따라 2~5일 간격으로 5~10마리 내외의 자어를 채집하여 MS 222에 마취시킨 후, profile projector를 이용하여 1  $\mu\text{m}$ 까지 측정하였다.

## 6. 자료 분석



모든 결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 SAS 통계프로그램으로 검정하였다.

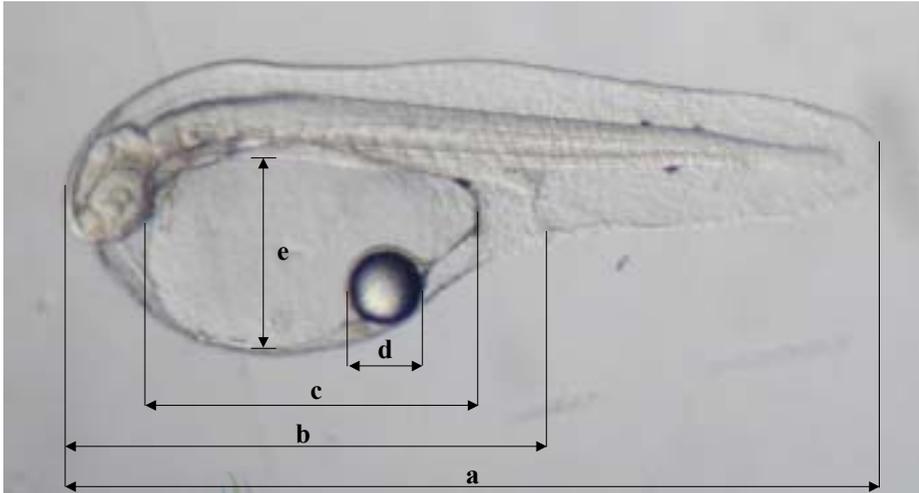


Fig. 3. Measurement of *E. septemfasciatus* larvae. a, total length; b, anal length; c, major axis of yolk; d, diameter of oil globule; e, minor axis of yolk.

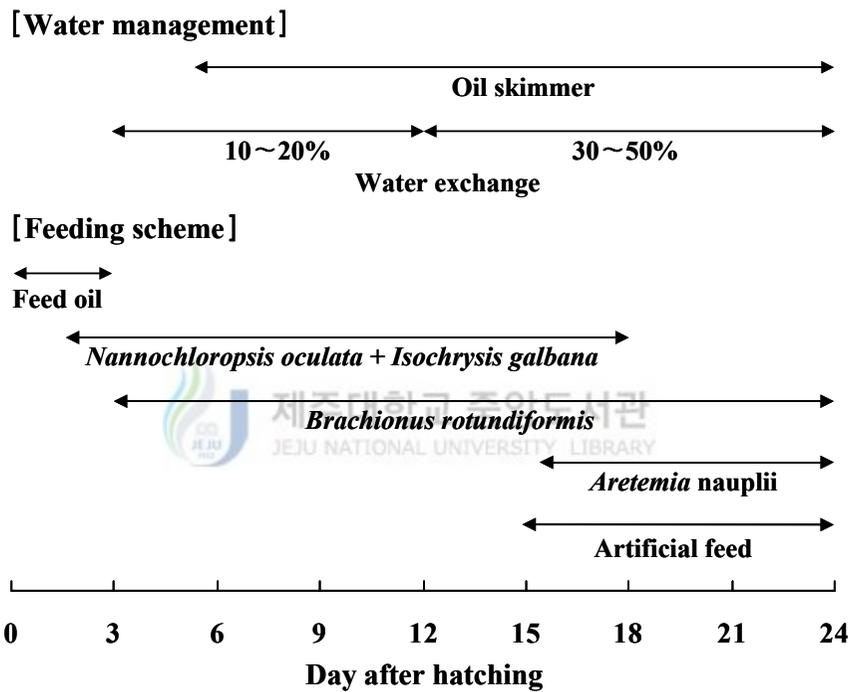


Fig. 4. Rearing scheme during the larval rearing of *E. septemfasciatus*.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 어미사육 환경조절과 성숙유도

대조구 (자연조건)의 광주기는 실험시작 시기인 2001년 12월 9.8L:14.2D에서 2002년 1월부터 점차 명기가 증가하여 5월에는 14.0L:10.0D가 되었다. 수온은 2001년 12월에  $15.2\pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 에서 2002년 2월에는  $12.8\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 로 낮아진 후 5월  $16.3\pm 0.6^{\circ}\text{C}$  증가하였다 (Fig. 5).

광주기를 생식주기에 맞추어 인위 조절한 실험구는 실험시작 할 때 휴지기 조건인 9.5L:13.5D에서 매주 15~30분씩 명기를 증가시켜 3월에 성숙 및 산란조건인 14.0L:10.0D로 조절하였다. 수온 조절은 실험 시작 후 7일간격으로  $0.5\sim 1.0^{\circ}\text{C}$  상승시켜 3월부터 산란시기 수온인  $21.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 조절하였다. 조절실험구에서 사육한 어미에서 4월 중순이후 복부가 팽창하고 생식공이 돌출하여 성숙징후를 보이는 개체 (Fig. 6)를 관찰할 수 있었으나, 대조구에서 성숙징후를 보이는 개체는 관찰되지 않았다.

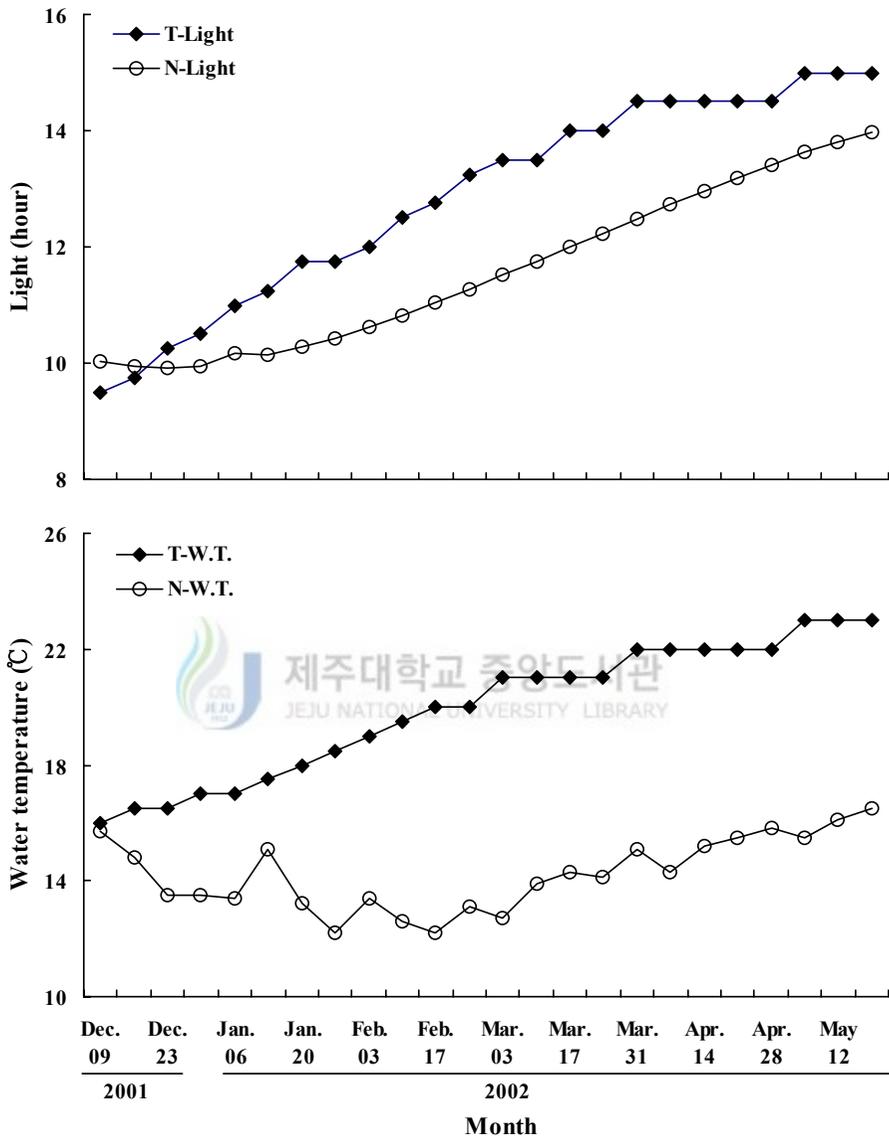


Fig. 5. Changes of water temperature and photoperiod under natural condition and treatment group from December 9 2001 to May 19 2002. T-Light, treatment daylight; N-Light, natural daylight; T-W.T., treatment water temperature; N-W.T., natural water temperature.

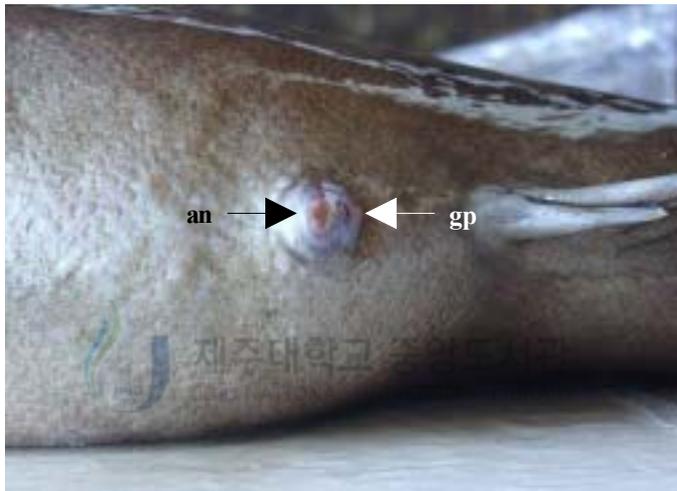


Fig. 6. External feature of genital pore in mature stage of *E. septemfasciatus* female. an, anus; gp, genital pore.

## 2. 난 성숙 및 배란 유도

### 1) 난모세포 발달단계

2002년 5월에 생식소 발달 조사 결과, 광주기와 수온을 조절한 실험구에서 조사대상 21마리 중 7마리가 주변인기 단계의 미성숙한 난모세포 (난경 200  $\mu\text{m}$  이하, Fig. 7A)가 분포하였고, 2마리에서는 생식소내에 난황구기 단계의 난모세포 (난경 300~400  $\mu\text{m}$  이상, Fig. 7B)가 분포하였다. 그리고 2마리에서는 과숙란 (난경 800  $\mu\text{m}$  이상, Fig. 7C)을 포란하였다. 나머지 실험어는 cannula 삽입이 어려워 성숙도를 조사하지 못하였다.

2003년도 자연조건에서 사육한 능성어 (총 51마리)를 대상으로 6월부터 7월까지 생식소 발달을 조사한 결과, cannulation이 가능한 28마리 중 15마리가 주변인기 단계의 미성숙한 난모세포 (난경 200  $\mu\text{m}$  이하, Fig. 7A)가 분포하였고, 9마리에서 난황구기 단계의 난모세포 (난경 300~400  $\mu\text{m}$  이상, Fig. 7B)가 분포하였다. 그리고 4마리에서는 과숙란 (난경 800  $\mu\text{m}$  이상, Fig. 7C)을 포란하였다.

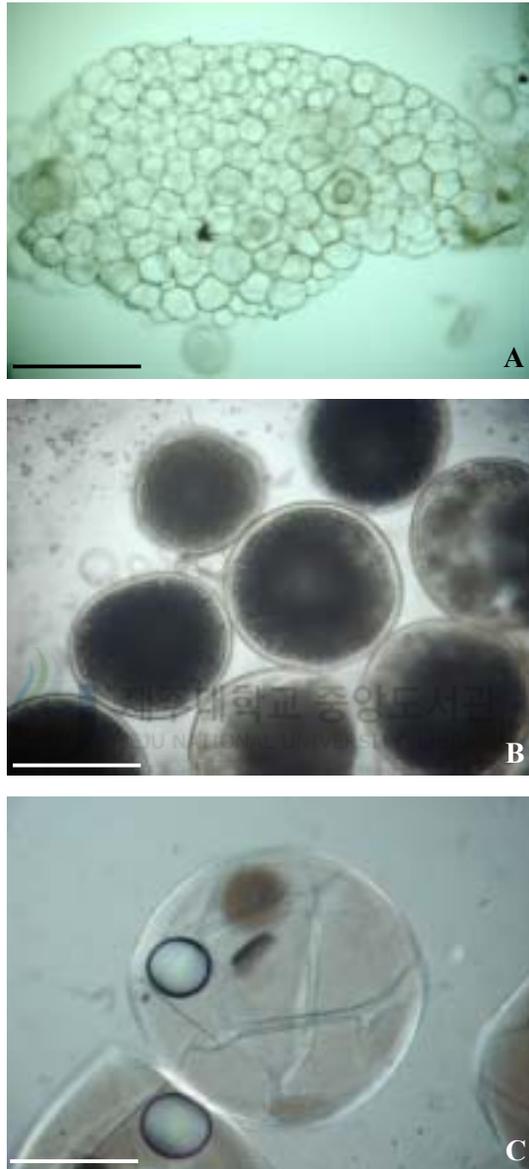


Fig. 7. Oocytes of different developmental stage in the ovary taken by cannulation of *E. septemfasciatus*. A, peri-nucleolus stage; B, yolk globule stage; C, over-mature egg stage. Scale bar=400  $\mu$ m.

## 2) 호르몬 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도

### (1) LHRHa

LHRHa 처리 전 난경 330~550  $\mu\text{m}$  (평균 419.2 $\pm$ 15.4  $\mu\text{m}$ )의 난모세포가 분포하였으나, 주사 2일후 2~8개의 유구를 가지는 난모세포 (평균 812.6 $\pm$ 2.6  $\mu\text{m}$ , Fig. 8A)가 분포하였고, 주사 5일후 알 속이 백탁된 과숙란 (평균 819.2 $\pm$ 3.1  $\mu\text{m}$ , Fig. 8B) 이었다 (Fig. 9).

LHRHa 처리 2일후와 5일후 각각 배란을 유도 했을 때, 실험어 5마리 중 2마리가 배란되었고, 배란된 알은 각각 주사 2일후 7 mL, 5일후 1,260 mL이었다 (Table 10).

### (2) hCG

hCG 처리 전 난경 300~500  $\mu\text{m}$  (평균 461.1 $\pm$ 6.6  $\mu\text{m}$ )의 난모세포가 분포하였으나, 24시간 경과 후 난경 300~700  $\mu\text{m}$  (평균 509.6 $\pm$ 11.8  $\mu\text{m}$ , Fig. 8C) 내외의 다양한 난모세포들이 분포하였고, 48시간 경과 후 91.3~98.8%가 난경 800  $\mu\text{m}$ 이상 난모세포이었다 (Fig. 10, 11).

hCG 처리구의 실험어 8마리 중 7마리가 배란되어 배란율은 87.5%이었다. 어미 개체당 배란된 알은 70~710 mL였고, 7마리의 총 배란된 알은 2,480 mL이었다. 그리고 배란된 알 중 부상란은 1,360 mL로 부상율은 54.9%이었다 (Fig. 12).

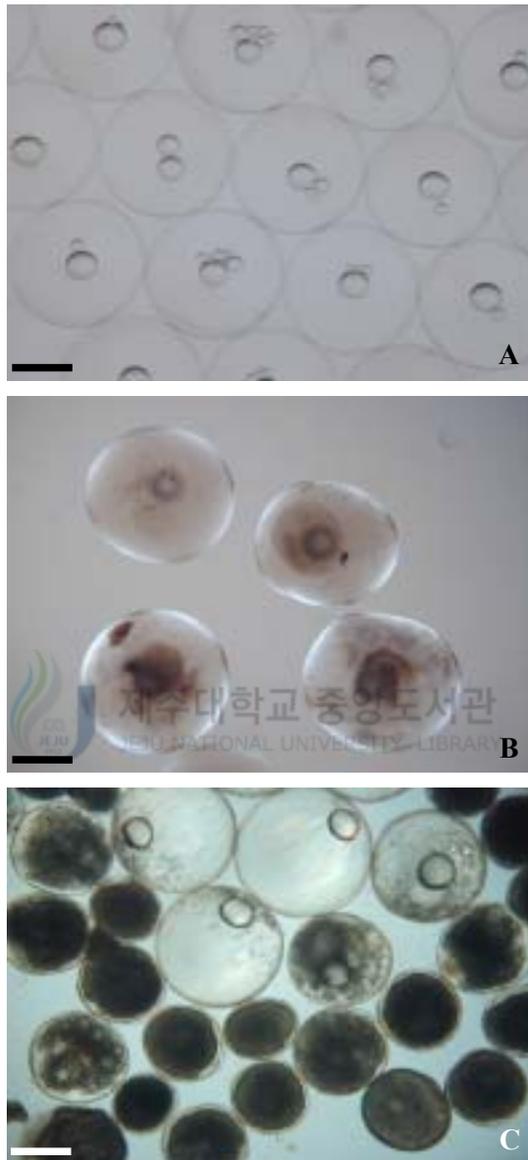


Fig. 8. Egg conformation by time after hormone injection. The eggs were collected by cannulation. A, mature eggs (2 days after LHRHa injection); B, over-mature eggs (5 days after LHRHa injection); C, various stage of eggs (24 hours after hCG injection). Scale bar=400  $\mu$ m.

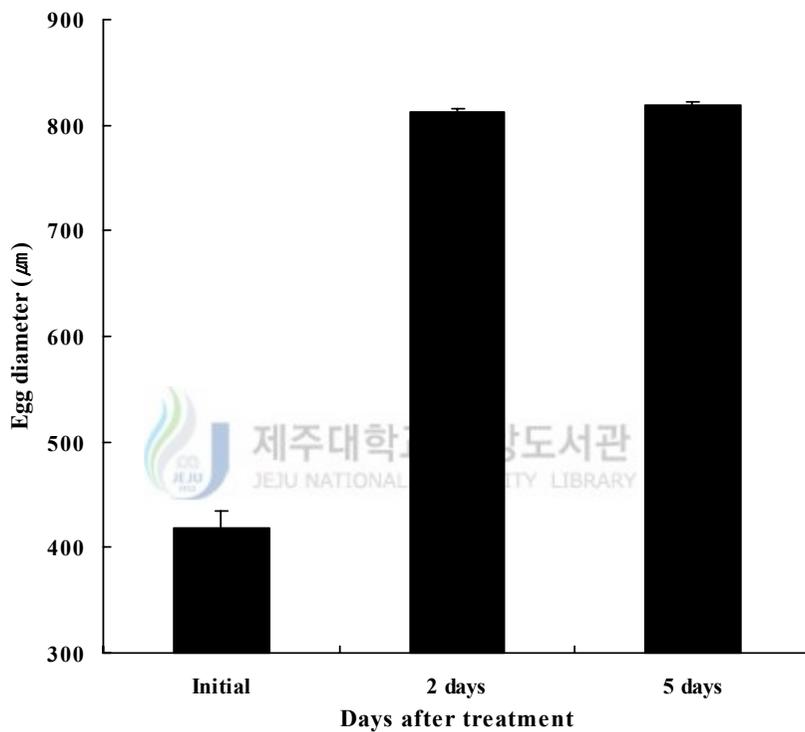


Fig. 9. Changes in egg diameter by the time after LHRHa injection. Values are means of 200~500 eggs collected by cannulation of 2 females. Vertical bars denote standard error of means.

Table 10. Egg collection by stripping of *E. septemfasciatus* female after LHRHa hormone injection

Total length (cm)	Body weight (kg)	Egg collection (mL)	
		2 days	5 days
71.0	5.72	-	540
70.0	5.78	7	720

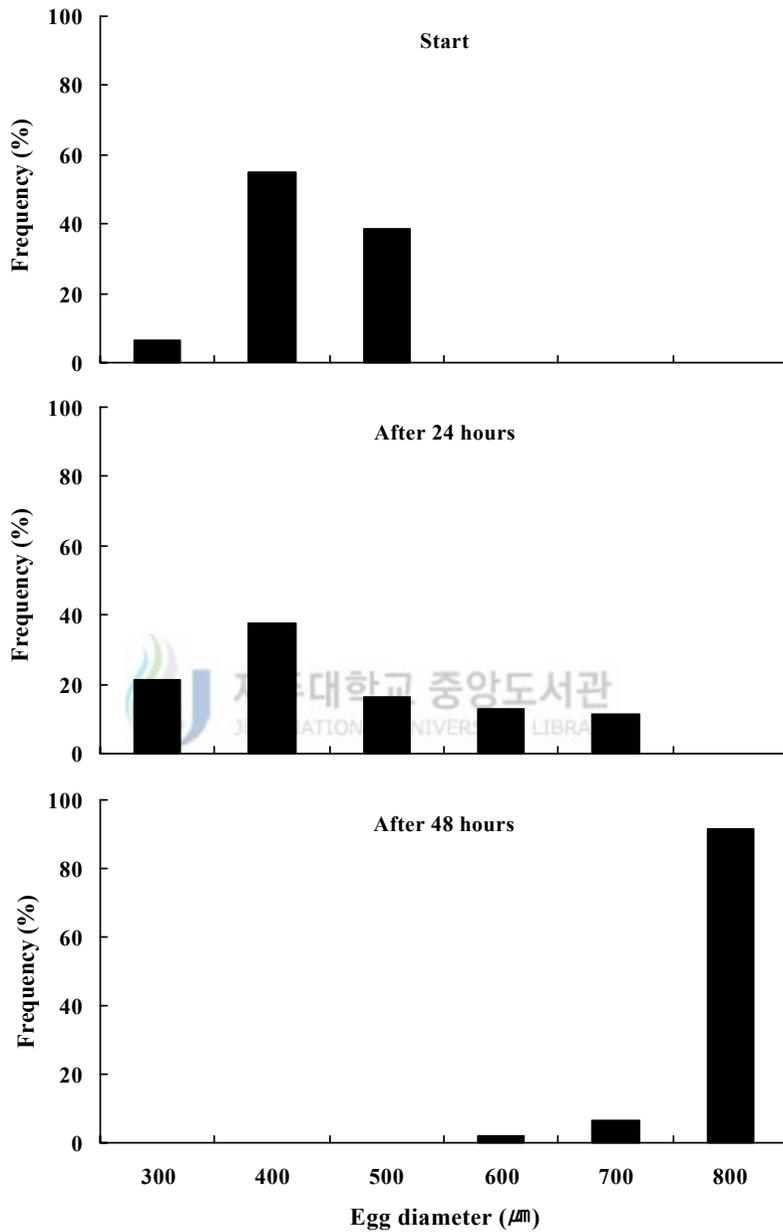


Fig. 10. Changes in egg diameter by the time after hCG injection on July 12 2003.

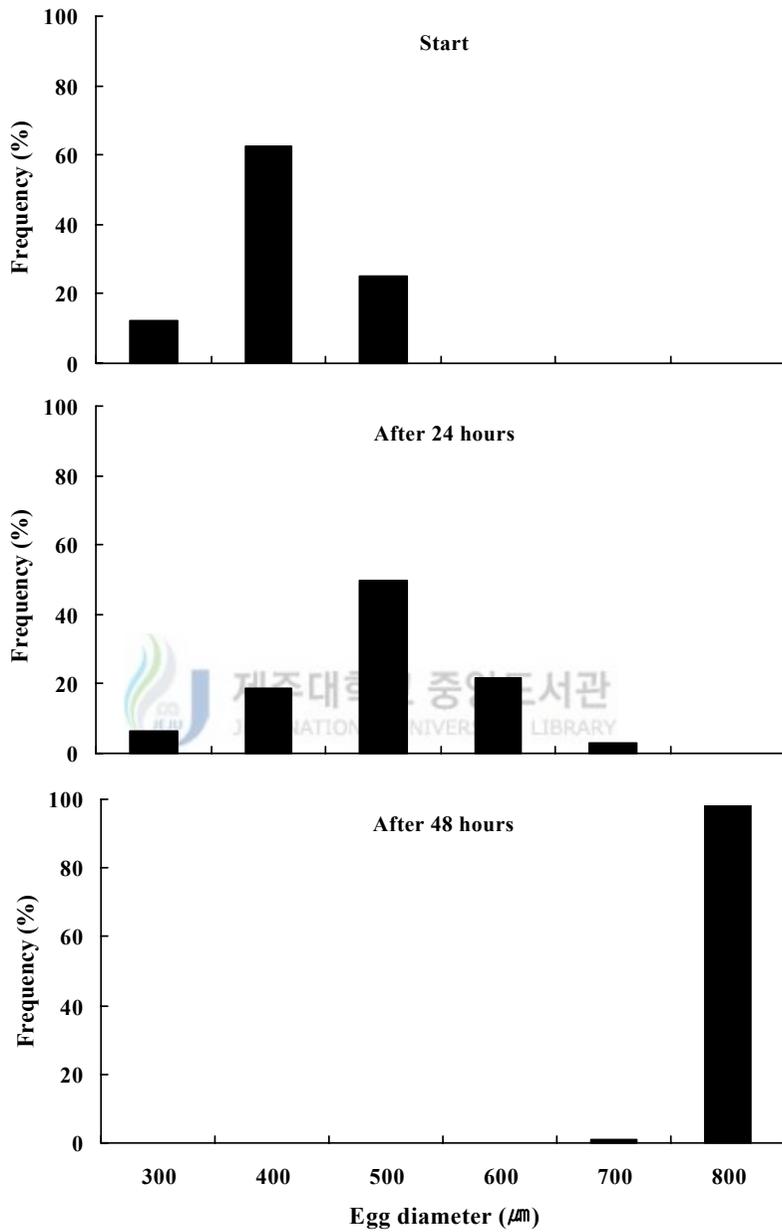


Fig. 11. Changes in egg diameter by the time after hCG injection on July 21 2003.

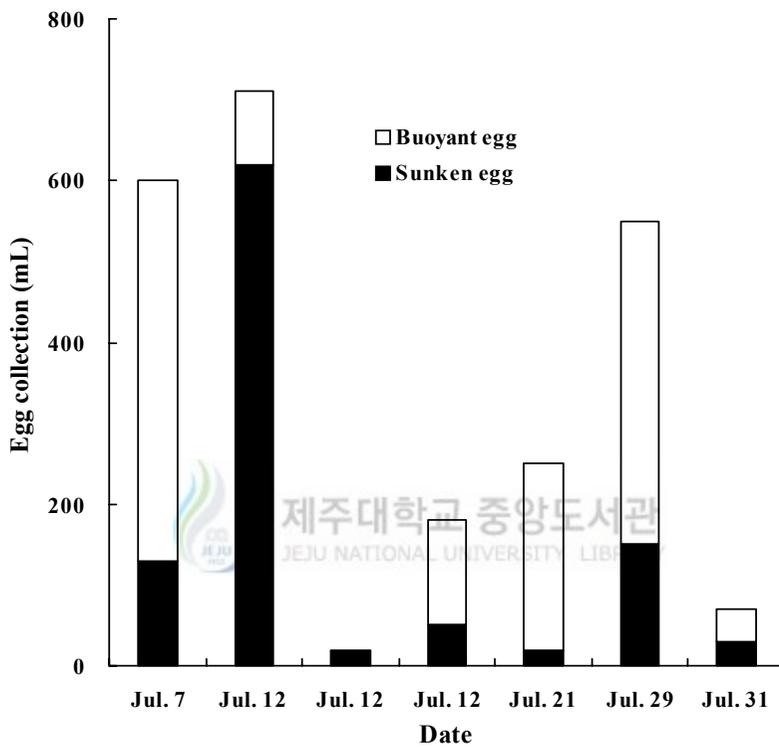


Fig. 12. Effect of hCG treatment on ovulation of *E. septemfasciatus* females in 2003.

### 3. 기능적 응성화 유도

#### 1) 성전환과 정자형성

2002년 3월부터 5월까지 MT를 사용한 응성화 유도실험에서 대조구 GSI는  $0.03 \pm 0.02$ 에서 종료 때 GSI는  $0.04 \pm 0.01$ 로 변화가 없었다. 0.5, 1.0, 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 종료 때 GSI는 각각  $0.06 \pm 0.01$ ,  $0.12 \pm 0.04$ ,  $0.11 \pm 0.03$ 로 대조구 GSI 보다 높은 경향을 보이나 실험구간 유의차는 없었다 ( $P > 0.05$ , Fig. 13). 대조구의 실험어는 성전환이 일어나지 않았으나, MT를 처리한 모든 실험구에서 수컷으로 성전환 되었다 (Table 11).

대조구 생식소는 실험 시작과 종료 때 난소 박판에 대부분 주변인기 난모세포와 생식원세포들로 구성되었으나 (Fig. 14A), MT를 처리하여 응성화를 유도한 정소는 소엽내강에 정자무리들이 분포하고 기부에 새로운 수정관이 형성되었다 (Fig. 14B). 0.5 mg MT/kg BW 처리구 생식소는 실험 종료 때 소엽내강에 정원세포와 정세포 및 정자무리들이 대부분 차지하고 기부에 수정관이 형성되었으며, 일부 어린 난모세포들이 산재 하였다 (Fig. 15A). 1.0과 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 소엽내강과 기부의 수정관에 정자무리들로 가득 차 있었다 (Fig. 15B).

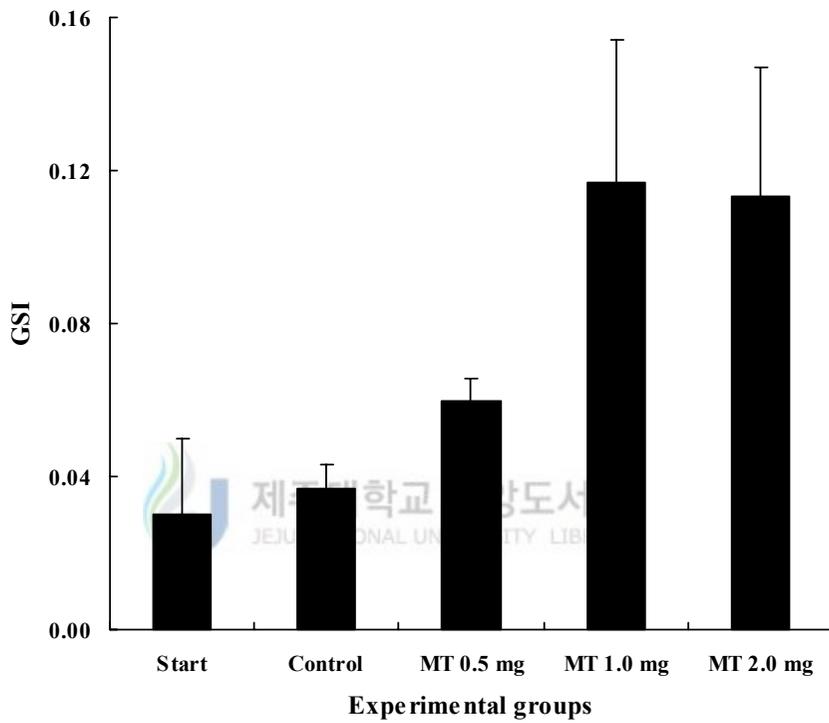


Fig. 13. Gonadosomatic index (GSI) of *E. septemfasciatus* by various  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatment. Vertical bars denote standard error of means.

Table 11. Sex reversal of *E. septemfasciatus* females by 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) injection during the experimental period (March to May 2002)

Experimental group	Duration after time (week)	No.	Total length (cm, mean $\pm$ S.E. <sup>1)</sup> )	Body weight (g, mean $\pm$ S.E.)	GSI <sup>2)</sup> (Mean $\pm$ S.E.)	Sex	
						Female	Male
Control <sup>3)</sup>	8	3	36.9 $\pm$ 2.6	787.5 $\pm$ 65.8	0.036 $\pm$ 0.009	3	0
0.5 mg MT/kg BW	8	3	38.6 $\pm$ 1.0	871.5 $\pm$ 123.7	0.059 $\pm$ 0.007	0	3
1.0 mg MT/kg BW	8	3	37.5 $\pm$ 1.5	750.5 $\pm$ 98.5	0.119 $\pm$ 0.036	0	3
2.0 mg MT/kg BW	8	3	39.2 $\pm$ 1.7	876.8 $\pm$ 192.4	0.111 $\pm$ 0.033	0	3

<sup>1)</sup>S.E.: Standard error of means. <sup>2)</sup>GSI: gonadosomatic index. <sup>3)</sup>Treated with cocoa butter only.

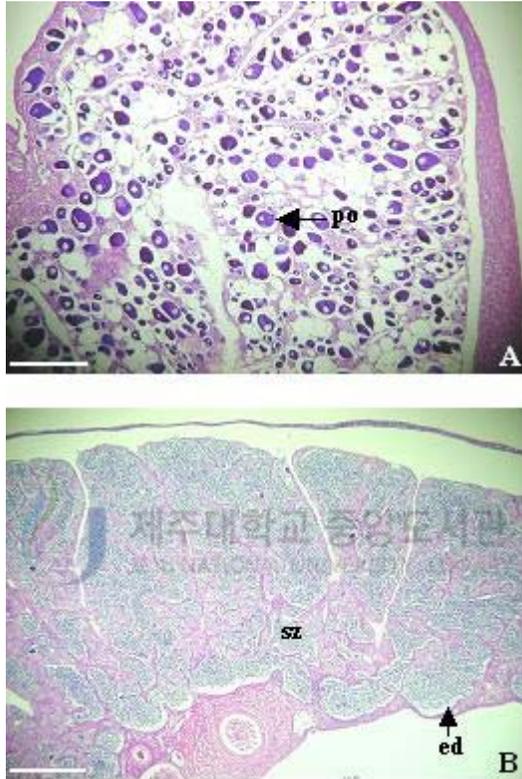


Fig. 14. Ovary (A) and testis (B) of *E. septemfasciatus*. ed, efferent duct; po, peri-nucleolus oocyte; sz, spermatozoa. Scale bar=200  $\mu$ m.

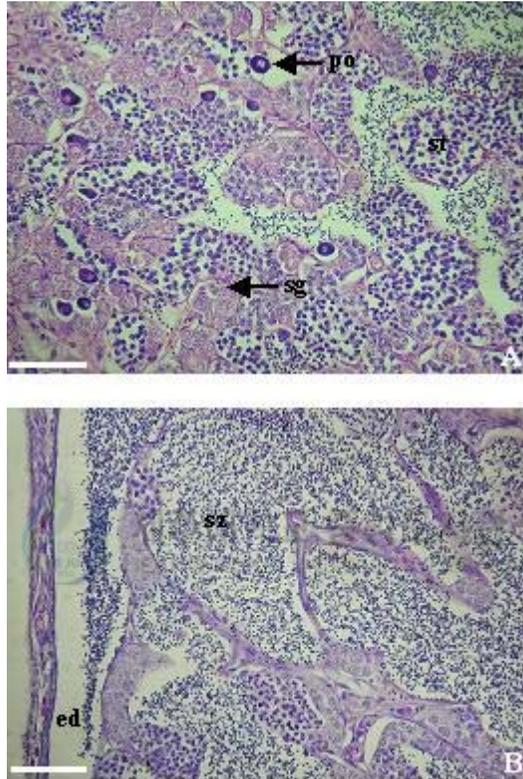


Fig. 15. Gonads of *E. septemfasciatus* treated with  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT). A, 0.5 mg MT/kg BW treatment group; B, 1.0, 2.0 mg MT/kg BW treatment group. ed, efferent duct; po, peri-nucleolus oocyte; sg, spermatogonia; st, spermatid; sz, spermatozoa. Scale bar=50  $\mu$ m.

## 2) 배정 유도

능성어 생식주기에 따라 MT 주사처리로 응성화를 유도한 결과 초기성장기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월)의 실험구는 처리 8주 후에 배정되었고, 성숙시기에 가까운 4~5월의 실험구는 처리 9~11주 후에 배정되었다. 1월에 silastic capsule을 이용한 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 같은 시기에 근육 주사 한 1.0 mg MT/kg BW 처리구보다 2주 늦은 10주 후에 4마리 중 2마리에서 배정되었다. 0.5 mg MT/kg 주사 처리구는 시기에 관계없이 응성화로 유도되었으나, 배정되지 않았다 (Table 12).



Table 12. Induction to functional males by various 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments

Times	MT treatments		Experimental fish			No. of spermatied fish
	Trials	Periods (Weeks)	No. of test fish	Total length (cm, mean $\pm$ S.E. <sup>1)</sup> )	Body weight (kg, mean $\pm$ S.E.)	
Sep. 2001	Control <sup>2)</sup>	10	2	31.5 $\pm$ 3.3	0.66 $\pm$ 0.08	0
	0.5 mg MT/kg BW	10	2	33.5 $\pm$ 3.5	0.73 $\pm$ 0.09	0
	1.0 mg MT/kg BW	10	2	36.8 $\pm$ 4.1	0.88 $\pm$ 0.29	2
	2.0 mg MT/kg BW	10	2	37.0 $\pm$ 1.7	0.81 $\pm$ 0.20	2
Mar. 2002	Control	8	3	42.2 $\pm$ 2.4	1.35 $\pm$ 0.25	0
	0.5 mg MT/kg BW	8	3	39.2 $\pm$ 3.3	1.24 $\pm$ 0.29	0
	1.0 mg MT/kg BW	8	4	39.9 $\pm$ 3.1	1.44 $\pm$ 0.19	4
	2.0 mg MT/kg BW	8	3	43.0 $\pm$ 1.0	1.49 $\pm$ 0.14	3
Jan. 2003	1.0 mg MT/kg BW	8	7	50.9 $\pm$ 1.0	2.18 $\pm$ 0.11	7
	2.0 mg MT/kg BW <sup>3)</sup>	10	4	48.4 $\pm$ 2.1	1.73 $\pm$ 0.25	2
Apr. 2003	1.0 mg MT/kg BW	9	1	63.0	3.22	1
	2.0 mg MT/kg BW	9	3	49.3 $\pm$ 3.9	1.94 $\pm$ 0.38	3
May 2003	2.0 mg MT/kg BW	11	4	53.0 $\pm$ 5.5	2.47 $\pm$ 0.62	3

<sup>1)</sup>S.E.: Standard error of means. <sup>2)</sup>Treated with cocoa butter only. <sup>3)</sup>It was treated by silastic capsule.

### 3) Testosterone과 11-ketotestosterone 변화

MT 처리로 기능적 음성화를 유도하는 과정에서 T의 농도는 대조구에서 0.116~0.073 ng/mL로 실험종료까지 변화가 없었으나, 0.5, 1.0, 2.0 mg MT/kg BW 처리구에서 4주 후 각각 0.136, 0.140, 0.163 ng/mL로 대조구의 0.083 ng/mL보다 높았다 ( $P<0.05$ ). 6주 후 1.0, 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 각각 0.119, 0.112 ng/mL로 대조구의 0.084 ng/mL보다 높았으나 ( $P<0.05$ ), 0.5 mg MT/kg BW 처리구는 대조구와 유사하였다 ( $P>0.05$ ). 8주 후 모든 MT 처리구는 0.078~0.098 ng/mL로 대조구와 유사하였다 ( $P>0.05$ , Fig. 16).

11-KT 농도는 대조구에서 실험기간 동안 0.029~0.059 ng/mL이었으나, 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 0.112~0.211 ng/mL로 2주 후부터 실험 종료 (15주)까지 대조구보다 높았다 ( $P<0.05$ ). 1.0 mg MT/kg BW 처리구는 0.110~0.232 ng/mL로 2주 후부터 6주 후까지 대조구보다 높았다 ( $P<0.05$ ). 0.5 mg MT/kg BW 처리구에는 4주 후까지 대조구보다 높았으나 ( $P<0.05$ ), 이후 대조구와 유사하였다 ( $P>0.05$ , Fig. 17).

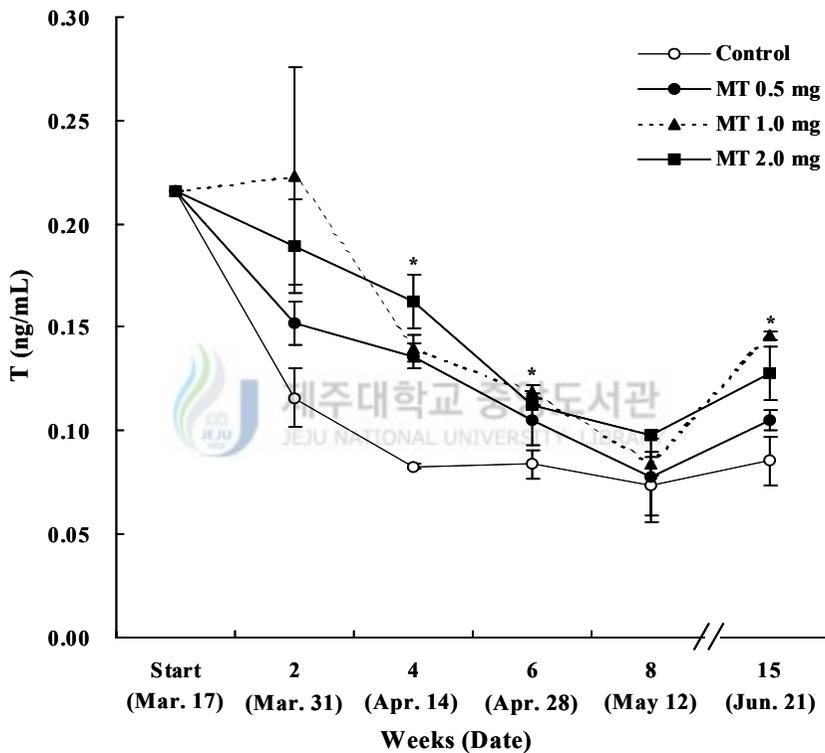


Fig. 16. Changes in plasma testosterone (T) levels after  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatment. Vertical bars denote standard error of means. Asterisks indicate significant differences between treatment and control groups ( $P < 0.05$ ).

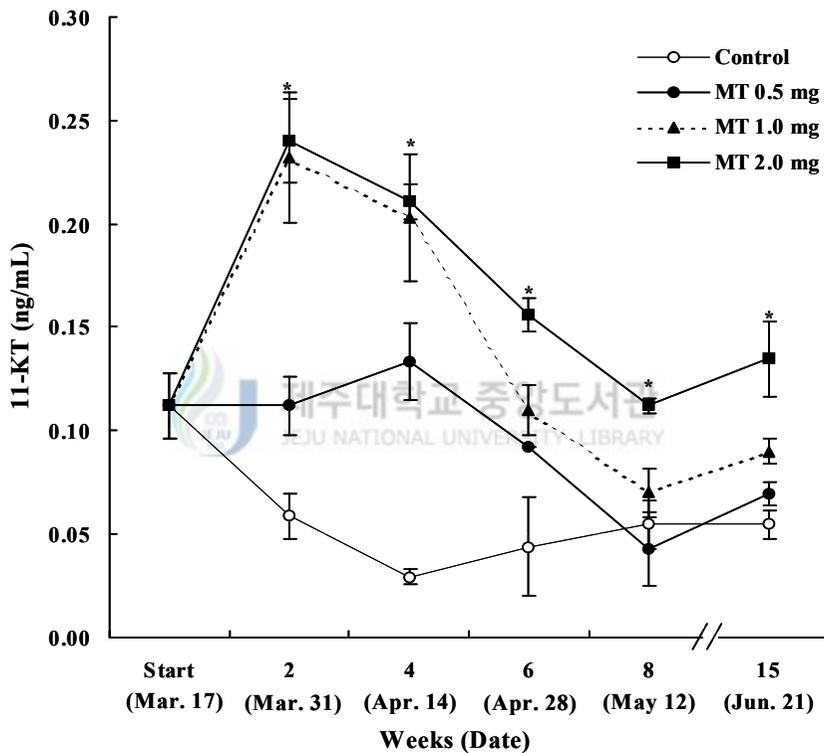


Fig. 17. Changes in plasma 11-ketotestosterone (11-KT) levels after 17  $\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatment. Vertical bars denote standard error of means. Asterisks indicate significant differences between treatment and control groups ( $P < 0.05$ ).

## 4. 수정

### 1) 정자 냉동보존

#### (1) 정자의 구조 및 크기

능성어 정자는 두부와 꼬리부로 구분되며, 두부는 공모양의 둥근 형태이고 길이가 1.3~1.5  $\mu\text{m}$ 이었다 (Fig. 18).

#### (2) 혈장과 희석액의 물리적 특성

능성어 혈장의 pH는 7.30, 삼투압 농도는 395 mOsm/kg이었다. 그리고 냉동보존에 사용한 5% glucose와 MFRS, PMRS, Ham's F-10 희석액의 pH는 각각 6.40, 6.81, 7.39, 7.55이었고, 삼투압 농도는 287, 460, 350, 281 mOsm/kg이었다 (Table 13).

#### (3) 냉동정자의 특성

희석액과 동해방지제 종류에 따른 정자 운동성은 GTS와 GDS 실험구는 각각  $13.68 \pm 1.77$ 와  $14.24 \pm 1.84$ 로 대조구 (fresh sperm)  $20.42 \pm 2.30$ 보다 낮았으나, HTS  $7.76 \pm 1.00$ , HDS  $7.52 \pm 0.77$ , MTS  $6.08 \pm 0.78$ , MDS  $3.60 \pm 0.46$ 보다 높았다 ( $P < 0.05$ , Fig. 19).

냉동정자의 해동 후 운동성은 모든 실험구에서 해동 후 2시간까지 운동성을 가졌다. 해동 후 운동성은 GDS 실험구에서 30분 전후로 운동성이 높았고, GTS 실험구는 해동 후 60분에 운동성이 높았다. 이외에 다른 실험구는 20~30분 사이에 운동성이 높았으나, GTS와 GDS 실험구보다 운동성은 낮았다 (Fig. 20).



Fig. 18. A scanning electron microscopic photograph of thawed sperm in seawater after cryopreservation over 1 year.

Table 13. Properties of seminal plasma of *E. septemfasciatus* and diluents used for cryopreservation

		Osmolality (mOsm/kg)	pH
Fish	Plasma	395	7.30
Diluents	5% glucose	287	6.40
	MFRS <sup>1)</sup>	460	6.81
	PMRS <sup>2)</sup>	350	7.39
	Ham's F-10	281	7.55

<sup>1)</sup>MFRS, marine fish ringer solution; <sup>2)</sup>PMRS, *Pagrus major* ringer solution.



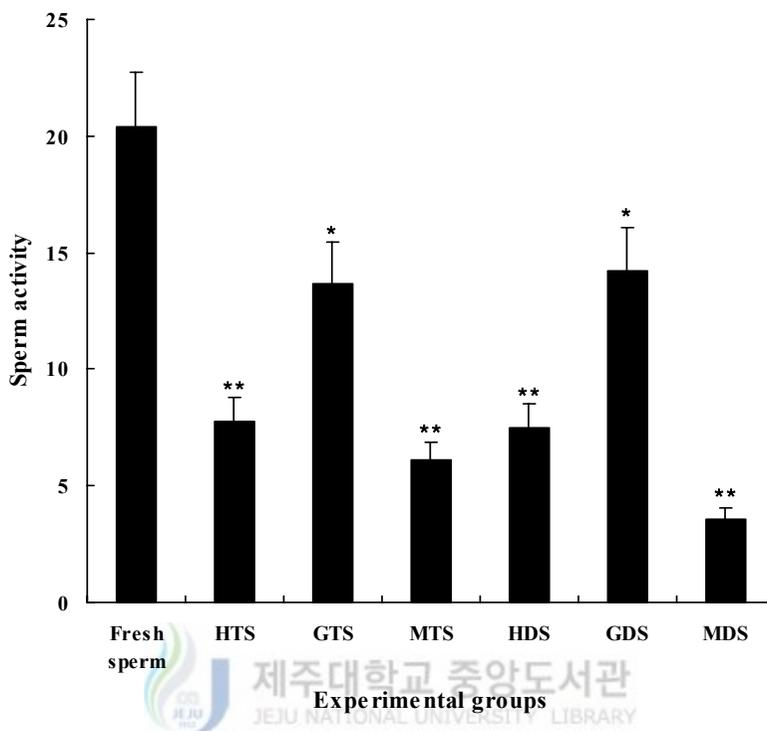


Fig. 19. Activities of thawed sperm of *E. septemfasciatus* after cryopreservation with different diluents and protectant levels. Vertical bars denote standard error of means. Asterisks indicate significant differences at  $P < 0.05$ . HTS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and Test Yolk Buffer (TYB) as cryoprotectant; GTS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and TYB as cryoprotectant; MTS, thawed sperm after cryopreservation with marine fish ringer solution (MFRS) as diluent and Test Yolk Buffer as cryoprotectant; HDS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and dimethylsulfoxide (DMSO) as cryoprotectant; GDS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and DMSO as cryoprotectant; MDS, thawed sperm after cryopreservation with MFRS as diluent and DMSO as cryoprotectant.

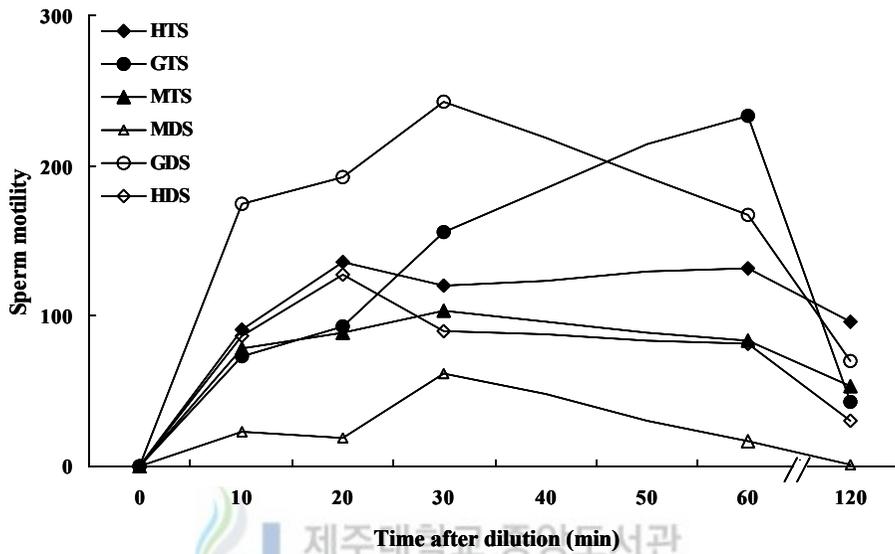


Fig. 20. Changes in motility of thawed sperm of *E. septemfasciatus* by time after dilution. HTS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and Test Yolk Buffer (TYB) as cryoprotectant; GTS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and TYB as cryoprotectant; MTS, thawed sperm after cryopreservation with marine fish ringer solution (MFRS) as diluent and Test Yolk Buffer as cryoprotectant; HDS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and dimethylsulfoxide (DMSO) as cryoprotectant; GDS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and DMSO as cryoprotectant; MDS, thawed sperm after cryopreservation with MFRS as diluent and DMSO as cryoprotectant.

## 2) 인공수정

### (1) 정자의 수정률과 수정란 부화율

웅성화로 유도된 능성어에서 배정된 정자를 이용하여 인공수정 시켰을 때, 수정률은 56.2~94.9%이었으며, 수정란 부화율은 70.0~97.7%이었다 (Fig. 21).

### (2) 해동정자의 수정률과 수정란 부화율

해동정자의 수정률은 대조구에서  $94.9 \pm 2.0\%$ 였고, GDS와 PDS 실험구에서 각각  $97.7 \pm 1.2\%$ 와  $93.9 \pm 1.8\%$ 로 유사하였다 ( $P > 0.05$ , Fig. 22). 수정란 부화율은 대조구에서  $97.3 \pm 1.5\%$ 이었고, GDS와 PDS 실험구에서 각각  $97.0 \pm 0.9$ 와  $94.0 \pm 1.3\%$ 로 유사하였다 ( $P > 0.05$ , Fig. 22).



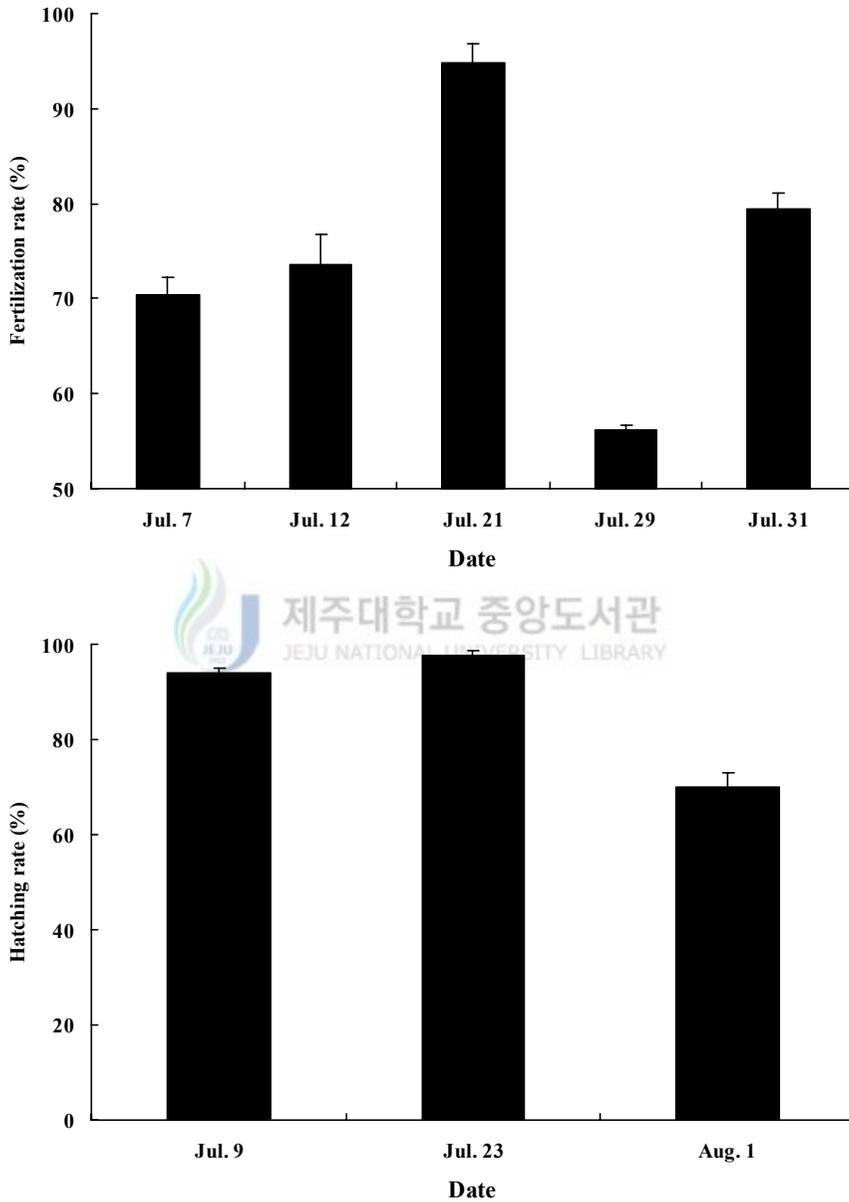


Fig. 21. Fertilization and hatching rate of the buoyant eggs of *E. septemfasciatus* treated by hCG injection in 2003.

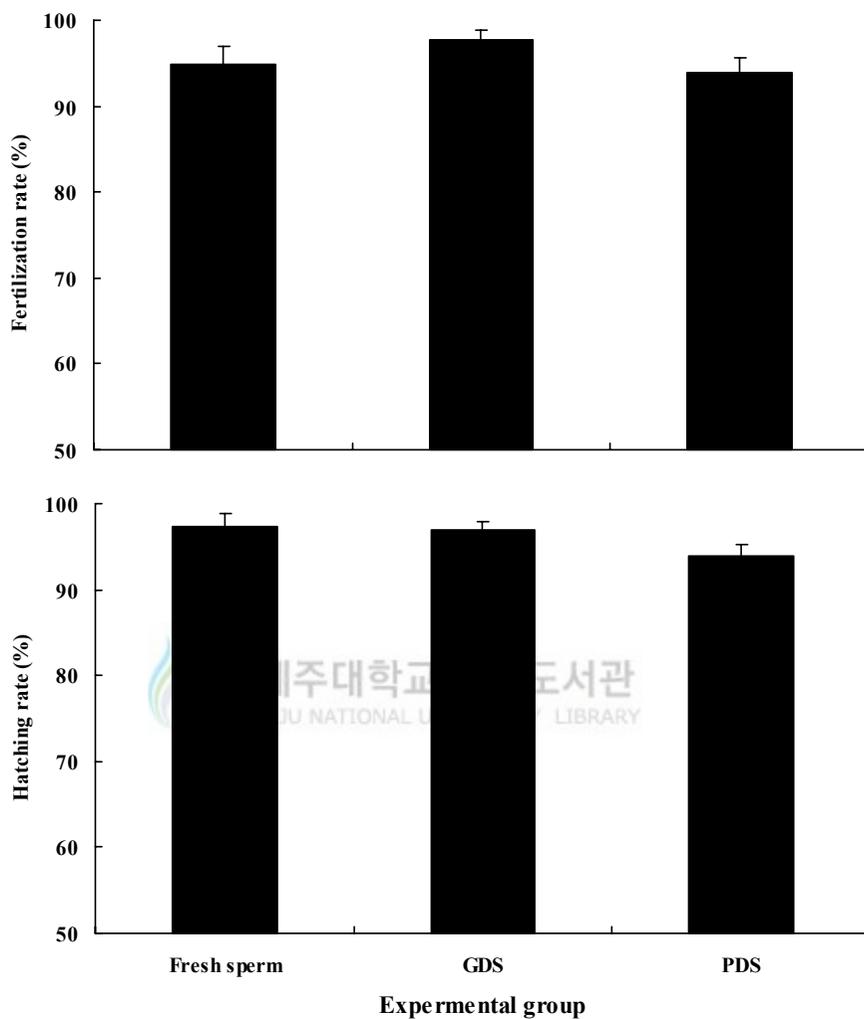


Fig. 22. Fertilization and hatching rate of fresh sperm and thawed sperm of *E. septemfasciatus* after cryopreservation with different diluents. Vertical bars denote standard error of means. GDS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and dimethylsulfoxide (DMSO) as cryoprotectant; HDS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and DMSO as cryoprotectant.

## 5. 수정란 및 자어 발달

### 1) 난 발생

능성어 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 난경 790~890  $\mu\text{m}$  (평균 821.8 $\pm$ 2.0  $\mu\text{m}$ ), 유구경 170~230  $\mu\text{m}$  (평균 192.9 $\pm$ 0.9  $\mu\text{m}$ )이었다 (Fig. 23).

수온 22°C에서 수정란의 난 발생 과정 (Table 14, Fig. 24)은 수정 후 위란강 (perivitelline space)과 배반 (blastodisc)이 형성 되었고 (Fig. 24A), 수정 후 1시간 만에 배반이 동·식물극을 축으로 제 1난할이 시작되어 2세포기에 이르렀다 (Fig. 24B). 수정 후 2시간이 경과하여 4세포기 (Fig. 24C), 2시간 30분 후에 8세포기 (Fig. 24D), 3시간 30분 후 32 세포기 (Fig. 24E)로 발달하였다.

난할이 계속 진행됨에 따라 할구의 크기가 점점 작아져 5시간 후에 상실기 (Fig. 24F), 12시간 후에 포배기 (Fig. 24G)에 이르면서 배반엽 (blastoderm)이 융기되었다. 그 후 점차 배반엽이 넓어지면서 난황을 덮기 시작하였다. 수정 후 16시간 경과했을 때 배반은 점차 난황을 덮어쓰우면서 배환 (germ ring)이 형성되는 낭배기 (Fig. 24H)에 이르렀고, 23시간 후 원구가 합입되면서 배순 (embryonic shield)이 형성되었다 (Fig. 24I).

수정 후 27시간이 지나면서 두부 분화와 안포가 형성되었다. 이때 근절수는 7~9개였고, Kuffer's vesicle이 배체의 뒤쪽 부분에 출현하였다 (Fig. 24J, K). 수정 후 29~31시간이 경과했을 때 Kuffer's vesicle이 소멸되며 근절수가 11~12개로 증가하였다 (Fig. 24L). 수정 후 37시간 만에 안구와 이포가 형성되었고, 근절수가 17~20개로 증가하였다 (Fig. 24M). 수정 후 44시간이 경과하였을 때 배체의 움직임이 시작되면서 심장박동이 관찰되고 (Fig. 22N), 부화는 46시간 후에 시작되었다 (Fig. 24O).

수온에 따른 난 발생속도는 22℃에서 상실기까지 평균 5.0시간, 25℃에서는 평균 4.5시간이 소요되었다. 포배기까지 소요시간은 22℃에서 12.0시간, 25℃에서 10.5시간 이었다. 배체형성시기까지 소요 시간은 22℃에서 23.0시간, 25℃에서는 17.0시간이었다. 부화까지 평균 소요시간은 22℃일 때 46.0시간, 25℃일 때 35.0시간으로 수온이 높을수록 발생단계별 소요시간이 짧았다 (Table 15).

## 2) 수온과 염분에 따른 부화율

사육수온 22℃와 25℃에서 각각 염분 34‰와 26‰, 18‰에 따른 수정란 부화에 소요시간은 유사하였다. 부화율은 수온 22℃에서 34‰ 실험구는 99.9%였고 26‰와 18‰ 실험구는 각각  $89.3 \pm 1.8\%$ 와  $64.0 \pm 6.4\%$ 로 염분농도에 따라 차이가 있었다 ( $P < 0.05$ ). 수온 25℃에서 부화율은 34‰와 26‰ 실험구에서 각각  $99.3 \pm 0.7\%$ 와  $98.7 \pm 0.7\%$ 로 유사하였으나, 18‰ 실험구는  $89.3 \pm 3.7\%$ 로 낮았다 ( $P < 0.05$ , Fig. 25).

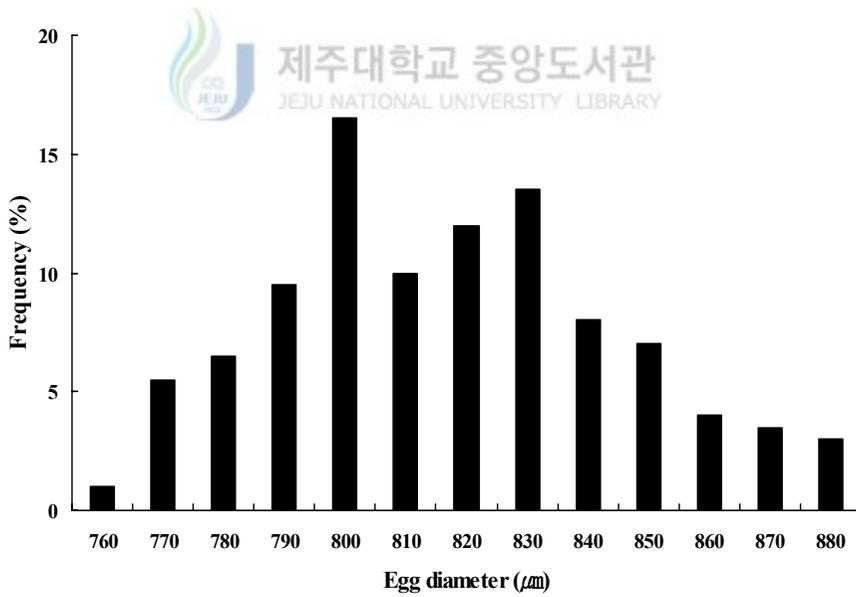
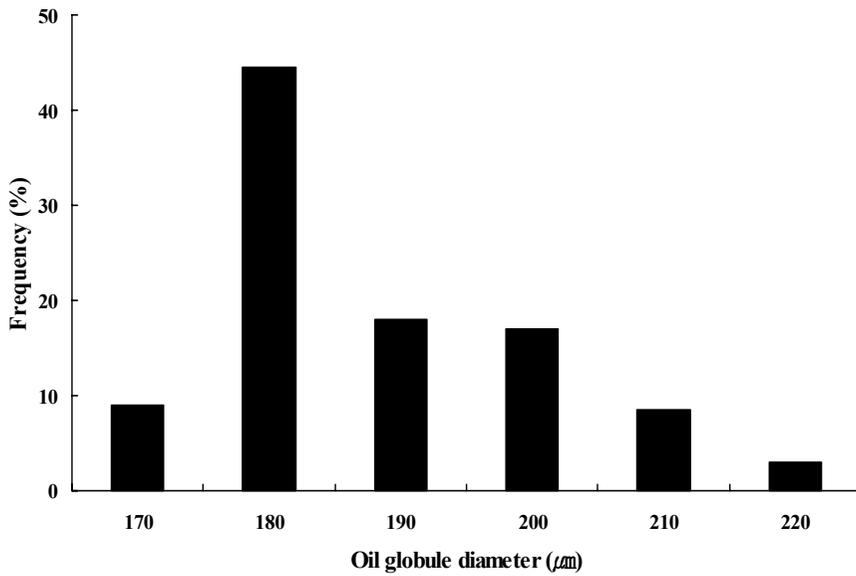


Fig. 23. Frequency in diameters of oil globule and fertilized egg of *E. septemfasciatus*.

Table 14. Development stage of fertilized egg of *E. septemfasciatus*  
(water temperature: 22.0±0.5°C)

Developmental stage	Time after fertilization	Features of eggs and embryos
Fertilized egg	0 h	
2 cell	1 h	
4 cell	2 h	
8 cell	2 h 30 min	
32 cell	3 h 30 min	
Morula	5 h	
Blastula	12 h 16 h 30 min	
Gastrula	23 h	Blastopore depression
Early embryo formation	27 h	Kuffer's vesicle appearance, 7~9 myotomes stage
Myotomes formation	29~31 h	Kuffer's vesicle disappearance, 11~12 myotomes stage
Lens and ear vesicle formation	37 h	17~20 myotomes stage
Heart beat	44 h	
Hatched larval	46 h	

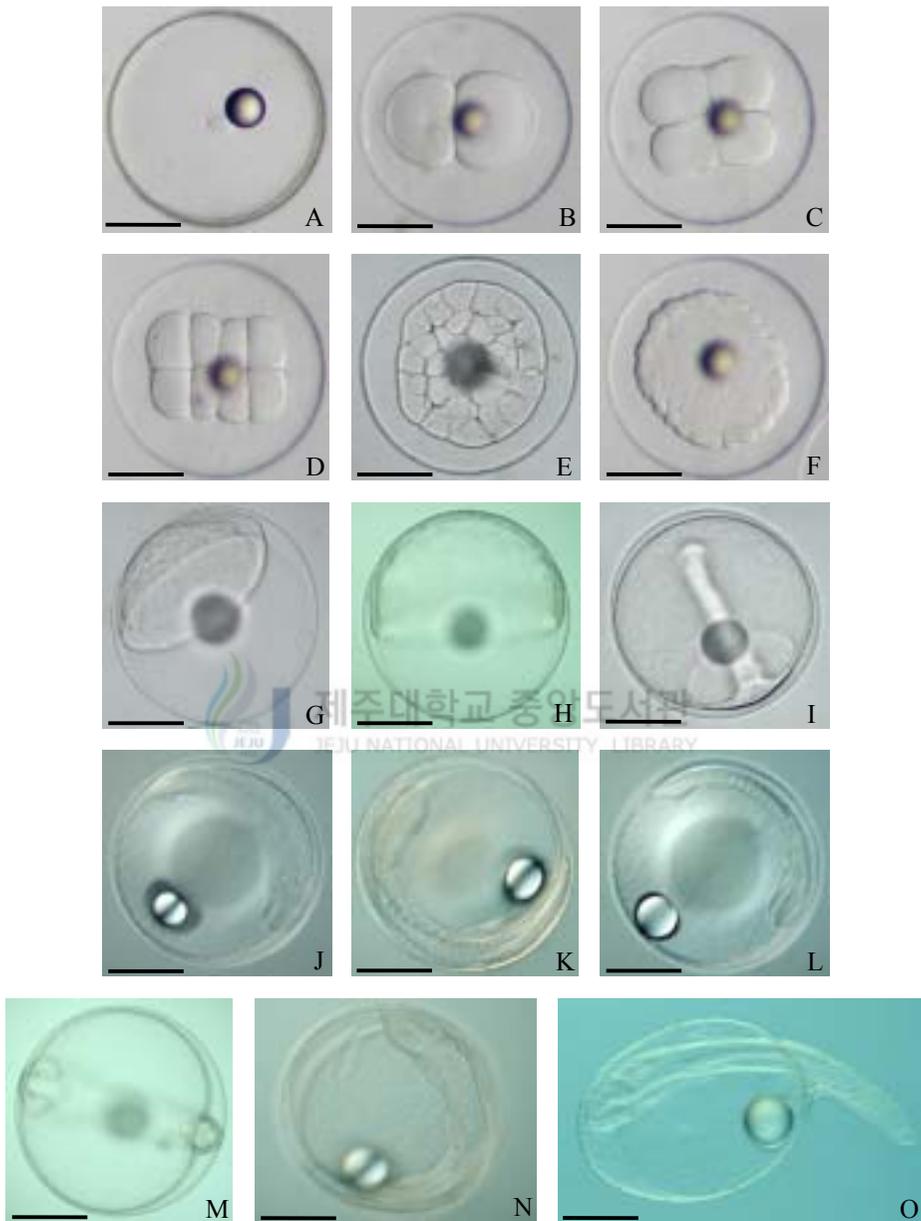


Fig. 24. Microscopic view of embryonic development of *E. septemfasciatus*. A, fertilized egg; B, 2 cell; C, 4 cell; D, 8 cell; E, 32 cell; F, morula stage; G, blastula stage; H, I, gastrula stag; J, K, embryo formation; L, myotomes formation; M, lens and ear vesicle formation; N, heart beat; O, hatched larva. Scale bar=400  $\mu$ m.

Table 15. Time for the embryonic developmental stage at two different water temperature of 22 and 25°C for *E. septemfasciatus*

Developmental stage	Water temperature (°C)	
	22°C	25°C
Morula	5.0 h	4.5 h
Blastula	12.0 h	10.5 h
Gastrula	16.5 h	14.0 h
Embryo formation	23.0 h	17.0 h
Hatching	46.0 h	35.0 h



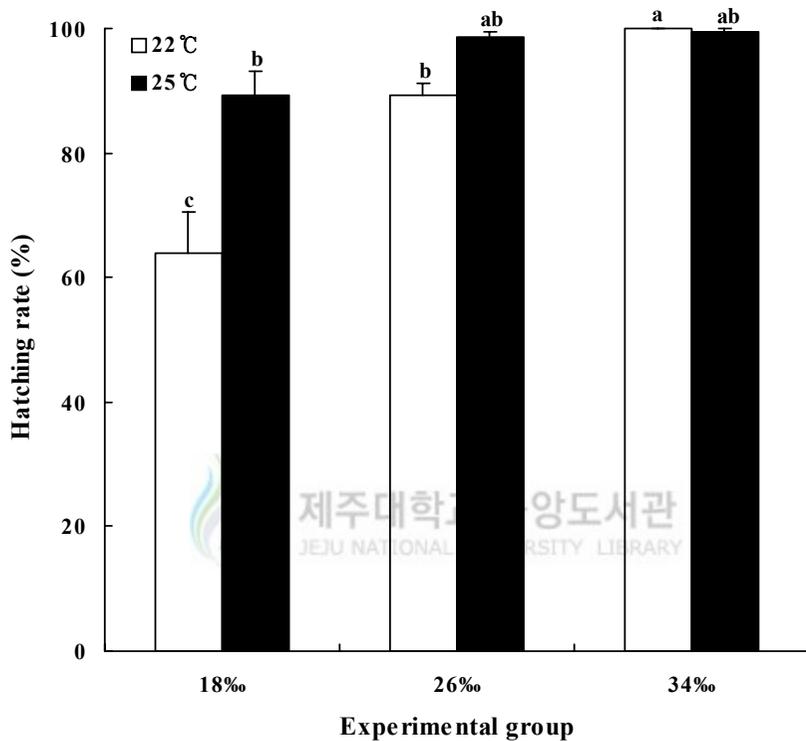


Fig. 25. Hatching rates of fertilized eggs of *E. septemfasciatus* at various water temperatures and salinities. Vertical bars denote standard error of means. Different superscripts on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3) 자어의 형태발달과 성장

#### (1) 난황흡수 및 개구시간

부화자어의 난황용적비는  $0.244 \pm 0.020 \text{ mm}^3$  (100%)이었다. 사육수온 22°C와 25°C 실험구에서 시간경과에 따른 난황흡수는 25°C에서 부화 후 24시간 16.5%, 48시간 2.1%로 난황이 대부분 흡수되었으나, 22°C에서는 부화 후 24시간 67.3%, 48시간 11.8%, 72시간 6.9%로 일부 난황이 존재하였다 (Fig. 26A).

자어의 유구용적비는 부화 직후  $0.0034 \pm 0.0002 \text{ mm}^3$  (100%)이었다. 25°C에서 부화 후 24시간 66.0%, 48시간 19.7% 그리고 96시간 0.9%로 흡수되었으나, 22°C에서 부화 후 24시간 70.5%, 48시간 59.8%, 96시간 31.8% 그리고 120시간 7.9%로 흡수되었다 (Fig. 26B).

부화 후 개구까지 소요 시간은 난황이 흡수하는 시기와 일치하여 25°C에서는 부화 후 3일, 22°C에서는 부화 후 4일이었다.

#### (2) 부화자어의 구경 변화

사육수온 25°C에서 부화 후 3일에 자어가 개구되었을 때 구경 (d)은 0.209 mm이었으며, 부화 후 4일 0.238 mm에서 점차 커져 부화 후 11일에는 0.325 mm이었다. 개구직후부터 부화 후 11일까지 0.75d와 0.5d는 각각 0.157~0.244 mm, 0.105~0.162 mm이었다 (Table 16).

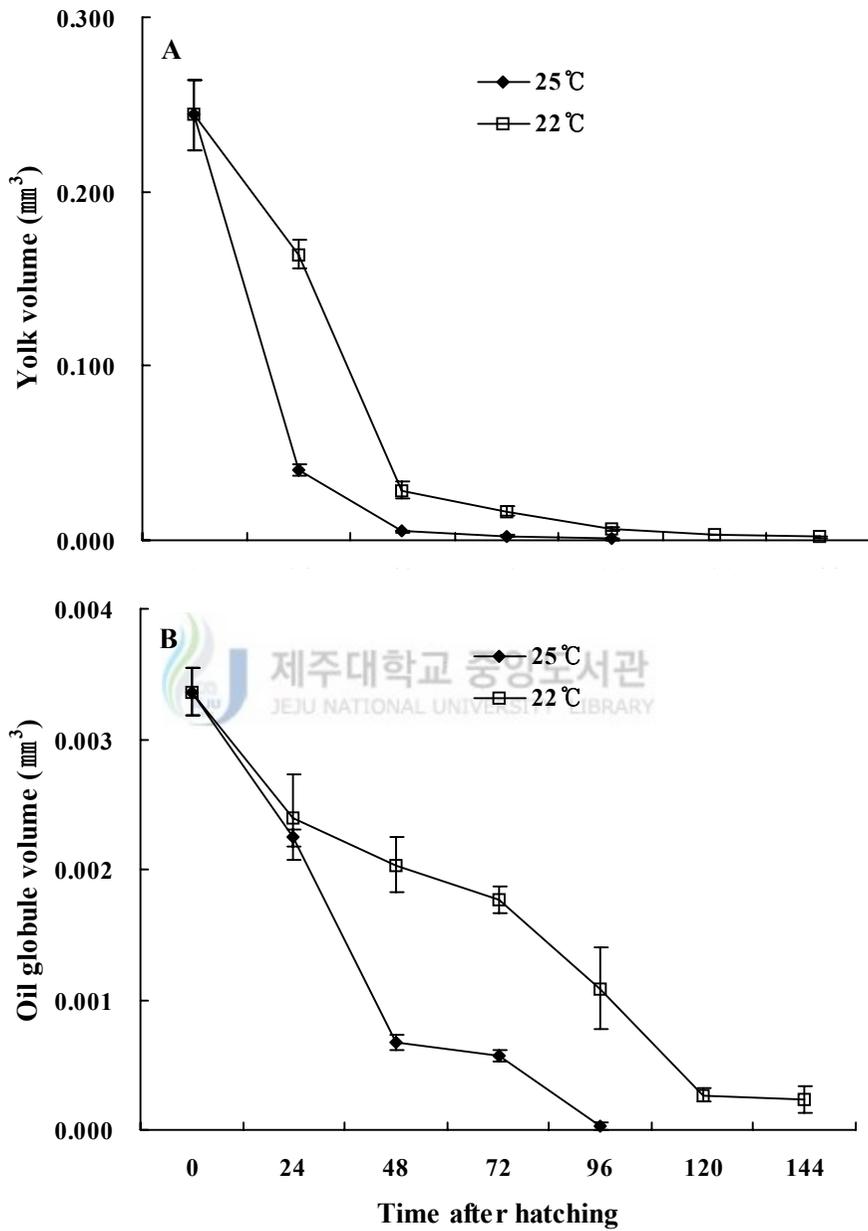


Fig. 26. Comparison of absorptions of yolk (A) and oil globule (B) in *E. septemfasciatus* larvae at two water temperatures. Vertical bars denote standard error of means.

Table 16. Growth of mouth of *E. septemfasciatus* larvae by days after hatching

Day after hatching	Total length (mm±S.E. <sup>1)</sup> )	Upper jaw length (mm±S.E.)	Calculated mouth length (mm)		
			d <sup>2)</sup>	0.75d	0.5d
3	2.48±0.04	0.148±0.009	0.209	0.157	0.105
4	2.72±0.06	0.169±0.006	0.238	0.179	0.119
5	2.75±0.05	0.180±0.002	0.255	0.191	0.127
6	2.78±0.03	0.195±0.004	0.275	0.207	0.138
7	2.62±0.04	0.205±0.017	0.290	0.218	0.145
9	2.94±0.04	0.209±0.005	0.295	0.221	0.148
11	3.24±0.12	0.230±0.005	0.325	0.244	0.162

<sup>1)</sup>S.E.: Standard error of means. <sup>2)</sup> $\sqrt{2}$ ×upper jaw length.

### (3) 자어의 형태 발달

① 부화 0~1일 (Fig. 27A): 전장 1.75~2.40 mm로 유구는 난황의 끝부분, 항문은 몸체 중앙보다 뒤에 위치하였다. 꼬리 중앙 부분의 등과 복부면에 흑색소포가 분포하고, 막지느러미는 포상 과립으로 덮혀있었다. 부화자어는 대부분 수표면 근처에 분산 유영하였다.

② 부화 2~3일 (Fig. 27B): 전장 2.46~2.55 mm로 난황과 유구가 일부 남아 있었고, 부화 3일부터 일부 개체가 개구되기 시작하였다. 두부 골격이 형성되고, 가슴지느러미 원기가 발현하였다. 자어는 대부분 수조 저면으로 이동하였다.

③ 부화 4~5일 (Fig. 27C): 전장 2.55~2.72 mm로 난황과 유구가 완전히 흡수되었고, 입과 항문이 열렸으며, 안구에 흑색 색소포가 침적되었다. 등지느러미와 꼬리지느러미는 미분화되었으나, 가슴지느러미는 발달하기 시작하였다. 흑색 색소포는 근절을 따라 복부쪽에 산재하였다. 자어들은 수표면으로 이동하여 로티퍼를 섭취한 개체가 관찰되었다.

④ 부화 7~10일 (Fig. 27D): 전장 2.62~2.94 mm로 막지느러미가 소실되고 등지느러미와 꼬리지느러미의 형태 분화가 일어나고 소화관이 분화 발달 하였다. 근절을 따라 복부와 막지느러미 부분에 색소포 침적부위가 증가하였다.

⑤ 부화 17~23일 (Fig. 27E): 전장 4.15~5.12 mm로 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 커지고, 복부에 흑색 색소포 층이 발달되면서 꼬리지느러미가 분화 발달하였다.

### (4) 자어 성장

사육수온 22℃와 25℃에서 자어의 성장과 항문장의 변화를 조사하였다 (Fig. 28). 사육수온 25℃에서 자어 전장은 부화 직후 1.75 mm에서 부화 후 3일째 2.48 mm로 성장하였고, 먹이를 섭취하는 부화 후 4일부터 11일

까지 2.72~3.24 mm로 성장하였다. 부화 후 11일부터 변태를 시작하였고, 부화 후 24일에는 5.12 mm까지 성장하였다. 항문장도 전장의 성장과 유사하였다. 사육수온 22℃에서 자어 성장은 25℃ 사육조건과 유사한 성장을 하였다.



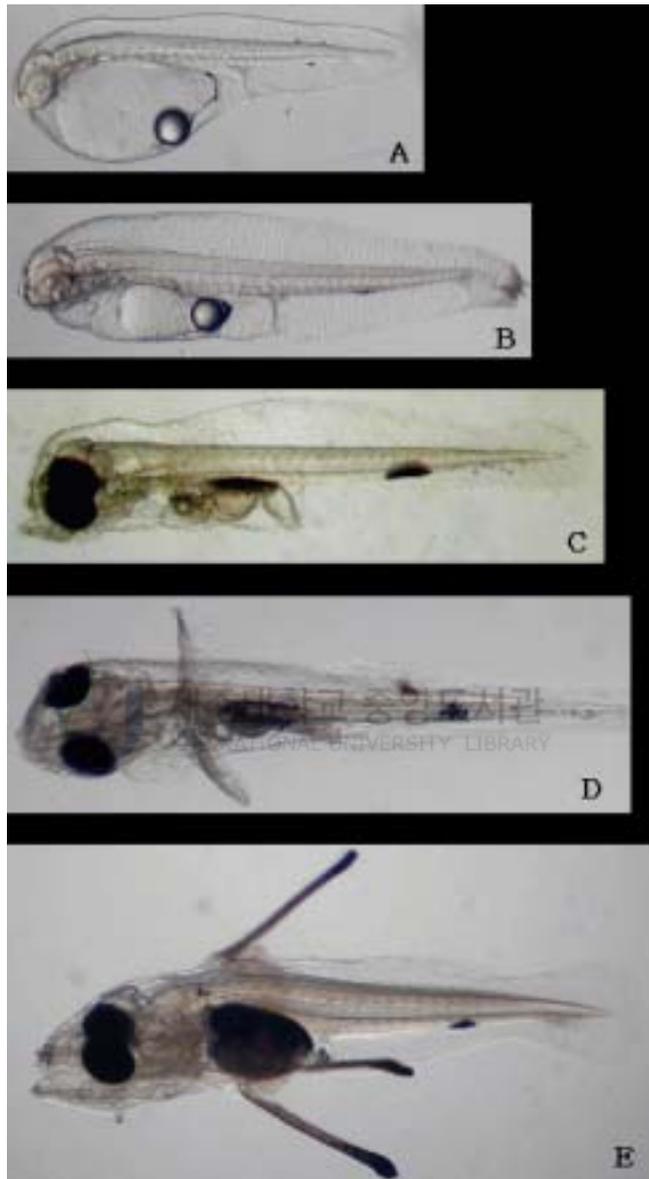


Fig. 27. Microscopic photographs of growth of *E. septemfasciatus* larvae. A, newly hatched larva, 1.75 mm TL; B, two days old larva, 2.46 mm TL; C, four days old larva, 2.72 mm TL; D, nine days old larva, 2.94 mm TL, E, twenty four days old larva, 5.12 mm TL.

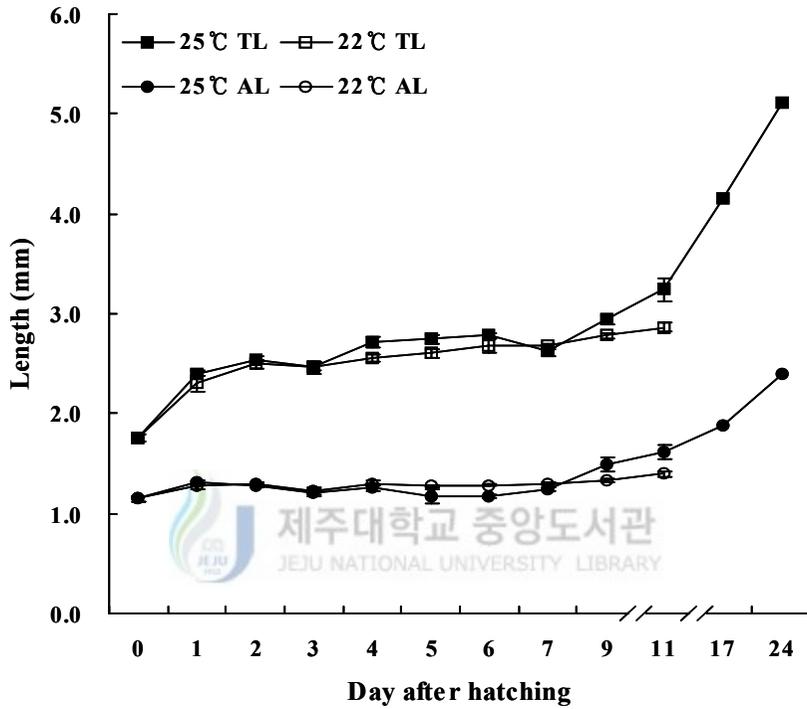


Fig. 28. Growth patterns in total length (TL) and anal length (AL) of *E. septemfasciatus* larvae at two water temperatures. Vertical bar denotes standard error of means.

## IV. 고찰

### 광주기·수온 조절을 통한 성 성숙 유도

어류의 성 성숙 및 산란을 제어하는 요인으로 내적 요인과 함께 환경요인으로 광주기와 수온이 깊이 관여하고 (Nish, 1979), 대부분 어류는 광주기의 계절적 변화 패턴에 따라 생식 활동 특성을 가진다 (Bromage et al., 2001). Aida (1991)는 수온과 광주기 등의 환경요인과 관련하여 어류의 산란형태를 춘계, 준하계, 하계, 춘추계, 추계, 동계 산란형으로 나누었다. 열대 및 아열대 지역에 서식하는 능성어류의 자연산란 특성은 산란시기에 달주기 (lunar cycle)에 따라 산란리듬을 가지는 *E. polyphekadion* (Rasem et al., 1997), *E. merra* (Lee et al., 2002)와 연중 산란하는 *E. suillus* (Toledo et al., 1993), 그리고 일정기간동안 산란하는 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), 불바리 (Kim and Park, 1993; Okumura et al., 2002)와 같이 서식장소와 종에 따라 다양하다.

하계산란종인 그물코쥐치 *Rudarius ercodes* (Lee et al., 1984)는 장일광주기 (13L 이상) 처리로 성 성숙이 유도되었으며, 추계산란종인 *Salvelinaus fontinalis* (Carson and Hale, 1973)와 무지개 송어 (Davies and Bromage, 1991)는 일장이 짧아짐에 따라 성 성숙이 유도되고, 수온 자극으로 산란하였다. 해산어류에서 동계에 성숙하는 조피볼락 (Park, 2000)은 단일조건과 수온 조절을 통해 자연조건 보다 2개월 이상 조기 산출을 유도하였다. 춘하계 산란형인 감성돔 (Hwang, 1999)은 수온 16.7℃, 광주기 14.0L:10.0D 조건으로 조절된 결과 자연조건보다 37일 조기 산란을 유도하

였으나, 광주기와 수온 조건 중 어느 하나만을 주었을 때 생식소 발달과 산란이 일어나지 않았다. 춘계산란형인 넙치 (Kim and Hur, 1991)와 참돔 (Kim and Kim, 1990)의 경우 광주기와 수온 조절로 자연 상태보다 약 1~2개월 조기 채란이 가능하였다.

이 연구에서는 하계산란형에 속하는 제주산 능성어의 경우, 성숙과 산란 유도를 위해 3월에 장일광주기조건 (14.0L:10.0D)과 수온 (21.0±0.5℃) 조절을 수행한 결과, 자연에서의 성숙시기보다 2~3개월 빠른 4~5월에 성숙된 개체를 유도할 수 있었다.

#### 호르몬 처리에 의한 인공배란 유도

양식 대상 어종의 전제 조건은 사육 수조에서 성 성숙 제어에 필요한 시기에 수정란 공급이 가능해야 한다 (Bromage and Roberts, 1995). *E. polyphkadion*은 홍해지역 (James et al., 1998)에서 3~8월, 폴리네시아 (Aquacop et al., 1989)에서 12~3월에 자연산란 하였으며, 필리핀 지역에 서식하는 *E. suillus* (Toledo et al., 1993)는 사육수조에서 연중 산란하였고 가두리에서 4개월 이상 산란 하여, 능성어류인 경우 산란은 지역, 위도 등에 따라 같은 종이라도 시기 및 기간이 다르다. 붉바리는 우리나라의 완도 지역 (Kim and Park, 1993)에서는 7월 초부터 8월 중순까지, 여수지역 (Kim and Kim, 1993)에서는 6월 중순부터 8월 초까지 수조내 자연산란 하였다. 일본 오카야마현에서는 수온 19~20℃인 6월에 시작하여 26~27℃내인 9월초까지 자연산란 하였다 (Kayano 1996; Okumura et al., 2002). 제주도에서 능성어의 수조내 자연산란 기간은 주로 7~8월 이었다.

수조에서 사육하는 *E. tauwina* (Hussain and Higuchi, 1980) 그리고 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), 능성어 (Shein, 2000)에서 난모세포의 성

숙 및 배란이 유도되지 않거나 산란행동장애에 따른 난질 저하 등이 발생하였다. 어미사육에서 난질저하 원인은 어미의 건강상태, 성비 불균형 및 산란에 적합한 사육 수심 등 부적합한 환경요인으로 추정하고 있다 (Toledo et al., 1993; Okumura et al., 2002).

이와 같은 문제점 해결방안으로 호르몬을 사용하여 어류의 성숙 및 배란 유도를 시도하고 있고, 처리방법으로는 경구투여 및 주사, implantation 방법을 이용하여 *Pleuronectes ferrugineus* (Larsson et al., 1997), *Salmo salar* (Crim et al., 1983), 자주복 (Chuda et al., 1997) 등에서 시도되고 있으며, 어류의 뇌하수체, hCG, LHRHa/GnRHa 등이 사용되고 있다.

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

이 연구에서 제주산 능성어 암컷에 50  $\mu$ g LHRHa/kg BW와 500 IU hCG/kg BW를 각각 처리하여 난 성숙 및 배란 유도를 할 수 있었다. 자바리와 능성어 (Takaya and Arakawa, 1987)를 대상으로 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) 150 IU/kg BW과 hCG 1,000 IU/kg BW를 각각 3회와 1회를 동시에 처리하여 인공배란이 가능하였고, 능성어

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



난 성숙 및 배란 유도를 하기위한 호르몬 처리 시기는 어종에 따라 차이가 있다 (Harmin and Crim, 1992). 난경 분포에 따라 호르몬 처리가 성숙 및 배란에 미치는 영향을 조사한 실험에서, 난경 400~500  $\mu$ m의 난모세포를 가진 *E. aeneus* (Hassin et al., 1997)와 *C. altivelis* (Sugama and Ikenoue., 1999)를 대상으로 LHRHa와 GTH를 처리하여 산란을 유도하였다. *E. marginatus* (Marino et al., 2003)는 난경 350~450  $\mu$ m일 때 GnRHa implant를 삽입한 경우 성 성숙 유도가 가능하였고, *E. fario* (Kuo et al., 1988)와 *E. microdon* (Tamaru et al., 1996)는 각각 난경이 550  $\mu$ m와 400  $\mu$ m 이었을 때 hCG 처리를 통해 성숙 및 배란 유도가 가능하였다. 능성어 (Shein, 2000)의 경우 난경 440  $\mu$ m 이하에서 LHRHa를 처리했을 때는 배란 유도가 되지 않았다.

이 연구에서 성 성숙한 능성어 생식소내 난모세포 변화를 조사한 결과

300~500  $\mu\text{m}$  (평균 460  $\mu\text{m}$ ) 내외 크기를 가진 능성어 암컷에 LHRHa와 hCG 처리로 성숙 및 배란 유도를 할 수 있었다.

호르몬 처리 후 배란 까지 소요 시간은 종에 따라 차이를 가진다. 붉바리 (Tseng and Ho, 1979)와 *E. striatus* (Tucker et al., 1991)는 hCG 처리 후 배란까지 소요시간은 각각 38~67시간과 48~51시간이 소요되었다. *E. marginatus* (Marino et al., 2003)와 능성어 (Shein, 2000)에서 GnRH $\alpha$  implant와 LHRHa를 삽입 후 성 성숙을 유도 하는데 각각 70~80시간과 36~42시간이 소요되었다. 이 연구에서 제주산 능성어에 LHRHa를 처리한 경우 2일후 성숙한 알이 배란되었으며, 5일후 과숙란이 배란되었다. hCG를 처리한 실험구에서는 처리 24시간이 경과 후 난경이 증가하기 시작하여 48시간 후에 양질의 알이 배란되었다. 이와 같은 호르몬 처리 후 배란 유도 까지 소요시간 차이는 종에 따른 차이가 있으나, 사육조건, 호르몬 종류와 농도 차이도 하나의 원인으로 생각된다.

*E. tauvina* (Hussain and Higuchi, 1980)와 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990)의 자연 산란된 알의 수정률 및 부화율은 9~24%이었다. 제주산 능성어 (Song et al., 2001)에서 자연 산란된 알의 부상률은 3~29%이었으며, 수정률은 0~80%이었다. 호르몬을 사용하여 인공채란 했을 때, hCG 처리한 *E. microdon* (Tamaru et al., 1996)에서 배란된 알의 수정률은 33~99%이었으며, 부화율은 90% 이하였고, LHRHa 처리한 능성어 (Shein, 2000)에서 인공채란 했을 때 수정율 및 부화율은 각각 70%와 80%이었다.

이 연구에서 제주산 능성어 암컷에 hCG 처리로 배란된 알 중 부상란은 1,360 mL로 부상률은 55%였으며, 인공수정 시켰을 때 수정율 및 부화율은 각각 56~95%와 70~98%로 수조내 자연 산란한 알 보다 수정률과 부상률이 높았다. 수조에서 자연 산란이 어렵거나 수정율과 부화율이 낮은 종에서 안정적인 수정란 확보를 위한 방법으로 호르몬 처리 방법이 유용할 것

으로 생각된다.

### 기능적 응성화 유도

능성어류는 자성선숙형 자웅동체 종이다. *E. tauvina* (Chao and Lim, 1991)는 7년생부터 암컷에서 수컷으로 성전환이 일어나기 시작하여, 만 10년에 이르렀을 때 완전한 수컷으로 기능을 하고, *E. marginatus* (Glamuzina et al., 2000)는 사육수조에서 자연적인 성전환이 일어나는 시기는 생후 14년부터 일어났다. *E. mario* (Randall and Heemstra, 1991)의 성전환은 생후 9년생, 체중 11 kg부터 성전환이 일어났고, 붉바리 (Kayano, 1996)는 전장 24~32 cm부터 성전환이 일어났으며, 대부분 40 cm 이상에서 수컷이 출현하였다. 능성어 (Tsuchihashi et al., 2003)는 체중 6 kg 이상부터 성전환이 일어났다. 능성어류 어미 사육에 수컷 확보가 어려워 응성호르몬을 사용하여 붉바리 (Hwang et al., 1998), *E. fario* (Kuo et al., 1988), *E. tauvina* (Chao and Chow, 1990), *E. coioides* (Yeh et al., 2003) 등에서 성전환을 유도하여 정자를 확보하는 연구들이 진행되고 있다.

성전환을 유도하기 하기 위한 호르몬 처리 방법으로는 경구투여, 주사 그리고 implantation 방법 등이 있으며, 호르몬의 종류와 처리량에 따라 성전환이 유도 성공 유무와 지속시간이 달라질 수 있다 (Kuo et al., 1988; Quintio et al., 1997). 응성 호르몬을 사용하여 성전환 및 기능적 수컷 유도 실험에서 경구투여 방법을 이용한 *E. tauvina* (Chao and Lim, 1991)와 *E. fario* (Kuo et al., 1988)의 성전환을 유도하였는데, 이때 많은 양의 호르몬을 장기간 처리해야 하는 문제점이 발생하였다. 주사 방법을 이용한 *E. suillus*의 성전환 유도 (Tan-Fermin et al., 1994)와 피하 주입 방법을 이용한 *E. tauvina* (Chao and Chow, 1990)와 능성어 (Tsuchihashi et al.,

2003) 성전환 유도를 하였다. 이 연구에서 제주산 능성어의 성전환 유도에는 cocoa butter를 이용하여 호르몬을 immersion화 시켜 어체 근육에 삽입하는 방법과 호르몬을 silastic capsule에 넣어 어체 복강내 삽입하는 방법으로 성전환 유도가 가능하였다. 이와 같은 방법은 성전환 유도에 들어가는 호르몬의 양과 어체에 미치는 stress를 최소화 할 수 있을 것으로 생각된다.

능성어류 성전환 유도에는 음성 호르몬으로서 MT가 주로 사용되며, 처리농도는 다양하다. 경구투여 방법을 이용한 성전환 유도에서 *E. tawina*는 1년에 145 mg MT/kg BW (Chen et al., 1997)과 7개월에 120 mg MT/kg BW (Chao and Chow, 1990) 농도로 처리했을 때 성전환 유도가 가능하였다. *E. tario*와 *E. salmonoides*의 성전환 유도에는 각각 70 mg MT/kg BW과 104 mg MT/kg BW 처리하였다 (Kuo et al., 1988). 주사방법을 이용한 성전환 유도에서 *E. suillus* (Tan-Fermin et al., 1994)는 30 mg MT/kg BW를 격주로 6회 주사 하였을 때 성전환 유도가 가능하였고, *E. tawina* (Chao and Lim, 1991)는 0.5 mg MT/kg BW의 silastic capsule을 제작하여 피하 주입 했을 때, 4개월 후 기능적 수컷으로 유도 할 수 있었다. *E. coioides* (Yeh et al., 2003)는 음성 호르몬 (17 $\alpha$ -methyltestosterone, testosterone, testosterone propionate)을 혼합하여 implant 방법을 이용했을 때, 10~20 mg androgens/kg BW 처리구에서 처리 후 90일에 완전한 수컷으로 성전환 유도를 할 수 있었고, 능성어 (Tsuchihashi et al., 2003)는 1.0 mg MT/kg BW과 4.0 mg MT/kg BW 농도로 피하주입했을 때, 1개월 후 기능적 수컷을 유도 할 수 있었으며, 2개월 후에 4.0 mg MT/kg BW 처리구에서 배정 유도를 할 수 있었다.

수컷으로 성전환된 능성어류의 GSI는 성숙시기 붉바리 (Tanaka et al., 1990) 수컷에서 0.5~0.6이었고, *E. fario* (Kuo et al., 1988) 수컷은 0.04였

다. 이 연구에서 성전환된 제주산 능성어의 배정유도가 가능한 시기의 GSI는 각각 1.0과 2.0 mg MT/kg BW 실험구에서 0.11~0.12이었다. 자성선속형 자웅동체어류인 놀래기류에서 성숙시기에 1차 수컷보다 성전환된 2차 수컷의 정소 중량이 낮은 것은 성전환 수컷의 정소구조가 난소강이 성전환된 정소의 중앙에 위치하고 정자형성은 난소 소낭에서 이루어지며 기부에 수정관을 형성하는 구조를 가지는 구조적 특징으로 해석하고 있다 (Lee et al., 1993).

이 연구에서 미성숙한 제주산 능성어를 대상으로 주사 방법을 이용하여 0.5~2.0 mg MT/kg BW 처리했을 때 모든 개체가 처리시기에 상관없이 성전환이 유도됐다. 배정 유도는 생식소의 배우자 형성 활성 초기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월)에 1.0~2.0 mg MT/kg BW를 처리한 실험구에서는 8주 후부터 운동성을 가진 정자가 배정되었다. 산란시기에 가까운 4~5월에 1.0~2.0 mg MT/kg BW를 처리한 실험구에서는 9~11주 후에 배정되었다. 1월에 silastic capsule을 이용한 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 1.0 mg MT/kg BW 주사 처리구보다 2주 늦은 10주 후에 정자가 배정되었다.

능성어를 대상으로 성전환 유도는 0.5~2.0 mg MT/kg BW 처리한 모든 실험구에서 가능하였으나, 배정 유도는 1.0~2.0 mg MT/kg BW 처리구에서만 가능하였다. 0.5 mg MT/kg 처리구에서 성전환은 유도되었으나, 운동성을 가진 정자로 분화가 덜된 것으로 생각된다. 그리고 옹성 호르몬 처리에 의한 성전환 유도는 양성능 (bipotentiality)을 가지는 생식원세포가 항상 존재하기 때문에 연중 가능하였으며, 처리시기에 따라 배정 유도까지 소요시간은 다소 차이가 있었다.

## 인위적 성전환에 따른 혈중 스테로이드 호르몬의 변화

일반적으로 어류에서 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)는 암컷 특이 성 스테로이드 호르몬이고 11-KT는 수컷 특이 성 스테로이드 호르몬으로 알려지고 있는데, *E. coioides* (Yeh et al., 2003) 암·수컷의 혈중에서 E<sub>2</sub>와 11-KT가 검출되었다. 이 연구에서 능성어의 성전환 유도과정 중 대조구에서 T 혈중 농도 변화는 시작시 0.216 ng/mL에서 종료 때에는 0.085 ng/mL로 감소하였다. MT 처리구의 T 혈중농도는 대조구보다 2주 후부터 6주 후까지 높았으나 (P<0.05), 8주 후부터 대조구와 유사하였다 (P>0.05). 11-KT 혈중농도는 대조구에서는 실험기간 동안에 0.029~0.059 ng/mL로 낮았으나, MT 1.0 처리구는 2주 후부터 6주째까지 0.110~0.232 ng/mL, 2.0 mg MT/kg BW 처리구는 2주 후부터 실험 종료 때까지 0.112~0.240 ng/mL로 대조구보다 높았다 (P<0.05). 능성어인 경우도 *E. coioides*처럼 미성숙 개체에서 11-KT가 검출되었는데 자웅동체어의 성적 특징의 하나로 생각된다. 능성어에서 MT 처리에 의한 성전환 유도과정에서 T와 11-KT의 농도변화로 볼 때, MT는 생식원세포 (gonia cell)가 정모세포로 분화를 유도하였고 T, 11-KT는 정자형성과 수정관 분화에 영향을 주는 것으로 생각된다.

## 정자

능성어의 정자의 두부 형태는 구형으로 넙치 (Zhang et al., 2003)와 turbot (Dreanno et al., 1997)의 정자 형태와 유사하였고, 두부의 직경은 1.3~1.5  $\mu$ m로 자주복 (Suquet et al., 1993), Tubot (Dreanno et al., 1997), 감성돔 (Chang et al., 1998), 넙치 (Zhang et al., 2003)의 두부 크기 1.2~1.5  $\mu$ m 와 비슷하였다.

어류 정액의 물리적, 화학적 특성은 정자 보존에 적절한 희석액의 기본 조성을 결정하는 기본요소인데, 어종에 따른 정장의 pH는 해산어류인 자주복 (Chang et al., 1998) 그리고 감성돔 (Chang, 1997), 문치가자미 *Limanda yokohamae* (Kho et al., 1997)는 8.0~8.3이었고, 송어 *M. cephalus* 7.4 (Chao et al., 1975; Chang et al., 1999b), 기수성 어류인 *Odontesthes bonariensis* 8.3 (Strussmann et al., 1994)이었으며, 잉어과 어류는 8.1~8.5 (Lahnsteiner et al., 1994)로 서식장소와 어종에 따라 특이적으로 나타났다. 정장의 삼투압 농도는 담수어류인 금붕어 *Carassius auratus*와 잉어는 각각 317과 302 mOsm/kg (Morisawa, 1985)이었고, 황복 *T. obscurus*는 266 mOsm/kg (Chang et al., 1999a)이었고, 해산어류인 복섬 *Fugu niphobles*, 감성돔, 문치가자미, 송어, 자주복은 각각 342, 359~382, 351, 370, 383 mOsm/kg (Morisawa, 1985; MAF, 1997; Kho et al., 1997; Chang et al., 1998; Chang et al., 1999b)로 담수어류에 비해 해산어류의 정장 삼투압 농도가 40~80 mOsm/kg 높았다.

감성돔 (MAF, 1997)의 경우 정장 pH 8.3, 혈장 pH 7.3으로 정장이 혈장보다 pH가 1.0 높은 약 알칼리성 이었으며, 삼투압 농도는 정장 382 mOsm/kg, 혈장 342 mOsm/kg으로 정장 삼투압 농도가 혈장보다 40 mOsm/kg 정도 높았다. 능성어 혈장내 pH와 삼투압 농도는 각각 7.30과 395 mOsm/kg이었다.

### 정자 냉동보존

어류 정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 중요 요소는 어종에 적합한 희석액, 동해방지제의 제조 및 사용, 평형시간, 해동 온도 처리 등이 있다.

정자를 냉동보존하기 위한 희석액의 갖추어야 할 요건은 삼투압 농도 차

이로 정자 활성화를 방지하고, 성분도 정장의 이온 조성파 유사해야 한다 (Jamieson., 1991). 담수어류 정자는 정장보다 낮은 삼투압 농도에서 운동성이 높고, 해산어류 정자는 정장과 같은 등장액 또는 고장액에서 운동성이 높다 (Morisawa et al., 1983; Strussmann et al., 1994).

정자 냉동보존에 희석액으로서 삼투농도가 287 mOsm/kg인 5% glucose가 복잡 (Gwo et al., 1993) 및 연어과 어류 (Piironen, 1993), 감성돔 (Lim et al., 1997) 에서 우수한 보존 효과를 나타낸 것과 유사하게 이 연구에서도 다른 희석액에 비해 보존효과가 높았다. 정자 냉동보존 희석액으로서 Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* (Gwo et al., 1991)는 sodium chloride와 glucose 및 sucrose, *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla et al., 1987)은 Mounib's solution과 MFRS, 황복 (Chang et al., 1999a)은 MFRS, 자주복 (Chang et al., 1998)은 Alsever's solution, 넙치 (Zhang et al., 2003)는 Stain's extender가 냉동보존에 양호하여 희석액에 따라 종 특이성을 보여준다.

정자 냉동보존에서 동해방지제가 갖추어야 할 요건으로는 동해방지, 친수성과 높은 세포막 투과성, 정자에 대한 독성이 낮아야 한다 (Jamieson, 1991). 동해방지제로서 glycerol, DMSO, ethylene glycol, methanol 등이 사용되고 있으며 각각 종 특이성을 보이는데, Glycerol은 무지개 송어 (Stoss and Holtz, 1983)와 능성어류 *E. tawina* (Chao et al., 1992) 정자에 독성을 가지는 반면, Atlantic halibut (Bolla et al., 1987)와 yellowfin seabream *A. australis* (Thorogood and Blackshaw, 1992), 넙치 (Zhang et al., 2003)에 적합한 동해방지제로 알려져 있다.

DMSO는 세포내로 투과속도가 빠르고, 냉동이나 해동 과정에서 정자 활성에 미치는 영향이 적어 (Jamieson, 1991), turbot (Dreanno et al., 1997) 과 넙치 (Zhang et al., 2003) 등 대부분의 해산 어류에 사용되고 있으나,

온수성 담수어류인 *Sarotherodon mossambicus*에는 부적합하였다 (Harvey 1983). 제주산 능성어 정자 냉동보존에는 DMSO가 동해방지제로서 적합하였다. 난황이나 BSA (Bovin Serum Albumin) 등 유기물 성분을 포함한 동해방지제는 세포막과 결합하여 냉동과정 중에 세포 상해를 방지하여준다 (Babiak et al., 1995). 동해방지제로서 Turbot (Dreanno et al., 1997)은 10% BSA가 적합하였다. 능성어 정자 냉동보존에 동해방지제로 난황성분이 들어있는 TYB를 이용했을 때 DMSO와 효과차이는 없었으나 ( $P>0.05$ ), 일부 정자 엉킴 현상 (aggregation)이 관찰되었다.

냉동보존된 정자의 해동 후 운동성에 영향을 미치는 요인으로는 평형시간 (Harvey, 1983)과 해동온도 (Caylor et al., 1994)가 관련 있다. 어류 정자는 크기가 매우 작아 동해방지제가 세포내 빠르게 침투하므로 (Morisawa, 1985), 냉동보존 시기에 평형시간이 길어질수록 해동 후 정자의 운동성은 감소한다 (Gwo, 1994). 냉동 정자의 해동온도가 너무 낮으면 세포내 recrystallization 현상이 일어나고, 너무 높은 경우 세포가 탈수된 물이 재흡수 시간 부족으로 동해를 입어, 해동 후 정자 활력이 감소한다 (Jamieson 1991). Caylor et al. (1994)은 어류 냉동정자의 해동온도는 28~37°C 범위가 적합하다고 하였다. 이 연구에서 평형 시간을 1분 이내로 하고 해동온도를  $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 했을 때, 냉동 보존된 능성어 정자의 운동성은 대부분 해동 후 20~60분 사이에 높았고, 해동 후 2시간 까지 운동성을 가진 정자도 있었다.

어류의 냉동정자를 해동하여 인공수정을 했을 때, 황복 (Chang et al., 1999a), 넙치 (Zhang et al., 2003), 무지개송어 (Cabrita et al., 2001) 등에서 수정률과 부화율은 신선한 정자를 이용했을 때 보다 낮았으나. 제주산 능성어의 경우 GDS와 PDS 처리 정자는 수정률과 부화율이 각각 93.9~97.7%와 94.0~97.0%로 대조구와 유사하였다 ( $P>0.05$ ). 냉동 후 해동된 정

자의 수정률과 부화율은 동해방지제, 희석제, 해동방법 및 시간, 해동후 정자 운동성 등에 영향을 받아 종 특이적인 것으로 사료된다.

### 수정란 발생

어류의 수정란 크기는 자어의 크기, 색이능력, 기아내성, 먹이 크기의 범위 및 포식자로부터의 도피 능력 등 자연생태계에서 자어의 생존 적응력을 높일 수 있는 중요한 요인이다 (Kayano, 1996). 수정란 크기는 어종에 따라 다양하고, 동일종에서도 수정란의 크기는 개체군, 산란시기, 어미 연령 등에 따라 차이가 난다 (Hamamoto et al., 1986).

능성어류에서 동일종이라도 서식지역에 따라 수정란 크기는 차이를 가지는데, *E. polyphkadion* 난경은 홍해지역 (Rasem et al., 1997)에서 0.71~0.79 mm이었고, 프랑스 Polynesian (Aquacop et al., 1989)에서는 평균 0.86 mm이었다. *E. coioides* 난경은 홍해지역 (Hussain et al., 1975)에서 0.77 mm이었고, 필리핀 해역 (Toledo et al., 1993)에 서식하는 경우 평균 0.84 mm이었다. 이와 같이 동일종이라도 고염분 (42~43‰) 지역에 서식하는 경우 난경이 작아지는 경향을 나타내었다. 우리나라에 서식하는 붉바리 난경은 0.77 mm (Lee et al., 1997)이었고, 이 연구에서 제주산 능성어의 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 난경은 0.76~0.88 mm (평균 0.82 mm), 유구경 0.17~0.220 mm (평균 0.19 mm)로 Kitajima et al. (1991)의 보고와 유사하였다.

수정란의 난 발생 속도 및 부화율 등에 영향을 주는 요인은 수온 이외에 염분농도, 조도, aeration 등에 영향을 받는다. *E. striatus* (Watanabe et al., 1998)는 수온 26~30℃에서 25~20시간 소요되고, *E. polyphkadion* (Rasem et al., 1997)은 수온 29~30℃에서 19시간 소요되었다. 이 연구에

서 제주산 능성어인 경우 부화하는데 수온 22℃에서 46시간, 25℃에서 35시간 소요되었다. 수온에 따른 부화율 차이는 없었으나 ( $P>0.05$ ), 수온 22℃와 염분 18‰ 조건에서 부화율이 가장 낮았다 ( $P<0.05$ ).

## 자어 발달

부화 직후 복부에 난황과 유구를 가진 능성어 자어는 전장 1.75~2.40 mm이었고, 항문은 몸 후방에 위치하였다. 난황은 자어의 초기발달 에너지원으로서 난황이 큰 자어는 많은 양의 에너지를 보유할 수 있어 난황이 작은 자어에 비해 먹이를 섭취할 수 있는 시간적 여유가 많고 (Bagarinao, 1986), 첫 먹이 섭취시 자어의 크기가 상대적으로 크기 때문에 먹이 섭취 가능성이 높아 생존에 유리하다 (Hunter, 1981; Quattro and Weeks, 1991).

어류의 난황 흡수 속도는 사육조건에 따라 다른데, 아열대성 어류인 능성어류와 독가시치류는 온대성 어종에 비해 상대적으로 적은 난황을 보유하고 난황흡수는 빠르게 진행된다 (Bagarinao, 1986). 붉바리가 수온 25~29℃에서 부화 후 24시간 경에 90% 내외의 난황을 흡수하였고, 부화 후 84~60시간에 99% 이상 난황을 흡수하였다 (Lee and Hur, 1997). 이 연구에서 능성어는 수온 25℃ 조건에서 48시간 이내에 대부분 난황이 흡수되었으나, 22℃ 조건에서는 부화 후 72시간까지도 일부 난황이 존재하였다.

유구의 흡수는 난황보다 다소 늦게 흡수되는데 (Kuo et al., 1974), 난황 흡수기에 비교적 늦게 이용되는 triglyceride와 깊은 관련이 있다고 하였다 (Fyhn, 1989; Clyde et al., 1992). 능성어 유구 흡수는 부화 후 수온 25℃에서 96시간 이전에 모두 흡수되었으나, 수온 22℃에서 개구후에도 일부 남아있었다.

붉바리 개구시간은 수온 23~31℃에서 부화 후 62~42시간 (Lee and

Hur, 1997), 수온 20~28℃ 에서 84~46시간 이었다 (Kayano, 1988). 이 연구에서 능성어 개구 시간은 수온 22~25℃에서 96~72시간 이었다. Shirota (1970)의 방법에 따라 계산한 개구시 능성어 자어 구경 (d)은 0.209 mm이었으며 0.5d는 0.105 mm로 붉바리 (Kayano, 1988; Lee and Hur, 1997) 자어의 먹이 섭취시 최소 구경 (0.5d) 0.078 mm 보다는 컸다.

부화 7~10일에 등지느러미와 꼬리지느러미가 분화되었으며, 소화관이 전반부와 후반부로 분화 발달 하였다. 부화 17~23일에 전장 4.15~5.12 mm로 성장하고 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 신장 돌출하여 능성어류의 지느러미 변태 특징을 보였다. Kitajima et al. (1991)은 능성어 자어가 8 mm 전후시기에 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 각각 체장의 90%, 75%로 최대 신장하고 이후 성어와 유사한 상대성장을 한다고 하였다. 능성어류 자어의 변태과정에서 등지느러미 제2극조 변화는 *C. altivelis* (Sugama and Ikenoue, 1999)는 체장의 120%까지 신장하고, *E. tauvina* (Hussain and Higuchi, 1980)에서 전장의 48%까지 신장하였다.

## 자어사육

능성어 부화자어는 수표면 근처에서 유영하다가 수표면의 장력으로 표면에 부착되어 사망하는 개체들이 출현하였으며, 붉바리 (Yamaoka et al., 2000)의 자어사육에 있어서도 초기 대량폐사의 원인으로 알려져 있다. 이 연구에서 수표면의 장력을 방지하기 위해 피드오일 (Feed oil)을 사용하여 수표면에 유막을 만들어 사육하였다.

사육수 (25.0±0.5℃) 환수는 부화 직후부터 3일까지는 지수 상태를 유지하였고, 그 후 매일 사육수의 약 10~30%를 부분 환수하였다. 능성어류 자어 사육에서 초기 먹이밀도에 따른 먹이섭취는 5일된 *E. coioides*와 *E.*

*suillus* (Duray, 1994) 자어는 로티퍼를 20개체/mL 밀도로 공급했을 때 100%의 섭취하였으나, *E. taurina* (Randall and Heemstra, 1991) 자어는 5개체/mL의 로티퍼 밀도에서는 먹이를 섭취한 개체는 거의 없었다. 이 연구에서 자어 먹이로 부화 후 3일째부터 로티퍼 (크기 110~210  $\mu\text{m}$ )를 15개체/mL 밀도로 공급했을 때, 첫 먹이를 섭취한 개체는 부화 후 4일째 관찰되었다.

부화 후 15일째부터 초기 인공사료 (150  $\mu\text{m}$  내외)와 부화 후 16일째부터 *Artemia* (2~3 개체/mL 사육수)를 로티퍼와 함께 공급하였으며, 이후 자어가 성장함에 따라 점차 인공사료의 크기를 증가시켰다. 앞으로 능성어 종묘생산 체계를 구축 하기위해 자치어의 안정적인 사육생태조건 확립에 관한 연구수행이 요구된다.



## V. 요약

제주연안에 서식하는 능성어 *Epinephelus septemfasciatus*는 급격한 자원 감소로 자원회복과 양식산업화를 위한 종묘생산 기술개발이 필요하다. 이 연구는 능성어 종묘생산 기술개발을 위하여 어미관리 그리고 배란 유도, 성전환 유도, 정자 냉동보존, 난 발생 및 자어발달에 관한 연구를 수행하였다.

### 1. 어미관리

능성어 어미 21마리 (전장  $66.6 \pm 4.4$  cm, 체중  $5.30 \pm 1.24$  kg)를 반순환 여과시스템 사육환경조절로 2001년 12월부터 2002년 5월까지 사육하였다. 광주기와 수온은 실험 시작 12월에 각각 9.5L:13.5D와  $15.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 에서 3월에 성숙산란조건으로 각각 14L:10D와  $21.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 조절하여 4~5월에 성숙을 유도하였다.

### 2. 난 성숙 및 배란 유도

능성어 어미의 성숙도를 cannulation 으로 조사하고 평균  $400 \mu\text{m}$  이상 난모세포를 가진 어미를 대상으로 hCG 500 IU/kg BW로 주사하여 성숙 및 배란 유도를 수행하였다. hCG 처리 전 난경  $300 \sim 500 \mu\text{m}$  (평균  $461.1 \pm 6.6 \mu\text{m}$ )에서 처리 후 24시간에 난경  $300 \sim 700 \mu\text{m}$  (평균  $509.6 \pm 11.8 \mu\text{m}$ ), 48시간 경과 후 난경  $800 \mu\text{m}$  이상 91.3~98.8%이었다. hCG 처리 실험어 8마리 중 7마리가 배란되어 배란율은 87.5%였고, 총 배란된 알 2,480 mL에서 부상란은 1,360 mL로 부상율은 54.9%이었다.

### 3. 기능적 응성화 유도

17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) 0.5~2.0 mg/kg BW 농도로 능성어 (전장 28.2~65.0 cm, 체중 0.58~3.92 kg)에 주사와 실리콘튜브삽입 방법으로 성 전환 및 기능적 응성화 유도를 수행하였다. 생식소의 초기 성장기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월), 그리고 성숙시기 (4~5월)에 MT 1.0~2.0 mg/kg BW 농도 처리 개체에서 정자가 배정되어 기능적 응성화가 유도 되었다.

### 4. 정자 냉동보존과 수정

능성어 정자는 두부와 꼬리부로 구분되며, 두부는 구형이고 크기가 1.3~1.5  $\mu\text{m}$  이었다. 능성어 정자 냉동보존에 희석제 5% glucose와 동해방지제 DMSO를 사용하여 냉동보존 후 해동된 정자는 대조구보다 운성성은 낮았으나 ( $P < 0.05$ ), 수정률과 수정란 부화율은 대조구와 GDS 실험구에서 각각 94.9~97.6%, 94.2~97.0%로 유사하였다 ( $P > 0.05$ ).

### 5. 자어 발달

능성어 수정란은 구형의 분리부성란으로 난경 760~880  $\mu\text{m}$  (평균 821.8 $\pm$ 2.0  $\mu\text{m}$ ), 유구경 170~220  $\mu\text{m}$  (평균 192.9 $\pm$ 0.9  $\mu\text{m}$ )이었다. 수온 25.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 부화까지 소요시간은 35시간이었고, 부화 직후 자어는 전장 1.75 mm 이었다. 난황 및 유구는 부화 후 3일 이내에 대부분 흡수되었다. 부화 후 3~4일에 자어는 전장 2.48~2.72 mm로 입과 항문이 열렸고, 구경 (d)은 0.209~0.238 mm 이었다. 부화 후 11~17일에 전장 3.24~4.15 mm로 등지느러미 제2극과 배지느러미 극이 출현·신장하여 변태를 시작하였고, 복부에 흑색소가 침적되었다. 부화 24일째 자어는 전장 5.12 mm 로 성장 하였다.

## VI. 참고문헌

- Aida, K., T. Kato and M. Awaji. 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon *Oncorhynchus masou*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 50 : 565~571.
- Aida, K. 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms in teleostei. Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph. 16 : 173~187.
- Aquacop, J. Fuchs, G. Nedelee and E. Gasset. 1989. Selection of finfish species as candidates for aquaculture in French Polynesia. Advances in tropical aquaculture. Actes de Colloques. IFREMER, 9 : 143~156.
- Babiak, I., J. Glogowski, M. J. Luczynski, D. Kucharczyk and M. Luczynski. 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. J. Fish Biol., 46 : 819~828.
- Bagarinao, T. 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. Marine Biology, 91 : 449~459.
- Baynes, S. M. and A. P. Scott. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa : the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. Aquaculture 66 : 53~67.
- Blaxter, J. H. S. and G. Hempel. 1963. The influence of egg size on

- herring larvae (*Clupea harengus* L.). J. Cons. int. Explor. Mer. 28 : 211~244.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture, 65 : 371~374.
- Bromage, N., M. Porter and C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture, 197 : 63~98.
- Bromage, N. R. and R. J. Roberts. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, pp. 424.
- Cabrita. E., V. Robles, R. Alvarez and M. P. Herraez. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture, 201 : 301~304.
- Carson. A. R. and J. G. Hale. 1973. Early maturation of brook trout in the laboratory. Prog. Fish Cult., 35 : 150~153.
- Caylor, R. E., P. M. Biesiot and J. S. Franks. 1994. Culture of cobia, *Rachycentron canadum*: cryopreservation of sperm and induced spawning. Aquaculture, 125 : 81~92.
- Chang, Y. J., H. K. Lim, Y. J. Chang and H. S. Kim. 1999a. Sperm cryopreservation and fertility of Post-thaw sperm in river puffer, *Takifugu obscurus*. J. of Aquaculture, 12 : 1~5. (in Korean)
- Chang, Y. J., Y. H. Choi, H. K. Lim and K. H. Kho. 1999b. Milt property and sperm motility of grey mullet (*Mugil cephalus*). J.

- Korean Fish. Soc., 32 : 238~241. (in Korean)
- Chang, Y. J., Y. J. Chang and H. K. Lim. 1997. Short-term preservation of sperm in the tiger puffer, *Takifugu rubripes*. J. of Aquaculture, 10 : 273~279. (in Korean)
- Chang, Y. J., Y. J. Chang and H. K. Lim. 1998. Physico-chemical properties of milt and fine structure of cryopreserved spermatozoa in tiger puffer (*Takifugu rubripes*). J. Korean Fish. Soc., 31 : 353~358. (in Korean)
- Chao, N. H., H. P. Chen and I. C. Liao. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. Aquaculture, 5 : 389~406.
- Chao, N. H., H. P. Tasi and I. C. Liao. 1992. Short and long term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). Asian Fish. Sci., 5 : 103~116.
- Chao, T. M. and M. Chow. 1990. Effects of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). Singapore J. Pri. Ind., 18 : 1~14.
- Chao, T. M. and L. C. Lim. 1991. Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 19 : 79~93.
- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim. 1997. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 5 : 1~21.
- Chuda, H., M. Matsuyama, Y. Ikeda and S. Matsuura. 1997. Development of maturation and ovulation-induction method in cultured tiger

- puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. Nippon Suisan Gakkaishi, 63 : 728~733. (in Japanese)
- Clyde, S. T., A. Harry and C. S. Lee. 1992. Fatty acid and free amino acid profiles of spawned eggs of stripped mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 105 : 83~94.
- Crim, L. W., D. M. Evans and B. H. Vickery. 1983. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40 : 61~67.
- Crim, L. W., J. J. Nestor Jr. and C. E. Wilson. 1988. Studies of the biological activity of LHRH analogue in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. Gen. Comp. Endocrinol., 71 : 372~382.
- Davies, B. and N. R. Bromage. 1991. The effects of fluctuating seasonal and constant temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout. In : Scott, A. P., Sumpter, J., Kime, D., Roffe, M. Eds., Proceeding of IV International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp., 91 : 154~157.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In : Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. Eds., Fish Physiology. Reproduction, Vol. IX B, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351~403.

- Dreanno, C., M. Suquet, L. Quemener, J. Cosson, F. Fierville, Y. Normant and R. Billard. 1997. Cryopreservation of turbot spermatozoa. *Theriogenology*, 48 : 589~603.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple-range test and multiple F test. *Biometrics*, 11 : 1~42.
- Duray, M. N. 1994. Daily rates of ingestion on rotifers and *Artemia* nauplii by laboratory-reared grouper larvae of *Epinephelus suillus*. *Philipp. Sci.*, 31 : 32~41.
- Duray, M. N., C. B. Estudillo and L. G. Alpasan. 1997. Larval rearing of the grouper *Epinephelus suillus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 150 : 63~76.
- FAO. 1993. FAO species catalogue Vol. 16. Groupers of the world. pp. 1~10. FAO Rome.
- Fyhn, H. J. 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy. *Aquaculture*, 80 : 111~120.
- Glamuzina, B. N. Glavić, P. Tutman, V. Kožul and B. Skaramuca. 2000. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1875). *Aquaculture International*, 8 : 551~555.
- Gwo, J. C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* spermatozoa. *Theriogenology*, 41 : 989~1004.
- Gwo, J. C., H. Kurokura and R. Hirano. 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 777~782.
- Gwo, J. C., K. Strawn, M. T. Longnecker and R. Connie. 1991.

- Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94 : 355~375.
- Hamamoto, S., K. Yokogawa and M. Tochino. 1986. Several problems on cultivating the parent fish of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schegel), and judging the qualities of the eggs obtained from them. *Bull. Kagawa Pref. Fish. Exp. Stn.*, 2 : 13~22.
- Harmin, S. A. and L. A. Crim. 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analogue (GnRHa) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture*, 104 : 375~390.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32 : 313~320.
- Hassin, S. D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar and D. M. Popper. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156 : 305~316.
- Hodson, R. and C. V. Sullivan. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24 : 389~398.
- Hunter. J. R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. in: *Marine fish larvae-morphology. Ecology and Relation to Fisheries* (ed. by R. I. Lasker). Univ. Washington Press. Seattle and London., 33~77.

- Hussain, N. A., M. Saif and M. Ukawa. 1975. On the culture of *Epinephelus tauvina* (Forsk.) . Kuwait Institute for Scientific Research, Kuwait., 12 pp.
- Hussain, N. A. and M. Higuchi. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) . Aquaculture, 19 : 339~350.
- Hwang, S. I, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho. 1998. Gonadal development and the effect of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. of Aquaculture, 11 : 173~182. (in Korean)
- Hwang, H. G. 1999. Biological studies on aquaculture of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). Ph.D. Thesis Cheju Nat'l. Univ., 144 pp. (in Korean)
- Jamieson, B. G. M. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York. pp. 319.
- James, C. M., S. A. AL-Thobaiti, B. M. Rasem and M. H. Carlos. 1998. Comparative growth of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* and camouflage grouper, *E. polyphakadioides* under hatchery and growout culture conditions. Asian Fisheries Science, 11 : 133~147.
- Kayano, Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Saibai. Giken., 3 : 55~60. (in Japanese)
- Kayano, Y. 1996. Yearly change in egg production of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in a rearing tank. Saibai. Giken.,

- 25 : 47~52. (in Japanese)
- Kayano, Y. and H. Y. Wan. 1996. Initial feeding and growth of larval red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Suisanzoshoku, 45 : 213~218. (in Japanese)
- Kho, K. H., Y. J. Chang and H. K. Lim. 1997. Effects of osmolality and  $Ca^{2+}$  on sperm motility in marbled sole, *Limanda yokohamae*. J. Korean Fish. Soc., 30 : 809~815.
- Kim B. H., K. M. Kim, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* I. The effect of hCG on ovulation induction. J. of Aquaculture, 10 : 55~61.
- Kim, H. B. and J. M. Kim. 1990. Induced spawning of red seabream, *Pagrus major* by controlling photoperiod and water temperature. J. of Aquaculture, 3 : 1~11. (in Korean)
- Kim, I. S., Y. Choi and B. J. Kim, 2001. Percoides fishes of Korea. Korea research institute of bioscience and biotechnology, Korea, pp. 279. (in Korean)
- Kim, S. H. and P. H. Kim. 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bulletin of NFRD, 101 : 162~167. (in Korean)
- Kim, S. G. and S. Park. 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bulletin of NFRD, 101 : 137~140. (in Korean)
- Kim, Y. and S. B. Hur. 1991. Spawning inducement of flounder, *Paralichthys olivaceus* by the control of water temperature and

- photoperiod. J. of Aquaculture, 4 : 85~95. (in Korean)
- Kitajima, C., M. Takaya, Y. Tsukashima and T. Arakawa. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. Jap. J. Ichthyol., 38 : 47~55. (in Japanese)
- Kuo, C. M., C. E. Nash and Z. H. Shehadeh. 1974. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 3 : 1~14.
- Kuo, C. M., Y. Y. Ting and S. L. Yeh. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. Aquaculture, 74 : 113~126.
- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi. 1984. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture, 37 : 267~273.
- Lahnsteiner, F., R. A. Patzner and T. Weismann. 1994. The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes. II. Composition of the seminal fluid. J. Fish Biol., 44 : 459~467.
- Lam, T. J. 1982. Application of endocrinology of fish culture. Can. J. Aquat. Fish. Sci., 39 : 11~137.
- Larsson, D. G. J., C. C. Mylonas, Y. Zohar and L. W. Crim. 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) induces multiple ovulation of high-quality eggs in a cold-water, batch spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54 : 1957~1964.
- Lee, C. K. and S. B. Hur, 1997. Yolk resorption, onset of feeding and

- survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. of Aquaculture, 10 : 473~483. (in Korean)
- Lee, T. Y., I. Hanyu and K. Furukawa. 1984. Effects of photoperiod and temperature on the gonadal activity in small filefish, *Rudarius ercodes*. Bull. Korean Fish. Soc., 17 : 523~528. (in Korean)
- Lee, Y. D., H. B. Go, H. B. Kim, I. S. Park and J. J. Lee. 1993. Sex reversal of protogynous hermaphrodite fish. Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ., 17 : 115~127. (in Korean)
- Lee, Y. D., S. H. Park, A. Takemura and K. Takano. 2002. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycle in the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra* in Okinawa waters. Fisheries Science, 68 : 872~877.
- Lim, H. K., K. H. Kho and Y. J. Change. 1997. Effect of diluents on the short-term storage of sperm in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. J. Korean Fish. Soc., 30 : 211~215. (in Korean)
- Lim, L. C., T. M. Chao and L. T. Khoo. 1990. Observations on the breeding of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.) in Singapore. Singapore Journal of Primary Industry, 18 : 66~84.
- MAF. 1997. Physiological activities and long- and short-term preservation of sperm in marine fishes. Ministry of Agriculture and Forestry Report, 39~80. (in Korean)
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finoia, Y. Zohar and C. C. Mylonas. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant, Aquaculture,

219 : 841~858.

- Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.*, 107 : 95~103.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2 : 605~615.
- Nish, K. 1979. A daily rhythm in the photosensitive development of the in the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 30 : 109~115.
- Okumura, S., K. Okamoto, R. Oonori and A. Nakazono. 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture*, 206 : 165~173.
- Park, M. E. 2000. Control of reproductive mechanism related to parturition of Black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Ph.D. Thesis, Thesis Cheju Nat'l. Univ., 130 pp. (in Korean)
- Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 48 : 337~350.
- Quattro, J. M. and S. C. Weeks, 1991. Correlations between egg size and egg energetic content within and among biotypes of the genus *Poeciliopsis*. *J. Fish Biol.*, 38 : 331~334.
- Quinitio, G. E., N. B. Caberoy, and D. M. Reyes Jr. 1997. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Isr. J. Aquaculture. Bamidgeh.*, 49 : 77~83.

- Randall, J. E. and P. C. Heemstra. 1991. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae). with descriptions of five new species. Indo-Pacific Fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum. Honolulu. Hawaii., pp. 322.
- Rasem, B. M. C. M. James, S. A. Al-Thobaiti and M. H. Carlos. 1997. Spawning of the camouflage grouper, *Epinephelus polyphkadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of Saudi Arabia. Asian Fisheries Science, 9 : 251~259.
- Shein, N. L. 2000. A new method for induction of ovulation using LHRH analogue in cultured sevenband grouper. MS. Thesis Nagasaki Univ., 53 pp. (in Korean)
- Sherwood, N. M., D. B. Parker, J. E. McRory and D. W. Lescheid. 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. In : Sherwood, N. M., Hew, C. L. Eds., Fish Physiology. Molecular Endocrinology of Fish, vol. VIII, Academic Press, New York, pp. 3~66.
- Shirota, A., 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 36 : 353~368.
- Song, Y. B., C. H. Lee, J. P. Seo and Y. D. Lee. 2001. Fall meeting of the korean aquaculture society : abstracts and Proceedings. (in Korean)
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolarity of the thawing

- solution. *Aquaculture*, 32 : 321~330.
- Strussmann, C. A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60 : 9~13.
- Suquet, M., G. Dorange, M. H. Omnes, Y. Normant, A. LeRoux and C. Jauvel. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoa of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Biol.*, 42 : 509~516.
- Sugama, K. and H. Ikenoue. 1999. Research and development: The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA., pp. 53.
- Takaya, M. and T. Aarakwa. 1987. Hormon treatment for spawning induction of *Epinephelus moara* and *E. septemfasciatus*. Bulletin of Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, 13 : 16~18.
- Tamaru, C. S., C. T. Carlstrom, Jr. W. J. Fitzgerald and H. Ako. 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper, *Epinephelus microdon* capture from spawning aggregations in the republic of Palau, Micronesia, *J. World Aqua. Soc.*, 27 : 363~372.
- Tanaka, H, K. Hirose, K. Nogami, K. Hattori and N. Ishibashi. 1990. Sexual maturation and sex reversal in red grouper, *Epinephelus akaara*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 17 : 1~15.
- Tan-Fermin, J. D. and L. M. B. Garcia and A. R. Jr. Castillo. 1994.

- Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes) by injections of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. Jap. J. Ichthyol., 40 : 413~420.
- Thorogood, J. and A. Blackshaw. 1992. Factors affecting the activation, motility and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Gunther). Aquacult. Fish. Manag., 23 : 337~344.
- Toledo, J. D., A. Nagi and D. Javellana. 1993. Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. Aquaculture, 115 : 361~367.
- Trounson, A. O. and D. K. Gardner. 2000. Handbook of in vitro fertilization : 2nd edi. CRC Press. 205~266.
- Tseng, W. Y. and S. K. Ho. 1979. Egg development and early larval rearing of red grouper (*Epinephelus akaara*, Temminck & Schlegel). Quarterly J. Taiwan Museum, 32 : 209~219.
- Tsuchihashi, Y., H. Tanaka, Y. Kuromiya, M. Kashiwagi and M. Yoshioka. 2003. Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51 : 189~196.
- Tucker, Jr. J. W., J. E. Parsons, G. C. Ebanks and P. G. Bush. 1991. Induced spawning of Nassau grouper, *Epinephelus striatus*. J. World Aqua. Soc., 22 : 187~191.
- Watanabe, W. O., E. P. Ellis, S. C. Ellis and M. W. Feeley. 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. J. World Aqua. Soc.,

29 : 393~404.

- Yamaoka, K., T. Nanbu, M. Miyagawa, T. Isshiki and A. Kusaka. 2000. Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. *Aquaculture*, 189 : 165~176.
- Yeh, S. L., C. M. Kuo, Y. Y. Ting and C. F. Chang. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218 : 729~739.
- Zhang, Y. Z., S. C. Zhang, X. Z. Liu, Y. Y. Xu, C. L. Wang, M. S. Sawant, J. Li and S. L. Chen. 2003. Cryopreservation of flounder, *Paralichthys olivaceus* sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60 : 989~996.
- Zohar, Y., and C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197 : 99~136.
- Zohar, Y., A. Goren, M. Tosky, G. Pagelson, D. Leibovitz and Y. Koch. 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo and in vitro studies. *Fish. Physiol. Biochem.*, 7 : 59~67.

## 감사의 글

대학이란 곳에 들어와 부족함이 많은 저를 학문의 길로 이끌어 주시고, 이 논문이 완성되기까지 언제나 자상한 가르침과 용기를 주신 이영돈 교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 중에도 논문의 체제를 바로 잡아주시고, 정성껏 다듬어 주신 노섭 교수님, 이정의 소장님, 김형배 교수님, 이경준 교수님께 깊은 감사드립니다. 그리고 늘 관심과 조언으로 격려를 아끼지 않으신 정상철 교수님, 이기완 교수님, 최광식 교수님께 진심으로 감사드립니다.

이 논문이 완성되기까지 능성어에 대한 많은 실험을 할 수 있도록 도와주신 주신 한라수산 석학령 사장님, 서종표 형님, 지보근님 그리고 직원여러분께 감사드립니다. 호르몬 분석에 많은 도움을 주시고 자상하게 가르쳐 주신 부경대학교 백혜자 교수님과 정자 냉동보존에 관한 많은 조언과 도움을 주신 마리아병원에 계신 이병문 선배님과 변정선 선생님께 깊은 감사 말씀드립니다. 항상 많은 조언과 격려를 아낌없이 보내주신 제주대학교 TIC의 김세재 교수님과 문상욱 박사님께 감사드립니다.

이 논문은 저만의 노력으로 이루어진 것이 아니라 발생학 실험실 식구들이 있었기에 이루어진 것이라 생각합니다. 이 논문이 완성되기까지 참으로 많은 시간동안 형제간처럼 동고동락하며 성심성의껏 도와주신 발생학실험실 식구들인 김병호 형님, 나오수 형님, 오성립 형님, 김성준 형님, 김봉원님, 이치훈님, 김한준님, 최정권님, 박창범님, 강지웅님, 진영석님, 허상우님, 김삼연님, 허성표님, 이권우님, 김재형님 과 멀리 외국에서 공부하고 있는 임봉수님, 박용주님, 문순주님 그리고 졸업생인 최영진 선배님, 김봉래 선

배님, 박성보님, 진숙자님, 한성민님에게 진심으로 감사의 말씀드립니다. 아울러 늘 옆에서 많은 조언을 해준 변수철 선배님과 (주)래피아텍의 강성종 사장님, 강순구 부사장님, 강성보 팀장님, 고희진님, 고범호님께도 감사의 말씀드립니다.

이 연구 수행에 큰 도움을 주신 제주대학교 해양과환경연구소 강태연 선생님, 김봉길 선생님, 고성대 선생님을 비롯한 직원 여러분께 진심으로 사의를 표합니다. 언제나 항상 곁에서 힘을 실어준 증식학과 90학번 친구들에게도 감사의 말씀드립니다.

오늘이 있기까지 어려운 여건에서도 항상 사랑과 희생으로 뒷바라지하시느라 고생하신 사랑하는 어머님과 누님가족, 형님가족, 동생가족, 그리고 항상 곁에서 힘을 실어준 한숙이에게 마음속 깊은 감사드리며, 지금은 여기 계시진 않지만 멀리 하늘나라에서 아들을 지켜보실 아버님 영전에 이 논문을 받칩니다.

