


석사학위논문

양식산 자주복, *Takifugu rubripes*의
인공 수정란 생산

 제주대학교 중앙도서관
제주대학교 대학원
수산생물학과

김성준

2005년 6월

양식산 자주복, *Takifugu rubripes*의
인공 수정란 생산

지도교수 이 영 돈

김 성 준

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2005년 6월

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

김성준의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 이 경 준 (인)

위 원 강 법 세 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

제주대학교 대학원

2005년 6월

Production of fertilized eggs
of cultured tiger puffer,
Takifugu rubripes

Sung-Jun Kim

(Supervised by Professor Young-Don Lee)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

June 2005

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험어 및 사육 환경	3
2. 난 성숙 및 배란 유도	3
1) 난모세포 발달 조사	3
2) LHRHa에 의한 배란 유도	4
3. 정자 냉동 보존	8
1) HCG에 의한 배정 유도	8
2) 정자 냉동 보존	8
4. 인공 수정	13
1) 정자의 수정률과 수정란 부화율	13
2) 해동 정자의 수정률과 수정란 부화율	13
5. 수정란 및 자어 발달	14
1) 수정란 배양과 발생 과정	14
2) 자어의 사육과 성장	14
6. 자료 분석	14

III. 결 과	16
1. 사육 환경	16
2. 난 성숙 및 배란 유도	17
1) 난모세포 발달	17
2) LHRHa에 의한 배란 유도	17
3. 정자 냉동 보존	20
1) HCG에 의한 배정 유도	20
2) 정자의 외부 형태	20
3) 냉동 정자의 특성	20
4. 인공 수정	23
1) 정자의 수정률과 수정란 부화율	23
2) 해동 정자의 수정률과 수정란 부화율	23
5. 수정란 및 자어 발달	26
1) 수정란 배양과 발생 과정	26
2) 자어의 사육과 성장	28
IV. 고 찰	30
V. 요 약	36
VI. 참고문헌	38

Abstract

The planned production of fertilized eggs was preceded for the purpose of commercial production of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. In this study, we conducted the broodstock management, induction of ovulation, cryopreservation of spermatozoa, fertilization, and larval development of the species for the development of the larviculture technique by artificial fertilized eggs.

Three year old broodstocks (42.67 ± 2.37 cm TL, 1.53 ± 0.19 kg BW) were distributed and managed in three circle tanks (5m diameter \times 1.5m depth) at a density of 20-21 fish per tank in SAJO CS Co., Ltd. Jeju, Korea.

Investigation of oocyte diameter of *T. rubripes* was conducted by cannulation method at 2 weeks intervals from January 9 to February 18, 2005. At the beginning of the investigation, oocyte diameters of the fish ranged from 710 to 760 μ m. After 6 weeks, oocyte diameters of the fish were gradually increased and reached over 900 μ m. For the induction of ovulation, fish with oocytes over 900 μ m were chosen and injected with luteinizing hormone releasing hormone analogue (LHRHa, 400 μ g/kg BW). Ovulation was induced from 6 out of 7 fishes treated with LHRHa. The average ovulation rate was 85.7%, and the total weight of the stripped eggs was 1,568g.

The cryopreservation of sperm was conducted to control fertilization time on account of the disagreement of mature timing between testis and ovary. The spermatozoa of *T. rubripes* are divided into head and tail part.

The head was elliptical shape and the size was 1.45 μ m. After cryopreservation with Alserver's solution, MFRS (marine fish ringer solution), 5% glucose and Ham's F-10 as diluents and DMSO (dimethylsulfoxide) and TYB (test yolk buffer) as cryoprotectants, 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 69.3% and 39.8% in the control, 57.5% and 30.2% in ATS (thawed sperm after cryopreservation with Alserver's solution as a diluent and TYB as a cryoprotectant) groups, respectively. Both fertilization and hatching rates in the ATS groups reached approximately 75% of those the control.

The fertilized egg of *T. rubripes* was adhesive-sinking spheres, and 1.2-1.3mm in oocyte diameter. Hatching began approximately 9-12 days after the fertilization at a water temperature of 16.0-17.0 $^{\circ}$ C.

The total length of newly hatched larvae was about 2.9mm TL. Their mouths were opened at 4 days after hatching (DAH), and the yolk and oil globules were almost absorbed within 10 DAH when fish reached about 4.3mm TL. The larvae reached about 5.4mm TL at 20 DAH, and the membrane fin began to differentiate at the time the dorsal, anal, and caudal fins. The larvae reached 9.8mm TL at 30 DAH, and developed 9 fin rays in caudal fin.

I. 서 론

자주복, *Takifugu rubripes*은 복어목 Tetraodontiformes 참복과 Tetraodontidae에 속하는 어류로서 우리나라 전 연안 및 일본 홋카이도 이남과 동중국해에 분포하며 전장 70cm 이상까지 성장하는 대형종이다(Abe, 1949; 松原, 1955). 자주복은 우리나라와 일본에서 해산 자원 어류로서 기호도가 매우 높아 수요가 늘어나고 있으나, 우리나라에서는 자주복의 완전양식을 위한 계획적인 인공 수정란 생산에 대한 연구가 미진한 실정이다.

일본에서는 자주복의 양식 산업화를 위해 인공 수정과 종묘 생산(藤田, 1962)을 시초로 종묘 생산과 생산성 향상을 위한 시도(北田·北島, 1983)와 호르몬 처리에 의한 자연산 친어의 성숙 촉진(長谷川 等, 1978; 宮本 等, 1992)등 많은 연구가 수행되어 자주복의 완전양식이 이루어지고 있다. 반면 우리나라에서는 1970년에 근해에서 어획된 자주복에서 난과 정자를 확보하여 수정란을 만들고 종묘 생산(Pyen and Rho, 1970)을 시도한 이래로 자·치어 사육 생태에 관한 연구(Ko and Rho, 1996; Kim et al., 2003)와 태반성 성선 자극 호르몬(HCG, human chorionic gonadotropin) 처리에 의한 인공 채란(Yang et al., 1994)에 대한 연구가 수행되었으며, 일부 업체에서 인공 채란에 대한 연구가 지속되고 있지만 아직까지 자주복 어미의 성숙 제어를 통한 안정적인 수정란 생산이 이루어지지 않아 일본에서 수입한 수정란에 의한 종묘 생산과 양성이 남해안과 제주도 일부 지역에서만 이루어지고 있다.

자주복은 산란 행동 장애로 사육 수조내에서 자연 산란이 어렵고, 산란이 일어나더라도 난질이 저하되거나 자연 채란 시기를 놓쳐 수정률이 떨어진다. 이러한 이유에서 자주복에서는 배란 유도를 위한 호르몬 처리가 선

행되어야 한다. 어류를 대상으로 성 성숙 및 배란 유도를 위한 외인성 호르몬의 사용은 1930년에 Houssay가 *Prochilodus platenis*의 뇌하수체를 *Cnesterdon decemmaculatus* 복강에 주사하는 것을 시작으로 HCG, 황체형성호르몬 방출호르몬(LHRH)/생식소자극호르몬 방출호르몬(GnRH) 및 그 유사체 등을 주로 사용하였다(Crim et al., 1983; Larsson et al., 1997; Song, 2004). LHRHa는 생물학적 활성이 HCG나 LHRH 그 자체보다 높기 때문에 여러 어종에서 성 성숙 및 배란 유도를 위해 사용되고 있다(Crim et al., 1983; Harvey et al., 1985; Lee et al., 1987).

그리고 어류의 방란·방정 시기 및 성비의 불균형으로 사육조건에서 동일한 시기에 채란 및 정자 확보가 어려운 경우, 안정적인 수정란 생산과 년중 종묘 생산을 위해서는 정자 동결 보존 기술이 필요하여 해산 어류에서의 정자 냉동 보존이 자주복(Chang et al., 1998), 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* (Lim et al., 1997), 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Zhang et al., 1997), 능성어, *Epinephelus septemfasciatus* (Song, 2004) 등에서 수행되었다.

이 연구는 자주복의 완전양식을 위해 호르몬 처리에 의한 배란 및 배정 유도 실험과 냉동 보존한 자주복 정자를 해동한 후 정자의 운동성과 수정 능력을 조사하여 계획적이고 안정적인 수정란 생산 및 종묘 생산을 하는데 그 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 사육 환경

사육수조는 사조 CS (주) 제주양식장 내에 직경 5m × 수심 1.5m인 원형 콘크리트 수조 3개를 사용하였고, 각 수조에는 3년생 자주복(평균전장 42.67±2.37cm, 평균체중 1.53±0.19kg)을 각각 20-21미씩 수용하였다. 실험 기간 동안 사육수는 자연 해수와 지하 해수를 혼합하여 사육하였으며, 사육수조의 일일 환수량은 10-12회전을 유지 하였다. 먹이는 습사료(moist pellet, MP)를 하루 1회 오전에 공급하였다.

실험기간 동안 사육수의 수온과 용존산소(Dissolved oxygen, DO)는 매일 1회 측정하였으며, 수온은 수온 온도계, DO는 DO meter (DO-14P, TOA)를 사용하였다.

2. 난 성숙 및 배란 유도

성 성숙과 배란 유도를 하기 위하여 자주복의 난모세포의 성숙도를 조사하였고, 배란 유도가 가능한 암컷을 대상으로 생식소자극호르몬-방출호르몬(LHRHa: desGly¹⁰ [D-Ala⁶] - luteinizing hormone releasing hormone ethylamide, Sigma Co., USA)과 태반성성선자극호르몬(HCG: human chorionic gonadotropin, Sigma Co., USA)을 처리하였다.

1) 난모세포 발달 조사

인위적 배란을 유도하기 위한 호르몬의 적정 처리시기를 알아보기 위하여 cannulation 방법으로 전장 39.0-47.5cm, 체중 1,160-1,697g 내외의 자주복 암컷 6마리의 난경 발달 정도를 파악하였다(Table 1).

실험어는 150-200 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 외부 생식공의 발달 정도에 따라 실험어를 선택하여 내경 1.2mm, 외경 2.0mm인 실리콘 재질의 cannular를 이용하여 cannulation을 하였다. 난 성숙과 배란 유도를 하기 위해 600 μ m 이상 난모세포를 가진 암컷을 선별하여 portable reader (SERIAL N°)로 표지하여 수용하였다. Tag한 암컷 개체들은 2주 간격으로 cannulation 방법을 통해 난경 발달 정도를 조사하였다. 조사 후 실험어는 질병 감염 예방을 위해 100 ppm의 Tiamulin hydrogen fumarate으로 약욕하였다(Fig 1).

2) LHRHa에 의한 배란 유도

배란 유도를 위해 LHRHa는 Shein (2000)의 방법에 따라 에틸알코올에 녹인 LHRHa 용해액과 cocoa butter (EA, Japan)를 1:9 비율로 혼합하여 사용하였고, HCG는 생리식염수에 용해하여 사용하였다. 배란 유도를 위한 호르몬 처리는 400 μ g LHRHa/kg BW 농도로 1회 처리한 처리구와 LHRHa 400 μ g 처리 2주후 500 IU HCG/kg BW 농도로 1회 처리한 처리구를 두었다. 배란을 유도하기 위한 호르몬은 어체의 등 근육 부위에 주사하였다. 배란 유무 확인은 호르몬 처리후 3일 부터 4시간 간격으로 조사하였다(Fig. 2).

Table 1. Total length and body weight of *T. rubripes* used in examination of oocyte diameter by developmental stages

Female		Male	
Total length (cm)	Body weight (g)	Total length (cm)	Body weight (g)
42.0	1,624	41.5	1,353
47.5	1,697	39.0	1,303
39.0	1,679	41.5	1,477
43.0	1,612	45.0	1,586
44.0	1,355	43.0	1,720
43.5	1,160	43.0	1,802





Fig. 1. Examination steps for the investigation of oocyte diameter of *T. rubripes* by cannulation method. A: body weight measurement, B: cannulation, C: tagging with microchip, D: shutting experimental fish into a cage.

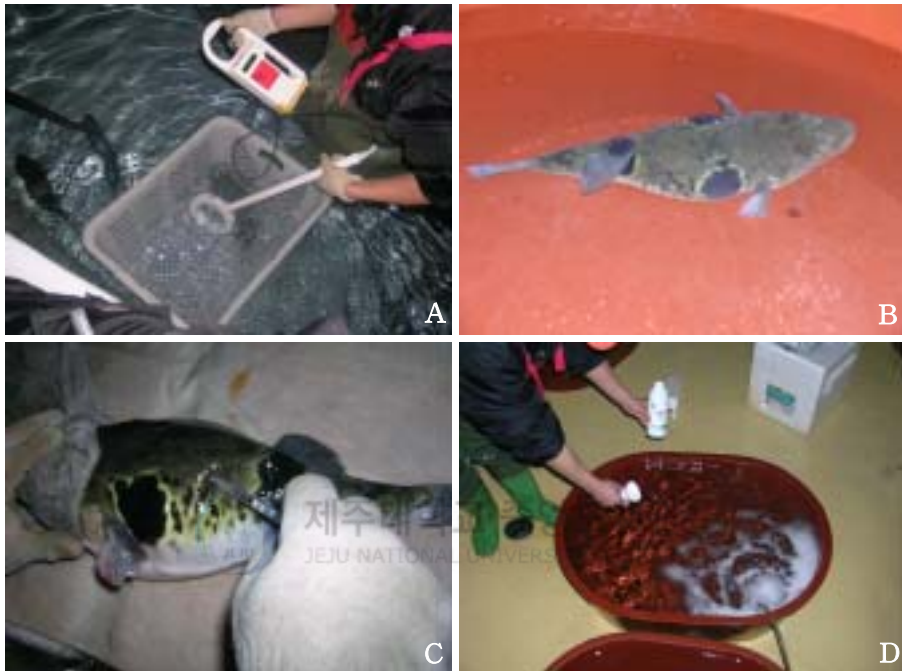


Fig. 2. Examination steps for hormonal treatment to ovulation of *T. rubripes*. A: Tag reading, B: anesthetization in 150-200 ppm 2-phenoxy ethanol, C: intramuscular injection with LHRHa ($400\mu\text{g}/\text{kg}$), D: treatment of 100 ppm Tiamulin hydrogen fumarate cline-HCl.

3. 정자 냉동 보존

1) HCG에 의한 배정 유도

자주복 수컷(전장 42.17±2.02cm, 체중 1.54±0.20kg) 6마리를 이용하여 배정 유도를 하였으며, 배정 유도를 위한 호르몬 처리는 500 IU HCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다(Table 1). 호르몬 처리 후 24시간 간격으로 2일간 배정 유무를 복부압박으로 조사하였다.

2) 정자 냉동 보존

성숙한 자주복 수컷 어미(전장 44.0cm, 체중 2.1kg)에서 정자를 채취하여 냉동 보존 실험을 실시하였다. 실험은 정자의 형태적 특징 그리고 희석액과 동해방지제 종류에 따른 냉동 정자의 해동 후 운동성을 조사하였다.

(1) 정자의 형태적 특징

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 2-phenoxyethanole로 마취시킨 후 비뇨 생식공 주위를 눌러 오줌과 배설물을 제거한 다음 복부를 가볍게 압박하여 채정을 하였다. 채취한 정액을 원심분리(15,000×G, 10분)한 후 최하층에 있는 sperm pellet을 채취하여 실험에 사용하였다. 정자의 형태적 특징을 조사하기 위해 정자를 2.5% glutaraldehyde 용액에 90분 동안 전고정을 하였으며, 전고정 후 2.0% osmium tetroxide 용액에 1시간 동안 후고정을 하였다. 그리고 저농도 에틸알콜(50%)로부터 에틸알코올 계열하에서 탈수하고, isoamilacetate를 사용하여 치환시켰다. 형태적 특징은 주사전자현미경(SEM, scanning electron microscope)을 이용하여 조사하였다.

(2) 희석액과 동해방지제

정자 냉동 보존에 적합한 희석액(diluent)과 동해 방지제(cryoprotectant)를 탐색하기 위하여 4가지 희석액과 2가지 동해 방지제를 사용하였다. 희석액은 Alsever's solution, marine fish ringer solution (MFRS), 5% glucose 와 Ham's F-10을 사용하였다(Table 2).

정자 냉동 보존에 사용한 동해 방지제는 dimethylsulfoxide (DMSO)와 Test Yolk Buffer (TYB, Irvine Scientific)를 사용하였다.

(3) 냉동 보존 평가

정자 냉동 보존 과정에서 동해 피해 방지를 위한 각각의 희석액과 동해 방지제 종류의 혼합비율은 Chang *et al.* (1999)과 Trounson and Gardner (2000) 등의 방법을 응용하여 설정하였다(Table 3). 모든 실험구의 평형시간은 1분 이내로 하였고 정자 냉동에는 0.25ml 용량의 정자 보존용 straw를 이용하였다. 각 실험에서 정자가 주입된 0.25ml 정자 보존용 straw를 액체질소 증기(-76℃)로 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다. 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 7일간 저장하였으며, 해동은 30.0±0.5℃의 항온수조로 옮겨 10초 이내에 시행하였다.

냉동 보존된 정자의 운동성 평가는 각 실험구별로 정자를 해동하여 자연 해수와 1:9의 비율로 희석한 후 Makler counting chamber (Sefi-Medical In.)를 이용하여 광학현미경과 모니터 하에서 해동 이후 경과 시간에 따른 정자 운동성을 조사하였다. 정자의 운동성 파악은 Strussmann *et al.* (1994)의 정자 활성 지수(sperm activity index) 측정 방법을 변형하여 이용하였다(Table 4).

Table 2. Constituents of the diluents used for sperm cryopreservation of *T. rubripes*

Diluents	Constituents
Alsever's solution	2.05g glucose, 0.4g sodium chloride, 0.8g sodium citrate/100ml D.W. ¹⁾
MFRS ²⁾	0.346g CaCl ₂ , 0.597g KCl, 0.017g MgCl ₂ , 13.5g NaCl, 0.025g NaHCO ₃ /1,000 ml D.W.
5% glucose	5g glucose/100 ml D.W.
Ham's F-10 ³⁾ (mM/L DW)	NaCl, 126.60; KCl, 3.82; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.62; NaHPO ₄ , 1.31; KH ₂ PO ₄ , 0.61; NaHPO ₄ , 14.28; CaCl ₂ ·2H ₂ 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

¹⁾DW, distilled water; ²⁾MFRS (marine fish ringer solution), Chang et al., 1999; Ham's F-10³⁾, Trounson and Gardner, 2000.

Table 3. Diluents and cryoprotectants tested for sperm cryopreservation of *T. rubripes*

Treatment group	Composition			Mixture rate (each volume)
	Diluents	Cryoprotectant	Sperm	
ADS	Alsever's solution	DMSO ¹⁾	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
MDS	MFRS ²⁾	DMSO	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
GDS	5% glucose	DMSO	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
HDS	Ham's F-10 ³⁾	DMSO	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
ATS	Alsever's solution	TYB ⁴⁾	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
MTS	MFRS	TYB	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
GTS	5% glucose	TYB	sperm pellet	0.72:0.13:0.15
HTS	Ham's F-10	TYB	sperm pellet	0.72:0.13:0.15

¹⁾DMSO (dimethylsulfoxide), MAF, 1997; ²⁾MFRS (marine fish ringer solution), Chang et al., 1999; ³⁾Ham's F-10, Trounson and Gardner, 2000; ⁴⁾TYB (test yolk buffer), Trounson and Gardner, 2000.

Table 4. Numerical degree used for the evaluation of sperm motility in the cryopreservation experiment

Criterion	Sperm motility
3	Forward movement rapidly
2	Forward movement slowly
1	Vibrating movement moderately
0	Immobile sperm

4. 인공 수정

자주복 수정란을 생산하기 위해서 각각 호르몬 처리하여 배란과 배정을 유도한 암컷과 수컷을 복부압박법으로 채란과 채정을 하였으며, 건식법으로 인공 수정을 시켰다. 수정시킨 알은 5, 6회 세란하고 부화수조에 수용하여 각각 수정률과 부화율을 조사하였다.

1) 정자의 수정률과 수정란 부화율

인공 채란된 알과 HCG로 방정을 유도한 신선한 정자를 인공 수정시켜 수정률과 부화율을 각각 조사하였다. 수정률은 각각의 실험구에서 인공 수정 후 5일째 배체가 형성된 때를 기준으로 3회 조사하였고, 부화율은 부화가 대부분 이루어지는 부화시작 3일후에 조사하였다.

2) 해동 정자의 수정률과 수정란 부화율

냉동 보존된 정자의 해동 후 인공 수정에 따른 수정률과 부화율 조사는 각 실험구의 해동 정자와 어체에서 채취한 신선한 정자를 사용하였다. 인공 수정은 2005년 5월 5일 채란된 알을 이용하였고, 대조구와 실험구 모두에서 각각 수정률과 부화율을 3회 조사하였다.

5. 수정란 및 자어 발달

1) 수정란 배양과 발생 과정

성숙한 자주복의 암수에서 채란된 알과 채정된 정자를 건식법으로 수정시켜 난경과 시간경과에 따른 발생 과정을 조사하였다. 수정란은 부화수조 내에 수용하였으며, 환수는 1일에 약 8회전 정도로 하면서 강하게 통기를 하였다. 부화시 사육 수온은 16.0-17.0℃를 유지하였다.

2) 자어의 사육과 성장

부화된 자어는 20L 원형 아크릴 수조에서 1일 0.5회전 정도로 환수하였고, 수온은 17.0-18.0℃를 유지하였다. 자어의 난황흡수와 개구시간 및 사육 경과 시간에 따른 자어의 전장 변화를 24시간 간격으로 조사하였다.

실험기간 동안 자어 먹이는 부화 후 4일째부터 로티퍼를 사육수 ml당 15개체의 밀도로 급이하였고, 부화 후 20일째부터 초기 인공사료(크기: 150 μ m, INVE, USA)와 Artemia(2-3 개체/ml 사육수), 로티퍼를 급이하였다. 이후 자어가 성장함에 따라 점차 인공사료의 크기를 증가시켰다(Fig. 3).

6. 자료 분석

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

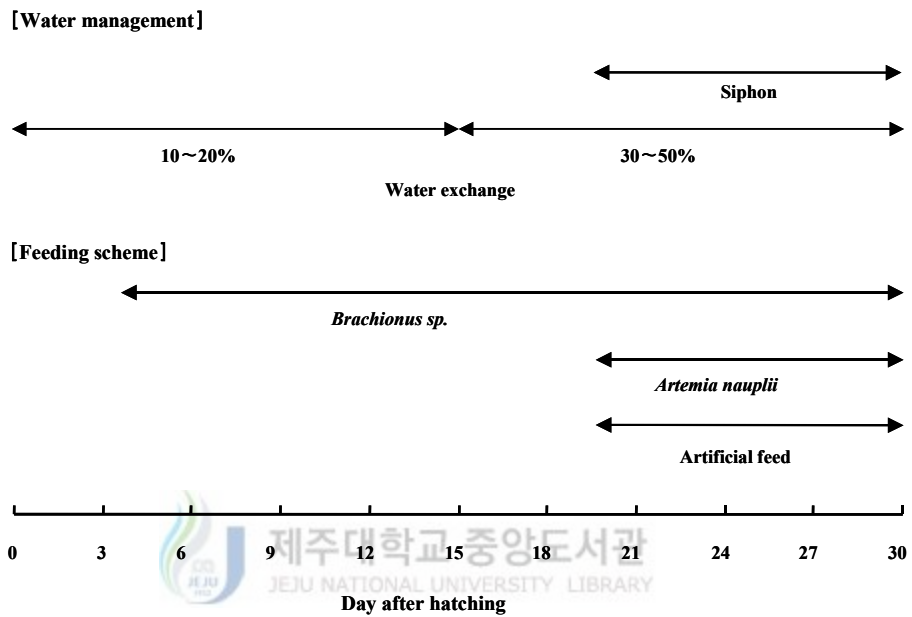


Fig. 3. Rearing scheme during the larval rearing of *T. rubripes*.

Ⅲ. 결 과

1. 사육 환경

실험기간 중 사육 수온은 16.8-19.6℃의 범위였으며, 8월에 최고에 달하였고, 평균 수온은 17.8℃이었다. 사육수의 DO는 6.8-9.6mg/l 범위였다(Fig. 4).

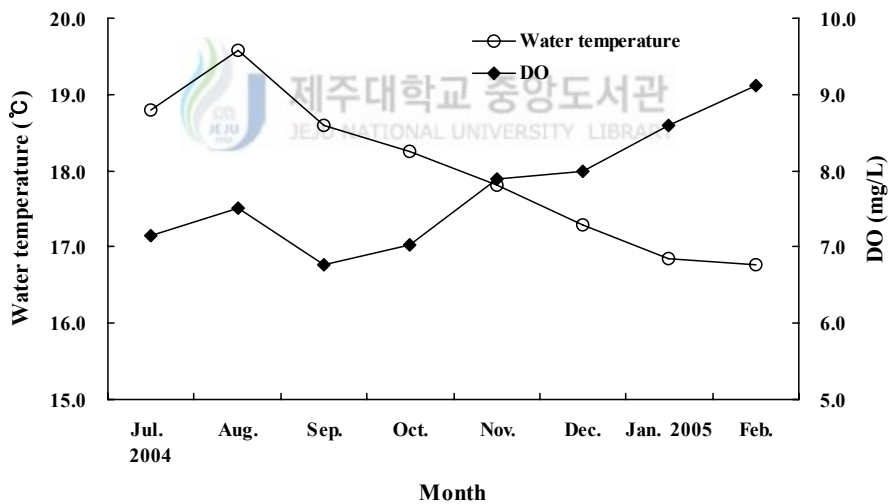


Fig. 4. Monthly changes of dissolved oxygen (DO) and water temperature during a controlled photoperiod experiment.

2. 난 성숙 및 배란 유도

1) 난모세포 발달

자주복 암컷 친어에서는 난경 630-923 μm 내외의 난이 생식소 내에 분포하였다. 실험 시작시 710-760 μm 내외의 난을 가지고 있는 개체들은 6주후 난경 900 μm 이상으로 난의 크기가 성장하였으며, 635.7 \pm 61.0 μm 의 난을 가지고 있는 개체는 6주후 838.7 \pm 48.0 μm 까지 성장하였다(Fig. 5).

2) 호르몬 처리에 의한 배란 유도

호르몬 처리에 이용된 자주복 암컷의 체중은 1,347-1,866g 범위였다. LHRHa 단일처리와 LHRHa+HCG 처리를 통한 배란 유도 실험에서는 실험어 7마리 중 6마리가 배란되어 배란율은 85.7%이었다. 어미 개체당 채란된 알은 190-345g였고, 6마리의 총 채란된 알은 1,568g이었다(Table 5).



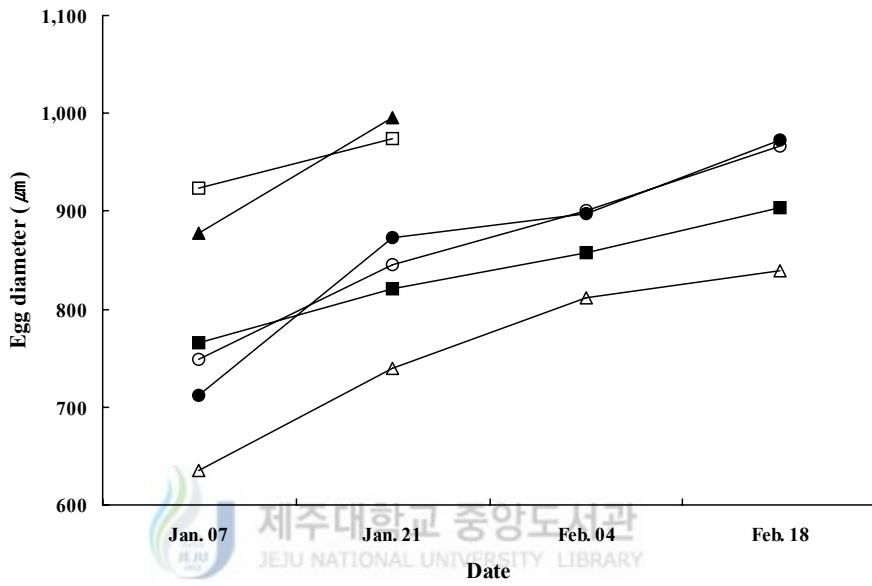


Fig. 5. Change of oocyte diameter of *T. rubripes*.

Table 5. Effects of different hormonal treatments on ovulation of *T. rubripes*

Hormones	Body weight (g)	Total weight of ovulated eggs (g)
	1,700	190
	1,719	264
LHRHa 400 μ g	1,347	190
	1,479	297
	1,866	345
LHRHa 400 μ g	1,721	282
+HCG 500 IU	1,584	0

3. 정자 냉동 보존

1) 호르몬 처리에 의한 배정 유도

HCG 처리에 의해 배정 유도 실험에서는 호르몬 처리후 48시간 부터 배정이 이루어지기 시작하였으며, 실험어 9마리 모두에서 배정이 이루어져 배정률은 100%이었다.

2) 정자의 외부형태

자주복 정자는 두부와 꼬리로 구분되며, 두부는 타원형으로 장경은 약 $1.45\mu\text{m}$ 내외 였고, 단경은 $0.38\mu\text{m}$ 내외 였다. 냉동 보존 후 해동한 정자는 신선한 정자와 비교하여 형태와 크기에서 차이가 없었다(Fig. 6).

3) 냉동 정자의 특성

냉동 정자의 운동성은 해동 후 1분 이내에는 활발한 운동성을 가졌으나, 5분 경과한 후에는 운동성을 가진 정자는 관찰되지 않았다. 그리고 서로 다른 희석액과 동해방지제를 사용하여 냉동한 정자의 해동 후 운동성을 평가한 결과 동해방지제로 TYB를 사용한 모든 희석액 실험구(ATS, MTS, GTS, HTS 실험구)에서 활발한 정자의 움직임이 관찰되었다(Table 6).

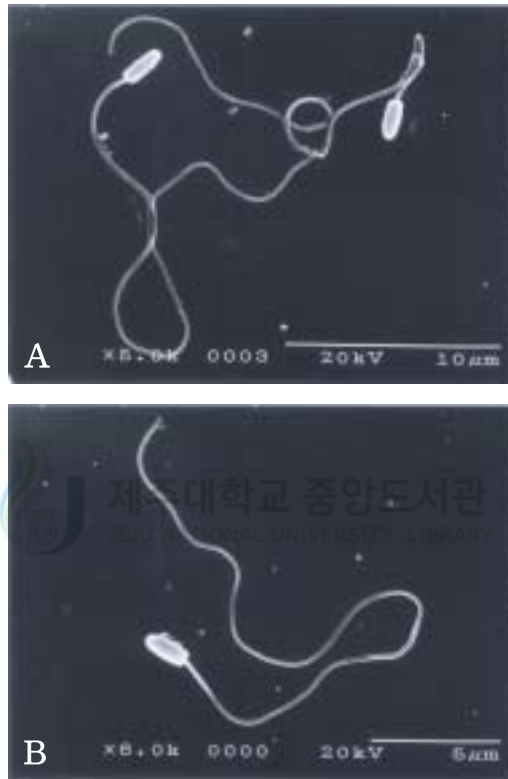


Fig. 6. Scanning electron microscopic photographs of the spermatozoa of *T. rubripes*. A: fresh sperm, B: thawed sperm after cryopreservation.

Table 6. Motility of thawed sperm of *T. rubripes* after cryopreservation with different diluents and cryoprotectant levels

Treatment groups	1 min	5 min
	Sperm motility	Sperm motility
ADS	0	0
MDS	0	0
GDS	0	0
HDS	1	0
ATS	2	0
MTS	2	0
GTS	2	0
HTS	2	0

ADS, thawed sperm after cryopreservation with Alsever's solution as diluent and dimethylsulfoxide (DMSO) as cryoprotectant; MDS, thawed sperm after cryopreservation with marine fish ringer solution (MFRS) as diluent and DMSO as cryoprotectant; GDS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and DMSO as cryoprotectant; HDS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and DMSO as cryoprotectant; ATS, thawed sperm after cryopreservation with Alsever's solution as diluent and test yolk buffer (TYB) as cryoprotectant; MTS, thawed sperm after cryopreservation with MFRS as diluent and TYB as cryoprotectant; GTS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and TYB as cryoprotectant; HTS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and TYB as cryoprotectant.

4. 인공수정

1) 정자의 수정률과 수정란 부화율

HCG치리로 배정이 유도된 수컷 친어에서 채정한 정자와 400 μ g LHRHa/kg BW치리를 통해 배란이 유도된 암컷 친어에서 채란한 알을 건식법으로 인공 수정 시켰을 때, 수정률은 69.3-89.8%이었으며, 수정란 부화율은 38.3-88.1%이었다(Table 7).

2) 해동 정자의 수정률과 수정란 부화율

해동 정자의 수정률은 대조구에서 69.3%였고, 실험구에서는 ATS와 HTS에서 각각 57.5%와 53.5%로 다른 실험구(11.4-42.1%) 보다 높았다(P <0.05). 수정란 부화율은 대조구에서 57.5%이었고, ATS와 HTS 실험구에서 각각 52.6%와 49.3%로 다른 실험구 보다 높았다(P <0.05, Table 8).



Table 7. Fertilization and hatching rate of the stripped eggs and sperm of *T. rubripes* after hormone treatments

Experimental groups	Body weight (g)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
	1,700	-	-
	1,719	74.9	39.8
LHRHa 400 μ g	1,347	-	-
	1,479	89.0	52.3
	1,866	89.8	88.1
LHRHa 400 μ g	1,721	73.1	38.3
+HCG 500 IU	1,584	-	-



Table. 8. Fertilization and hatching rate of fresh sperm and thawed sperm of *T. rubripes* after cryopreservation with different diluents and cryoprotectant levels

Experimental group	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Total hatching rate (%)
Control	69.3	57.5	39.8
ADS	38.0	43.2	16.4
MDS	11.4	6.7	0.8
GDS	35.8	42.1	15.1
HDS	38.2	41.3	16.9
ATS	57.5	52.6	30.2
MTS	23.7	30.7	7.3
GTS	42.1	46.4	19.5
HTS	53.5	49.3	26.4

ADS, thawed sperm after cryopreservation with Alsever's solution as diluent and dimethylsulfoxide (DMSO) as cryoprotectant; MDS, thawed sperm after cryopreservation with marine fish ringer solution (MFRS) as diluent and DMSO as cryoprotectant; GDS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and DMSO as cryoprotectant; HDS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and DMSO as cryoprotectant; ATS, thawed sperm after cryopreservation with Alsever's solution as diluent and test yolk buffer (TYB) as cryoprotectant; MTS, thawed sperm after cryopreservation with MFRS as diluent and TYB as cryoprotectant; GTS, thawed sperm after cryopreservation with 5% glucose as diluent and TYB as cryoprotectant; HTS, thawed sperm after cryopreservation with Ham's F-10 as diluent and TYB as cryoprotectant.

5. 수정란 및 자어 발달

1) 수정란 배양과 발생 과정

난은 구형의 침성점착란으로 평균 난경은 1,222.3-1,303.3 μ m였으며, 유백색을 띠었다. 위란강은 좁고 다수의 소유구가 난황의 상부에 존재하였다. 수정 전의 난은 투명하고 점착력이 적으나 수정이 이루어짐에 따라 점착력이 강해졌으며, 부화가 가까워질수록 다시 약해지는 경향을 보였다. 발생 초기의 수정란은 불투명하게 되어 외부로부터 난황이 진행되는 것을 관찰할 수가 없고 단지 다수의 유구만 관찰되었다(Fig. 7A). 수정 후 5일째에 배체가 형성되었고, 배체의 측부나 난황에 흑색소포가 출현하였다(Fig. 7B). 이 기간 동안에 미수정란은 중앙에 다수의 유구들이 터져서 기포같은 것들이 관찰되어 수정 유무를 판단할 수 있었다. 수정후 7일째에 안구가 형성되었으며, 심장의 박동의 시작되었고, 배체의 운동이 관찰되었다(Fig. 7C). 수정 후 9일째에 부화가 시작되어 수정 후 12일째까지 부화가 지속되었다(Fig. 7D).

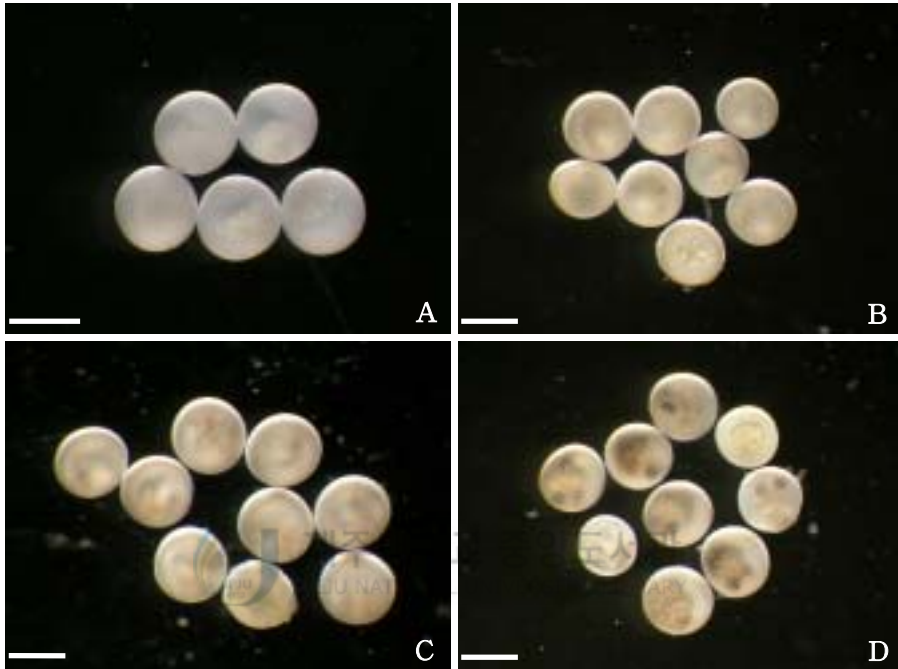


Fig. 7. Embryonic development of fertilized eggs of *T. rubripes* at 16.0-17.0°C. A, after 4 hours; B, after 5 days (Composition of embrional body); C, after 7 days (Active motility of embrional body); D, after 9 days (Initiation of hatching). Scale bar=1,000 μ m.

2) 자어의 사육과 성장

부화 직후의 자어는 전장이 2.9mm전후이고, 입은 닫혀 있었다. 막 지느러미는 머리 위 부분에서 시작되며, 작은 과립이 그 위에 존재하였다. 부채 모양의 가슴지느러미가 출현하며, 눈은 진한 청록색을 띠었다. 난황은 타원형이며, 작은 유구가 조밀하게 분포하였다. 입, 난황 그리고 항문 바로 위쪽의 배 부분에 나뭇가지 모양의 흑색소포가 분포하였다(Fig. 8A).

부화 후 4일째에 입이 열리기 시작하고, 전장 4.3mm전후가 되는 10일째에는 난황이 완전히 흡수되며, 복강의 위쪽 앞부분에 모여있는 유구들도 소실되었다. 대형의 나뭇가지 모양의 흑색소포는 머리부분과 가슴지느러미 밑 부분에 출현하였으나, 몸의 옆면에는 나타나지 않았다(Fig. 8B).

부화후 20일째 후기자어는 전장이 5.4mm전후이며, 막 지느러미는 등, 뒤, 꼬리지느러미로 분화하였다. 흑색소포는 머리와 몸통의 옆면에서 배쪽을 따라 발달하였으며, 머리 위쪽과 몸통부분의 등쪽에는 산발적으로 분포하였다(Fig. 8C).

부화후 30일째 후기자어는 전장이 9.8mm 전후이며, 꼬리지느러미는 상하 양엽이 불대칭 형태로 9개의 기조가 발달하였다. 흑색소포는 머리와 몸통 부분의 전체를 둘러싸며, 등지느러미 밑 부분과 뒷지느러미 밑 부분에 대형의 흑색소포가 조밀하게 분포하였다(Fig. 8D).

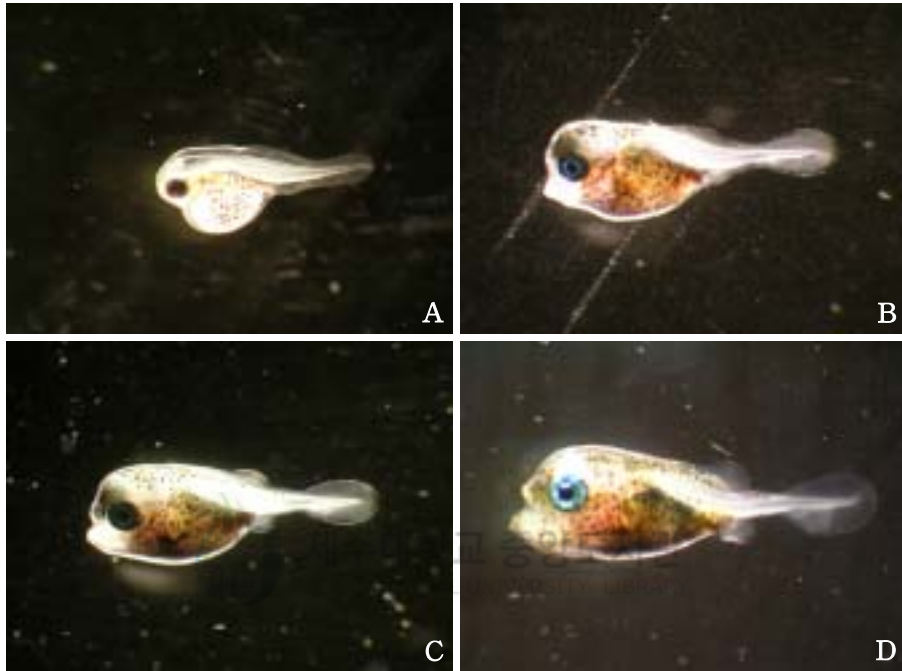


Fig. 11. Microscopic photographs of *T. rubripes* larvae. A, newly hatched larva, 2.9mm total length (TL); B, 10 day old larva, 4.3mm TL; C, 20 day old larva, 5.4mm TL; D, 30 day old larva, 9.8mm TL.

IV. 고 찰

양식 대상 어종을 양식 산업화하기 위해서는 친어관리를 통한 수정란 생산과 종묘 생산, 양성으로 이어지는 완전양식이 이루어져야 한다. 이를 위해서는 사육 수조내에서 인위적 성 성숙 제어를 통한 계획적인 수정란 생산이 가능해야 한다(Bromage and Roberts, 1995).

수조에서 사육하는 경우에 난모세포의 성숙이 진행되지 않거나 산란 행동 장애로 산란이 일어나지 않는다. 이러한 생식 기능 장애는 수조내에 가두어지는데에 따르는 스트레스(Sumpter et al., 1994; Pankhurst and Vander Kraak, 1997)와 자연 산란 환경조건의 결여(Zohar, 1989a,b; Yaron, 1995; Battaglene and Selosse, 1996; Ohta et al., 1997)등 복합적인 원인에서 기인한다. 자주복은 모래바닥이나 자갈바닥 위에 복부를 비비면서 산란하는 산란 습성을 갖고 있어 수조내에서는 이러한 산란 행위가 어렵기 때문에 산란이 잘 일어나지 않는다. 간혹 일부에서 산란이 일어나더라도 난질이 저하되거나 적절한 채란 시기를 놓쳐 수정률이 떨어진다. 친어 사육에서 난질저하 원인은 어미의 건강상태, 성비 불균형 및 산란에 부적합한 환경요인으로 추정되고 있다(Toledo et al., 1993; Okumura et al., 2002). 또한 배란에 따른 채란 시기가 난질과 수정률에 중요한 영향을 준다(Shelton, 1989).

이와 같은 문제의 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 있다. 인공 종묘 생산을 위한 양질의 난을 확보하기 위해 주로 HCG와 GnRH 또는 LHRH 및 그 합성제(GnRH analogue: GnRH_a)들과 tamoxifen 및 clomiphene 물질이 사용되고 있다(Zohar and Mylonas, 2001).

HCG의 경우 현재 가장 널리 사용되어 황복, *T. obscurus* (Jang, 1996), 독가시치, *Siganus fuscescens*(Hwang, 1999) 와 자주복(Yang et al., 1994) 에서 배란 및 산란 유도에 효과가 있다고 보고 되고 있다. 그러나 복강에 주사된 이 호르몬이 난소에 직접 강하게 작용하여 부작용을 일으키는 등 산란 유도율에 있어서 개선해야할 점이 많다(Zohar and Mylonas, 2001).

시상하부의 신경분비세포에서 분비되는 GnRH 및 합성제인 GnRHa는 종 특이성이 낮고 투여한 어류자체의 GTH를 방출시켜 성숙, 배란을 유도하기 때문에 모든 어종에서 성숙 유도 효과를 기대할 수 있다. 현재는 GnRH의 유사체 (Des-Gly¹⁰-[D-Ala⁶]LHRH ethlamide: LHRHa)가 인공 합성되어 손쉽게 구할 수 있고, 이것은 체내에서 대사되기 어렵기 때문에 어류 본래의 GnRH보다도 효과가 강하며 저 농도에서도 효과가 있어 경제적으로 유리하다(Sherwood et al., 1994; Zohar and Mylonas, 2001).

LHRHa는 다수의 경골어류에서 성공적으로 배란이 유도되었고(Crim et al., 1987; Thomas, 1994), 이 실험에서도 자주복 암컷을 대상으로 400 μ g LHRHa/kg BW와 400 μ g LHRHa/kg BW+500 IU HCG/kg BW를 각각 처리하여 자주복 암컷의 난 성숙 및 배란 유도를 할 수 있었다. 참돔, *Pagrus major* (Matsuyama et al., 1992; Kumakura et al., 2003), *Dicentrarchus labrax* (Fornies et al., 2001; Mananos et al., 2002; Mateos et al., 2002), 능성어류(Watanabe et al., 1995; Marino et al., 2003))등에서는 10-100 μ g LHRHa/kg BW를 처리하여 배란 유도가 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.

호르몬 처리 후 배란 까지 걸리는 시간은 종에 따라 차이를 가진다. HCG를 처리한 경우에도 방어, *Seriola quinquevadiata*(梅田 等, 1981), 참돔(赤崎 等, 1976), 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*(松山 等, 1989), 능성어(Song, 2004)등에서는 48 시간 이내 였는데, 자주복인 경우는 宮本 等

(1992)에 의하면 83-174 시간이고, Yang et al. (1994)에 의하면 114-142 시간이어서 다른 어종에 비해서 채란이 가능한 시간까지 걸리는 시간이 길었다. 이 연구에서는 LHRHa를 처리한 후 자주복의 채란 가능 시간까지 86-168 시간이 걸려 宮本 等(1992)과 비슷하였다. 이와 같은 호르몬 처리 후 채란까지 걸리는 시간은 종에 따라서 차이가 있으나, 사육조건, 호르몬 종류와 농도 차이도 하나의 원인으로 생각된다.

자주복 정자의 두부 형태는 원형인 turbot (Dreanno et al., 1997), 넙치 (Zhang et al., 2003)와 능성어(Song, 2004) 등과는 달리 타원형이며, 두부의 장경은 $1.45\mu\text{m}$ 로 Tubot (Dreanno et al., 1997), 감성돔(Chang et al., 1998), 넙치(Zhang et al., 2003), 능성어(Song, 2004)등의 두부 크기 1.2-1.5 μm 와 비슷하였다.

어류 정자의 냉동 보존에는 어종에 적합한 희석액과 동해방지제, 평형시간 및 해동온도 등이 중요한 역할을 한다(Jamieson., 1991).

정자를 냉동 보존하기 위한 희석액의 갖추어야 할 조건은 삼투압 농도 차이로 정자 활성화를 방지하고, 성분도 정장의 이온 조성과의 유사해야 한다(Jamieson., 1991). 담수 어류 정자는 정장보다 낮은 삼투압 농도에서 운동성이 높고, 해산 어류 정자는 정장과 같은 등장액 또는 고장액에서 운동성이 높다(Morisawa et al., 1983; Strussmann et al., 1994).

정자 냉동 보존에 희석액으로서 삼투농도가 287 mOsm/kg인 5% glucose는 복섬, *Fugu nipobles* (Gwo et al., 1993) 및 연어과 어류(Pironen, 1993), 감성돔(Lim et al., 1997)에서 우수한 보존 효과를 나타냈으며, 삼투농도가 449 mOsm/kg인 MFRS는 Atlantic halibut (Bolla et al., 1987)에서 보존 효과가 좋은 것으로 나타났다. 이와 같이 적합한 희석액의 종류는 어종에 따라 종 특이적인 경향을 보인다. 이번 연구에서 자주복은 Chang et al. (1998)에서와 마찬가지로 삼투농도가 자주복 정장의 삼투농도와 비슷한 Alserver's solution이 적합한 희석액으로 나타났다.

정자 냉동 보존에서 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(Dreanno et al., 1997; Zhang et al., 2003), 종 특이성을 나타냈었다. Glycerol은 무지개 송어, *Salmo gairdneri* (Stoss and Holtz, 1983)와 능성어류 *E. tawina* (Chao et al., 1992)등의 정자에 독성을 가지는 반면, Atlantic halibut (Bolla et al., 1987)와 yellowfin seabream, *A. australis* (Thorogood and Blackshaw, 1992), 넙치(Zhang et al., 2003)등에서는 적합한 동해방지제로 알려져 있다. 난황이나 BSA (Bovin Serum Albumin) 등 유기물 성분을 포함한 동해방지제는 세포막과 결합하여 냉동과정 중에 세포의 상해를 방지하여 준다(Babiak et al., 1995). 이번 연구에서는 자주복 정자 냉동 보존에 동해방지제로 난황성분이 들어있는 TYB를 사용하였는데 일부 정자 엉킴 현상(aggregation)이 관찰되었으나, DMSO보다 효과가 좋은 것으로 나타났다.

냉동 보존된 정자의 해동 후 운동성에 영향을 미치는 요인으로서는 평형시간(Harvey, 1983)과 해동온도(Caylor et al., 1994)가 있다. 어류 정자는 크기가 매우 작아 동해방지제가 세포내에 빠르게 침투하므로(Morisawa, 1985) 냉동 보존 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 입어서 해동 후 정자 활력이 감소한다(Jamieson 1991). Caylor et al. (1994)은 어류 냉동 정자의 해동온도는 28-37℃ 범위가 적당하다고 하였다. 이 연구에서 평형 시간을 1분 이내로 하고 해동온도를 30±0.5℃로 했을 때, 냉동 보존된 자주복 정자의 운동성은 대부분 해동 후 1-2분에 높게 나타났으며, 2분이 지나면서 운동성은 현저히 떨어졌다.

어류의 냉동 보존 정자를 해동하여 인공 수정을 했을 때, 황복(Chang et

al., 1999), 넙치(Zhang et al., 2003), 무지개송어(Cabrita et al., 2001) 등에서 수정률과 부화율은 신선한 정자를 이용했을 때 보다 낮았다. 이 실험에서도 신선한 정자를 이용했을 때 보다 모든 실험구의 수정률과 부화율이 낮게 나왔지만 ATS 실험구에서는 수정률과 부화율 모두에서 신선한 정자를 사용한 대조구의 75%까지 나왔다. 또한 ATS와 HTS 실험구의 수정률과 부화율이 각각 53.5-57.5%와 49.3-52.6%로 다른 실험구 보다 높게 나타났다($P < 0.05$).

수정란의 난 발생 속도 및 부화율은 수온 이외에 조도, aeration 등에 영향을 받는다(Piper et al., 1982). 복어류의 알은 난막이 두껍기 때문에 수온의 허용범위가 높고, 수온의 급격한 변동에 저항력이 강하다고 알려져 있다(藤田, 1962). 졸복, *T. pardalis*의 온도 허용 범위는 12.0-24.0°C이고 자주복은 13.0-22.0°C이며, 자주복의 부화는 수온 15.6-17.2°C에서 약 243시간, 수온 16.2-17.5°C에서는 288시간이라는 장시간이 걸렸다(藤田, 1962). 또한 Pyen and Rho(1970)는 수온 15.9-17.4°C에서 163시간이 걸렸고, Han(1999)은 수온 15.1-18.0°C에서 161시간에 부화하기 시작되어 180시간 30분에 대부분 부화한다고 보고하고 있다. 이번 연구에서는 수온 16.0-17.0°C에서 216시간에 부화하기 시작하여 288시간까지 부화가 지속되었다. 이처럼 자주복의 부화시간은 분리부성란을 갖고 있는 돌돔(Yoo et al., 1988), 넙치(Han and Kim, 1997), 능성어(Song, 2004) 등에 비해서 많이 걸렸지만 연어류(Myong and Kim, 1993)보다는 적게 걸렸다.

부화 직후 자주복 자어는 난황과 다수의 유구를 가지고 있었고, 전장 2.9mm 전후로 다른 어류보다 자어의 크기가 다소 컸으며, 부화 후 4일째에 개구가 시작되어 전장 4.3mm전후가 되는 10일경에는 난황이 완전히 흡수되었다. 이것은 첫 먹이 섭취시 크기가 상대적으로 크기 때문에 먹이 섭취 가능성이 높아 생존에 유리하다는 점(Hunter, 1981; Quattro and Weeks, 1991)과 난황이 흡수되는데 걸리는 시간이 길다는 점에서 다른 어류에 비해 종묘 생산이 원활한 이점을 갖게 한다고 생각한다.

앞으로 안정적인 자주복 수정란 생산을 하기 위해서는 수정률 및 부화율을 향상시키기 위한 어미 사육 시스템 개발에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.



V. 요약

자주복 *Takifugu rubripes*의 양식 산업화를 위해서는 계획적인 수정란 생산이 선행되어야 한다. 이 연구에서는 인공 수정란 생산에 의한 종묘 생산 기술 개발을 위하여 친어관리 그리고 배란 유도, 정자 냉동 보존, 난 발생 및 자어 발달에 관한 연구를 수행하였다.

친어사육은 사조 CS (주) 제주양식장 내에 직경 5m × 수심 1.5m 원형 수조 3개에 각각 20-21 마리를 수용하여 사육관리하였다. 친어는 전장 42.67±2.37cm, 체중 1.53±0.19kg인 3년산 자주복을 사용하였다.

자주복의 난경조사는 2005년 1월 9일부터 2월 18일 까지 2주 간격으로 cannulation 방법에 의해 수행되었다. 시작시 난경은 710-760 μ m의 범위였고, 6주후 난경이 점차적으로 증가하여 900 μ m 이상으로 성장하였다. 배란 유도를 위해서, 평균 900 μ m 이상 난모세포를 가지는 친어를 대상으로 LHRHa 400 μ g/kg BW로 주사하였다. 배란은 LHRHa를 처리한 7마리 중 6마리가 배란되어 배란율은 85.7%였고, 총 채란된 알은 1,568g이었다.

정자의 냉동 보존은 정소와 난소의 성숙 시기 불일치 때문에 수정 시기를 조절하기 위해 수행하였다.

자주복 정자는 두부와 꼬리부로 구분되며, 두부는 타원형이고 크기가 1.45 μ m 이었다. 희석제로는 Alserver's solution, MFRS (marine fish ringer solution), 5% glucose와 Ham's F-10, 그리고 동해방지제로는 DMSO (dimethylsulfoxide)와 TYB (test yolk buffer)를 사용하여 냉동 보존된 자주복 정자의 해동 후 운동성은 대조구 보다 낮았다(P < 0.05). 수정률과 수정란 부화율은 대조구에서는 각각 69.3%와 39.8%이고, ATS(희석제; Alserver's solution, 동해방지제; TYB) 실험구에서는 각각 57.5%와 30.2%이다. ATS 실험구의 수정률과 수정란 부화율은 모두 대조구의 75% 범위

였다.

자주복 수정란은 구형의 침성접착란으로 난경이 1.2-1.3mm이었다. 수온 16.0-17.0℃에서 부화까지 걸리는 시간은 9-12일이었다.

부화 직후 자어는 전장 2.9mm 이었다. 부화 후 4일째 개구가 시작되어, 전장 4.3mm전후가 되는 10일경에는 난황이 완전히 흡수되었다. 부화 후 20일째 후기자어는 전장이 5.4mm전후이며, 막 지느러미는 등, 뒤, 꼬리지느러미로 분화하였다. 부화 후 30일째 후기자어는 전장이 약 9.8mm로 성장하였으며, 꼬리지느러미에 9개의 기조가 발달하였다.



VI. 참고문헌

- Abe, T. 1949. Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions - V. Synopsis of puffers from Japan and adjacent regions. Bull. Biogr. Soc. Japan, 14: 89-140.
- 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.
- Battaglione, S.C. and P.M. Selosse. 1996. Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner), (Percichthyidae). Aqua. Res., 27: 191-204.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture, 65: 371-374.
- 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. Herraiz. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. Aquaculture, 201: 301-304.
- 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., 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)
- Chang, Y.J., H.K. Lim, Y.J. Chang and H.S. Kim. 1999. Sperm cryopreservation and fertility of post-thaw sperm in river puffer, *Takifugu obscurus*. J. of Aquaculture, 12: 1-5. (in Korean)
- 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.
- Chuda, H., M. Matsuyama, Y. Ikeda and S. Matsuura. 1997. Development of maturation and ovulation-induction method in cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. Nippon Suisan Gakkaishi, 63: 728-733. (in Japanese)
- Crim, L.W., 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., R.E. Peter and G. Van Der Kraak. 1987. The use of LHRH analogs in aquaculture. (in) LHRH and its analogs: Contraceptive and therapeutic application, Part II, (ed) B.C. Vickery and J.J. Nestor Jr., MTP Press, Lancaster, pp. 489-498.
- 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.
- Fornies, M.A., E. Mananos, M. Carrillo, A. Rocha, S. Laureau, C.C. Mylonas, Y. Zohar, S. Zanuy. 2001. Spawning induction of individual European sea bass females, *Dicentrarchus labrax* using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*, 202: 221-234.
- 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.
- Han, K.H. and Y.U. Kim. 1997. The early life history of flounder, *Paralichthys olivaceus* - I. Development of egg, larvae and juveniles. *Bull. Yosue Nat'l Fish. Univ.*, 11: 105-117. (in Korean)
- Han, K.N. 1999. Development of eggs, larvae and juveniles of the puffer, *Takifugu rubripes* reared in the laboratory. *J. of Aquaculture*, 12: 255-266. (in Korean)
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32: 313-320.
- Harvey. B., J. Nacario, L.W. Crim, J.V. Juriano and C.L. Marte. 1985. Induced spawning of sea bass, *Labeo calcarifer* and rabbit fish, *Siganuu guttaus* after implantation of pelleted LHRH analogue. *Aquaculture*, 47: 53-59.

- Houssay, B.A., 1930. Accion sexual de la hipofisis en los pecesy reptiles. Rev. Soc. Arg. Biol. 106: 686-688.
- Hunter. J.R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. (in) Marine fish larvae-morphology. Ecology and relation to fisheries, (ed) R.I. Lasker, Univ. Washington Press. Seattle and London., pp. 33-77.
- Hwang, H.K. 1999. Biological studies on aquaculture of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). Ph.D. Thesis Cheju Nat'l. Univ., 124 pp. (in Korean)
- Jamieson, B.G.M. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York. pp. 319.
- Jang, S.I. 1996. Induced ovulation by using human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone analogue plus pimozide in yellow puffer, *Takifugu obscurus*. J. of Aquaculture, 9: 3-10. (in Korean)
- Kim, B.W., O.S. Na, C.B. Park, H.B. Go, B.S. Kang, Y.C. Choi and Y.D. Lee. 2003. Development of the digestive track in tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Dev. Reprod., 7: 29-34. (in Korean)
- Ko, H.B. and S. Rho. 1996. Low salinity tolerance of eggs and juveniles of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. J. of Aquaculture, 9: 43~55. (in Korean)
- Kumakura, N., K. Okuzawa, K. Gen and H. Kagawa. 2003. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream, *Pagrus major*. Gen. Comp. Endocrinol., 131: 264-273.
- 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.S., C.S. Tamaru, G.T. Miyamoto and C.D. Kelley. 1987. Induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus* by LHRHa. *Aquaculture*, 62: 327-336.
- 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 schlegelii*. *J. Korean Fish. Soc.*, 30: 211-215. (in Korean)
- MAF. 1997. Physiological activities and long and short-term preservation of sperm in marine fishes. Ministry of Agriculture and Forestry Report, 39-80.
- Mananos, E., M. Carrillo, L.A. Sorbera, C.C. Mylonas, J.F. Asturiano, M.J. Bayarri, Y. Zohar and S. Zanuy. 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Fish Biol.*, 60: 328-339.
- 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.
- Mateos J., E. Mananos, M. Carrillo and S. Zanuy. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp.*

- Biochem. Physi. Part B, 132: 75-86.
- Matusyama, M., H. Kagawa, H. Tadeuchi, M. Kashiwagi, T. Iwai and K. Hirose. 1992. Effect of LHRHa Cholesterol Pellet on Gonadal Development, Maturation and Spawning in *Pagrus major* during Winter Season. *Suioanzoshoku*, 40: 159-165. (in Japanese)
- 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.
- Myoung, J.G. and Y.U. Kim. 1993. Morphological study of *Oncorhynchus spp.* (Pisces: salmonidae) in Korea - I. Egg development and morphology of alevin fry and smolt of chum. salmon, *Oncorhynchus keta*. *Korean J. Ichthyol.*, 5: 53-67. (in Korean)
- Ohta, H. and H. Tanaka. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (HCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of HCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153: 123-134.
- 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.
- Pankhurst, N.W. and G. Van der Kraak. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. (in) *Fish stress and health in Aquaculture*, (ed) G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 73-93.

- Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout, *Salmo trutta lacustris* L. and arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. Aquaculture, 48: 337-350.
- Piper, R.G., I.B. McElwain, L.E. Orme, J.P. McCraren, L.G. Fowler and J.R. Leonard. 1982. Fish hatchery management. U.S. Department of the Int. Washington, D.C., pp. 190-193.
- Pyen, C.K. and S. Rho. 1970. Breeding of the puffer, *Takifugu rubripes*. Bull. Korean Fish. Soc., 3: 52-64. (in Korean)
- 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.
- Shein, N.L. 2000. A new method for induction of ovulation using LHRH analogue in cultured sevenband grouper. MS. Thesis Nagasaki Univ., 53 pp.
- Shelton, W.L. 1989. Management of finfish reproduction for aquaculture. Aquat. Sci., 1989: 497-535.
- 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) Fish Physiology. molecular endocrinology of fish, vol. VIII, (ed) N.M. Sherwood and C.L. Hew, Academic Press, New York, pp. 3-66.
- Song, Y.B. 2004. Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ph.D. Thesis Cheju Nat'l. Univ., 89 pp. (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.
- Sumpter, J.P., T.G. Pottinger, M. Rand-Weaver and P.M. Campbell. 1994. The wide-ranging effects of stress in fish. (*in*) *Perspectives in comparative endocrinology*, (ed) K.G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe, National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 535-538.
- Thomas, P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. (*in*) *Perspectives in comparative endocrinology*, (ed) K.G. Davey, S.S. Tobe and R.E. Peter, National Research Council, Ottawa, pp. 619-625.
- 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. pp. 205-266.
- Watanabe, W.O., S.C. Ellis, E.P. Ellis, W.D. Head, C.D. Kelley, A. Moriwake, C.S. Lee and P.K. Bienfang. 1995. Progress in

- controlled breeding of nassau grouper, *Epinephelus striatus* broodstock by hormone induction. *Aquaculture*, 138: 205-219.
- Yang, S.G., Y.D. Lee and C.K. Pyen. 1994. A study on the gonadal maturation and egg-stripping by hormone treatments of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *J. of Aquaculture*, 11(4): 189-205. (in Korean)
- Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129: 49-73.
- Yoo, S.K., Y.J. Chang and M.S. Won. 1988. Influence of water temperature and specific gravity on egg development and hatching of the striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Bull. Nat'l Fish. Univ. Pusan*, 28: 51-57.
- 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., A. Goren, M. Tosky, G. Pagelson, D. Leibovitz and Y. Koch. 1989a. 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.
- Zohar, Y., M. Tosky, G. Pagelson and Y. Finkelman. 1989b. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using [D-Ala⁶-Pro⁹NET]-LHRH: comparison with the use of HCG. *Israeli J. Aquacult. Bamidgeh*, 41: 105-113.
- Zohar, Y., and C.C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.

- 宮本廉夫・立原一憲・蛭子亮制・塚島康生・松村靖治・藤田朱郎・林田豪
介・多付田修. 1992. ホルモン処理によるトラフグ天然魚の成熟促進. 水産増殖 40: 439-442.
- 梅田普・水内俊郎・落合明・長谷川泉. 1981. 催熟しだぶり親魚の水槽内産卵
について. 栽培技研 10: 127-131.
- 北田哲夫・北島力. 1983. トラフグ 種苗生産試験. 長崎縣水試事報 58:
170-177.
- 松山倫也・勝山成美・塚島康生・吉田満彦・荒川敏久・北島力・松浦修平.
1989. シロザケ脳下垂體および HCG 投與のイシダイに對する成
熟, 排卵の促進效果. 水産増殖 37: 203-209.
- 松原喜代松. 1955. 魚類の形態と検索 II. 石崎書店. 東京 pp. 791-1605.
- 藤田朱郎. 1962. 日本主要フグ類の生活史と養殖に關する研究. 長崎縣水産試
験場論文集 2: 16-17
- 長谷川仁・大順賀穂作・近藤優. 1978. 養殖トラフグからの採卵. 靜岡水試研
報 12: 35-36.
- 赤崎正人・梶河武史・立中義徳・石橋制. 1976. マダイの種苗生産に關する基
礎的研究 - I. ホルモン投與による卵巢卵の催熟效果. 宮大農報
23: 25-35.

감사의 글

녹색의 진한 향이 물씬 풍겨나는 계절에 때 늦게 새로운 학문의 길에서 자그마한 결실을 보는 감회를 저를 아껴주시고 도와주신 모든 분들과 함께 나누고자 합니다.

이따금 회식 자리에서 겨울비가 추적추적 내리는 날에 연구소를 찾아왔다는 이유만으로 연구실원으로 받아주었다고 말씀하시는 이영돈 지도교수님께 색다른 학문의 길목에서 주저하는 저를 다독이면서 잘 인도해 주신 것에 대해 감사의 말씀을 올립니다.

이 논문이 나오기까지 한 자 한 자 꼼꼼하게 다듬어 주신 사조 CS (주) 제주양식장 강법세 이사님과 영어 문장을 깔끔하게 손질해 주신 이경준 교수님께 감사드리며, 학위과정 중에 많은 관심과 애정으로 지도해 주신 노섬 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 최광식 교수님께 감사드립니다.

친어관에서부터 모든 실험이 원활하게 될 수 있도록 도움을 주신 사조 CS (주) 박길수 대표 이사님, 송영길 과장님, 고영수 계장님, 양훈석 계장님, 김형철 계장님, 현종우 대리님, 오상민 대리님, 송영만 님, 송진호 님, 송혜영 님, 오은주 님, 자주복 관리와 실험에 아낌 없는 조언을 주신 고환봉 차장님, 그리고 하나의 성과물을 위해서 2년여 동안 함께 고생하다가 올해 사조 CS (주) 제주양식장 식구가 된 김삼연 군을 비롯한 양식사업팀 가족 여러분께 감사드립니다.

학과 사무실에서 조교로 근무하면서 행정적으로 많은 도움을 주신 강도형 님과 최영웅 님께 감사드리고, 아울러 시설과 기자재를 이용할 수 있도록 도움을 주신 해양과환경연구소 강태연 선생님, 김봉길 선생님, 변수철 선생님, 김병직 박사님, 김선희 님, 재호에게도 고마움을 전합니다.

그리고 저희 아내와 동기 동창이라는 이유만으로 학위과정에서부터 마지막 논문이 완성될 때까지 저의 뒤치닥거리를 성심 성의껏 해준 송영보 박사

와 항상 곁에서 사소한 것까지 챙겨준 발생학 실험실의 임봉수 박사, 이치훈 실장, 김한준, 박창범, 진영석, 허성표, 이권우, 김재형 후배님들에게 고마움을 전합니다. 또한 서종표 선배님을 비롯한 해성회 식구들인 김병호 박사, 나오수, 오성립, 박용주, 김봉원, 최정권, 고희진, 고범호, 강지웅, 허상우 후배님들께 감사드립니다.

늦은 나이에 새로운 학문의 길을 갈 수 있도록 뒤에서 묵묵히 보살피 주신 부모님과 형제들에게 감사를 드리고, 만학의 길에 접어들 수 있도록 용기를 주고 내조를 해준 아내와 힘든 상황에서도 항상 힘과 웃음을 주는 큰 딸 가연이와 아들 민석이에게 이 논문 한자락에 묻어있는 애환을 남겨두고 싶습니다.

이 연구는 사조 CS(주) 제주양식장과 산업자원부의 지역혁신 인력양성 사업의 연구결과로 수행되었습니다.

