

석사학위논문

자바리, *Epinephelus bruneus* 암컷의
성숙 특성과 puberty 유도

제주대학교 대학원

해양생명과학과

류 용 운

2008년 2월

**Mature characteristics and induction of puberty in
female longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*
(Bloch, 1793)**

Yong-Woon Ryu
(supervised by professor Young-Don Lee)

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

**MARINE LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February 2008

자바리, *Epinephelus bruneus* 암컷의 성숙 특성과 puberty 유도

지도교수 이 영 돈

류 용 운

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2008년 2월

류용운의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장

최 광 식



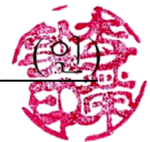
위 원

김 기 영



위 원

이 영 돈



제주대학교 대학원

2008년 2월

목 차

목 차	i
List of figures	iii
List of tables	v
Abstract	vi
총 론	1
제 1장. 자바리 puberty(성숙개시) 특성에 관한 연구	
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	
1) 실험어	5
2) Sampling	8
3) 조직학적 관찰	10
4) 생식제어활성인자 분석	
(1) Total RNA 추출	10
(2) Realtime RT-PCR	11
(3) RIA	15
III. 결 과	
1) 자바리 puberty 특성에 관한 조직학적 관찰	14
2) 생식생리활성인자들의 발현량 비교	18
3) 혈중 스테로이드 호르몬양의 변화 비교	20
제 2장. 자바리 Puberty 조기 성숙 유도	
I. 서 론	22

II. 재료 및 방법	
1) 실험어	25
2) 호르몬 투여	27
3) 조직학적 관찰	30
4) 생식제어활성인자 분석	
(1) Total RNA 추출	30
(2) Realtime RT-PCR	30
(3) RIA	30
5) 난질 평가	30
III. 결 과	
1) 호르몬 처리에 따른 생식선 변화의 조직학적 관찰	31
2) 생식생리활성인자들의 발현량 비교	34
3) 혈중 스테로이드 호르몬양의 변화 비교	36
4) 난질 평가	38
중합 고찰	40
요 약	46
참고 문헌	48

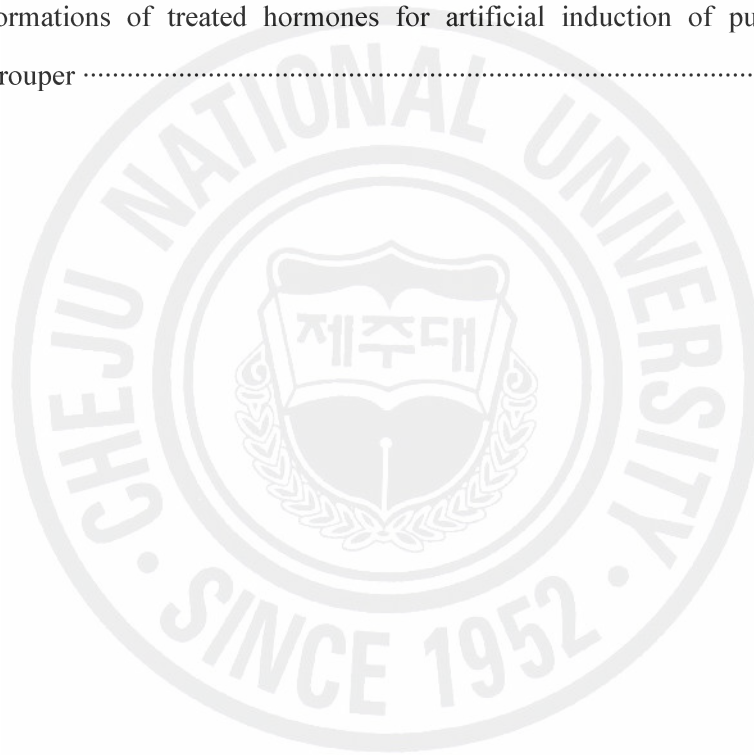
List of figures

- Fig. 1. Tagging procedures and tools. A, tagging tools (reader, injector, chip); B, micro chip; C, injector; D, injection spectacle of microchip on dorsal muscle of longtooth grouper. 7
- Fig. 2. Photograph of experimental fish of longtooth grouper female classified three groups on the bodyweight for understanding pubertal development. A, about 1 kg fish putative pre-puberty; B, about 2 kg fish putative dummy run; C, about 3 kg fish putative puberty. 9
- Fig. 3. Photomicrographs of ovarian development of female longtooth grouper in none breeding season (April). A, about 1 kg bodyweight fish; B, about 2 kg bodyweight fish; C&D, about 3kg bodyweight fish. PNO, perinucleous stage oocyte; ODO, oil droplet stage oocyte; YO, yolk stage oocyte; N, nucleus. Scale bar = 200 μm 15
- Fig. 4. Photomicrographs of ovarian development of longtooth grouper female in breeding season (June). A&B, about 1 kg bodyweight fish; C, about 2 kg bodyweight fish; D, about 3kg bodyweight fish. PNO, perinucleous stage oocyte; ODO, oil droplet stage oocyte; YO, yolk stage oocyte. Scale bar = 200 μm 16
- Fig. 5. Changes of relative frequencies of gonadal development between none breeding season and breeding season in female longtooth grouper. (A), None breeding season (April); (B), Breeding season (June). 17
- Fig. 6. Expression levels of follicle-stimulating hormone ($\text{FSH}\beta$) and luteinizing hormone ($\text{LH}\beta$) mRNAs in the pituitary of female longtooth grouper on non-breeding season (April) and breeding season (June). Data are expressed as means \pm SEM. 19
- Fig. 7. Plasma E2 levels of female longtooth grouper on non-breeding season

(April) and breeding season (June). Data are expressed as means \pm SEM. *, P<0.05.	21
Fig. 8. Photographs of hormone treatment by syringe. A, injecting position; B, scene of injection.	29
Fig. 9. Photomicrographs of ovarian biopsies of longtooth grouper female treated with hormones. (A) initial control, (B) control, (C) GnRH α , (D) GnRH α + IGF-I, (E) GnRH α + Dom group at time of the treatment after 20 days. Scale bars=200 μ m.	32
Fig. 10. Relative frequencies of gonadal development among the hormones treated groups in female longtooth grouper.	33
Fig. 11. Expression levels of follicle-stimulating hormone (FSH β) and luteinizing hormone (LH β) mRNAs in the pituitary of female longtooth grouper by the hormone treatments. Data are expressed as means \pm SEM.	35
Fig. 12. Variation of plasma E $_2$ levels of female longtooth grouper by the hormone treatments during the experimental period. Data are expressed as means \pm SEM.	37
Fig. 13. Frequencies of fertilization and hatching rates on ovulated egg. (A), egg quality of fertilized egg on pre-pubertal fish by GnRH α treatment. (B), relative frequencies of egg quality between pre-pubertal fish and post-pubertal fish. Vertical bars indicated standard errors.	39

List of tables

Table 1. Experimental fish size and identification of longtooth grouper by sampling times on non-breeding season (April) and breeding season (June)	6
Table 2. GTH subunits primers and taqman probes used in real time RT-PCR	12
Table 3. Experimental fish size and identification of longtooth grouper on hormone treatment groups	26
Table 4. Formations of treated hormones for artificial induction of puberty in female longtooth grouper	28



ABSTRACT

Longtooth grouper *Epinephelus bruneus* is a commercially and recreationally valuable species in Korea but it takes too much time until sexual maturation. Therefore, it makes difficult to obtain stable fertilized eggs and understand the mature characteristics in female longtooth grouper. This study researched that pubertal development on the bodyweight and the effects about hormone treatment of GnRH analogue (GnRH_a) and GnRH_a in combination with dopamine antagonist (Domperidone; Dom) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on early sexual maturation in pre-pubertal female longtooth grouper.

Experimental fish were classified into three groups (about 1, 2, 3 kg) by the bodyweight (BW) for understanding pubertal development in this species. Three groups were sampled on none-breeding season (April) and breeding season (June). On the none-breeding season, 1 kg and 2 kg groups showed perinucleous stage while vitellogenesis was observed in 3 kg group. However, on the breeding season, 2 kg and 3 kg groups showed vitellogenesis while 1 kg group showed perinucleous stage. In the GTH subunit expressions, FSH β and LH β mRNA levels showed similar trends to rise according to increase of bodyweight in both non-breeding and breeding seasons. However, in the FSH β expression levels of 3 kg group, the breeding season was lower than non-breeding season. The serum concentration of E₂ of 3 kg group showed similar pattern with FSH β expression levels.

Sexually immature pre-pubertal fish (33.2 ± 0.5 cm, 1.04 ± 0.04 kg) were treated intramuscularly with a sustained-release single injection of the GnRH_a ($60 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{BW}$) and combinations of both GnRH_a and Dom ($60 \mu\text{g}/\text{kg} + 5 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$), GnRH_a and IGF-I ($60 \mu\text{g}/\text{kg} + 10 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{BW}$). The control group was injected coconut oil (free-hormone) and maintained for 20 days. After 20 days, the control group showed perinucleous stage and was not significantly different than initial control group. Both GnRH_a and GnRH_a + IGF-I treatment groups showed

vitellogenesis stage and ovulation was observed in only GnRH α treatment group on day 5. The GnRH α and GnRH α + IGF-I treatment accelerated oocyte developmental stage. A combination of the GnRH α and Dom of treatment group showed the late developmental trend from the others treatment. In the GTH subunit expressions, FSH β mRNA levels in the GnRH α treatment group were higher than that of the others treatments groups. However, in the GnRH α + Dom treatment group, the LH β mRNA levels were higher than that of the others treatment groups. Serum E $_2$ concentrations in both GnRH α and GnRH α + Dom treatment groups increased after 5 days. However, the E $_2$ concentration in the GnRH α + IGF-I treatment group increased than that of the others treatment groups on day 10 and remained at the high levels until day 15.

These results indicate that the pubertal development characteristics in this species is able to classify three stages; pre-puberty (about 1 kg), dummy run (about 2 kg) and puberty (about 3 kg) by the bodyweight. Moreover, GnRH α and GnRH α + IGF-I treatment have more effects for inducing onset of puberty in pre-pubertal female longtooth grouper. Also, expression of FSH β have more important effects than LH β during the sexual maturation and oocyte development in the female longtooth grouper.

총 론

바리과 어류는 전 세계적으로 기호성이 매우 높은 어종으로 고부가가치의 생산성을 지녔다. 하지만, 최근 남획과 서식지 파괴로 인하여 자원이 계속 감소하고 있는 추세이며, 국제식량기구(FAO, 1993)와 바리과 어류의 멸종위기 상황에 관한보고(Annalie et al., 2000) 등에서도 자원량이 급격히 감소하고 있는 어종으로 분류하고 있다. 또한 2004년 국제자연보호기구(IUCN)에서 발표한 세계 멸종위기 종들에 관한 보고서인 “The 2004 IUCN Red List of Threatened Species” (Baillie et al., 2004)에서는 63종의 바리과 어류를 멸종위기 종으로 분류하고 있으며, 제주도에 서식하는 지역 특산 어종인 자바리와 붉바리도 멸종위기 종에 속해 있다. 자바리는 성체의 길이가 1 m에 달하는 대형종으로 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다. 서식 환경은 치어시기에 얕은 연안에서 활동하다 성어가 되면 수심 20~200 m 사이의 암초지대에서 서식하며, 작은 어류나 갑각류, 두족류를 주식으로 하는 육식성 어류이다(FAO, 1993; Kim et al., 2005). 성 특성은 다른 바리과와 같이 전 개체가 암컷으로 성숙한 후 일부 개체들이 수컷으로 성전환을 하는 자성선숙형 자동동체이며, 처음 암컷으로 성성숙하는데 약 5~7년, 성전환을 통해 수컷이 출현하기까지는 약 7~10년의 긴 시간이 소요된다. 더욱이 인위적인 사육환경에서는 성숙에 필요한 환경요인의 결여로 인하여 성숙과 산란에 이르기까지 더 오랜 시간이 소요되는 것으로 추정된다. 산란시기는 환경에 따라 차이가 있으나 제주지역에서는 6~8월로 추정되고 있다.

이와 같이 자바리는 고부가가치의 어종임에도 불구하고 자원관리의 부재로 인하여 그 양이 급감하고 있으며, 인위적인 사육환경에서는 효율적인 사육관리와 안정적인 수정란 생산을 하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 문제점은 기존의 다른 양식어종들에 비하여 자바리의 성숙 발달 특성에 관한 연구가 부족하여 체계적인 관리가 이루어지고 있지 않기 때문이다. 자바리에 관한 연구는 유생의 소화기관과 면역기관 발생(Kato et al., 2004), 유생의 발생과 사육(Song et al., 2005), 사육환경개선에 의한 유생 생산(Kazuhisa and Kenzo, 2006), 성전환과 성숙유도에 따른 종묘 생산(Oh, 2006) 등 주로 종묘생산과 치어사육에 관련하여 많은 연구가

이루어졌다. 성공적인 종묘생산을 통하여 치어를 생산하고 이를 사육관리하기 위해서는 우선적으로 안정적인 수정란 공급이 선행되어야 한다. 또한, 안정적인 수정란 생산을 위해서는 원하는 시기에 수정란을 생산할 수 있는 효율적 성숙유도 기술이 개발되어야 하며, 이를 위해서는 자바리의 종 특이적인 성성숙 발달기작을 이해하고 있어야 한다. 하지만 현재까지 자바리 성성숙 발달특성의 이해를 위한 생식내분비계의 번식생리에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다.

어류의 성숙과 산란은 다른 척추동물과 마찬가지로 생식내분비계에 의하여 조절된다. 어류의 생식내분비계는 뇌-뇌하수체-생식선의 축(Brain-Pituitary-Gonad axis; B-P-G axis)으로 이루어져 있으며, 각각의 기관은 서로 상보적인 기능을 갖는다. 어류의 성성숙은 다양한 환경정보가 생식내분비계 축의 발동을 자극함으로써 시작되며(Goos, 1993), 뇌의 시상하부에서는 이런 정보를 통합하여 뇌하수체로 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH; 생식선 자극호르몬 방출호르몬)을 방출하게 된다(Kobayashi et al., 1997; Okuzawa and Kobayashi, 1999). GnRH는 뇌하수체에서 Gonadotropin (GTH; 생식선 자극 호르몬)의 방출을 자극하여 두 종류의 GTH, Follicle stimulating hormone (FSH; 여포 자극 호르몬)와 Luteinizing hormone (LH; 황체 형성 호르몬)의 분비를 촉진한다. 암컷에 있어 FSH는 주로 성숙초기에 여포세포에 작용해서 난황축적에 많은 관여를 하며, LH는 성숙후기에 난의 최종 성숙과 배란을 조절하는 것으로 알려져 있다(Schulz, 1995; Nagahama, 2000). 이러한 B-P-G axis의 발동은 어류에서 puberty를 개시하는 원인이 되며(Okuzawa, 2002), 생식내분비계축의 완전한 발현은 puberty완료의 조건이 된다(Kumakura, 2003, 2004). 어류의 puberty 성숙 특성을 이해하고 조절하는 것은 어류의 번식 특성을 이해하기 위한 기초가 될 뿐 아니라 어류양식에 있어서도 양식 목적에 맞는 성숙의 조기 유도과 억제를 위하여 매우 중요하다. 따라서 자바리의 성성숙 특성에 관한 연구는 자원회복과 양식 산업의 발달을 위해서도 매우 중요하며, 성숙 및 산란시기까지 오랜 시간이 걸리는 대형어종의 번식생리 특성을 이해하기 위한 실험 모델로써의 의미도 크다.

이 연구는 puberty에 이르기까지 오랜 시간이 걸리는 자바리의 puberty 발달 특성을 조사하고 pre-puberty 단계의 미성숙한 자바리 암컷의 성성숙 유도방법에 대하여 연구하였다.

제 1장

자마리 puberty(성숙개시) 특성에 관한 연구

서 론

Puberty(성숙개시)는 성적으로 미숙한 개체가 생식능력을 획득하고 생후 처음으로 기능적인 배우자를 생산하여 성숙에 이르는 현상이며(Okuzawa, 2002), puberty의 작동은 시상하부 중추신경계의 성중추 활동 개시에 따라 뇌하수체에서 전달되는 GTH (FSH, LH)의 분비 활성 변화로 일어난다(Okuzawa and Kobayashi, 1999; Nagahama, 2000). Puberty의 시작은 일부 어류에서는 성분화 시기에 나타나기도 하며(Strüssmann and Nakamura, 2002), 이때 생후 처음으로 수컷과 암컷에서는 배우자형성과정의 시작된다(Schulz and Miura, 2002; Patiño and Sullivan, 2002). Puberty의 완료는 수컷과 암컷 모두 기능적인 성 성숙을 이루어 배정·배란하는 것이다(Okuzawa, 2002).

어류의 puberty는 B-P-G axis의 활성화로 시작되지만, 이 활성화의 유도 기작에 대해서는 아직 불분명하다. 포유류에서의 puberty 시작에 관한 기작은 뇌에서 발현되는 GnRH의 전달 빈도에 의한 것으로 초점이 맞추어지고 있으나(Foster, 1994), 어류에서는 GnRH의 전달 빈도에 대한 발현측정이 어려워 GnRH 전달빈도와 puberty 시작의 상보적인 관계에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다(Okuzawa and Kobayashi, 1999). 그러나 최근 많은 연구들에서 pre-puberty시기와 puberty시기의 GnRH발현양의 차이에 대하여 보고되어지고 있으며, striped bass, *Morone saxatilis* (Holland et al., 2001), red seabream, *Pagrus major* (Okuzawa et al., 2003) 등에서 puberty시기의 GnRH발현이 pre-puberty시기보다 높았으며, 이는 생식소 발달과도 관계가 있었다고 보고하고 있다. Puberty시기의 GTH 중 FSH의 역할은 초기성숙기에 난황축척과 정소발달을 촉진하는 것이며, LH는 성숙후반기에 난의 최종성숙과 배란을 유도하는 역할을 한다(Gomez et al., 1999; Hassin et al., 2000). 하지만 Rodríguez et al. (2000) 등과 같이 european sea bass에서 LH가

pre-puberty시기에 증가했다는 연구보고도 있어 어류에서 FSH와 LH의 발현양을 비교하는 것은 대상종의 puberty 성숙특성을 이해하기 위하여 필요하다.

이 연구에서는 자바리 암컷의 puberty 성숙기작을 이해하기 위하여 puberty 전후시기로 추정되는 자바리 암컷을 대상으로 미성숙시기와 성숙시기에 생식소의 발달 상태와 생리생식활성인자들의 발현양을 측정하여 puberty 발달의 생리적 특성을 탐색하였다.



재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 제주연안에서 채포하여 탐라수산(제주특별자치도 서귀포시 표선면)의 2개 조의 콘크리트수조(A조: $6.5 \times 6 \times 3$ m, B조: $6.5 \times 11 \times 3$ m)에서 사육 중인 1~5 kg의 자바리 중에서 1 kg 4마리(평균 전장 31.7 ± 1.1 cm, 평균 체중 1.1 ± 0.1 kg), 2 kg 4마리(평균 전장 45.8 ± 1.1 cm, 평균 체중 2.3 ± 0.2 kg), 3 kg 4마리(평균 전장 52.0 ± 1.1 cm, 평균 체중 3.3 ± 0.2 kg)를 실험에 사용하였다(Table 1).

모든 실험어는 개체별 관리를 위해 등 근육에 micro chip을 삽입하였으며, 실험 및 사육 관리시 micro chip reader ISO MAX IV (Data Mars SA, Switzerland)를 이용하여 개체별 이력사항을 추적하였다(Fig. 1). 먹이는 냉동고등어와 전갱이를 이틀에 한번 씩 공급하였으며, 성숙시기 3개월 전인 3월부터 영양 강화를 위하여 오징어를 같이 공급하였다. 2 kg 미만인 개체는 먹이 섭이 시 큰 개체에 밀려 먹이를 먹지 못하는 현상을 방지하기 위하여 수조에 PVC 파이프와 가두리 망을 이용하여 제작한 cage안에 수용하여 사육 관리하였다.

Table 1. Experimental fish size and identification of longtooth grouper by sampling times on non-breeding season (April) and breeding season (June)

Season	ID No.	Body Weight (g)	Body Length (cm)	Rearing Tank
Non-breeding season	215118	1020	30.0	B(cage)
	216044	958	29.5	B(cage)
	216350	2590	48.0	B
	216624	2700	47.0	B
	215547	2900	50.0	B
	215140	3750	55.0	B
	216060	1140	33.0	B (cage)
Breeding season	215490	1120	34.0	B (cage)
	215752	1940	44.5	B (cage)
	216217	1910	43.5	B (cage)
	216699	3440	51.0	B
	216405	3300	52.0	B

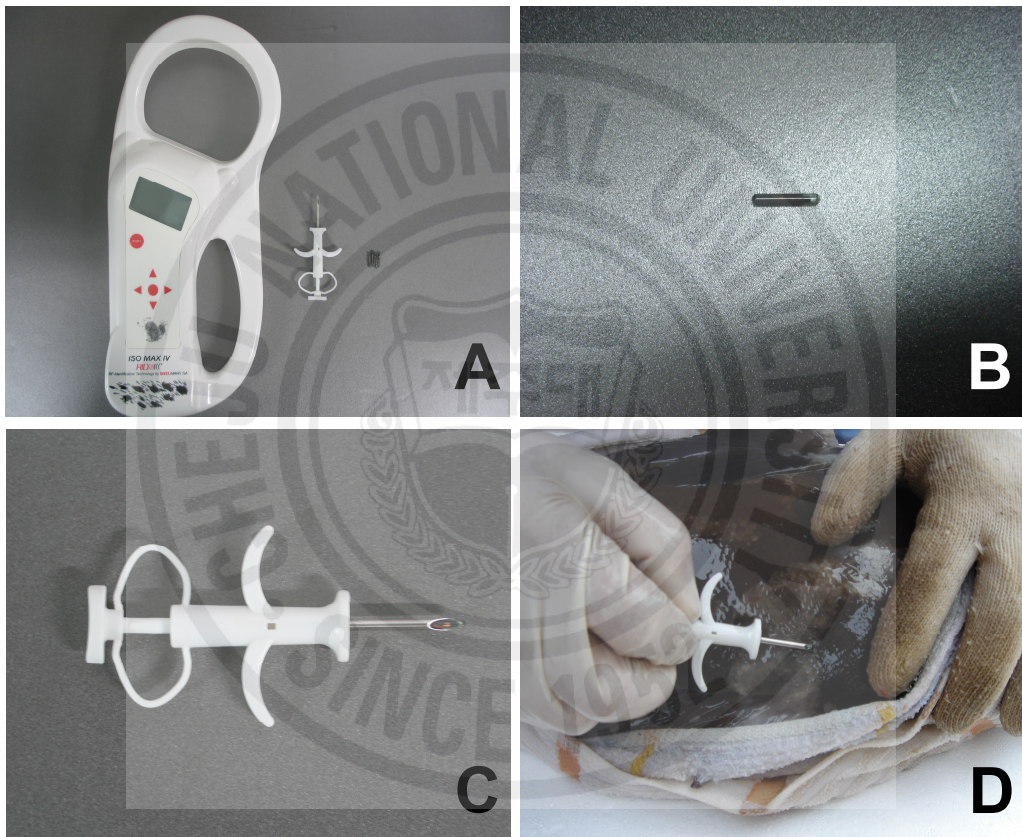


Fig. 1. Tagging procedures and tools. A, tagging tools (reader, injector, chip); B, micro chip; C, injector; D, injection spectacle of microchip on dorsal muscle of longtooth grouper.

2. Sampling

실험은 자바리 암컷의 **puberty** 발달 특성을 조사하기 위하여 미성숙시기와 성숙시기에 1 kg, 2 kg, 3 kg 개체를 체중별로 생식선의 발달 상태와 생식생리활성인자들의 발현을 조사하였다.

실험어는 미성숙시기인 4월과 성숙시기인 6월에 각 개체별 2마리씩 **sampling** 을 실시하였고, 미성숙시기와 성숙시기에 **puberty** 발달 단계에 따라 개체 간 성숙 특성을 비교하기 위하여 생식선 발달의 조직학적 관찰과 생식생리활성인자인 **GTH subunits (FSH β , LH β)**의 발현량, 혈중 스테로이드 호르몬(**E₂, 11-KT**)의 농도를 조사하였다. **Sampling**시 실험어는 **2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA; 20ppm)** 에 마취시킨 후 전장과 체장을 측정하고, 혈중 스테로이드 호르몬의 농도를 알기 위하여 피부에서 혈액을 채취하였으며, 조직학적 관찰을 위하여 생식선을 적출 후 **Bouin's** 용액에 고정하였다. 생리생식인자들의 발현량을 측정하기 위하여 뇌와 뇌하수체는 적출한 후 바로 액체 질소(-196℃)에 급속 동결시켜 분석전까지 -70℃에서 보관하였다.



Fig. 2. Photograph of experimental fish of longtooth grouper female classified three groups on the bodyweight for understanding pubertal development. A, about 1 kg fish putative pre-puberty; B, about 2 kg fish putative dummy run; C, about 3 kg fish putative puberty.

3. 조직학적 관찰

생식선의 성숙상태를 조직학적으로 관찰하기 위하여 생식선은 Bouin's solution 에 하루 동안 고정된 후 70% EtOH로 치환시켜주었다. 고정된 조직은 단계별 탈수 과정을 거친 후 파라핀으로 포매하였으며, 절편법에 의해 7 μ m의 두께의 조직 표본으로 만들었다. 조직표본은 Hansen's haematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색을 실시하여 광학현미경하에서 검경하였다. 생식선내의 난모세포 발달단계 조사는 조직표본 슬라이드의 관찰을 통하여 3반복으로 개수하여 측정하였다.

4. 생식제어 생리활성인자 분석

(1) Total RNA 추출

뇌하수체는 생식생리활성인자(GTH subunits)의 발현량 측정을 위해 total RNA 추출 전까지 -70°C 에서 보관하였고, 추출시 조직 100 mg당 1 ml의 RNAiso Reagent (TaKaRa Co., Japan)를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 완전히 마쇄하였다. 마쇄된 시료는 실온에서 5분간 방치한 후 0.3 ml의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 $12,000 \times g$ 으로 4°C 에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 새로운 튜브로 옮긴 다음 동량의 isopropanol과 RNA 침전시 회수율을 높이기 위하여 3 ml의 Ethachinmate (Nippon Gene, Japan)를 첨가하여 $12,000 \times g$ 으로 4°C 에서 10분간 원심분리를 시행하였다. 침전된 RNA는 75% EtOH로 수세한 후 알콜을 완전히 제거하여 DEPC-DW에 용해하였다. 용해된 시료는 Optizen 2120 UV Spectrometer (Mecasys Co., Korea)를 이용하여 260nm의 흡광도에서 RNA의 농도를 측정하였고 A260/A280의 비를 이용하여 순도를 검증하였다.

(2) Realtime RT-PCR

Puberty 발달 과정중의 생식내분비계 구축여부를 확인하기 위하여 GTH subunits의 mRNA 발현량을 Quantitative Realtime RT-PCR 방법으로 분석하였다.

Total RNA는 RNase 증류수(DEPC DW)를 더하여 5 μg / 30 μl 의 농도로 맞춰 주었고 RNA 2차 구조를 방지하기 위하여 65°C에서 10분간 가열 시킨 후 즉시 얼음위에서 식혀주었다. Total RNA를 cDNA로 역전사하기 위하여 합성 kit인 Ready-To-Go-You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, UK)를 사용하였으며, primer는 mRNA만 cDNA로 역전사 시키기 위하여 Oligo-dT primer (15mer; Promega, USA)를 0.5 μg 첨가한 후 37°C에서 60분간 역전사 하였다. 합성된 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 JM109 competent cell에 형질전환 시킨 후, 양성 colony로부터 plasmid DNA (pDNA)를 추출하였고, 추출된 pDNA는 spectrometer를 이용하여 정량화 한 후 copy 수를 측정 하였다. pDNA는 5배씩 같은 비율로 희석하여 8 points의 standard로 sample을 정량화 하였다.

Quantitative Real time RT-PCR방법은 Taqman probe 방법을 사용하였으며, 각 GTH subunits의 염기배열마다 특이적인 TaqMan probe 및 primer를 설계하였다 (Table 2). 합성된 cDNA는 75.75 ng/ μl 의 농도로 희석하여 template로서 5 μl 를 IQ supermix (Bio-rad, USA) 12.5 μl 와 Forward primer 1 μl (500nM), Reverse primer 1 μl (500nM), probe 1 μl (500nM), nuclease-free water 4.5 μl 를 혼합하여 총 25 μl 의 volume을 반응에 사용하였다. Real time RT-PCR의 수행은 Chromo 4™ Four-Color Real-Time System (Bio-rad, USA)을 이용하여 50°C에서 2분, 95°C에서 3분간 pre-heating시켜 주었으며, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing하여 45cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 duplication으로 측정하여 각각 생식생리활성인자들(FSH β , LH β)의 mRNA 발현량을 정량화하였다.

Table 2. GTH subunits primers and taqman probes used in real time RT-PCR

Gene	Oligonucleotide primers	Product length
Common- α	Forward primer	5'-CAGAGGCACAATGAAGAGTCAAC-3'
	Taqman probe	5'-CACTGAGCCCATCGTGGTTGCAGC-3'
	Reverse primer	5'-AGACAACAGGAGAAAGATTTCAGTCC-3'
FSH- β	Forward primer	5'-CTGCCACTCCGACTGTCATC-3'
	Taqman probe	5'-ACCAGCATCAGCATCCCTGTGGAGA-3'
	Reverse primer	5'-GGTAAACACTGTCCTTCACATATGG-3'
LH- β	Forward primer	5'-TTTGAGCTTCCTGACTGTCCCTC-3'
	Taqman probe	5'-ACCCGACTGTACCTACCCTGTGGC-3'
	Reverse primer	5'-GGCTCTCGAAGGTGCAGTC-3'

(3) RIA (Radio Immuno Assay)

혈중 스테로이드 호르몬(11-KT, E₂)의 변화를 확인하기 위하여 미부 동맥에서 혈액을 채혈한 후 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리하였으며, 분석 전 까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 스테로이드 호르몬 추출을 위하여 각 호르몬(11-KT, E₂)당 혈장 250 μ l를 채취한 다음 2 ml의 diethyl ether를 첨가하여 혼합 한 후 5~10분간 정체시킨 뒤 -70°C의 냉동고에서 15분간 결빙 시켜 상층의 유기 용매층(free steroids)만을 시험관에 옮겼다. 완전 건조된 스테로이드 추출물은 1 ml의 0.1% gel-PBS (pH 7.5)에 다시 용해하였다.

방사면역측정법(RIA, radioimmunoassay)은 각 100 μ l의 standard (0.0075~3.84 ng/ml)와 ³H로 표지된 스테로이드(Amersham, England)를 100 μ l씩 첨가 후 희석 항체를 200 μ l씩 넣고 교반시켜 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 항원 항체의 결합형과 유리형을 분리하기 위하여 DCC (dextran coated charcoal)를 250 μ l씩 첨가하여 4°C에서 15분간 방치한 후 원심분리(4°C, 2000 g, 15분)하여 결합형 상등액을 취하였으며, 여기에 3 ml의 scintillation cocktail (Optiphase, WALLAC)을 넣고 액체섬광계측기로 측정하였다. E₂와 11-KT에 대한 항체는 Alexis Fostier (Institute National Recherche Agronomique Campus de Beaulieu, Rennes cedex, France) 박사로부터 얻었으며, E₂와 11-KT RIA계에 있어서 최소 검출량은 각각 12.73 pg/ml (E₂), 7.66 pg/ml (11-KT)이었고, assay 내 (intra-assay)와 assay 간 (inter-assay) 변동계수를 50% 상대결합율에서 조사한 결과, E₂ RIA계에서는 6.02% ($n=3$)와 9.20% ($n=6$), 11KT RIA계에서는 6.55% ($n=3$)와 9.66% ($n=6$)였다.

결 과

1. 자바리 puberty 성숙특성에 관한 조직학적 관찰

실험어의 생식선은 1, 2, 3 kg의 체중별로 미성숙시기와 성숙시기의 성숙상태를 조직학적인 방법으로 조사하였다.

미성숙시기(4월)에 1 kg 개체의 자바리 암컷 생식선은 대부분 약 80 μm 의 주변인기 난모 세포로 이루어져 있었으며(Fig. 3-A), 2 kg의 개체에서는 조금 더 발달한 상태인 평균 난경 90~100 μm 의 주변인기 난모세포들로 구성되어 있었다(Fig. 3-B). 3 kg 개체의 생식선에서는 약 150 μm 의 난경을 가지는 다수의 유구기 난모세포들이 관찰되었으며(Fig. 3-C), 300~400 μm 난경의 성숙한 난황구기의 난모세포를 가지는 개체도 일부 관찰 되었다(Fig. 3-D).

생식선내의 난모세포 발달단계별 출현빈도는 미성숙시기에 1 kg 과 2 kg 개체의 생식선에서 100% 주변인기 난모세포만이 존재하는 것을 관찰할 수 있었다. 3 kg의 개체에서는 주변인기 난모세포가 55%의 비율로 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 유구기와 난황구기 난모세포도 14%와 31%의 비율로 혼재하여 존재하였다(Fig. 5-A).

성숙시기에 1 kg 개체의 생식선은 다수의 주변인기 난모세포들과 유구기 난모세포로 구성되어 있었으며(Fig. 4-A), 주변인기와 유구기, 초기 난황구기 난모세포가 혼재해 있는 개체도 관찰되었다(Fig. 4-B). 2 kg 개체의 생식선에서는 미성숙시기보다 발달한 300~350 μm 의 난경을 가지는 난황구기 난모세포를 관찰할 수 있었으며(Fig. 4-C), 3 kg 개체에서는 370~410 μm 의 난황구기 난모세포가 주를 이루고 있었다(Fig. 4-D).

성숙시기에 1 kg 개체의 생식선에서는 유구기와 난황구기 난모세포가 12.7, 20.3%로 존재하였으며, 주변인기 난모세포가 67%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었다. 2 kg 개체에서는 난황구기 난모세포가 64%로 가장 높은 비율을 보였으며, 3 kg 개체에서는 71%의 다수의 난황구기 난모세포와 12%와 16%의 비슷한 비율로 유구기와 주변인기 난모세포가 존재하였다(Fig. 5-B).

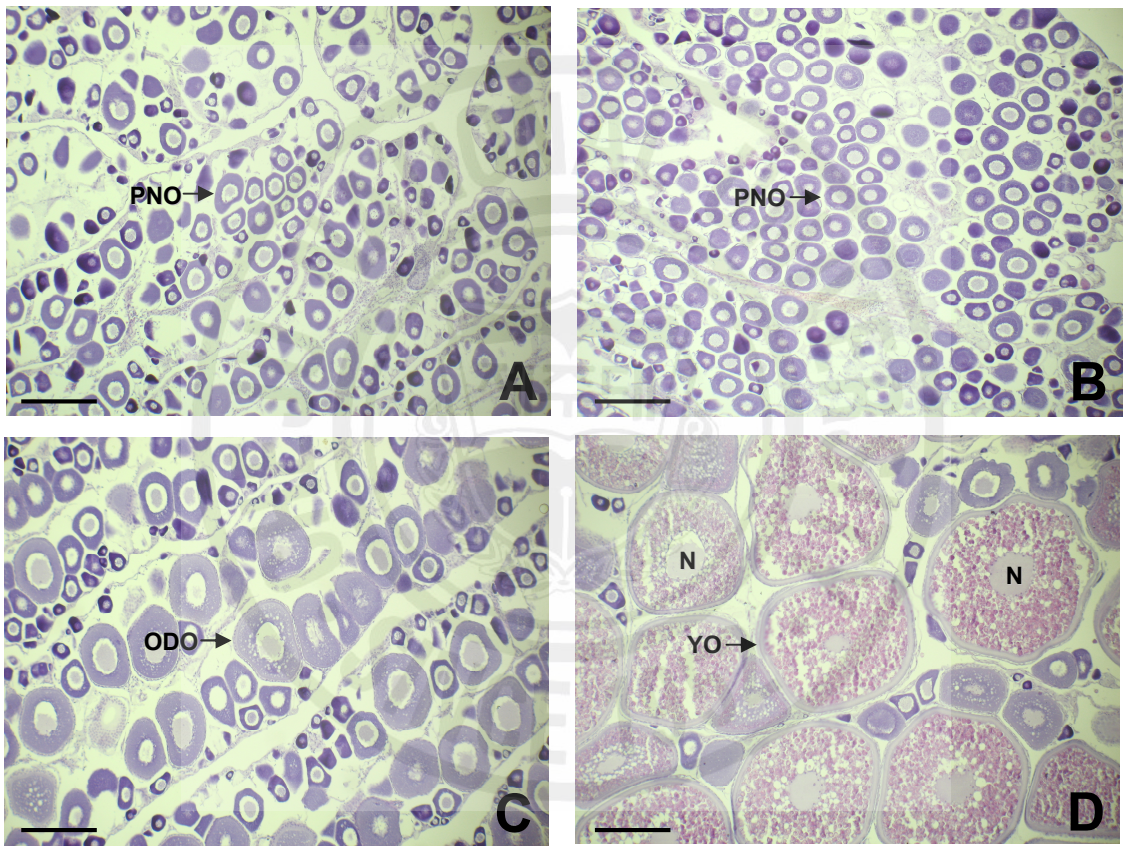


Fig. 3. Photomicrographs of ovarian development of female longtooth grouper in none breeding season (April). A, about 1 kg bodyweight fish; B, about 2 kg bodyweight fish; C&D, about 3kg bodyweight fish. PNO, perinucleous stage oocyte; ODO, oil droplet stage oocyte; YO, yolk stage oocyte; N, nucleus. Scale bar = 200 μm .

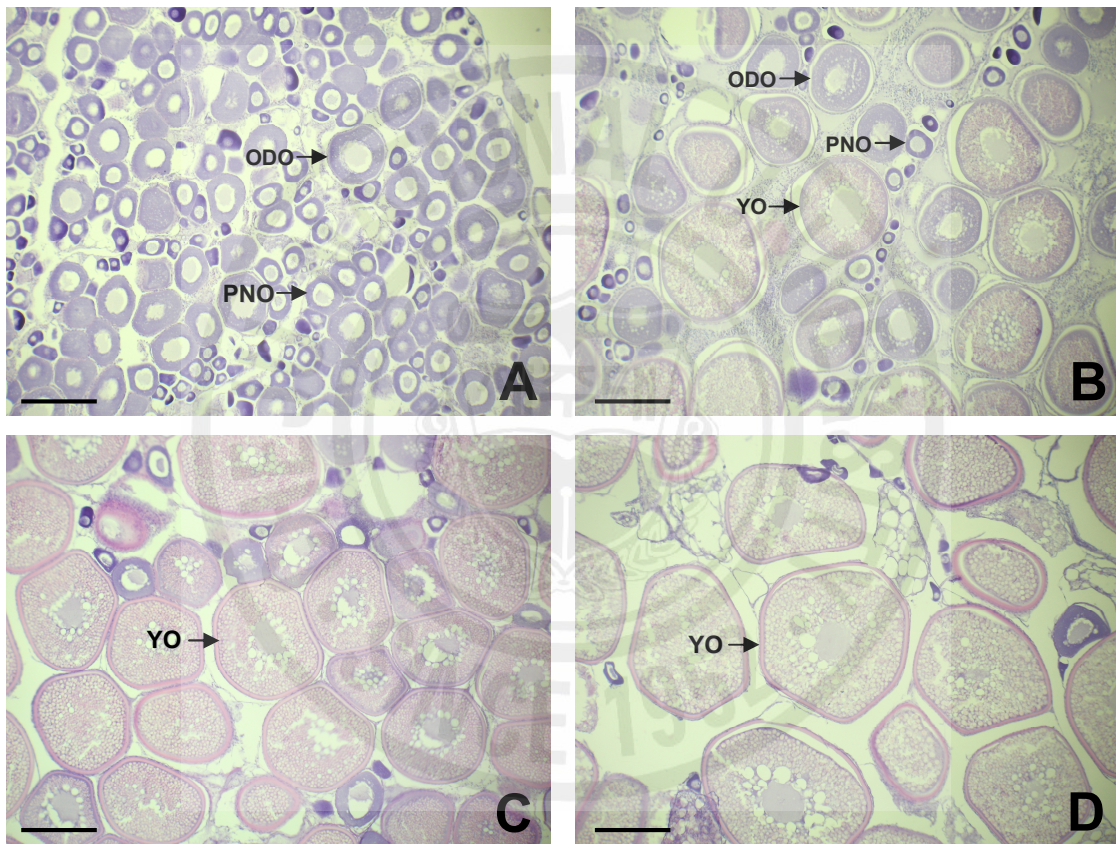


Fig. 4. Photomicrographs of ovarian development of longtooth grouper female in breeding season (June). A&B, about 1 kg bodyweight fish; C, about 2 kg bodyweight fish; D, about 3kg bodyweight fish. PNO, perinucleous stage oocyte; ODO, oil droplet stage oocyte; YO, yolk stage oocyte. Scale bar = 200 μ m.

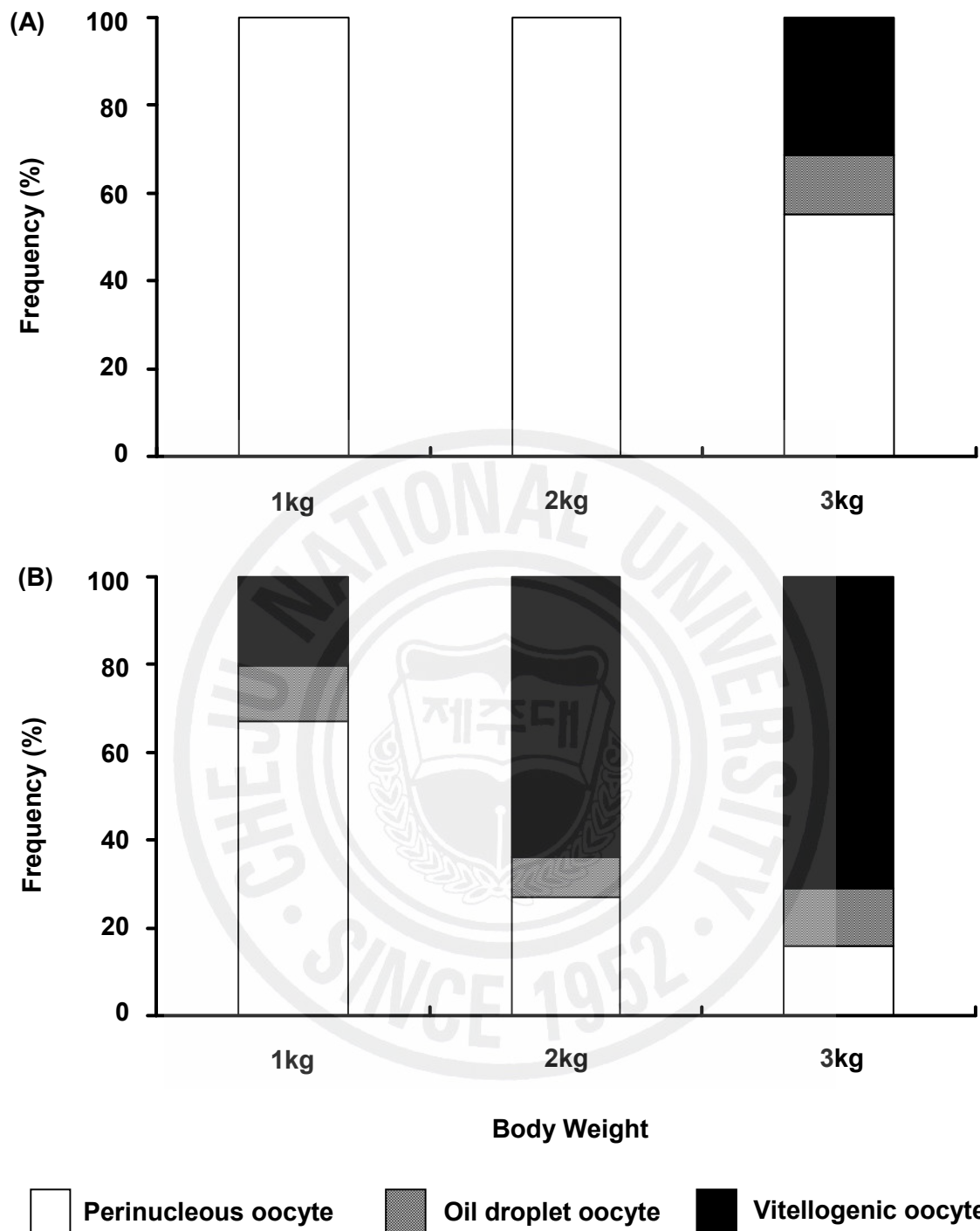


Fig. 5. Changes of relative frequencies of gonadal development between non breeding season and breeding season in female longtooth grouper. (A), non breeding season (April); (B), breeding season (June).

2. 생식생리활성인자들의 발현량 비교

자바리의 puberty 발달특성은 Quantitative Real time RT-PCR 방법을 이용하여 미성숙시기와 성숙시기간의 각 개체별로 생리생식활성인자들(FSH β , LH β)의 발현량을 측정하여 조사하였다.

미성숙시기에 FSH β 발현량은 1 kg 개체에서 1.2×10^6 , 2 kg 개체에서 8.6×10^6 , 3 kg 개체에서 1.0×10^7 으로 체중이 증가함에 따라 높게 발현되는 경향을 보였다. 성숙시기의 1 kg 개체에서 FSH β 발현량은 미성숙시기보다 조금 증가하였으나 4.0×10^6 으로 개체 중 가장 낮게 발현되는 경향을 나타내었으며, 2 kg 개체에서는 1.5×10^7 으로 가장 높게 발현되는 경향을 보였다. 3 kg 개체의 FSH β 발현량은 미성숙시기와 비교하여 6.6×10^6 으로 발현량이 감소하는 경향을 보였으며, 성숙시기의 2 kg 개체보다 감소한 경향을 보였다.

미성숙시기에 LH β 의 발현량은 1 kg 개체에서 1.3×10^6 , 2 kg 개체에서 8.8×10^6 , 3 kg 개체에서 1.5×10^7 으로 체중이 증가함에 따라 높게 발현되는 경향을 보였으며, 성숙시기의 LH β 발현량 또한 미성숙시기와 유사하게 1 kg 개체에서 5.0×10^6 , 2 kg 개체에서 1.3×10^7 , 3 kg 개체에서 2.0×10^7 으로 체중이 증가함에 따라 발현량이 상승하는 경향을 보였다(Fig. 6).

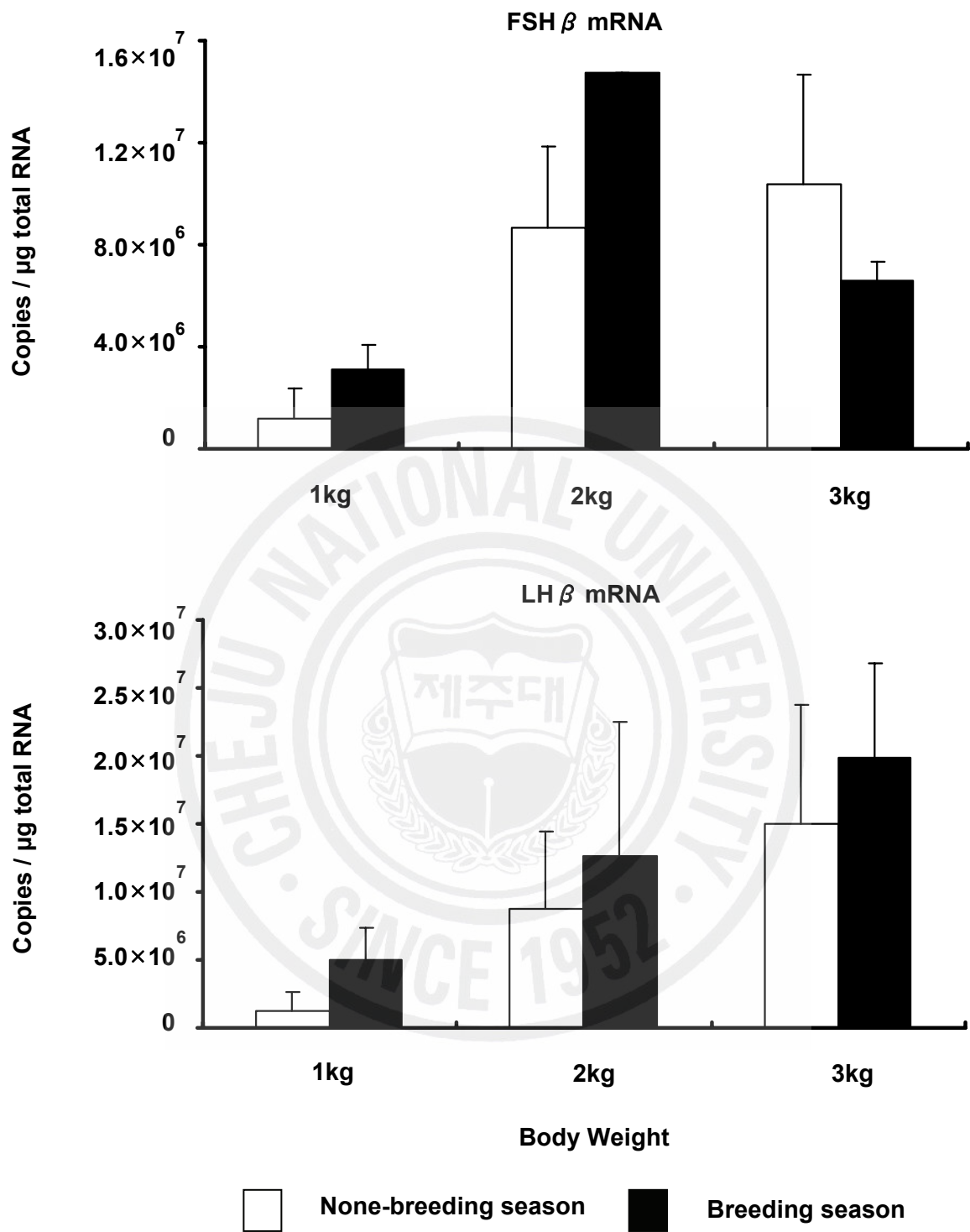


Fig. 6. Expression levels of follicle-stimulating hormone (FSH β) and luteinizing hormone (LH β) mRNAs in the pituitary of female longtooth grouper on non-breeding season (April) and breeding season (June). Data are expressed as means \pm SEM.

3. 혈중 스테로이드 호르몬양의 변화 비교

미성숙시기와 성숙시기간의 각 개체별 혈중 스테로이드 호르몬 변동량은 RIA 방법으로 E2와 11KT의 양을 조사하여 비교하였다.

미성숙시기에 E2 농도는 1 kg 개체인 경우 90 pg/ml로 가장 낮은 농도를 보였으며, 2 kg 개체는 180 pg/ml, 3 kg 개체는 860 pg/ml로 가장 높은 농도를 나타내어서 미성숙 시기의 개체별 혈중 E2 농도는 체중 증가에 따라 상승하는 경향을 보였다.

성숙시기 E2 농도는 1 kg 개체인 경우 144 pg/ml이었으며, 2 kg 개체는 80 pg/ml로 가장 낮은 농도를 나타내었다. 3 kg 개체는 461 pg/ml로 가장 높은 농도를 나타내었으며, 미성숙시기와 비교하여 감소하였다($P < 0.05$, fig. 7).

혈중 11KT의 양은 대부분 최소 검출량 이하의 농도로 검출이 되지 않아 data로 나타내지 못하였다.

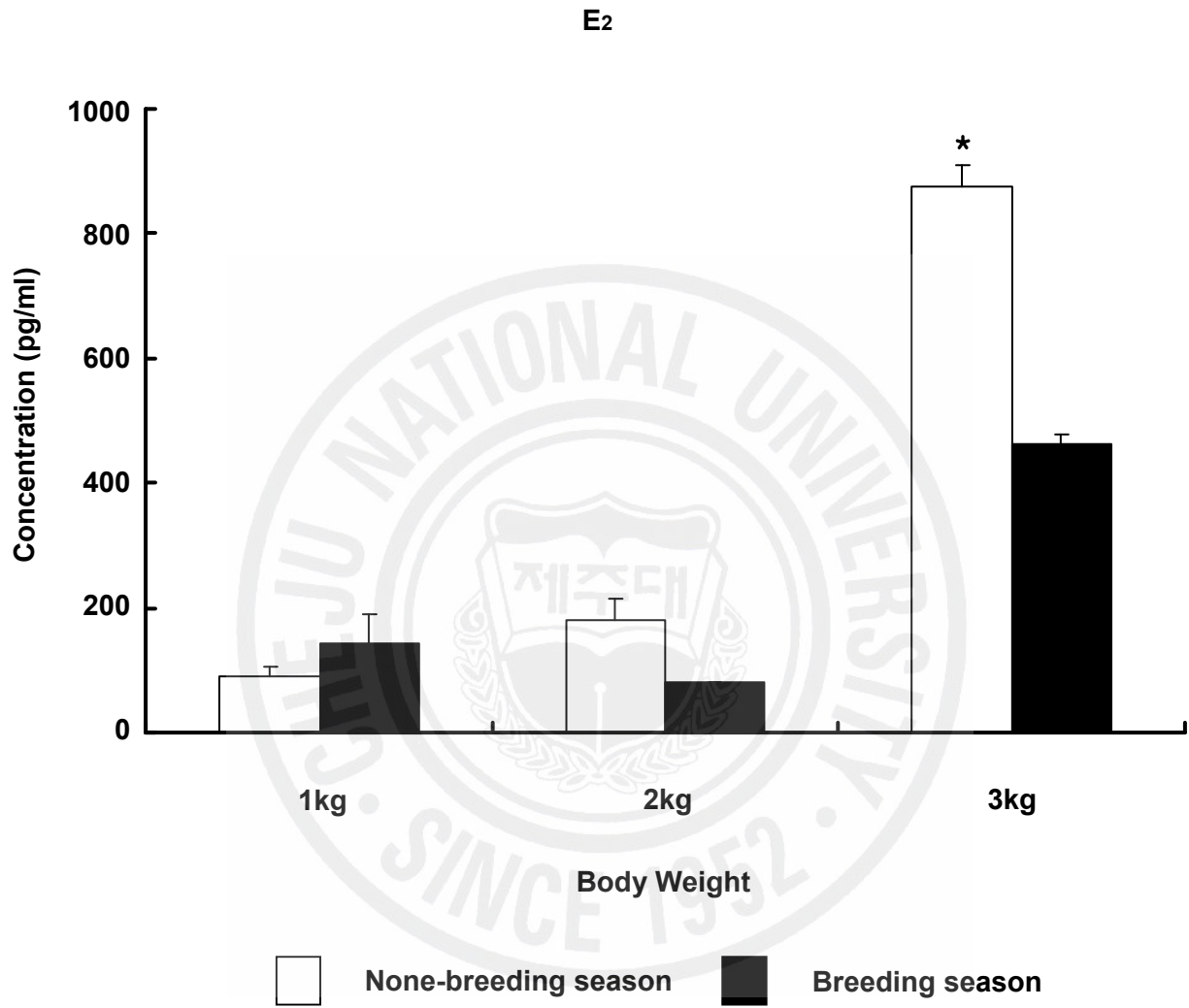


Fig. 7. Plasma E2 levels of female longtooth grouper on non-breeding season (April) and breeding season (June). Data are expressed as means \pm SEM. *, $P < 0.05$.

Chapter 2

자바리 Puberty 조기 성숙 유도

서 론

바리과, 다랑어과, 철갑상어과 등과 같은 대형 양식어종은 puberty에 다다르기 까지 많은 시간이 소모되는 성성숙 특성으로 인하여 안정적으로 수정란을 확보 하기가 매우 어렵다. 이와는 반대로 연어, 잉어, 농어목 등과 같이 조기에 puberty가 완료되는 어종들은 성장에 필요한 에너지를 성숙에 사용함으로써 발육이 더디어지는 발육부진 현상을 보이기도 한다(Okuzawa, 2002). 이와 같은 문제점은 대상종의 puberty 성숙 특성을 이해하고 이를 바탕으로 종 특이성에 알맞은 성숙 유도방법을 사용하여 puberty의 발동과 성숙시기를 조절함으로써 해결할 수 있다. 하지만 미성숙 어류에서의 인위적인 성숙 유도는 성숙한 어류에서와는 달리 성숙에 관여하는 생식생리활성인자들의 발현이 완전하게 활성화 되지 않았으므로 성숙에 결여된 요인을 확인하고 그에 알맞은 처리를 해줘야 하기 때문에 많은 어려움을 가지고 있다. 현재까지 미성숙한 어류에 대한 성숙유도방법은 환경조절 (Hansen et al., 2001)과 호르몬 투여(Kumakura et al., 2003)에 의하여 이루어져왔 으며, 그 외 영양조절로 인한 성숙 유도(Hopkins and Unwin, 1997; Shearer and Swanson, 2000)등 여러 방면으로 미성숙 어류에서의 조기 성숙유도를 위한 방법 이 연구되어지고 있다.

호르몬조절로 인한 인위적인 성숙유도는 생식내분비계에 영향을 미치는 여러 종류의 호르몬 hCG (Lee et al., 1988; Zohar, 1989), GTH (Peter and Yu, 1997; Zohar and Mylonas, 2001), GnRHa (Mylonas and Zohar, 2001; Duncan et al., 2003), IGFs (Le Gac et al., 1993; Negatu et al., 1998), thyroid hormones (Daniel and Eales, 1996), dopamine antagonists (Kumakura et al., 2003; Aizen et al., 2005)등의 투여에 의하여 성숙과 배란이 유도되었다. 이 실험에서는 자바리의 조기 puberty 성숙유 도를 위하여 GnRHa (Gonadotropin releasing hormone analogue)를 기본으로

Domperidone (Dom)과 Insulin growth factor-I (IGF-I)을 복합 투여하여 puberty 초기 성숙유도에 적합한 호르몬을 검색 하였다. GnRHa는 생식선자극호르몬인 GTH의 분비를 자극하는 성숙유도호르몬으로써 GnRHa의 투여는 성숙한 많은 어류들에서 성공적으로 성숙과 산란 유도 효과를 보였다(Zohar and Mylonas, 2001). 하지만, 미성숙한 어류의 초기 성숙유도에서 GnRHa의 단독 투여는 성공적인 성숙유도 효과를 보이지 못했으며, 이는 GnRHa의 자극만으로는 미성숙한 어류의 성성숙에 필요한 요인들을 충족시켜주지 못했기 때문이다(Crim and Evans, 1983; Yaron, 1995). 따라서, 최근에는 pre-puberty 시기의 미성숙한 어류에 초기 puberty 성숙을 위하여 다양한 호르몬을 복합투여하고 있으며, 그 중 Domperidone은 dopamine 저해제로써 GTH의 분비를 선택적으로 억제하는 dopamine을 차단하여 GnRH에 의한 성숙유도 효과를 증진시킨다(Dufour et al., 2005; Aizen et al., 2005). IGF-I은 성장인자로써 어류의 성숙과 LH의 분비를 촉진시켜 GnRHa와 더불어 어류의 puberty를 조기에 성숙 유도 시킬 수 있는 작용을 한다(Huang et al., 1998; Campbell et al., 2006).

약물 전달 시스템은 기존 약물의 효율적이지 못한 지속 시간을 자유롭게 조절할 수 있게 다양한 매개체를 통하여 발전되었으며, 이러한 시스템은 인간에게만 국한 된 것이 아니라 어류양식 산업에도 다양하게 적용되었다. 초기의 성숙유도를 위한 호르몬 처리 방법은 단순히 호르몬을 사료에 섞어 경구 투여를 하거나 용해시켜 주사하는 방법이었으나 어류에서는 Aida et al. (1978) 등에 의해 호르몬을 지속적으로 방출시켜주는 emulsification 방법이 성숙과 배란유도에 더 효과적이라는 것이 증명되면서 다양한 방법의 호르몬 처리 기술이 개발되었다. 지속적인 호르몬 처리 방법으로는 Cholesterol pellet (Crime et al., 1988), Ethylene-vinyl acetate (Zohar, 1996), Biodegradable microsphere (Mylonas et al., 1995)등이 있으며, 다양한 형태로 발달되어 어류에게 사용되었다. 하지만, 각각의 처리방법은 서로 다른 장단점들을 가지고 있어 약물전달매개체의 선택과 사용에 있어서는 신중함을 기해야 된다. 이 실험에서는 미성숙한 pre-puberty 시기의 자바리 암컷을 조기에 puberty로 성숙시키기 위하여 지속적인 성숙 자극효과를 가지는 coconut oil을 이용한 emulsification 방법으로 호르몬을 투여하였다. 이 방법은 호르몬과 섞여 emulsion화 된 호르몬이 어체 근육 내 투여 시 굳었다가 점차

시간이 지나면서 서서히 녹아 체내로 방출되며, implant처리 등에서 나타나는 2차 감염의 우려가 없다는 장점이 있다.

이 연구에서는 미성숙한 자바리 암컷을 대상으로 다양한 호르몬 처리를 통한 조기 puberty 유도 가능성 유무를 조사하였고, 미숙한 자바리에 있어서 조기 성숙 유도에 적합한 호르몬을 검토하였다. 또한, 각 호르몬 투여에 따른 미성숙 자바리의 생식소 변화와 생식내분비계의 변화를 관찰 하였다.



재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 탐라수산(제주특별자치도 서귀포시 표선면)의 콘크리트수조(6.5 × 11 × 3 m)에서 사육 관리 중인 1 kg대의 미숙한 자바리 중 control구(평균 전장 34.3±1.4 cm, 평균 체중 1.0±0.1 kg), GnRHa 투여구(평균 전장 36.1±0.7 cm, 평균 체중 1.2±0.1 kg), GnRHa + IGF-I 투여구(평균 전장 35.6±1.58 cm, 평균 체중 1.2±0.1 kg), GnRHa + Domperidone 투여구(평균 전장 34.5±1.6 cm, 평균 체중 1.2±0.1 kg)의 4개 실험구에 각 3마리씩 총 12마리를 실험에 사용하였다(Table 3).

실험어의 관리는 1장에서와 동일하게 실시하였다.



Table 3. Experimental fish size and identification of longtooth grouper on hormone treatment groups

Group	ID No.	Body Weight (g)	Body Length (cm)
Control	125215	954	36.0
	125955	749	31.5
GnRH _a	126139	1273	35.5
	126074	1048	35.0
	125183	1293	37.5
	124861	1288	36.0
GnRH _a + IGF-I	126090	1320	37.5
	125353	1017	32.5
	124794	1309	37.0
GnRH _a + Domperidone	126343	1066	32.0
	125762	1255	34.0
	126366	1316	37.5

2. 호르몬 투여

조기 성숙유도를 위하여 사용한 호르몬은 GnRH α (Sigma Co., USA)와 IGF-I (Sigma Co., USA), Domperidone (Sigma Co., USA) 3종류이며, 각각의 호르몬은 용매체에 용해시킨 후 coconut oil과 혼합하여 immersion상태로 만들어 등 근육 제1극조 밑 부분에 주사하였다(Table 4, Fig. 8).

실험어는 호르몬 투여 후 20일 동안 사육하였으며, 호르몬 처리 후 시간 경과에 따른 혈중 스테로이드호르몬(E₂, 11KT)의 변동량을 측정하기 위하여 투여 후 5일 간격으로 총 4회 1 ml의 혈액을 미부에서 채취하여 분석하였다. 호르몬처리에 의한 효과는 호르몬 투여 후 20일 뒤 생식소를 적출하여 조직학적으로 관찰하였고 뇌하수체에서 total RNA를 분리하여 생식생리활성인자들을 비교 분석하였다.

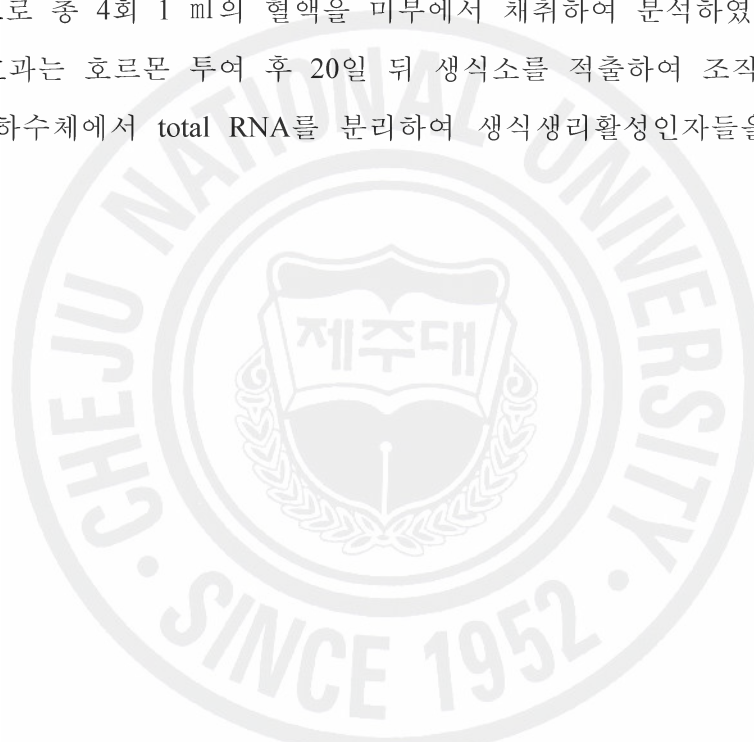


Table 4. Formations of treated hormones for artificial induction of puberty in female longtooth grouper

Group	Concentration
Control	Only coconut oil
GnRH _a	60 µg/kg BW
GnRH _a + IGF-I	60 µg/kg + 10 µg/kg BW
GnRH _a + Dom	60 µg/kg + 5 mg/kg BW



Fig. 8. Photographs of hormone treatment by syringe. A, injecting position; B, scene of injection.

3. 조직학적 관찰

제 1장의 방법과 동일.

4. 생식제어 생리활성인자 분석

(1) Total RNA extracts

제 1장의 방법과 동일.

(2) Realtime RT-PCR

제 1장의 방법과 동일.

(3) RIA (Radio Immuno Assay)

제 1장의 방법과 동일.

5. 난질 평가

호르몬 투여 후 5일 간격으로 육안관찰시 복부팽창이 확인되는 개체는 복부를 눌러 배란 유무를 확인하였으며, 배란된 난은 즉시 수정시켜 난질 평가를 실시하였다. 난질평가는 수정율과 부화율을 이용하여 측정하였으며, 수정율은 수정된 난을 시계 접시에 위에 100개씩 수용하여 투영기인 profile projector (Mitutoyco Co., Japan)에서 난할이 일어나지 않는 이상 발생한 개체를 3반복으로 개수하여 측정하였으며, 부화율은 100 ml 비이커에 난을 100개씩 수용하여 부화하는 개체를 모두 개수하는 방식으로 3반복하여 측정하였다.

결 과

1. 호르몬 처리에 따른 생식선 변화의 조직학적 관찰

호르몬 처리 후 생식선의 변화는 대조구와 각 호르몬 처리구의 생식선 발달 상태를 조직학적으로 비교 관찰하였다.

실험개시인 initial control의 생식선 발달 상태는 초기주변인기 난모세포단계였으며(Fig. 9-A), 실험 종료시 control구의 생식소는 대부분 70~90 μm 의 주변인기 난모세포들로 구성되어 있었다(Fig. 9-B). GnRHa 단독처리구는 320~400 μm 의 난경을 보이는 난황구기 난모세포들로 구성되어 있었으며(Fig. 9-C), GnRHa + IGF-I 처리구는 GnRHa 단독 처리구와 유사하게 310~400 μm 의 난황구기 난모세포들로 구성되어 있었다(Fig. 9-D). GnRHa + Domperidone 처리구는 주변인기와 유구기, 초기 난황구기 난모세포들이 혼재되어 있었다(Fig. 9-E).

생식선내 난모세포 발달단계 조사에서 initial control구는 주변인기 난모세포들이 95%의 높은 비율로 존재하였고 소수의 유구기 난모세포들도 혼재하였다. Control구는 100% 주변인기 난모세포만 존재하였다. GnRHa 단독 처리구는 다른 처리구들과 비교하여 난황구기난모세포가 가장 높은 73.7%의 비율로 관찰되었다. GnRHa + IGF-I 처리구는 50%의 난황구기 난모세포 비율을 보였으며, 21%의 유구기와 29%의 비슷한 비율로 주변인기 난모세포가 존재하였다. GnRHa + Dom 처리구에서는 주변인기 난모세포의 비율이 69%로 가장 높았으며, 유구기 난모세포도 다수 존재하였고 낮은 비율의 난황구기 난모세포도 관찰되었다(Fig. 10).

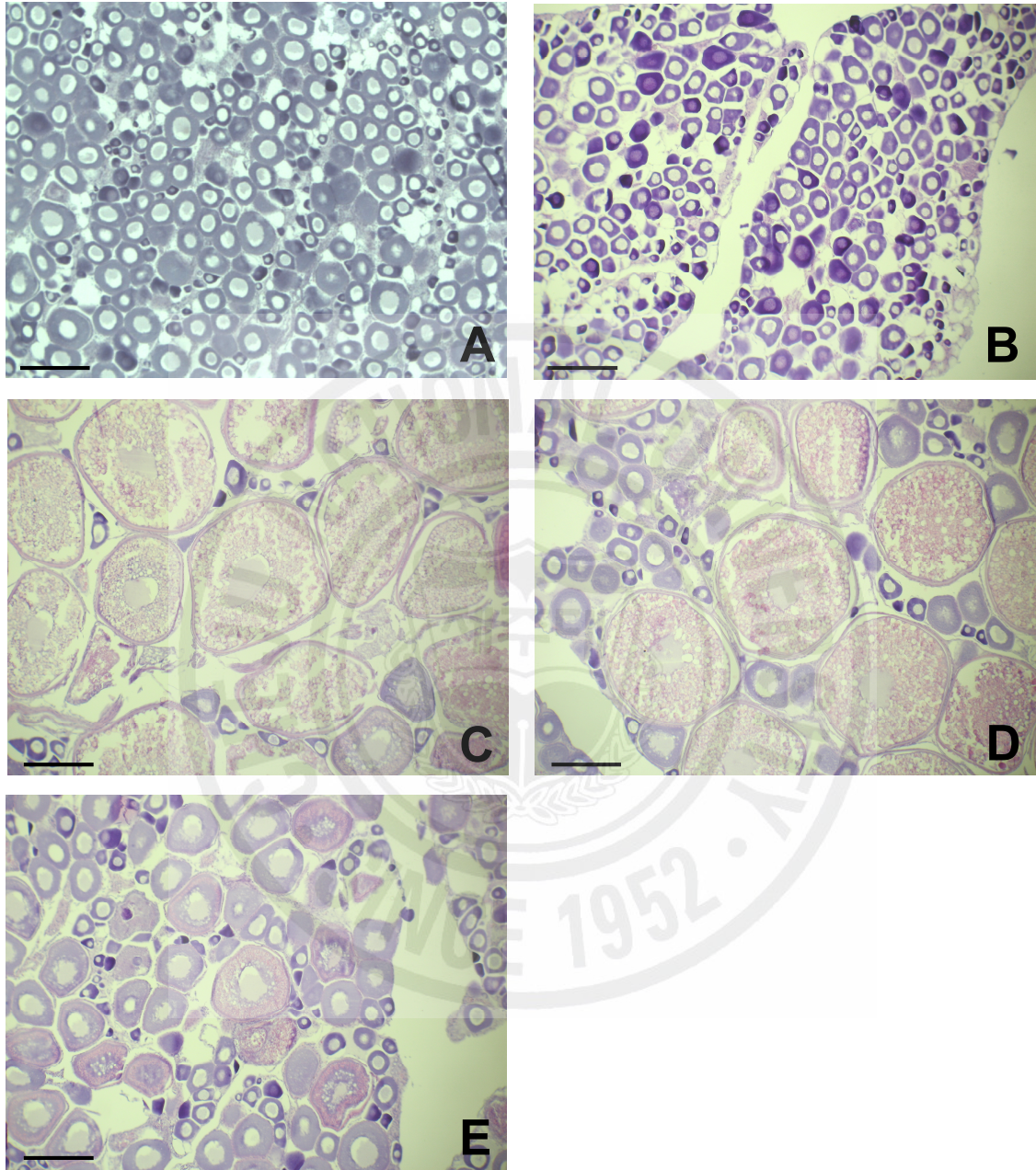


Fig. 9. Photomicrographs of ovarian biopsies of longtooth grouper female treated with hormones. (A) initial control, (B) control, (C) GnRH α , (D) GnRH α + IGF-I, (E) GnRH α + Dom group at time of the treatment after 20 days. Scale bars=200 μ m.

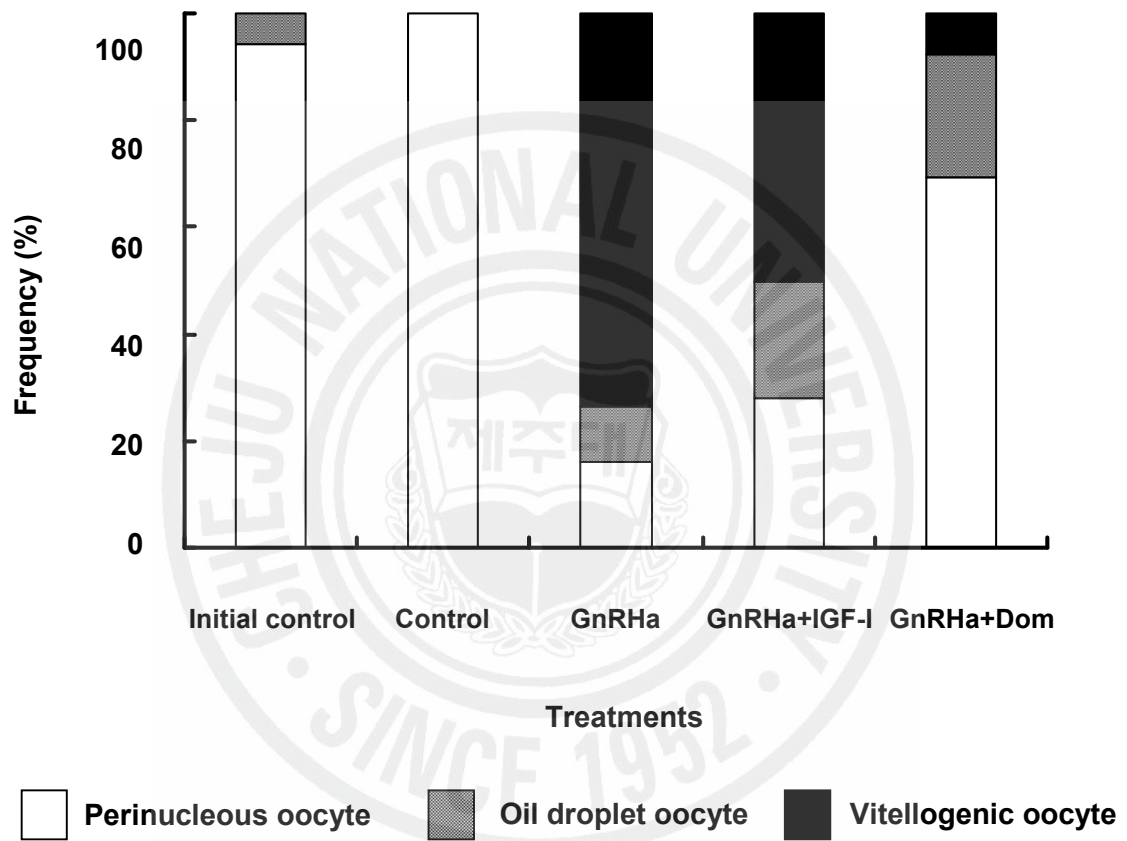


Fig. 10. Relative frequencies of gonadal development among the hormone treated groups in female longtooth grouper.

2. 생식생리활성인자들의 발현량 비교

호르몬 처리에 따른 실험구들간의 생리생식인자들의 활성은 FSH β 와 LH β 의 발현량을 Quantitative Real time RT-PCR 방법으로 조사하여 비교하였다.

FSH β mRNA의 변화량은 control구에서 4.5×10^6 으로 initial control구의 3.7×10^6 과 유사하였으며, 호르몬 처리구들과 비교 하여 낮은 경향을 나타내었다. GnRH α 단독 처리구는 1.1×10^7 으로 가장 높은 발현 경향을 나타내었으며, GnRH α + Dom 처리구는 7.4×10^6 으로 GnRH α + IGF-I 처리구의 7.0×10^6 와 유사한 경향을 보였다(Fig. 11).

LH β mRNA의 변화량에서도 control구는 6.8×10^6 으로 Initial control구의 5.0×10^6 의 값과 유사하였으며, 호르몬 처리구들에 비하여 낮은 경향을 보였다. GnRH α 단독 처리구는 1.2×10^7 의 발현량을 보였으며, GnRH α + Dom 처리구는 1.6×10^7 으로 다른 처리구들에 비하여 가장 높은 발현 경향을 보였다. GnRH α + IGF-I 처리구는 1.0×10^7 으로 호르몬 처리구들 중 가장 낮게 발현되는 경향을 보였다(Fig. 11).

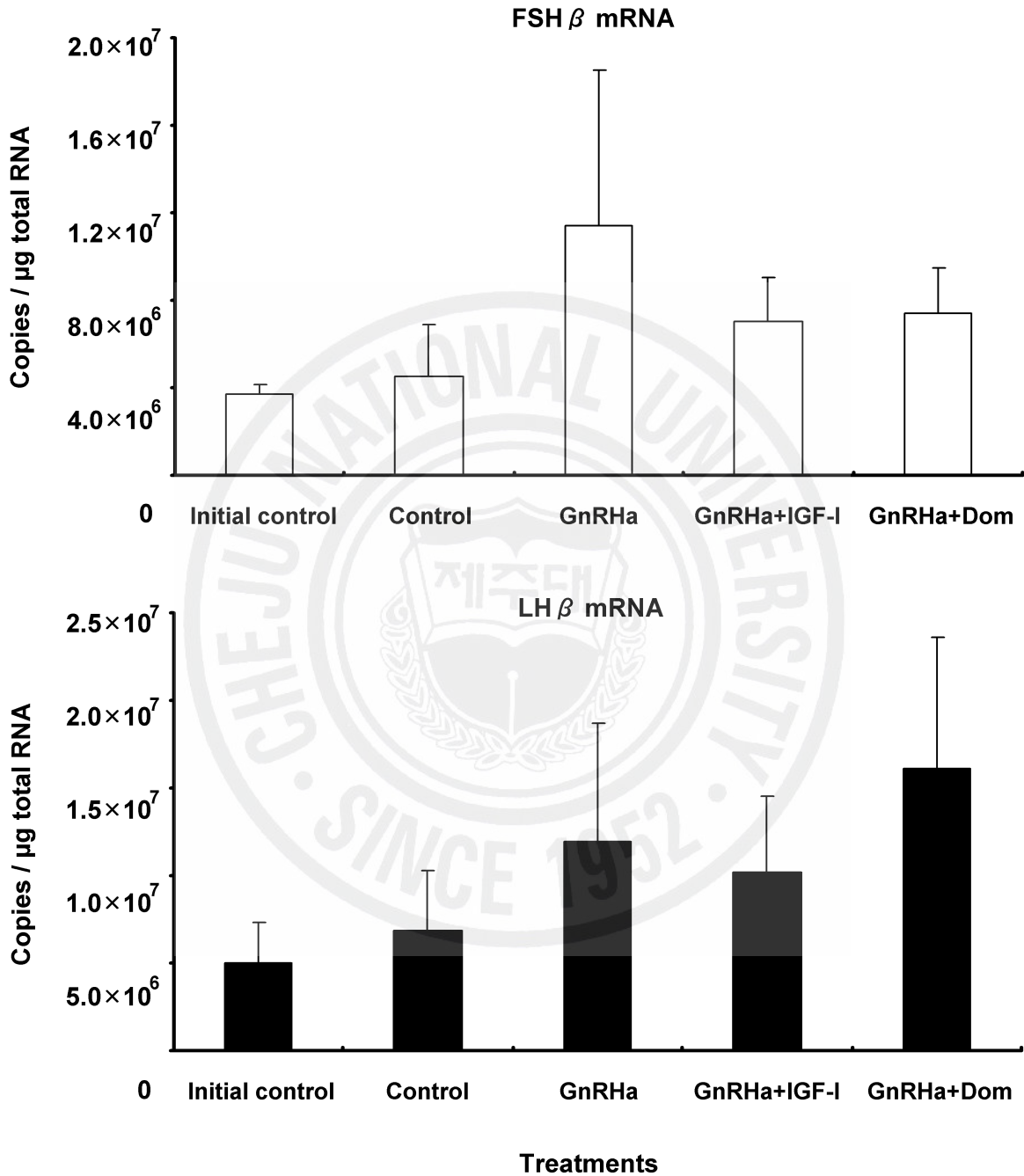


Fig. 11. Expression levels of follicle-stimulating hormone (FSH β) and luteinizing hormone (LH β) mRNAs in the pituitary of female longtooth grouper by the hormone treatments. Data are expressed as means \pm SEM.

3. 혈중 스테로이드 호르몬양의 변화 비교

호르몬 처리 후 시간 경과에 따른 혈중 스테로이드 호르몬의 변동량은 E2와 11KT의 양을 RIA방법으로 정량하여 비교하였다.

호르몬 투여 후 20일 동안 E2 농도의 변화는 Control구에서 실험기간동안 53~93 pg/ml의 농도로 투여 전과 비슷하였으나, GnRHa 단독 처리구는 호르몬 투여 후 5일 뒤 137 pg/ml의 농도로 급격히 증가하였고, 그 후 점차 하강하여 실험 종료 시 99 pg/ml로 대조구의 94 pg/ml와 유사한 값을 나타내었다. GnRHa + IGF-I 처리구는 호르몬 처리 후 10일 뒤 E2 농도가 134 pg/ml로 급격하게 증가하였고, 15일 뒤 138 pg/ml로 높은 양을 유지하다 감소하여 실험 종료시 97 pg/ml의 농도로 대조구와 유사한 값을 나타내었다. GnRHa + Dom 처리구에서는 GnRHa 단독처리구와 유사하게 호르몬 투여 후 5일 뒤 129 pg/ml로 E2량이 급격하게 상승하였고, 그 후 하강하여 97 pg/ml의 농도를 유지하다 실험 종료 시 88 pg/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 12).

혈중 11KT의 양은 대부분 최소 검출량 이하의 농도로 검출이 되지 않아 data로 나타내지 못하였다.

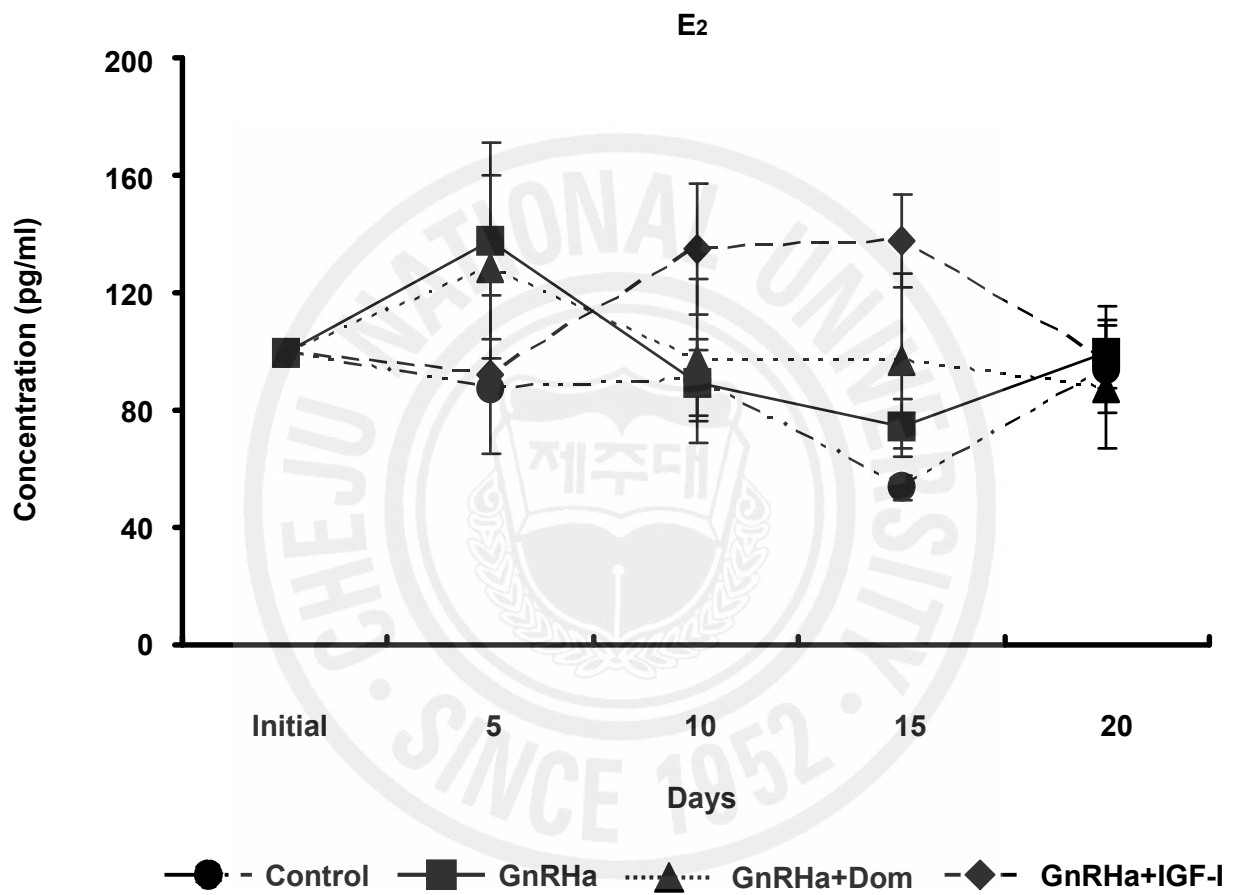


Fig. 12. Variation of plasma E2 levels of female longtooth grouper by the hormone treatments during the experimental period. Data are expressed as means \pm SEM.

4. 난질 평가

GnRHa 단독 투여구에서는 호르몬 투여 후 한 개체에서 배란이 관찰되었으며, 배란된 난은 즉시 수정시켜 난질을 평가 하였다.

수정란은 $75.0 \pm 0.6\%$ 의 수정율을 보였으며, 부화율은 $54.3 \pm 0.9\%$ 였다(fig. 13-A). 난질 비교를 위하여 2007년 자체 생산되어진 성숙한 post-puberty 단계의 자바리 암컷($n=9$)에서 배란된 수정란의 난질과 비교 하였다. 두 그룹간의 수정율과 부화율은 모두 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$, fig. 13-B).



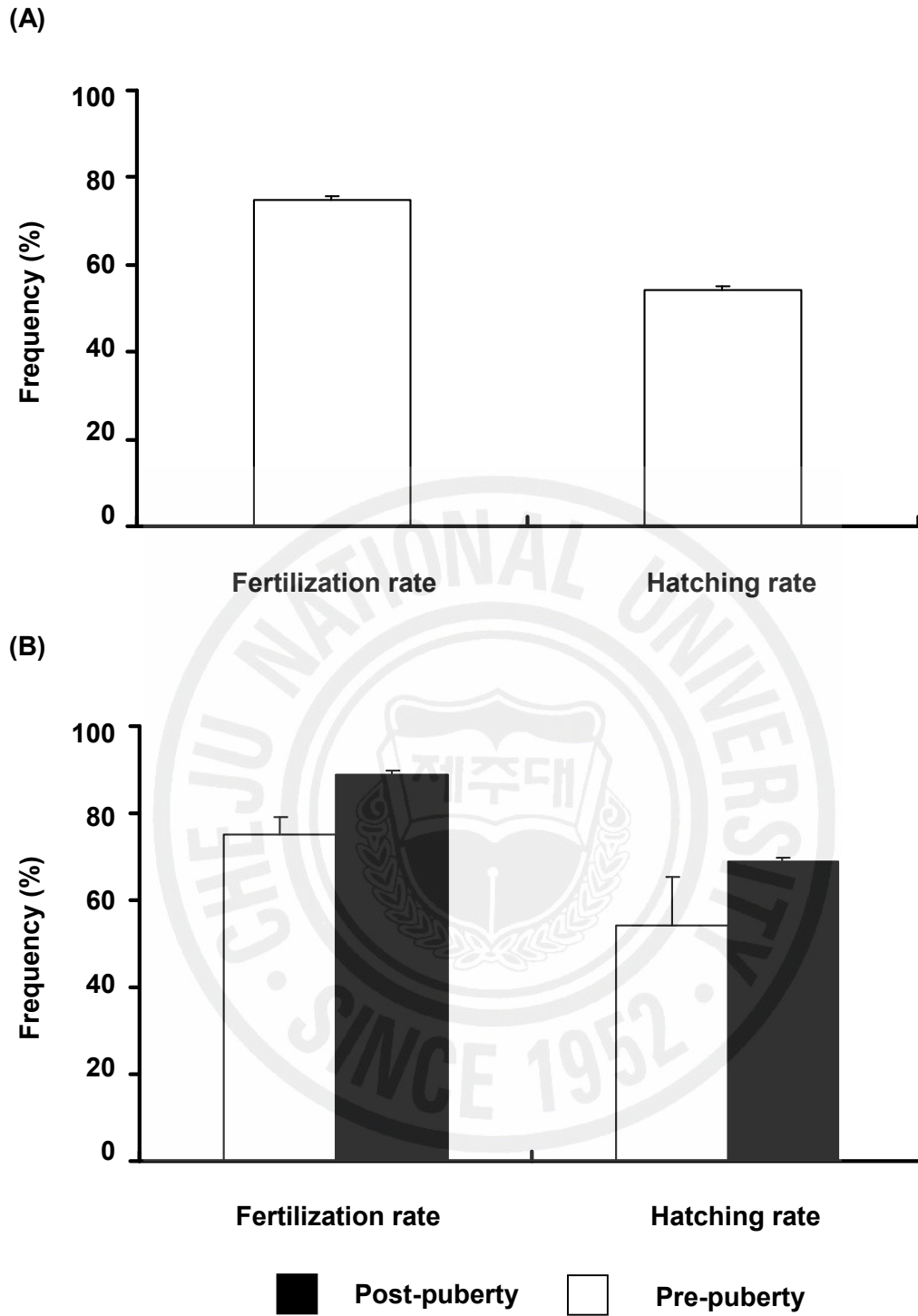


Fig. 13. Frequencies of fertilization and hatching rates on ovulated egg. (A), egg quality of fertilized egg on pre-pubertal fish by GnRH α treatment. (B), relative frequencies of egg quality between pre-pubertal fish and post-pubertal fish. Vertical bars indicated standard errors. $P > 0.05$.

종합 고찰

어류에서 puberty(성숙개시)의 의미는 성숙과 산란을 하기 위한 준비가 갖추어진 상태를 뜻한다(Okuzawa, 2002). 하지만 다른 척추동물들에서와 마찬가지로 어류의 puberty 발달특성과 작동기작에 대해서는 아직 완전하게 알려져 있지 않으며, 어류에서의 puberty 발달 기작은 척추동물들 중 가장 큰 분류군을 구성하고 있는 어종의 다양성만큼이나 종 특이적인 양상을 보인다(Jalabert, 2005). Puberty의 발달은 외부적인 환경요인, 종 특이적인 성숙 특성, 내분비 조절인자들의 발현과 같은 다양한 요인들이 관여한다. 어류의 puberty 발달 과정과 특성을 조사하는 것은 어류의 다양한 번식전략을 이해하기 위한 생물학적인 기초연구자료로서의 가치를 가질 뿐만 아니라 인위적인 어류의 성숙과 번식조절이 필요한 양식산업의 응용에 있어서도 중요한 의미를 가진다(Goos, 1993).

제 1장의 연구에서는 실험대상어인 자바리 암컷의 puberty 발달특성을 이해하고 이에 따른 puberty 발달단계의 구분을 위하여 미성숙시기와 성숙시기에 체중별 개체 특성을 조직학적인 방법과 분자 생물학적인 방법을 통하여 조사하였다. Puberty의 성숙과 발달은 인간을 포함한 대부분의 척추동물들에서 체중과 연령이 증가하여 puberty로 성숙 가능한 상태에 도달하였을 때 나타난다(Van Tienhoven, 1968). 이 연구의 실험어인 자바리에서는 연령에 의한 puberty 발달단계의 구분은 체내에서 이석을 추출하지 않고 육안으로는 연령추정이 어려우며, 동일 연령내에서도 개체별 차이가 심한 자바리의 성숙특성으로 인하여 육안으로 구분이 가능한 체중을 통하여 puberty의 발달특성을 구분 하였다.

미성숙시기 생식선의 조직학적 관찰에서 1 kg 과 2 kg 개체의 생식선은 100 μm 이하의 주변인기 난모세포들만 관찰이 되었으나 3 kg개체의 생식선에서는 유구기 난모세포와 난황구기 난모세포들이 관찰되어 3 kg개체는 다른 개체들보다 빠르게 난모세포의 성숙이 시작된 것을 확인할 수 있었다. 성숙시기에 1 kg 개체의 생식선은 미성숙시기와 비교하여 크게 발달되지 않은 주변인기 난모세포가 관찰된 반면 2 kg 개체의 생식선은 미성숙시기보다 많이 발달된 난황구기 난모세포를 관찰할 수 있었으며, 3 kg 개체의 생식선은 난경이 500 μm 에 이르는 난황

구기 난모세포가 관찰되어 *puberty*의 완료조건인 배란유도가 가능 한 상태임을 확인할 수 있었다. 난모세포의 발달단계 비율변화조사에서는 이러한 차이가 더 확연하게 나타나며, 미성숙시기와 성숙시기간의 개체별 큰 차이를 보인다. 1 kg 개체의 생식선에서는 미성숙시기에서와 마찬가지로 성숙시기에도 크게 발달하지 않은 대다수의 주변인기 난모들로 구성되어있었던 반면, 2 kg 개체는 미성숙시기에 1 kg 개체와 유사한 발달 상태를 보였으나 성숙시기에 크게 발달하면서 다수의 난황구기 난모세포를 포함하고 있는 것을 관찰 할 수 있었다. 3 kg 개체는 미성숙시기부터 다른 개체들과는 달리 빠르게 성숙이 진행 중이었으며, 성숙시기에도 다른 개체들 보다 많은 난황구기난모세포가 관찰되면서 난황형성과정이 정상적으로 진행되고 있음을 확인할 수 있었다.

생식생리활성인자들의 발현량 조사에서는 미성숙시기에 $FSH\beta$ 와 $LH\beta$ 모두 체중 증가에 따라 높게 발현되었으며, 혈중 E_2 농도 또한 체중증가에 따라 높아지는 경향을 보였다. 특히, 3 kg 개체에서는 E_2 의 농도가 급격하게 증가하였다. Nagahama (1994)에 의하면, 난황형성과정중의 GTH subunits인 $FSH\beta$ 나 $LH\beta$ 의 발현량 증가는 협막세포에서 testosterone (T)의 생성을 촉진하며, 생성된 T는 방향화 효소인 aromatase에 의하여 E_2 로 전환이 된다고 보고하였다. 이러한 보고에 따르면 GTH 발현량의 증가에 의하여 E_2 농도 또한 증가한 것으로 해석이 되며, 특히 난황형성초기에 난황축적을 촉진하는 $FSH\beta$ 의 발현량 증가가 E_2 농도의 증가에 더 큰 영향을 미친 것으로 추측이 된다. 또한, 3 kg 개체에서 급격하게 E_2 의 농도가 증가한 것은 3 kg 개체에서만 난황형성과정이 진행되면서 난황축적을 위하여 난황전구물질인 vitellogenin의 합성을 위한 E_2 양이 증가한 것으로 생각된다. 성숙시기의 조사에서 $LH\beta$ 의 발현량은 전 개체에서 미성숙시기보다 증가하였고 체중증가에 따라 높아지는 경향을 보였으며, $FSH\beta$ 의 발현량은 2 kg대에서 급격하게 증가하였고 3 kg대에서는 미성숙시기보다 감소한 것을 관찰 할 수 있었다. 이와 유사하게 E_2 의 농도 또한 3 kg 개체에서 미성숙시기 보다 감소하였으며, 이러한 결과는 난황형성과정의 완료와 난의 최종 성숙시 $LH\beta$ 의 발현량은 증가하고 E_2 의 농도는 감소한다(Nagahama, 1994; Kagawa et al., 1998)는 결과와 유사하게 3 kg 개체는 난의 최종성숙과정에 들어가는 시기임을 확인 할 수 있었다.

어류의 puberty 발달특성은 성숙과 산란이 불가능한 pre-puberty 시기와 난황형성과 정자형성단계까지는 진행이 되나 배란과 배정까지는 가지 못하는 dummy run 시기, 성공적으로 배우자 형성과정을 거쳐 산란과 방정을 완료하는 puberty 시기, 그 후 post-puberty 시기로 나뉘게 된다(Okuzawa, 2002). 이 연구에서 조사되어진 자바리, *Epinephelus bruneus*의 puberty 발달단계는 위의 결과들을 종합하여 볼 때 다음과 같이 구분되어진다. 1 kg의 개체는 미성숙시기와 성숙시기 모두 생식생리활성인자인 GTH의 발현이 낮았으며, 혈중스테로이드 호르몬인 E2의 농도도 매우 낮았다. 그 결과 생식선내의 난모세포의 발달단계는 대부분 주변인기 난모세포로만 이루어져 성숙과 산란이 불가능한 pre-puberty 개체로 구분이 된다. 2 kg 개체는 생식생리활성인자의 발현이 3 kg 개체보다는 낮았으나 성숙시기에 FSH β 의 발현이 증가하면서 생식선내에서 다수의 난황구기 난모세포가 출현하였다. 하지만 난의 최종성숙에 관여하는 LH β 의 발현과 vitellogenin의 합성에 관여하는 E2의 양이 낮아 난황형성을 완료하지 못하고 난경이 400 μ m 밖에 이르지 못하였다. 따라서 2 kg의 개체는 난황형성기를 성공적으로 완료하지는 못하였으나 난황축척이 활발하게 일어나며, 최종성숙과 배란의 가능성을 보이는 dummy run 시기로 추정되어진다. 3 kg 개체는 성성숙에 관여하는 모든 인자들이 활발하게 발현이 되며, 배란유도가 가능한 500 μ m 이상의 난모세포가 관찰되어 사육환경에서는 자연 산란이 불가능 하나 인위적인 배란유도방법으로 배란을 할 수 있는 puberty 개체로 구분할 수가 있다.

미성숙한 어류의 puberty가입 유도는 양식 산업에서 중요한 어종들을 대상으로 다양한 호르몬 처리와 방법을 통하여 시도되어져 왔다(Okuzawa, 2002). 양식 어류는 사육환경의 불안정과 다양한 요인들로 인하여 성장과 성성숙의 저해현상이 나타나며, gilthead seabream (Zohar et al., 1995), striped bass (Mylonas et al., 1997), 많은 농어목 어류(Tucker, 1994; Watanabe et al., 1998)등에서 이러한 현상을 볼 수 있다. 따라서 양식어종의 안정적인 수정란 생산을 위하여 성장과 성성숙에 저해되는 인자들을 확인하고, 그에 알맞은 적절한 호르몬 처리를 하는 것은 필요하며, 바리과 어류와 같이 성장과 성성숙에 오랜 시간이 걸리는 대형어종들은 조기에 puberty가입 유도를 위한 성성숙유도 기술의 개발이 요구된다.

제 2장의 연구에서는 1장에서 밝혀진 성숙이 불가능한 pre-puberty 시기의 자

바리 암컷(1 kg)을 대상으로 다양한 호르몬 처리를 통하여 조기에 puberty가입 유도 가능성을 검토하였으며, 호르몬 처리에 의한 생식선의 발달과 배란유무를 조직학적인 방법으로 관찰하였다. 또한, 각 호르몬 투여구의 생식생리활성인자 발현 변화와 혈중스테로이드호르몬의 농도변화를 분자유전학적으로 관찰하였다. 호르몬 처리를 통하여 배란된 난은 난질평가를 통하여 호르몬 투여 후에 따른 난질저하 유무를 조사하였다.

호르몬 처리 후 각 투여구의 조직학적인 관찰 결과, control구의 생식선은 initial control구와 유사한 발달 상태인 주변인기단계의 난모세포들이 관찰되었다. 위의 결과로 보아 호르몬 투여의 매개체인 coconut oil에 대한 영향이 없는 것을 확인할 수 있었고, 실험기간 동안 난모세포의 성숙발달이 진행되지 않았음을 알 수 있었다. 그에 반해, GnRH α 투여구와 GnRH α + IGF-I 투여구는 비슷한 난경과 난모세포 발달 상태를 보이며, 호르몬 처리에 의한 성숙유도 효과를 나타내었다. GnRH α + Dom 투여구는 유구기 난모세포들과 성숙중인 초기 난황구기 난모세포들이 관찰 되면서 다른 처리구들 보다 호르몬처리에 의한 성숙유도효과가 늦게 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 생식선내 난모세포 발달단계 비율은 initial control구와 control구간의 차이를 보이지 않았으며, GnRH α 투여구와 GnRH α + IGF-I 투여구는 생식선내 난모세포의 발달 상태에서 유사한 경향을 보였으나 비율 조사에서는 GnRH α 투여구가 더 높은 난황구기 난모세포 비율을 보임으로써 GnRH α 의 투여가 GnRH α 와 IGF-I의 복합 투여보다 난모세포의 성숙에 더 효과가 있음을 확인할 수 있었다. GnRH α + Dom 투여구의 생식선은 대부분의 주변인기 난모세포와 유구기 난모세포들이 차지하며, 같은 투여기간 내에 다른 호르몬 처리구들 보다 성숙 유도 영향이 늦게 나타남을 알 수 있었다.

생식생리 활성인자들인 FSH β 와 LH β 의 발현은 initial control구와 control구에서 비슷한 경향을 보였고, 두 그룹 모두 호르몬 처리구들 보다 낮은 발현량을 보이며, 실험기간동안 호르몬 처리하지 않은 개체들에서는 발현량의 변화가 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다. GnRH α 단독 투여구는 다른 호르몬 처리구들 보다 FSH β 가 높게 발현되는 경향을 보였으며, E₂의 농도변화는 호르몬 투여 후 5일 뒤 급격히 상승하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이에 반하여 GnRH α + Dom 투여구에서는 LH β 가 높게 발현되는 경향을 보였으며, 혈중 E₂농도는 GnRH α 단독

투여구와 비슷하게 변화하는 경향을 보였으나 낮은 농도를 나타내었다. 이러한 생식생리 활성인자들의 변화에 따라 FSH β 가 높게 발현된 GnRH α 단독처리구의 생식선내에서는 난모세포의 발달이 더욱 진행되었으며, 가장 높은 난황구기난모세포의 비율을 확인할 수 있었다. 반면, LH β 가 높게 발현된 GnRH α + Dom 투여구에서는 난모세포의 발달이 가장 늦었으며, 많은 유구기와 주변인기 난모세포들이 관찰되었다. 이러한 결과는 무지개 송어, *Oncorhynchus mykiss*에서 GnRH α 와 dopamine antagonist로써 Domperidone과 유사한 작용을 하는 pimozide의 투여가 FSH β 의 합성을 촉진하였으며, 무지개 송어의 난형성과정에는 LH β 보다 FSH β 의 작용이 더 중요하다(Breton et al., 1998)는 결과와 유사하였으며, 이와는 반대로 참돔, *Pagrus major*에서는 GnRH α 와 Domperidone의 투여에 의하여 LH β 의 발현이 높게 나타났고, 참돔의 난황축척과 배란유도에는 LH β 의 작용이 FSH β 의 작용보다 중요하다는 보고(Kumakura et al., 2003)와는 상이하였다. GnRH α 와 IGF-I의 복합 투여구에서는 다른 호르몬 처리구들보다 생식생리활성인자들의 발현이 낮았으나 혈중 E2농도가 호르몬 처리 후 10일째 급격하게 상승하여 15일까지 높은 양을 나타내었으며, 생식선내에서는 GnRH α 단독처리구와 유사한 발달상태인 난황구기 난모세포들을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 IGF-I의 처리가 난소에서 aromatase 활성을 촉진시켜 E2의 발현을 증가시킨다는 결과(Kagawa et al., 2003)와 비슷하게 GnRH α 와 IGF-I의 복합 투여는 FSH β 와 LH β 의 분비에 작용하지 못하였으나 난소의 aromatase활성에 직접 작용하여 E2농도의 증가와 생식발달을 촉진한 것으로 추측된다.

위의 결과들을 종합하면, 자바리 암컷의 성성숙과 난발달에는 FSH β 가 LH β 보다 미치는 역할이 강하며, FSH β 의 합성을 촉진하는 GnRH α 의 단독투여와 생식선에 작용하여 aromatase의 활성과 E2 농도를 증가시키는 GnRH α + IGF-I의 복합 투여가 미성숙한 자바리 암컷의 조기 puberty 유도에 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 하지만, 이번 연구에서는 각각의 호르몬 처리에 따른 GnRH의 변화, 각 내분비 조절 인자들의 receptor 발현, 혈중 GTH의 변화 등 생식내분비계에 영향을 미치는 많은 부분들에 대해 조사하지 못하였으며, 이들의 작동 기작을 명확하게 밝혀내지 못하였다. 이와 같이 어류의 puberty 발달과 생식내분비에 관련한 기작들에 대해서는 아직도 불분명하고 밝혀지지 않은 부분이 많다. 따라서 차후

에는 어류번식생리특성의 이해와 양식 산업의 발전을 위하여 밝혀지지 않은 많은 부분들에 대한 심도 깊은 연구와 조사가 필요하다고 생각된다.

또한, 호르몬 처리에 의하여 배란된 난의 난질은 성숙한 개체들에서 배란된 난들과 비교하여 유의적인 차이는 없었으나 산란양이 상대적으로 낮은 경향을 보였다. 이는 greenback flounder, *Rhombosolea tapirina* (Poortenaar and Pankhurst, 2000), dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Marino et al., 2003)등에서 보고된 호르몬 처리에 의한 수정란의 난질저하나 산란횟수의 감소와 같은 호르몬 처리에 따른 영향을 무시할 수 없음을 보여주며, 이에 대한 연구는 성숙유도 방법의 개발과 함께 연구되어야 하겠다.



요 약

자바리는 성체의 길이가 1 m에 달하는 대형종으로 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다. 서식 환경은 치어시기에 얕은 연안에서 활동하다 성어가 되면 수심 20~200 m 사이의 암초지대에서 서식하며, 작은 어류나 갑각류, 두족류를 주식으로 하는 육식성 어류이다. 자바리는 기호성이 매우 높은 고부가가치의 어종이며, 최근 남획과 서식지 파괴로 인하여 그 수가 감소하고 있는 자원 회복이 필요한 중요한 어종이다. 이 연구는 puberty에 이르기까지 오랜 시간이 걸리는 자바리의 성숙 특성들을 조사하고 미성숙한 pre-puberty 자바리 암컷의 조기 puberty 유도방법에 대하여 연구하였다.

실험어는 1, 2, 3 kg의 개체로 구분하여 체중에 따른 puberty 발달 특성을 조사하였으며, 미성숙시기와 성숙시기간의 개체에 따른 성숙발달 특성을 비교하기 위하여 조직학적인 관찰과 생식생리활성인자들(FSH β , LH β)의 발현량, 혈중스테로이드 호르몬인 estradiol-17 β (E2)의 농도를 측정하였다. 조직학적인 관찰 결과, 미성숙시기의 조사에서는 1 kg과 2 kg개체에서 주변인기 난모세포만이 관찰되었으며, 3 kg의 개체에서는 발달중인 유구기 난모세포와 난황구기 난모세포가 관찰되었다. 생식생리활성인자인 FSH β 와 LH β 의 발현량은 미성숙시기와 성숙시기에 체중 증가에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 성숙시기의 3 kg개체에 있어서는 FSH β 가 미성숙시기 보다 감소하였다. 혈중스테로이드 호르몬인 E2 농도변화의 조사에서는 1, 2 kg 개체에서 특이적인 변화를 보이지 않았으며, 3 kg 개체에서 FSH β 의 발현과 유사한 경향으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

제 1장에서 밝혀진 성숙이 불가능한 미성숙한 pre-puberty시기의 암컷을 대상으로 GnRH analogue (GnRHa)의 단독투여와 GnRHa 와 dopamine antagonist인 Domperidone (Dom), 성장촉진인자인 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 복합 투여를 통하여 조기에 puberty 유도 가능성을 조사하였다. 호르몬을 넣지 않은 매개체(coconut oil) 투여 그룹을 control 그룹으로 사용하였으며, sampling은 호르몬 처리 후 20일 뒤 실시하였다. 호르몬 처리 결과 initial control그룹과 control그룹에서는 실험기간동안 난모세포의 발달이 진행되지 않았으며, GnRHa와 GnRHa +

IGF-I 그룹에서는 성숙한 난황구기 난모세포가 관찰되었다. GnRH α + Dom 처리 그룹에서는 초기 난황구기 난모세포가 관찰되어 발달이 늦게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 호르몬 처리에 따른 생식생리활성인자들의 발현량 조사에서는 GnRH α 처리 그룹에서 가장 높은 FSH β 의 발현을 관찰할 수 있었으며, LH β 는 GnRH α + Dom 처리구에서 가장 높게 발현되었다. 혈중스테로이드 호르몬인 E₂ 농도변화는 GnRH α 그룹과 GnRH α + Dom 그룹에서 호르몬 투여 후 5일 뒤 농도가 급격히 상승하는 것을 관찰 할 수 있었으며, GnRH α + IGF-I 그룹은 호르몬 투여 후 10일 뒤 농도가 급격히 상승하였다.

이번 연구의 결과들로 미루어 보아 자바리의 puberty 발달 특성은 체중에 따라 1 kg (pre-puberty), 2 kg (dummy run), 3 kg (puberty) 개체로 구분되어진다. 또한, 호르몬 처리를 통한 미성숙한 개체의 조기 puberty 성숙유도에는 GnRH α 와 GnRH α + IGF-I의 복합 투여가 효과적임을 확인할 수 있었으며, 자바리의 성성숙과 난모세포 발달 과정에는 FSH β 의 역할이 LH β 의 역할보다 강하다고 추측되어진다.

참고 문헌

- Aida, K., R. S. Izumo, H. Satoh and T. Hibiya, 1978. Induction of ovulation in plaice and goby with synthetic LH-releasing hormone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44, 445-450.
- Aizen, J., I. Meiri, I. Tzchori, B. Levavi-Sivan, H. Rosenfeld, 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. Gen. Comp. Endocrinol., 142, 212-221.
- Annalie, V. M., C. M. Roberts and J. P. Hawkins, 2000. The threatened status of groupers (Epinephelinae). Biodivers. Conserv., 9, 919-942.
- Baillie, J., C. H. Taylor, S. N. Stuart, 2004. The 2004 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Glands, Switzerland.
- Breton, B., M. Govoroun and T. Mikolajczyk, 1998. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-a stimulation. Gen. Comp. Endocrinol., 111, 38-50.
- Campbell, B., J. Dickey, B. Beckman, G. Young, A. Pierce, H. Fukada and P. Swanson, 2006. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone and somatolactin. Biol. Reprod., 75, 34-44.
- Crim, L. W. and D. M. Evans, 1983. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. Biol. Reprod., 29, 137-142.
- Crim, L. W., N. M. Sherwood and C. E. Wilson, 1988. Sustained hormone release: II. Effectiveness of LHRH analogue (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotrophin levels

- in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 74, 87-95.
- Daniel, G. C. and J. G. Eales, 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6, 165-200.
- Duncan, N. J., G. A. Rodriguez M. de O, D. Alok and Y. Zohar, 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture*, 218, 625-635.
- Dufour, S., F. A. Weltzien, M. E. Sebert, N. LE. Belle, B. Vidal, P. Vernier and C. Pasqualini, 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: Ecophysiological and Evolutionary Implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1040, 9-21.
- FAO, 1993. Groupers of the world. FAO species catalogue Vol. 16, FAO, Rome, 1-10pp.
- Foster, D. L., 1994. Puberty in the sheep. (in) E. Knobil and J. D. Neil (eds.), *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 411-451.
- Gomez, J. M., C. Weil, M. Ollitrault, P. Y. Le Bail, B. Breton and F. Le Gac, 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113, 413-428.
- Goos, H. J. Th., 1993. Pubertal development: big questions, small answers. (in) F. Facchinetti, I. W. Henderson, R. Pierantoni and A. M. Polzonetti-Magni (eds.), *Cellular Communication in Reproduction*, Journal of Endocrinology. Bristol, UK, pp. 11-20.
- Hansen, T., Ø. Karlsen, G. L. Taranger, G. I. Hemre, J. C. Holm and O. S. Kjesbu, 2001. Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aquaculture*, 203, 51-67.
- Hassin, S., M. C. H. Holland and Y. Zohar, 2000. Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biol. Reprod.*, 63, 1691-1697.

- Holland, M. C. H., S. Hassin and Y. Zohar, 2001. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. *J. Endocrinol.*, 169, 527-538.
- Hopkins, C. L. and M. J. Unwin, 1997. The effect of restricted springtime feeding on growth and maturation of freshwater-reared chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac. Res.*, 28, 545-549.
- Huang, Y. S., K. Rousseau, N. Le. Belle, B. Vidal, E. Burzawa-Gerard, J. Marchelidon and S. Dufour, 1998. Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *J. Endocrinol.*, 159, 43-52.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45, 261-279.
- Kagawa, H., H. Tanaka, K. Okuzawa and M. Kobayashi, 1998. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in Vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 112, 80-88.
- Kagawa, H., G. Koichiro, K. Okuzawa and H. Tanaka, 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicle of red seabream, *Pagrus major*. *Biol. Reprod.*, 68, 1562-1568.
- Kato, K., K. Ishimaru, Y. Sawada, J. Mutsuro, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai, 2004. Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fish. Sci.*, 70, 1061-1069.
- Kazuhisa, T. and Y. Kenzo, 2006. Successful mass production of early-stage larvae of kelp grouper *Epinephelus bruneus* in improved rearing conditions. *Suisan Zoshoku*, 54, 187-194.
- 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.
- Kumakura, N., K. Okuzawa, K. Gen, S. Yamaguchi, B. S. Lim and H. Kagawa, 2004. Effects of gonadotropin-releasing hormone on pituitary-ovarian axis of one-year old pre-pubertal red seabream. Gen. Comp. Endocrinol., 138, 105-112.
- Kobayashi, M., M. Amano, M. H. Kim, Y. Yoshiura, Y. C. Sohn, H. Suetake and K. Aida, 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. Fish Physiol. Biochem., 17, 1-8.
- Kim, I. S., Y. Choi, C. L. Lee, Y. J. Lee, B. J. Kim and J. H. Kim, 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyo-hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, pp. 615. (in Korean)
- Lee, C. S., C. S. Tamaru and C. D. Kelley, 1988. The cost and effectiveness of CPH, HCG and LHRH-a on the induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 73, 341-347.
- Le Gac, F., O. Blaise, A. Fostier, P. Y. Le Bail, M. Loir, B. Mourot and C. Weil, 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. Fish Physiol. Biochem., 11, 219-232.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finioia, Y. Zohar and C. C. Mylonas, 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH α implant. Aquaculture, 219, 841-858.
- Mylonas, C. C., Y. Tabata, R. Langer and Y. Zohar, 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. J. Control. Release, 35, 23-34.
- Mylonas, C. C., L. C., III, Woods and Y. Zohar, 1997. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. J. Fish Biol., 50, 34-49.

- Mylonas, C. C. and Y. Zohar, 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10, 463-491.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine control of gametogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 217-275.
- Nagahama, Y., 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. (in) B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson (eds.), *Proceeding of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Bergen, Norway, pp. 211-222.
- Negatu, Z., S. M. Hsiao and R. A. Wallace, 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 19, 13-21.
- Oh, S. R., 2006. Seed production of longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* with induced sex reversal and maturation. Ph. D. thesis, Cheju Nat'l Univ., Jeju. Korea, pp. 1-120 (in Korean)
- Okuzawa, K. and M. Kobayashi, 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in the teleostean brain and functional significance. (in) P. D. Prasada Rao and R. E. Peter (eds.), *Neural regulation in the vertebrate endocrine system*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 85-100.
- Okuzawa, K., 2002. Puberty in teleosts. *Fish. Physiol. Biochem.*, 26, 31-41.
- Okuzawa, K., K. Gen, M. Bruysters, J. Bogerd, Y. Gothilf, Y. Zohar and H. Kagawa, 2003. Seasonal variation of the three native gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids levels in the brain of female red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 130, 324-332.
- Patiño, R. and C. V. Sullivan, 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26, 57-70.
- Peter, R. E. and K. L. Yu, 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7, 173-197.
- Poortenaar, C. W. and N. W. Parkhurst, 2000. Effect of luteinizing hormone-releasing

- hormone analogue and human chorionic gonadotropin on ovulation, plasma and ovarian levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. J. World Aquac. Soc., 31, 175-185.
- Rodríguez, L., M. Carrillo, L. A. Sorbera, M. A. Soubrier, E. Mañanós, M. C. H. Holland, Y. Zohar and S. Zanuy, 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. Gen. Comp. Endocrinol., 120, 67-74.
- Schulz, R. W. 1995. Physiology, morphological, and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. (in) F. W. Goetz and P. Thomas (eds.), Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, Texas, pp. 2-6.
- Schulz, R. W. and T. Miura, 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. Biochem., 26, 43-56.
- Shearer, K. D. and P. Swanson, 2000. The effect of whole body lipid on early sexual maturation of 1+age male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 190, 343-367.
- Song, Y. B., S. R. Oh, J. P. Seo, B. G. Ji, B. S. Lim, H. B. Kim and Y. D. Lee, 2005. Larval development and rearing of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in Jeju Island, Korea. J. World Aquac. Soc., 36, 209-216.
- Strüssmann, C. A. and M. Nakamura, 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem., 26, 13-29.
- Tucker, J. W., 1994. Spawning of captive serranid fish: A review. J. World Aquac. Soc., 25, 345-359.
- Van Tienhoven, A., 1968. Puberty. (in) W. B. Saunders (ed.), Reproductive physiology of vertebrates. Company Limited, Toronto, pp. 80-95.
- Watanabe, W. O., E. P. Ellis, S. C. Ellis, J. Chaves, C. Manfredi, R. W. Hagood, M. Sparsis and S. Arneson, 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. J. World

- Aquac. Soc., 29, 176-187.
- Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129, 49-73.
- Zohar, Y., 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. (in) M. Shilo and S. Sarig (eds.) *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, pp. 65-119.
- Zohar, Y., H. Harel, S. Hassin and A. Tandler, 1995. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). (in) N. R. Bromage and R. J. Roberts (eds.) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp. 94-117.
- Zohar, Y., 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Suppl.*, 2, 43-48.
- Zohar, Y. and C. C. Mylonas, 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.

감사의 글

논문을 마무리하면서 지난 2년을 돌아보니 정말 꿈같은 시간들이었던 것 같습니다. 동고동락했던 실험실원들과의 생활, 많은 분들과의 인연을 맺을 수 있었던 대학원 생활, 이 모든 것들이 주마등과 같이 생각을 스치며 지나갑니다.

안하던 공부가 갑자기 하고 싶다면서 대뜸 실험실을 찾아와 대학원을 가고 싶다고 말하는 제게 언제나 한결같은 관심과 애정으로 열심히 하라고 격려해주셨던 지도교수님이신 이영돈 교수님께 이 자리를 빌어서 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 그리고 대학원 과정 동안 날카로운 지적과 따뜻한 관심으로 대학원생과 학자로서의 마음가짐을 잊지 않도록 가르침을 주신 노섬 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 최광식 교수님, 이경준 교수님, 김기영 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

자바리라는 고급어종을 대상으로 실험하면서 혹시나 실험과정 중에 이상이라도 생기면 어떻게 하나 많은 걱정을 했었지만 실험하는 동안 부단히도 귀찮게 하는 저희를 위해 사육조를 빌려주시고 항상 웃음으로 맞이하여 주신 현구연 사장님, 시설물 사용에 적극적으로 도움을 주신 차성인소장님, 열심히 사시는 모습이 아름다우신 유영이 형님과 형수님, 동기라는 이유로 저의 무리한 부탁을 다 들어 주었던 철영이와 여러 직원분들이 있었기에 마음을 놓고 편안하게 실험을 할 수 있었습니다. 진심으로 감사드립니다.

분자생물학 실험을 시작하면서 어려움에 빠져 헤매고 있을 때 바쁜 시간을 할애하시며 밝은 길을 열어주셨던 자연대 분자생물학 실험실의 행복이 형님, 역시 동기라는 이유로 자기 할 일도 못해가며 도움을 준 경만이와 실험실원들, 그리고 실험실과 기기사용을 허락해 주신 김세재 교수님께도 진심으로 깊은 감사를 드립니다.

혈액분석을 하면서 ELISA 실험이 되지 않아 고민하고 있을 때 멀리 부산에서 다른 방법을 알려주시고 기기와 실험실 사용을 허락해주신 친척과 같은 부경대학교 발생생식내분비학실험실의 백해자 교수님과 RIA의 전반적인 부분을 가르쳐주시고 밤새며 실험을 도와주신 인준이 형님, 실험실원들께도 다시 한 번 깊은 감사를 드립니다.

사실 지금에 오기까지 저희 발생생물학실험실 가족들의 도움이 없었다면 이 자리에서 글을 쓰고 있지 못했을 것입니다. 실험실의 맏형이자 든든한 지원자인 영보형, 논문 지도를 위하여 정말 너무나 고생하셨고 고생시켰던 봉수형, 형님보다 더 형님 같은 순주 누나, 적지 않으신 나이임에도 불구하고 학문에 대한 뜨거운 열정을 보여주신 김성훈 선배님, 친형과 같이 모든 것을 상담하고 도와주었던 치훈이 형, 연구소의 실장님이신 부드러운 카리스마의 상우형, 같은 학위 과정 동안 말 안 듣는 후배 때문에 많은 고생한 성표형, 언제나 성실하고 열심히 하는 자세가 귀감이 되는 사춘기 형철이, 지금은 연구소에 없지만 정말 많은 도움을 주었던 든든한 후배 태진이와 대현이 그리고 귀여운 막내 수용이 까지 정말 어떻게 감사의 마음을 전해야 할지 몰라 막막하지만, 앞으로 더욱 학업에 정진하고 발전해나가는 모습을 보여드립니다으로써 부족한 감사의 마음을 대신하겠습니다. 또한, 제주대학교 해양과환경연구소에서 먹고, 자고, 실험하는데 불편함이 없도록 많은 지원과 도움을 주신 강태연 선생님, 김봉길 선생님, 김태웅 선생님, 고성대 선생님, 김선희 님께도 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 그리고 학위 과정 중 많은 격려와 힘을 실어주신 해성희 선배님들께도 진심으로 감사의 뜻을 전합니다.

자주 얼굴도 내 비치지 못하는 무정한 친구를 위해 많은 격려와 응원을 해준 사랑하는 친구들과 오랜 시간 동안 제 곁에서 힘이 되어 준 사랑하는 경덕이, 이제는 가족과 같은 아버님, 어머님, 경진, 경은, 승현이에게 깊고 뜨거운 감사를 드리며, 마지막으로 못난 아들을 위해 헌신적인 인생을 살아오신 너무나 사랑하고 존경하는 아버지와 어머니, 형의 빈자리를 대신하여 주는 듬직하고 착한 동생 윤운이에게 앞으로 더욱 발전하고 노력하는 모습 보여드릴 것을 약속드리면서 이만 감사의 글을 마치고자 합니다.

※ 타지에서 제주도에 온지 9년이란 시간이 지나는 동안 관심과 사랑으로 보살펴주신 분이 너무도 많아 여기 지면으로 다 감사의 뜻을 전하지 못하는 점 정말 죄송스럽게 생각하며 열심히 살아가면서 갚아나가도록 하겠습니다.

2008년 1월 류 용 운