



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

자바리, *Epinephelus bruneus*의
성 전환과 성숙 유도에 따른 종묘생산



제주대학교 대학원

수산생물학과

오 성 립

2006년 12월

자바리, *Epinephelus bruneus*의 성 전환과 성숙 유도에 따른 종묘생산

지도교수 이 영 돈

오 성 립

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2006년 12월

오성립의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 노 섬

위 원 이 정 의

위 원 이 기 완

위 원 김 형 배

위 원 이 영 돈

제주대학교 대학원

2006년 12월

Seed Production of Longtooth Grouper,
Epinephelus bruneus with Induced Sex
Reversal and Maturation

Seong-Rip Oh

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

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

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December 2006

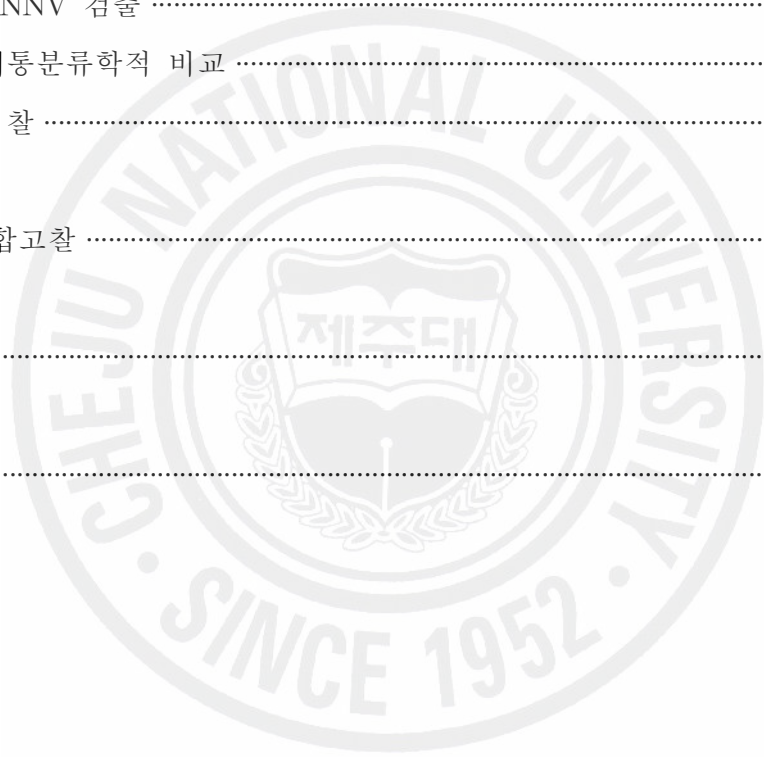
목 차

List of figure	i
List of table	iii
Abstract	v
총 론	1
제 1장 성 전환과 동결보존 정자의 수정 능력	5
I. 서 론	5
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어	6
2. 성 특성과 기능적 수컷유도	8
1) 실내사육 어미의 성 특성	8
2) 기능적 수컷유도	10
(1) 17 α -methyltestosterone 처리에 따른 기능적 수컷유도	10
(2) 수컷유도 개체의 암컷 복귀율	13
3. 동결보존 정자의 수정 능력	14
1) DMSO 농도에 따른 동결정자의 수정 능력	14
2) 보존기간에 따른 동결정자의 수정 능력	15
III. 결 과	17
1. 성 특성과 기능적 수컷유도	17
1) 실내사육 어미의 성 특성	17
2) 기능적 수컷유도	26
(1) 17 α -methyltestosterone 처리에 따른 기능적 수컷유도	26
(2) 수컷유도 개체의 암컷 복귀율	29
2. 동결보존 정자의 수정 능력	31

1) DMSO 농도에 따른 동결정자의 수정 능력	31
2) 보존기간에 따른 동결정자의 수정 능력	33
IV. 고찰	35
제 2장 난 성숙 유도에 따른 채란과 수정란 및 자·치어 발달	39
I. 서론	39
II. 재료 및 방법	41
1. 난 성숙과 배란 유도	41
1) 실험어 사육관리	41
2) cannulation을 이용한 난 성숙도 조사	41
3) HCG 처리에 따른 난 성숙과 배란 유도	42
2. 채란과 부화	46
1) 채란과 부화	46
2) 난 발생	46
3) 염분에 따른 부화율	46
3. 자·치어 형태 발달	48
1) 자·치어 발달	48
(1) 난황흡수 및 개구시간	48
(2) 부화자어의 전장과 입 크기	48
(3) 등지느러미와 배지느러미 극(棘)	49
2) 이형 발달	49
(1) 실험어	49
(2) 조사방법	49
III. 결 과	51
1. 난 성숙과 배란 유도	51
1) 실험어 사육관리	51
2) cannulation을 이용한 난 성숙도 조사	54
3) HCG 처리에 따른 난 성숙 및 배란 유도	56
(1) 혼합수에서의 난 성숙 및 배란 유도	56

(2) 지하해수에서의 난 성숙 및 배란 유도	56
(3) 적정 호르몬 처리 시기	56
2. 채란과 부화	60
1) 채란과 부화	60
2) 난 발생	60
3) 염분에 따른 부화율	60
3. 자·치어 형태 발달	66
1) 자·치어 발달	66
(1) 난황흡수 및 개구시간	68
(2) 부화자어의 전장과 입 크기	70
(3) 등지느러미와 배지느러미 극(棘)	72
2) 이형 발달	76
(1) 외부 형태이상	76
(2) X-ray 투과영상을 통한 골격계 형태이상	76
(3) 척추골과 부속지 골격	80
(4) 척추 형태이상	82
IV. 고찰	86
제 3장 종묘생산	92
I. 서 론	92
II. 재료 및 방법	93
1. 종묘생산	93
1) 요오드액을 이용한 수정란 소독	93
(1) 요오드액의 적정 처리 농도 및 시간	93
(2) 요오드액 처리시기에 따른 영향	93
2) 종묘생산	94
2. 종묘생산 과정에서 VNNV 검출과 유전학적 계통 분류	97
1) 실험재료	97
2) RT-PCR 수행	97

3) 염기서열 분석과 유전학적 계통 분류	99
Ⅲ. 결 과	100
1. 종묘생산	100
1) 요오드액을 사용한 수정란 소독	100
(1) 요오드액의 적정 처리 농도 및 시간	100
(2) 요오드액 처리시기에 따른 영향	100
2) 종묘생산	103
2. 종묘생산 과정에서 VNNV 검출과 유전학적 계통 분류	107
1) VNNV 검출	107
2) 계통분류학적 비교	107
Ⅳ. 고 찰	110
제 4장 종합고찰	114
요 약	118
참고문헌	121



List of figure

Fig. 1. Preparation procedure for implantation of silastic capsule with 17 α -methyltestosterone (MT).	11
Fig. 2. Implantation procedure for sex reversal by silastic capsule with 17 α -methyltestosterone.	12
Fig. 3. Change of sex ratios on broodstock of <i>E. bruneus</i> during the rearing period.	25
Fig. 4. Histological images of gonads of <i>E. bruneus</i> by implantation of silastic capsule with 17 α -methyltestosterone.	27
Fig. 5. Ability of fertilization of frozen-thawed semen that frozen with three DMSO concentrations levels.	32
Fig. 6. Ability of fertilization of frozen-thawed semen by cryopreservation periods.	34
Fig. 7. Serial view images of cannulation with injection.	43
Fig. 8. Serial view images of artificial ovulation and fertilization.	47
Fig. 9. Monthly changes of rearing water temperature and photoperiod of mixing seawater group.	52
Fig. 10. Monthly changes of rearing water temperature and photoperiod of underground seawater group.	53
Fig. 11. Comparison of ovulation rates with HCG 500 IU/kg BW injection by different oocyte sizes in ovary.	59
Fig. 12. Distributions of egg and oil globule diameters in <i>E. bruneus</i>	63
Fig. 13. Embryonic development in <i>E. bruneus</i>	64
Fig. 14. Comparison of hatching rates of fertilized eggs in <i>E. bruneus</i> under four different salinity concentrations.	65
Fig. 15. External development and growth of <i>E. bruneus</i> larvae.	67
Fig. 16. Absorptions of yolk and oil globule in <i>E. bruneus</i> larvae by time elapse after hatching under two water temperature conditions.	69

Fig. 17. Development of the dorsal spines and pelvic spines of <i>E. bruneus</i> larvae.	73
Fig. 18. Growth of the first, second, and third dorsal spines and the pelvic spine by days after hatching in <i>E. bruneus</i> larvae.	74
Fig. 19. Proportions of the second dorsal and pelvic spines to total length of <i>E. bruneus</i>	75
Fig. 20. External features of normal and polymorphism juvenile of <i>E. bruneus</i>	77
Fig. 21. Type of external polymorphism in <i>E. bruneus</i> juvenile produced artificially.	78
Fig. 22. Lateral and ventral radiograph images of normal and polymorphism <i>E. bruneus</i> juvenile produced artificially.	79
Fig. 23. Lateral view of skeletal polymorphism in <i>E. bruneus</i> using transparent fish-skeletal specimen.	83
Fig. 24. Proportions of polymorphism site and type of vertebral column at malformed individuals in <i>E. bruneus</i> juvenile.	84
Fig. 25. Part of polymorphism of skeletal in <i>E. bruneus</i> juvenile.	85
Fig. 26. Water management and feeding scheme during the larval rearing of <i>E. bruneus</i>	96
Fig. 27. Effect of the treatment with povidone-iodine on the hatching rates and abnormalities by the concentrations and durations of the disinfectants contact.	101
Fig. 28. Effects of the treatment with povidon-iodin (20 ppm, 15 min) on the hatching rates of fertilized egg by developmental stages contacted.	102
Fig. 29. Growth patterns of the total length and anal length of <i>E. bruneus</i> larvae by days after hatching.	106
Fig. 30. Detection of VNNV from fertilized egg and juvenile of <i>E. bruneus</i> by RT-PCR.	108
Fig. 31. Phylogenic tree of nodaviruses isolated from <i>E. bruneus</i>	109

List of table

Table 1. Total length and body weight of <i>E. bruneus</i> for taming to broodstock by years	7
Table 2. Fish size and sex distribution of <i>E. bruneus</i> with each rearing tank by rearing period	9
Table 3. Composition of diluents used for cryopreservation of <i>E. bruneus</i> sperm	16
Table 4. Quantities of diluents, DMSO, and fresh semen in three different DMSO concentration trials	16
Table 5. Change of sex distribution and fish size of <i>E. bruneus</i> reared in C tank during 2003 to 2004	19
Table 6. Change of sex distribution and fish size of <i>E. bruneus</i> reared in D tank during 2003 to 2004	20
Table 7. Change of sex distribution and fish size of <i>E. bruneus</i> reared in B tank during 2004 to 2005	21
Table 8. Change of sex distribution and fish size of <i>E. bruneus</i> reared in B tank during 2005 to 2006	22
Table 9. Change of sex distribution and fish size of <i>E. bruneus</i> reared in A tank during 2005 to 2006	24
Table 10. Induced spermiation of <i>E. bruneus</i> implanted with 17 α -methyltestosterone (MT 2 mg/kg BW)	28
Table 11. Revert to females in sex-changed males <i>E. bruneus</i> implanted with 17-methyltestosterone (MT 2 mg/kg BW)	30
Table 12. Fish size and dosage of HCG for ovulation induction in the mixing seawater group	44
Table 13. Fish size and dosage of HCG for ovulation induction in the underground seawater group	45
Table 14. Distribution of oocytes size by cannulation in mixing seawater	

and underground seawater groups of <i>E. bruneus</i>	55
Table 15. Composition of oocyte size in ovary before HCG injection and ovulated egg with HCG injection in mixing seawater cultured broodstock in 2005	57
Table. 16. Composition of oocyte size in ovary before HCG injection and ovulated egg with HCG injection in underground seawater cultured broodstock in 2006	58
Table 17. Induced ovulation and fertilization on <i>E. bruneus</i> broodstock	62
Table 18. Changes of mouth size calculated by upper jaw length of <i>E. bruneus</i> larvae	71
Table 19. Number of axial skeletons and appendages in <i>E. bruneus</i>	81
Table 20. Primer set used for the diagnosis of VNNV infection	98
Table 21. Condition of the reaction steps and polymerase chain reaction (PCR) cycles	98
Table 22. Effects of fertilized egg disinfection on the survival of larvae in the mass seed production of <i>E. bruneus</i>	105

Abstract

Longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* inhabits around cragged rock mass under 10 to 20 m water depth and esteems one of the most important and resources-decreasing fishes in Jeju island. To try resources enhancement and commercial aquaculture for grouper, artificial seedling production trials has begun in Korea since 1993. However, mass production was still unable to produce stably because of the limited numbers of fertilized eggs, insufficient live food organism suitable for the mouth size of larvae at the onset of feeding, and infection with viruses such as the viral nervous necrosis virus (VNNV).

In the present study, for mass production of fertilized eggs and seeds of longtooth grouper, *E. bruneus*, a kind of epinepheline fish, was conducted to investigate the induction of sex reversal, sexual maturation and ovulation of indoor tank-reared of wild-caught broodstock and the development of fertilized egg, larval and juvenile, and polymorphism individuals. Also investigated the VNNV during the process of seed production and their pedigree.

1. Sex reversal and sperm cryopreservation

To domesticate for broodstock, sixty one wild-caught longtooth grouper of 47-110 cm in total length and 1.5-21.4 kg in body weight were reared at an indoor concrete tank (4-5 m wide, and 2.5-3 m deep) for around four years from year 2002 to 2006. Eight broodstock showed sex reversal from female to male during indoor cultivation whose total lengths and body weights were 63-99 cm and 4.4-13.2 kg, respectively. After inducing artificial masculinization in 20 female longtooth groupers with 17 α -methyltestosterone (2 mg/kg BW) implants from 2003 to 2006, spermiation occurred in 13 fish.

Performing artificial fertilization using frozen-thawed sperm after freezing

the sperm at different DMSO concentration of 5.0%, 7.5%, 10.0%, respectively, fertilization and hatching rates were not significant by different DMSO concentration (5.0%, 7.5% and 10.0%, respectively).

2. Induction of sexual maturation and development of fertilized eggs, larvae, and juveniles

For the induction of sexual maturation of longtooth grouper, *E. bruneus* were reared in mixed seawater (mixed natural and underground seawater; 15.9–22.8°C) and underground seawater (17.0–22.7°C). Induce of ovulation occurred to following HCG (500 IU/kg BW) injection in 22 June for mixed seawater group, and in 27 April for underground seawater group. The eggs were artificially fertilized with the fresh semen. The resulting of fertilization rates were 74.1–96.2% (mean 87.1±8.4%) in mixed seawater group, and were 78.3–95.2% (mean 90.2± 6.5%) in underground seawater group.

Fertilized eggs have one oil globule and a diameter of 906.5±27.5 μm (N=100). Hatching of fertilized eggs occurred after about 48 h at 20°C.

At 3 DAH, the mouth opened and the initial mouth size (d) of larvae 3 and 4 DAH was 0.219–0.223 mm. The second spine of the dorsal fin and the pelvic spine appeared 11 DAH, and the first and third spines of the dorsal fin appeared 17 DAH. The dorsal and pelvic fins were separated 48 DAH, and the second spine of the dorsal fin and the pelvic spine were maximally 40% and 35% of the total length of the larva, respectively, when the total length was about 8 mm.

External polymorphism of longtooth groupers was 88.9% for complex polymorphism and 11.1% for simple polymorphism. Polymorphism part of malformed individuals were 39.0% for anterior, 27.3% for middle, and 33.7% for posterior of vertebral column.

3. Seed production and VNN

Effect of iodine various disinfection concentration and time on hatching of eggs posterior of optic vesicle formation stage were investigated. When the fertilized eggs were disinfected at 15 and 30 minutes in 5, 10 and 20 ppm of iodine, the hatching rate was 95.8–100%, which was not significant that of the control ($P>0.05$). However, in the treatment groups for 15 and 30 minutes in 40 and 80 ppm of iodine, the hatching rate was 53.8–84.7%, lower than that of the control ($P<0.05$).

When the fertilized eggs were disinfected before optic vesicle formation stage (OVFS), the hatching rate was 9.9–45.3%, lower than that of the control ($P<0.05$). However, when the fertilized eggs were disinfected after OVFS, the hatching rate was 95.8%, which was not significant that of the control ($P>0.05$). The malformation rate of eggs disinfected with 40 ppm iodine for 15 min was 12.1% and the malformation rates of eggs in the group treated with 80 ppm iodine for 15 and 30 min were 33.1 and 65.1%, higher than that of the control ($P<0.05$).

Checking whether VNN happened because of disinfection of fertilized eggs during the process of mass seed production of longtooth grouper, infected VNN at 10 and 28 days after hatching from the hatched fertilized eggs without disinfection and that the final survival rate of the larval of longtooth grouper was proved to be 0.11%. The rate of survival was 10.2% after the fertilized eggs were disinfected for 15 min in 20 ppm of iodine. The eggs were hatched as a result of the seed production and were found to be negative for VNNV 60 days after hatching.

The VNNV coat protein gene, obtained from the material infected in 2005, showed 99.2% and 98.0% homology with VNNV coat genes of the dragon grouper and red spotted grouper, respectively. The VNNV infecting longtooth grouper in Jeju was identical to the red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV).

총 론

제주도에서 일반적으로 “다금바리”라 불리는 자바리 *Epinephelus bruneus*는 농어목(Perciforme) 바리과(Serranidae) 능성어속(*Epinephelus*)의 어종으로 전장 100 cm 이상 성장하며, 제주도를 포함한 우리나라 남해, 일본 중부이남, 중국, 필리핀 등 온대 및 아열대 지역의 외양과 접한 암초지역에 분포한다(FAO, 1993; Kim et al., 2005). 이 종은 다갈색 바탕에 머리쪽으로 휘어진 6~7개의 흑갈색 무늬를 갖고 있으며, 노성어가 되면 이 무늬가 불분명하고 어두운 갈색을 띤다(Kim et al., 2005).

우리나라에 서식하는 바리과 어류는 남해안과 제주도 연안에 자바리, 능성어 *E. septemfasciatus*, 붉바리 *E. akaara*, 홍바리 *E. fasciatus*, 그리고 별우럭 *E. fario* 등이 분포한다(Kim et al., 2005). 이 바리과 어류는 우리나라뿐만 아니라 일본, 중국 그리고 동남아시아 지역에서도 식용어로서 기호도가 높고, 고가어종으로 그 수요가 매우 높다. 국제식량농업기구(FAO)는 남획 등으로 인하여 자원량이 급격하게 감소하는 어종으로 자바리와 붉바리 *E. akaara* 및 다수의 바리과 어종을 포함시키고 있다. APEC에서는 바리과 어류의 자원회복을 위해 국가간 공동연구 및 기술지원 등 다양한 자원관리 정책 방안을 제시하였다(Rimmer et al., 1999). 이와 같은 바리과 어류 자원감소 문제에 적극적으로 접근하여 해결할 수 있는 방법은 종묘생산 기술을 확립하여 대량 종묘생산과 방류 사업을 통한 자원 조성을 추진하는 일이라 할 수 있다. 특히 자바리는 연안 정착성 어종으로 이동 범위가 크지 않기 때문에 종묘를 생산하여 방류할 경우 그 효과가 매우 클 것으로 예상된다.

바리과 어류의 자원회복을 위한 연구는 일본, 중국, 대만, 필리핀 등 동남아시아 국가를 중심으로 어미 관리와 성 성숙 유도 및 종묘생산에 관하여 수행되고 있으며(Chen et al., 1977; Fukuhara, 1989; Sugama and Ikenoue, 1999; Tsuchihashi et al., 2003a, b; Song, 2004; Alam et al., 2006), 미국과 호주지역에서는 연안 자원관리와 성 현상에 관한 연구들이 진행되고 있다(Johnson et al., 1998; Williams et al., 1998; Patterson et al., 1999).

자바리의 번식생물학적 연구는 실내사육 수조에서 자연산란 행동과 초기생활사, 자·치어의 환경스트레스 내성 및 성장과 형태학적 발달, 사육수온이 치어의 섭식과 성장에 미치는 영향 등에 관한 연구들이 수행되었다(Manabe and Kasuga, 1988; Okada et al., 1996; Sawada et al., 1999; Inoue, 2001).

자바리의 성 특성은 암컷으로 먼저 성숙한 후에 개체 중 일부가 수컷으로 성 전환하는 자성선숙형 자웅동체어(proto gynous hermaphrodite)이다. 바리과 어류의 성 전환은 종 특이성을 가지며, 자연적 성 전환이 일어나는 시기는 dusky grouper *E. marginatus*의 경우 부화 후 9~16년, greasy grouper *E. tauvina*는 부화 후 7년에 일어난다(Chauvet, 1988; Chao and Lim, 1991). 이와 같은 성 특성으로 인하여 자연 환경에서 정자 생산이 가능한 기능적 수컷을 확보하는 것은 매우 어렵다. 이러한 문제점은 옹성호르몬을 사용한 인위적 성 전환을 유도하여 해결하고 있다.

바리과 어류의 옹성화 유도에 관한 연구는 17 α -methyltestosterone (MT)을 사용한 경구투여, 주사 또는 implant 방법을 이용하여 인위적 성 전환을 유도하고 있으며, 최근에는 honeycomb grouper *E. merra*에 방향화효소억제물질(aromatase inhibitor, AI)을 사용하여 인위적 성 전환을 유도하였다(Chen et al., 1977; Tukashima and Kitajima, 1983; Chao and Chow, 1990; Hwang et al., 1998; Tsuchihashi et al., 2003a; Song, 2004; Alam et al., 2006).

어류의 방란·방정 시기 불일치 또는 성비 불균형으로 인하여 수컷의 정액을 원하는 시기에 얻을 수 없는 경우에 이를 보완하기 위하여 효율적인 정자 냉장보존 또는 동결보존 방법에 대한 연구를 수행하고 있다. 지금까지 국내외에서 어류 정자의 동결보존에 관한 연구는 희석액에 따른 동결보존 효과, 동해방지제의 종류와 농도에 따른 난 발생에 미치는 영향 등이 있다(Ott and Horton, 1971; Yamamoto, 1976; Baynes and Scott, 1987; Lim and Chang, 1998; Zhang et al., 2003; Dang et al., 2006).

어류의 성숙과 산란은 생식 내분비계에 의하여 조절되지만, 이들의 성숙 조절을 유도하는 것은 주로 환경요인으로 광주기와 수온이 성 중추 활동을 강하게 제어한다(De Vlaming, 1972, 1975; Nishi and Takano, 1979; Asahina and Hanyu, 1983; Razani and Hanyu, 1986). 어류의 생식소 발달과 산란은 수온과 광주기 조

건들이 단독적인 작용보다는 상호 보완적 작용을 하며, 종에 따라 그 범위가 각각 다르게 나타난다(Donaldson and Hunter, 1983; Kim and Hur, 1991). 국내에서 해산어류의 인위적 성 성숙 유도에 관한 연구는 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*, 조피볼락 *Sebastes schlegeli*과 능성어 *E. septemfasciatus*에서 광주기와 수온조절을 통하여 생식소의 성숙을 조절하였다(Hwang, 1999; Park, 2000; Song, 2004).

어류의 골격계 형태이상은 척추, 지느러미, 그리고 턱 등에 주로 나타난다. 형태이상 개체의 발생 원인은 배(embryos)발생 시기에 유전적 원인 또는 외부환경 요인에 영향을 받아 발생한다(Paperna, 1978; Piron, 1978). 특히 어류의 척추 형태이상은 종묘생산 시기에 사육환경 또는 영양성분의 불균형으로 인해 발생하고 있다(Haya, 1989; Weis and Weis, 1989; Wiegand et al., 1989; Akiyama et al., 1989; Caris and Rice, 1990; Cahu et al., 2003). 척추 형태이상의 또 다른 원인은 자어시기 부레 형성 과정이 불완전하면 부상 능력 부족에 따른 비정상 유영행동을 보이고, 이와 같은 유영 행동 때문에 척추 형태이상이 발생한다(Kitajima, 1978; Chatain, 1982; Andrades et al., 1996).

어류의 건강 종묘 생산 체제가 확립되려면 안정적인 수정란 대량생산과 종묘생산과정에서 발생하는 질병 예방이 주요 과제이다. 자바리를 비롯한 바리과 어류 종묘생산과정에서 발생하는 바이러스성신경괴사증(viral nervous necrosis, VNN)은 자·치어기에 대량폐사를 유발하는 질병으로서, 이러한 VNN 발생은 주로 수직감염 또는 수평감염에 의해 이루어진다(Munday and Nakai, 1997; Munday et al., 2002; Gomez et al., 2004). 국내에서는 Sohn et al. (1998)이 능성어 *E. septemfasciatus*의 VNN 감염을 보고하였으며, 일본의 경우도 바리과 어류 종묘생산과정에서 VNN 감염이 가장 큰 문제로 지적되었다(Tsuchihashi et al., 2002; Tanaka, 2005).

세계적으로 양식산 바리과 어류의 60% 이상은 자연산 치어를 채포하여 축양하는 형태로 양식이 이루어지고 있으며(Sadovy et al., 2003), 국내에서도 대부분이 남해안에서 자연산 치어를 채포하여 사육하고 있는 실정이다. 우리나라에서 바리과 어류의 완전양식에 관한 연구는 1993년부터 붉바리 *E. akaara*와 능성어 *E. septemfasciatus*에 대한 종묘생산 기술개발을 시도하였으나 수정란 확보문제와 초기 자어의 구경에 적합한 먹이생물 부재 등의 이유로 아직까지 안정적인 대량생산 체제가 확립되어 있지 않다(Kim and Kim, 1993; Kim and Park, 1993; Kim et al.,

1997; Hwang et al., 1998; Song, 2004).

이 연구는 자바리의 성 특성 파악과 종묘생산 기술개발을 목적으로 실내 사육 수조에서 개체별 추적을 통한 성 분포 변화와 안정적인 정자 확보를 위한 인위적 성 전환 유도 및 확보된 정자의 효율적인 동결보존 방법을 탐색하였고, 자연 광주기 조건에서 제주도 지하해수의 수온 특성을 이용하여 조기 성 성숙 유도 가능성과 호르몬 처리에 따른 배란유도, 난 발생 및 자·치어의 형태 발달에 관한 연구를 수행하였다. 그리고 형태이상 개체의 X-ray 영상과 투명골격표본을 이용하여 자바리 치어의 골격계 이형 발달을 형태학적으로 조사하였으며, 종묘생산과정 중에 발생하여 대량 감모를 일으키는 바이러스성신경괴사증의 방지 대책과 원인 바이러스의 유전학적 계통분류를 실시하였다.



제 1장 성 전환과 동결보존 정자의 수정 능력

I. 서 론

자바리는 암컷으로 성숙한 후 수컷으로 성 전환이 일어나는 자성선속형 자웅동체어이다. 바리과 어류의 자연적 성 전환 시기는 greasy grouper *E. tauvina*의 경우 부화 후 7년, dusky grouper *E. marginatus*는 9~16년이며, 붉바리 *E. akaara*는 체중 500 g 이상에서 수컷 비율이 증가하고, 사육 수조내 성비에 따라 암컷에서 수컷 또는 수컷에서 암컷으로 성 전환이 일어나는 특징을 가진다(Hamamoto et al., 1986; Chauvet, 1988; Chao and Lim, 1991; Lee et al., 1998).

이와 같은 바리과 어류의 성 특성으로 인하여 자연에서 수컷을 구하기가 쉽지 않아 수정란 생산에 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 greasy grouper *E. tauvina*, 능성어 *E. septemfasciatus*, 붉바리 *E. akaara*의 암컷에 MT를 투여하여 인위적 용성화를 유도하였고, honeycomb grouper *E. merra*에는 fadrozole hydrochloride hydrate을 사용하여 수컷을 유도하는 성 전환 기법을 이용하였다(Chen et al., 1977; Tukashima and Kitajima, 1983; Chao and Chow, 1990; Hwang et al., 1998; Tsuchihashi et al., 2003a; Song, 2004; Alam et al., 2006).

자성선속어에서 수컷 확보의 어려움과 원하는 시기에 정액을 용이하게 얻을 수 없는 문제점을 해결하기 위하여 정자 냉장보존 또는 동결보존을 수행하고 있다. 지금까지 국내외에서 어류정자의 동결보존에 관한 연구는 희석액에 따른 냉장과 동결보존 효과 및 동해방지제의 종류와 농도에 따른 난 발생에 미치는 영향에 관한 연구들이 수행되었다(Ott and Horton, 1971; Yamamoto, 1976; Baynes and Scott, 1987; Lim and Chang, 1998; Zhang et al., 2003; Dang et al., 2006).

이 연구는 실내사육 자바리의 성 특성을 탐색하기 위해 개체별 추적으로 연차별 암·수 전장과 체중 분포에 따른 성 변화를 조사하였고, 안정적 정자 확보를 위하여 기능적 수컷유도 및 효율적인 정자 동결보존 방법을 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 2002년 9월부터 2005년 12월까지 제주도 연근해에서 포획된 자연산 자바리 69마리(평균 전장 65.6 ± 13.1 cm, 평균 체중 4.7 ± 4.0 kg)를 구입하여 이용하였다(Table 1). 실험어는 제주특별자치도해양수산자원연구소의 실내 콘크리트수조 6개($5 \times 5 \times 3$ m, 유효수량 62 m^3 2개; $4 \times 4 \times 2.5$ m, 유효수량 32 m^3 4개)에 옮긴 후 사육 관리하였다.

실험어는 각 개체의 이력을 추적하기 위하여 실내수조에 수용하기 전에 radio frequency identification tag (ID tag, trovan Ltd. U.K.)를 등 근육에 삽입하였다. 먹이는 냉동 전갱이를 주 2회 공급하였고, 산란시기 2~3개월 이전부터는 냉동 전갱이와 오징어를 공급하였다.

Table 1. Total length and body weight of *E. bruneus* for taming to broodstock by years

Year ¹⁾	Number of fish	Total length (cm)		Body weight (kg)	
		Mean±S.D. ²⁾	Range	Mean±S.D.	Range
2002	7	88.4±21.6	65 ~ 110	12.3±8.1	3.5 ~ 21.4
2003	32	59.8±6.5	47 ~ 71	3.2±1.0	1.5 ~ 5.1
2004	27	66.9±9.4	51 ~ 84	4.5±2.1	2.0 ~ 8.2
2005	3	62.3±14.6	52 ~ 79	4.1±3.4	1.9 ~ 8.0

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾S.D.: Standard deviation of means.

2. 성 특성과 기능적 수컷유도

1) 실내사육 어미의 성 특성

2002년부터 2005년까지 구입하여 등 근육에 ID tag가 삽입된 상태로 사육관리 중인 실험어 35~61마리를 대상으로 2003년부터 2006년까지 실내 사육수조 내에서 수조별 성 전환과 성 분포 변화를 추적 조사하였다.

매년 6~7월사이 배란·배정 유도 후 새롭게 혼합하여 수용된 각각의 연차별·수조별 어체 크기와 성비 분포는 Table 2에 나타내었다. 성 특성 구분은 생식소 내 난모세포 크기가 200 μm 이상의 개체와 매년 배란을 경험한 개체를 암컷으로 판별하였고, 전년도 암컷 개체 중 복부를 압박 했을 때 배정이 이루어지는 개체를 수컷으로 판별하였다. 그리고 배란·배정이 이루어지지 않고, cannulation을 할 수 없는 개체를(no detection) 암·수 불분명 개체로 구분하였다.

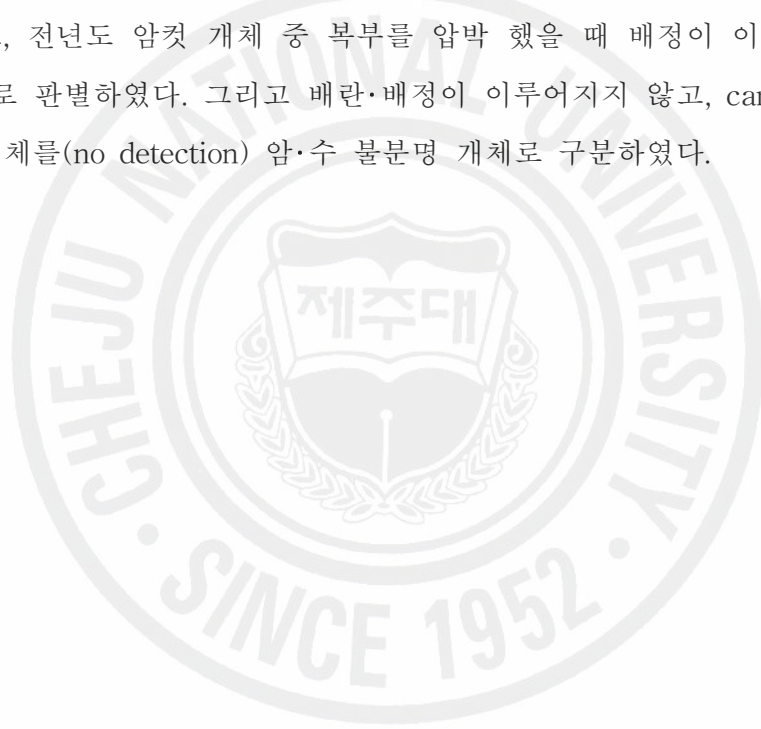


Table 2. Fish size and sex distribution of *E. bruneus* with each rearing tank by rearing period

Rearing period	Rearing tank	Number of fish	TL ¹⁾ (cm)	BW ²⁾ (kg)	Sex		
					F ³⁾	M ⁴⁾	ND ⁵⁾
Jul. 2003~	A (62 m ³) ⁶⁾	4	95 ~ 110 (105.3±6.9) ⁷⁾	12.9 ~ 21.4 (18.3±3.9)	3	1	0
Jun. 2004	B (32 m ³)	7	50 ~ 74 (64.6±7.4)	2.2 ~ 5.6 (4.2±1.0)	2	2	4
	C (32 m ³)	12	58 ~ 83 (68.8±8.3)	3.2 ~ 8.2 (5.3±1.8)	7	5	0
	D (32 m ³)	12	47 ~ 60 (55.3±5.2)	1.5 ~ 3.0 (2.3±0.6)	0	0	12
Aug. 2004~	A (62 m ³)	16	63 ~ 90 (72.1±8.3)	3.6 ~ 8.8 (5.4±1.8)	8	4	4
Jun. 2005	B (62 m ³)	3	97 ~ 104 (101.3±3.8)	12.9 ~ 21.3 (17.9±4.4)	2	1	0
	C (32 m ³)	23	47 ~ 64 (57.2±4.6)	1.5 ~ 3.9 (2.6±0.7)	4	5	14
	D (32 m ³)	6	60 ~ 67 (62.8±2.3)	3.2 ~ 3.5 (3.3±0.2)	3	3	0
	E (32 m ³)	13	56 ~ 84 (67.8±8.7)	2.8 ~ 8.5 (4.5±1.8)	7	2	4
Jul. 2005~	A (62 m ³)	25	58 ~ 75 (67.0±4.3)	2.6 ~ 6.2 (4.2±0.8)	16	9	0
Jun. 2006	B (62 m ³)	6	83 ~ 115 (92.0±13.0)	8.2 ~ 19.8 (11.4±4.5)	4	2	0
	C (32 m ³)	19	52 ~ 64 (59.2±3.7)	2.4 ~ 4.1 (2.9±0.5)	5	3	11
	D (32 m ³)	5	65 ~ 111 (82.2±17.6)	4.5 ~ 22.1 (9.5±7.2)	3	2	0

¹⁾TL: total length. ²⁾BW: body weight. ³⁾F: female. ⁴⁾M: male. ⁵⁾ND: no detection. ⁶⁾Volume of rearing tank. ⁷⁾Mean±standard deviation of mean.

2) 기능적 수컷유도

(1) 17 α -methyltestosterone 처리에 따른 기능적 수컷유도

자바리의 인공 수정란 생산을 위한 정자 확보 방안으로서 미성숙 자바리를 대상으로 웅성호르몬인 17 α -methyltestosterone (MT, Sigma Co., USA) 처리로 기능적 수컷을 유도하였다. 실험어는 2003년부터 2006년까지 전장 50~69 cm(평균 61.5 \pm 4.5 cm), 체중 2.3~4.3 kg(평균 3.4 \pm 0.5 kg)의 자바리 20마리를 대상으로 실시하였다.

인위적 웅성화 유도는 Tsuchihashi et al. (2003a)의 방법에 따라 웅성호르몬이 들어있는 silastic capsule를 제작하여 실험어 복강에 삽입하였다. Silastic capsule은 1단계로 100 mg의 MT를 95%에탄올 200 μ l에 용해시킨 후 castor oil (Junsei Chemical Co., Japan) 800 μ l를 첨가하여 MT 용액(1 mg MT/10 μ l)을 만들었다. 2단계로서 내경 2 mm의 실리콘튜브를 2 cm (MT 6 mg 함유용)와 3 cm (MT 8 mg 함유용)로 각각 절단하여 위에서 제조된 용액을 60 μ l과 80 μ l를 넣고 절단부위를 실리콘으로 봉합하였다(Fig. 1).

실험어는 2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA) 300 ppm에 마취시켜 가슴지느러미 끝의 아래 부분 복부를 0.5 cm 정도 절개 후, MT 2 mg/kg BW로 제작된 silastic capsule를 삽입한 후 접착제를 사용하여 절개 부위를 봉합하였다(Fig. 2).

자바리의 인위적 성 전환 유무는 2003년에는 조직학적 방법과 복부를 압박하여 육안적으로 확인하는 방법으로 비교하였다. 2004년부터 2006년까지는 복부를 압박하여 정액이 배정되는 것을 육안적으로 확인하는 방법만을 이용하였다. 조직학적 방법은 silastic capsule 삽입 전과 삽입 8주 후 어체를 해부하여 생식소를 Bouin's solution에 고정시킨 후 상법인 파라핀 절편법을 이용하였으며, H-E 비교염색으로 검정하였다. 육안적인 방법은 silastic capsule 삽입 8주후부터 14주 사이에 복부를 압박하여 채정되는 것을 육안적으로 확인하여 수컷유도 성공 여부를 판별하였다.

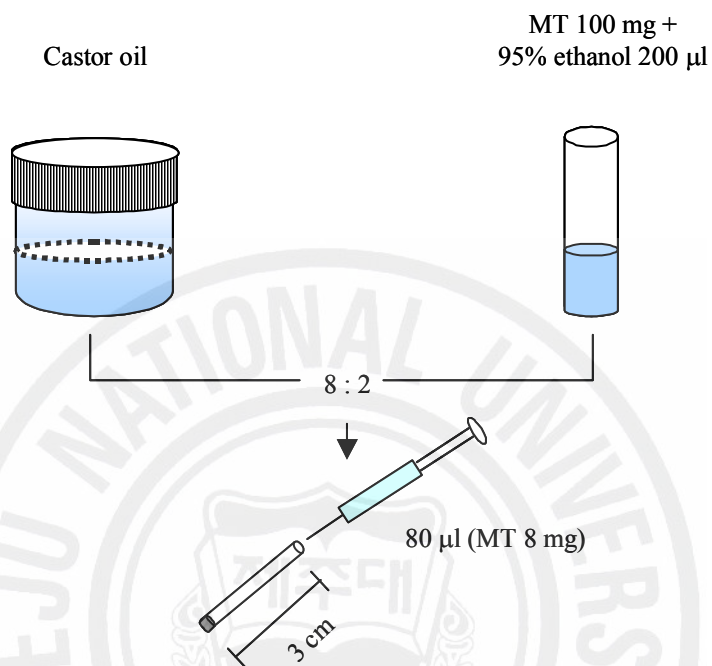


Fig. 1. Preparation procedure for implantation of silastic capsule with 17 α -methyltestosterone (MT). One hundred milligrams of MT were dissolved in 200 μ l of 95% ethanol. The dissolved hormone was then thoroughly mixed with 800 μ l of castor oil. Silastic tubing, having the dimension of 2 mm (inside diameter), was cut into 3 cm lengths. A microdispenser was used to pipet 80 μ l of the MT-castor oil mixture into each open-ended tube.



Fig. 2. Implantation procedure for sex reversal by silastic capsule with 17 α -methyltestosterone. A, Silastic capsule; B, Anesthetization of brood stock; C, Pricking the abdominal cavity part for implantation; D, Insertion of the silastic capsule.

(2) 수컷유도 개체의 암컷 복귀율

2003년부터 2005년까지 응성호르몬 처리에 의해 기능적 수컷으로 성 전환된 개체가 지속적으로 수컷으로 유지되는지 또는 암컷으로 다시 복귀하는지를 2004년부터 2006년까지 조사하였다. 실험어는 매년 MT 처리 후 기능적 수컷으로 확인된 실험어를 대상으로 이듬해 자연조건에서 성숙시기인 6~7월 사이에 복부압박 방법으로 배정 유무를 조사하였다. 최종 암컷 복귀 개체로의 판단은 기능적 수컷유도 개체 중 cannulation이 이루어지고, 성숙 난모세포를 가지는 개체를 암컷 복귀 개체로 판정하였다.



3. 동결보존 정자의 수정 능력

정자 동결보존 실험은 실내수조에서 자연적 성 전환된 자바리의 정액을 채취하여 실시하였다. 정액 채취는 배정이 확인된 자바리를 대상으로 HCG (Human chorionic gonadotropin, Calbiochem Co., USA) 500 IU/kg BW로 등지느러미 제 1극 아래 부분 근육에 주사 후 48시간째에 복부를 압박하여 채정하였다. 정액은 1.5 mL 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box (2~4°C)에 보관하였다.

자바리 정자 동결보존을 하기 위한 희석액은 해수어류용 링거액을 사용하였고 (Table 3), 동해방지제는 DMSO (Sigma Co., Ltd. USA)를 사용하였다. 정액과 희석액과의 평형시간은 1분 이내로 하였으며, 정자 동결보존은 0.5 mL 용량의 정자 보존용 straw를 이용하였다.

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

1) DMSO 농도에 따른 동결정자의 수정 능력

정자 동결보존 과정에서 동해 피해 방지를 최소화시키기 위한 희석액과 동해방지제의 적정 혼합 비율을 조사하기 위하여 각각 서로 다른 비율로 혼합하였다 (Table 4). 동해방지제가 포함된 희석정액은 마이크로피펫으로 0.5 mL를 취한 후 straw에 주입하여 끝 부분을 봉합하였다. 봉합된 straw는 액체질소 증기(-96°C)에서 15분간 동결 후 액체질소 탱크(-196°C)에 저장하였다. 동결보관된 정자는 일반 여과해수(22.0±1.0°C)에서 해동 후 실험에 사용하였다.

DMSO 농도에 따른 수정률에 미치는 영향을 조사하기 위한 수정란은 HCG 처리에 따른 배란 유도된 난 20 g과 각각의 동결보존 정액 0.1 mL 비율로 혼합 후 여과해수를 조금씩 첨가하면서 인공수정을 유도하였다. 대조구는 정액과 희석액을 1 : 49 비율로 희석하여 냉장보관 중인 신선정액을 사용하였다. 수정률은 인공수정 4시간 후 부상란의 일부를 무작위로 채취 하여 profile projector (PJ-H3000F, Japan)에서 정상발생중인 난을 계수하여 구하였다.

DMSO 농도별 부화율 실험은 수정란 80~100개를 무작위로 채취 후 profile

projector에서 계수하여 500 mL 비이커에 수용하여 부화시켰다. 부화율 계산은 인공수정 후 60시간째 부화하지 않은 수정란 수를 계수하여 구하였으며, 수온은 $21.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

정상 개체율은 전체 부화자어 중 부화 직후 사망한 개체와 부화는 이루어졌지만 어체가 만족된 개체 등 비정상 발생 개체를 제외한 정상 개체의 비율로 나타내었다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

2) 보존기간에 따른 동결정자의 수정 능력

동결보존 기간에 따른 동결 정자의 수정 능력을 조사하기 위해 동결보존 기간에 따른 수정률과 부화율을 조사하였다. 동결정자 제작 방법은 DMSO와 희석액을 1 : 7 비율로 혼합한 혼합액과 ice box에 보관중인 정액을 5배(정액 1 : 혼합액 4)로 희석하였다. 동해방지제가 포함된 희석정액을 마이크로피펫을 이용하여 0.5 mL를 취한 후 straw에 주입 후 끝 부분을 봉입하였다. 봉입된 straw는 액체 질소 증기에서 15분간 동결 후 액체질소 탱크에 저장하였다.

동결정자의 해동 후 수정 능력은 동결보존 후 2일, 2년, 3년 경과된 해동정자를 사용하여 인공수정시킨 수정란의 수정률과 부화율을 조사하였다. 수정률과 부화율 조사는 DMSO농도에 따른 냉동보존 평가에 대한 실험 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

Table 3. Composition of diluents used for cryopreservation of *E. bruneus* sperm

Constituent	Formula weight
NaCl	10.00 g
KCl	0.22 g
CaCl ₂	0.25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.74 g
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	1.19 g
Glucose	0.90 g
Streptomycin	0.10 g
Penicillin G	100,000 unit
Distilled water	1,000 mL
pH	7.4

Table 4. Quantities of diluents, DMSO, and fresh semen in three different DMSO concentration trials

Experimental group	Diluent (mL)	DMSO ¹⁾ (mL)	Fresh semen (mL)
5.0% DMSO	7.50	0.50	2.00
7.5% DMSO	7.25	0.75	2.00
10.0% DMSO	7.00	1.00	2.00

¹⁾DMSO: dimethylsulfoxide.

Ⅲ. 결 과

1. 성 특성과 기능적 수컷유도

1) 실내사육 어미의 성 특성

2003년부터 2004년까지 사육기간 동안 실내사육 수조에서 수컷으로 성 전환은 C 수조(32 m³)에 사육중인 12마리 중 2003년에 구입한 1마리(전장 63 cm, 체중 4.4 kg)에서 일어났다. C 수조 내 성 분포는 2003년 암·수 각각 7마리, 5마리에서 2004년에 암컷 6마리 수컷 6마리로 변화였다(Table 5). D 수조(32 m³)에 사육중인 12마리 중 2003년에 구입한 1마리(전장 62 cm, 체중 3.4 kg)에서 수컷으로 성 전환이 일어났으며, D 수조 내 성 분포 변화는 2003년에 전 개체가 미성숙 개체로 암·수 구분이 어려웠지만, 2004년 암·수 판별이 가능한 개체는 암컷 3마리, 수컷 1마리였고, 미성숙 개체는 8마리였다(Table 6).

2004년부터 2005년까지 사육기간 동안 A 수조(62 m³)에 사육중인 16마리 중 2002년에 구입한 1마리(전장 70 cm, 체중 5.1 kg)와 2003년에 구입한 2마리(전장 72 cm, 체중 5.0 kg; 전장 82 cm, 체중 7.2 kg)가 암컷에서 수컷으로 성 전환이 일어났다. A 수조 내 성 분포는 2004년에 암·수 각각 8마리, 4마리와 암·수 구분이 불분명한 개체 4마리에서 2005년에 암컷 9마리, 수컷 7마리로 변화였다(Table 7).

2005년부터 2006년까지 사육기간 동안 실내사육 수조에서 수컷으로 성 전환은 A 수조(62 m³)에 사육중인 25마리 중 2002년에 구입한 1마리(전장 77 cm, 체중 6.7 kg)와 2003년에 구입한 1마리(전장 78 cm, 체중 7.1 kg)에서 일어났다. A 수조내 성 분포는 2005년 암·수 각각 16마리, 9마리에서 2006년에 암컷 14마리, 수컷 9마리로 변화였으며, 암·수 구분이 불분명한 개체는 2마리였다(Table 8). B 수조(62 m³)에 사육중인 6마리 중 수컷으로의 성 전환은 2002년에 구입한 1마리(100 cm, 체중 13.6 kg)가 암컷에서 수컷으로 성 전환이 일어났다. B 수조 내 성 분포는 2005년 암·수 각각 4마리, 2마리에서 2006년에 암컷 2마리, 수컷 3마리로

변하였으며, 암·수 구분이 불분명한 개체는 1마리였다(Table 9).

2003년부터 2006년까지 실내사육 과정에서 성 전환이 일어난 크기는 전장 63~99 cm, 체중 4.4~13.2 kg 이었으며, 대부분 성 전환 개체의 체중은 5~8 kg 이었다. 그리고 어체중에 따른 성 분포는 5 kg 이하의 개체는 총 25마리 중 암컷 19마리(76%), 수컷 1마리, 그리고 암·수 구분이 불분명한 개체가 5마리였다. 어체중 5~8 kg 사이의 개체는 총 11마리 중 암컷 5마리(45.5%), 수컷 6마리(54.5%)로 수컷의 비율이 높게 나타나기 시작하였다. 어체중 8 kg 이상의 개체는 총 8마리 중 암컷 2마리, 수컷 3마리, 그리고 암·수 구분이 불분명한 개체가 3마리였다 (Fig. 3).



Table 5. Change of sex distribution and fish size of *E. bruneus* reared in C tank during 2003 to 2004

Rearing tank (C)	Year ¹⁾	Initial (2003)			Final (2004)			ID Number	
		TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex		
32 m ³ ⁴⁾	2002	58	3.2	M ⁵⁾	61	3.3	M	0635-0030	
		59	3.9	F ⁶⁾	65	3.8	F	0633-3A73	
		60	3.2	M	64	3.5	M	0634-2E83	
		67	4.9	M	70	5.2	M	063D-EF1B	
		71	5.1	F	75	5.3	F	0636-5863	
	2003	63	3.8	F	63	4.4	M	0634-DDE0	
		67	5.3	F	67	5.3	F	0634-34B3	
		70	4.5	F	72	4.8	F	063D-BA84	
		70	6.6	F	91	7.8	F	0633-C1AE	
		78	7.7	F	83	7.7	F	0636-55F8	
		80	7.4	M	82	8.4	M	0634-CA9E	
		83	8.2	M	90	8.8	M	0634-290F	
		Mean±S.D. ⁷⁾		68.8±8.3	5.3±1.8		73.6±10.6	5.7±2.0	

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾32 m³: volume of rearing tank. ⁵⁾M: male. ⁶⁾F: female. ⁷⁾S.D.: standard deviation of mean.

Table 6. Change of sex distribution and fish size of *E. bruneus* reared in D tank during 2003 to 2004

Rearing tank (D)	Year ¹⁾	Initial (2003)			Final (2004)			ID Number
		TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex	
32 m ⁴⁾	2003	47	1.6	ND ⁵⁾	47	1.8	ND	063D-B5D9
		49	1.5	ND	49	1.8	ND	063D-BAFA
		49	1.5	ND	50	1.6	ND	0634-E707
		52	2.0	ND	52	2.0	ND	063D-A16E
		52	2.0	ND	54	2.4	F ⁶⁾	0634-E476
		57	2.8	ND	62	3.4	M ⁷⁾	063D-8CCB
		58	2.5	ND	59	2.5	ND	063D-9A68
		58	2.8	ND	61	3.0	ND	063D-E6C4
		60	2.4	ND	60	2.7	ND	063D-97CA
		60	3.0	ND	62	3.5	F	063D-C4B3
		60	3.0	ND	64	3.6	F	063D-85E2
		62	2.8	ND	63	3.2	ND	063D-AEC2
		Mean±S.D. ⁸⁾		55.3±5.2	2.3±0.6		56.9±6.1	2.6±0.7

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾32 m³: volume of rearing tank. ⁵⁾ND: no detection. ⁶⁾F: female.

⁷⁾M: male. ⁸⁾S.D.: standard deviation of mean.

Table 7. Change of sex distribution and fish size of *E. bruneus* reared in A tank during 2004 to 2005

Rearing tank (A)	Year ¹⁾	Initial (2004)			Final (2005)			ID Number	
		TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex		
62 m ³ ⁴⁾	2002	65	3.8	F ⁵⁾	65	4.4	F	0633-3A73	
		67	4.4	F	70	5.1	M ⁶⁾	0636-1EF9	
	2003	63	4.4	M	69	4.5	M	0634-DDE0	
		64	3.6	F	65	4.5	F	063D-85E2	
		66	3.9	F	65	4.3	F	0634-EEEC	
		70	5.2	M	74	6.6	M	063D-EF1B	
		72	4.8	F	72	5.0	M	063D-BA84	
		72	5.7	F	73	6.2	F	0633-B2A3	
		75	5.1	F	75	5.6	F	0634-34B3	
		82	8.4	M	83	9.0	M	0634-CA9E	
		83	7.8	F	82	7.2	M	0633-C1AE	
	90	8.8	M	90	9.7	M	0634-290F		
	2004	66	3.6	ND ⁷⁾	66	4.1	F	063D-9AD9	
		67	4.7	ND	67	4.3	F	063D-C38F	
		68	4.1	ND	68	4.6	F	063D-95FF	
		84	8.0	ND	84	8.2	F	063D-B39C	
	Mean±S.D. ⁸⁾		72.1±8.3	5.4±1.8		73.0±7.8	5.8±1.8		

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾62 m³: volume of rearing tank. ⁵⁾F: female ⁶⁾M: male. ⁷⁾ND: no detection. ⁸⁾S.D.: standard deviation of mean.

Table 8. Change of sex distribution and fish size of *E. bruneus* reared in A tank during 2005 to 2006

Rearing tank (A)	Year ¹⁾	Initial (2005)			Final (2006)			ID Number
		TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex	
62 m ³ ⁴⁾	2002	65	4.4	F ⁵⁾	68	4.1	F	0633-3A73
		70	5.1	M ⁶⁾	76	7.0	M	0636-1EF9
		75	5.3	F	77	6.7	M	0636-5863
	2003	62	3.1	F	62	3.6	F	063D-E6C4
		62	3.4	M	67	4.2	ND ⁷⁾	0636-586F
		64	3.1	M	64	3.6	M	0633-4997
		64	4.2	F	67	4.4	F	063D-C4B3
		65	4.0	M	66	4.0	M	0635-0030
		65	4.3	F	70	5.3	F	0634-EEEC
		66	4.0	F	70	4.9	F	0634-4BEF
		69	4.5	M	70	5.2	M	0634-DDE0
		69	3.4	M	63	3.9	M	0642-DFC9
		70	5.0	M	70	4.9	M	063D-8CCB

Table 8. Continued

Rearing tank (A)	Year	Initial (2005)			Final (2006)			ID Number	
		TL (cm)	BW (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex		
62 m ³	2003	72	4.6	F	73	6.0	F	0634-CD67	
		72	4.6	M	72	5.0	ND	063D-9358	
		72	5.0	M	76	6.4	M	063D-BA84	
		73	6.2	F	78	7.1	M	0633-B2A3	
	2004	58	2.6	F	60	3.0	F	063D-D77E	
		62	3.2	F	65	4.3	F	063D-BDDE	
		62	3.8	F	63	4.2	F	063D-D94B	
		64	3.6	F	69	5.6	F	0643-66BB	
		66	4.1	F	66	4.4	F	063D-9AD9	
		67	4.3	F	66	4.7	F	063D-C38F	
		68	4.6	F	70	5.0	F	063D-95FF	
		72	4.5	F	72	4.9	F	0642-DA51	
		Mean±S.D. ⁸⁾		66.9±4.3	4.2±0.8		68.8±4.8	4.9±1.1	

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾62 m³: volume of rearing tank. ⁵⁾F: female ⁶⁾M: male. ⁷⁾ND: no detection. ⁸⁾S.D.: standard deviation of mean.

Table 9. Change of sex distribution and fish size of *E. bruneus* reared in B tank during 2005 to 2006

Rearing tank (B)	Year ¹⁾	Initial (2005)			Final (2006)			ID Number
		TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	Sex	TL (cm)	BW (kg)	Sex	
62 m ³ ⁴⁾	2002	99	13.2	F ⁵⁾	100	13.6	M ⁶⁾	0634-F69B
		115	19.8	F	115	19.9	F	0635-66B5
	2003	83	8.2	F	83	9.2	ND ⁷⁾	0636-55F8
		83	9.0	M	85	10.0	M	0634-CA9E
		90	9.7	M	90	9.6	M	0634-290F
	2004	82	8.2	F	85	8.9	F	063D-B39C
Mean±S.D. ⁸⁾		92.0±13.0	11.4±4.5		93.0±12.4	11.9±4.3		

¹⁾Year: year of purchased for broodstock. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾62 m³: volume of rearing tank. ⁵⁾F: female ⁶⁾M: male. ⁷⁾ND: no detection. ⁸⁾S.D.: standard deviation of mean.

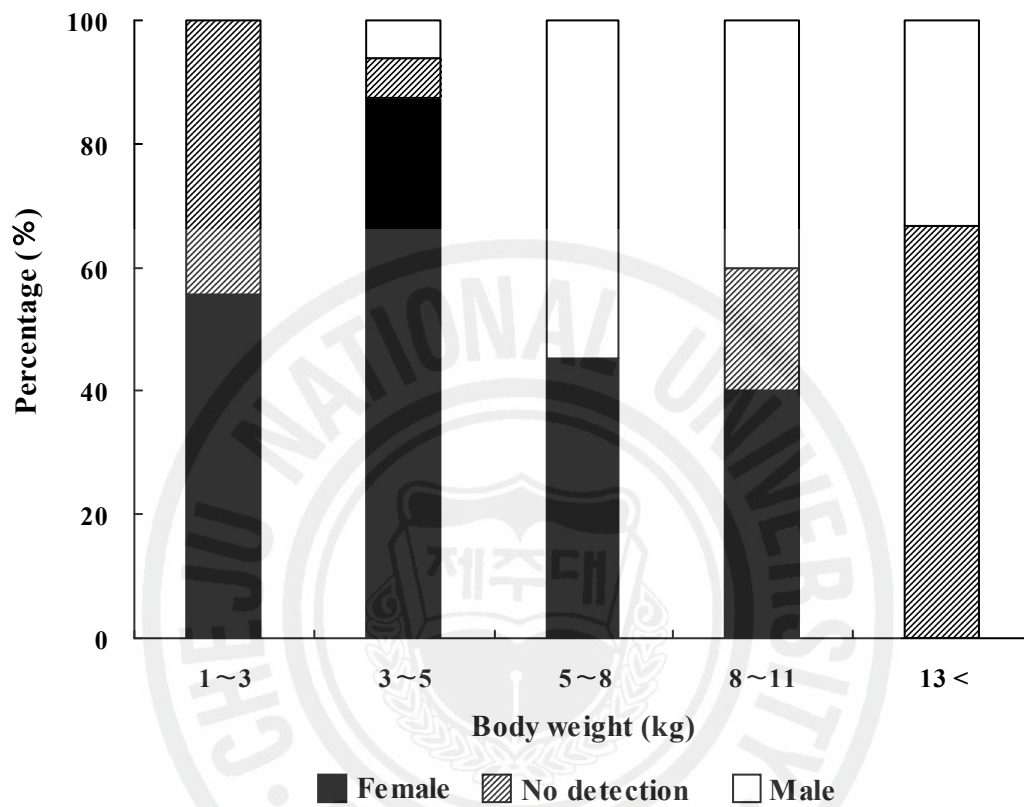


Fig. 3. Change of sex ratios on broodstock of *E. bruneus* during the rearing period.

2) 기능적 수컷유도

(1) 17 α -methyltestosterone 처리에 따른 기능적 수컷유도

2003년 3월 MT 2 mg/kg BW silastic capsule 처리에 의한 자바리 성 전환 유도에서 조직학적 관찰 결과 실험 시작시 대조구의 생식소는 대부분의 주변인기 단계의 어린 난모세포가 분포하고 있었다(Fig. 4A). MT 처리 8주 후 실험어 생식소내에는 소엽내강과 기부의 수정관에 정자무리들로 가득차 있었다(Fig. 4B). 대조구의 생식소는 시작시와 같은 주변인기 단계의 어린 난모세포들만 존재하였다(Fig. 4C). MT 처리 실험구에서 silastic capsule 삽입 14주 후에 복부를 압박하여 정액을 채정하였으며, 그리고 17일 후에 다시 채정할 수 있었다(Fig. 4D).

2003년 호르몬 처리에 의한 배정이 확인된 개체는 4마리로 기능적 수컷유도는 66.7%이었다. 2004년 silastic capsule 삽입에 의한 기능적 수컷유도는 실험어 7마리 중 5마리에서 배정이 일어났으며, 2005년에는 실험어 5마리 중 3마리에서 배정이 이루어졌다. 2006년에는 실험어 2마리 중 1마리에서 배정이 일어났다. 2003년부터 2006년까지 silastic capsule 삽입에 의한 기능적 수컷 유도는 전체 20마리의 실험어 중 13마리에서 배정되었다(Table 10).

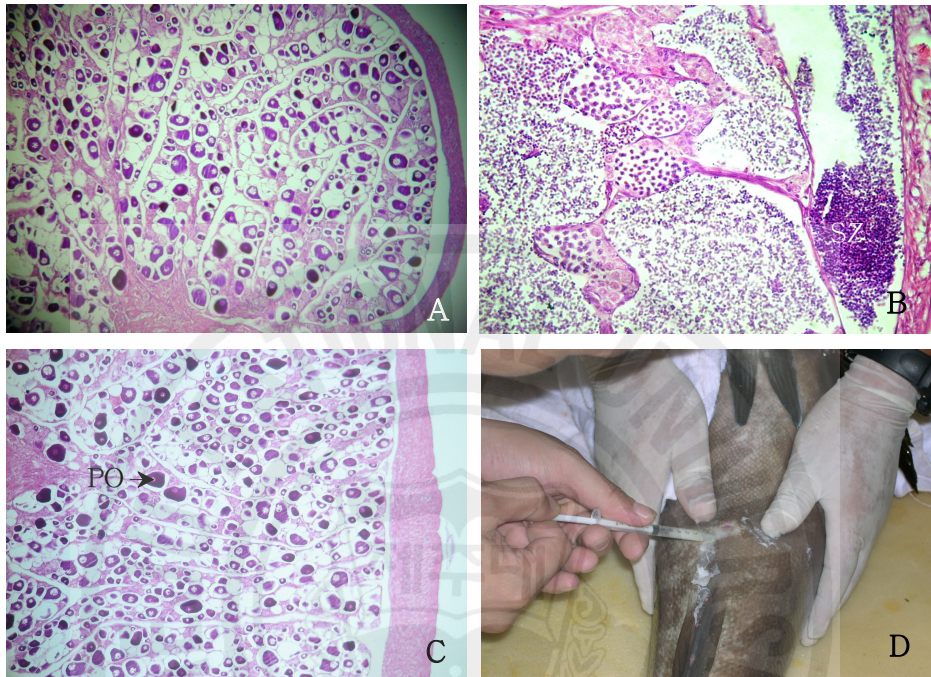


Fig. 4. Histological images of gonads of *E. bruneus* by implantation of silastic capsule with 17 α -methyltestosterone. A, Initial; B, 8 weeks later implantation; C, 8 weeks later on control fish; D, extraction of semen 12 weeks later implantation. PO, perinucleolus oocyte; SZ, spermatozoa.

Table 10. Induced spermiation of *E. bruneus* implanted with 17 α -methyltestosterone (MT 2 mg/kg BW)

Year ¹⁾	TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	MT (mg)	Spermiation	ID number
2003	50	2.6	6	Y ⁴⁾	0637-F351
	58	3.2	6	Y	0635-0030
	59	3.1	6	N ⁵⁾	0636-586F
	60	3.6	8	Y	0634-2E83
	65	4.2	8	Y	0633-AAA8
	66	3.6	8	N	0634-F4F3
2004	54	2.3	5	Y	063D-CD62
	60	3.2	6	N	0642-DFC9
	60	3.2	6	Y	0636-586F
	62	3.2	6	Y	063D-E9EE
	62	3.1	6	N	0633-4997
	63	3.5	8	Y	063D-B5DC
	68	4.3	8	Y	063D-9358
2005	63	3.4	6	N	063D-F5E4
	63	3.5	6	N	063D-AEC2
	64	4.1	8	Y	063D-E9EE
	65	4.1	8	Y	063D-B5DC
	69	3.4	6	Y	0642-DFC9
2006	59	3.3	6	Y	0634-E476
	60	3.4	6	N	063D-915D

¹⁾Year: year of MT implantation performed. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾Y: occurred of spermiation. ⁵⁾N: not occurred of spermiation.

(2) 수컷유도 개체의 암컷 복귀율

2003년부터 2005년까지의 인위적 웅성화 유도에 따른 기능적 수컷개체는 총 11마리 중 2마리에서 암컷으로 복귀하여 배란이 일어났으며, 실험기간 동안 기능적 수컷개체의 암컷 복귀율은 18.2%이었다.

2003년도 기능적 수컷유도 개체 4마리 중 1마리가 2004년도에 암컷으로 성이 복귀되었으며, 이 개체는 2006년도에 HCG 처리에 의한 배란유도가 이루어졌다. 2004년도 기능적 수컷유도 개체 5마리 중 1마리가 2005년도에 암컷으로 복귀하여 2006년에 HCG 처리에 의한 배란유도가 이루어졌다(Table 11).



Table 11. Revert to females in sex-changed males *E. bruneus* implanted with 17-methyltestosterone (MT 2 mg/kg BW)

Year	2003		2004		2005		2006		Tag No.
	Sex	BW ¹⁾ (kg)	Sex	BW (kg)	Sex	BW (kg)	Sex	BW (kg)	
2003 ²⁾	M ³⁾	1.8	F ⁴⁾	2.2	F	3.1	F	3.7	0637-F351
	M	3.2	M	3.3	M	4.0	M	4.0	0635-0030
	M	3.2	M	3.5	M	3.5	D ⁵⁾	-	0634-2E83
	M	4.2	M	5.2	M	6.6	M	8.3	0633-AAA8
2004 ²⁾			M	2.3	F	2.7	F	2.9	063D-CD62
			M	3.1	M	3.1	M	3.1	0633-4997
			M	3.2	M	3.3	ND ⁶⁾	4.2	0636-586F
			M	3.2	M	3.5	M	4.7	063D-E9EE
			M	3.5	M	4.1	D	-	063D-B5DC
			M	4.3	M	4.4	ND	5.0	063D-9358
2005 ²⁾					M	3.4	M	3.9	0642-DFC9

¹⁾BW: body weigh. ²⁾Year of MT implantation performed. ³⁾M: male. ⁴⁾F: female. ⁵⁾D: died.

⁶⁾ND: no detection.

3. 동결보존 정자의 수정 능력

1) DMSO 농도에 따른 동결정자의 수정 능력

DMSO 5.0%, 7.5%, 10.0% 농도 실험구의 수정률은 각각 $99.5\pm 0.8\%$, $99.5\pm 0.7\%$, $99.6\pm 0.6\%$ 로 대조구의 수정률 100%와 유사하여 DMSO 농도에 따른 동결정자의 수정률은 유의차가 없었다($P>0.05$, Fig. 5A).

DMSO 농도에 따른 수정란의 부화율은 대조구에서 $89.1\pm 1.4\%$ 로 다른 실험구에 비해 가장 낮았고($P<0.05$), 5.0%, 7.5%, 10.0% 실험구의 부화율은 각각 $96.2\pm 2.3\%$, $95.3\pm 3.6\%$, $96.6\pm 1.8\%$ 로 유사하였다($P>0.05$, Fig. 5B).

정상 개체율은 대조구와 DMSO 5.0% 실험구에서 각각 $98.4\pm 0.5\%$, $97.8\pm 0.1\%$ 로 유의차가 없었으며($P>0.05$), DMSO 7.5%, 10.0% 실험구는 각각 $97.2\pm 0.6\%$, $95.9\pm 0.2\%$ 로 대조구에 비해 정상 개체율이 낮았다($P<0.05$, Fig. 5C).

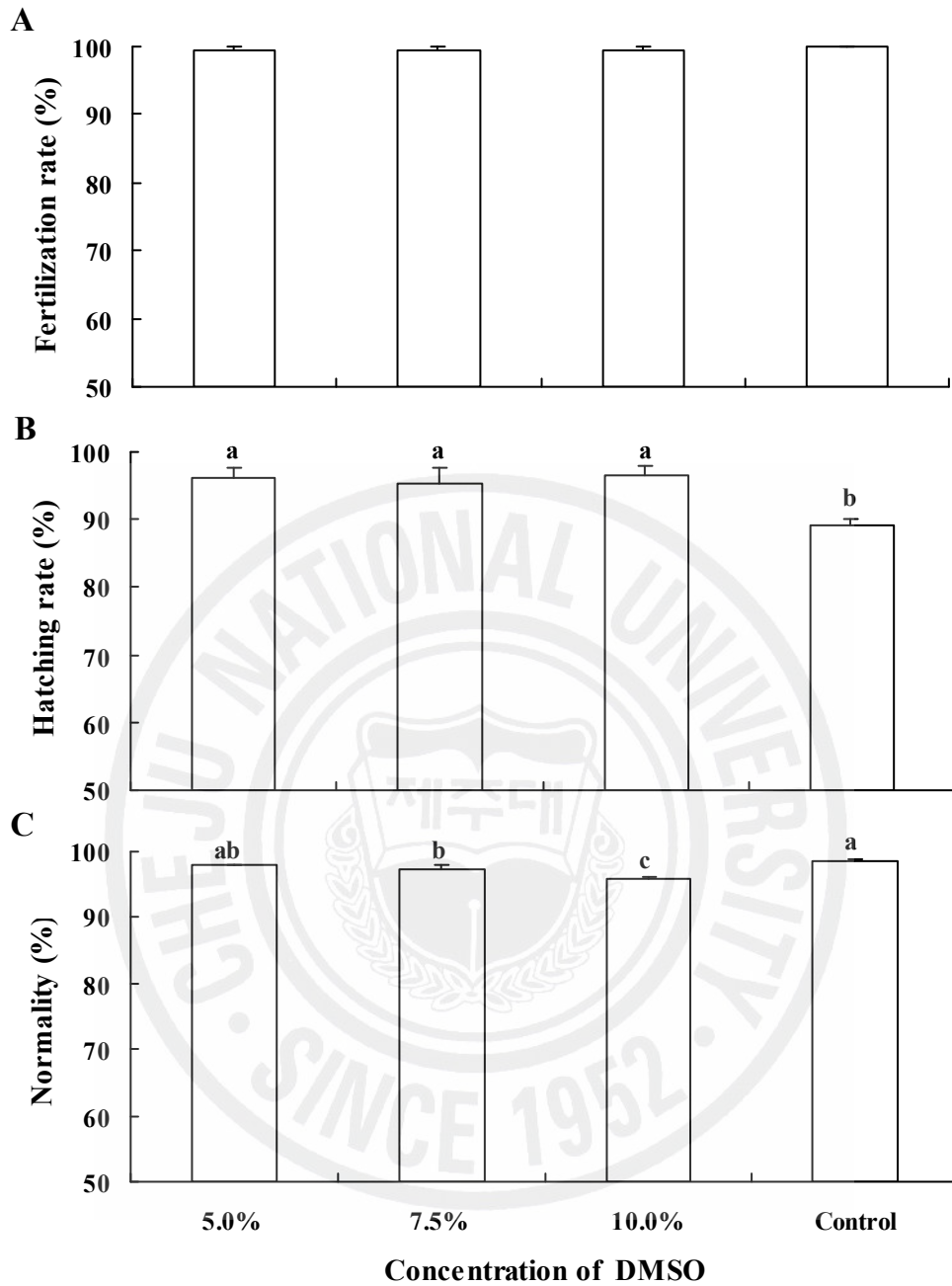


Fig. 5. Ability of fertilization of frozen-thawed semen that frozen with three DMSO concentrations levels. A, Fertilization rates; B, Hatching rates C, Normality. Small letters indicate significant differences at $P < 0.05$. Vertical bars denote standard errors of means.

2) 보존기간에 따른 동결정자의 수정 능력

동결정자 보존기간 3년, 2년, 2일에 따른 수정률은 각각 $66.8 \pm 1.8\%$, $78.5 \pm 14.8\%$, $99.6 \pm 0.6\%$ 로 2일 동결처리 실험구에서 가장 높았다($P < 0.05$). 대조구인 신선정액 실험구는 100%로 2일 실험구와 유의차가 없었다($P > 0.05$, Fig. 6A).

동결정자 보존기간에 따른 수정란 부화율은 3년, 2년 실험구에서 각각 $82.0 \pm 12.9\%$, $79.3 \pm 0.6\%$ 로 유의차가 없었으며($P > 0.05$), 2일 실험구와 대조구도 각각 $96.6 \pm 1.8\%$, $91.1 \pm 3.6\%$ 로 유사하였다($P > 0.05$). 그러나 대조구와 2일 실험구는 3년과 2년 실험구에 비해 높게 나타났다($P < 0.05$, Fig. 6B).



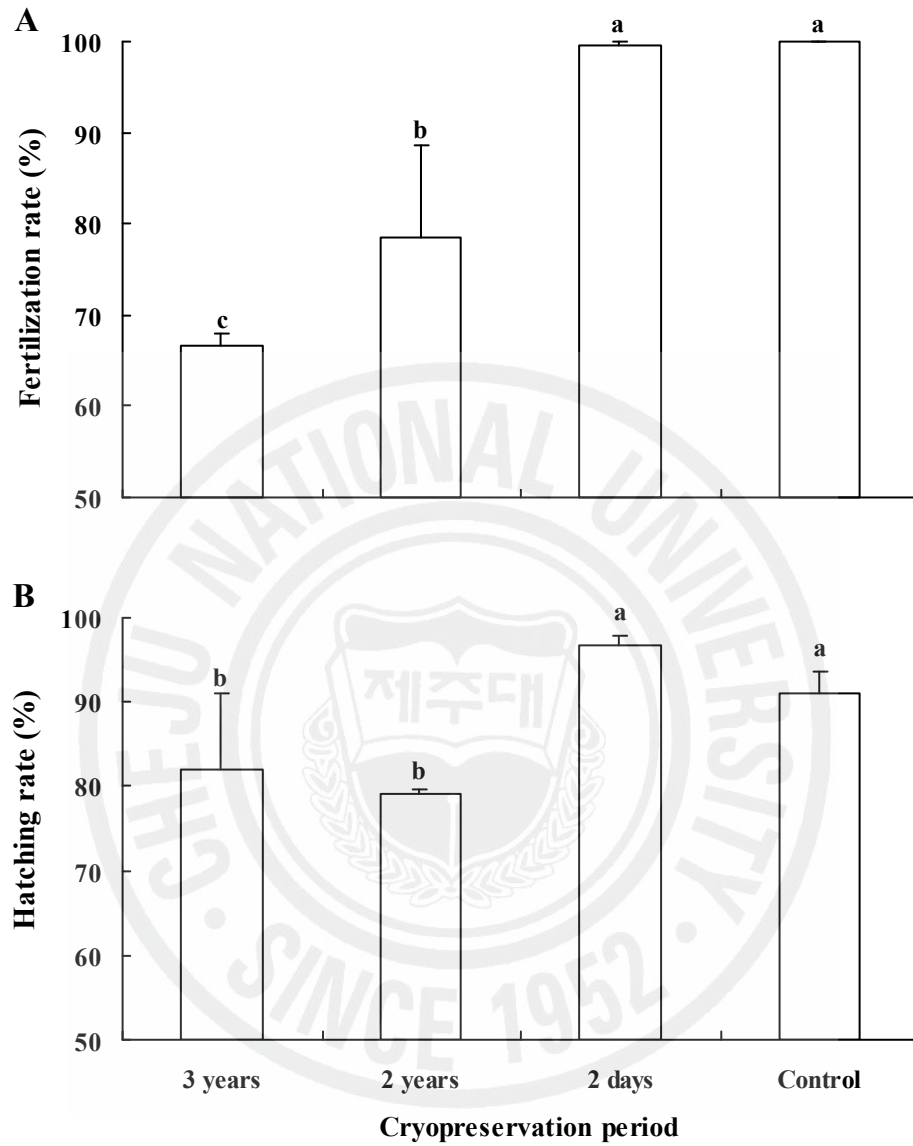


Fig. 6. Ability of fertilization of frozen-thawed semen by cryopreservation periods. A, Fertilization rate; B, Hatching rates. Small letters indicate significant differences at $P < 0.05$. Vertical bars denote standard error of means.

IV. 고 찰

성 전환

자바리는 바리과에 속하는 자성선속형 자웅동체 어종이다. 바리과 어류의 성 특성은 사육환경 조건에 따라 성이 제어된다. orange-spotted grouper *E. coioides*는 대형의 암컷을 소형의 암컷과 함께 사육하면 대형의 암컷에서 수컷으로 성 전환이 일어난다(Quinitio et al., 1997). 실내수조내에 붉바리 *E. akaara*의 암·수 성비가 같은 경우에 수컷 크기가 암컷보다 크면 암컷에서 수컷으로 성 전환이 억제되지만, 암컷과 수컷의 크기가 비슷하면 암컷이 수컷으로 성 전환이 일어난다(野上·福永, 1990).

바리과 어류에서 성 전환이 일어나는 시기는 어종에 따라 다르게 나타나는데, red grouper *E. morio*는 사육수조에서 생후 9년, 체중 11 kg 전후에서 성 전환이 일어나고, dusky grouper *E. marginatus*는 생후 9~16년, 체중 6~10 kg에 성 전환이 일어난다(Moe, 1969; Chauvet, 1988; Randall and Heemstra, 1991; Glamuzian et al., 2000). 능성어 *E. septemfasciatus*는 체중 6 kg 이상, malabar grouper *E. salmonoides*는 부화 후 5년 이상, 체중 6 kg(체장 60~70 cm) 이상에서 성 전환이 일어난다(Tang et al., 1979; Tshchihashi et al., 2003a). 붉바리 *E. akaara*는 체장 25 cm 이상, 체중 500 g 이상에서 수컷의 비율이 증가하기 시작하면서 성 전환이 일어나지만, 사육수조에 전 개체를 수컷으로 수용하여 사육할 경우 암·수 성비 불균형에 의하여 수컷에서 암컷으로 성 전환이 일어난다(Hamamoto et al., 1986; Lee et al., 1998).

이 연구에서 실내사육 자바리의 경우, 암컷에서 수컷으로 성 전환은 전장이 63~99 cm, 체중은 4.4~13.2 kg 사이에서 일어났다. 어체중에 따른 암·수 분포는 5 kg 이하의 개체 25마리 중 암컷 개체가 19마리로 대부분 암컷의 성 특성을 보였지만, 어체중 5 kg 이상의 개체 19마리 중 수컷이 9마리로 암컷에 비해 높게 나타났다. 따라서 제주산 자바리의 경우 실내 사육수조에서 성 전환이 일어나는 시기는 5 kg 이상에서 성 전환이 일어나는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 실내

수조에서 1년간 미성숙 개체 12마리(1.5~3.0 kg)를 혼합하여 사육한 경우 암컷으로 성숙된 개체가 3마리, 수컷으로 성 전환이 일어난 개체는 1마리였다. 이와 같이 자바리의 성 특성은 실내수조내 암·수 성 분포 환경에 의하여 성 전환이 조절될 수 있다는 것을 암시한다. 앞으로 실내수조에서 자바리의 성 전환 요인에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

능성어 *E. septemfasciatus*, dusky grouper *E. marginatus*와 같이 대형의 크기에서 성 전환이 일어나는 바리과 어류를 대상으로 육상수조 사육과정에서 자연적 성 전환이 일어난 수컷을 확보하기가 쉽지 않다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 소형 암컷에 옹성호르몬을 투여하여 인위적으로 성 전환을 유도하는 연구들이 진행되고 있다(Chen et al., 1977; Tukashima and Kitajima, 1983; Chao and Chow, 1990; Tsuchihashi et al., 2003a). 바리과 어류의 성 전환 유도에는 옹성호르몬인 MT가 주로 사용되며, 처리방법과 처리농도는 다양하다. 경구투여 방법을 이용한 성 전환 유도는 greasy grouper *E. tauvina*가 1년에 MT 145 mg/kg BW과 7개월에 MT 120 mg/kg BW로 처리했을 때 성 전환 되었고, 능성어 *E. septemfasciatus*는 MT 1 mg/kg BW를 1일 1회 73일간 경구투여 했을 때 성 전환이 유도되었다(Chen et al., 1977; Tukashima and Kitajima, 1983; Chao and Chow, 1990). 복강 또는 근육 내 주사방법을 이용한 성 전환 유도는 orange-spotted grouper *E. suillus*가 MT 30 mg/kg BW을 격주로 6회 주사하였을 때 성 전환이 이루어졌고, greasy grouper *E. tauvina*는 MT 0.5 mg/kg BW의 silastic capsule을 제작하여 근육에 삽입했을때 4개월 후 기능적 수컷으로 유도되었다(Chao and Lim, 1991; Tan-Fermin et al., 1994). 능성어 *E. septemfasciatus*는 MT 1.0 mg/kg BW과 4.0 mg/kg BW 농도의 silastic capsule을 복강에 삽입했을때 2개월 후에 배정이 이루어졌고, MT 1.0~2.0 mg/kg BW의 silastic capsule을 복강에 삽입했을때와 MT 0.5~2 mg/kg BW을 주사했을때 성 전환 유도가 가능하였다(Tsuchihashi et al., 2003a; Song, 2004). Honeycomb grouper *E. merra*는 산란시기에 방향화효소억제물질 fadrozole 1.0 mg/kg BW silastic capsule을 삽입한 후 24일째 기능적 수컷으로 성 전환이 이루어졌다(Alam et al. 2006).

자바리의 경우 기능적 수컷은 MT 2.0 mg/kg BW 농도의 silastic capsule을 복강 내 삽입 후 12주 쯤부터 배정되었으며, 실험기간동안 수컷유도는 총 20개체 중 13개

체에서 정액을 얻을 수 있었다. 수컷유도 개체 중 일부 개체에서 성 전환이 이루어지지 않은 이유는 MT 처리 과정에서의 silastic capsule 내의 호르몬 유출 또는 삽입과정에서 silastic capsule이 체외로 빠져나가 호르몬이 작용하지 못한 것으로 생각된다.

기능적 수컷유도로 성 전환된 개체들 중 2개체는 호르몬 처리 2~3년 후에 암컷으로 복귀하였다. 이와 같은 개체들은 대부분 미성숙 시기(1.8~2.3 kg)에 호르몬을 처리한 개체들이었다. 미성숙 시기에 MT silastic capsule을 처리한 개체에서 암컷으로의 복귀는 silastic capsule에 들어 있는 옹성호르몬이 체내에 지속적으로 작용하다가 MT가 없어지자 암컷으로 복귀된 것으로 판단된다. 이것은 MT 경구투여 또는 주사방법에 의하여 성 전환된 개체가 다음 산란시기에 수컷으로 지속되지 않고 암컷으로 복귀된다는 연구결과와 일치한다(Marino et al., 2000; Sarter et al., 2006).

동결보존 정자의 수정 능력

정자 동결보존 방법은 어류의 방란, 방정시기 및 성비의 불균형, 또는 자웅동체어에서 수컷 확보가 어려운 경우에 문제점들을 해결할 수 있는 하나의 방법이다. 정자 동결보존에는 여러 종류의 희석액과 동해방지제가 사용되고 있다(Chao et al., 1975; Bolla et al., 1987; Gwo et al., 1991; Babiak et al., 1995).

어류 정자 동결보존에 사용하기 위한 희석액은 삼투압 농도 차이가 어류의 정자 삼투압 농도와 유사하여 정자 활성을 억제해야 되고, 성분도 정장의 이온 조성과 유사해야 한다(Jamieson, 1991). Atlantic croaker *Micropogonias undulatus*의 정자 동결보존에는 NaCl, glucose 및 sucrose를 적정하게 혼합한 희석액을 사용하였고, atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*는 Mounib's solution과 해산어류 Ringer's solution을 사용하였을 때 좋은 효과가 있었다(Bolla et al., 1987; Gwo et al., 1991). Black grouper *E. malabaricus*는 150 mM NaCl과 해산어류 Ringer's solution에서 정자의 운동성이 높았다(Gwo, 1993).

바리과 어류의 정자 동결보존에 사용된 희석액으로서 능성어 *E. setemfasciatus*의 정자 동결보존에 5% glucose와 해수어류용 링거액을 사용했을 때와 신선정액을 사용한 수정란의 수정률과 부화율은 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 해수어류용 링거액의 삼투압 농도와 pH가 각각 350 mOsm/kg와 pH 7.39로 능성어 *E.*

setemfasciatus 혈장내 삼투압 농도 395 mOsm/kg, pH 7.30과 유사하였기 때문이다(Song, 2004).

동해방지제는 glycerol, DMSO와 methanol이 주로 사용되고 있다(Gwo and Arnold, 1992; Lim and Chang, 1998; Zhang et al., 2003). DMSO는 세포내로 투과속도가 빠르고, 냉동이나 해동과정에서 정자 활성화에 미치는 영향이 적어 넓치 *Paralichthys olivaceus*, turbot *Scophthalmus maximus* 등 대부분의 해산어류에 사용되고 있다(Dreanno et al., 1997; Zhang et al., 2003). Black grouper *E. malabaricus* 는 동해방지제로 20.0% DMSO를 사용했을 때 glycerol이나 methanol을 사용했을 때보다 정자 운동성이 활발하였다(Gwo, 1993). 능성어 *E. septemfasciatus*의 정자 동결보존에서도 5.0% DMSO가 난황성분이 들어있는 test yolk buffer보다 해동정자의 수정 능력이 높았다(Song, 2004).

자바리인 경우 각기 다른 DMSO 농도(5.0%, 7.5%, 10.0%)에 따른 정자 동결 후 해동 정자를 사용한 수정란의 수정률과 부화율에 있어 DMSO 농도에 따른 유의차는 없었다. 정상개체 발생률은 신선정액을 사용한 대조구의 경우 98.4%인 반면, 해동정자를 사용한 인공수정란에서의 정상개체 발생률은 97.8~95.9%로 대조구보다 낮게 나타났다. 이와 같이 해동정자를 사용한 인공수정란에서 비정상개체 발생은 정자의 동결과 해동과정에서 유전적 변화가 일어나 자어의 기형을 초래하고 있다(Julia et al., 2004; Miskolczi et al., 2005). 초어 *Ctenopharyngodon idellus*에서 DMSO의 농도에 따른 해동정자의 기형발생률은 동해방지제의 농도가 높을수록 기형 발생률이 높게 나타났으며, 이것은 동결보존에 따른 정자의 유전적 변화에 기인하는 것으로 추정하고 있다(Dang et al., 2006).

동결정자 보존기간에 따른 수정 능력은 3년 보존 실험구에서 수정률과 부화율이 각각 66.8%와 82.0%로 대조구보다 낮았으나, 다른 어종들의 신선정액을 사용한 수정률 또는 부화율 보다 높았다(Gwo, 1993; Zhang et al., 2003; Dang et al., 2006). 따라서 자바리 정자의 장기 보존 방법으로 해수어류용 링거액과 10.0% 이하의 DMSO를 사용한 동결보존 정자는 종묘생산시 인공수정용으로 사용 가능할 것으로 생각되나, 비정상 개체 발생 및 장기간 동결보존 했을 때 수정률 및 부화율이 떨어지는 문제점을 해결하기 위해서 자바리에 가장 적합한 희석액과 동해방지제에 관한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

제 2장 난 성숙 유도에 따른 채란과 수정란 및 자·치어 발달

I. 서 론

자바리의 안정적 종묘생산을 위해서는 양질의 수정란을 언제든지 충분히 확보할 수 있는 어미의 성 성숙 제어 관리가 우선되어야 한다. 어류 수정란을 확보하는 방법은 실내사육 수조에서 자연산란을 유도하는 방법과 사육환경 조절 및 호르몬 처리에 의한 채란된 난을 인공수정시켜 인위적으로 수정란을 얻는 방법으로 나눌 수 있다.

바리과 어류의 수조내 산란행동 습성은 암·수가 함께 수면 위로 솟아올라 부딪치면서 방란·방정 하는 중 특이성을 가지고 있다(濱本 等, 1986; Manabe and Kasuga, 1988; 照屋 等, 1992). 일반적으로 사육환경 조건에서 산란행동 제한은 산란된 난의 불균질로 인하여 수정률과 부화율이 낮게 나타나고 있다(Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990; Hassin et al., 1997). 이와 같이 산란된 난의 불균질한 문제점은 걱정 호르몬 처리로 배란을 유도하여 해결하고 있다. 능성어 *E. septemfasciatus*의 경우 HCG 500 IU/kg BW로 투여하여 최종 난 성숙과 배란을 유도하였다(Song, 2004).

어류의 생식주기 특성은 서식환경에 적응하는 번식 전략으로서 수온, 광주기, 조석 그리고 달주기 등에 영향을 받는다(Baek and Lee, 1985; Lim et al., 1990; Rasem et al., 1997; Lee et al., 2002). 어류 생식소의 성숙 발달을 유도하는 각각의 환경요소들은 단독 작용보다 상호 보완적으로 작용하며, 종에 따라 그 범위가 각각 다르게 나타난다(Donaldson and Hunter, 1983; Baek and Lee, 1985; Kim and Hur, 1991).

어류의 초기 발생은 자어에서 치어로 발달하는 과정에 다양한 형태적 발달 과정을 가진다. 바리과 어류의 자·치어시기 형태적 특징은 등지느러미 제2극(棘)과 배지느러미 극이 특이하게 신장, 발달하고 나서 치어로 성장하는 변태과정을 가지

고 있다(Johnson and Keener, 1984; Kitajima et al., 1991; Sawada et al., 1999; Sugama and Ikenoue, 1999). 이와 같은 종 특이적인 지느러미의 형태적 특성은 바리과 어류의 종묘생산과정에 초기 자어 사육밀도 관리에 있어 중요 요소 중의 하나가 된다.

어류 종묘생산에 있어서 상품성을 저하 시키는 원인 중에 하나가 형태이상 개체의 발생이다. 이와 같은 형태이상 개체의 정확한 발생 원인은 아직 불분명하지만 영양, 사육환경, 또는 유전학적 문제 등으로 발생한다(Paperna, 1978; Piron, 1978; Haya, 1989, Weis and Weis, 1989; Wiegand et al., 1989; Caris and Rice, 1990; Hinton et al., 1992; Cahu et al., 2003). 그리고 척추 형태이상은 부레 결손이나 부레는 형성되어 있지만 팽창되지 않는 원인으로 인하여 발생한다(Kitajima et al., 1994; Chatain, 1994; Andrades et al., 1996).

이 연구는 자연 광주기 조건에서 지하해수의 수온 특성을 이용하여 조기 성 성숙 유도 가능성을 탐색하였고, 호르몬 처리에 따른 배란유도와 인공 수정란의 난 발생, 자·치어의 형태 발달, 그리고 형태이상 개체의 골격계를 X-ray 영상과 투명골격표본을 이용하여 형태학적으로 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난 성숙과 배란 유도

1) 실험어 사육관리

자바리의 인위적 난 성숙 유도는 자연해수와 지하해수를 혼합하여 사육한 혼합수 실험구와 조기 성 성숙 유도를 위하여 지하해수만을 이용하여 사육한 지하해수 실험구로 설정하였다. 혼합수 실험구는 2004년 10월부터 2005년 6월까지 겨울철 먹이 섭식을 원활히 하고, 일정 수온($16.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$) 이상을 유지하기 위한 모래여과된 자연해수와 제주도 지하해수($17 \sim 18^\circ\text{C}$)를 혼합한 해수를 이용하여 사육하였다. 지하해수 실험구는 2005년 12월부터 2006년 4월까지 제주도 지하해수만을 이용하여 사육하였다.

혼합수 실험구 실험어는 24마리로서 전장 $62 \sim 99$ cm(평균 70.9 ± 9.9 cm), 체중 $3.1 \sim 13.2$ kg(평균 5.4 ± 2.6 kg) 이었다. 지하해수만을 이용한 성 성숙 유도 실험어는 모두 16마리로서 전장 $52 \sim 67$ cm(평균 59.3 ± 4.2 cm), 체중 $2.9 \sim 4.8$ kg(평균 3.5 ± 0.5 kg) 이었다.

실험어 관리는 유수식(12~16회전/일)으로 사육하였으며, 사육수온은 매일 오전 10시에 수온염분측정기기(560YMD YSI, USA)를 이용하여 측정하였다. 광주기는 자연조건의 광주기를 이용하였다.

2) cannulation을 이용한 난 성숙도 조사

자바리의 생식소 발달 상태를 확인하기 위한 난모세포의 성숙도 조사는 혼합수 실험구와 지하해수 실험구의 실험어를 cannulation 방법으로 조사하였다. 실험어는 2-phenoxyethanol 300 ppm에서 마취하여 생식공 내 cannula 삽입이 가능한 개체를 대상으로 자체 제작한 내경 1.0 mm, 외경 2.0 mm인 폴리에틸렌 재질의 튜브를 이용하여 생식소 내 난모세포를 채취하였다(Fig. 7).

난모세포의 크기 측정은 cannulation에 의해 채취된 각 개체의 생식소내 난모세포들을 profile projector에 투영시킨 후 digimatic vernier caliper (CD-20C, Japan)로 측정하였다.

3) HCG 처리에 따른 난 성숙과 배란 유도

난모세포의 최종 성숙과 배란은 혼합수 실험구와 지하해수 실험구 실험어 중 cannulation이 가능한 개체를 대상으로 호르몬을 처리하여 유도하였다(Fig. 7). 호르몬 처리는 HCG를 생리식염수에 용해 후 500 IU/kg BW로 실험어 등 근육 제1극조 아래 1 cm 부분에 1회 주사하였다(Table 12, 13). 호르몬 주사 후 48시간 이후 복부를 강하게 압박하여 배란된 난을 인위적으로 채란하였다.





Fig. 7. Serial view images of cannulation with HCG injection. A, Anesthetization; B, Measuring and identification; C, Cannulation; D, HCG (500 IU/kg BW) injection.

Table 12. Fish size and dosage of HCG for ovulation induction in the mixing seawater group

TL ¹⁾ (cm)	BW ²⁾ (kg)	Dosage of HCG ³⁾	ID. Tag No
62	3.1	1,500 IU	063D-E6C4
64	3.6	1,800 IU	0643-66BB
64	4.3	2,100 IU	0634-EEEC
65	4.1	2,000 IU	063D-9AD9
65	4.4	2,200 IU	0633-3A73
65	4.5	2,200 IU	063D-85E2
66	4.0	2,000 IU	0634-4BEF
67	4.6	2,300 IU	063D-95FF
72	4.6	2,300 IU	0634-CD67
73	6.2	3,100 IU	0633-B2A3
74	5.6	2,800 IU	0634-34B3
75	5.3	2,600 IU	0636-5863
82	8.2	4,100 IU	063D-B39C
99	13.2	6,600 IU	0634-F69B
70.9±9.9 ⁴⁾	5.4±2.6		

¹⁾TL: total length. ²⁾BW: body weight. ³⁾Injection HCG 500 IU/kg of body weight. ⁴⁾Mean±standard deviation of mean.

Table 13. Fish size and dosage of HCG for ovulation induction in the underground seawater group

TL ¹⁾ (cm)	BW ²⁾ (kg)	Dosage of HCG ³⁾	ID. Tag No.
52	3.0	1,500 IU	063D-8E1C
56	3.6	1,800 IU	063D-B5D9
57	3.2	1,600 IU	063D-CD62
57	2.9	1,400 IU	0642-F243
58	3.0	1,500 IU	063D-BAFA
59	3.3	1,600 IU	0634-E476
59	3.8	1,900 IU	0643-3603
60	3.3	1,600 IU	063D-A16E
60	3.5	1,700 IU	063D-9A68
60	3.6	1,800 IU	063D-F2CC
60	3.7	1,800 IU	0637-F351
62	3.2	1,600 IU	0643-37D0
64	3.5	1,700 IU	063D-97CA
66	3.8	1,900 IU	063D-8BC0
67	4.8	2,400 IU	063D-E9EE
59.3±4.2 ⁴⁾	3.5±0.5		

¹⁾TL: total length. ²⁾BW: body weight. ³⁾Injection HCG 500 IU/kg of body weight. ⁴⁾Mean±standard deviation of mean.

2. 채란과 부화

1) 채란과 수정

인공수정은 HCG 호르몬 처리에 의해 채란된 난 500 g과 MT 처리로 유도된 수컷 및 실내사육수조에서 자연적 성 전환된 수컷에서 얻은 정액을 0.2~0.5 mL 비율로 혼합한 후 해수를 조금씩 첨가하였다. 수정된 수정란은 20 L 수조에 넣고 약 1시간 경과 후 부상란만을 수거하여 1.0 ton 유수식 수조에 설치된 네트(직경 70 cm, 높이 80 cm)에 수용하였다(Fig. 8).

수정란의 난경은 수정 2시간 후 부상란 100개를 profile projector에 투영시킨 후 digimatic vernier caliper로 측정하였다. 각 개체별 수정률은 수정란 100개 중 정상발생중인 수정란을 계수하여 구하였다.

2) 난 발생

인공수정 후 수정란의 난경 및 유구경 그리고 시간 경과에 따른 발생 과정을 조사하였다. 실험구는 22.0°C와 25.0°C로 설정하였으며, 광학현미경과 만능투영기를 이용하여 관찰하였다. 수정후 발생속도는 2세포기, 16세포기, 포배기, 배체형성, Kuffer's vesicle 출현 및 안포출현 배체형성까지 각 발생단계가 50% 이루어졌을 때를 기준으로 하였다. 수정란은 1 L 비이커에 수용하여 3반복 실험하였다.

3) 염분에 따른 부화율

염분에 따른 수정란의 특성을 조사하기 위하여 정상해수(34.0 psu)와 28.0 psu, 24.0 psu, 18.0 psu 해수를 제조하여 염분에 따른 수정란의 부화율에 미치는 영향을 조사하였다. 수정란은 각 실험구별로 100 mL 비이커에 50개의 수정란을 수용하였으며, 염분에 따른 부화율의 유의성 검정은 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

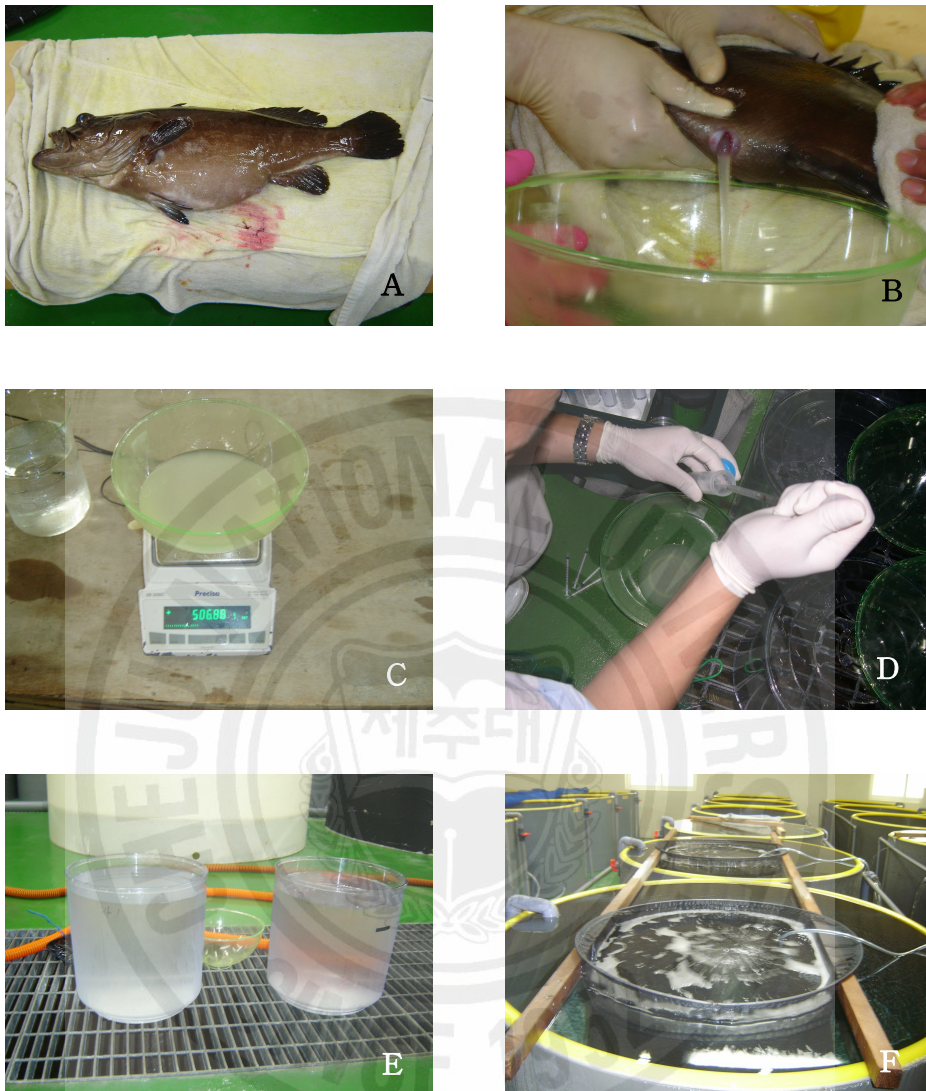


Fig. 8. Serial view images of artificial ovulation and fertilization. A, Anesthetized mature female; B, Egg stripping; C, Eggs weighting; D, Fertilization (1×10^6 eggs and 0.2~0.5 mL by semen); E, Collection of floating eggs after fertilization; F, Floating eggs for hatching.

3. 자·치어 형태 발달

1) 자·치어 발달

자·치어의 형태발달은 부화 직후부터 성체의 형태를 나타내는 부화 후 92일까지 3~5일 간격으로 10마리 내외의 자어를 MS 222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma Co., USA)에 마취시킨 후, profile projector로 측정하였다.

(1) 난황흡수와 개구시간

자바리 자어의 난황 흡수율 및 개구시간은 항온항습실을 이용하여 수온 22.0±0.5℃ 조건에서 조사하였다. 난황흡수율은 20 L의 아크릴 수조에 2,000~3,000개의 수정란을 수용한 후 부화된 자어를 대상으로 조사하였다. 난황 및 유구의 흡수는 사육중인 자어를 대상으로 24시간 간격으로 5~10마리씩을 표본 추출하여 MS 222로 마취시킨 후, profile projector로 측정하였다. 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 계산하였다.

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

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

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

(2) 부화자어의 전장과 입 크기

자어의 입 크기(d)는 자어의 상악장 크기(UJL, Upper jaw length)를 기준으로 설정한 Shirota (1970)의 방법에 따라 $d = \sqrt{2} \times UJL$ 의 식으로 구하였다. 자어의 전장과 상악장 및 항문장 크기는 부화 후 24시간 간격으로 10마리 내외의 자어를 MS 222에 마취시킨 후, profile projector로 측정하였다.

입 크기는 Shirota (1970)의 방법에 따라 자어의 개구각 90°, 45°, 0°를 각각 100, 50, 0%의 개구율로 가정할 때 개구율이 100%, 75%, 50%일 때의 입 크기를 각각 d, 0.75d, 0.5d로 구하였다.

(3) 등지느러미와 배지느러미 극(棘)

등지느러미와 배지느러미 극 변화는 변태를 시작하는 부화 후 11일부터 변태 완료시기인 부화 후 48일까지 3~5일 간격으로 10마리 내외의 자어를 MS 222에 마취시킨 후, profile projector로 측정하였다.

2) 이형 발달

(1) 실험어

형태이상 개체의 형태학적 조사는 부화 후 50일 이상된 인공산 자바리 치어 중 외부 형태이상을 보이는 600마리를 대상으로 목덜미(nape) 부분의 함몰, 등지느러미 부분의 함몰, 복부의 돌출 또는 함몰 그리고 척추골 형태이상 등 육안적으로 구분하였다. 외부 형태이상 구분은 목덜미, 복부, 척추 중 어느 한 부분이 형태이상인 단일형과 2개소 이상인 복합형으로 구분하였다.

(2) 조사방법

복합적으로 형태이상이 발생된 개체 중 41마리를 무작위로 선별하여 X-ray 투과영상기(KXO-50G, Toshiba, Japan)를 이용한 X선 조사와 투명골격표본을 제작하여 골격계 이상 유무를 조사하였다.

투명골격표본 제작은 Williams (1941)의 방법을 응용하여 골격표본을 제작하였다. 골격염색은 먼저 포르말린에 고정된 표본을 개체 식별을 위하여 표본에 라벨 부착 후 흐르는 물에 1일간 수세하였다. 수세 후 표본은 전처리 과정으로서 비늘, 내장 등을 제거하였다. 이후 표본은 1차적으로 연골염색을 실시하였다. 연골염색은 연골염색시약(70 mL Ethanol + 30 mL Acetic acid + Alcian blue 20 mg)으로 6~12시간 실시하였다. 연골염색이 끝난 표본은 포화 Boric acid에서 중화시키고 나서 5% KOH 용액에 넣어 5~7일간 1차 투명화 과정을 진행하였다. 이후 경골염색용 시약(5% KOH+Alizarin red 적량)으로 12~48시간 경골염색 후 0.5% KOH 수용액으로 완전 투명화 과정을 진행시키고 나서 글리세린으로 치환하여 보존하였다. 투명골격 표본은 해부현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 골격 이상 유무를 조사하였다.

형태이상 개체를 대상으로 척추골의 수와 등지느러미와 뒷지느러미의 기초수

를 조사하였다. 또한 형태이상 개체의 골격계 조사는 중추골격 중 척주(vertebral column)의 형태이상 및 부속지골격 중 등지느러미와 뒷지느러미의 담기골 형태이상을 조사하였다. 특히, 척주 형태이상으로는 척주만곡, 척추골 유착, 신경극(neural spine) 및 혈관극(haemal spine)의 만곡 등을 조사하였다. 척주를 척주 전반부(척추골 1~8), 척주 중반부(척추골 9~16), 그리고 척주 후반부(척추골 17~24)의 3부분으로 구분하여 형태적 이상 유무를 조사하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 난 성숙과 배란 유도

1) 실험어 사육관리

자연조건에서 성 성숙 유도 및 배란을 유도하기 위하여 모래여과된 자연해수와 지하해수를 일정 비율로 혼합한 혼합수를 유수식으로 사육한 혼합수 실험구의 수온은 15.9~22.8℃(평균 17.6±2.0℃)이었으며, 월 평균 최저 수온은 2005년 1월에 16.2℃, 최고 수온은 2004년 10월에 19.7℃이었다(Fig. 9).

2005년 12월부터 2006년 4월까지 지하해수를 단독으로 이용하여 유수식으로 사육한 지하해수 실험구의 수온은 17.0~22.7℃(평균 17.4±1.6℃)이었으며, 월 평균 최저 수온은 2006년 1월에 17.4℃, 최고 수온은 2005년 10월에 21.8℃이었다(Fig. 10).

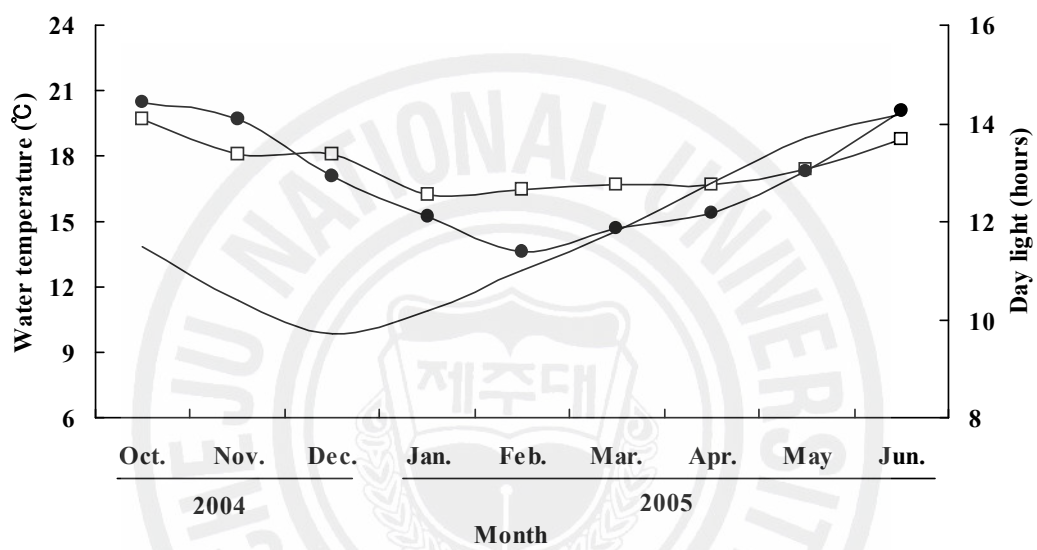


Fig. 9. Monthly changes of rearing water temperature and photoperiod of mixing seawater group. (—□—), Natural-and-underground mixing seawater temperature; (—●—), Natural seawater temperature; (—), photoperiod.

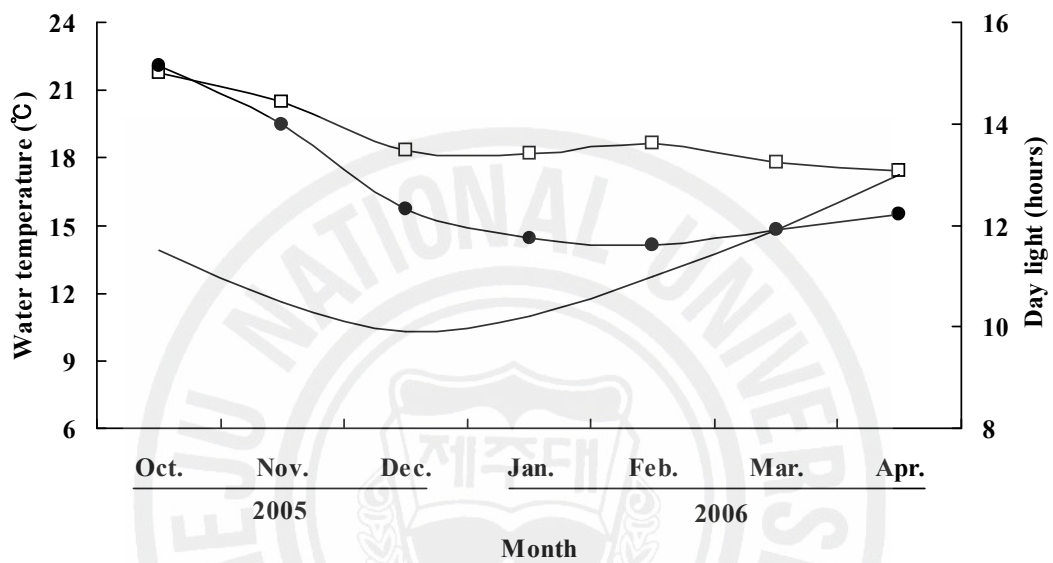


Fig. 10. Monthly changes of rearing water temperature and photoperiod of underground seawater group. (-□-), underground seawater temperature; (-●-), Natural seawater temperature; (-), photoperiod.

2) cannulation을 이용한 난 성숙도 조사

혼합수 실험구의 경우 2005년 3월 29일에 cannulation 방법에 의한 생식소 발달을 조사한 결과 조사 개체 5마리 모두 cannulation을 할 수 없었다. 그러나 6월 20일의 생식소 발달을 조사한 결과 24개체 중 14개체에서 cannulation이 가능하였으며, 난모세포의 평균 크기는 277~520 μm 이었다. Cannulation이 가능한 개체의 난모세포 분포는 400 μm 이하의 난모세포를 가지는 개체가 21.4%, 400~600 μm 사이의 난모세포를 가지는 개체가 11개체로 78.6%이었다(Table 14).

지하해수 실험구의 경우 2006년 3월 15일 cannulation에 의한 생식소 발달을 조사한 결과는 5마리 중 3마리에서 cannulation이 가능하였으며, 난모세포의 평균크기는 462~480 μm 이었다. 2006년 4월 25일의 성 성숙도 조사 결과는 15마리 중 10마리에서 cannulation이 가능하였으며, 난모세포의 평균크기는 421~520 μm 이고, 난모세포의 크기 분포는 400~600 μm 사이의 난모세포를 갖는 개체가 100%이었다(Table 14).

Table 14. Distribution of oocytes size by cannulation in mixing and underground seawater groups of *E. bruneus*

Experimental group	Date	Number of fish	NICP ¹⁾	Distribution of oocyte size (%)			
				200-299 μm	300-399 μm	400-499 μm	500-599 μm
Mixing seawater	Mar. 29	5	0	-	-	-	-
	Jun. 20	24	14	7.1	14.3	42.9	35.7
Underground seawater	Mar. 15	5	3	0	0	100	0
	Apr. 25	15	10	0	0	70.0	30.0

¹⁾NICP: Number of individual of cannulation performed.

3) HCG 처리에 따른 난 성숙 및 배란 유도

(1) 혼합수에서의 난 성숙 및 배란 유도

2005년 6~7월 사이에 cannulation이 가능한 실험어 14마리(평균 난경 277~520 μm)에 HCG 500 IU/kg BW 농도로 등 근육에 1회 주사 후 48시간 이후의 배란 유도 결과는 14마리 중 9마리에서 배란이 일어나 평균 배란율이 64.3%이었고, 배란된 난의 부상률은 50.3~84.7%(평균 69.1 \pm 5.6%)이었다(Table 15).

(2) 지하해수에서의 난 성숙 및 배란 유도

2005년 12월부터 지하해수만을 이용하여 사육한 실험구의 실험어 15마리 중 2006년 4월에 cannulation이 가능한 10마리(평균 난경 421~520 μm)를 대상으로 HCG 500 IU/kg BW 농도로 등 근육에 1회 주사 후 48시간 이후의 배란 유도 결과는 7마리에서 배란이 일어나 평균 배란율은 70.0%이었고, 배란된 난의 부상률은 61.2~97.0%(평균 84.4 \pm 4.3%)이었다(Table 16).

(3) 적정 호르몬 처리 시기

생식소내 난모세포의 크기가 각각 다른 개체에 HCG 500 IU/kg BW 농도로 투여할 경우 48시간 이후 400 μm 이하의 난모세포를 가지는 개체에서는 배란이 전혀 이루어지지 않았지만, 400 μm 이상의 난모세포를 가지는 개체에서는 정상적으로 배란이 이루어졌다(Fig 11).

Table 15. Composition of oocyte size in ovary before HCG injection and ovulated egg with HCG injection in mixing seawater¹⁾ cultured broodstock in 2005

Date	TL ²⁾ (cm)	BW ³⁾ (kg)	OSB ⁴⁾ (μ m)	Striped eggs after HCG (500 IU/kg BW) injection			ID Number
				WOE ⁵⁾ (g)	WFE ⁶⁾ (g)	Floating rate (%)	
Jun. 22	62	3.1	459±97.3	182	91	50.3	063D-E6C4
	64	3.6	503±22.7	240	166	69.2	0643-66BB
	64	4.3	498±21.1	283	183	64.7	0634-EEEC
	65	4.1	277±85.6	0	-	-	063D-9AD9
	65	4.4	510±35.5	866	528	61.0	0633-3A73
	65	4.5	520±33.1	668	406	60.8	063D-85E2
	66	4.0	457±32.0	0	-	-	0634-4BEF
	67	4.6	473±36.0	0	-	-	063D-95FF
	72	4.6	450±42.3	196	196	84.7	0634-CD67
	72	5.6	505±49.1	1,005	839	83.5	0634-34B3
	73	6.2	501±23.6	542	418	77.1	0633-B2A3
	75	5.3	386±51.9	0	-	-	0636-5863
	82	8.2	456±24.9	403	286	71.0	063D-B39C
	99	13.2	358±66.7	0	-	-	0634-F69B

¹⁾Mixing seawater: natural seawater-and-underground seawater mixed. ²⁾TL: total length. ³⁾BW: body weight. ⁴⁾OSB: oocyte size in ovary before HCG injection. ⁵⁾WOE: weight of ovulate egg. ⁶⁾WFE: weight of floating egg.

Table. 16. Composition of oocyte size in ovary before HCG injection and ovulated egg with HCG injection in underground seawater cultured broodstock in 2006

Date	TL ¹⁾ (cm)	BW ²⁾ (kg)	OSB ³⁾ (μ m)	Eggs striped after HCG (500 IU/kg BW) injection			ID Number
				OEW ⁴⁾ (g)	FEW ⁵⁾ (g)	Floating rate (%)	
Apr. 27	52	3.0	518 \pm 39.5	200	170	85.0	063D-8E1C
	56	3.6	520 \pm 42.8	178	166	93.3	063D-B5D9
	57	3.2	495 \pm 47.8	121	100	82.6	063D-CD62
	58	3.0	520 \pm 38.1	184	156	84.8	063D-BAFA
	59	3.8	455 \pm 94.0	230	223	97.0	0643-3603
	60	3.3	496 \pm 65.2	536	328	61.2	063D-A16E
	60	3.5	468 \pm 69.2	0	-	-	063D-9A68
	60	3.6	432 \pm 64.6	0	-	-	063D-F2CC
	60	3.7	487 \pm 52.6	372	324	87.1	0637-F351
	62	3.2	421 \pm 66.2	0	-	-	0643-37D0

¹⁾TL: total length. ²⁾BW: body weight. ³⁾OSB: oocyte size in ovary before HCG injection. ⁴⁾OEW: weight of ovulate egg. ⁵⁾FEW: weight of floating egg.

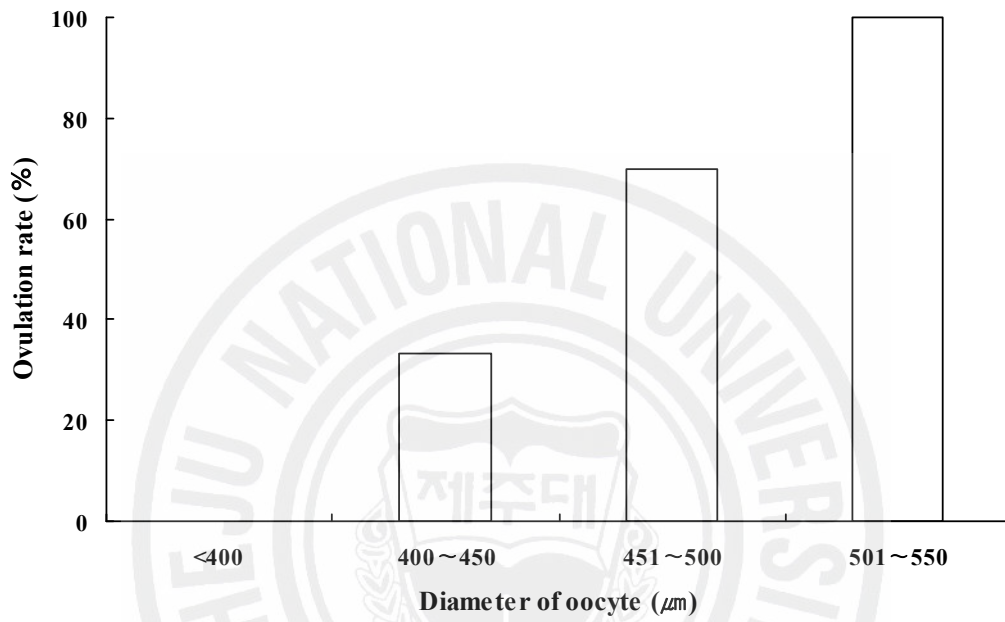


Fig. 11. Comparison of ovulation rates with HCG 500 IU/kg BW injection by different oocyte sizes in ovary.

2. 채란과 부화

1) 채란과 수정

혼합수를 이용하여 사육한 실험어 24개체 중 2005년 6월 22일에 9개체에서 배란된 난의 부상란은 3,113 g으로 개체당 평균 부상란은 345.9 ± 233.2 g이었으며, 배란된 난의 인공수정률은 74.1~96.2%(평균 87.1%)이었다(Table 17). 지하해수만을 이용하여 사육한 실험어 15개체 중 2006년 4월 27일에 7개체에서 배란된 난의 부상란은 1,467 g으로 개체당 평균 부상란은 209.6 ± 87.2 g이었으며, 배란된 난의 인공수정률은 78.3~95.2%(평균 90.2%)이었다(Table 17).

2) 난 발생

자바리의 수정란은 무색투명한 분리부성란이고, 보통 1개의 유구를 가지고 있으며, 수정란의 평균 크기는 $906.5 \pm 27.5 \mu\text{m}$ ($n=100$)이다(Fig. 12A). 그리고 유구의 평균 크기는 $234.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ ($n=100$)이다(Fig. 12B).

인공수정에 의한 자바리의 난 발생은 수온 $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 인공수정 직후 좁은 위란장이 생기면서 배반이 형성되기 시작하고, 수정 후 1시간 만에 배반이 동·식물극을 축으로 둘로 나뉘어지면서 제 1난할이 시작되어 2세포기에 이르렀고(Fig. 13A), 수정 3~4시간 후 16세포기에 이르렀다(Fig. 13B). 수정 후 12시간이 경과되었을 때 포배기에 이르면서 배반엽이 융기되기 시작하여 점점 넓어지면서 난황을 덮기 시작하였고, 차츰 난황을 덮어씌우면서 배환이 형성되기 시작하였다(Fig. 13C). 수정 후 27시간이 지나면서 두부가 발달하면서 안포가 형성되고, 근절이 형성되었다(Fig. 13D). 수정 후 30시간이 경과하였을 Kuffer's vesicle이 출현하였으며(Fig. 13E), 38시간 전후에 안구와 이포형성이 관찰되고, 배체의 움직임이 시작되면서 심장박동이 관찰되었다(Fig. 13F). 부화는 45시간 전후에 시작되었으며, 부화자어의 평균 크기는 2.02 ± 0.02 mm이었다(Fig. 13G).

3) 염분에 따른 부화율

수온 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 각각의 염분 농도에 따른 수정란의 부화 시간은 정

상해수(34 psu)와 28 psu, 24 psu, 18 psu 실험구간에 유의차가 없었다($P>0.05$). 부화율은 정상해수에서 $96.7\pm 1.3\%$ 이었으며, 28 psu, 24 psu, 18 psu 실험구에서는 $97.3\pm 0.7\%$, $95.3\pm 0.7\%$, $92.7\pm 1.8\%$ 이었다. 염분 농도에 따른 부화율은 저염분 실험구로 갈수록 비교적 낮았으나 실험구간에 유의차는 없었다($P>0.05$, Fig. 14).



Table 17. Induced ovulation and fertilization on *E. bruneus* broodstock

Experimental group	Date	Number of fish	TL ¹⁾ (cm)	BW ²⁾ (kg)	Floated eggs (g)		Fertilized eggs	
					Total	Mean±S.D.	Number	Rates (%)
Mixing seawater	Jun. 22 2005	9	62~82	3.1~8.2	3,113	345.9±233.2	6,226,000	87.1±8.4
Underground seawater	Apr. 27 2006	7	52~60	3.0~3.8	1,467	209.6 ± 87.2	2,934,000	90.2±6.5

¹⁾TL: total length. ²⁾BW: body weight. ³⁾Total weight of ovulate egg - weight of sunken egg.

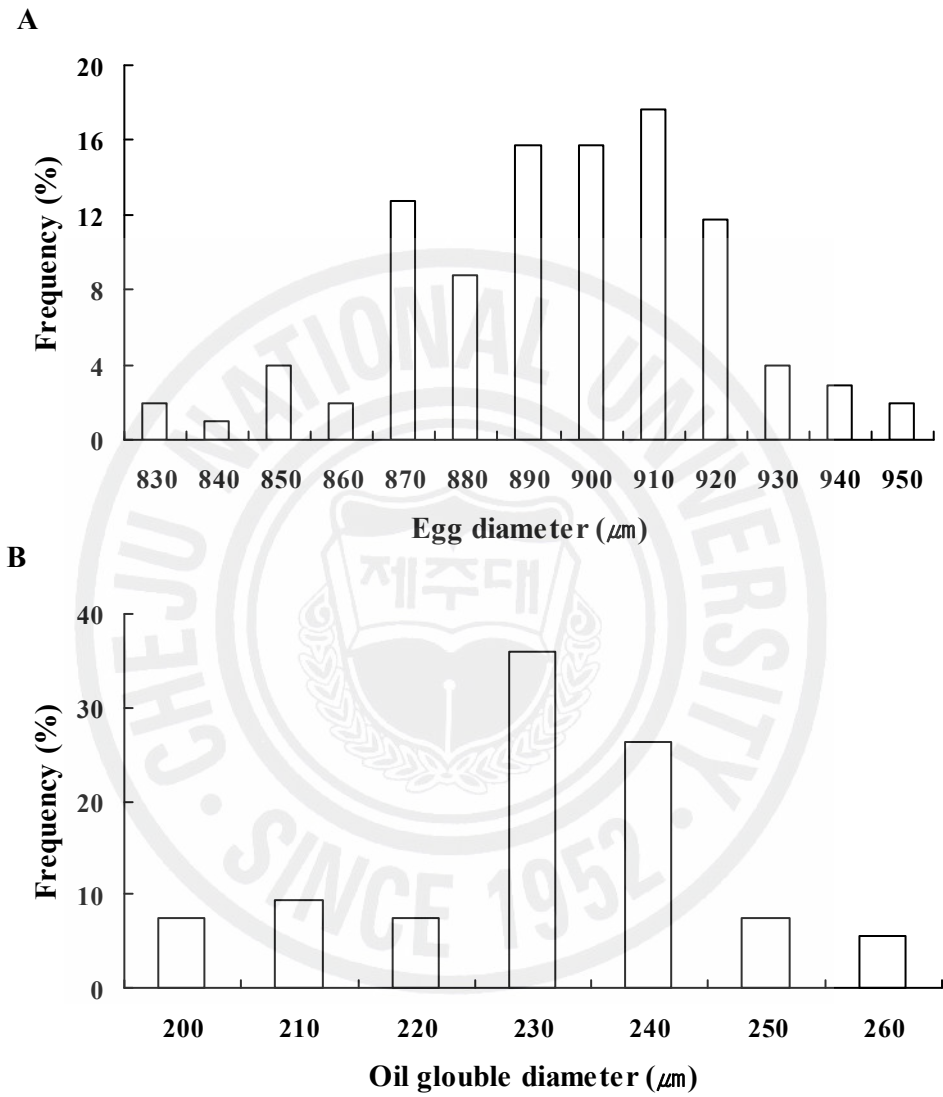


Fig. 12. Distributions of egg and oil globule diameters in *E. bruneus*. A. egg diameters; B, oil globule diameters.

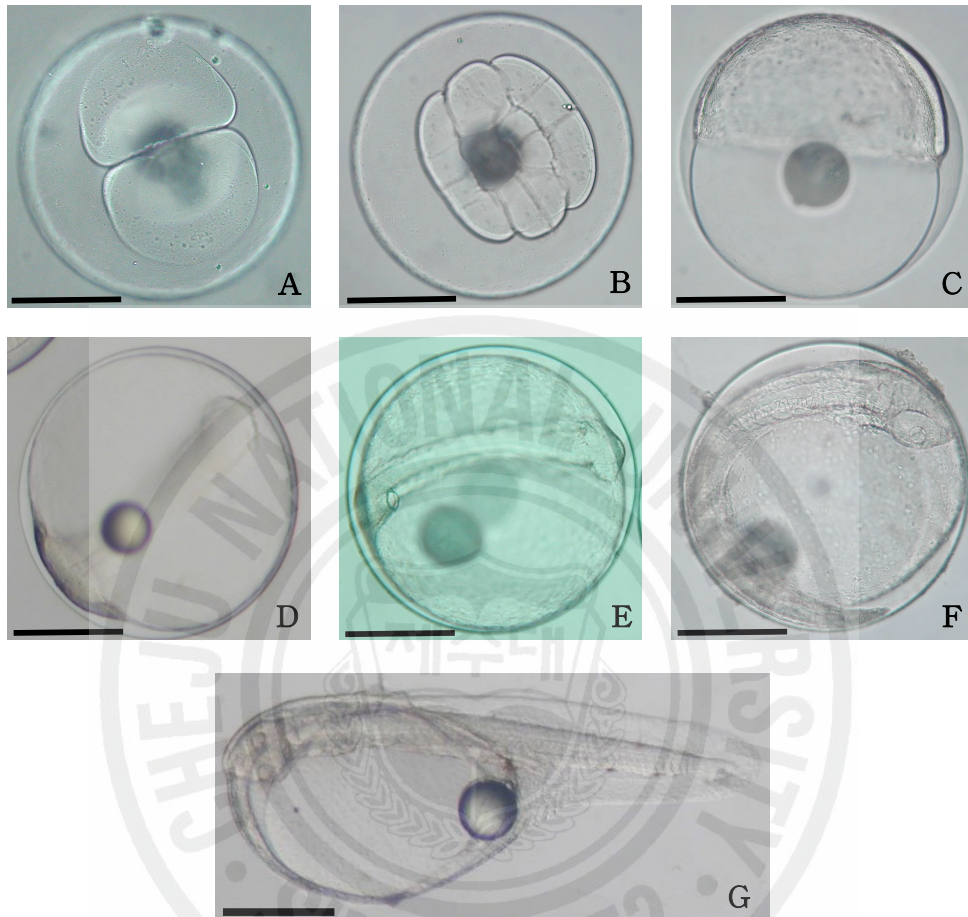


Fig. 13. Embryonic development in *E. bruneus*. A, 2-cell stage; B, 16-cell stage; C, Gastrula stage; D, Embryo formation; E, Appearance of Kupffer's vesicle; F, Formation of lens and ear vesicle; G, Newly hatched larve. Scale bar = 400 μm

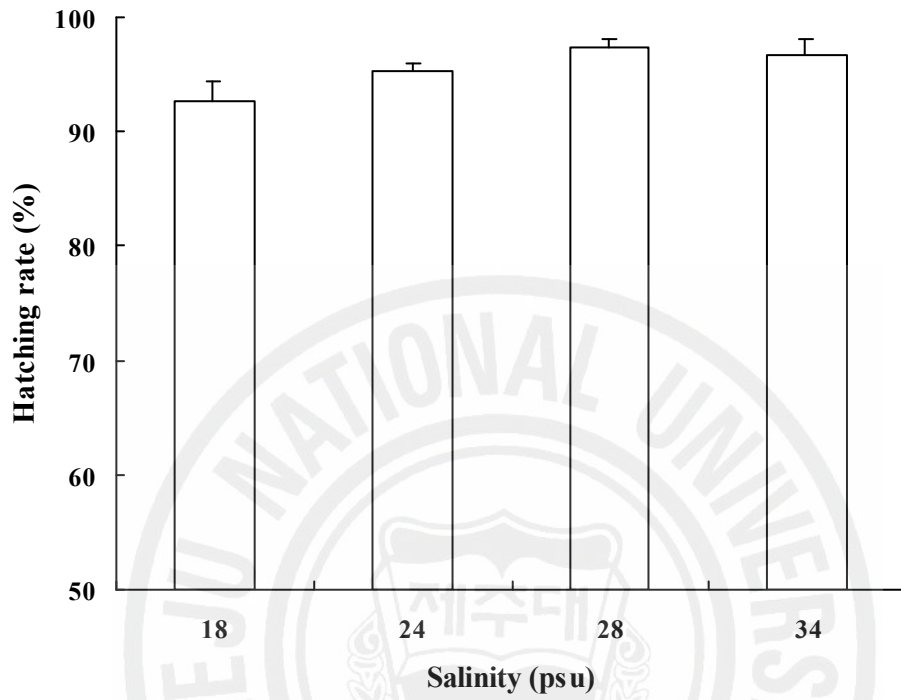


Fig. 14. Comparison of hatching rates of fertilized eggs in *E. bruneus* under four different salinity concentrations. Vertical bars denote standard errors of means.

3. 자·치어 형태 발달

1) 자·치어 발달

부화 후 0~1일: 유구는 난황의 끝부분, 항문은 난황에서 약간 떨어진 몸의 중앙보다 뒤에 위치하고, 꼬리부분 중앙의 등과 복부면에 흑색소포가 있다. 막지느러미를 가지는 몸측 전면은 포상의 과립으로 덮여있다. 부화자어는 대부분 수표면 근처에서 분산 유영하고, 머리를 아래쪽으로 향하여 정지상태를 유지하다가 순간적으로 빠르게 유영하는 행동을 보였다(Fig. 15A).

부화 후 3~5일: 난황과 유구가 완전하게 흡수되었다. 입이 개구되고, 항문이 열렸으며, 안구에 흑색 색소포가 침적되었다(Fig. 15B).

부화 후 11일: 등지느러미 제2극과 배지느러미 극이 출현하였다(Fig. 15C).

부화 후 30일: 후기 자어시기에 등과 꼬리지느러미의 기초적인 줄기가 형성 발달하기 시작하였다(Fig. 15D).

부화 후 50일 전후: 지느러미 분화가 완료되고, 체색이 형성되어 변태 단계를 끝내고, 자어에서 치어의 형태로 변하였다(Fig. 15E).

부화 후 90일 전후: 성체의 모습과 동일한 형태를 나타냈다(Fig. 15F).

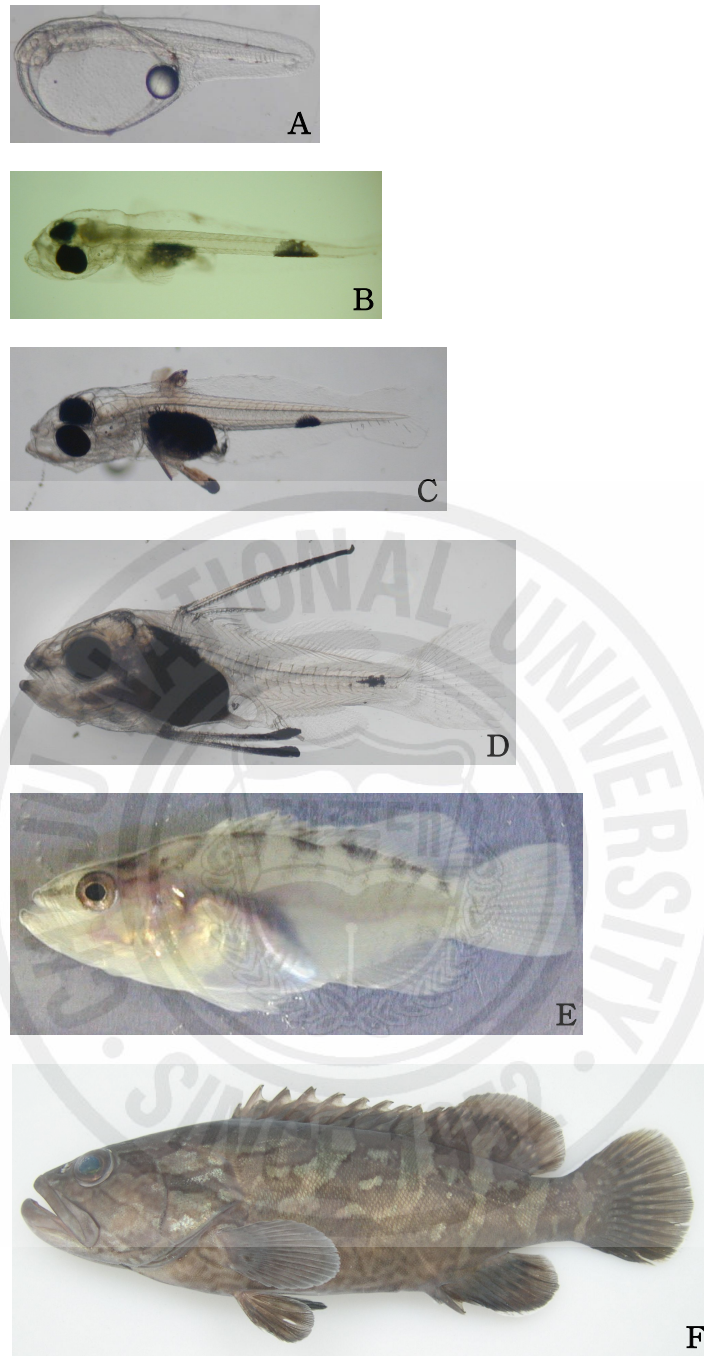


Fig. 15. External development and growth of *E. bruneus* larvae. A, newly hatched larva, 2.1 mm TL; B, 4 days old, 2.8 mm TL; C, 11 days old, 4.1 mm TL; D, 30 days old, 15.1 mm TL; E, 54 days old, 41.1 mm TL; F, 92 days old, 83.8 mm TL.

(1) 난황흡수와 개구시간

난황흡수율은 부화 직후 자어의 난황 용적 비율이 $0.140 \pm 0.011 \text{ mm}^3$ (100%)에서 부화 후 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 24시간 경과시 20.9%였고, 48시간째는 2.9%로 부화 후 48시간 이내에 난황이 대부분 흡수 되었다. 그러나 $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 24시간 경과시 53.7%였고, 48시간째는 23.4%, 72시간째는 4.4%로 부화 후 72시간까지도 일부 난황이 존재하였다(Fig. 16A).

유구 흡수율의 경우, 부화 직후 자어의 유구 용적 비율은 $0.0050 \pm 0.0009 \text{ mm}^3$ (100%)에서 부화 후 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 24시간 경과시 54.6%였고, 48시간 경과시 35.8%로 96시간 이전에 모두 흡수되었다. 그러나 $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 24시간 경과시 55.5%였고, 48시간 경과시 46.5%, 96시간 경과시 13.3%로 서서히 흡수되어 개구 후에도 일부 남아있었다(Fig. 16B).

부화 후 개구시까지 소요된 시간은 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 난황을 거의 흡수하는 부화후 3일, $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서는 부화 후 4일에 개구가 되기 시작하였다.

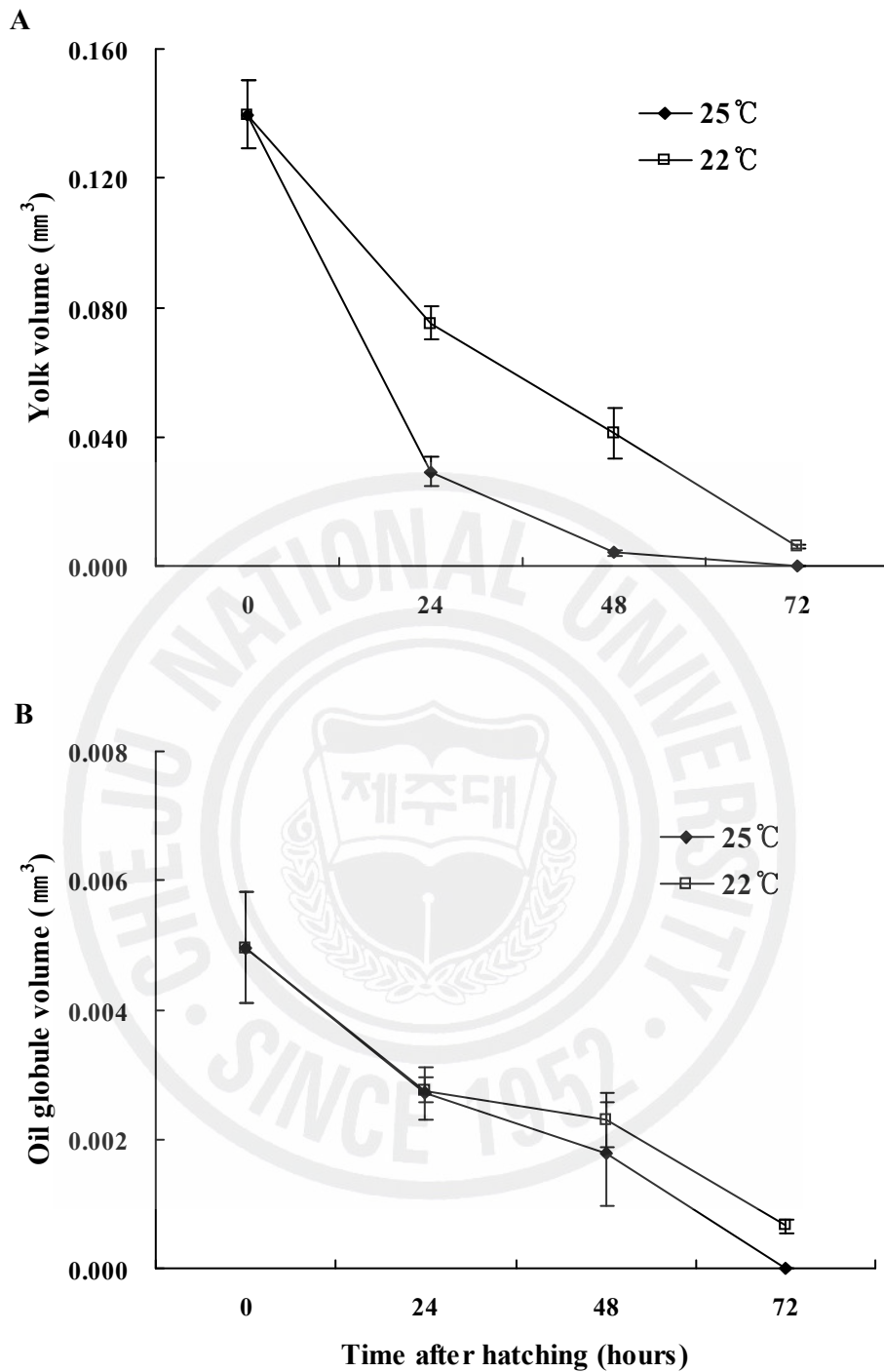


Fig. 16. Absorptions of yolk and oil globule in *E. bruneus* larvae by time elapse after hatching under two water temperature conditions. A, Yolk absorption; B, Oil globule absorption. Vertical bars denote standard errors of means.

(2) 부화자어의 전장과 입 크기

부화 후 첫 개구시 자어의 상악장 크기는 0.155 ± 0.008 mm로 부화 후 6일에 0.176 ± 0.008 mm로 점차 증가하였다. 그리고 이후 상악장의 크기가 급격히 증가하기 시작하여 부화 후 11일째 0.302 ± 0.006 mm에 이르러 54일째 2.838 ± 0.176 mm이었다. 먹이를 섭취하기 시작하는 부화 후 3일째부터 4일까지 자어의 입 크기 d는 $0.219\sim 0.223$ mm, 0.75d는 $0.164\sim 0.167$ mm, 0.5d는 $0.109\sim 111$ mm이었다. 이 기간동안 자어의 전장은 상악장의 크기 변화와 마찬가지로 부화 후 6일째부터 점차 증가하는 경향이였다(Table 18).



Table 18. Changes of mouth size calculated by upper jaw length of *E. bruneus* larvae

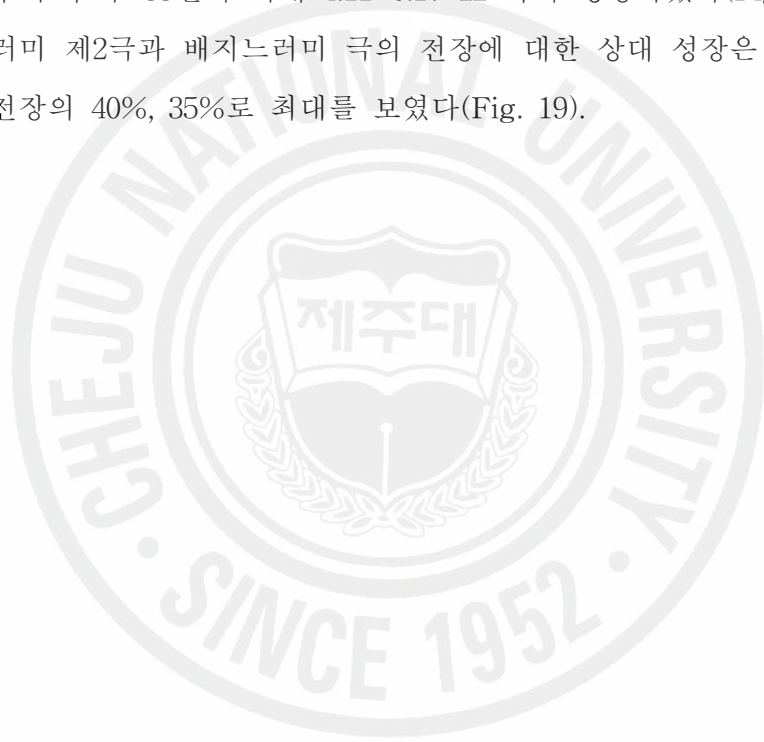
DAH ¹⁾	Total length (mm, mean±S.E. ²⁾)	Upper jaw length (mm, mean±S.E.)	Calculated mouth length (d)		
			d ³⁾	0.75d	0.5d
2	2.68±0.03				
3	2.76±0.08	0.155±0.008	0.219	0.164	0.109
4	2.84±0.06	0.157±0.006	0.223	0.167	0.111
6	2.76±0.04	0.176±0.008	0.249	0.187	0.125
8	2.95±0.09	0.160±0.005	0.226	0.170	0.113
11	4.12±0.09	0.302±0.006	0.427	0.320	0.213
14	4.95±0.12	0.287±0.008	0.406	0.305	0.203
17	6.10±0.14	0.406±0.039	0.574	0.430	0.286
20	5.75±0.30	0.536±0.057	0.758	0.569	0.379
23	7.62±0.33	0.687±0.056	0.972	0.729	0.486
26	10.42±0.17	0.957±0.152	1.353	1.015	0.677
33	15.93±0.42	0.905±0.011	1.280	0.960	0.640
38	21.18±1.14	1.466±0.123	2.074	1.555	1.037
44	25.60±1.17	1.741±0.058	2.462	1.847	1.231
48	30.74±0.95	2.001±0.081	2.816	2.112	1.408
54	41.12±1.20	2.838±0.176	4.013	3.010	2.007

¹⁾DAH: Day after hatching. ²⁾S.E.: standard error of means. ³⁾d: $\sqrt{2} \times$ Upper jaw length.

(3) 등지느러미와 배지느러미 극(棘)

등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 출현은 부화 후 11일부터 출현하였으며 (Fig. 17A), 등지느러미 제 1, 3극은 부화 후 17일부터 돌기하였다(Fig. 17B). 이후 등지느러미 극은 부화 후 38일, 배지느러미 극은 부화 후 33일에 최대로 신장하였다(Fig. 17C). 등지느러미와 배지느러미 극은 부화 후 48일에 지느러미로 분화되었다(Fig. 17D).

등지느러미 제2극은 부화 후 11일째에 0.56 ± 0.20 mm에서 부화 후 38일에 최대 5.35 ± 0.20 mm까지 성장하였다. 배지느러미 극의 길이는 부화 후 11일째에 0.83 ± 0.23 mm에서 부화 후 33일에 최대 4.11 ± 0.17 mm 까지 성장하였다(Fig. 18). 자바리의 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 전장에 대한 상대 성장은 전장 8 mm 전후시기에 전장의 40%, 35%로 최대를 보였다(Fig. 19).



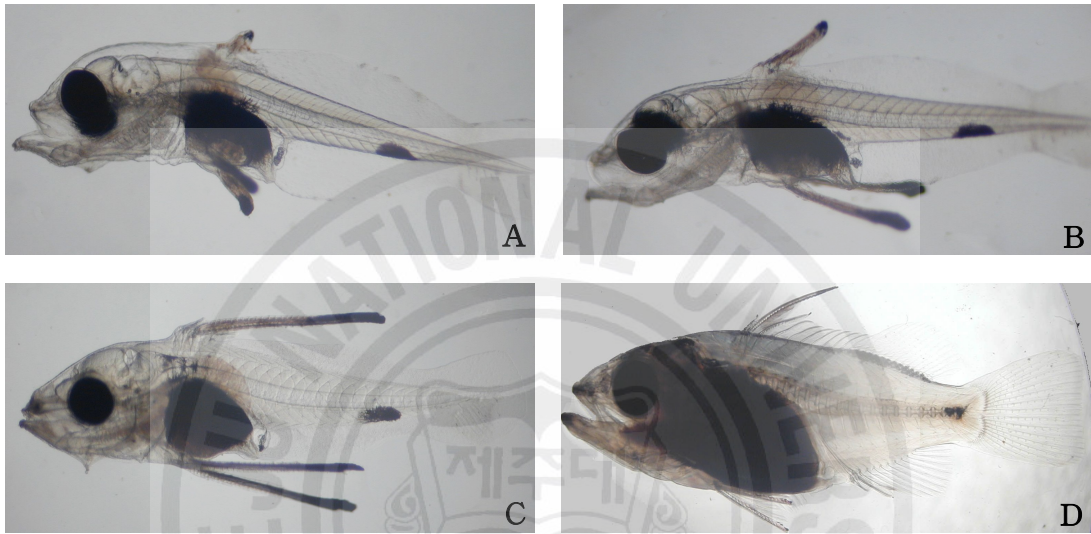


Fig. 17. Development of the dorsal and pelvic spines of *E. bruneus* larvae. A, 11 days old, 4.1 mm TL; B, 17 days old, 6.1 mm TL; C, 38 days old, 21.2 mm TL; D, 48 days old, 30.8 mm TL.

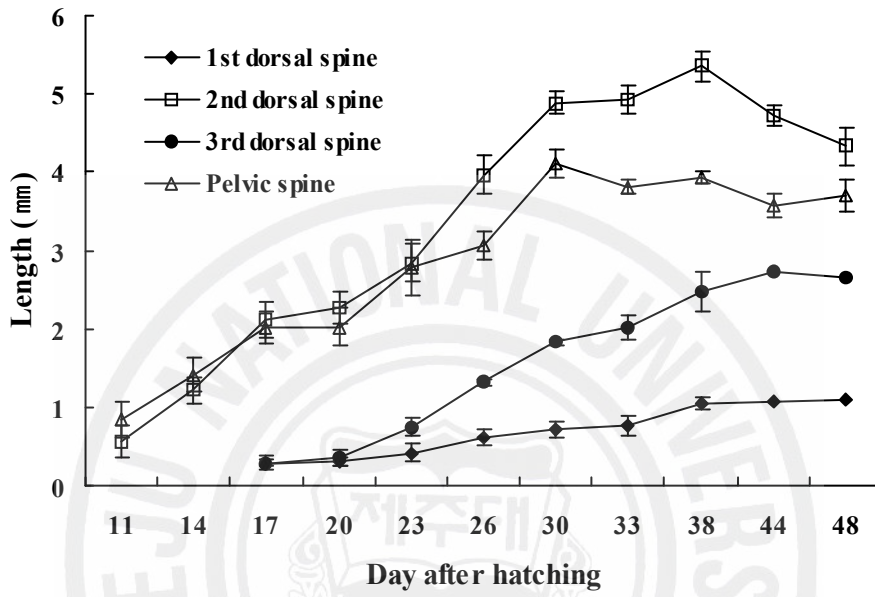


Fig. 18. Growth of the first, second, and third dorsal spines and the pelvic spine by days after hatching in *E. bruneus* larvae. Vertical bars denote standard errors of means.

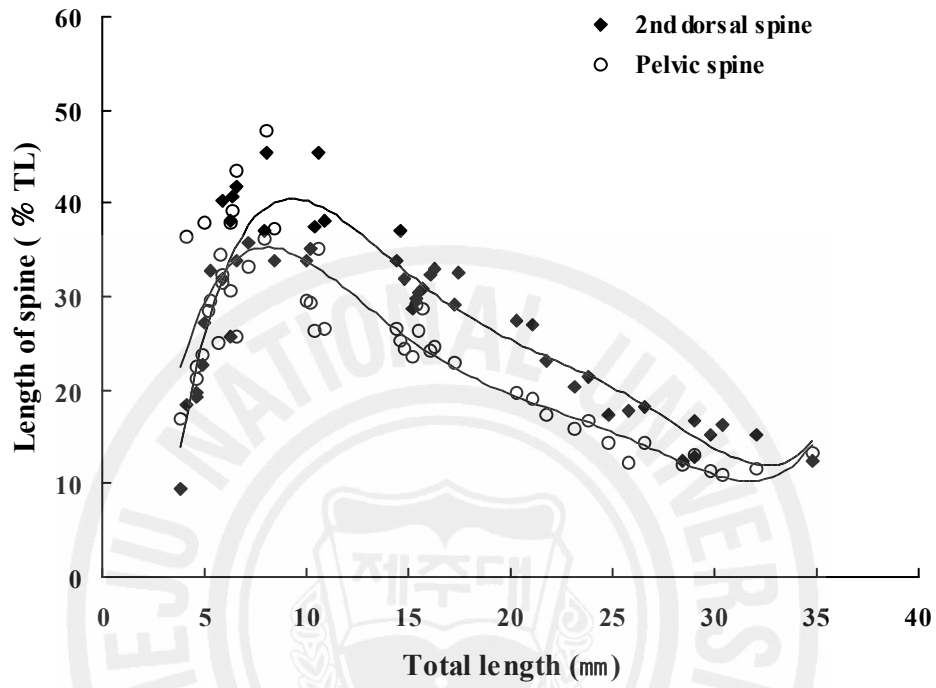


Fig. 19. Proportions of the second dorsal and pelvic spines to total length of *E. bruneus*.

2) 이형 발달

(1) 외부 형태이상

외부 형태이상 구분은 실험어 600마리를 대상으로 목덜미(nape) 부분의 함몰, 등지느러미 부분의 함몰, 복부의 돌출 또는 함몰 그리고 척추골 형태이상 등 육안적으로 구분하였다(Fig. 20)

자바리 외부 형태이상에 따른 출현 양상을 조사한 결과 조사 대상 실험어 600마리 중 세 부분 이상 복합 형태이상 개체가 53.8%로 가장 많았으며, 다음으로 두 부분 이상 복합 형태이상 개체가 35.1%였다. 그리고 단순 형태이상 개체가 11.1%로 가장 적게 조사되었다(Fig. 21).

(2) X-ray 투과영상을 통한 골격계 형태이상

X-ray 투과영상 방법을 이용하여 골격계를 조사한 결과 정상적 자바리의 척추골은 거의 직선형에 가까운 형태였다(Fig. 22A, B). 그러나 형태이상 개체는 척추 부분이 만곡 및 유착되어 있었으며, 신경극 및 혈관극의 형태이상도 동반되었다. 그리고 목덜미 부분과 등지느러미 극조부가 함몰된 부분의 담기골 형태이상 이 관찰되었다(Fig. 22C~F).

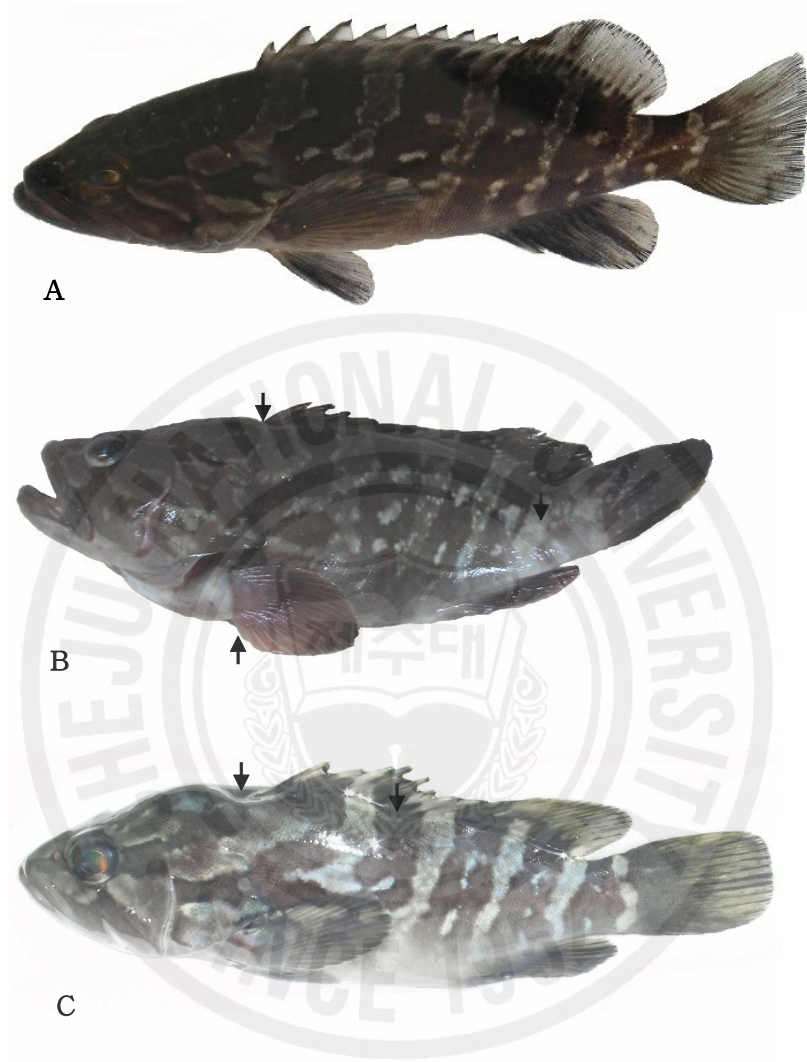


Fig. 20. External features of normal and polymorphism juvenile of *E. bruneus*. A, normal individual; B, C, polymorphism individual. Arrows showed the polymorphism appearance.

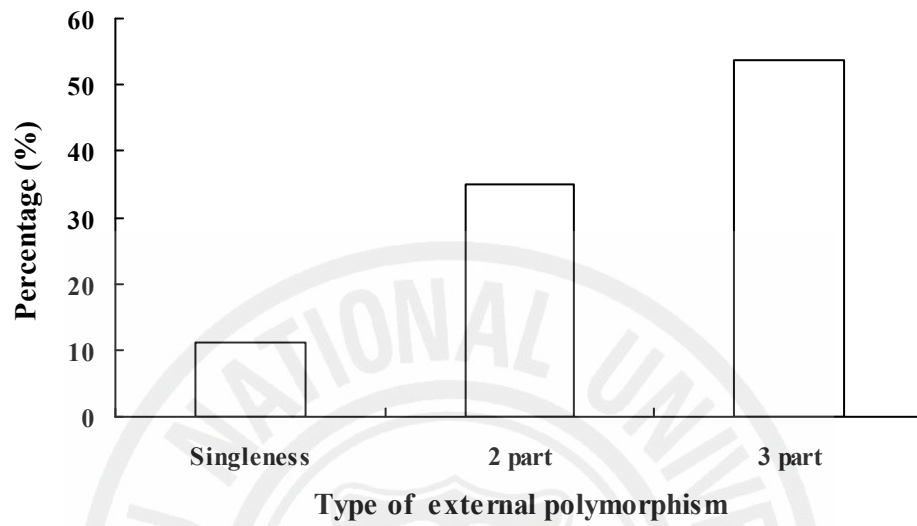


Fig. 21. Type of external polymorphism in *E. bruneus* juvenile produced artificially.

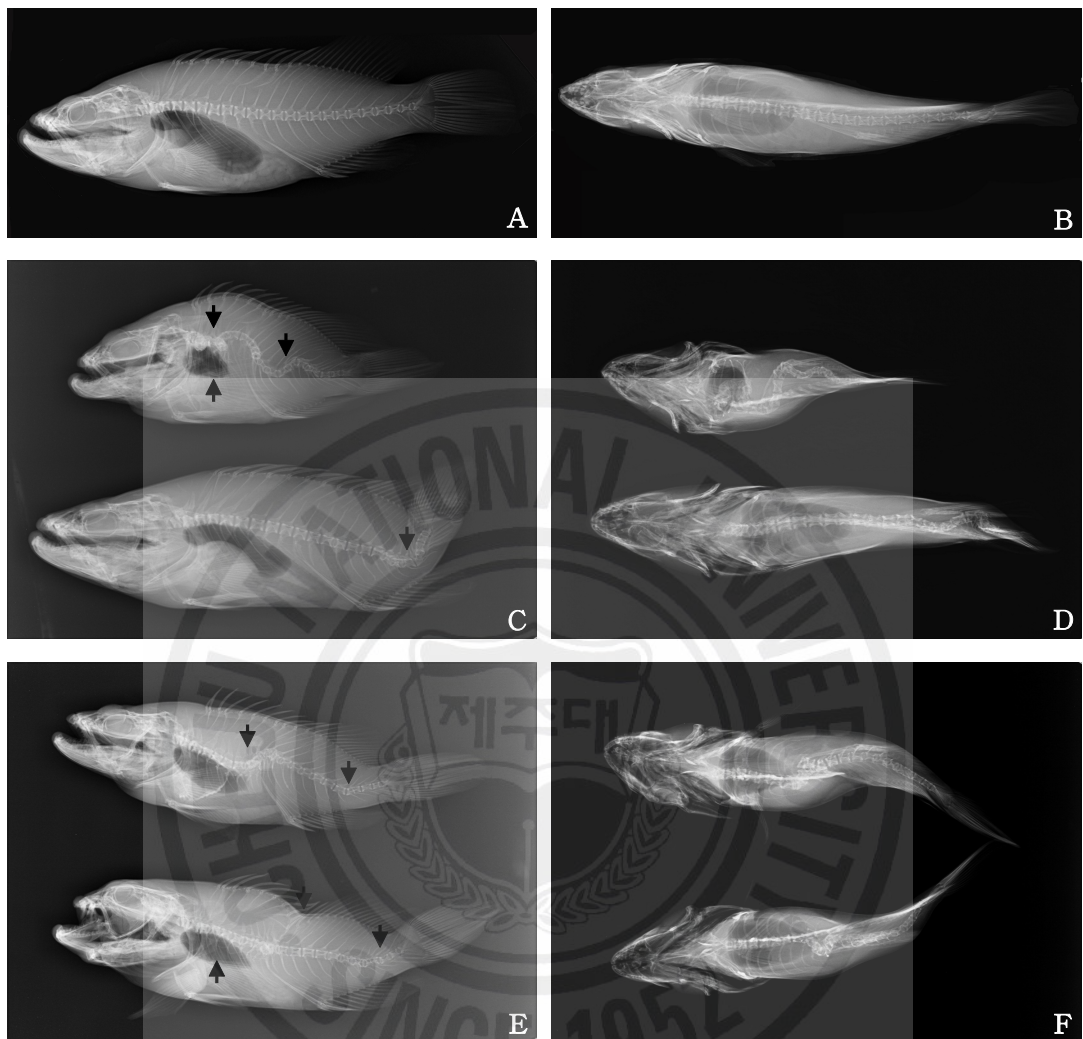


Fig. 22. Lateral (left) and ventral (right) radiograph images of normal and polymorphism *E. bruneus* juvenile produced artificially. A, B, Normal; C, D, polymorphism of vertebral column; E, F, Multiple polymorphism. Arrows showed the polymorphism site.

(3) 척추골과 부속지 골격

자바리 형태이상 개체 41마리를 대상으로 척추골, 신경간극(supraneural bone), 등지느러미와 뒷지느러미 기초수의 중추골격과 부속지 골격 이상 유무를 조사하였다. 그 결과 중추골격계 척추골수는 23.4 ± 0.7 개였으며, 부속지 골격으로서 신경간극 수는 평균 1.3 ± 0.7 개였다. 그리고 등지느러미 극조수와 연조수는 각각 11.1 ± 0.6 과 14.7 ± 0.9 개였다. 뒷지느러미 극조수와 연조수는 각각 2.9 ± 0.2 과 9.2 ± 0.5 개였다 (Table 19).



Table 19. Number of axial skeletons and appendages in *E. bruneus*

Supra-neural	Vertebral column	Dorsal spine		Anal spine	
		Spinous ray	Soft ray	Spinous ray	Soft ray
1.3±0.7	23.4±0.7	11.1±0.6	14.7±0.9	2.9±0.2	9.2±0.5

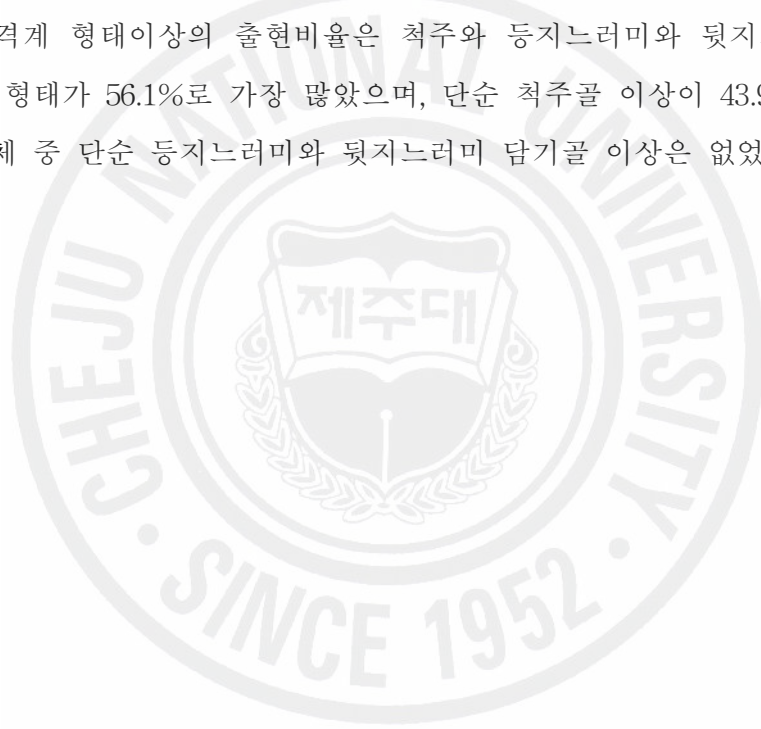
(4) 척주 형태이상

척주(vertebral column)의 형태이상은 대부분 척주 만곡(spinal curvature) 또는 유착(fusion)의 형태를 나타냈다(Fig. 23).

척주 형태이상 부위는 전반부, 중반부, 후반부 부위가 각각 39.0%, 27.3%, 33.7%로 전반부와 후반부에서 중반부보다 많이 발생하였다(Fig. 24A).

척주 형태이상 유형은 척주와 신경극 복합 형태이상이 36.6%로 가장 많았으며, 척주 단독 형태이상 26.8%, 복합적 형태이상 26.8%, 신경극 형태이상 9.8% 순으로 조사되었다. 그러나 혈관극 단독 형태이상 및 혈관극과 신경극 형태이상, 척주와 혈관극 단독 형태이상의 형태이상발생 개체는 없었다(Fig. 24B).

특히 골격계 형태이상의 출현비율은 척주와 등지느러미와 뒷지느러미 담기골이 혼합된 형태가 56.1%로 가장 많았으며, 단순 척주골 이상이 43.9% 이었다. 형태이상 개체 중 단순 등지느러미와 뒷지느러미 담기골 이상은 없었다(Fig. 25).



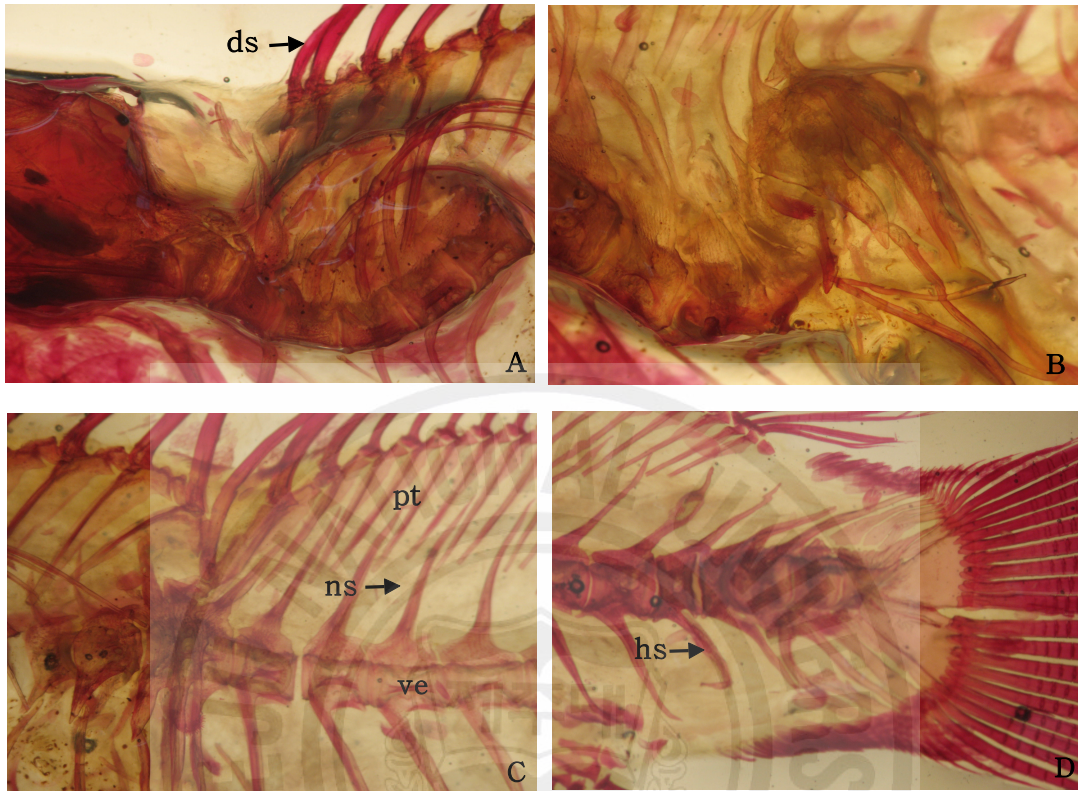


Fig. 23. Lateral view of skeletal polymorphism in *E. bruneus* using transparent fish-skeletal specimen. A, Vertebral curvature in anterior portion; B, Vertebral curvature and fusion in anterior-middle portion; C, Vertebral fusion in middle portion; D, Vertebral fusion in posterior portion. ds, dosal spine; hs, haemal spine; ns, neural spine; pt, pterygiophore; ve, vertebral.

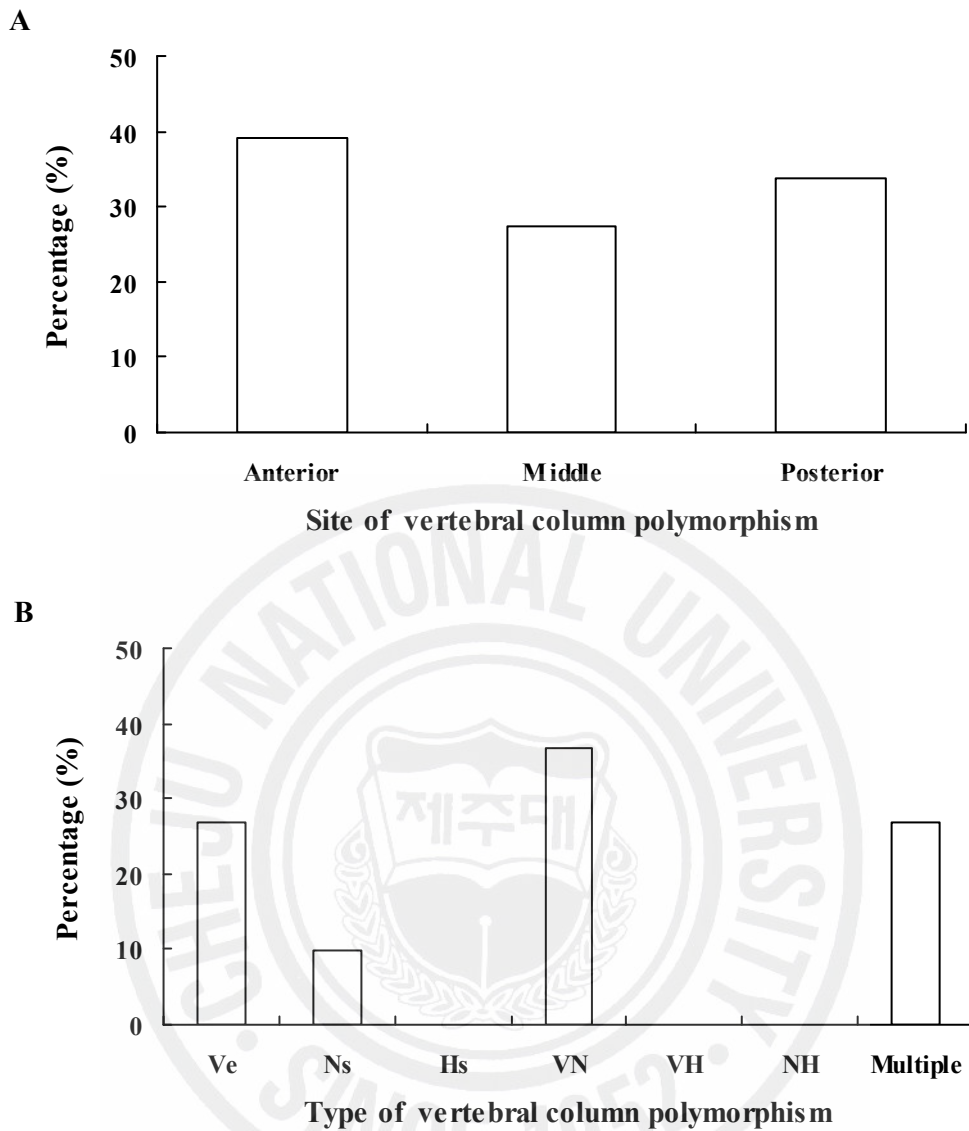


Fig. 24. Proportions of polymorphism site (A) and type (B) of vertebral column at malformed individuals in *E. bruneus* juvenile. Hs, Haemal spine; Multiple, Vertebral, aemal spine and neural spine; NH, Neural spine and haemal spine; Ns, Neural spine; Ve, Vertebral; VH, Vertebral and haemal spine; VN, Vertebral and neural spine.

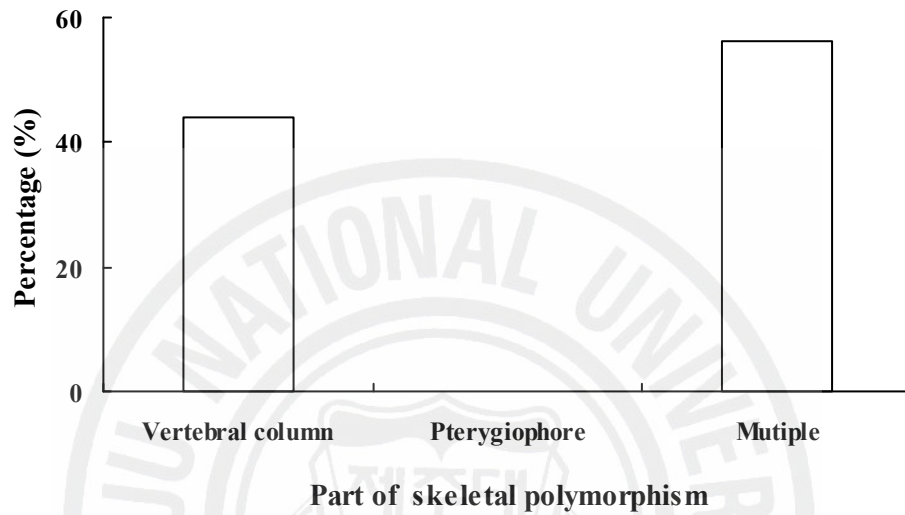


Fig. 25. Part of skeletal polymorphism in *E. bruneus* juvenile.

IV. 고 찰

난 성숙 유도

어류의 성숙, 배란 및 산란은 생식 내분비계 지배에 의해 조절되지만 이들의 조절을 유도하는 것은 환경요인이며, 그 중에서도 광주기와 수온이 깊게 관여한다(De Vlaming, 1975; Nish and Takano, 1979; Asahina and Hanyu, 1983). 어류의 산란형태는 봄 산란형, 여름 산란형, 가을 산란형, 겨울 산란형, 봄여름 산란형, 그리고 봄가을 산란형으로 구분한다(Aida, 1991). 이러한 산란기의 특징은 종 특유의 수온과 광주기에 대한 반응성으로 나타나며, 봄여름 산란형에 속하는 어류의 생식소 성숙과 산란 개시 요인은 주로 수온 상승에 의하여 유도된다(De Vlaming, 1975; Asahina et al., 1980; Shimizu and Hanyu, 1982; Asahina and Hanyu, 1983; Baek and Lee, 1985). 봄 산란형인 점망둑 *Chasmichthys dolichognathus*의 생식소 활성화와 산란 개시는 겨울철 저수온에서 봄철 수온 상승이 주로 작용하고, 광주기가 보상적으로 작용한다(Baek and Lee, 1985). 봄여름(5월 중순~10월 초순) 산란형인 그물코쥐치 *Rudarius ercodes*는 봄철 수온이 일찍 상승하더라도 단일조건에서는 생식소 발달이 일어나지 않으며, 성숙과 산란 개시를 유도하는 주요 요인으로는 광주기(13L 이상)이고, 수온은 보상적으로 작용한다(Lee et al., 1984). 넙치 *P. olivaceus*인 경우 성숙, 산란개시 요인으로는 장일처리와 함께 수온을 14~18℃로 유지하는 것이 효과적이다(伊島 等, 1986). 봄여름 산란형인 감성돔 *A. schlegeli*에서 광주기 및 수온조절을 통하여 자연조건보다 1~2개월 빠른 조기 성 성숙을 유도하였으며, 산란개시 요인은 주로 광주기가 작용하고 수온이 보상적으로 작용하고 있다(Hwang, 1999). 능성어 *E. septemfasciatus*의 경우 장일 광주기(14L/10D) 조건과 수온(21.0℃) 조절을 통해 자연에서의 성숙시기보다 2~3개월 빠른 4~5월에 성 성숙된 개체를 유도하였다(Song, 2004).

자바리의 경우 자연에서 수온 20~25℃의 6~8월 사이에 성숙 산란하며, 실내 사육수조에서 자연해수와 지하해수를 일정 비율로 혼합한 혼합수(15.9~22.8℃)를 이용하여 사육한 경우도 주로 6월 이후에 배란유도가 가능한 성숙 난모세포를

갖는 개체들을 확인할 수 있었다. 그러나 2005년 12월부터 자연광주기에서 수온 17~18℃ 이상의 제주도 지하해수를 이용하여 약 5개월 동안 사육한 지하해수 실험구(17.0~22.7℃)는 3월 15일경부터 배란유도가 가능한 400 μm 전후의 난모세포를 갖는 성숙 개체가 나타나기 시작하였다. 그리고 4월 25일에는 전체 실험어의 66.7%가 400~600 μm 사이의 난모세포를 갖고 있었다. 따라서 자바리의 성숙을 유도하는 요인은 수온이 주로 작용하고 있으며, 장일 광주기가 보상적으로 관여하는 것으로 추정된다.

배란유도

안정적 어류 양식을 하기 위한 전제 조건은 사육 수조에서 성 성숙 제어에 필요한 시기에 수정란 공급이 가능해야 한다(Bromage et al., 2001). 바리과 어류 양식을 하기 위한 수정란 대량 생산 방법으로서 orange-spotted grouper *E. suillus*, camouflage grouper *E. polyphkadion*, 붉바리 *E. akaara*는 실내수조와 가두리에서 자연 산란을 유도하여 수정란 생산을 하고 있다(Toledo et al., 1993; James et al., 1998; Okumura et al., 2002). 그러나 실내수조에서 greasy grouper *E. tauwina*, brown-marbled grouper *E. fuscoguttatus*, 능성어 *E. setemfasciatus*와 자바리는 수조내 자연 산란이 이루어 지지 않거나, 자연산란을 하더라도 난질 저하 및 산란량이 적어 이용이 부적합하다(Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990; Shein, 2000; Song, 2004). 어미사육에서 난질저하 원인은 어미의 건강상태, 성비 불균형 및 산란에 적합한 사육 수심 등 부적합한 환경요인으로 추정하고 있다(Toledo et al., 1993; Kayano, 1996; Okumura et al., 2002).

이와 같은 문제점을 해결하기 위해 호르몬 처리를 통한 배란 유도 및 인공수정을 실시하고 있다. 어류의 생식소 성숙을 제어하기 위해 사용되는 호르몬은 어류의 뇌하수체, LHRHa/GnRHa 그리고 HCG 등이 있다. HCG는 사용이 간편하고, 생식소에 직접적으로 작용하여 난모세포의 최종성숙 및 배란유도에 빠른 효과를 나타내는 장점이 있어 어류의 성숙 및 배란유도에 많이 사용되고 있다(Lam, 1982; Donaldson and Hunter, 1983; Hodson and Sullivan, 1993).

바리과 어류에서 HCG를 사용한 배란 유도는 별우럭 *E. fario*, nassau grouper *E. striatus*, camouflage grouper *E. microdon*, 능성어 *E. septemfasciatus* 등에서 HCG

500~2,000 IU/kg BW 이상 처리했을 때 배란 유도가 가능하였고, 이때 채란 된 난이 자연 산란한 난보다 부상률과 수정률이 향상되었다(Kuo et al., 1988; Watanabe et al., 1995; Tamaru et al., 1996; Song, 2004). 이 연구에서도 자바리에 HCG 500 IU/kg BW 농도로 1회 처리 후 48시간 이후에 양질의 난이 배란되었다.

난 성숙 및 배란 유도를 하기위한 호르몬 처리 시기는 어종에 따라 차이가 있다(Harmin and Crim, 1992). 바리과 어류의 난경 분포에 따른 호르몬 처리가 성숙 및 배란에 미치는 영향을 조사한 실험에서 white grouper *E. aeneus*와 humback grouper *Cromileptes altivelis*는 난경 400~500 μm 에 LHRHa와 GTH를 처리하여 산란을 유도하였다(Hassin et al., 1997; Sugama and Ikenoue., 1999). 별우럭 *E. fario*, camouflage grouper *E. microdon* 및 능성어 *E. septemfasciatus*는 난경이 각각 550 μm , 400 μm , 450 μm 이상이었을 때 HCG 처리를 통해 최종 난 성숙 및 배란 유도가 가능하였다(Kuo et al., 1988; Tamaru et al., 1996; Song, 2004).

이 연구에서도 2005년부터 2006년까지 생식소내 난모세포의 크기(277~520 μm)가 각각 다른 개체에 HCG 500 IU/kg BW 농도로 주사하여 배란 유무를 조사한 결과 400 μm 이하의 난모세포를 가지는 개체에서는 배란이 이루어지지 않았지만, 400~600 μm 사이의 난모세포를 가지는 개체에서는 81.8%가 정상적으로 배란이 이루어졌다. 사육수조내에서 자연산란이 어려운 자바리의 수정란을 대량으로 확보하는 방법은 일정 크기(약 450 μm) 내외의 난을 가지고 있는 개체를 대상으로 호르몬 처리를 통한 최종 난 성숙 유도로 채란하는 것이 효과적이라고 생각된다.

수정란 및 자·치어 발달

어류 수정란의 크기는 부화 자어의 크기, 색이능력, 기아내성, 섭취할 수 있는 먹이 크기의 범위 및 포식자로부터의 도피 능력 등 자연 생태계에서 자어의 생존 능력을 높일 수 있는 중요한 요인이다(Kayano, 1996). 일반적으로 해산 경골어류의 수정란 크기는 산란 수온과 밀접한 연관성을 가진다. 동일종이라도 낮은 수온에서 산란한 수정란은 높은 수온에서 산란한 수정란보다 난경이 더 크다(Kashiwaki et al., 1987; Imai and Tanaka, 1987). 홍바리 *E. fasciatus*의 경우 26°C와 22°C에서 산란한 수정란의 크기를 비교하면 각각 783 μm 와 820 μm 로 저수온에서 산란한 수정란의 난경이 더 크다(Kawabe, 1999). Atlantic herring *Clupea*

*harengus*와 atlantic cod *Gadus morhua*는 대형 수정란에서 유래한 부화자어의 생존능력이 더 높다(Blaxter and Hempel, 1963; Knutsen and Tilseth, 1985). 지금까지 보고 된 바리과 어류의 수정란 크기는 붉바리 *E. akaara* 0.71~0.82 mm, 능성어 *E. septemfasciatus* 0.88±0.22 mm, 홍바리 *E. fasciatus* 0.78~0.82 mm, 그리고 자바리는 0.91 mm 이었다(Watanabe et al., 1985; Kitajima et al., 1991; Kawabe, 1999; Sawada et al., 1999). 이 연구에서 자바리의 수정란은 무색투명한 분리 부상란으로 난경은 0.85~0.93 mm(평균 0.905±0.023 mm)이고, 유구경은 0.20~0.26 mm(평균 0.24±0.03 mm)이었다. 이러한 것은 다른 바리과 어류 보다 난경이 0.1~0.2 mm 정도가 커서 자바리 종묘생산이 다른 바리과 어류 종묘생산에 비해 유리할 것으로 생각된다.

난황이 큰 자어는 난황이 작은 자어와 비교해 볼 때 체조직과 난황에 많은 양의 에너지를 보유할 수 있으므로 PNR (point of no return: 자어의 활력이 떨어져 더 이상 먹이를 섭취하지 못하고 사망하게 되는 한계점)에 도달하기 전까지 먹이를 섭취할 수 있는 시간적 여유가 많고, 첫 먹이 섭취시 자어의 크기가 상대적으로 크기 때문에 유영능력과 포식능력이 높아 생존에 유리하다(Hunter, 1981; Bagarinao, 1986; Quattro and Weeks, 1991). 그리고 어류의 난황 흡수 속도는 사육조건에 따라 다르게 나타날 수 있으나, 일반적으로 아열대성 어류인 바리과 어류와 독가시치 *Siganus guttatus*는 온대성 어류에 비해 상대적으로 적은 난황을 보유하면서, 난황의 흡수는 빠르게 진행된다(Bagarinao, 1986; Lee and Hur, 1997). 붉바리 *E. akaara*가 수온 25~29°C 조건에서 부화 후 24시간 이내에 약 90%의 높은 난황 소모율을 보이고, 99% 이상 난황을 흡수하는 시점은 부화 후 60~84시간이었다(Lee and Hur, 1997). 이 실험에서 자바리의 난황 흡수율은 수온 25.0°C 조건에서 24시간 경과시 평균 79.1%였고, 48시간째는 97.1%로 대부분의 난황이 흡수되었다. 그러나 22.0°C 조건에서 난황 흡수율은 24시간 경과시 42.3%, 48시간 경과시 76.6%, 72시간 경과시 95.6%로 일부 난황이 존재하였다. 이와 같은 결과는 자바리도 다른 바리과 어류와 같이 난황흡수가 빠르게 진행되는 것으로 생각된다.

어류의 부화 자어는 내인성 영양물질로 난황과 유구가 사용되어지며, 일반적으로 유구가 난황보다 다소 늦게 흡수된다(Kuo et al., 1974). 이 실험에서 자바리

의 유구 흡수율은 부화 후 25.0℃조건에서 24시간 경과시 44.4%였고, 48시간째는 64.2%, 96시간 이전에 모두 흡수되었다. 그러나 22.0℃조건에서 96시간 경과시 86.7%로 서서히 흡수되어 개구 후에도 일부 남아있었다 이러한 현상은 난황 흡수기 동안 비교적 늦게 이용되는 것으로 알려져 있는 triglyceride와 깊은 관련이 있을 것으로 생각된다(Fyhn, 1989; Clyde et al., 1992).

부화자어의 개구시 작은 입은 부화자어의 사육시기에 높은 사망 원인 중에 하나이며, 첫 먹이 섭취 시기 자어의 입 크기는 초기 생존율을 높이기 위한 적정 먹이를 선택하는데 중요한 요소가 된다(Hussain and Higuchi, 1980; Kayano, 1988; Kohno et al., 1997). 자바리 자어의 개구시 상악장 크기는 0.155 ± 0.008 mm로 자어의 입 크기 d는 0.219~0.223 mm, 0.75d는 0.164~0.167 mm, 0.5d는 0.109~111 mm이었다. 이와 같은 결과는 붉바리 *E. akaara* 자어의 먹이 섭취시 구경은 최소 0.5d로 가정한 경우 입 크기가 0.078~0.120 mm 보다는 다소 컸다(萱野, 1988; Lee and Hur, 1997).

자바리 자어는 다른 바리과 어류 자어들처럼 등지느러미와 배지느러미의 톱날 같은 극이 길게 신장한다. 이러한 극의 정확한 기능은 알려지지 않았지만 형태학적 극 특징에 따라 능성어속 어류의 종 동정에 이용할 수 있다(Johnson and Keener, 1984). 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 변화는 능성어 *E. septemfasciatus*에서 체장 8 mm 전후시기에 체장의 90%, 65%로 최대를 보이고, 이후 성어와 유사한 상대성장을 보인다(Kitajima et al., 1991). 자바리의 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 변화는 각각 부화 후 38일에 5.35 ± 0.20 mm, 4.11 ± 0.17 mm 까지 성장하였으며, 전장에 대한 상대성장은 전장 8 mm 전후하여 전장의 40%, 35%로 최대치를 보여 능성어 *E. septemfasciatus*와 유사한 경향이였다.

형태이상(polymorphism)

어류 종묘생산에 있어서 형태이상 개체의 발생은 생산성과 상품성을 저하시키는 원인 중에 하나이다. 어류의 골격계 형태이상은 척추, 지느러미, 턱 등에 주로 나타난다. 척추전만(lordosis)의 원인으로는 크게 2가지로 구분할 수 있다. 첫째 선천적 기원은 배 발생 시기부터 영향을 주며, 그 원인으로는 유전적 원인, 난황 구성 물질, 빛, 온도, 물리적 자극, 오염, 병원균 감염 등의 환경요인이 어미

(broodstocks) 또는 배(embryos)에 영향을 주어 발생한다(Paperna, 1978; Piron, 1978). 둘째 후천적 원인은 사육환경(Haya, 1989, Weis and Weis, 1989; Wiegand et al., 1989; Caris and Rice, 1990)과 영양(Akiyama et al., 1989; Hinton et al., 1992; Cahu et al., 2003)에 의해 발생한다. 골격계 형태이상은 부레 형태이상에 의하여 나타나는 하나의 형태이상으로서, 원인은 초기 부레형성 시기에 모체와 초기 영양성에 의한 생물학적 원인과 수온과 염분, 빛 등의 물리적 환경요인에 기인한다(Kitajima et al., 1994; Bailey and Doroshov, 1995). 그리고 이와 같은 물리적 환경뿐만 아니라 수표면의 물리적 변화, aeration, 수표면의 유막 등 사육 환경이 부레 형성에 영향을 미친다(Battaglione and Talbot, 1993; Kitajima et al., 1994). 또 다른 원인으로 자어시기 부레형성이 제대로 이루어지지 않았을 때 부상 능력 부족에 따른 비정상 유영행동을 보이고, 이러한 유영행동 때문에 척추 형태 이상이 발생한다(Kitajima, 1978; Chatain, 1982; Andrades et al., 1996).

이 연구에서 자바리 치어의 형태이상 출현은 조사 개체 대상 중 3부분 이상의 복합적 형태이상이 53.8%로 가장 많이 나타났으며, X-ray 투과영상 방법을 이용한 조사결과 대부분 척추 부분의 만곡, 유착과 같은 척추 형태이상으로 조사되었다. 이와 같은 형태이상 원인이 HCG 호르몬 처리에 의한 난모세포 최종 성숙 및 인공 배란유도 과정에 영향을 받아 발생한 결과인지 또는 초기 사육과정에서 오일처리에 의한 유막형성, 조명, 먹이생물의 영양 불균형 등으로 부레 발달에 장애를 입어 부레 형태이상에 의한 척추 형태이상이 나타나는 것인지 정확히 알 수 없다. 따라서 자바리 종묘의 상품성을 저하시키는 형태이상 개체의 발생 원인을 밝히기 위해서는 부레형성 시기에 자어 사육환경과 부레 형태이상과의 관계를 밝힐 수 있는 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

제 3장 종묘생산

I. 서 론

양식 산업은 빈번한 질병 발생으로 경제적 피해를 받고 있으며, 그 중 바이러스성 질병은 세균성이나 기생충성 질병과 달리 수산용 약제에 의한 대처가 곤란하다. 또한 종묘생산 시기에 바이러스성 질병 발생은 자·어의 대량폐사를 유발시켜 종묘생산의 성패를 좌우하는 경우도 많이 발생한다.

자바리를 비롯한 바리과 어류 종묘생산과정에서 발생하는 VNN 질병은 자·치 어기에 대량폐사를 유발하는 대표적인 질병으로, 발생경로는 수직감염 또는 수평감염에 의해 이루어진다(Munday and Nakai, 1997; Munday et al., 2002; Gomez et al., 2004). 국내에서 바리과 어류의 VNN 감염은 여름철 고수온기 가두리에 양성중인 능성어 *E. septemfasciatus*에서 처음으로 보고되었지만, 종묘생산과정에서 VNN 감염에 대한 연구는 찾아볼 수 없다(Sohn et al., 1998). 일본의 경우, 바리과 어류의 종묘생산과 양성과정에서 VNN 감염이 가장 큰 문제로 지적되고 있으며, 종묘생산 과정에서 VNN 방지는 요오드 또는 오존처리 해수에서 수정란을 소독하고, 오존처리된 살균 해수에서 종묘생산을 수행하고 있다(虫明·有元, 2000; 渡辺, 2000; Tsuchihashi et al., 2002; Tanaka, 2005).

이 연구는 바이러스성신경괴사증 감염을 방지하기 위하여 요오드를 사용한 수정란 적정 처리 농도와 처리 시간을 조사하여 건강 종묘생산 방법을 탐색하였고, 자바리 종묘생산 과정 중에 발생한 VNN 원인 바이러스를 유전학적 계통분류로 동정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 종묘생산

1) 요오드를 사용한 수정란 소독

자바리 종묘생산 과정 중에 발생하는 VNN을 방지하기 위하여 요오드를 사용한 수정란 적정 소독 방법에 대하여 조사하였으며, 모든 결과의 유의성 검정은 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

(1) 요오드액의 적정 처리 농도 및 시간

VNN 질병 예방을 위하여 수정란 적정 소독 방법에 대하여 조사하였다. 수정란 소독을 위한 소독제는 10% 요오드용액(Povidon-Iodine, Korea Pharma Co., Korea)을 사용하였다.

수정란에 대한 적정 소독 농도 및 처리 시간을 조사하기 위하여 요오드 농도를 대조구, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm에서 15분과 30분간 소독한 후 부화율을 조사하였다. 수정란은 각 실험구별 500 mL 비이커에 약 80개씩 수용하여 관찰하였다. 실험 시작 시 수정란의 발생단계는 안포형성 이후의 배체형성기 단계의 수정란을 이용하였다.

부화율은 각 실험구의 총 수정란을 계수한 후 수정 후 60시간에 미부화란을 계수하여 구하였다. 비정상개체 발생은 각 실험구별 전체 부화자어 중 부화 직후 사망한 개체와 부화는 이루어졌지만 곧게 뻗지 못하는 개체를 비정상적인 개체의 비율로 나타내었고, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

(2) 요오드액 처리시기에 따른 영향

수정란 소독시기는 64세포기(64 cell), 상실기(morula stage), 포배기(blastra

stage), 낭배기(gastrula stage), 초기배체형성기(early embryo formation stage, EEF), 안포형성기 이후(posterior of optic vesicle formation stage, POOV) 단계로 구분하여 각 발생단계별 소독에 따른 영향을 조사하였다.

각 발생단계별 수정란은 대조구와 소독구로 나누어 500 mL 비이커당 약 80개씩 수용하여 요오드 20 ppm 농도에서 15분간 소독 후 여과해수로 수정란을 세척하여 미리 준비한 대조구와 같은 해수에 수정란을 수용하였다.

부화율은 각 실험구의 총 수정란에서 소독직후 백탁된 사란과 수정 후 70시간에 미부화란을 제외한 부화자어의 수로 계산하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

2) 종묘생산

수정란 소독 유무에 따른 VNN 질병 발생여부와 부화 후 60일까지 최종 생존율을 조사하였다.

2005년 6월의 종묘생산에서는 수정란을 소독하지 않고 사육수조에 수용하였고, 수온은 $26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 내외를 유지하도록 하였다. 2006년 6월의 종묘생산에서는 인공수정 24시간 후 안포형성이전단계의 배체형성기 수정란을 요오드 20 ppm에서 15분간 소독 처리 후 사육수조에 수용하였고, 수온은 $28.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 내외로 설정하여 사육하였다.

수정란과 사육수온을 제외한 모든 종묘생산과정은 동일한 방법으로 수행하였다. 종묘생산 수조는 7 m 원형 PP수조(유효수량 30 ton)를 이용하였으며, 수정란 수용은 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 개/ton의 밀도로 수용하였다. 사육수 환수는 수정란 수용 직후부터 저층으로 액화산소가 들어있는 소량의 사육수(0.1회전/1일)를 주수하였으며, 사육일수가 증가할수록 용존산소가 5 ppm 이상이 유지되도록 환수량을 점차적으로 높여 주었다.

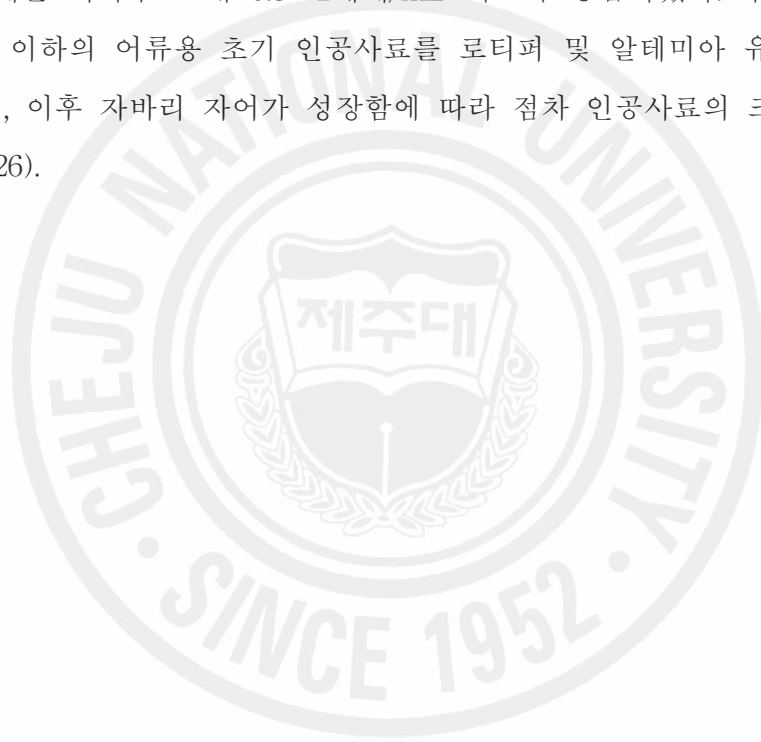
부화 직후부터 사육수조 내에 수질안정 및 로티퍼의 먹이를 제공하기 위하여 시판용 농축 *Nannochloropsis*와 *Pavlova*를 각각 3×10^5 cells/mL과 2×10^5 cells/mL 농도로 매일 2회 첨가하였다. 유막 형성은 유화오일 1~2 mL를 1일 2회 부화 직후부터 부화 후 7일까지 수조내 에어레이션 부근에 첨가하여 주었다. 사육수조 저면의 수질안정을 위하여 패화석(fish green, Japan)을 10 ppm 농도로 해수와

회색하여 수조에 골고루 살포하였다.

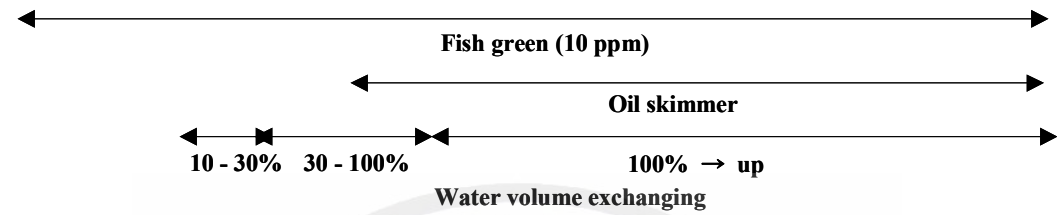
조도는 부화 직후부터 일령 9일까지는 24시간 연속적으로 점등하여 주었으며, 일령 10부터는 오전 6시~오후 9시까지 점등하여 사육수조 수표면의 조도를 500~800 lux가 유지되도록 하였다.

로티퍼 공급은 부화 후 2일부터 수조내 로티퍼수가 항상 15개체/mL가 유지되도록 공급하였다. 부화 후 2일부터 6일까지는 SS형 로티퍼(81~184 μm)를 공급하였고, 부화 후 7일부터 35일까지는 S형 로티퍼(89~222 μm)를 공급하였다.

알테미아 유생 공급은 부화후 22일부터 50일까지 유화오일을 사용하여 영양강화시킨 개체를 사육수조 내 0.5~2개체/mL 되도록 공급하였다. 부화 후 25일부터 250 μm 이하의 어류용 초기 인공사료를 로티퍼 및 알테미아 유생과 함께 공급하였으며, 이후 자바리 자어가 성장함에 따라 점차 인공사료의 크기를 증가시켰다(Fig. 26).



WATER MANAGEMENT



FEEDING REGIME

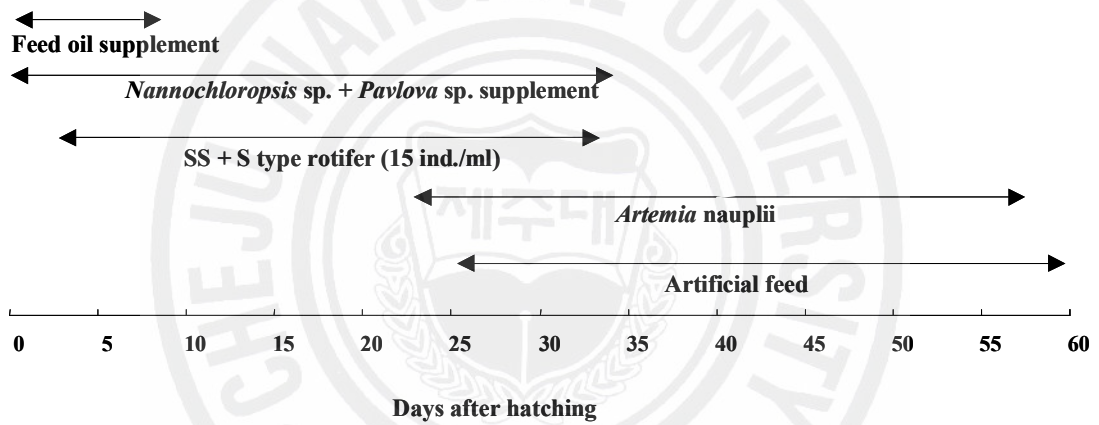


Fig. 26. Water management and feeding scheme during the larval rearing of *E. bruneus*.

2. 종묘생산 과정에서 VNNV 검출과 유전학적 계통 분류

자바리 종묘생산 과정에서 빈번하게 발생하는 바이러스성신경괴사증 감염 여부를 확인하기 위하여 인공수정란과 사육단계별 자·치어에 대하여 PCR법으로 VNNV 감염 여부를 조사하였으며, 검출된 VNNV에 대한 유전학적 계통분류를 실시하였다.

1) 실험재료

2005년 6월과 2006년 6월에 생산된 인공수정란과 자·치어 발달에 따라 10일 간격으로 시료를 채취하여 -70°C 에 보관 후 실험재료로 이용하였다.

2) RT-PCR 수행

Total RNA는 각각의 시료를 분쇄 후 Extractor RNA kit (Toyobo Co., Japan)를 사용하여 자동 핵산추출기(MFX 6100, Toyobo Co., Japan)로 추출하였다.

cDNA는 시료로부터 분리된 total RNA $1\mu\text{l}$ ($1\sim 5\mu\text{g}/\mu\text{l}$), random primer (Invitrogen Co., USA) $1\mu\text{l}$, 그리고 DEPC water를 조합하여 최종적으로 $12\mu\text{l}$ 가 되도록 조절 후 70°C 에서 10분간 처리하였고, 1분간 얼음에 방치 후 10초간 spin down하였다. 여기에 first strand buffer (5 \times) $4\mu\text{l}$, 10 mM dNTPs $1\mu\text{l}$, 0.1 M DTT $2\mu\text{l}$ 를 첨가하고 42°C 에서 2분간 방치 후 superscriptTM II RTase (Invitrogen, USA) $1\mu\text{l}$ 를 첨가하여 42°C 에서 1시간 동안 배양한 후 70°C 에서 15분간 heating하여 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 PCR 반응을 실시하였다(Table 20). 이때 PCR 반응에 사용한 primer는 Nishizawa et al. (1994)이 보고한 F2/R3 primer set (Table 21)을 사용하였으며, 1.5% agarose gel 전기영동을 실시하여 PCR 산물을 확인하였다.

Table 20. Condition of the reaction steps and polymerase chain reaction (PCR) cycles

PCR Step	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle (sec)
Pre denature	72	10 min	1
	95	2 min	1
Denature	95	40 sec	
Annealing	55	40 sec	25
Extension	72	40 sec	
Post extension	72	5 min	1

Table 21. Primer set used for the diagnosis of VNNV infection

Primer name	Sequence (5'→3')	Product size (bps)
F2	CGTGTCAGTCATGTGTCGCT	426
R3	CGAGTCAACACGGGTGAAGA	

3) 염기서열 분석과 유전학적 계통 분류

VNNV의 coat protein gene 절편을 재조합하기 위해 증폭된 PCR 산물을 TOPOTA cloning kit (Invitrogen Co., USA)를 이용하여 cloning을 실시하였다.

형질전환은 TOP10F' *Escherichia coli*를 competent cell로 하여 형질전환을 실시한 다음 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 X-gal과 IPTG 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ampicillin을 포함하고 있는 고체 LB배지를 이용하여 37°C에서 18 시간 동안 배양한 후 흰색 콜로니를 선 발하였다. 형질전환된 대장균은 ampicillin이 첨가된 LB broth (Difco, USA)에 접종하여 37°C, 220 rpm에서 18시간 배양한 후, Wizard SV Mini-Prep DNA Purification System (Promega, USA)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

형질전환 확인은 분리된 plasmid에 제한 효소 *EcoR* I 을 처리하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 1.2% agarose gel 전기영동에서 클로닝 여부를 확인하였고, 염기서열분석은 Solgent (Korea)에 의뢰하여, 분석된 gene sequence를 NCBI의 GenBank balst search 및 clustal W program을 이용하여 유전적 계통을 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 종묘생산

1) 요오드액을 사용한 수정란 소독

(1) 요오드액의 적정 처리 농도 및 시간

요오드 20 ppm 이하 농도에서 15분과 30분간 소독 처리한 수정란의 부화율은 95.8~100%로 대조구(100%, 99.3%)와 유의차가 없었다($P>0.05$). 그러나 40 ppm 과 80 ppm 농도에서 15분과 30분 소독 처리한 수정란의 부화율은 53.0~84.7%로 대조구에 비해 낮았다($P<0.05$, Fig. 27A).

요오드 처리 농도 및 처리 시간에 따른 비정상개체 발생은 20 ppm 이하의 농도에서 15분간 처리한 경우 0~6.8%, 30분간 처리한 경우 0~8.3%로 비교적 낮게 나타났다($P>0.05$). 그러나 40 ppm 이상의 농도에서 15분과 30분간 처리한 경우의 비정상 개체 발생은 11.1%~65.1%로 대조구에 비해 높았다($P<0.05$, Fig. 27B).

(2) 요오드액 처리시기에 따른 영향

안포형성 이전 단계의 수정란에 소독한 수정란의 부화율은 9.9~45.3%로 대조구(98.2%)에 비해 낮게 나타났다($P<0.05$, Fig. 28). 그러나 안포형성 이후 배체형성기 단계의 수정란에 소독한 수정란의 부화율은 95.8%로 대조구와 유의차가 없었다($P>0.05$, Fig. 28).

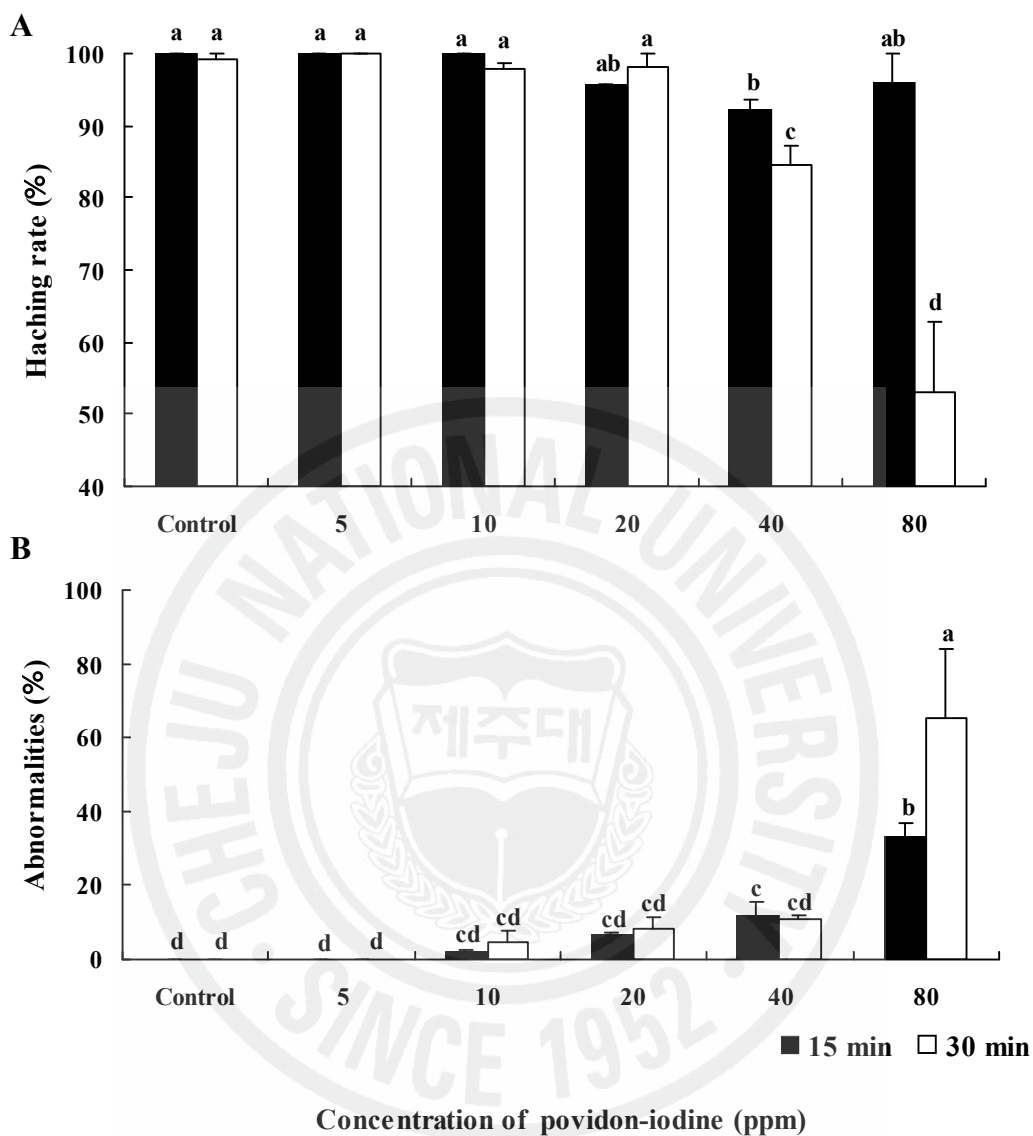


Fig. 27. Effect of the treatment with povidone-iodine on the hatching rates and abnormalities by the concentrations and durations of the disinfectants contact. A, Hatching rates; B, Abnormalities. Small letters indicate significant differences at $P < 0.05$. Vertical bars denote standard errors of means.

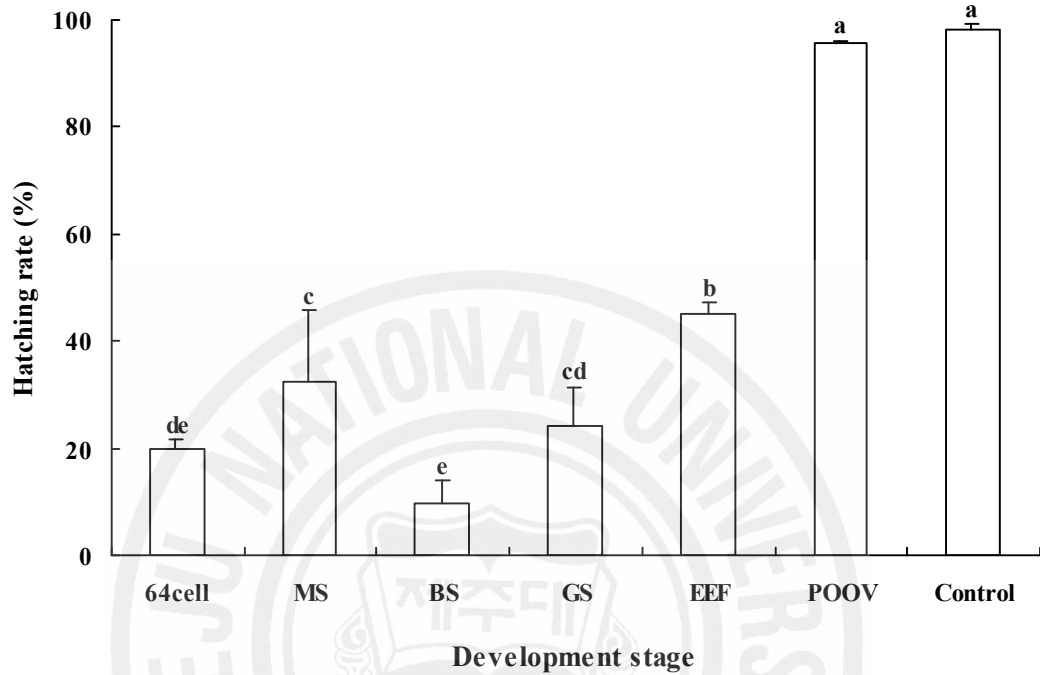


Fig. 28. Effects of the treatment with povidon-iodin (20 ppm, 15 min) on the hatching rates of fertilized egg by developmental stages contacted. BS, Blastula stage; EEF, early embryo formation stage; GS, Gastrula stage; MS, Morula stage; POOV, Posterior to optic vesicle formation. Small letters indicate significant differences at $P < 0.05$. Vertical bars denote standard error of means.

2) 종묘생산

2005년 종묘생산에 사용된 인공수정란의 평균 크기는 $905 \pm 24.8 \mu\text{m}$ 이고, VNN 검사결과 음성으로 조사되었으며, 부화자어의 크기는 $1.83 \pm 0.02 \text{ mm}$ 이었다. 사육수조에 수정란 수용시 수온은 20.5°C 이었고, 부화율은 88.9%이었다. 2006년 종묘생산에 사용된 인공 수정란의 평균 크기는 $920 \pm 22.2 \mu\text{m}$ 이고, VNN 검사결과 음성으로 조사되었으며, 부화자어의 크기는 $1.92 \pm 0.16 \text{ mm}$ 이었다. 사육수조에 수정란 수용시 수온은 19.8°C 이었고, 부화율은 58.1%이었다.

자바리 부화자어는 부화 직후 수조 내에 넓게 분포하다가 부화 3일째부터 수면위로 부상하기 시작하고, 자어의 복부부분에 흑색소포가 선명하게 나타나면서 개체식별이 가능하게 되며, 성장이 빠른 개체에서는 개구가 시작되었다. 자어의 먹이 섭식은 부화 3일째에 처음으로 확인하였으며, 소화관 위쪽으로 흑색소포가 짙게 침적되는 것이 관찰되었다. 부화 5일 이후부터 자어는 수표면 바로 아래에 군집을 형성하며 넓게 분포하기 시작하였다.

종묘생산 기간 중 자·치어의 대량폐사는 2005년 종묘생산에서 부화 후 28일째 이상유영을 하다가 바닥으로 가라앉고, 등이 굽어지면서 수표면 위에 누워있는 개체들이 나타나기 시작하면서 계속적으로 폐사가 일어났다. 폐사 원인은 노다바이러스 원인균에 의한 VNN으로 나타났으며, 부화 후 10일째의 수조에서도 VNN 발생에 의하여 전량 폐사하였다. 2005년도 종묘생산 결과 부화 후 60일까지의 평균 생존율은 0.06%이었다(Table 22).

2006년도 종묘생산은 수정란 단계에서부터 10일 간격으로 VNN검사 결과 음성으로 조사되었으며, 부화 후 60일까지 VNN에 의한 폐사는 나타나지 않았지만 부화 후 45일부터 빠른 성장으로 변태가 완료된 개체들이 소형개체를 잡아먹는 공식현상으로 생존율이 저조하였으며, 부화 후 60일째까지의 최종 생존율은 10.1%이었다(Table 22).

자바리 종묘생산 과정 중 자어의 전장은 부화 후 1일째 2.3~2.4 mm에서 개구 후 먹이를 섭취하기 시작하는 4~5일째 2.6~2.7 mm로 크기 변화는 거의 없었다. 이후 자어는 완만한 성장을 하기 시작하여, 지느러미 변태가 시작되면서 알테미아를 섭취하기 시작하는 부화 후 20일째 6.1~7.6 mm까지 성장 후 빠른 성장을 하였다. 부화 후 50일째 자어는 전장 30.7~41.1 mm로 성어와 유사한 채색을 띠면

서 치어로 성장하였다. 이후 배합사료를 계속적으로 섭취하면서 빠른 성장을 하여 부화 90일 전후 치어는 93.8 mm까지 성장하였다(Fig. 29).



Table 22. Effects of fertilized egg disinfection on the survival of larvae in the mass seed production of *E. bruneus*

Year	Rearing tank (m ³)	Number of fertilized egg (×10 ³)	VNN detection in fertilized eggs	Fertilized egg disinfection	Hatching rate (%)	VNN detection in larvae and juvenile	Survival rate at 60 days (%)
2005	30	900	ND ¹⁾	No	88.9	D ²⁾ (H28) ³⁾	0.11
	30	900	ND	No	88.9	D(H10)	0
2006	30	600	ND	Yes	58.1	ND(H60)	8.6
	30	300	ND	Yes	58.1	ND(H60)	11.5

¹⁾ND: no detection of VNN. ²⁾D: detection of VNN. ³⁾(): days after hatching

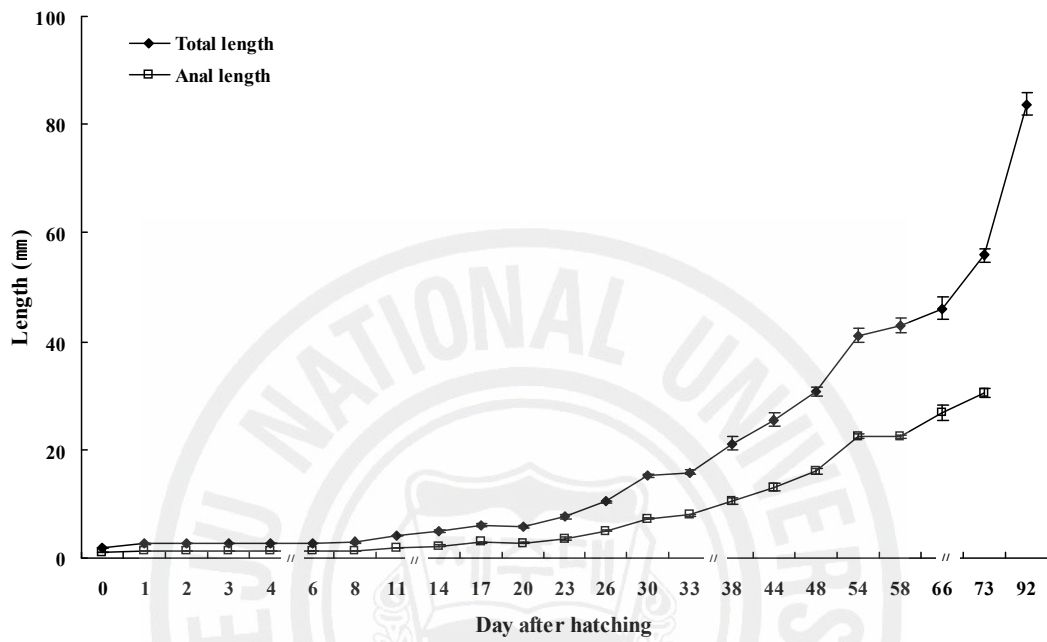


Fig. 29. Growth patterns of the total length and anal length of *E. bruneus* larvae by days after hatching. Vertical bars denote standard error of means.

2. 종묘생산 과정에서 VNNV 검출과 유전학적 계통 분류

1) VNNV 검출

2005년도 자바리의 종묘생산 과정에서 수정란 및 부화 후 10일, 20일, 30일, 40일 자어를 각각 채취하여 PCR방법을 이용하여 VNNV 감염여부를 확인한 결과 수정란에서 20일령까지는 VNNV 감염이 확인 되지 않았으나, 부화 후 30일과 40일 자·치어 시료에서는 426 bps의 증폭산물 밴드가 나타남으로써 VNNV의 감염이 확인되었다(Fig. 30). 또한 28일령 이후 급속한 자어의 폐사 현상이 발생하기 시작하여 부화 후 50일에는 대부분의 자어가 폐사하여 폐사율이 약 99.9%에 달하였다. VNNV 감염의 증상은 척추 측만증상, 이상유영 행동 및 입 벌림 증상 등이 관찰되었으며, 일부개체는 부레팽창이 관찰되었다.

2) 계통분류학적 비교

VNN에 감염된 자바리 치어에서 분리된 VNNV의 coat protein gene에 대한 유전자형 분석결과 dragon grouper (*E. lanceolatus*, accession NO. 721615), 붉바리 (*E. akara*, accession NO. DQ116038)의 VNNV coat protein gene과 각각 99.2%와 98.0%의 homology를 나타냈다(Fig. 31).

이 결과로 이 연구에서 발생한 자바리의 VNNV는 red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)와 동일한 계통으로 조사되었다.

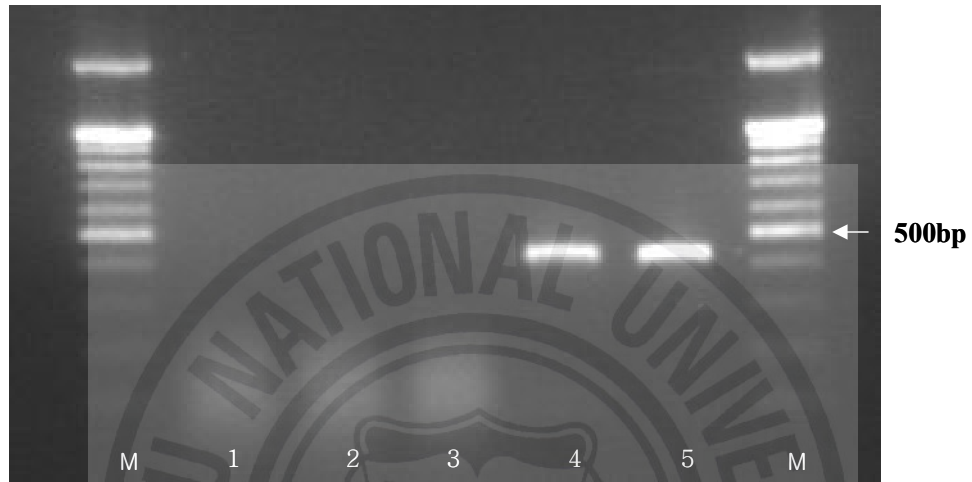


Fig. 30. Detection of VNNV from fertilized eggs and larvae of *E. bruneus* by RT-PCR. M, 100-bp DNA ladder; lane 1, fertilized egg; lane 2, 10 days old; lane 3, 20 days old; lane 4, 30 days old; lane 5, 40 days old.

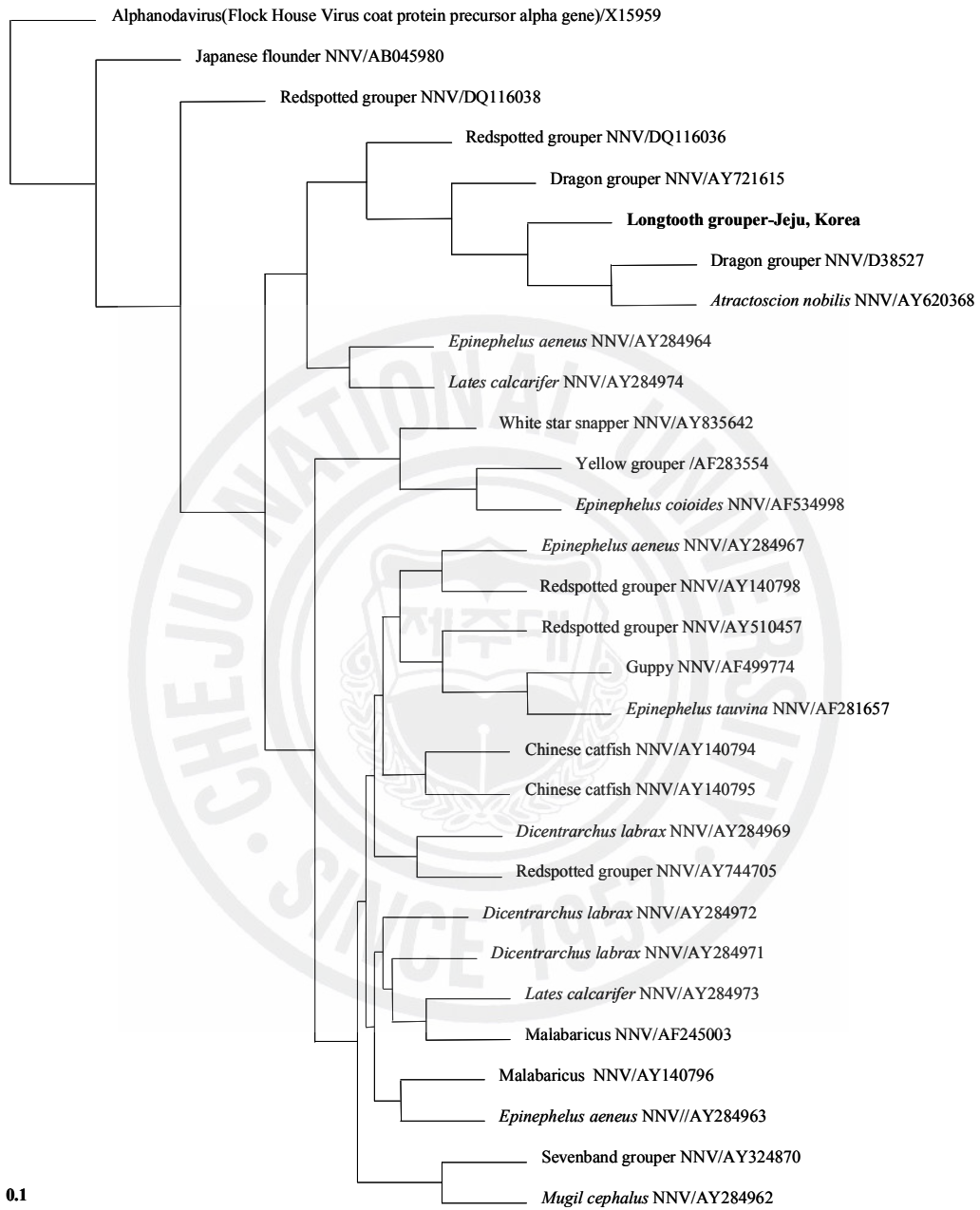


Fig. 31. Phylogenetic tree of nodaviruses isolated from *E. bruneus* larvae.

IV. 고 찰

종묘생산

종묘생산과정에서 수정란이나 자어의 VNN 감염을 예방하기 위해 자외선이나 오존수 등의 물리적 처리와 차아염소산나트륨, 차아염소산칼슘, 요오드 등의 화학적 살균제가 사용되고 있다(Nakai et al., 1995; Arimoto et al., 1996; Tsuchihashi et al., 2002). 요오드는 살균제의 하나로 수정란에는 상대적으로 독성이 적지만 수정란 표면에 감염된 병원균에는 살균력이 강하며, 연어과 어류의 수정란 소독용으로 광범위하게 사용되고 있다(Amend and Pietch, 1972; Ross and Smith, 1972; Inoue et al., 1991). 최근 해산어류를 대상으로 요오드의 처리 시기와 처리 농도 등에 관한 연구가 진행되고 있다. Humpback grouper *C. altivelis*의 경우 VNN을 예방하기 위하여 20 ppm 요오드에서 15분간 수정란을 소독하여 종묘생산에 이용하고 있으며(Sugama et al., 2001), RGNNV를 인위적으로 감염시킨 능성어 *E. septemfasciatus* 수정란을 요오드 50 ppm 농도에서 15분간 소독한 후 수정란 및 부화자어에 대한 nested PCR 검사에서 RGNNV 유전자가 검출되지 않았다(高見 等, 2003). 또한 발생단계별 요오드의 처리 효과와 안정성을 비교한 실험에서 orange-spotted grouper *E. coioides*는 신경배단계에 7.5 ppm 농도에서 10분간 소독하는 것이 적합하다(Tendencia et al., 2001). 그리고 spotted halibut *Verasper variegatus*의 경우 부화 1일전 심장박동시기에 75 ppm 농도에서 15분, 참돔 *Pagrus major*의 경우 상실기 단계에 100~200 ppm 농도에서 5분간 소독하는 것이 적합하며, 적정 유효 농도에서는 성장과 부화 후 비정상개체가 출현하지 않았지만, 고농도에서는 부화율이 낮았다(Hirazawa et al., 1999).

이 연구에서 자바리 수정란 각 발생단계별 요오드 20 ppm 농도에서 15분간 소독 결과 안포형성 이후 배체형성기 단계에서는 소독 후 백탁되는 수정란이 없었고, 부화율도 95.8%로 대조구와 비교하여 유의차가 없었다($P>0.05$). 또한 처리 농도와 처리시간별 실험에서 농도와 처리시간이 증가할수록 부화율이 감소하였고, 비정상개체 발생도 증가하였다($P<0.05$). 따라서 요오드 용액을 사용한 자바리 수정란을 소독할 경우 안포형성 이후 배체형성 단계의 수정란을 20 ppm 농도에

서 15~30분간 처리하는 것이 적당하며, 발생단계에 따른 부화율의 차이는 난할 단계보다 배체형성 이후가 요오드와 같은 외부 자극 인자에 대한 강한 내성에 기인한 것으로 생각된다.

바리과 어류의 종묘생산은 자어 초기사육시기에 높은 사망률이 큰 문제점으로 지적되고 있다(Sawada et al., 1999). 첫 먹이 섭취 시기 자어의 입 크기는 초기 생존율을 높이기 위한 적정 먹이를 선택하는데 중요한 요소가 된다(Hussain and Higuchi, 1980; Kayano, 1988; Kohno et al., 1997). 이 연구에서 자바리 자어의 개구시 상악장 크기는 0.155 ± 0.008 mm로 첫 먹이 섭취시 개구각을 $75 \sim 50^\circ$ 로 가정할 경우 자어의 구경은 $0.109 \sim 0.164$ mm이었다. 청보리멸 *Sillag japonica*의 경우, 첫 먹이 섭취시 입 크기는 $0.128 \sim 0.156$ mm인데 먹이생물의 적정 크기는 $113 \sim 159$ μm 라고 보고 하였다(塚島 等, 1983).

바리과 어류의 종묘생산에서 초기 먹이생물은 로티퍼와 요각류 유생 그리고 굴 유생을 혼합 또는 단독으로 이용하고 있다. Orange-spotted grouper *E. suillus* 자어에 부화 후 2일부터 로티퍼를 20개체/mL 밀도로 공급한 5일째 100% 섭식하였다(Duray, 1994). 그러나 부화 후 5일된 greasy grouper *E. taurina* 자어에 로티퍼를 5개체/mL 밀도로 공급한 경우 위는 대부분 비어 있었다(Randall and Heemstra, 1991).

자바리 종묘생산 과정에서 로티퍼 공급은 부화 후 2일부터 6일까지는 SS형 로티퍼($81 \sim 184$ μm), 부화 후 7일부터 35일까지는 S형 로티퍼($89 \sim 222$ μm)를 수조내 로티퍼 수가 항상 15개체/mL가 유지되도록 공급하였는데, 부화 후 3일째 수조내 전장 2.82 mm 자어의 소화관내에서 처음으로 섭취한 것으로 보이는 로티퍼를 확인할 수 있었다. 그러나 이 연구에서 로티퍼 첫 먹이생물로서 SS형 로티퍼를 자어에 공급하였으나, 자바리 자어의 경우 청보리멸 *S. japonica*와 구경이 비슷하여 150 μm 내외의 일반 S형 로티퍼도 충분히 섭취가 가능할 것으로 생각된다.

능성어 *E. septemfasciatus* 초기 먹이생물의 원활한 섭식을 유도하기 위하여 부화 후 10일까지 24시간 점등을 통한 종묘사육 관리가 자어의 초기 생존율을 향상시켰다(Tsuchihashi et al., 2003b). 이 연구에서도 부화자어의 첫 먹이 섭취를 원활히 해주기 위하여 24시간 점등을 통한 종묘생산을 수행하였지만, 초기 생존율 변화에 대해서는 조사하지 못하였다. 따라서 앞으로 자바리 자·치어 사육과정에서

24시간 점등에 따른 초기 생존율 변화와 부화자어의 stress 등으로 인하여 발생할 수 있는 형태이상 발달 개체와의 상관관계 등 자어 사육생태 특성에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

자바리 자어의 성장은 난황 흡수가 빠르게 진행되는 부화 후 24시간까지는 급격한 증가를 하였으나, 이후 먹이를 섭취하는 부화 후 5일 이내에는 성장이 완만한 증가 또는 거의 정지 상태를 보였다. 이후 자·치어의 성장은 변태시기부터 서서히 증가하기 시작하여 변태 완료 후에 빠른 성장을 보인다. 성장은 변태 시작 시 4.12 ± 0.09 mm에서 변태 완료 시기에 30.74 ± 0.95 mm까지 성장하였으며, 이후 급격한 성장을 하여 부화 후 93일째 93.78 ± 1.98 mm까지 성장하였다. 이와 같은 성장은 능성어 *E. septemfasciatus*, orange-spotted grouper *E. suillus*, camouflage grouper *E. polyphekadion*, humpback grouper *C. altivelis*,의 성장과 유사하였다 (Kitajima et al., 1991; Duary et al., 1997; James et al., 1998; Sugama and Ikenoue. 1999).

VNN

바리과 어류 종묘생산과정에서 발생하는 바이러스성신경괴사증 바이러스(viral nervous necrosis virus, VNNV)는 돌돔 *Oplegnathus fasciatus*에서 처음으로 보고되었다(Yoshikoshi and Inoue, 1990). VNN의 원인 바이러스는 노다바이러스속(Nodaviridae)에 속하는 positive-sense single strand RNA를 genome으로 가지고 있으며, 곤충에 감염되는 노다바이러스와는 다른 특성을 보여 betanodavirus로 분류하였다(Tang et al., 2002). 전 세계적으로 약 30여종의 어류가 이 바이러스에 감염되어 피해를 유발하는 것으로 알려졌으며, 해산어류뿐만 아니라 담수어류에서도 노다바이러스의 감염이 보고되었다(Munday and Nakai, 1997; Chi et al., 2001; Munday et al., 2002; Athanassopoulou et al., 2003; Hegde et al., 2003; Gomez et al., 2004).

어류에서 VNN 질병의 원인바이러스인 노다바이러스는 coat protein gene인 RNA2의 부분적인 nucleotide sequence를 바탕으로 한 분자생물학적 분류기법에 의해 북어류 tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), 전갱어류 striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), 가자미류 barfin flounder nervous necrosis virus

(BFNNV), 능성어류 red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) 등 네 개의 type으로 분류하고 있다(Nishizawa et al., 1999; Chi et al., 2001; Tanaka et al., 2001).

이 연구에서 VNN에 감염된 자바리 치어에서 분리된 VNNV coat protein gene에 대한 유전자형 분석결과는 dragon grouper *E. lanceolatus* (accession NO. 721615), 붉바리 *E. akaara* (accession NO. DQ116038)의 VNNV coat protein gene과 각각 99.2%와 98.0%의 homology를 보여 RGNNV 계통으로 확인되었다. 이러한 결과는 한국에서 양식되는 넙치 *P. olivaceus*, 돌돔 *O. fasciatus*, 능성어 *E. septemfasciatus*에서 분리된 노다바이러스의 분류학적 계통이 RGNNV이라고 보고한 것과 일치한다(Cha, 2005).



제 4장 종합고찰

바리과 어류는 연령과 체중 성장에 따라 암컷으로 먼저 성숙한 후에 개체 중 일부가 수컷으로 성 전환하는 자성선속형 자웅동체 어종이다. 실내사육 중인 바리과 어류의 성 전환은 체중과 성의 분포에 따른 social control로 일어날 수 있다. 대형의 orange-spotted grouper *E. coioides* 암컷을 소형의 암컷과 함께 사육하면 대형의 암컷이 수컷으로 성 전환이 일어나고(Quinitio et al., 1997), 붉바리 *E. akaara*의 암·수 성비가 1 : 1인 경우 수컷의 크기가 암컷보다 크면 암컷이 수컷으로의 성 전환이 억제된다(野上·福永, 1990).

이 연구에서 육상수조에 사육중인 자바리의 자연적 성 전환은 전장 63~99 cm, 체중 4.4~13.2 kg 사이에서 일어났으며, 어체중에 따른 성비 조사 결과 5 kg 이하에서는 25마리 중 암컷 개체가 19마리(76.0%)로 대부분 암컷의 성 특성을 보였지만, 어체중 5 kg 이상의 개체 19마리 중 수컷이 9마리(47.4%)로 암컷(36.8%)에 비해 높게 나타나, 실내 사육수조 내 자바리의 성 전환 시기는 보통 5 kg 이상에서 성 전환이 일어남을 알 수 있다. 그러나 실내수조에서 1.5~3.0 kg 12마리를 1년간 사육한 경우 암컷으로 성숙된 개체가 3마리, 수컷으로 성 전환이 일어난 개체가 1마리로 자바리의 성 현상은 실내수조내 암·수 성 분포에 따라 social control에 의한 성 전환이 일어난다는 것을 암시한다. 앞으로 실내수조에서 자바리의 성 전환 요인과 연령에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

바리과 어류는 수컷을 구하기가 쉽지 않을 뿐 아니라 실내수조에서 자연산란이 어려워 안정적인 수정란 확보가 어려운 실정이다. 바리과 어류의 종묘생산 기술개발을 위한 수정란 생산 방안은 정자를 생산할 수 있는 수컷을 확보하거나, 소형 개체에 옹성호르몬을 투여하여 기능적 수컷을 만들어 정자를 안정적으로 생산해야 한다. 바리과 어류의 인위적 옹성화유도는 주로 옹성호르몬인 MT와 방향화효소 억제물질인 AI 등이 사용되고 있고(Tsuchihashi et al., 2003a; Song, 2004; Alam et al., 2006), 처리 방법은 경구투여, 주사 그리고 implants 방법이 이용되고 있다(Chen et al., 1977; Tukashima and Kitajima, 1983; Hwang et al., 1998; Tsuchihashi et al., 2003a; Song, 2004). 이 연구에서 자바리 소형개체에

implants 방법으로 MT를 2 mg/kg BW로 처리했을때 인위적 옹성화 유도가 가능하였다. 따라서 자바리 종묘생산을 하기 위한 정자 확보 방안으로 자연적 성 전환된 수컷 개체를 확보하기 어려운 경우, 소형개체를 옹성화시켜 정자를 확보하는 것이 효과적인 방안으로 생각된다.

MT 경구투여 또는 주사방법에 의하여 수컷으로 성 전환된 개체가 다음 산란 시기에 수컷으로 지속되지 않고, 일부 암컷으로 되돌아간다(Marino et al., 2000; Sarter et al., 2006). 이 연구에서 수컷으로 성 전환된 개체 중 2~3년 후에 암컷으로 복귀한 개체는 미성숙 시기(1.8~2.3 kg)에 호르몬을 처리한 개체들에서 볼 수 있었다. 이와 같이 미성숙 시기에 MT silastic capsule을 처리한 개체에서 암컷으로의 복귀는 silastic capsule에 들어 있는 옹성호르몬이 지속적으로 작용하다가 capsule내 MT가 없어지자 암컷으로 복귀되는 것으로 판단된다.

어류의 정자 동결보존 연구에서 해동정자를 사용한 인공수정란의 비정상개체 발생은 유전적 구조 변화에 원인이다(Julia et al., 2004). 특히 catfish의 정자는 동결과 해동과정에서 염색체(chromosome set) 변화가 일어나며, 염색체 변화는 비정상개체 발생 원인으로 추정된다(Miskolczi et al., 2005). 초어 *C. idellus*의 정자 동결보존에서 동해방지제 DMSO 농도가 높을수록 비정상개체 발생이 높았고, 그 원인은 동결보존에 따른 정자의 유전적 구조 변화에 기인하는 것으로 추정된다(Dang et al., 2006).

자바리 정자 동결보존에서 각기 다른 DMSO 농도(5.0%, 7.5%, 10.0%)에서 정자동결 후 해동정자를 사용한 인공수정 결과 수정률과 부화율에 있어 DMSO 농도에 따른 유의차는 없었다($P>0.05$). 그러나 DMSO 농도가 증가할수록 해동정자를 사용한 수정란에서 정상개체 발생은 대조구보다 낮게 나타났다($P<0.05$). 동결정자 보관기간에 따른 수정 능력 실험 결과 동결보관 3년째의 해동정자를 사용한 수정란의 수정률과 부화율이 66.8%와 82.0%로 대조구보다 낮았으나($P<0.05$), 다른 어종들의 신선한 정액을 사용한 수정률 또는 부화율 보다 높게 나타나고 있다(Gwo, 1993; Zhang et al., 2003; Dang et al., 2006). 따라서 자바리 정자의 장기보관방법으로 해수어류용 링거액과 10.0% 이내의 DMSO 동해방지제를 사용하여 자바리 정자를 동결보존 한다면 오랜 기간동안 보관할 수 있을 뿐만 아니라 종 보존 차원의 정자보존 방법으로 유용할 것이라고 생각된다.

제주산 능성어 *E. septemfasciatus*에서 12월부터 4월까지 수온을 점차적으로 상승시켜 최종 수온을 21.0℃로 설정하고, 광주기는 12월 9.5L에서 3월에 14L이 되도록 조절하여 조기 성 성숙 유도가 가능하였다(Song, 2004). 이 연구에서 2005년 12월부터 자연광주기에서 17~18℃내외의 제주도 지하해수만을 이용하여 자바리 15개체를 5개월간 사육한 결과 4월에 15개체 중 10개체에서 400~600 μm 의 난모세포를 가지는 성숙개체로 유도가 가능하였다. 이와 같은 결과는 제주도 지하해수와 광주기 조절을 통한 적정 어미관리가 이루어진다면 수온조절에 소요되는 경비부담 없이 조기 성 성숙 유도가 충분히 가능한 것으로 판단된다.

그리고 생식소내 난모세포의 크기(277~520 μm)가 각각 다른 개체에 HCG 500 IU/kg BW 농도로 주사하여 배란 유무를 조사한 결과 400 μm 이하의 난모세포를 가지는 개체에서는 배란이 이루어지지 않았지만, 400~600 μm 사이의 난모세포를 가지는 개체에서는 81.8%가 정상적으로 배란이 이루어졌다. 따라서 자바리의 경우 양질의 수정란을 확보하는 방법으로는 사육수조내 자연산란을 유도할 수 있는 사육환경 시설을 구비하는 것이 최선책이지만, 인위적 성 성숙 유도에 의한 400 μm 이상의 성숙 난모세포를 가지고 있는 개체를 대상으로 호르몬 처리를 통한 난모세포 최종 성숙 및 인공 채란에 의하여 수정란을 확보하는 것도 효과적이라고 생각된다.

어류 형태이상 개체의 발생 원인은 배발생 시기에 유전적 원인, 또는 초기 자·치어의 사육환경 부적합과 영양적 결핍 요인에 의하여 발생한다. 골격계 형태이상은 부레 형태이상으로 초래되며, 부레 형태이상은 부레 형성 초기에 수온과 염분, 빛 등의 물리적 환경요인에 기인한다(Kitajima et al., 1994; Bailey and Doroshov, 1995).

이 연구에서 자바리 치어의 형태이상 부위는 주로 척추골 형태이상과 외부 등 지느러미 함몰 같은 복합적 형태이상이었다. 이와 같은 형태이상의 원인은 크게 3 가지로 나누어 보면 첫째 HCG 호르몬 처리가 난 성숙 및 배란유도 과정에서 최종 난 성숙 과정에 영향을 주었던지, 둘째 자어시기에 유막처리 또는 24시간 연속 점등 등과 같은 사육환경이 부레형성에 장애를 주었던지, 셋째 초기 먹이생물의 영양성분 불균형이 형태이상 개체를 유도한 것으로 생각되나 정확한 발생 원인은 불분명하다. 자바리 종묘의 생산성과 상품성을 저하시키는 형태이상 발생

원인을 정확히 규명하기 위해서는 위에서 언급된 원인들에 대한 지속적인 연구가 요구되며, 특히 부레형성 시기에 자어 사육환경과 부레 형태이상과의 인과관계를 밝힐 수 있는 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

자바리를 비롯한 바리과 어류 종묘생산과정에서 발생하는 VNN 질병은 자·치어 시기에 대량폐사를 유발하는 대표적인 질병으로 알려져 있으며, 국내에서는 가두리에 사육중인 능성어 *E. septemfasciatus* 치어의 여름철 대량폐사 원인을 VNN 감염이라고 보고하였다(Sohn et al., 1998). 일본의 경우도 바리과 어류 종묘생산과정에서 VNN 감염에 의한 안정적 종묘생산이 이루어지지 않고 있다(Tsuchihashi et al., 2002; Tanaka, 2005). 이러한 VNN 발생 예방을 위하여 최근 들어 요오드 또는 오존수에 수정란을 소독하고, 자외선조사 해수나 오존살균수에서 자·치어를 사육을 권장하고 있다(室賀 等, 1993; Nakai et al., 1995; 虫明·有元, 2000; 渡辺, 2000; Tsuchihashi et al., 2002).

이 연구에서 자바리 종묘생산과정에서 발생하는 VNN 발병을 예방하기 위하여 요오드 20 ppm 농도에서 15분간 수정란 소독 후 종묘생산을 수행한 결과 VNNV 음성으로 조사되었고, VNN 증상에 의한 폐사는 일어나지 않았다. 이와 같은 결과로 바리과 어류 종묘생산과정에서 가장 큰 문제점 중에 하나인 VNN을 예방하기 위해서는 VNNV 음성인 수정란을 오존수 또는 요오드액 등 적정 소독액에서 소독 후 종묘생산에 이용할 경우 VNN 감염을 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 자바리의 안정적 수정란 대량생산을 위한 정자확보 방법은 자연에서 정자를 생산할 수 있는 수컷을 확보하거나, 미성어를 기능적 수컷으로 유도하여 정자를 생산하고, 생산된 정자를 동결보존 하는 시스템을 구축한다면 원하는 시기에 수정란을 생산할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 종묘생산과정에서 빈번하게 발생하여 대량 종묘생산을 저해하는 VNN 방지 대책과 상품성을 저하시키는 형태이상 개체의 발생 원인을 분석하고, 형태이상 개체의 발생을 줄일 수 있는 방법에 대한 연구가 이루어진다면 새로운 양식품종 및 제주 특산어종의 자원회복 방안으로 각광받고 있는 자바리 종묘생산기술이 확립될 것으로 생각된다.

V. 요약

자바리 *E. bruneus*는 수심 10~20 m의 암반지역에 서식하며, 제주도에서 자원이 지속적으로 감소하는 가장 중요한 어종 중의 하나이다. 우리나라에서 바리과 어류의 자원회복과 상업적 양식을 위한 종묘생산은 1993년부터 시작하였다. 그러나 수정란 확보문제, 부화자어의 구경에 적합한 초기 먹이생물 부재, VNN같은 바이러스 감염 등으로 인하여 안정적인 대량생산 체제는 이루어지지 않고 있다.

이 연구는 바리과 어류의 일종인 자바리의 완전양식 기술개발을 위하여 실내 사육수조에서의 성 전환과 성 성숙 및 배란 유도, 그리고 수정란, 자·치어 발달과 형태이상발생 개체를 조사하였다. 또한 종묘생산 과정 중 발생한 바이러스성 신경괴사증 바이러스의 유전학적 계통분류를 실시하였다.

1. 성 전환과 정자 동결보존

자연산 자바리 어미 61마리(전장 47~110 cm, 체중 1.5~21.4 kg)를 2002년부터 2006년까지 실내수조에서 사육하면서 성 전환을 조사한 결과 8마리가 암컷에서 수컷으로 성 전환이 일어났다. 성 전환이 일어난 개체의 크기는 전장 63~99 cm, 체중 4.4~13.2 kg이었다. 실내사육수조에서의 안정적 정자 확보를 위해서 MT 2 mg/kg BW implants 방법에 의한 인위적 수컷유도 결과 실험어 20개체 중 13개체에서 기능적 수컷으로 성 전환이 일어났다.

동해방지제 DMSO의 각기 다른 농도(5%, 7.5%, 10%)에서 정자동결 후 해동 정자를 사용한 인공수정 결과 DMSO 농도에 따른 수정률과 부화율은 유의차가 없었다($P>0.05$).

2. 성 성숙, 배란 유도, 난 발생과 자·치어 형태 발달

자연 광주기 조건에서 지하해수의 수온 특성을 이용한 조기 성 성숙 및 배란 유도 가능성을 조사하였다. 실험구는 겨울철 사육수온이 15℃ 이상을 유지하기 위하여 지하해수와 자연해수를 혼합한 혼합수 실험구(15.9~22.8℃)와 지하해수

실험구(17.0~22.7℃)로 나누어 실시하였다.

혼합수를 이용하여 사육한 실험구의 경우 6월 20일 cannulation에 의한 성 성숙도 조사 결과 400 μm 이상의 난모세포를 갖는 성숙 개체는 24마리 중 14마리로 조사되었다. 이들 개체에 HCG (500 IU/kg BW) 투여에 의한 난모세포 최종 성숙 및 배란 유도 결과 14마리 중 9마리에서 배란이 이루어졌다.

지하해수만을 이용하여 사육한 실험구의 경우 4월 25일 cannulation 방법에 의한 성 성숙도 조사 결과 난모세포의 평균크기는 400 μm 이상의 난모세포를 갖는 성숙 개체는 전체 15마리 중 10마리로 조사되었다. 이들 개체에 HCG (500 IU/kg BW) 호르몬 투여에 의한 난모세포 최종 성숙 및 배란 유도 결과 10마리 중 7마리에서 배란이 이루어졌다.

HCG 호르몬 처리에 의해 난 최종 성숙 및 배란 유도된 자바리 암컷의 난과 MT 처리에 의한 기능적 수컷 및 자연적 성 전환된 수컷에서 얻은 정액을 사용하여 습식법으로 인공수정을 유도하였다. 혼합수 실험구의 평균 수정률은 87.1 \pm 8.4%이었고, 지하해수 실험구의 평균 수정률은 90.2 \pm 6.5%이었다.

자바리의 수정란은 보통 1개의 유구를 가지고 있으며, 수정란의 평균 크기는 906.5 \pm 27.5 μm (n=100)이었다. 인공수정에 의한 자바리 수정란의 부화시간은 보통 20℃에서 약 48시간 정도 소요되었다.

부화 후 개구시까지 소요된 시간은 25℃조건에서 난황이 거의 흡수하는 부화 후 3일째, 22℃에서는 부화 후 4일째 개구가 되기 시작하였다. 부화 후 3일부터 4일까지 자바리 자어의 구경 d는 0.219~0.223 mm, 0.75d는 0.164~0.167 mm, 0.5d는 0.109~111 mm이었다.

등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 출현은 부화 후 11일부터 나타났으며, 등지느러미 제 1, 3극은 부화 후 17일부터 나타났다. 등지느러미와 배지느러미는 부화 후 48일째 성어와 비슷한 지느러미로 분화되었고, 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 상대 성장은 전장 8 mm 전후시기에 전장의 40%와 35%로 최대를 보였다.

자바리 외부형태에 따른 형태이상 출현 양상을 조사한 결과 형태이상발생 부위가 두 곳 이상의 복합 형태이상은 88.9%, 단순 형태이상은 11.1%이었다. 척추골의 형태이상 부위는 척주의 전반부, 중반부, 후반부 부위가 각각 39.0%, 27.3%,

33.7%이었다.

3. 종묘생산과 VNN

안포형성이후 배체형성기 단계의 수정란에 소독 농도별과 소독 시간에 따른 부화율을 조사한 결과 요오드 농도 5, 10, 20 ppm에서 15분과 30분 소독 처리한 경우 부화율은 95.8~100%로 대조구와 유의차가 없었다($P>0.05$). 그러나 40 ppm과 80 ppm 농도에서 15분과 30분 소독 처리한 경우의 부화율은 53.8~84.7%로 대조구에 비해 낮았다($P<0.05$). 그리고 각 소독 농도 및 소독 시간에 따른 비정상 개체 발생률은 40 ppm 15분 처리구에서는 12.1%, 80 ppm 15분과 30분 처리구에서는 각각 33.1%와 65.1%로 대조구에 비해 높게 나타났다($P<0.05$). 안포형성 이전 단계의 수정란에 소독한 경우 부화율은 9.9~45.3%로 대조구(98.2%)에 비해 낮게 나타났다($P<0.05$). 그러나 안포형성이후 배체형성기 단계에 소독한 경우 부화율은 95.8%로 대조구와 유의차가 없었다($P>0.05$).

자바리 대량 종묘생산과정에서 수정란 소독 유무에 따른 VNN 발병 여부를 조사한 결과 2005년 수정란 소독을 하지 않고 부화시킨 수정란에서 부화 후 10일과 28일에 VNN이 검출되었으며, 부화 후 60일까지의 최종 생존율은 0.06%이었다. 2006년 유효 요오드 20 ppm 농도에서 15분간 수정란을 소독한 후 종묘생산 결과 부화 후 60일까지 VNN이 검출되지 않았으며, 부화 후 60일까지의 최종 생존율은 10.1%이었다. 2005년도 발생한 바이러스성신경괴사증에 감염된 실험어로부터 분리된 VNNV의 coat protein gene에 대한 유전자형 분석결과 dragon grouper, *E. lanceolatus*, 붉바리 *E. akaara*의 VNNV coat protein gene과 각각 99.2%와 98.0%의 homology를 보여 이 연구에서 조사된 VNNV는 red-spotted grouper nervous necrosis virus와 동일한 RGNNV type으로 조사되었다.

참 고 문 헌

- Aida, K., 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms in teleosts. Bull. inst. Zool., Academia Sinica, Monograph., 16, 173-187.
- Akiyama, T., T. Murai and K. Mori, 1989. Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. Bull. Japan Soc. Fish., 52, 1249-1254.
- Alam, M. A., R. K. Bhandari, Y. Kobayashi, K. Soyano and M. Nakamura, 2006. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. Aquaculture, 255, 532-535.
- Amend, D. F. and J. P. Pietch, 1972. Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29, 61-65.
- Andrades, J. A., J. Becerra and P. Fernández-Llebrez, 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture, 141, 1-11.
- Arimoto, M., J. Sato, K. Maruyama and I. Furusawa, 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Aquaculture, 143, 15-22.
- Asahina, K. and I. Hanyu, 1983. Role of temperature and photoperiod in annual reproductive cycle of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 49, 61-67. (in Japanese)
- Asahina, K., I. Iwashita, I. Hanyu and T. Hibiya, 1980. Annual reproductive cycle of bitterling, *Rhoreus ocellatus*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46, 299-305. (in Japanese)
- Athanassopoulou, F., C. Billinis, V. Psychas and K. Karipoglou, 2003. Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* farmed in fresh water in Greece. J. of Fish Dis., 26, 361-365.

- 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.
- Baek, H. J. and T. Y. Lee, 1985. Experiment studies on the mechanism of reproductive cycle in the longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus* (HILGENDORF). *Bull. Korea Fish. Soc.*, 18, 243-252. (in Korean)
- Bagarinao, T., 1986. Yolk absorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. *Marine Biology*, 91, 449-459.
- Bailey, H. C. and S. I. Doroshov, 1995. The duration of the interval associated with successful inflation of the swimbladder in larval striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 131, 135-143.
- Battaglione, S. C. and R. B. Talbot, 1993. Effects of salinity and aeration on survival of and initial swim bladder inflation in larval Australian bass. *Prog. Fish. Cult.*, 55, 35-39.
- Baynes, S. M. and A. P. Scott, 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa : the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66, 53-67.
- Blaxter, J. H. S. and G. Hempel, 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 28, 211-244.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie, 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture*, 65, 371-374.
- Bromage, N., M. Porter and C. Randall, 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, 197, 63-98.
- Cahu, C., J. Z. Infante and T. Takeuchi, 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227, 245-258.
- Caris, M. G. and S. D. Rice, 1990. Abnormal development and growth reductions of pollock *Theragra chalcogramma* embryos exposed to

- water-soluble fractions of oil. Fish. Bull. US, 88, 29-37.
- Cha, S. J., 2005. Genetic characteristics of nodaviruses isolated from cultured fishes in Korea. Ph. D. thesis, Univ. of Ulsan, Ulsan, Korea, 82pp. (in Korean)
- Chao, N. H., H. P. Chen and I. C. Liao, 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. Aquaculture, 5, 389-406.
- Chao, T. M. and L. C. Lim, 1991. Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 19, 79-93.
- Chao, T. M. and M. Chow, 1990. Effects of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tawina* (Forsk.). Singapore J. Pri. Ind., 18, 1-14.
- Chatain, B., 1982. Contribution à l'étude de l'élevage larvaire de la dorade japonaise (*Chrysophrys major*). Thèse de 3e cycle, Université d'Aix-Marseille II, France, 121 pp.
- Chatain, B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). Aquaculture, 119, 371-379.
- Chauvet, C., 1988. Study of the growth of the grouper *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) from the Tunician coasts. Aquatic Living Resources, 1, 277-288.
- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim, 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tawina* (Forsk.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 5, 1-21.
- Chi, S. C., B. J. Lo and S. C. Lin, 2001. Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). J Fish Dis., 24, 3-13.
- Clyde, S. T., A. Harry and C. S. Lee, 1992. Fatty acid and free amino acid profiles of spawned eggs of striped mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 105, 83-94.
- Dang, T. M., M. A. Pham, A. T. Pham and K. J. Lee, 2006. Effect of dimethyl-sulfoxide on sperm cryopreservation of grass carp (*Ctenopha-*

- ryngodon idellus*). J. of Aquaculture, 19, 52-59.
- De Vlaming, V. L., 1972. Environmental control of teleost reproductive cycles : a brief review. J. Fish. Biol., 4, 131-140.
- De Vlaming, V. L., 1975. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus rhyoleucas*. Biol. Bull., 148, 402-415.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter, 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In : Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. Eds., Fish Physiology. Reproduction, Vol. IX B, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351-403.
- Dreanno, C., M. Suquet, L. Quemener, J. Cosson, F. Fierville, Y. Normant and R. Billard, 1997. Cryopreservation of turbot spermatozoa. Theriogenology, 48, 589-603.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple-range test and multiple F test. Biometrics, 11, 1-42.
- Duray, M. N., 1994. Daily rates of ingestion on rotifer and *Artemia* nauplii by laboratory-reared grouper larvae of *Epinephelus suillus*. Philipp. Sci., 31, 32-41.
- FAO. 1993. FAO species catalogue Vol. 16. Groupers of the world. FAO, Rome, pp. 119-120.
- Fukuhara, O., 1989. A review of the culture of grouper in Japan. Bull. Nansei. Reg. Fish. Res. Lab., 22, 47-57.
- Fyhn, H. J., 1989. First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy? Aquaculture, 80, 111-120.
- Glamuzina, B. N. Glavić, P. Tutman, V. Kožul and B. Skaramuca, 2000. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1875). Aquaculture International, 8, 551-555.
- Gomez, D K., J. Sato, K. Mushiake, T. Isshiki, Y. Okinaka, and T. Nakai,

2004. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. of Fish Dis.*, 27, 603-608.
- Gwo, J. C., 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39, 1331-1342.
- Gwo, J. C. and C. R. Arnold, 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: Evaluation of morphological changes. *J. of Exp. Zool.*, 264, 444-453.
- Gwo, J. C., K. Strawn, M. T. Longnecker and R. Connie, 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94, 355-375.
- Hamamoto, S., K. Yokogawa and M. Tochino, 1986. Several problems on cultivating the parent fish of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schegel), and judging the qualities of the eggs obtained from them. *Bull. Kagawa Pref. Fish. Exp. Stn.*, 2, 13-22.
- Harmin, S. A. and L. A. Crim, 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analogue (GnRHa) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture*, 104, 375-390.
- Hassin, S. D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar and D. M. Popper, 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus*. 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156, 305-316.
- Haya, K., 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 381-391.
- Hegde, A., H. C. Teh, T. J. Lam and Y. M. Sin, 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol.*, 148, 575-586.
- Hinton, D. E., P. C. Baumann, G. R. Garden, W. E. Hawkins, J. D. Hendricks, R. A. Murchelano and M. S. Okihiro, 1992. Histopathological biomarkers. in: *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (ed. by R. J. Hugett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle

- and H. L. Bergman). Lewis, Boca Raton, FL, pp. 155-209.
- Hirazawa, N., T. Hara, T. Mitsuboshi, J. Okazaki and K. Hata, 1999. Iodophor disinfection of eggs of spotted halibut *Verasper variegatus* and red sea bream *Pagrus major*. Fish. Sci., 65, 333-338.
- Hodson, R. and C. V. Sullivan, 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. Aquacult. Fish. Manage., 24, 389-398.
- Hunter, J. R., 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. in: Marine fish larvae-morphology. Ecology and Relation to Fisheries (ed. by R. I. Lasker). Univ. Washington Press. Seattle and London, pp. 33-77.
- Hussain, N. A. and M. Higuchi, 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). Aquaculture, 19, 339-350.
- Hwang, S. I., 1999. Artificial control in sex and reproduction cycle of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. Thesis Cheju Nat'l. Univ., 118 pp. (in Korean)
- Hwang, S. I., Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho, 1998. Gonadal development and the effect of 17 α -methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. of Aquaculture, 11, 173-182. (in Korean)
- Imai, C. and S. Tanaka, 1987. Effect of sea water temperature on egg size of Japanese anchovy. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 2169-2178. (in Japanese)
- Inoue, K., F. Ikeya, T. Yamazaki and T. Hara, 1991. Virucidal activities of various germicides to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Fish Pathol., 26, 189-194.
- Inoue, M., 2001. Effects of water temperature on feeding and growth of juvenile kelp grouper, *Epinephelus moara*. Bull. Fish. Res. Inst. Mie, 9, 35-38. (in Japanese)

- James, C. M., S. A. AL-Thobaiti, B. M. Rasem and M. H. Carlos, 1998. Comparative growth of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* and camouflage grouper, *E. polyphakadioides* under hatchery and growout culture conditions. *Asian Fisheries Science*, 11, 133-147.
- Jamieson, B. G. M., 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York. pp. 319.
- Johnson, A. K., P. Thomas and R. R. Wilson Jr., 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *J. of Fish Bio.*, 52, 502-518.
- Johnson, G. D. and P. Keener, 1984. Aid to the identification of American grouper larvae. *Bull. Mar. Sci.*, 34, 106-134.
- Julia, K., K. Eugeny, Z. Tiantian, M. R. David and V. H. William, 2004. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 61, 1661-1673.
- Kashiwaki, M., H. Sakai, T. Takahashi and T. Iwai, 1987. A relationship between egg size and hatching rate in Japanese whiting *Sillago japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 2105-2110.
- Kawabe, K., 1999. Evaluation of common s-type rotifer as an initial food for the larvae of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. *Suisanzoshoku*, 47, 403-408. (in Japanese)
- Kawamura, K. and K. Hosoya. 1991. A modified double staining technique for making a transparent fish-skeletal specimen. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 20, 11-18. (in Japanese)
- Kayano, Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Saibai. Giken.*, 3, 55-60. (in Japanese)
- Kayano, Y., 1996. Yearly change in egg production of the red spotted grouper,

- Epinephelus akaara* in a rearing tank. Saibai. Giken., 25, 47-52. (in Japanese)
- Kim, B. H., K. M. Kim, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho, 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. I. The effect of hCG on ovulation induction. J. of Aquaculture, 10, 55-61. (in Korean)
- 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)
- Kim, S. G. and S. Park, 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bull. of NFRD, 101, 137-140. (in Korean)
- Kim, S. H. and P. H. Kim, 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bull. of NFRD, 101, 162-167. (in Korean)
- Kim, Y. and S. B. Hur, 1991. Spawning inducement of flounder, *Paralichthys olivaceus* by the control of water temperature and photoperiod. J. of Aquaculture, 4, 85-95. (in Korean)
- Kitajima, C., 1978. Acquisition of fertilized eggs and mass culture of juveniles of red sea bream, *Pagrus major*. Spec. Rep. 5, Nagasaki Prefecture Institute of Fisheries, 92 pp.
- Kitajima, C., M. Takaya, Y. Tsukashima and T. Arakawa. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. Japan J. Ichthyol., 38, 47-55. (in Japanese)
- Kitajima, C., T. Watanabe, Y. Tsukashima and S. Fujita. 1994. Lordotic deformation and abnormal development of swimbladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. J. World Aqua. Soc., 25, 64-77.
- Knutsen, G. M. and S. Tilseth, 1985. Growth, development, and feeding

- success of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* related to egg size. Trans. Ameri. Fish. Soc., 114, 507-511.
- Kohno, H., R. Ordonio-Aguilar, A. Ohno and Y. Taki, 1997. Why is grouper larval rearing difficult?: an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. Ichthyl. Res., 44, 264-274.
- Kuo, C. M., C. E. Nash and Z. H. Shehadeh, 1974. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 3, 1-14.
- Kuo, C. M., Y. Y. Ting and S. L. Yeh, 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. Aquaculture, 74, 113-126.
- Lam, T. J., 1982. Application of endocrinology of fish culture. Can. J. Aquat. Fish. Sci., 39, 11-137.
- Lee, C. K. and S. B. Hur, 1997. Yolk absorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. of Aquaculture, 10, 473-483. (in Korean)
- Lee, C. K., S. B. Hur, T. K. Ko and S. Park, 1998. Maturation, sex ratio and sex-reversal of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. of Aquaculture, 11, 573-580. (in Korean)
- Lee, T. Y., I. Hanyu and K. Furukawa, 1984. Effects of photoperiod and temperature on the gonadal activity in small filefish, *Rudarius ercodes*. Bull. Korean Fish. Soc., 17, 523-528. (in Korean)
- Lee, Y. D., S. H. Park, A. Takemura and K. Takano, 2002. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycle in the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra* in Okinawa waters. Fisheries Science, 68, 872-877.
- Lim, H. K. and Y. J. Chang, 1998. Effect of diluents and cryoprotectants on cryopreservation of black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm.

- J. of Aquaculture, 11, 67-75. (in Korean)
- Lim, L. C., T. M. Chao and L. T. Khoo, 1990. Observations on the breeding of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.). Singapore J. of Primary Industry, 18, 66-84.
- Manabe, S. and A. Kasuga, 1988. Spawning behavior and early life history of *Epinephelus moara* in an aquarium. J. of Japanese Asso. of Zoo. Gar. and Aqua., 30, 16-24.
- Marino, G., E. Azzurro, M. G. Finoia, M. T. Messina, A. Massari and A. Mandrich, 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Cahiers Options Mediterraneenes, 47, 215-225.
- Miskolczi, E., S. Mihalfy, E. P. Varkonyi, B. Urbanyi and A. Horvath, 2005. Examination of larval malformation in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. Aquaculture, 247, 119-125.
- Moe, M. A. J., 1969. Biology of the red grouper, *Epinephelus morio* (Valenciennes), from the eastern Gulf of Mexico. Florida Dept. Res. Prof. Pap., 2207, 1-20.
- Munday, B. L. and T. Nakai, 1997. Special topic review: Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. World J. Microbiology & Biotechnology, 13, 375-381.
- Munday, B. L., J. Kwang and N. Moody, 2002. Betanodvirus infections of teleost fish : a review. J. Fish Dis., 25, 127-142.
- Nakai, T., K. Mori, T. Nishizawa and K. Muroga, 1995. Viral nervous necrosis of larval and juvenile marine fish. Proceedings of the international symposium on biotechnology applications in aquaculture, Asian Fisheries Society Special Publication No. 10, 147-152.
- Nishi, K. and K. Takano, 1979. Effects of photoperiod and temperature on the ovary of the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bull. Fac. fish.

- Hokkaido Univ., 30, 63-73. (in Japanese)
- Nishizawa T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga, 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 103-107.
- Nishizawa T., R. Takano, and K. Muroga, 1999. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 80, 3023-3027.
- Okada, T., H. Yoneshima, Y. Mukai and Y. Sawada, 1996. Tolerance limits of young kelp grouper, *Epinephelus moara* for environmental stress. *Bull. Fish. Lab. Kinki Uni.*, 5, 139-146.
- 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.
- Ott, A. G. and H. F. Horton, 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) egg with cryopreserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28, 1915-1918.
- Paperna, I., 1978. Swimbladder and skeletal deformations in hatchery bred *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.*, 12, 109-114.
- Park, M. E., 2000. Control of reproductive mechanism related to parturition of black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Ph.D. Thesis, Thesis Cheju Nat'l. Univ., 130 pp. (in Korean)
- Patterson, H. M., S. R. Thorrold and J. M. Shenker, 1999. Analysis of otolith chemistry in nassau grouper (*Epinephelus striatus*) from the Bahamas and Belize using solution-based ICP-MS. *Coral reefs*, 18, 171-178.
- Piron, R. D., 1978. Spontaneous skeletal deformities in zebra danio (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity test. *J. Fish Biol.*, 13, 79-83.
- Quinitio, G. E., N. B. Caberoy, and D. M. Reyes Jr., 1997. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Isr. J.*

- Aquaculture, Bamidgeh., 49, 77-83.
- 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.
- Randall, J. E. and P. C. Heemstra, 1991. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae). With descriptions of five new species. Indo-Pacific Fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum. Honolulu, Hawaii, pp. 322.
- Rasem, B. M., C. M. James, S. A. Al-Thobaiti and M. H. Calos, 1997. Spawning of the camouflage grouper, *Epinephelus polyphekadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of Saudi Arabia. Asian Fisheries Science, 9, 251-259.
- Razani, H. and I. Hanyu, 1986. Annual reproductive cycle 2~3 years old female goldfish and its artificial modification by manipulations of water temperature and photoperiod. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52, 965-969. (in Japanese)
- Rimmer, M. A., K. C. Williams, M. J. Phillips and H. Kongkeo, 1999. Development of a regional cooperative network for grouper aquaculture research. Joint APEC/NICA/NACA workshop on "grouper research and development", Asia-Pacific Economic Cooperation/National Institute of Coastal Aquaculture/Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific. Hatyai, Thailand, 1-10.
- Ross, A. J. and C. A. Smith, 1972. Effects of two iodophors on bacterial and fungal fish pathogens. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29, 1359-1361.
- Sadovy, Y. J., T. J. Donaldson, T. R. Graham, F. McGilvray, G. J. Muldoon, M. J. Phillips, M. A. Rimmer, A. Smith and B. Yeeting, 2003. While stocks last: The live reef food fish trade. Asian Development Bank, Manila, Philippines, pp. 8-19.
- Sarter, K., M. Papadaki, S. Zanuyan and C. C. Mylonas, 2006. Permanent sex inversion in 1-years-old juveniles of the protogynous duskey grouper

- (*Epinepelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256, 443-456.
- Sawada, Y., K. Kato, T. Okada, M. Kurata, Y. Mukkai, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai, 1999. Growth and morphological development of larval and juvenile *Epinepelus bruneus* (Perciformes: Serranidae). *Ichthy. Res.*, 46, 245-257. (in Japanese)
- Shein, N. L., 2000. A new method for induction of ovulation using LHRH analogue in cultured sevenband grouper. MS. thesis, Nagasaki Univ., Nagasaki. Japan, 53 pp. (in Japanese)
- Shimizu, A. and K. Hanyu, 1982. Environmental regulation of annual reproductive cycle in a spring-spawning bitterling *Aschelilognathus tabra*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1563-1568. (in Japanese)
- Shirota, A., 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 36, 353-368. (in Japanese)
- Sohn, S. G., M. A. Park, M. J. Oh and S. K. Chun, 1998. A fish nodavirus isolated from cultured sevenband grouper, *Epinepelus septemfasciatus*. *J. Fish Pathol.*, 11, 97-104. (in Korean)
- Song, Y. B., 2004. Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinepelus septemfasciatus*. Ph. D. thesis, Cheju Nat'l Univ., Jeju. Korea, 120 pp. (in Korean)
- Sugama, K. and H. Ikenoue, 1999. Research and development: The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA., pp. 53.
- Sugama, K., Tridjoko, B. Slamet, S. Isumi, E. Setiadi and S. Kawahara, 2001. Manual for the seed production of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency, 37 pp.
- Tamaru, C. S., C. T. Carlstrom, Jr. W. J. Fitzgerald and H. Ako, 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper,

- Epinephelus microdon* capture from spawning aggregations in the republic of Palau, Micronesia, J. World Aqua. Soc., 27, 363-372.
- Tanaka, S., 2005. Studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Bull. Fish. Res. Div, 12, 53-94.
- Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto and T. Nakai, 2001. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. J. Fish Dis. 24, 15-22.
- Tang, H. C., J. Y. Twu and W. C. Su, 1979. Preliminary report on artificial propagation of black spotted grouper, *Epinephelus amblycephalus* Bleeker. Bull. Taiwan Fish. Res. Inst., 31, 511-517.
- Tang, L., C. S. Lin, N. K. Krishna, M. Yeager, A. Schneemann and J. E. Johnson, 2002. Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodavirus. J. of virology, 76, 6370-6375.
- Tan-Fermin, J. D., L. M. B. Garcia and A. R. Jr. Castillo, 1994. Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes) by injections of 17 α -methyltestosterone. Japan J. Ichthyol., 40, 413-420.
- Tendencia, E. A., 2001. Effect of iodine disinfection on the bacterial flora and hatching rate of grouper, *Epinephelus coioides* eggs at the cleavage and eyed stages. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 21, 160-163.
- 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.
- Tsuchihashi, Y., H. Tanaka, Y. Kuromiya, M. Kashiwagi and M. Yoshioka, 2003a. Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51, 189-196. (in Japanese)
- Tsuchihashi, Y., I. Kuriyama, Y. Kuromiya, M. Kashiwagi and M. Yoshioka, 2002. Control of viral nervous necrosis (VNN) in Seedling Production

- of sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 50, 355-361. (in Japanese)
- Tsuchihashi, Y., I. Kuriyama, Y. Kuromiya, M. Kashiwagi and M. Yoshioka, 2003b. Effects of water temperature, illumination and feed oil addition on the survival of larvae in the mass seed production of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51, 49-54. (in Japanese)
- Tukashima, Y. and C. Kitajima, 1983. Acceleration of sex reversal from immature female into functional males through oral administration of methyltestosterone in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (THUNBERG), Bull. Nagasaki Pre. Ins. Fis., 9, 55-57.
- Watanabe, K., S. Araki, M. Tenshin, T. Narita and T. Akizuki, 1985. Rearing experimental of larval grouper. Bull. Tokushima Fish. expl. Stn, 18-19.
- Watanabe, W. O., C. S. Lee, S. C. Ellis and E. P. Ellis, 1995. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolk sac larvae of the nassau grouper *Epinephelus striatus*. Aquaculture, 136, 141-147.
- Weis, J. S. and P. Weis, 1989. Effects of environmental pollutants on early fish development. Aquat. Sci., 1, 45-73.
- Wiegand, M. D., J. M. Hataley, C. L. Kitchen and L. C. Buchanan, 1989. Induction of developmental abnormalities in larval goldfish, *Carassius auratus* L., under cool incubation condition. J. Fish Biol., 35, 85-95.
- Williams, K., C. Barlow and F. D'Souza, 1998. Larval penaeid and grow-out finfish nutritional research in Australia. Proceedings of the Grouper Aquaculture Research Workshop, Bangkok, Thailand. pp. 15-20.
- Williams, T. W., 1941. Alizarine red S and toluidine blue for differentiating adult and embryonic bone and cartilage. Stain Technol., 16, 23-25.
- Yamamoto, T., 1976. Fertilizing capacity of dog salmon spermatozoa in Ringer's solution, with special reference to the effect of dilution. Japan J. Ichthyol., 23, 88-92.

- Yoshikoshi, K. and K Inoue, 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). J. of Fish Diseases, 13, 69-77.
- 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 practical methodology. Theriogenology, 60, 989-996.
- 高見生雄, 中井敏博, 杉原志貴, 2003. マハタのVNN(ウイルス神経壊死症)の防除対策に関する研究. 平成14年度長崎県総合水産試験場事業報告, 198-199.
- 渡辺研一, 2000. マツカワに発生ウイルス性神経壊死症の防除対策に関する研究. 特別研究報告 15号, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京.
- 濱本俊策・具鍋三郎・春日 公・野坂克巳, 1986. ヤイトハタ *Epinephelus salmonoides* (LACEPEDE) の水槽内産卵と生活史. 栽培技研, 15, 143-155.
- 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖, 1993. 総説シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, 46, 473-480.
- 野上欣也・福永恭平, 1990. 栽培漁業と新養性技術-キジハタ種苗生産. 水産の研究, 9, 103-109.
- 伊島 時郎・阿部 登志勝・平川 京三郎・鳥島嘉明, 1986. 長日処理にヒラメ早期採卵. 栽培技研, 15, 57-62.
- 照屋和久・升間主計・本藤 靖, 1992. 水槽でのスジアの産卵および産卵行動. 栽培技研, 21, 15-20.
- 塚島康生・吉田範秋・北島 力・松村清治, 1983. 小形シオミズツクムシお用いたシロギスの種苗生産. 水産増殖, 30, 202-210.
- 虫明敬一・有元 操, 2000. シマアジのウイルス性神経壊死症 (VNN) に防除対策. 栽培技研, 28, 47-55.
- 萱野倭久, 1988. キジハタ仔稚魚の口器の発達と攝餌. 剛山水試報, 3, 55-60.

감사의 글

부족함이 많은 저를 학문의 길로 들어서게 해주시고 항상 친자식 같은 마음으로 이 논문이 완성되기까지 늘 격려와 지도로 일관 해주신 이영돈 교수님께 진심으로 감사드립니다. 새로운 일을 시작하면서 바쁘신 중에도 부족한 논문을 꼼꼼하고 정성스럽게 다듬어주신 노 섬 교수님과 이기완 교수님, 바쁜 업무 중에도 논문의 체계와 영문 교정을 바로 잡아주신 이정의 소장님, 멀리 강원도에서 날카로운 비평과 풍부한 지식을 전해주고 논문을 교정해 주신 김형배 교수님께 감사드립니다. 그리고 증식학과 시절부터 많은 관심과 지도를 해주신 정상철 교수님, 최광식 교수님, 이경준 교수님께도 감사드립니다.

어려운 여건 속에서도 이 연구 수행이 원활하게 될 수 있도록 배려해주시고 따뜻한 격려를 해주신 해양수산자원연구소의 김수완 소장님, 김문관 과장님, 김대환 과장님을 비롯한 연구원분들과 직원여러분 그리고 해양수산본부의 이종만 본부장님, 홍성삼 과장님을 비롯한 저를 아는 모든 분들께 이 지면을 빌어 다시 한번 감사드립니다.

자신의 일도 마다하고 밤을 세워가며 초안 작성에서부터 완성되는 날까지 함께 고민하고 자료 정리를 도와준 후배이자 동기인 송영보 박사께 고마움을 전하며, 실험실 선배의 일이라고 굶은일도 마다 않고 많은 도움을 준 발생학실험실의 이치훈 실장과 임봉수 박사 및 후배들, 어류골격표본 제작 및 분석에 많은 시간을 할애해준 해양환경연구소의 김병직 박사님, 해연수산의 서종표 사장님, HiDi의 김병호 박사님과 나오수님을 비롯한 해성회 모든 분들께 깊은 감사를 드립니다.

지금까지 어려움 속에서도 한없는 사랑과 정성으로 뒷바라지에 고생하신 어머님과 맞벌이하는 우리부부를 대신해 우리 아이들을 살갑게 보살펴 주신 장모님께 이 작은 결실로나마 보답해 드리고자 합니다. 그리고 지금까지 막내 동생을 이해하고 도와준 형님과 누님 가족 모두에게 감사드리며, 항상 옆에서 애정과 사랑으로 격려해준 처가댁 형님 내외분들과 친 형제처럼 우리 아이들을 돌봐준 조카들에게 고마움을 느낍니다.

늘 무슨 일이든 이해하며 믿고 따라주는 사랑하는 아내와 바쁘다는 핑계로 많은 시간을 함께하지 못하는 귀여운 아들 정현이, 정윤이와 이 기쁨을 함께 나누며

막내아들의 이 순간을 보시길 원했지만 못 보시고 작고하신 아버님 영전에 이 논문을 바칩니다.

끝으로 도움을 주신 모든 분들을 일일이 열거 할 수 없지만 가정에 건강과 행복이 깃드시길 바라옵고 앞으로 보다 나은 연구자의 모습을 보여드릴 것을 약속드리며 다시 한번 깊은 감사를 드립니다.