



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](#)

석사학위논문

성 성숙 유도를 통한 붉바리
(Red spotted grouper, *Epinephelus akaara*)
F3의 수정란 생산과 치어의 성장

제주대학교 산업대학원

중식학과

김 채 림

2020년 2월

Fertilized egg production and juvenile of growth in
the F3 red spotted grouper, *Epinephelus akaara* by
induction of sexual maturity.

Che-Rim Kim

(supervised by professor Young-Don Lee)

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

2020. 2

MARINE LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

성 성숙 유도를 통한 붉바리(Red spotted grouper, *Epinephelus akaara*) F3의 수정란
생산과 치어의 성장

지도교수 이 영 돈

김 채 림

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2019년 12월

김채림의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 여 인 규 (인)

위 원 정 준 범 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

제주대학교 산업대학원

2019년 12월

목 차

I. 목차	i
II. List of figures	iii
III. List of tables	v
IV. Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험어 사육관리 및 사육환경 조절	3
1) 어미 사육관리	3
2) 광주기 및 수온 조절	3
2. 생식소 발달	6
3. 난 성숙도 조사	7
4. 배란유도를 위한 HCG 주사	9
5. 수정란 생산	11
6. 불بار리 자·치어 사육	14
III. 결과	15
1. 사육관리	15
2. 생식소 발달	18
3. 배란유도와 수정란 생산	23
1) 난경 분포	23
2) HCG주사 후 채란 및 수정란 생산	23
4. 난 발생과 부화율	29

5. 불바리 F3 치어의 성장	33
IV. 고찰	36
V. 참고문헌	39

List of figures

Fig. 1. Adult fish rearing water tank attached LED lamp for inducing sex maturation.	5
Fig. 2. Maturity survey by canonization. A, cannulation; B, body weight measurement; C, body length measurement.	8
Fig. 3. HCG hormone injection. A, HCG hormone solution. ; B, hormone treatment by syringe. C, egg collection by using abdominal pressure.	10
Fig. 4. Fertilized egg production process.	12
Fig. 5. Hatching rate survey of fertilized egg.	13
Fig. 6. External feature of gonads livers in <i>E. akaara</i> . testis (A) and ovary (B) and male liver (C) and female liver (D).	20
Fig. 7. Photograph of the male and female gonad in <i>E. akaara</i> . A, male gonad; B, female gonad. Sg, Spermatogonia; Sc, Spermatoocytes; Sp, spermatozoon; No, nucleolus; N, nucleus; Fl, follicle layer; Yg, yolk globule; Zr, zona radiata; Od, Oil droplet. Scale bars indicate 20 μ m.	21
Fig. 8. Photograph of the male and female liver in <i>E. akaara</i> . A, male liver; B, female liver. er, erythrocyte; Hp, hepatocyte; bv, blood vessel. Scale bars indicate 50 μ m.	22
Fig. 9. Diameters of obtained egg by cannulation F2, F3 egg of <i>E. akaara</i> . A, F2 ; B, F2 control group ; C, F3 : D, Average of diameter of obtained egg in F2 and F3 <i>E. akaara</i>	24
Fig. 10. Egg size and shape change. A, F1 obtained egg from cannulation ; B, obtained egg after HCG injection 48hr; C, fertilized egg. A, B, C Scale bar=100 μ m.	27

Fig. 11. Frequency in diameters of the fertilized egg in F2, F3 *E. akaara*.
 A, F2 ; B, F3 ; C, Average diameter of fertilized egg in F2, F3 *E. akaara*. 28

Fig. 12. Fertilized egg development of *E. akaara*. A, fertilized egg; B, 2 cell; C, 4 cell; D, 8 cell; E, 16 cell; F, 32cell; G, morula stage; H, blastula stage; I, J, gastrula stage; K, lens and ear vesicle; L, hatched larva. Scale bar=100 μ m. 31

Fig. 13. Hatching rate of fertilized egg. 32

Fig. 14. External feature of juvenile F3 in 78 days after fertilization. 34

List of tables

Table 1. Diet supply during rearing from March to June 2019	16
Table 2. Mortality during rearing from March to June 2019	17
Table 3. Total body weight and length and gonad weight and liver weight of F1 <i>E. akaara</i>	19
Table 4. Total body weight and length and squeezed maturation egg of F1 and body weight after squeezed of F1 <i>E. akaara</i>	25
Table 5. Total body weight and length and squeezed maturation egg of F2 and body weight after squeezed of F2 <i>E. akaara</i>	26
Table 6. Time required by development stage of fertilized egg of <i>E. akaara</i> (water temperature: 23°C)	30
Table 7. Growth of Juvenile F3 in 78 days after hatching	35

Abstract

In order to ensure the competitiveness of aquaculture of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* through breeding, the seed production of high colorful and growth are necessary. The study examined, selected and raised seeds of rapid growth and excellent color with adult fish (F2), and the hatching rate of fertilized eggs and growth of juvenile fish by production of F3.

For four months, *E. akaara* F2 are maintained under 14L:10D photo-conditions and water temperature of $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.6 ± 0.2 , and DO 7.8 ± 0.8 mg/L. A mature *E. akaara* was selected and injected into the dorsal muscle at a concentration of 16 ml (5IU) HCG/g BW. After HCG treatment, a mature individual whose abdomen is expanded is selected, and the size of a fertilized egg is measured through an egg collecting process and a wet method fertilization process to observe an egg development process. The fertilized eggs had 30 ml, 35 ml, 45 ml, 35 ml, 18 ml per F2 individual, and average size was 438 μm . The hatching rate of fertilized eggs was 94.1% and 95.4% and 92.8% and 93.1% and 87.8% respectively.

The rearing environment conditions of hatching larva are maintained in DO 6.5-8.0 mg/L and pH 7.0-8.2. The water temperature is increased by 1°C per day after the fertilized egg is implanted at $20.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and kept at $24.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. The conditions of the circumference of the light are maintained at 24L until 13th after hatching, and adjusted to 12L from 14th after hatching. F3 Juvenile grew to an average of TL 5.0 ± 0.75 cm, BW 1.90 ± 0.79 g on the 78th day after hatching.

I. 서론

붉바리는 농어목(perciformes) 바리과(serranidae) 능성어아과(Epinephelinae) 우레기속(Epinephelus)에 속하는 온수성 어류로 주로 한국의 제주도, 일본 중부이남, 중국 대만 등에 분포하며 산란기는 6~8월이다(Yang et al., 2007). 바리과 어류는 전 세계적으로 기호성이 매우 높은 어종으로 고부가가치의 생산성을 지녔지만 최근 남획과 서식지 파괴로 인하여 자원량이 급격히 감소하고 있는 추세이다. 이로 인해 국제자연보호기구(IUCN)에서도 바리과 어류를 멸종위기 종으로 분류하고 있다(Lee et al., 2008; Sao et al., 2012; Kim et al., 2015; Annalie et al., 2000; Baillie et al., 2004).

붉바리의 자원량 감소 대체를 위해 생산량을 늘리려 하여도 붉바리는 아열대성 물고기라 적절한 수온유지가 어렵고 상품 크기로 자랄 때까지 3년 이상 오래 걸려 그간 양식에 어려움이 따랐다(Lee et al., 1998). 그러나 최근 2015년에 붉바리를 종자 때부터 성어까지 완전 양식에 성공하는 등 관련된 실험과 양식 기술도 점차 개선되어가고 있다. 그러나 여전히 사육주에 적응하고 경제력 향상을 위한 육종이 필요한 실정이다.

붉바리를 대상으로 산란습성과 초기생활사(Ukawa et al., 1966), 생식소 발달(Hwang et al., 1988), 자어의 간세포핵 변화(Lee et al., 1998), 성장호르몬 발현(Kang et al., 2003), 성숙과 성전환(Lee et al., 1998), 먹이생물(Lee et al., 1998), 난질변화(Lee et al., 1997), 잡종 수정란 부화(Noh et al., 2015), 성성숙 유도와 종자생산에 관한 연구는 인공 종묘 생산(Park, 2016), 성숙 개시와 성 특성(Oh, 2017), 수온 변화와 스트레스로 인한 영향(Kang, 2017), 난모세포 최종 성숙과 배란 유도(Lee et al., 2018), 사육수온에 따른 붉바리 pubert유도(Oh, 2018), 자치어 성장에 따른 안구 형성과 관련 유전자발현 (Kim, et al., 2019) 바리과 어종 분류를 위한 종 특이적 PCR개발(Kim, et al., 2019)등 번식 생리를 포함한 다양한 생리적 특성에 대한 연구가 진행되고 있다. 광주기를 조절하여 종묘 생산이나 성성숙을 유도하는 실험은 붉바리 외 무지개 송어나 점농어, 돌돔 등에서도 여러 연구가 진행되고 있다 (Randall et al., 1997 ; Jeong et al., 1999 ; Lim et al., 2014).

불바리를 대상으로 체계적인 육종시스템을 통한 F1, F2 종자 생산 연구에 관한 연구는 불바리 GSP과제로 제주대학교 해양과학연구소에서 수행 중이다.

이 연구는 제주대학교 해양과학연구소에서 F1, F2를 선발하여 사육중인 불바리 F2를 대상으로 광주기 조절을 통해 얻은 F3의 수정란 생산과 수정란의 부화율, 자치어의 성장 등을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 사육관리 및 사육환경 조절

1) 어미 사육관리

제주도와 남해안에서 수집한 자연산 붉바리(F0)를 제주대학교 해양연구소에서 친어로 사육하면서 붉바리 F1 집단을 생산하였다. 생산된 붉바리 F1 집단의 일부를 친어로서 하여 붉바리 F2 집단이 생산되었으며 이후 F2 집단의 일부를 친어로서 선발하여 F3 생산에 이용하였다. 붉바리 F2 생산을 위한 F1 친어 선발은 성장, 건강 상태와 채색 등을 고려하여 1차 선정하였다. 1차 선정 친어후보에 대한 유전자 분석을 통해 모계유전자 마커인 CR VNTR 유전자형 분석 등 성장 관련 유전자마커를 이용하였다. F3 생산을 위한 F2 친어 선발은 성장, 건강 상태, 채색 등을 고려하여 1차 선정하였다. 최종 친어선발은 모계유전자 마커인 CR (control region) VNTR (variable number tandem repeat), 핵 DNA 유전자형 분포를 기준으로 선정하였다 (Han et al., 2017). 이 연구는 붉바리 GSP과제로 수행중인 제주대학교 해양과학연구소 붉바리 어미관리와 수정란 생산, 종자생산에 함께 수행하였다.

제주대학교 해양과학연구소에서 생산한 F1, F2의 붉바리를 원형 아크릴 수조 (1.5 × 1.5 × 1 m, 유효수량 4.5 ton)에 수용하여 사육하였다(Fig. 1). F0, F1를 섞은 1번 수조 101마리(평균전장 32.6 ± 2.4 cm, 평균체중 0.69 ± 0.36 kg), 2번 수조 166마리(평균전장 30.6 ± 2.1 cm, 평균체중 0.53 ± 0.41 kg), F2를 넣은 3번 수조 249마리(평균전장 24.3 ± 1.3 cm, 평균체중 0.29 ± 0.11 kg), 4번 수조 255마리(평균전장 24.9 ± 1.6 cm, 평균체중 0.31 ± 0.13 kg)를 실험에 사용하였으며 사육수는 1일 5회 순환시켰다. 모든 실험어는 등 근육에 Micro chip을 삽입하였으며 먹이는 1일 2회, 오전 EP사료, 오후 생사료를 한 번씩 공급하였다.

2) 광주기 및 수온 조절

광주기를 인위적으로 조절하기 위해 광주기는 3월부터 각 수조에 LED 수중등을 설치하여 14L:10D의 광주기 조건으로 하였다. 각 수조의 수온과 pH, 용존산소량 (Dissolved Oxygen, DO)을 5월부터 측정 기록하였으며, 수온은 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH는 7.6 ± 0.2 , DO는 $7.8 \pm 0.8 \text{ mg/L}$ 범위를 유지하였다.



Fig. 1. Adult fish rearing water tank attached LED lamp for inducing sex maturation.

2. 생식소 발달

광주기와 수온 조절을 하지 않은 일반조건에서 사육한(대조구) 붉바리의 성숙 상태를 파악하기 위해 사육수조에서 사육 중인 3마리를 채집하여 2-phenoxyetanol에 마취시킨 후 생식소와 간을 채취하여 Bouin's solution에 24시간 고정하였고 다음 날 70% EtOH 용액에 재고정하였다. 이후 파라핀 포매 과정으로 파라핀 블록을 만들어 Microtome을 이용하여 생식소와 간조직의 종단면을 5 μ m 두께로 절편하였다. 슬라이드글라스에 부착한 조직표본은 탈파라핀 xylene I, II, III, 함수용 EtOH 95%, 90%, 80%, 70%를 15분간 거쳐 물로 세척 후 haematoxylin 용액과 eosin 용액으로 염색했다. 염색한 표본은 탈수용 EtOH 70%, 80%, 90%, 95%, 100%를 거쳐 순서대로 5초간 흔들어준 뒤 cleaning xylene I, II에 30분을 거쳐 슬라이드 커버를 덮어 조직표본을 완성하였다.

3. 난 성숙도 조사

성숙도 조사는 F1에서 대상어류 3마리, F1 대조구 3마리, F2 5마리를 포획하여 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation (Fig 2A) 작업을 마친 뒤 미성숙 개체를 제외한 나머지 개체의 전장(Fig 2B)과 체장 (Fig. 2C)의 길이를 측정하였다.



Fig. 2. Maturity survey by canonization. A, cannulation; B, body weight measurement; C, body length measurement.

4. 배란유도를 위한 HCG 주사

배란유도는 개체선별을 마친 배란 가능성 있는 어미에게 산란유도제인 HCG용액을 희석제와 섞어(Fig. 3A) 16 ml(5IU) HCG/g BW 농도로 등 근육에 주사했다. (Fig. 3B) 호르몬 투여 뒤 2시간 주기로 개체를 다시 선별하여 복부 압박을 통해 성숙란을 채취하였다(Fig. 3C).

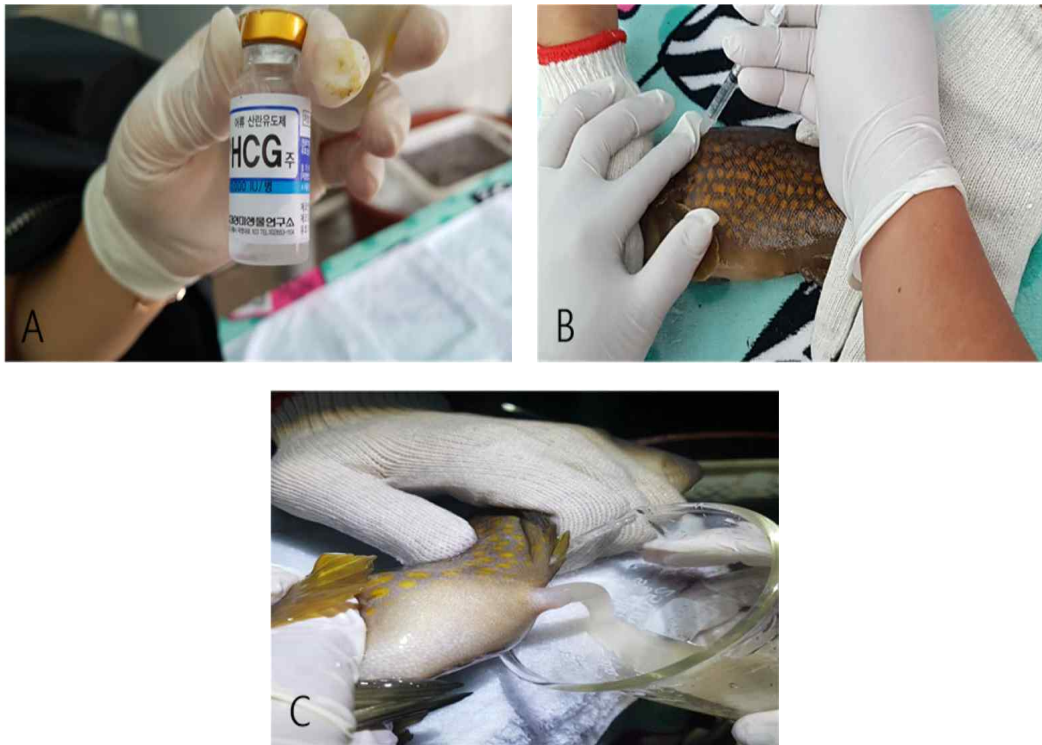


Fig. 3. HCG hormone injection. A, HCG hormone solution. ; B, hormone treatment by syringe. C, egg collection by using abdominal pressure.

5. 수정란 생산

채란된 알과 수컷에서 채취한 정자를 이용하여 습식법으로 수정 후 수정란의 발생과정을 관찰하였다(Fig. 4). 수정을 마친 F1 개체 3마리와 F2 개체 5마리, F1 대조구 3마리의 수정란을 각각 100개씩 선정하여 1마이크로로 여과한 해수 800 ml에 넣어 관찰하였다. 브로와에 에어스톤을 연결하여 비커 1개당 1개의 에어스톤을 설치하였으며 수온은 23°C를 유지하였고 4~8시간마다 200 ml씩 물을 교환하였다(Fig. 5).

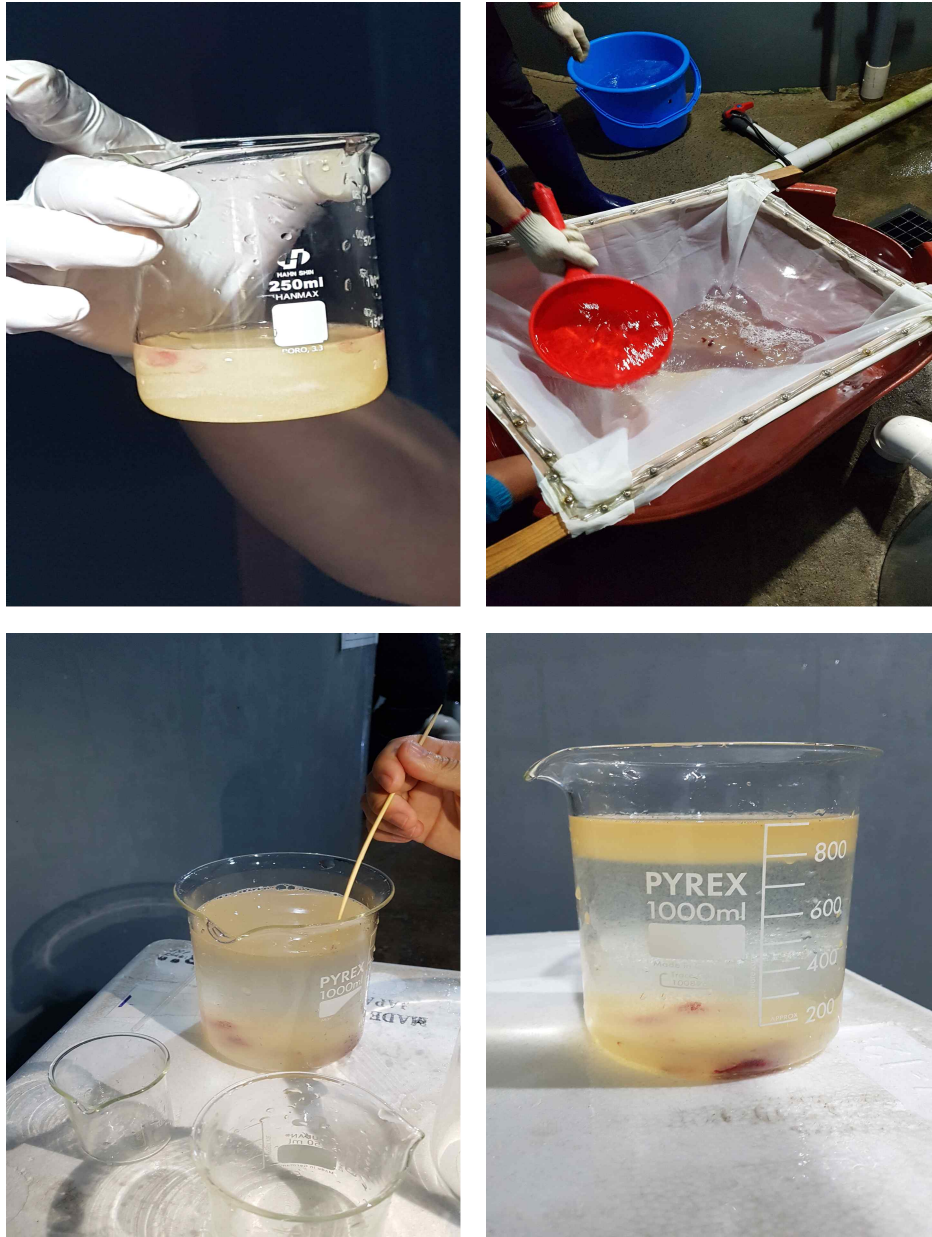


Fig. 4. Fertilized egg production process.

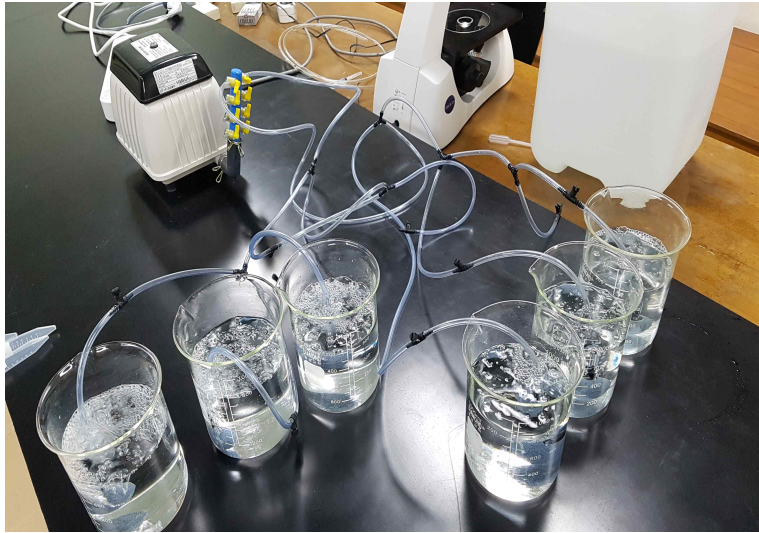


Fig. 5. Hatching rate survey of fertilized egg.

6. 불바리 자·치어 사육

부화자어 사육환경 조건은 용존산소 6.5-8.0 mg/L, pH 7.0-8.2를 유지하였으며 수온은 $20.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 에서 수정란 입식 후 하루에 1°C 씩 증가시켜 $24.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 광주기 조건은 부화 후 13일까지 24L로 유지하고 부화 후 14일부터는 12L로 조절하였다.

사료공급은 부화 5~8일까지 ss-type rotifer를, 부화 9~30일까지 s-type rotifer를, 부화 13~40일까지 초기사료를, 부화 20~50일까지는 Artemia를 공급하였다.

Ⅲ. 결과

1. 사육관리

사료공급은 3월부터 시작하여 하루 오전 1회 EP사료만을 공급하였으나 4월부터는 오전 EP사료에 오후 생사료를 추가로 공급했다. EP사료의 섭취율은 평균 250 g, 생사료의 섭취율은 평균 150 g였다(Table 1). 5월에는 베네데니아충의 감염으로 1번과 2번 수조에서 폐사가 발생하였고 문제 해결을 위해 모든 수조에 담수욕 처리를 하였다. 폐사량이 많은 1, 2번 수조에는 추가로 동이온 발생장치를 설치하였고 설치 이후에는 폐사 개체가 발생하지 않았다(Table 2).

Table 1. Diet supply during rearing from March to June 2019

Fish Cage No.	Month	Mar		Apr		May		Jun	
		A.M	P.M	A.M	P.M	A.M	P.M	A.M	P.M
F1	1	277	0	267	100	205	180	187	82
	2	275	0	218	130	216	182	272	160
F2	3	218	0	250	78	250	134	339	181
	4	200	0	282	102	282	212	323	199

A.M : expended pellet (EP. g), P.M : moisture pellet(MP. g)

Table 2. Mortality during rearing from March to June 2019

		Month			
		Mar	Apr	May	Jun
Fish	Cage No.				
F1	1	1	0	2	0
	2	1	0	7	0
F2	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0

2. 생식소 발달

2-phenoxyetanol에 마취한 붉바리 F1 대조구 3마리(평균전장 32.7 ± 1.3 cm, 평균체중 635.8 ± 22.1 g)의 생식소와 간을 채취하였다(Table 3, Fig. 6).

암수의 GSI(생식소 중량지수)는 각각 암컷 1.35, 수컷 0.48로 3배 정도의 차이가 났다. 정소는 정원세포와 정모세포들이 상피를 따라 분포하고 내강에는 정자무리들이 차지하고 있다. 암컷의 난소는 대부분 유구기와 난황형성기 난모세포를 분포하며, 생식상피를 따라 드문드문 정모세포군과 정세포무리들이 산재하고 있다. 암수의 HSI(간 중량지수)는 각각 암컷 2.11, 수컷 2.12로 유사하고 간조직상도 암수 모두 유사하였다(Fig. 7, 8).

Table 3. Total body weight and length and gonad weight and liver weight of F1 *E. akaara*

No.	Sex	BW (g)	TL (cm)	GW (g)	LW (g)
1	male	626.05	31.5	2.78	12.15
2	female	623.02	34.0	8.36	13.17
3	male	658.48	32.6	3.54	15.23

BW: Body weight, TL: Total length, GW: Gonad weight, LW: Liver weight

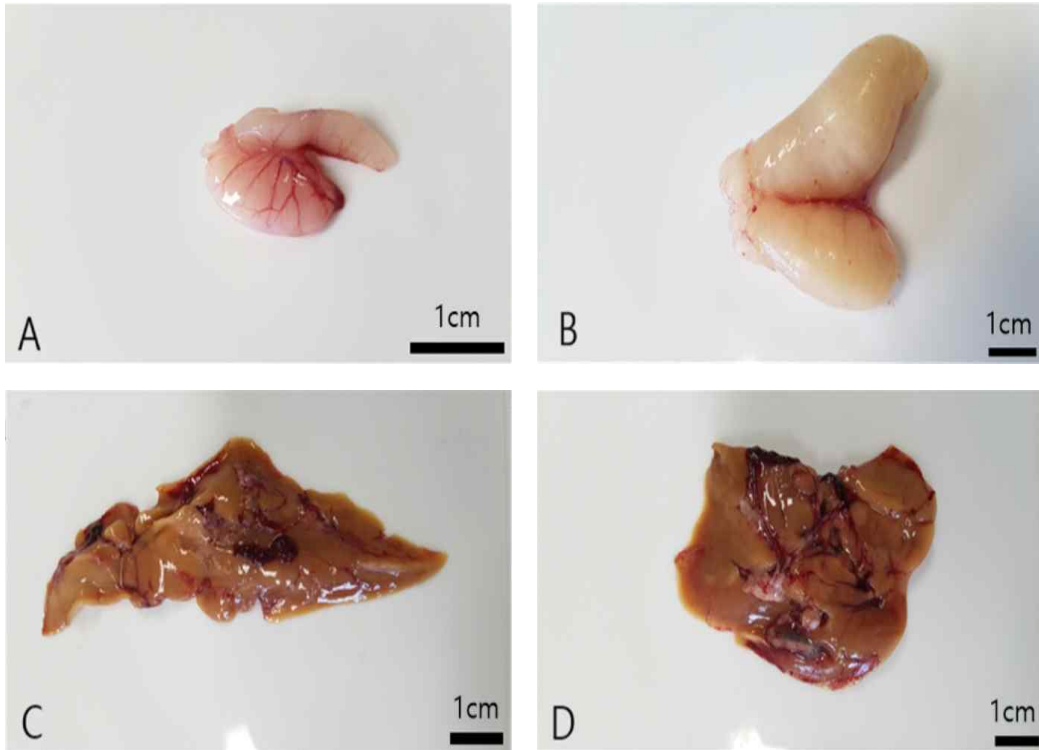


Fig. 6. External feature of gonads livers in *E. akaara*. testis (A) and ovary (B) and male liver (C) and female liver (D).

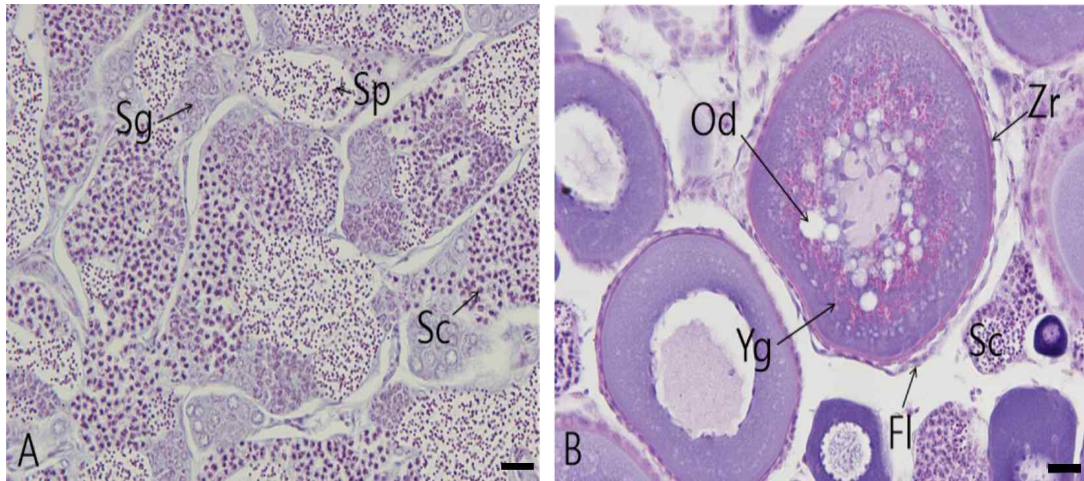


Fig. 7. Photograph of the male and female gonad in *E. akaara*. A, male gonad; B, female gonad. Sg, Spermatogonia; Sc, Spermatocytes; Sp, spermatozoon; No, nucleolus; N, nucleus; Fl, follicle layer; Yg, yolk globule; Zr, zona radiata; Od, Oil droplet. Scale bars indicate 20 μ m.

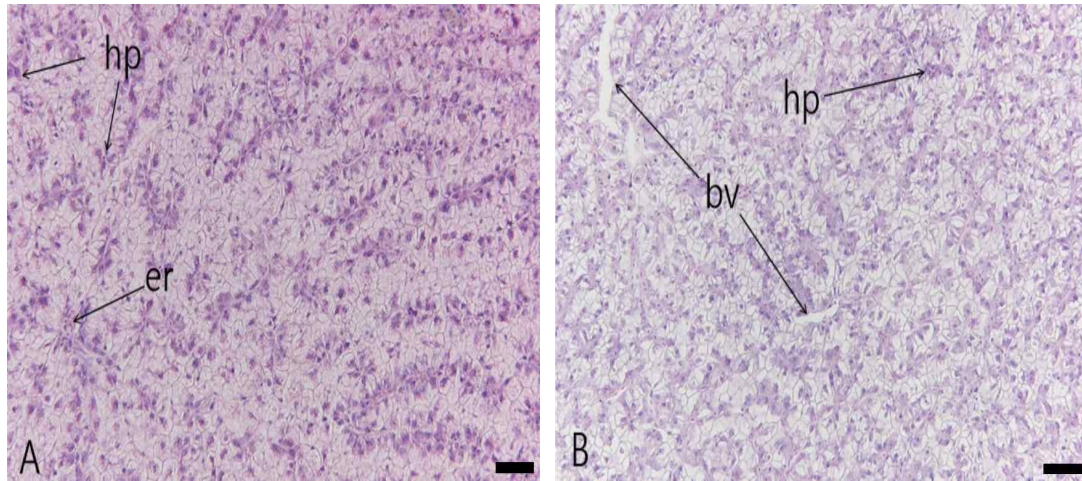


Fig. 8. Photograph of the male and female liver in *E. akaara*. A, male liver; B, female liver. er, erythrocyte; Hp, hepatocyte; bv, blood vessel. Scale bars indicate 50 μ m.

3. 배란유도와 수정란 생산

1) 난경분포

cannulation 작업을 통해 F1 대상어류 3마리, F2 대상어류 5마리, F1 대조구 3마리의 난을 채취한 뒤 난구의 길이를 측정하였다(Fig. 9.).

2) HCG주사 후 채란 및 수정란 생산

HCG 주사를 투여한 뒤 선별된 F1 개체 3마리(평균전장 32.2 ± 1.4 cm, 평균체중 608.6 ± 51.3 g), F2 개체 5마리(평균전장 21.6 ± 1.7 cm, 평균체중 214.6 ± 32.4 g), F1 대조구 3마리(평균전장 28.7 ± 2.5 cm, 평균체중 585.8 ± 19.1 g)의 채란된 성숙란의 양과 채란 후의 무게를 기록하였다. 채란 양은 F1 평균 65 ml, F2 평균 32.6 ml, F1 대조구 16.7 ml였다(Table 4, 5.). 이후 cannulation을 통한 F1 수정란의 성숙도를 조사한 뒤 HCG 주사 48시간 후 착란상태와 수정을 마친 수정란을 관찰한 뒤 수정된 난의 난경을 측정하였다(Fig. 10, 11.). 수정란의 평균 크기는 F2 수정란 430 μm , F3 수정란 438 μm , 대조구 432 μm 였다.

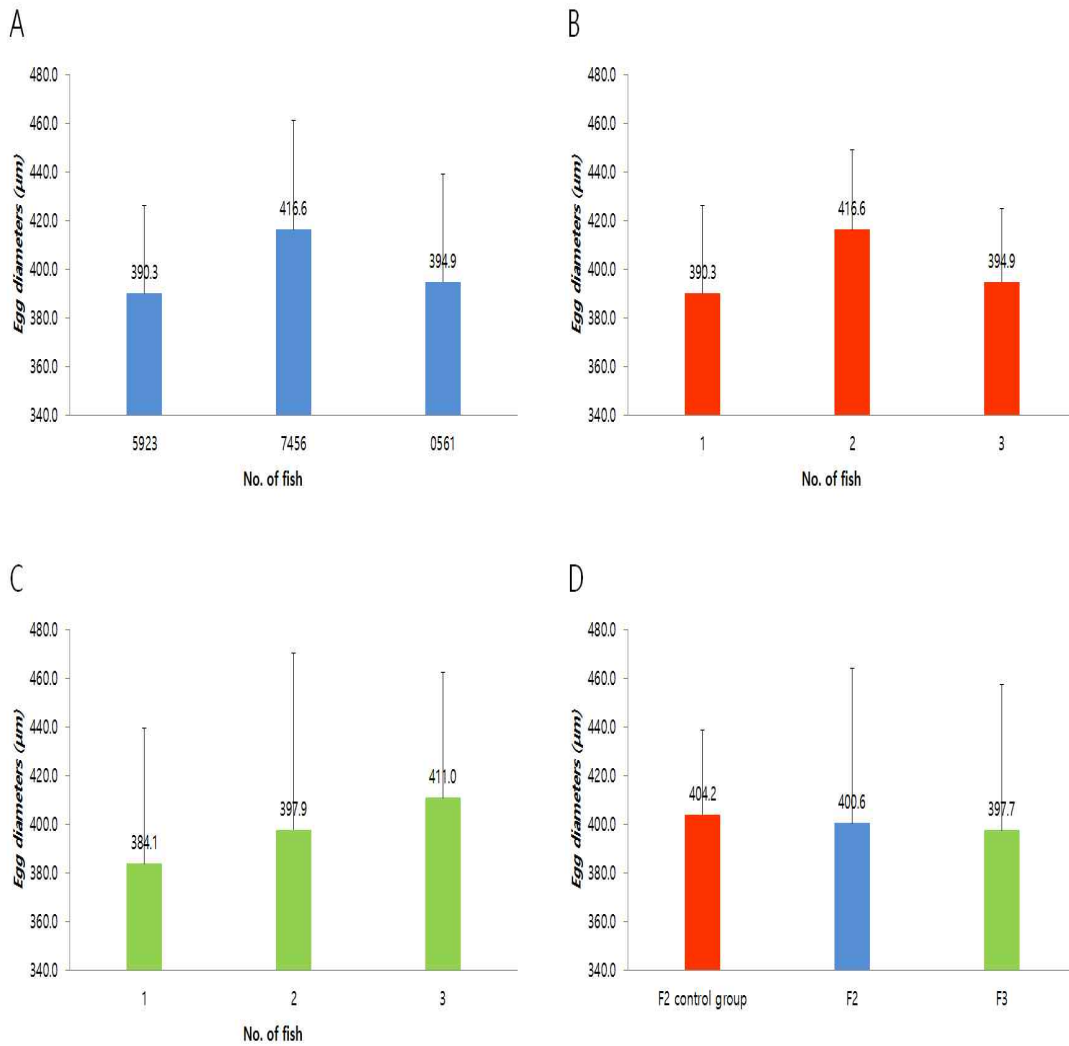


Fig. 9. Diameters of obtained egg by cannulation F2, F3 egg of *E. akaara*. A, F2 ; B, F2 control group ; C, F3 : D, Average of diameter of obtained egg in F2 and F3 *E. akaara*.

Table 4. Total body weight and length and sgueezed maturation egg of F1 and body weight after sgueezed of F1 *E. akaara*

ID No.	BW (g)	TL (cm)	SME (ml)	WAS (g)
0561	660	31.8	95	579
5923	510	31.0	50	472
7456	656	33.5	50	596

BW: Body weight, TL: Total length, SME: Sgueezed maturation egg, WAS: Weight after sgueezed

Table 5. Total body weight and length and squeezed maturation egg of F2 and body weight after squeezed of F2 *E. akaara*

NO.	BW (g)	TL (cm)	SME (ml)	WAS (g)
1	213	22.1	30	192
2	190	20.3	35	151
3	247	23.1	45	226
4	224	22.0	35	199
5	199	20.5	18	167

BW: Body weight, TL: Total length, SME: Squeezed maturation egg, WAS: Weight after squeezed

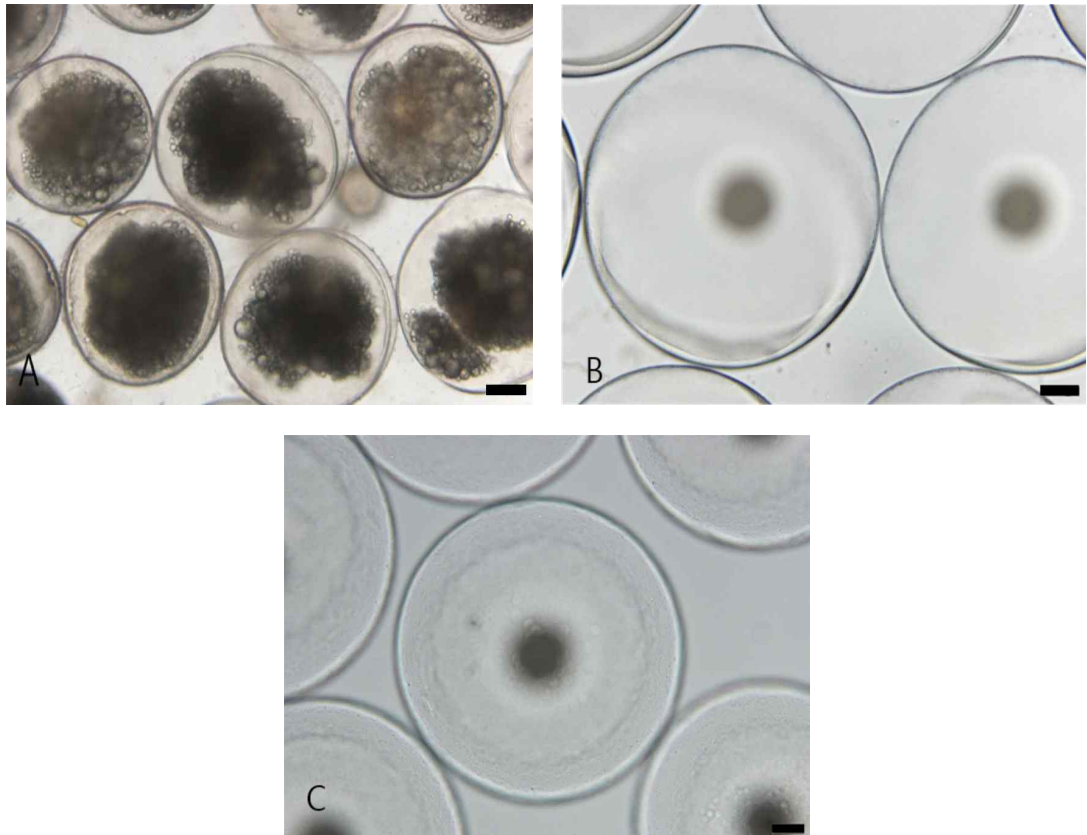


Fig. 10. Egg size and shape change. A, F1 obtained egg from cannulation ; B, obtained egg after HCG injection 48hr; C, fertilized egg. A, B, C Scale bar=100 μ m.

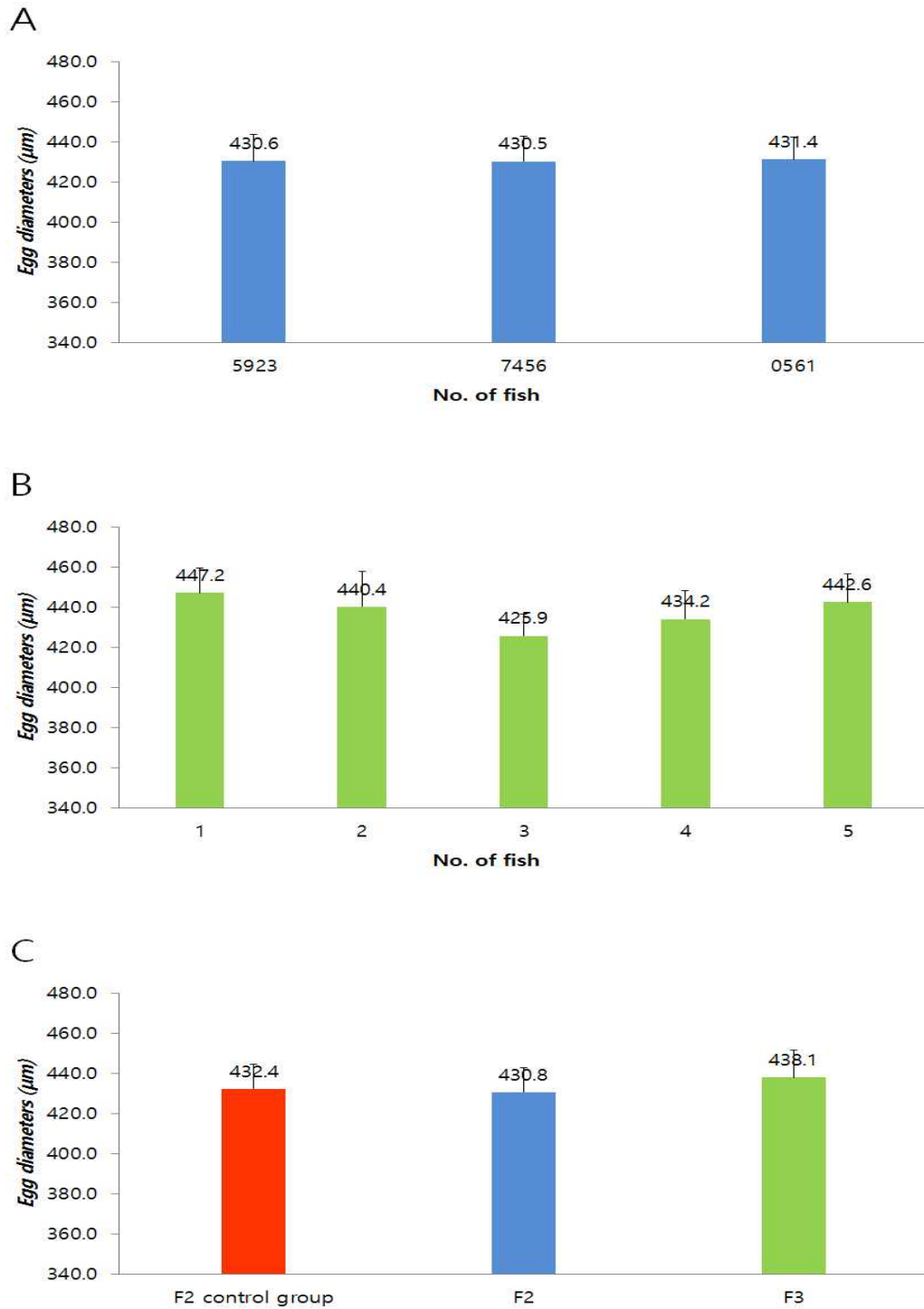


Fig. 11. Frequency in diameters of the fertilized egg in F2, F3 *E. akaara*. A, F2 ; B, F3 ; C, Average diameter of fertilized egg in F2, F3 *E. akaara*.

4. 난 발생과 부화율

붉바리 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 F1 개체의 F2 수정란 난경은 (평균 $430.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$), F2개체의 F3 수정란 난경은 (평균 $438.1 \pm 12.3 \mu\text{m}$)이었다. 수온 23°C 에서 수정란의 난 발생 과정은 수정 30분만에 2세포기에 이르렀다. 수정 후 1시간이 경과하여 4세포기, 1시간 30분 뒤 8세포기, 2시간 뒤 16세포기, 2시간 30분 뒤 32세포기로 발달하였다. 난할이 계속 진행됨에 따라 4시간 후에는 상실기, 7시간 뒤에는 포배기에 이르렀고 10시간 뒤에는 낭배기로 발달하였다. 30시간이 지나면서 두부에 안구와 이포가 형체를 갖추기 시작했으며 35시간 뒤에는 부화가 시작되었다(Table 6, Fig. 12).

이때 4시간씩 해수를 순환한 시간이 짧아 F1 개체의 F2 수정란 대부분이 사망하여 부화율은 24%, 47%, 39%에 불과해 대조구와 F2개체의 순환 시간은 8시간으로 수정하였다. 실험 결과 F1 대조구의 F2 수정란 부화율은 76%, 75%, 74%였으며 F2 개체의 F3 수정란 부화율은 94.1%, 95.4%, 92.8%, 93.1%, 87.8%로 나타났다(Fig. 13).

Table 6. Time required by development stage of fertilized egg of *E. akaara* (water temperature: 23°C)

Developmental stage	Time after fertilization
Fertilized egg	0 h
2 cell	30 min
4 cell	1 h
8 cell	1 h 30 min
16 cell	2 h
32 cell	2 h 30 min
Morula	4 h
Blastula	7 h
Gastrula	10 h
Lens and ear vesicle formation	30 h
Hatched larval	35 h

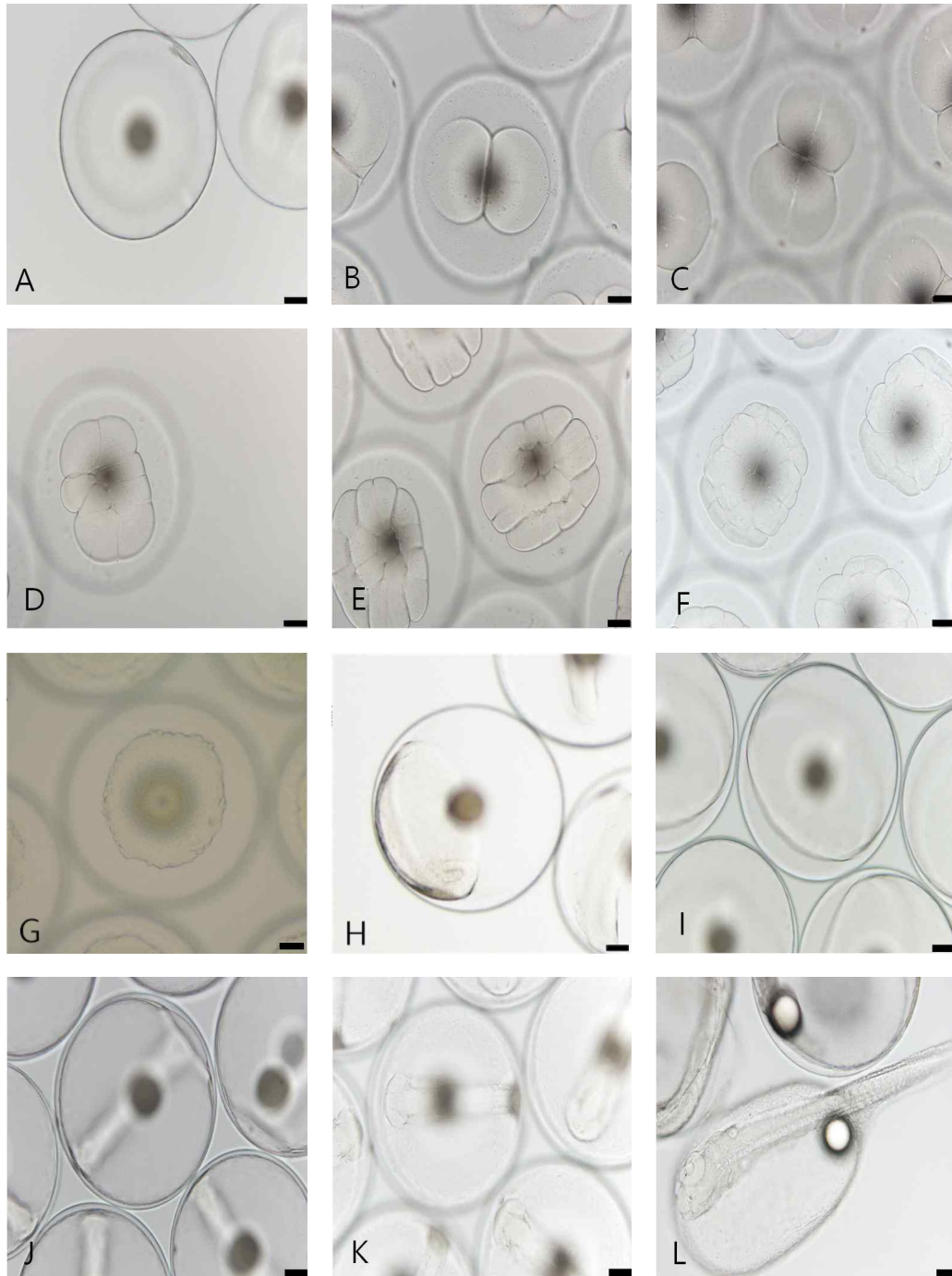


Fig. 12. Fertilized egg development of *E. akaara*. A, fertilized egg; B, 2 cell; C, 4 cell; D, 8 cell; E, 16 cell; F, 32cell; G, morula stage; H, blastula stage; I, J, gastrula stage; K, lens and ear vesicle; L, hatched larva. Scale bar=100 μ m.

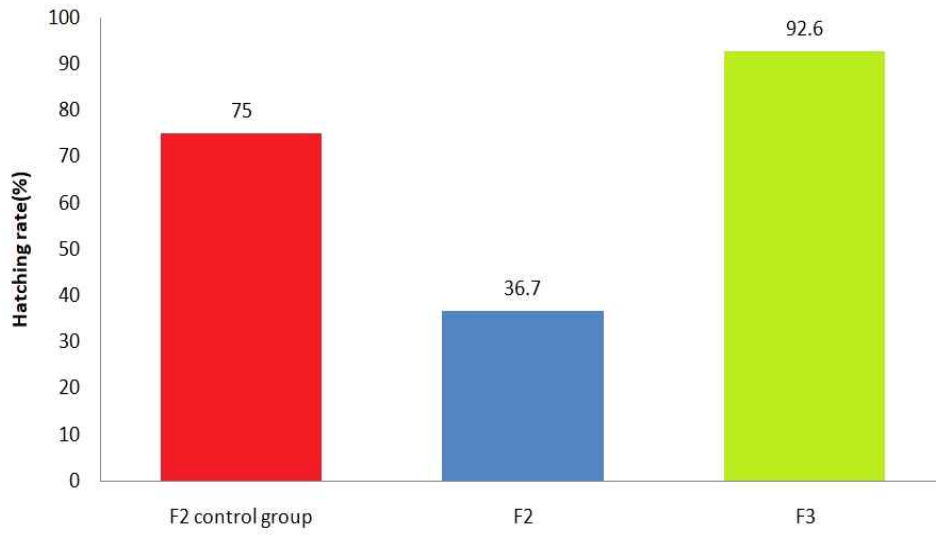


Fig. 13. Hatching rate of fertilized egg.

5. 붉바리 F3 치어 집단의 성장

부화 후 78일에 붉바리 F3에 대한 성장형질 측정 결과 TL은 평균 5.0 ± 0.75 cm, BW는 평균 1.90 ± 0.79 g 였다(Fig 14, Table 7).

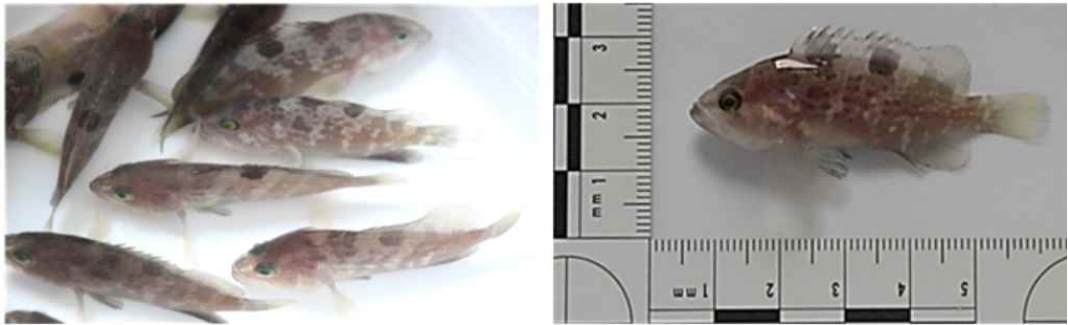


Fig. 14. External feature of juvenile F3 in 78 days after fertilization.

Table 7. Growth of Juvenile F3 in 78 days after hatching

Traits	N	Mean \pm SD	Min	Max
TL (cm)	326	5.0 \pm 0.75	3.2	6.8
BW (g)	326	1.90 \pm 0.79	0.60	4.20

IV. 고찰

붉바리 양식생산성 향상을 위하여 붉바리 어미관리와 수정란 생산, 종자생산 등을 통한 육종관리가 필요하다. 어류양식에서 종자생산은 원천기술이자 가장 핵심요소 중 하나이다. 어류의 번식 육종에 관한 기술적 노하우가 양식 경쟁력을 확보하는 원천 기술로 넙치의 성분화 생식소 발달(Lee et al., 1990), 자성발생 이배체 넙치유도(Kim, 1993), 무지개 송어(Gjerde et al., 1983 : Su et al., 1996: Pante et al., 2001), 메기류(Bondari, 1987) 등을 대상으로 지속적으로 수행하는 경향을 볼 수 있다.

이 연구는 제주도와 남해안에서 수집한 자연산 붉바리(F0)를 제주대학교 해양연구소에서 친어로 사육하면서 붉바리 F1 집단을 생산하고, 생산된 붉바리 F1 집단에서 성장과 채색이 우수한 개체를 친어로 선발하여 붉바리 F2 집단이 생산되었으며 이후 F2 집단에서 우수한 개체를 친어로 선발하여 F3 생산에 이용하였다. 붉바리 F2 생산을 위한 F1 친어 선발은 성장, 건강 상태와 채색 등을 고려하여 1차 선정하였고, 1차 선정 친어후보에 대한 유전자 분석을 통해 모계유전자 마커인 CR VNTR 유전자형 분석 등 성장 관련 유전자마커를 이용하였다. F3 생산을 위한 F2 친어 선발은 성장, 건강 상태, 채색 등을 고려하여 1차적으로 선정한 후 최종 친어 선발은 모계유전자 마커인 CR (control region) VNTR (variable number tandem repeat), 핵 DNA 유전자형 분포를 기준으로 선정하였다(Han et al., 2017).

바리과 어류는 암컷으로 먼저 성숙이 일어난 후에 개체 중 일부가 수컷으로 성전환하는 자선성숙형 자웅동체어로 성전환 시기가 종마다 다른 특이성을 가진다. *E. tauvina*의 성전환 시기는 부화 후 7년이며, 10살이 되어서 수컷으로 기능을 하고(Chao et al., 1991), *E. marginatus*는 부화 후 14년 이상(Glamuzina et al., 2000), *E. mario*는 부화 후 9년, 체중 11 kg 이상(Randall et al., 1991), 붉바리는 전장 24~32 cm, 체중 500g 이상부터 성전환이 일어난다(Kayano, 1996). 능성어는 체중 6 kg 이상(Tsuchihashi et al., 2003), 자바리는 전장 63~99 cm, 체중 4.4~13.2 kg에서 성전환이 일어난다(Oh, 2006).

온대해역 어류의 생식주기는 계절성을 가져서 수정란을 한정된 시기에만 확보할

수 있는 자연조건이다. 성숙 산란시기의 자연 광주기와 수온조건에 반응하는 생리 특성을 탐색하여 연중 성숙산란을 유도하는 시스템 개발에 관한 연구들이 진행되고 있다(Lee, 2019).

어류의 성숙 및 산란의 생리적 특성은 뇌의 시상하부에서 분비하는 생식소자극호르몬방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 뇌하수체 전엽에서 분비하는 생식소자극호르몬(gonadotropins, GTH; LH, FSH), 성호르몬 그리고 신경호르몬 등에 의해 조절되지만, 이들의 조절을 유도하는 것은 광주기와 수온과 같은 서식지 환경요인으로(De Vlaming, 1975; Nish et al., 1979; Asahina et al., 1983), 이런 환경요인들은 단독적인 작용보다는 상호 보완적으로 작용을 하며, 종 특이성을 가진다(Donaldson et al., 1983; Baek et al., 1985; An, 1995). 능성어 *E. septemfasciatus*의 경우 장일 광주기(14L/10D)와 사육수온 21~22°C 처리로 자연조건보다 2~3개월 앞당겨 성 성숙을 유도하며(Song, 2004), 자바리 *E. bruneus*인 경우 성 성숙을 유도하는 요인은 수온이 주로 작용하고, 장일 광주기가 보상적으로 관여하는 것으로 추정하고 있다(Oh, 2006). 또한 Kanemaru(2012)는 고수온과 장일처리로 비산란시기에 *E. merra*의 성 성숙을 유도하였다. 홍바리의 성 성숙 유도 요인은 고수온(25°C)조건이 주로 작용하고, 장일 광주기(14L/10D)가 보상적으로 관여한다(Lee et al., 2010).

광주기와 수온 등 환경요소를 이용하여 성 성숙 유도를 수행하는 경우 배란유도된 난질의 정도에 따라서 생산성에 미치는 영향이 크다. 무지개 송어의 경우 광주기 조절에 의한 조기 성숙을 유도하여 채란할 경우 광주기 조절에 의한 성숙과 관련된 에너지 소모를 고려하여 영양 강화 먹이배합과 적절한 먹이양을 섭취시켜야 우량한 난을 얻을 수 있다(Ham, 2009).

이 연구에서 붉바리 F1, F2를 대상으로 광주기 14L/10D, 사육수온 21~22°C로 조절하여 성숙유도를 통한 결과 F1 (평균전장 32.2 ± 1.4 cm, 평균체중 608.6 ± 51.3 g)에서 평균 65 ml, F2 (평균전장 21.6 ± 1.7 cm, 평균체중 214.6 ± 32.4 g)에서 평균 32.6 ml, F1 대조구 (평균전장 28.7 ± 2.5 cm, 평균체중 585.8 ± 19.1 g)에서 평균 16.7 ml 의 수정란을 생산하였다. 부화율은 F2 수정란 36.7%, F3 수정란 92.6%, F2 대조구 수정란 75%였으며 F2 수정란의 부화율은 실험 중의 사고로 지나치게 많은 사망률을 보였으나 정상적으로 부화된 F3 수정란은 대조구

보다 높은 부화율을 보였다. 부화한 F3 개체는 부화 5~8일까지 ss-type rotifer를, 부화 9~30일까지 s-type rotifer를, 부화 13~40일까지 초기사료를, 부화 20~50일까지는 Artemia를 공급하였다. 이 F3 개체는 부화 후 78일에 평균전장 5.0 ± 0.75 cm, 평균체중 1.90 ± 0.79 g 로 나타났다.

어류의 성장은 어종, 크기, 사육수온과 밀도 등에 따라서 종 특이적으로 나타난다(Stickney, 1979). 어류의 성 성숙과 산란에 관여하는 것은 성숙관련 호르몬뿐만 아니라 산란시기의 서식지 수온이나 광주기 같은 환경요인 등이 영향을 줄 수 있다(Takashima et al., 1984). 종묘육성을 위한 수정란 생산 실험은 광주기 외에도 수온이나 호르몬 조절을 통하여 바리과 외에 다양한 양식 대상어류에도 시도되고 있다. 어류의 난질 평가는 어종에 따라 판단 기준이 다양하며 무지개 송어, *Oncorhynchus mykiss* 의 경우 발안율과 수정률을 실질적으로 현장에서 적용할 수 있는 난질 평가를 기준으로 삼고 있으며(Bromage et al., 1992), 어류의 난질 평가는 난의 특성에 따라 다양하지만 분리부성란의 경우 부상률과 침강률을 기준으로 난질을 평가하기도 한다(McEvoy, 1984; Carrillo et al., 1989). 한편 Kjorsvik et al., (1990)은 수정난막의 출현율, 알의 형태와 투명도, 유구의 분포에 의해 난질을 평가할 수 있는 형태적 요소로 삼을 수 있고, 특히 수정률, 부화율 및 알의 과숙 상태는 해산 어류의 난질 평가에 좋은 지표가 되고, 자어의 생존율이나 건강한 종묘의 생산성에 난질 평가의 중요한 요인이다(De Leeuw et al., 1985; Manickam and Joy, 1989).

불بار리 외에 광주기를 통한 성숙 유도는 의 무지개 송어나(Randall et al., 1997) 돌돔(Jeong et al., 1998), 점농어(Lim et al., 2014)에서 광주기를 조절한 개체는 자연광으로 성장한 대조구와 비교하여 치어의 부화율이 더 높게 나타났다. F1 개체의 경우 실험구와 대조구의 수정란 크기가 유사하였지만 F2 개체의 수정란은 대조구보다 평균 $6\mu\text{m}$ 더 크며 광주기를 조절한 개체 쪽이 채란 양도 많은 것을 확인하였다.

이번 연구에서 불바리의 체계적인 종자 생산은 불بار리 양식 산업 창출과 산업의 활성화 및 세계화에 기여할 수 있는 기술적 노하우로 여겨진다.

V. 참고문헌

- Annalie VM, Roberts CM, Hawkins Jp (2000) The treated status of groupers (*Epinephelinae*). Biodivers Conserve 9, 919-942.
- An CM (1995) Effects of photoperiod and water temperature on the reproductive cycle of the spring-spawning bitterling, *Rhodeusuyekii* (Pisces: Cyprinidae). Korean J Ichthyol 7, 43-55.
- Asahina K, Hanyu I (1983) Role of temperature and photoperiod in annual reproductive cycle of the rose bitterling, *Rhodeusocellatus ocellatus*. Bull Japan Soc Sci Fish 49, 61-67.
- Baek HJ, Lee TY (1985) Experimental studies on the mechanism of reproductive cycle in the long chin go by *Chasmichthys dolichognathus* (HILGENDORF). Bull Korean Fish Soc 18, 243-252.
- Baillie J, Taylor CH, Stuart SN (2004) The 2004 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Glands, Switzerland.
- Bondari K, Dunham RA, (1987) Effects of inbreeding on economic traits of channel catfish. Theor. Appl. Genet., 74: 1-9.
- Boo MS (2019) Development of feed organism culture system and investigation of appropriate feeds for the seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. M.S. thesis, Jeju National University Jeju. Korea. 5-7.
- Bromage N, Jones J, Randall C, Thrush M, Davies B, Springate J, Duston J, Barker G (1992) Brood stock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 100, 141-166.
- Carrillo M, Bromage N, Zanuy S, Serrano R, Puat F (1989) The effects of modifications in photoperiod on spawning time, ovarin development and egg quality in the sea bass, *Dicentrarchus Labrax*. Aquaculture. 81: 351-365.

- Chao TM, Lim LC (1991) Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus spp.*) in Singapore. Singapore J Pri Ind 19, 79-93.
- De Leeuw R, Goos HHT, Richter CJJ, Eding EH (1985) Pimozide LHRH induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Bruchell). Aquaculture, 44: 295-302.
- De Vlaming VL (1975) Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus rhysoleucas*. Biol Bull 148, 402-415.
- Donaldson EM, Hunter GA (1983) Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. Fish Physiology. Reproduction, Vol. IX B, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351-403.
- Glamuzina BNGlavi, Kožul V, Tutman P, Skaramuca B (2000) Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinepheluscostae* (Steindachner, 1875). Aquaculture Int 8, 551-555.
- Jeong KS, Kim SM (1998) Induced Spawning of Striped Knife-Jaw, *Oplegnathus fasciatus* by Manipulating Water Temperature and Photoperiod. The Ichthyological Society of Korea VOL.11 NO.2 : 141-149.
- Joo HS (2013) Characteristics of reproductive physiology in blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. Ph. D. thesis, Jeju National University Jeju. Korea. 71-79.
- Gjerde B, Gunnes K, Gjedrem T, (1983) Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. Aquaculture, 34: 327-332.
- Ham JS (2009) Seed production of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* throughout the year by photoperiod manipulation. Ph. D. thesis, Busan National University Pukyong. Korea. 65-76.
- Han SH, Kim YK, Lee CH, Lee YD (2017) Mitochondrial DNA

- polymorphisms of the red-spotted grouper: Information for molecular phylogeny and breeding. In Development & Reproduction, Seoul, Korea, August, 2017, pp. 13-14.
- Hwang SI, Lee YD, Song CB, Rho S (1998) Gonadal Development and the Effects of 17 α -methyltestosterone on Sex Inversion of the Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. The Ichthyological Society of Korea VOL.11 NO.2 : 173-182.
- Kanemaru T, Nakamura M, Murata R, Kuroki K, Horie H, Uchida K, Senthilkumaran B, Kagawa H (2012) Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. Aquaculture 358, 85-91.
- Kang GY, Song CB, Lee JH (2003) Cloning of Growth Hormone Complementary DNA from Red-Spotted Grouper(*Epinephelus akaara*) and Its Expression in E. coli. The Ichthyological Society of Korea VOL.16 NO.2 : 110-117.
- Kayano Y (1996) Yearly change in egg production of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in a rearing tank. Saibai Giken 25, 47-52.
- Kjorsvik E, Jonsen AM, Holmefjord I (1990) Egg quality in fishes. Mar. Biol., 26: 71-113.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB, Cho KC (1993) Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. Korean J Genetics 15, 179-186.
- Kim ES, Lee CH, Lee YD (2019) Retinal development and opsin gene expression during the juvenile development in red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Development & Reproduction, 23(2), 171.
- Kim HK, Kim JH, Kim WS, Baek HJ, Kwon JY (2015) Early Gonadal Differentiation of the Protogynous Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. Dev. Reprod, 19(4), 209.

- Kim YK, Lee CH, Lee YD, Han SH (2019) Development of species-specific PCR for the identification of three grouper fish species (*Epinephelus septemfasciatus*, *E. bruneus* and *E. akaara*). Indian Journal of Animal Research, 53(4), 482-484.
- Lim SG, Baek JM, Kim JH, Han HY, Cho YC, Kang YJ (2014) Effect of Photoperiods on Sexual Maturation in Spotted seabass, *Lateolabrax maculatus*. The Ichthyological Society of Korea VOL.26 NO.5 : 935-940.
- Lee CK, Hur SB (1998) Effect of live food and water temperature on larval survival of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Journal of aquaculture, 11(4), 565-572.
- Lee CK, Park IS, Hur SB (1998) Influence of Starvation on the Variations of Hepatocyte Nucleus in Larvae of Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. Ph. D. thesis, Busan National University Pukyong. Korea. 11-17.
- Lee CK, Hur SB, Ko TS, Park S (1998) Maturation, Sex Ratio and Sex-reversal of Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. Ph. D. thesis, Busan National University Pukyong. Korea. 573-580.
- Lee CK, Hur SB, Park S, Kim BG (1997) Qualities of spawned eggs during the spawning period in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Ph. D. thesis, Busan National University Pukyong. Korea. 463-472.
- Lee CH, Kang HC, Song YB, Park YJ, Joo HS, Baek HJ, Lee YD (2010) Effects of Water Temperature and photoperiod manipulation genital development Development of the Genome of Blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. Korea Originating Biology Conference. VOL.29 NO. 49-49.
- Lee YD, Song YB, Lim BS, Oh SR, Kim HB (2008) Grouper aquaculture research in Jeju Island, Korea. In: Liao IC, Leaño EM, eds. The Aquaculture of Groupers, J World Aquac Soc, p 49-60.

- Lee YD, Baek HJ (2018) Hormonal-induced final oocyte maturation (GVBD) and ovulation in red spotted grouper *Epinephelus akaara*: in vitro and in vivo studies. In KOFFST International Conference, Busan, Korea, November, 2018, pp. 355-355.
- Lee YD, Lee TY (1990) *Paralichthys olivaceus*(TEMMINCK et SCHLEGEL) Sex Differentiation and Development of the Gonad in the Flounder, *Paralichthys olivaceus*(TEMMINCK et SCHLEGEL). Marine Resources Laboratory Research Report VOL.14 NO. : 61-86.
- Lee YD (2019) Golden Seed Project Report (213008-05-3-CG500). Korea: Korea Institute Of Planning And Evaluation For Technology In Food.
- National Fisheries Research & Development Institute(NFRDI) (2004) Commercial fishes of the coastal & offshore waters in korea(second edition). pp.258.
- National Fisheries Research & Development Institute(NFRDI) (2014) Technical Report of National Fisheries Research and Development Institute. NFRDI, 695-703.
- Nishi K, Takano K (1979) Effects of photoperiod and temperature on the ovary of the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bull. Fac. fish. Hokkaido Univ 30, 63-73.
- Noh CH, Kim KS, Myoung JG, Cho JK, Yun NJ, Lim HG, Bang IC (2015) Short Papers : The Hatchability of Fertilized Eggs of Interspecific Hybrid between Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) and Brown-Marbled Grouper (*E. fuscoguttatus*). The Ichthyological Society of Korea VOL.27 NO.1 : 16-20.
- Manickam P, Joy KP (1989) Induction of maturation and ovulation by pimozide-LHRH analogue treatment and resulting high quality egg production in the asian catfish, *Clarias batrachus*(L.). Aquaculture. 83: 193-199.
- McEvoy LA (1984) Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in

- cultivated turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Fish Biol., 24: 437-438.
- Oh SB, Lee CH, Lee YD (2018) Induction of Puberty in Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara* By Water Temperature. J Aquac Res Development 9.537 (2018): 2.
- Oh SE (2017) Puberty and sex characteristic in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. M.S. thesis, Jeju National University Jeju. Korea. 18-20.
- Oh SR (2006) Seed production of longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* with induced sex reversal and maturation. Ph. D. thesis, Jeju National University Jeju. Korea. 137 pp.
- Pante MJR et al (2001) Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Aquaculture 192: 213-224.
- Park JY (2016) Studies on artificially seedings production of the Red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Ph. D. thesis, Gwangju National University Chonnam. Korea. 75-85.
- Randall CF, Bromage NR, Duston J, Symes J (1997) Photoperiod-Induced Phase-Shifts of the Endogenous Clock Controlling Reproduction in the Rainbow-Trout - A Circannual Phase-Response Curve. Journal of Reproduction & Fertility VOL.111.
- Randall JE, Heemstra PC (1991) *Epinephelus fasciatus*. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae), with descriptions of five new species. Indo-Pacific fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum, Honolulu.
- Sao PN, Hur SW, Lee CH, Lee YD (2012). Gonadalsex differentiation of hatchery-reared longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*). Dev Reprod 16: 185-193.
- Seo YI, Joo H, Lee SK, Kim HY, Ko JC, Choi MS, Kim JI, Oh TY (2010) Maturity and Spawning of Marbled Sole *Pleuronectes yokohamae* in the Southern Sea of Korea. Korean J Ichthyol 22(2), 83-89.

- Song YB (2004) Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfascatus*. Ph. D. thesis, Jeju National University Jeju. Korea. 120 pp.
- Stickney RR (1979) Principle of warm water aquaculture. John Wiley & Sons., Inc., New York.
- Su GS, Liljedahl LE, Gall GAE (1996) Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 142, 139-148.
- Takashima F, Yamada Y (1984) Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. Aquaculture, 43, 243-257.
- Tsuchihashi Y, Tanaka H, Kuromiya Y, Kashiwagi M, Yoshioka M (2003) Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51, 189-196.
- Ukawa MSO, Higuchi MSK (1966) Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara*.(TEMMINCK et SCHLEGEL). Jpn. J. Ichthyol. 13, 156-161.
- Yang MH, Choi YU, Jung MM, Ku HD, Oh BS, Moon TS, Lee CH, Kim KM, Han SJ (2007) Temperature effect in egg development and hatching of longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*. Development and reproduction, 11(2), 105-109.