

최 종  
연구보고서

# 참조기 인공종묘생산 기술개발

Technology Development of the Hatchery-based Seed  
Production of Small Yellow Croaker,  
*Larimichthys polyactis*

2006. 8.

주관연구기관 : 국립수산과학원 서해수산연구소  
협동연구기관 : 목포해양수산청 영광해양수산사무소

해 양 수 산 부

## 최 종 보 고 서

2006년도 수산특정연구개발사업에 의하여 완료한 “참조기 인공종묘생산 기술개발”에 관한 연구의 최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.

2006년 8월

총괄연구책임자      조 기 채      (인)

주관연구기관장      서해수산연구소장      (직인)

해 양 수 산 부 장 관      귀 하



# 참조기 인공종묘생산 기술개발

Technology Development of the Hatchery-based Seed  
Production of Small Yellow Croaker,  
*Larimichthys polyactis*

**2006. 8.**

주관연구기관 : 국립수산과학원 서해수산연구소

협동연구기관 : 목포해양수산청 영광해양수산사무소

해 양 수 산 부



## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “참조기 인공종묘생산 기술개발”에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 8월 일

주관연구기관명	:	국립수산과학원 (서해수산연구소)
협동연구기관명	:	목포지방해양수산청 (영광해양수산사무소)
총괄연구책임자	:	조 기 채
협동연구책임자	:	박 형 윤
연 구 원	:	
서해수산연구소	:	이 진 호, 강 덕 영 강 희 응, 김 문 환 나 시 환, 박 영 제 송 홍 인, 손 상 규 전 제 천, 박 광 재 변 원 호
수산생명과학본부	:	박 두 원, 김 우 진 박 중 연
동해수산연구소	:	이 중 윤
부 안 시 험 포	:	임 세 훈, 장 진 엽
한 양 대 학 교	:	강 한 승
영광해양수산사무소	:	황 경 열, 최 정 배 양 석 우, 박 승 강 선 구, 함 승 식
연 구 보 조 원	:	김 규 희, 나 원 흠 박 균 호, 은 기 석 김 삼 규, 김 영 복

# 요 약 문

## I. 제 목

참조기 인공종묘생산 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라 해산어 양식은 1970년대 초부터 남해안을 중심으로 방어(*Seriola quinqueradiata*)와 참돔(*Chrysophrys major*)양식이 개발되기 시작하여 1980년대 초부터 국립수산물과학원을 중심으로 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 인공종묘생산기술이 개발되었다. 양식산업은 해상가두리 양식과 육상수조양식 2가지 양상으로 발전되어 육상 양식장에서는 넙치가 95%를 차지하고, 해상가두리 양식장에서는 조피볼락 70%, 점농어 15%, 돔류 10%, 기타 5% 순으로 이루어지고 있지만, 최근 양식산업은 침체현상을 겪고 있다. 참조기 어획은 주로 안강망과 연안 유자망으로 채포하고 있으나 표 1에서 보는 바와 같이 해마다 생산량이 감소 추세에 있으며 2003년도 어획량은 5년 전에 비하여 52.7%가 줄어든 것을 볼 수 있다.

참조기는 우리나라 서해안의 지역특산 품종으로서 맛과 육질이 우수하고, 그 소비 기호도가 매우 높으나 자연생태계의 자원량이 많이 감소하여 국민들의 소비욕구를 충족시켜주지 못하고 있다. 다른 어류에 비해 선호도가 높은 위치에 있으며, 특히 지역 특산품인 영광 굴비의 가공식품으로서 사회·문화적으로 그 가치성과 국민들의 소비성이 매우 높아 연구개발의 효과가 그 무엇보다 기대된다.

또한 참조기의 가공원료인 굴비는 전남 영광지역 특산 수산물로서 연간 약 1천억원의 매출을 올리는 국민 기호식품으로 자리 잡고 있다. 따라서 참조기에 대한 종묘생산 및 양식기술을 개발함으로써 양식산업화 가능성과 양질의 수정란 공급으로 대량종묘생산에 의한 자원 조성용 종묘방류와 자원회복 방안을 제시함으로써 체계적인 자원관리와 침체된 해면 양식산업의 활성화로 어업 생산성 증대를 도모하고자 한다.

표 1. 우리나라 참조기의 연도별 어획량

Table 1. Annual catching production of small yellow croaker, *L. polyactis* in recent 6 years in Korea (MOMAF Fishery production statistics, 2004)

(단위 : MT)

연 도	1998	1999	2000	2001	2002	2003
어획량	15,011	13,490	19,630	7,938	10,941	7,098

(해양수산부 어업생산 통계, 2004)



### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 3년간 참조기를 대상으로 인공종묘생산 기술을 개발하는데 그 목적을 두었으며, 이를 수행하기 위해 기초 생태자료 분석, 자연산 참조기 채포 및 실내사육 기술, 산란유도에 의한 종묘생산과 양성기술, 양식생물학적 특성, 특정 유전자 분리 동정과 다양성 분석에 대한 일련의 연구를 수행함으로써 양식생태학적 특성 이해와 새로운 양식대상 가능성에 대한 연구결과를 종합하여 보고하고자 한다.

### IV. 연구개발 결과

#### 1. 어장환경

자연산 참조기 채포어장은 전라남도 영광군 백수리를 주소로 칠산해역에 위치하고 있고 육지에서 개막이 시설까지는 약 5km에 이르는 갯벌을 형성하고 있으며, 채포시 수심은 50~60 cm이었지만 수중의 어류가 보이지 않을 정도로 해수는 매우 혼탁한 상태였다. 2004년도 채포기간(8.14~10.19) 현장 수온은 17.2~28.5℃이었으며, 8월 14~22일 동안은 28.5℃로 수온이 가장 높았다. 2005년도 채포기간(9.16~11.06)에는 19.4~22.7℃ 범위로 9월 16~25일 사이에 수온이 22.7℃로 가장 높았다. 채포기간 동안 현장의 평균 수온은 23.1℃이었다. 염분농도는 24.5~30.2 ppt, 용존산소는 5.33~7.22 ppm이었다.

#### 2. 분류 및 생태

가. 분류학적 위치

- (1) 농어목(Order Percida)/민어과(Family Sciaenidae)/조기속(Genus *Larimichthys*)
- (2) 국 명 : 참조기
- (3) 학 명 : *Larimichthys polyactis*
- (4) 영 명 : Small yellow croaker
- (5) 일본명 : キグチ(Kiguchi)
- (6) 중국명 : 小黄魚
- (7) 방 언 : 석수어, 노랑조기, 황조기

## 나. 형태학적 특징

몸과 머리는 좌우로 납작하며 몸 전반부는 체고가 높고 뒤쪽은 낮은 편이다. 눈은 머리의 등 쪽에 위치하고, 눈의 지름은 주둥이 길이보다 약간 짧은 편이다. 주둥이 앞쪽은 둥글고 아래턱이 위턱보다 약간 길다. 기조수는 9~11극 31~36연조이다. 뒷지느러미의 기조수는 2극 9~10연조이고 두 번째 극조는 눈의 지름보다 짧다. 꼬리지느러미의 후연은 바깥쪽으로 삼각형을 이룬다. 측선은 몸 중앙보다 위에 위치하고 측선 비늘은 53~59개이다. 몸의 색깔은 등 쪽은 회색을 띤 황금색 바탕에 옆줄 아래쪽의 배는 선명한 노란색을 띤다. 입술은 붉은색을 띠고 입안은 희고 아가미구멍은 검은색을 띠며 꼬리자루는 두툼한 편이다.

## 다. 생태학적 특징

### (1) 분포 및 회유

참조기는 황해 혼합군과 강소군 및 절강군 등 3개 계군이 있다. 황해 혼합군은 발해연안 압록강 하구역 및 한국 서해연안의 각지에서 산란한 후 9월부터 외해측으로 이동하여 황해 중남부에서 제주도 서부 및 서·남측 수역으로 남하한다. 강소군은 양자강 하구역의 북측에서 산란 후 8~9월경에 이동하여 12월에서 이듬해 3월까지 황해 중·남부로부터 동중국해의 깊은 수심에서 월동 한다. 4~5월부터 수온이 상승하면 산란장으로 이동한다. 절강군은 2~3월에 중국남부의 절강근해에 출현한 후 4~5월에 연안역에서 산란하고 9월경부터 외해 측으로 이동하여 동계에 깊은 수심에서 월동하고 있다.

3개 계군 중 우리나라 황해로 회유하는 어군인 황해 혼합군은 산란기가 4월에서 6월로 남쪽으로 갈수록 산란기가 빠르다. 산란군은 해역수온이 9~12℃인 4월에 북상하며 10~14℃ 수온 범위에서 산란한다. 분포밀도는 연안 및 도서를 중심으로 높으나 외해일수록 낮다. 시기별로는 산란기인 4월경에 위도 근해의 칠산도 어장, 5월에는 연평도 근해에 가장 많이 출현한다. 2세미만 계군의 어장은 수온 16~20℃의 수온대에서 주로 위도, 안마도, 흑산도 근해에 걸쳐 7~10월에 형성된다(그림 1).

### (2) 습성

우리나라 서·남해와 발해만, 동중국해 등에서 찾아볼 수 있으며 해역수심이 40~160 m로 저질성분이 모래나 갯벌로 형성된 곳에서 주로 서식한다.

### (3) 섭식

해수중의 동물성 플랑크톤을 주로 섭식하는데 4월에는 유파우시아(Euphausia), 암피포다(Amphipoda) 등을 섭식하며, 5월 산란기에는 유파우시아(Euphausia), 암피포다(Amphipoda), 마이시다(mysidaca), 어류 자치어 및 새우류 등을 섭식한다. 수온이 점차 상승하는 여름철로 접어들면서 먹이의 양은 증가되며 8월쯤 되면 주로 회유성 어류 및 저서성 어류의 자치어를 먹이로 섭식한다.

### (4) 산란

산란기는 4~6월로서 남쪽일수록 빠르고 북쪽일수록 늦은 편이다. 위도 어장의 산란기는 4월 중순~하순이며, 연평도 어장은 5월 초순~하순까지가 산란성기이나 일부는 6월 중순에도 산란을 한다. 참조기의 생물학적 최소형은 평균체장 18 cm (2세어)이며, 포란수는 전장 30 cm 전후에서 3~7만개, 35 cm 전후 10만개, 4세어 이상은 10~16만개를 산란한다고 보고(최, 1980)되어 있으며, 현재까지 알려진 참조기의 일반적인 크기별 산란율은 표 2와 같다. 연령에 따른 성비는 1세어가 암·수 1 : 1이며, 2세어부터는 암컷이 많아지기 시작하여 6세어 이후는 암컷 66.6%, 수컷 33.4%로 2 : 1의 비율을 형성한다.

### (5) 성장

부화 직후의 자어는 전장 3.3~3.5 mm이며 2~3개월이 지나면 5~6 cm로 성장한다. 부화 후에서 1년까지 성장이 가장 빠르고 이 후 연간성장 속도가 다소 감소하다가 3~4세 사이에는 연간 평균 1.5 cm로 성장이 늦어지며 3세 이상에서는 다시 연간 2~3 cm 성장하는 특성을 가지며, 연령별 길이성장은 표 3과 같다.

표 2. 참조기의 크기별 산란율

Table 2. Spawning rate by size of small yellow croaker, *L. polyactis*

전 장 (cm)	16	19	20	> 21
산란율 (%)	33	48	72	100

표 3. 참조기의 연령별 성장

Table 3. Growth by age of small yellow croaker, *L. polyactis*

연령 (age)	1	2	3	4	5	6	7	8
전장 (cm)	12	18	22	24	25.6	27	29.5	31.8

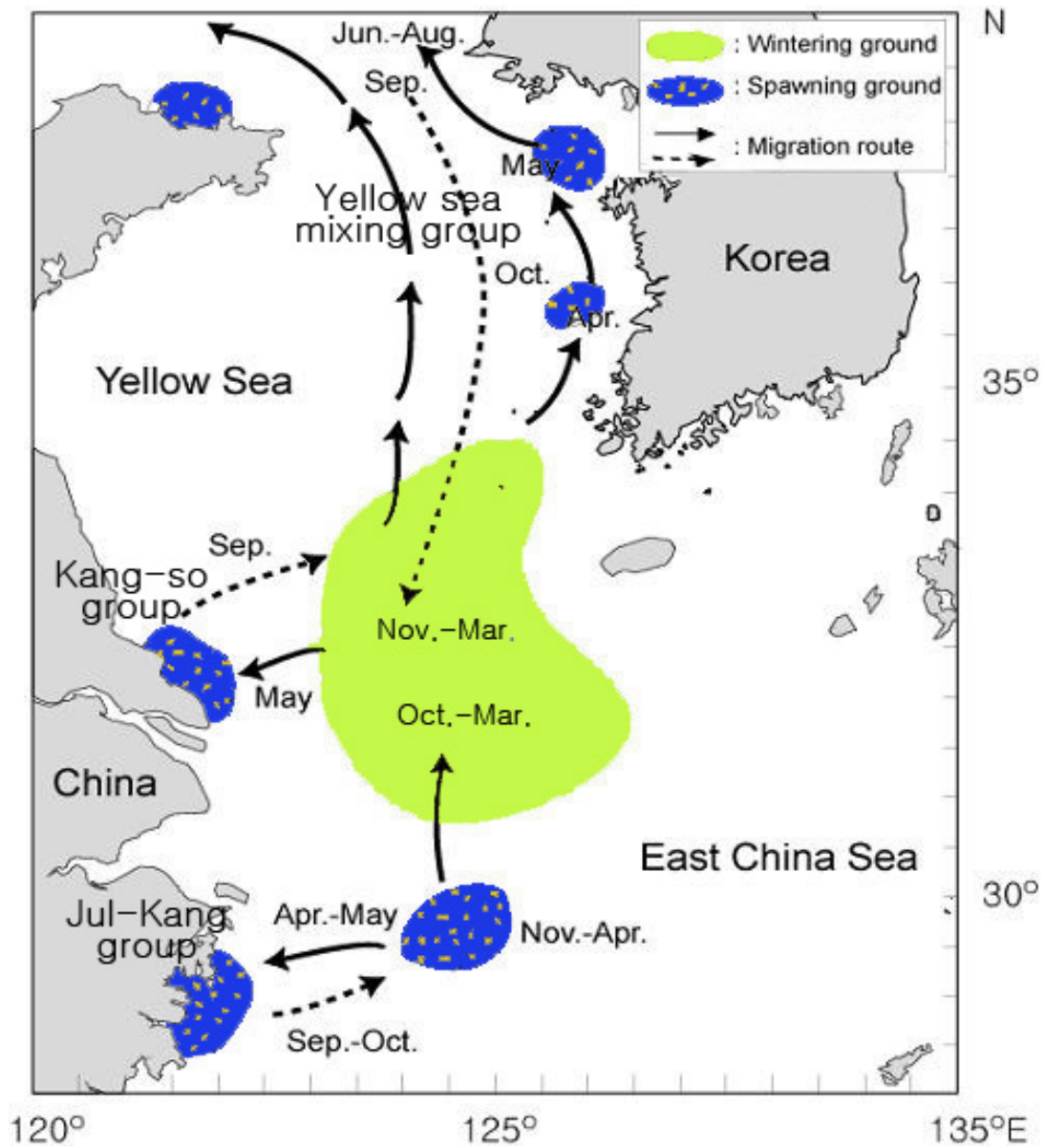


그림 1. 참조기 계군의 회유 경로(Shojima & Otaki, 1982).

Fig. 1. Migration route on the groups of the wild small yellow croaker, *L. polyactis* (Shojima & Otaki, 1982).

### 3. 생태학적 정보

2004년 2월부터 2005년 2월까지 계절에 따라 추자도, 영광 및 목포에서 포획된 자연산 암컷 참조기를 조직학적으로 조사하였다. 참조기의 난소는 좌우 비대칭의 낭상형으로 복강 배측(背側) 후방부에 위치하며, 복강의 가장자리 뒤끝 부위에서 합일되어 노관과 연결되어 비노생식공으로 개구되어 있는 형태였다. 생체지수의 경우, 비만도(CF)와 간중량지수(HSI)는 생식선 발달과 특별한 상관관계가 없었으나, 대신 내장중량지수(VSI)는 역상관 관계, 생식소중량지수(GSI)는 정상관 관계를 나타내었다.

한편 생식세포 월별 변화 조사 결과, 참조기는 수온이 낮아지기 시작하는 9월부터 생식소 내 난원세포가 난모세포로 발달하기 시작하여 1차 성장기를 나타내고, 10~12월에 2차 성장기를 보였다. 다음해 1~4월에 난소는 본격적으로 성숙을 시작하여, 5월에 최종 성숙, 배란 및 산란 단계를 나타내었다. 이후 6월까지 참조기는 왕성한 산란 시기에 머물러 있었으며, 7월에 이르러 산란 후 잔존 난모세포를 퇴화, 흡수시키고 8월에 이르러 휴지기에 접어들었다. 이때 생식세포 발달 양식은 난군동기발달형이며, 산란형은 봄-여름 1회 산란형인 것을 알 수 있었다.

### 4. 유전학적 분석

#### 가. 유전자 분석을 이용한 참조기 확인

현재까지 참조기에서 526개의 염기서열만 밝혀져 있는 상태이며, 보고된 참조기와 부세의 염기서열에 의한 유전적 상동성(homology)은 97%로 526개의 염기중 514개가 동일하고 12개의 염기는 서로 다른 것으로 밝혀져 있다. 본 실험에서 참조기로부터 발현이 확인된 16S ribosomal RNA 유전자를 대상으로 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하여 염기서열을 분석(Sequencing)한 결과, 우리가 포획한 어류가 참조기임을 확인하였다.

#### 나. GnRH 유전자 동정

참조기와 계통 분류학적으로 가까운 어종에서부터 양서류 포유류에 이르기까지 유전적으로 매우 상동성 있는 부분의 염기서열로부터 primer를 design하여 PCR을 수행한 후 PCR 산물의 cloning, 염기서열을 분석하였다. 어류에서 성성숙 및 성적행동, 귀소본능에 관여하는

것으로 알려져 있는 참조기의 특이적인 sGnRH 및 cGnRH-2와 같은 2종의 GnRH 유전자를 동정 및 cloning하였다.

#### 다. 유전적 다양성

인위적 사육환경(실내 육상수조)에 순치된 참조기 어미개체로부터 생산된 치어 50마리를 이용하여 유전적 다양성을 분석한 결과 대립유전자수는 1~24개였으며, 관찰치(Ho) 및 기대치(He) heterozygosity는 각각 0~0.94 및 0~0.89이었다. 양식집단이 자연집단에 비해 평균 대립유전자수와 평균 이형접합률이 매우 낮게 나타났으며, 대립유전자의 빈도에 있어도 특정 대립유전자에만 국한되어 높게 나타나는 결과를 보였다. 이런 결과는 양식집단의 경우 종묘 생산에 관여하는 어미의 개체수가 적은 것에 기인하기 때문에 상대적으로 유전적 다양성이 낮은 것으로 추정된다.

### 5. 자연산 참조기 채포 및 실내사육 기술

#### 가. 채포

개막이 그물에 갇혀있는 참조기를 뜰채(무결절망)로 포획한 후 수중에 담가놓은 상태에서 플라스틱 바가지로 해수와 함께 1마리씩 상처나 비늘이 손상되지 않도록 조심스럽게 떠서 즉시 운반용 개조콤파인에 설치된 1톤 수조에 수용하였다. 평균전장 18.7 cm, 평균체중 68.9 g으로, 총 채포량은 7,206마리였으며, 채포된 개체 중 5,672마리(78.7%)가 폐사하였고, 최종적으로 1,534마리(21.3%)가 생존하여 실험용으로 사용하였다.

#### 나. 운반 및 수송

개조콤파인 수조에서 활어차로 옮겨주는 과정 또한 채포현장에서와 동일한 방법으로 실시하였으며, 활어차의 수온은 얼음을 이용하여 실내사육지 수온(24~26℃)과 동일하게 맞추어 주었다. 활어차에 수용이 끝나면 항생제(OTC 계열)를 250 ppm 농도로 처리하고, 용존산소는 7~8 ppm으로 유지하여 약육상태로 수송하였다.

#### 다. 실내사육지 수용

실내 사육지에 수용된 개체들은 보통 24시간이 경과하게 되면 안정을 찾으며 무리를 지어 조심스럽게 유영하게 된다. 채포된 참조기 중 약 50~60% 정도가 두부 윗부분이 그물에



부딪혀서 생긴 상처를 가지고 있으므로 실내 수용 후에도 2일 동안 항생제를 250 ppm 농도로 약용하였다.

#### 라. 실내사육

실내사육지에 수용 후 약 3~4일이 경과하게 되면 무리지어 유영하게 되는데 이 시기부터 전체적으로 생사료인 선새우류를 구입하여 공급하기 시작하였고, 활력이 양호하고 적응력이 빠른 일부 개체는 실내사육지에 수용된 후 5일 이후부터 유속을 높이고 1일 3회씩 새우를 충분히 공급하여 주면서 사육하였다.

### 6. 종묘생산

#### 가. 인공성숙 유도

채포한 참조기 어미가 정상적으로 성숙하도록 유도하기 위해서 칠산어장에서 생산되는 새우를 구입하여 지속적으로 공급하였다. 그리고 3일 간격으로 단백질 공급을 다양화하기 위해 전갱이 생사료도 충분히 공급하여 건강 상태를 유지시켜 주었다. 성숙단계까지 도달하는 개체는 약 40% 정도였으며, 실내 사육수조에 놓인 상태에서 산란에 이르는 개체는 없었다.

#### 나. 자연산란 유도

GnRH는 0.1 mg/kg/fish 농도로, HCG는 500 IU/kg/fish 농도로 주사하여 자연산란을 유도한 결과 GnRH를 주사한 개체에서만 산란이 이루어졌다.

#### 다. 수정란 사육관리

산란유도를 위해 호르몬을 주사한 어미로부터 생산된 참조기 수정란은 수중에서 부상하다가 배수관을 통해 유출되어 자연스럽게 준비된 수정란 수집 그물(Ø60×H 45 cm, mesh size 700 µm)에 수집되었다. 수집된 수정란은 18톤 콘크리트 원형수조에 수용하여 관리하였다.

#### 라. 부화율

산란에 참여한 어미로부터 생산된 산란량은 총 80만개였으며 이중 부상란수는 74만개, 수정율은 평균 52.3%였으며, 부화율은 61.2%, 부화자어로 발달하는 개체수는 40만마리로서 즉, 부화된 개체가 부화자어로 발생하는 비율은 89.4%였다.

#### 마. 난 발생

난 발생과정은 수온 22.4℃에서 관찰하였다. 수정된 난은 위란강을 형성하고 수정 10~20분에 배반형성, 1~2시간에 4~8세포기, 2.5~3시간에 상실기, 4~9시간에 포배기, 10~15시간에 낭배기, 16~22시간에 신경배 형성기, 23~32시간에 기관형성기, 35~60시간에 부화자어단계 그리고 122시간 후 난황흡수기로 발달하였다.

#### 바. 자치어 먹이공급

##### (1) 로티퍼(Rotifer)

난황흡수가 완료된 지 1일 경과, 즉 부화 3일째부터 영양을 강화시킨 로티퍼를 마리당 8~10개체 비율로 공급하기 시작하여 27일째까지 공급하였다.

##### (2) 알테미아(Artemia)

알테미아는 난황흡수 후 13일째부터 공급하였으며, 알테미아(3~4개체/마리)와 로티퍼(8~10개체/마리)는 7일 동안 혼합하여 공급하였고, 알테미아는 30일째까지 공급하였다.

##### (3) 배합사료

초기 배합사료는 부화 후 13일째부터 단계적으로 사료입자의 크기를 조정하여 공급하면서 로티퍼와 알테미아의 양과 개체수를 줄여 공급하였다.

### 7. 양식 생물학적 특성

#### 가. 수정란 크기

참조기 수정란은 육안으로는 원형으로 보이나 현미경 관찰시 완전 원형이 아니라 X축 길이(1.363±0.09 mm)와 Y축 길이(1.314±0.09 mm)가 서로 차이를 보여 수정란과 유구의 크기를 표면적( $A=\pi \times X \times Y / 4$ )으로 계산하였다. 수정란의 평균 크기는 1.406±0.09 mm<sup>2</sup>이었으며, 크기변화는 수정 30시간 경과 후 수정란의 면적이 0.055 mm<sup>2</sup> (7.75%)가 감소한 반면 유구의 면적은 변화가 없었다.

#### 나. 부화율

##### (1) 수온별

일반 자연수온 시험구(22.4℃, 대조구)가 51.1%로 가장 높았으며, 25℃ 시험구가 44.5%, 20℃ 시험구가 37.8%, 15℃ 시험구가 3.5% 순으로 나타났다.

(2) 염분농도별

참조기 수정란 부화에는 27.0 ppt 이상의 염분농도가 적정한 것으로 나타났다.

다. 생존율

(1) 수온별

생존율은 자연수온 시험구(대조구)가 73.0±4.2%로 가장 높았다.

(2) 염분농도별

염분농도가 낮은 구간일수록 생존율이 높았으며, 5.0 ppt 구간의 생존율은 90.0±10.0%로 가장 높게 나타났다.

라. 자치어 성장

참조기 수정란에서 난막을 깨고 부화된 부화자어의 크기는 2.32±0.15 mm이었으며, 사육 70 일 후에는 70.68±0.15 mm로 성장하였다.

마. 생태학적 특성

- (1) 5일령(3.9~4.4 mm) : 주로 수면에 분포하며 수면과 수중(10 cm)을 반복하여 수직운동.
- (2) 10일령(4.6~5.8 mm) : 개구(開口), 먹이(로티퍼) 섭식능력 소유, 외부자극에 반응하며, 수면과 수중 약 10~20 cm 정도에 분포 및 유영.
- (3) 15일령(5.6~6.8 mm) : 활동 및 유영능력이 증가하여 주변의 먹이뿐만 아니라 먹이를 찾아 섭식하는 단계.
- (4) 20일령(8.2~12.2 mm) : 알테미아 섭식력 왕성, 배합사료 섭식 개시, 물 흐름을 가르며 수면을 따라 유영.
- (5) 30일령(16.1~26.3 mm) : 배합사료 섭식이 가능하며 수면에서 수중 전반에 걸쳐 분포하여 유영, 소형 및 활력이 약한 개체에 대한 공식현상 심화.
- (6) 40일령(16.8~32.2 mm) : 적극적인 사료섭식 행동, 유속에 반응, 물 흐름에 역행하며 수면으로 부상하여 무리유영, 외부 충격에 민감하게 반응.
- (7) 50일령(40.8~50.1 mm) : 무리유영 중에도 사료를 섭식하며, 공식현상이 완전히 사라짐, 향문으로부터 배설물 분비 현상이 뚜렷.

바. 치어기 적정 사육밀도

시험수조(10 L)에 평균전장  $20.2 \pm 0.18$  mm (0.07 g)인 치어의 밀도별 사육시험 결과, 생존율은 5마리( $100 \pm 0.0\%$ ) > 25마리( $90.7 \pm 6.1\%$ ) > 10마리( $83.3 \pm 5.8\%$ )  $\geq$  20마리( $83.3 \pm 11.5\%$ ) > 15마리( $80.0 \pm 6.7\%$ ) 순으로 나타났으며, 25마리를 수용하였을 경우 사육 효율성이 가장 높았다.

사. 수온 충격에 대한 반응

13℃에서 수온을 11, 9, 7, 5, 3℃로 급격하게 하강시킨 후 24시간 동안 수온충격에 대한 반응을 조사한 결과 11℃와 9℃ 구간에서는 폐사가 없었으나, 5℃와 3℃로 수온을 급강하시킨 구간에서는 21~22시간만에 시험어 전량이 폐사하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

1. 수정란 및 치어 무상분양을 통한 양식 기반조성
2. 참조기 종묘생산 및 양성 핵심기술 전수
3. 특허 출원(2건) : 참조기 채포 및 수송기술, 개조 콤바인 제작
4. 수산관련 학술지 논문게재 : 4편

## S U M M A R Y

Small yellow croaker, *Larimichthy polyactis* a species specific to korean coasts of the Yellow Sea is traditionally favored by korean society. Because of the recent decrease of wild stocks, the landing has failed to meet the demand by the society. The economic value of the species is extremely high when it is specially processed. For instance, Younggwang, Jeollanam-do annually creates about 100 billions Won from Gulbi, a salted small yellow croaker, *L. polyactis*. Therefore, technology development for the seed production and aquaculture of the species is strongly suggested. Once the technology is established, a great number of economic values is expected in terms of general activation of depressed aquaculture business and wild stocks enhancement via seed releasing into the coasts.

Annual reproductive cycle of small yellow croaker were histologically investigated based on samples captured from the coast of Mokpo, Young kwang and Kanghwa, South Korea. Gonadosomatic index (GSI) of female began to increase from December and reached the maximum at May. GSI of male reached the maximum at February. Investigation of GSI change and gonadal tissue showed that the annual reproductive cycle was classified into the following successive 4 stages: the degenerative and resting stage from June to September, the growing stage from October to December, the mature stage from January to February, the ripe and spawning stage from March to June.

We described the isolation and characterization of eight microsatellite loci from small yellow croaker. All loci were found to be polymorphic, and had between three and 27 alleles with expected heterozygosity ranging from 0.48 to 0.98 in 30 individuals examined. Genetic diversity between hatchery population and wild population of small yellow croaker was assessed by means of microsatellite DNA. Marked reductions of genetic diversity in hatchery population compared with the wild population were observed in terms of number of micosatellite alleles and expected heterozygosity.

The wild spawners caught in the knotless-net set in the fisheries grounds were individually transferred into a specially designed culture tank (1 ton) set in the hatchery. The biometry of the experiment fish were 18.7 cm on average total length and 68.8 g. Among 7,206 fish, 1,534 fish survived, representing 21.3% of survival rate.

During the transportation, the fish were kept at water temperature 24-26°C. The transportation tanks were aerated to keep 7-8 ppm of DO and treated with 250 ppm of antibacterial (OTC). The fish contained in the indoor tank recover 24 hr after the containment, slowly swimming in the tank. Because 50-60% of the fish were hurt on the way of transportation, they were treated with 250 ppm antibacterial for two days.

The fish contained in the indoor tank recovered from normal condition after 3-4 days. The recovered fish were fed with unprocessed food and pellets. Five days after the containment, the fish were fed with unprocessed shrimps 3 times a day. The fish were cultured in captivity for the maturation. Maturation was manipulated by feeding nutrition-rich foods (shrimp and sardine). About 40% of the total fish reached the maturation, however, none of the fish spawned in the tank.

In the hormonal injection of GnRH (0.1 mg/kg/fish) and HCG (500 IU/kg/fish), the fish injected with the former spawned. The fertilized eggs obtained from hormonal injected fish were collected in the egg collecting net ( $\varnothing 60 \times H 45$  cm, mesh size 700  $\mu m$ ). The collected eggs were contained and managed in the round concrete tank (18 ton). Among 800,000 eggs collected, floating eggs were 740,000 with fertilization rate of 52.3% and hatching rate of 89.4% (no of fish larva, 400,000).

Fertilized egg formed perivitelline space, embryo disc, 4-8 cell stage, loss boat, blastula, gastrula, neurula, organogenesis, newly hatching larva and yolk absorption in 0, 10-20 minutes, 1-2 hours, 4-9 hours, 10-15 hours, 16-22 hours, 23-32 hours, 35-60 hours and 122 hours, respectively.

The fertilized eggs were round by appearance characteristics, but they were not round under microscopic observation: X axis of  $1.363 \pm 0.09$  mm and Y axis of  $1.314 \pm 0.09$  mm. Therefore, the surface areas of fertilized eggs and oil droplet could be calculated as following way:

With an aid of the equation as  $A = \pi \times X \times Y / 4$ , after fertilization 30 hours surfaces area of fertilized eggs was decreased 7.75% ( $0.055 \text{ mm}^2$ ) and surfaces area of oil sac was not changed.

Higher fertilization rate were obtained from 51.1% in control (natural sea water), followed by 44.5% in  $25^\circ\text{C}$ , 37% in  $20^\circ\text{C}$ , and 3.5% in  $15^\circ\text{C}$ . Best survival were obtained from untreated control group with survival of  $73.0 \pm 4.2\%$ . Higher survivals were achieved from lower salinities, with best survival of  $90.0 \pm 10.0\%$  at 5 ppt. The size of the just hatched larvae was  $2.32 \pm 0.15$  mm, and then gain growth of 68.36 mm by 70 days, reaching  $70.68 \pm 0.15$  mm.

Larval density of 25 ind./10 L was optimum culture density when larvae of  $20.2 \pm 0.18$  mm (0.07 g) were cultured for 30 days in 10 L culture chamber. Best survival of juvenile small yellow croaker in the culture density was  $100 \pm 0.0\%$  at 5 ind./10 L, followed by 25 ind./10 L ( $90.7 \pm 6.1\%$ ), 10 ind./10 L ( $83.3 \pm 5.8\%$ ), 20 ind./10 L ( $83.3 \pm 11.5\%$ ), and 15 ind./10 L ( $80.0 \pm 6.7\%$ ). The suggested density for the fish juvenile was 25 ind./10 L. In the study of temperature-driven mortality (temperature decreases from  $13^\circ\text{C}$  to 11, 9, 7, 5, and  $3^\circ\text{C}$ ), manifest thermal shocks were noticed in the decreases to  $5^\circ\text{C}$  and  $3^\circ\text{C}$ , where all the juveniles exhibited a total mortality in 21-22 hours.



# CONTENTS

## I . Title

Technology development of the hatchery-based seed production of small yellow croaker, *Larimichthys polyactis*

## II. Study purpose and justification

Finfish mariculture in Korea initiated in the early 1970s for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and sea bream (*Chrysophrys major*). Thereafter, a considerable progress in mariculture has been made with an establishment of hatchery-based seed production of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by the outstanding works of NFRDI in 1980s. The success in the hatchery-based seed production of the flounder have brought development of land-based culture system for the species, with the flounder occupying 95% of the total farmed fish from the system. Pen culture system was also developed for the production of a variety of farmed fishes; 70% for rockfish, 15% for sea breams, and the rest 5% for other species. Recently, however, the fish culture industry is under depression. The landing of small yellow croaker, *Larimichthys polyactis* by catch is normally by large scale net. Table 1 shows the fish landing by catch, where 2003 landing of the species decreased down to 52.7% of 1998 landing.

Small yellow croaker, a species specific to Korean coasts of the Yellow Sea is traditionally favored by Korean society. Because of the recent decrease of wild stocks, the landing has failed to meet the demand by the society. The economic value of the species is extremely high when it is specially processed. For instance, Younggwang, Jeollanam-do annually creates about 100 billions Won from Gulbi, a salted small yellow croaker. Therefore, technology development for the seed production and aquaculture of the species is strongly suggested. Once the technology is established, a great number of economic values is expected in terms of general activation of depressed aquaculture business and wild stocks enhancement via seed releasing into the coasts.

### III. Contents and scope of the study

The present study focused on the technology development of hatchery-based seeds of small yellow croaker for 3 years. For a generation of the knowledge of aquaculture ecology and aquaculture potential in the future, studied were general ecology, collection of wild stocks, broodstock acclimation in captivity, spawning induction, hatchery-based seed production, on-going growth, aquaculture biology, and isolation and identification of specific genes.

### IV. Result

#### 1. Environments of fisheries ground (Chilsan, Younggwang, Jeollanam-do)

Environments of the fisheries ground were characterized by 5 km long muddy shore. The location of the shore where spawners were obtained was 20-40cm deep and highly turbid. Water temperatures of the location were 17.2-28.5°C during August 14-October 19, 2004 (with maximum of 28.5°C in August 14-22) and 19.4-22.7°C during September 16-November 06, 2005 (with maximum in September 16~25). Salinity and DO were 4.5~30.2 ppt and 5.33~7.22 ppm, respectively.

#### 2. Classification and ecology

##### A. Classification

- (1) Order Percida / Family Sciaenidae / Genus *Larimichthys*
- (2) Common name: Small yellow croaker
- (3) Scientific name: *Larimichthys polyactis*
- (4) English name : Small yellow croaker
- (5) Japanese name: キグチ(Kiguchi)
- (6) Chinese name : 小黄魚

## B. Ecology

### (1) External characteristics

Shapes of the body and head are plat from right and left sides, and the body height is relatively high in the prior and low in the posterior of the body. The eyes are located in the dorsal part of the head, and diameter of the eye is a little bit shorter than the length of the mouth. Number of rays of the first dorsal fin is 9-11 spines and 31-36 soft rays. The shape of posterior margin of the caudal fin is alike triangle. The lateral line is located in the upper part of the middle of the body, and number of the lateral line scales is 53-59. The color of the body is gray small yellow in dorsal part and clear small yellow in the abdominal part, the lower part of the lateral line. Color of the lips is orange, white in the mouth, and black gill slits. The caudal peduncle is relatively thick.

### (2) Habitats

The species distributes in the coastal waters of 40-160 m in depth from south and west of Korean peninsula to East China Sea.

### (3) Foods

The fish feeds on plankton such as Euphausia and Amphipoda in April and Euphausia, Amphipoda, mysidaca, larval fish, shrimps in the spawning season of May. Thereafter, the fish feeds on juveniles of migrating fishes and benthic fishes.

### (4) Spawning

Spawning season of the species is from April to June. Spawning of the fish occurs middle and late April in Wi Island and May in Yeonpyung Island. Biological minimum size of the fish is 18 cm (2 years). Fecundity are 30,000-70,000 for 30 cm in total length, 100,000 for about 35 cm, 100,000-160,000 for the fish older than 4 years (Table 2). Ratio of female and female was 1:1 for 1 year fish. The ratio increased with the ages, finally showing 2:1 for 6-years old fish.

### (5) Growth

The size of just hatched fingerling, 3.3-3.5 cm in total length, became 5-6 cm in total length 2-3 months later. The growth was generally fast in the first a year with the growth of 1.5 cm in 3-4 years and 2-3 cm in 3 years after hatching.

## 3. Ecological information

Small yellow croaker, spread widely in the Yellow Sea and East China Sea, can be divided into three sub-populations, Yellow Sea, Kiangsu and Chekiang stocks, by the migration routes. The Yellow Sea stock migrates toward offshore in September, after spawning in the mouth of Abrok River and in the western sea of Korea, and then moves to the southern and western areas of Jeju Island through southern part of the Yellow Sea. Kiangsu stock migrates toward offshore in August and September after spawning in the northern part of the mouth of Yangtze River, and then over-winter in the deep sea in the southern part of the Yellow Sea and in the East China Seas from December through March. According to increasing of the water temperature from April to May it migrates to the spawning grounds. Chekiang stock spawns in the coastal areas of Chekiang Province from April to May and migrates toward the offshore and spends winter time in the deep sea areas near the Chekiang Province.

Among the three sub-populations, the Yellow Sea stock, migrating to the Korean western sea, spawns April to June spawn earlier in the southern area than in the Northern. When the spawning stocks move northward the spawn areas, the water temperature is 9-12°C, their optimum spawning temperature is 10-14°C. The distributional density of the fish is relatively higher in the coastal and around small islands but lower in the offshore. They migrate around Chilsan Island near Wi Island in April, and then appear mostly around Yeonpyeong Island in May. The fishing grounds of younger stocks than two year-old are formed around Wi, Anma and Heuksan Islands from July through October.

#### 4. Genetic analysis

##### A. Genetic identification of the small yellow croaker

In the genetic identification of the fish, the analysed 526 bp of 16S ribosomal RNA with an aid of PCR revealed 97% of sequence homology. These data mean the fish used in this experiment was identified as a small yellow croaker.

##### B. Identification of GnRH gene

The genetic properties of GenesGnRH and cGnRH-2 were analysed using PCR with primers specially designed from phylogenically relevant fish, amphibians, and mammals. From the analysis small yellow croaker-specific two of cGnRH-2 which were similar to GenesGnRH and cGnRH-2 were identified and cloned.

##### C. Genetic diversity

Genetic diversity of 50 juvenile small yellow croakers from the wild spawners acclimated to captivity were analysed. The alleles of the juvenile were 1-24 and  $H_o$  and  $H_e$  heterozygosity were 0-0.94 and 0-0.89, respectively. The allele and heterozygosity of wild juveniles were diversified compared with those of farmed ones. These results were from the limited number of spawners introduced to hatchery.

#### 5. Collection of wild spawners and hatchery-based seed production

##### A. Collection

The wild spawners caught in the fens-type net (with smooth mesh) set in the fisheries grounds were individually transferred into a specially designed culture tank (1 ton) set in the hatchery. The biometry of the experiment fish were 18.7cm on average total length and 68.8g. Among 7,206 fish, 1,534 fish survived, representing 21.3% of survival rate

## B. Transportation

During the transportation, the fish were kept at water temperature 24-26°C. The transportation tanks were aerated to keep 7-8 ppm of DO and treated with 250 ppm of antibacterial (OTC).

## C. Containment in the indoor tank

The fish contained in the indoor tank recover 24 hr after the containment, slowly swimming in the tank. Because 50-60% of the fish were hurt on the way of transportation, they were treated with 250 ppm antibacterial for two days.

## D. Indoor culture

The fish contained in the indoor tank recovered from days 3-4 after the containment. The recovered fish were fed with unprocessed food and pellets. Five days after the containment, the fish were fed with unprocessed shrimps 3 times a day.

# 6. Seed production

## A. Maturation conditioning in captivity

The fish were cultured in captivity for the maturation. Maturation was manipulated by feeding nutrition-rich foods (shrimp and sardine). About 40% of the total fish reached the maturation, however, none of the fish spawned in the culture tank.

## B. Induction of spawning

In the hormonal injection of GnRH (0.1mg/kg) and HCG (500IU/kg), the fish injected with the former spawned.

## C. Management of fertilized eggs

The fertilized eggs obtained from hormonal injected fish were collected in the egg

collecting net ( $\varnothing 60 \times H 45$ cm, mesh size 700 $\mu$ m). The collected eggs were contained and managed in the round concrete tank (18 ton).

#### D. Hatching rate

Among 800,000 eggs collected, floating eggs were 740,000 with fertilization rate of 52.3% and hatching rate of 89.4% (no of fish larva, 400,000).

#### E. Egg development

Fertilized egg formed perivitelline space, embryo disc, 4-8 cell stage, loss boat, blastula, gastrula, neurula, organogenesis, newly hatching larva and yolk absorption in 0, 10-20 minutes, 1-2 hours, 4-9 hours, 10-15 hours, 16-22 hours, 23-32 hours, 35-60 hours and 122 hours, respectively.

#### F. Culture of fish larvae

##### (1) Supply of rotifer

The larval fish were fed with nutritionally enhanced rotifer (100 rotifer/fish larva) just after all yolks were absorbed (7 days after fertilization), The supply of rotifer continued by days 8-15 when artemia were first supplied.

##### (2) Supply of Artemis

Supply of artemia were initiated by day 8 at the density of 100 artemia/fish larva. Rotifer were also supplied with the artemia at the density of 20-50 ind./fish larva. The supply of rotifer continued by day 15.

##### (3) Supply of formulated diet

The first grade of formulated diets were supply to the fish larvae from 24 days after fertilization, this coincided with 16th day of rotifer supply, 9th day of artemia supply. However some of the fish larvae started to feed the formulated diet from day 7. It was 15th day when all the larvae started to feed the diet.

## 7. Biological characteristics

### A. Size of the fertilized egg

The fertilized eggs were round by appearance characteristics, but they were not round under microscopic observation: X axis of  $1.363 \pm 0.09$  mm and Y axis of  $1.314 \pm 0.09$  mm. Therefore, the surface areas of fertilized eggs and oil sac could be calculated as following way: With an aid of the equation as  $A = \pi \times X \times Y / 4$ , after fertilization 30 hours surfaces area of fertilized eggs was decreased 7.75% ( $0.055 \text{ mm}^2$ ) and surfaces area of oil sac was not changed.

### B. Fertilization rate

#### (1) Temperature dependent fertilization rate

Higher fertilization rate were obtained from 51.1% in control (natural sea water), followed by 44.5% in 25°C, 37% in 20°C, and 3.5% in 15°C.

#### (2) Salinity dependent fertilization rate

The best fertilization was resulted from salinity 27 ppt.

### C. Survival

#### (1) Temperature dependent survival

Best survival were obtained from untreated control group with survival of  $73.0 \pm 4.2\%$ .

#### (2) Salinity dependent survival

Higher survivals were achieved from lower salinities, with best survival of  $90.0 \pm 10.0\%$  at 5 ppt.

### D. Larval growth

The size of the just hatched larvae was  $2.32 \pm 0.15$  mm, and then gain growth of 68.36 mm by 70 days, reaching  $70.68 \pm 0.15$  mm.



#### E. Optimum culture density

Larval density of 25 ind./10 L was optimum culture density when larvae of  $20.2 \pm 0.18$  mm ( $0.07$  g) were cultured for 30 days in 10 L culture chamber.

#### F. Ecological behavior by growth

- (1) Day 5 : Distributed in the water surface moving up and down in 10 cm depth.
- (2) Day 10 : Mouth opened, capable of rotifer, responding to external stimuli, moving up and down in depth 10-20 cm.
- (3) Day 15 : Actively moving chasing foods in the tank.
- (4) Day 20 : Actively feeding of Artemia and capable of feeding formulated diet, swimming against water current.
- (5) Day 30 : Distributed throughout the culture tank, exhibiting cannibalism.
- (6) Day 40 : Active in feeding formulated feed, swimming over water flow with groups, sensitively reacting to external stimulus
- (7) Day 50 : Showing feeding activity of formulated diet during schooling in the tank, showing no more cannibalism, and observable of feces excretion from anus.

#### G. Juvenile culture density

Best survival of juvenile small yellow croaker ( $20.2 \pm 0.18$  mm,  $0.07$  g) in the culture density was  $100 \pm 0.0\%$  at 5 ind./10 L, followed by 25 ind./10 L ( $90.7 \pm 6.1\%$ ), 10 ind./10 L ( $83.3 \pm 5.8\%$ ), 20 ind./10 L ( $83.3 \pm 11.5\%$ ), and 15 ind./10 L ( $80.0 \pm 6.7\%$ ). The suggested density for the fish juvenile was 25 ind./10 L.

#### H. Temperature-driven mortality

In the study of temperature-driven mortality (temperature decreases from  $13^\circ\text{C}$  to 11, 9, 7, 5, and  $3^\circ\text{C}$ ), manifest thermal shocks were noticed in the decreases to  $5^\circ\text{C}$  and  $3^\circ\text{C}$ , where all the juveniles exhibited a total mortality in 21-22 hours.

# CONTENTS LIST

<b>List of Table</b> .....	45
<b>List of Figures</b> .....	51
<b>Chapter 1. Summary of the research and development project</b> .....	55
Section 1. Object .....	55
Section 2. Necessity .....	55
1. Technical side .....	55
2. Economical and industrial side .....	55
3. Social and cultural side .....	56
Section 3. Scope of of the research and development .....	57
1. First-year .....	57
2. Second-year .....	57
3. Third-year .....	58
<b>Chapter 2. Present of domestic and international technical development</b> .....	59
Section 1. Present of technical development .....	59
Section 2. Point at issue .....	61
<b>Chapter 3. Content and result of technical development</b> .....	61
Section 1. Method .....	61
1. Reproductive biological trait .....	61
A. Sample collection .....	61
B. Item of measurement .....	61
C. Tissue analysis .....	64

2. Identification of GnRH gene and confirmation of small yellow croaker	66
A. Brain sample	66
B. Total RNA segregation	66
C. c-DNA synthesis	66
D. Polymerase Chain Reaction	66
E. Ligation, transformation, plasmid DNA segregation and sequencing	67
3. Genetic diversity	67
A. Experimental fish species	67
B. Segregation of genomic DNA	67
C. Microsatellite segregation	67
(1) DNA cutting and adapter ligation by restriction enzyme	67
(2) Microsatellite DNA enrichment by hybridization	68
(3) PCR by adapter arrangement	68
(4) Cutting of Nhe I area and vector Xba I with adapter	69
(5) Transformation	69
(6) Identification of positive colony by colony hybridization	69
(7) Analysis of DNA sequencing of positive colony	69
D. Diversity of analysis by Microsatellite DNA	69
(1) Primer design	69
(2) Analysis of Microsatellite genetic type	70
(3) Statistics analysis	70
4. Seed production	70
A. Security of adult group	70

B. Adult culture, maturation and spawning induction	71
(1) Wintering management	71
(2) Self-spawning induction by hormone injection	71
C. Production of juvenile small yellow croaker	72
(1) Fertilized eggs	72
(2) Culture management	77
(a) Rotifer	77
(b) Artemia	77
(c) Artificial feed	77
(d) Culture	77
5. Biological specification for culture	79
A. Egg development	79
B. Fertilized eggs size	79
C. Hatching rate	79
(1) water temperature	79
(2) salinity	79
D. Survival rate	79
(1) water temperature	79
(2) salinity	79
E. Decision of optimal spawning times	80
F. Behavior trait	80
G. Survival rate by various culture density	80
H. Water temperature stress	80

Section 2. Result and Discussion	81
1. Reproductive biological trait	81
A. Water temperature change of catching site	82
B. Reproductive biological information	85
(1) Vital index	85
(2) Gonad development	92
(a) Ovary	92
(b) Spermary	94
(3) Analysis of reproductive cycle	100
(a) Growth stage	100
(b) Maturation stage	100
(c) Final maturation and spawning stage	100
(d) Degeneration and rest	100
2. Genetic analysis	103
A. Genetic identification	103
(1) Analysis of microsatellite DNA	103
(2) Species confirm by the genetic analysis	104
(3) 16S Ribosomal RNA gene confirm by gene sequencing	104
B. Identification of GnRH gene and confirmation	110
(1) The role of GnRH	110
(2) Sequence comparison	114
C. Analysis of genetic diversity	117
(1) Microsatellite segregation	117

(2) Genetic diversity	-----	117
3. Seed production	-----	124
A. Standard method of capture, transport and accommodation in indoor of small yellow croaker	-----	124
(1) Catching facilities	-----	124
(2) Selection of transport techniques	-----	127
(3) Standard method for security of adult wild small yellow croaker	---	127
(a) Reconstructed-combine for tidal land moving	-----	128
(b) Capture	-----	128
(c) Transportation	-----	128
(d) Accommodation	-----	128
(e) Culture at the indoor system	-----	129
B. Serity of adult wild small yellow croaker	-----	135
(1) Water temperature of field, transport and culture ground	-----	135
(2) Security and survival rate of adult small yellow croaker	-----	135
C. Induction of artificial reproduction	-----	138
(1) Maturation induction	-----	138
(2) Self-spawning induction	-----	138
(3) Spawning by induction of maturation	-----	141
D. Hatching management of fertilized eggs	-----	141
(1) Hatching of fertilized eggs	-----	141
(2) Rearing management of fertilized eggs	-----	141
(3) Egg development	-----	141
E. Larvae and juvenile of small yellow croaker	-----	148

4. Standard method of mass seed production -----	153
A. Confirmation of spawning induction times -----	153
B. Management of larvae and juvenile of small yellow croaker -----	158
(1) Fertilized eggs collection -----	158
(2) Hatching condition -----	158
(3) Culture condition of larvae and juvenile of small yellow croaker -----	158
C. Investigation of feed conversion stage of larvae and juvenile of small yellow croaker -----	163
Times and method of formulated diet supply -----	163
(1) Nutrition strengthening of Rotifer -----	163
(2) Supply of Rotifer -----	163
(3) Nutrition strengthening of Artemia -----	163
(4) Supply of Artemia -----	163
(5) Supply of formulated diet -----	164
5. Biological specification for culture -----	167
A. Fertilized eggs size -----	167
B. Growth change of larvae and juvenile of small yellow croaker -----	167
C. Hatching rate -----	167
(1) Water temperature -----	167
(2) Salinity -----	167
D. Survival rate -----	173
(1) Water temperature -----	173

(2) Salinity	-----	173
E. Optimal density of larvae and juvenile of small yellow croaker	----	173
F. Early growth of larvae and juvenile of small yellow croaker	-----	173
G. Behavior trait on the early growth	-----	180
H. Response and survival rate of water temperature stress	-----	181
6. Releasing and free distribution of larvae and juvenile of small yellow croaker	-----	184
A. Transport of larvae and juvenile of small yellow croaker	-----	184
B. Releasing	-----	184
C. Free distribution	-----	184
<b>Chapter 4. Aim achievement level and contribution level in the relative part</b>	-----	189
<b>Chapter 5. Application plan of research product</b>	-----	192
Section 1. Core techniques or research product	-----	192
1. Core techniques	-----	192
2. Research product	-----	192
Section 2. Paper publication	-----	193
Section 3. Level of core techniques and application type	-----	194
Section 4. Application plan of each research product	-----	195
Section 5. Qualification for techniques transfer of result product	-----	196
Section 6. Anticipation effects	-----	197
Section 7. Reference	-----	198



# 목 차

표 목 차	-----	43
그림목차	-----	47
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	-----	55
제 1 절 연구개발의 목적	-----	55
제 2 절 연구개발의 필요성	-----	55
1. 기술적인 측면	-----	55
2. 경제·산업적 측면	-----	55
3. 사회·문화적 측면	-----	56
제 3 절 연구개발의 범위	-----	57
1. 1차년도	-----	57
2. 2차년도	-----	57
3. 3차년도	-----	58
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	-----	59
제 1 절 기술개발 현황	-----	59
제 2 절 문제점	-----	60
<b>제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과</b>	-----	61
제 1 절 연구방법	-----	61
1. 번식생물학적 특성	-----	61
가. 실험시료 채집	-----	61
나. 측정항목	-----	61
다. 조직학적 분석	-----	64

2. 참조기 확인 및 GnRH 유전자 동정 -----	66
가. 시료 및 뇌 수집 -----	66
나. Total RNA 분리 -----	66
다. c-DNA 합성 -----	66
라. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction) -----	66
마. Ligation, transformation, plasmid DNA 분리 및 염기서열 분석 -----	67
3. 유전적 다양성 분석 -----	67
가. 실험어 -----	67
나. Genomic DNA 분리 -----	67
다. Microsatellite DNA 분리 -----	67
(1) 제한효소에 의한 DNA 절단 및 adapter의 ligation -----	67
(2) Hybridization에 의한 microsatellite DNA의 enrichment -----	68
(3) Adapter 배열을 이용한 PCR -----	68
(4) Adapter의 Nhe I 영역의 절단과 vector의 Xba I 절단 -----	69
(5) 형질전환(Transformation) -----	69
(6) Colony hybridization에 의한 양성 colony 확인 -----	69
(7) 양성 colony의 DNA 염기서열 분석 -----	69
라. Microsatellite DNA에 의한 다양성 분석 -----	69
(1) Primer 설계 및 표지 -----	69
(2) Microsatellite 유전자형 분석 -----	70
(3) 통계처리 및 분석방법 -----	70
4. 종묘생산 -----	70
가. 어미개체군 확보 -----	70

나. 어미 사육, 성숙 및 산란유도	71
(1) 실내 어미 월동사육 관리	71
(2) 성숙에 의한 자연산란 유도	71
다. 인공종묘 생산	72
(1) 수정란 관리	72
(2) 참조기 치어 사육관리	77
(가) 로티퍼 공급	77
(나) 알테미아 공급	77
(다) 배합사료 공급	77
(라) 치어 사육	77
5. 양식생물학적 특성	79
가. 난 발생	79
나. 수정란 크기	79
다. 부화율	79
(1) 수온별	79
(2) 염분농도별	79
라. 생존율	79
(1) 수온별	79
(2) 염분농도별	79
마. 적정 산란시기 판정	80
바. 행동특성	80
사. 밀도별 생존율	80
아. 수온 충격 실험	80

제 2 절 연구결과 및 고찰	81
1. 번식생물학적 특성	81
가. 채포 어장의 수온변화	82
나. 번식생물학적 정보	85
(1) 월별 생체지수 변화	85
(2) 월별 생식소 발달	92
(가) 난소	92
(나) 정소	94
(3) 생식년주기 분석	100
(가) 성장기	100
(나) 성숙기	100
(다) 완숙 및 산란기	100
(라) 퇴화 및 휴지기	100
2. 유전학적 분석	103
가. 참조기의 유전학적 확인	103
(1) Microsatellite DNA 분리	103
(2) 유전학적 확인	104
(3) 염기서열 분석에 의한 16S ribosomal RNA 유전자 확인	104
나. 참조기 특이적인 GnRH 유전자의 동정	110
(1) GnRH 역할	110
(2) 염기서열 비교	114
다. 유전적 다양성 분석	117
(1) Microsatellite 분리	117

(2) 유전적 다양성 분석	-----	117
3. 종묘생산	-----	124
가. 채포, 수송 및 실내사육지 수용방법 개발	-----	124
(1) 채포어법	-----	124
(2) 수송방법	-----	127
(3) 채포, 수송 및 수용방법의 표준화	-----	127
(가) 갯벌 운반용 개조콤포바인	-----	128
(나) 채포방법	-----	128
(다) 운반 및 수송	-----	128
(라) 실내사육지 수용	-----	128
(마) 실내사육	-----	129
나. 자연산 참조기 어미 확보와 생존율	-----	135
(1) 참조기 채포현장, 수송 및 사육수온	-----	135
(2) 어미개체 확보 및 생존율	-----	135
다. 인공번식 유도	-----	138
(1) 성숙유도	-----	138
(2) 자연산란 유도	-----	138
(3) 성성숙 유도에 의한 산란	-----	141
라. 수정란 부화 사육	-----	141
(1) 수정란 부화	-----	141
(2) 수정란 관리	-----	141
(3) 난 발생	-----	141
마. 자치어 성장	-----	148

4. 대량 종묘생산 표준화	153
가. 산란유도 시기 판정	153
나. 부화관리 기술	158
(1) 수정란 수집	158
(2) 부화조건	158
(3) 부화자어 사육환경	158
다. 초기먹이 전환시기 구명	163
먹이공급 방법 및 시기	163
(1) 로티퍼(Rotifer) 영양강화	163
(2) 로티퍼 공급	163
(3) 알테미아(Artemia) 영양강화	163
(4) 알테미아 공급	163
(5) 배합사료 공급	164
5. 양식생물학적 특성	167
가. 수정란 크기	167
나. 부화자어의 성장에 따른 변화	167
다. 부화율	167
(1) 수온별	167
(2) 염분농도별	167
라. 생존율	173
(1) 수온별	173
(2) 염분농도별	173

다. 자치어의 적정밀도	-----	173
바. 자치어의 초기성장 관계	-----	173
사. 초기 성장행동 특성	-----	180
아. 수온충격 반응 및 생존율	-----	181
6. 종묘방류 및 분양	-----	184
가. 방류 치어 수송	-----	184
나. 방류	-----	184
다. 분양	-----	184
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	-----	189
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b>	-----	192
제 1 절 핵심기술 또는 연구결과	-----	192
1. 핵심기술	-----	192
2. 핵심 연구결과	-----	192
제 2 절 논문발표 실적	-----	193
제 3 절 핵심기술(연구내용) 수준 및 활용유형	-----	194
제 4 절 각 연구결과별 구체적 활용계획	-----	195
제 5 절 연구결과의 기술이전 조건	-----	196
제 6 절 기대효과	-----	197
<b>제 6 장 참고문헌</b>	-----	198

## 표 목 차

표 1.	우리나라 참조기의 연도별 어획량 -----	3
표 2.	참조기의 크기별 산란율 -----	7
표 3.	참조기의 연령별 성장 -----	8
표 4.	배우자 및 조직학적 특성에 의한 자연산 암컷 참조기의 성숙기 구분 -----	65
표 5.	산란유도를 위한 호르몬 주사 -----	73
표 6.	참조기 수정란 사육환경 조건 -----	76
표 7.	참조기 치어의 사육환경 조건 -----	78
표 8.	참조기 선어 구입 개체의 크기 -----	87
표 9.	자연산 암컷 참조기의 생식주기 -----	101
표 10.	자연산 수컷 참조기의 생식주기 -----	102
표 11.	Microsatellite 표식자의 반복 motif와 시발물질 염기서열 및 PCR 산물 크기 -----	106
표 12.	척추동물에서 발견된 GnRH의 종류 및 분류 -----	113
표 13.	참조기에서 분리된 8개 Microsatellite의 특징 -----	118
표 14.	양식산 참조기의 유전적 다양성 -----	119
표 15.	채포어법에 따른 생존율 비교 -----	125
표 16.	자연산 참조기 채포현장, 수송 및 사육수온 -----	136
표 17.	자연산 참조기 채포량과 생존율 -----	137
표 18.	산란유도에 이용한 호르몬 및 주사 시기 -----	139



표 19.	수정란 부화 수질환경	-----	143
표 20.	수정란 생산 및 부화율	-----	144
표 21.	난 발생과정과 형태 변화	-----	145
표 22.	호르몬 주사시기별 산란량과 수정란 생산	-----	157
표 23.	수온 충격에 대한 참조기 치어의 반응 및 폐사	-----	182
표 24.	방류해역 수질환경	-----	185
표 25.	무상분양 현황	-----	188

## LIST OF TABLE

Table 1.	Annual catching production of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> in resent 6 years in Korea -----	3
Table 2.	Spawning rate by size of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	7
Table 3.	Growth by age of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	8
Table 4.	Maturity stages of female, as defined by the germ cells present and other histological characteristics in wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	65
Table 5.	Hormone injection for spawning induction with small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	73
Table 6.	Culture condition for the fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	76
Table 7.	Culture condition for juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	78
Table 8.	Size of wild fresh small yellow croaker purchased in Mok-po and Gang-hwa -----	87
Table 9.	Reproductive cycle in female wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> --	101
Table 10.	Reproductive cycle in male small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	102
Table 11.	Repeat motif, primer sequence and PCR product size with MS marker -----	106
Table 12.	Classification and kind of GnRH in vertebrate -----	113
Table 13.	Specification of 8 microsatellites loci divided from small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	118
Table 14.	Genetic diversity of F1 generation of adult small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> cultured in the indoor for an year -----	119
Table 15.	Comparison of survival rate on the various catching method of wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	125

Table 16. Water temperature of catching field, transport and culture tank with small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	136
Table 17. Catch amount and survival rate of wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	137
Table 18. Hormone injection for spawning induction of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	139
Table 19. Hatching condition of fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	143
Table 20. Production and hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	144
Table 21. Egg development process and morphological change of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> -----	145
Table 22. Production of spawned and fertilized eggs by hormone injection time -----	157
Table 23. Response and mortality rate of the juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> to the low water temperature stress -----	182
Table 24. Water temperature condition at releasing waters of juvenile small yellow croaker -----	185
Table 25. Free distribution of juvenile small yellow croaker -----	188

## 그림 목 차

그림 1.	참조기 계군의 회유 경로 -----	9
그림 2.	자연산 참조기 시료의 포획 지점 -----	62
그림 3.	자연산 참조기의 월별 성장(개체수=30) -----	63
그림 4.	산란유도를 위한 호르몬 주사 -----	74
그림 5.	참조기 수정란 수집 시설 -----	75
그림 6.	자연산 참조기 채포어장의 연중 수온 변화 -----	83
그림 7.	자연산 참조기 채포어장의 연중 비중 변화 -----	84
그림 8.	산란기(5월)에 성숙한 자연산 참조기 암·수의 외부 형태 -----	88
그림 9.	성숙(5월) 어미의 생식소 형태 -----	89
그림 10.	참조기 위 내용물(새우류) -----	90
그림 11.	자연산 참조기의 비만도, 내장중량지수, 간중량지수 및 생식소중량지수의 월별 변화 -----	91
그림 12.	자연산 암컷 참조기의 연중 생식소의 변화 -----	95
그림 13.	자연산 암컷 참조기의 생식소 단위중량당 알의 수 및 크기별 알의 수 ---	96
그림 14.	암컷 참조기의 난소 단위중량당 포란수와 생식소중량지수와의 상관관계 --	97
그림 15.	성숙 및 산란기 동안 월별 암컷 참조기의 포란수(I) -----	98
그림 16.	성숙 및 산란기 동안 월별 암컷 참조기의 포란수(II) -----	99
그림 17.	MS marker Hdhka 1과 Hdhk 2의 gradient PCR 결과 -----	105
그림 18.	목포산과 영광산 참조기의 16S ribosomal RNA 유전자의 발현 -----	107
그림 19.	제한효소 절단에 의한 16S ribosomal RNA 유전자의 확인 -----	108

그림 20.	참조기, <i>Larimichthys polyactis</i> (Query)와 부세, <i>Pseudosciaena crocea</i> (Sbjct)의 16S Ribosomal RNA 유전자 염기서열 비교 분석	109
그림 21.	어류 Salmon type GnRH gene의 염기서열 비교	115
그림 22.	어류 Chicken 2 type GnRH gene의 염기서열 비교	116
그림 23.	양식집단과 자연집단과의 평균 대립유전자 수	120
그림 24.	양식집단과 자연집단과의 평균 이형접합을 기대치	121
그림 25.	양식집단에서 대립유전자의 빈도	123
그림 26.	삼각망을 통한 자연산 참조기 포획	126
그림 27.	갯벌 이동 및 수송용 개조콤파인의 개발 및 보완	130
그림 28.	사육순치중인 참조기의 공급 새우	131
그림 29.	새우를 공급하는 모습	132
그림 30.	자연산 참조기의 현장채포	133
그림 31.	자연산 참조기의 수송 및 실내사육지 수용	134
그림 32.	산란유도 개체	140
그림 33.	수면으로 부상중인 수정란	142
그림 34.	참조기의 난 발생과정	147
그림 35.	성장에 따른 형태 변화	149
그림 36.	치어(7.0cm)로 성장한 참조기	150
그림 37.	참조기 치어의 길이(전장) 성장	151
그림 38.	참조기 치어의 체고 변화	152
그림 39.	주사 전 생식소	154
그림 40.	주사 후 산란공(♀)	155

그림 41.	주사 후 생식소	-----	156
그림 42.	수정란 분리	-----	159
그림 43.	사육조에 수용된 수정란	-----	160
그림 44.	부화자어	-----	161
그림 45.	2005년과 2006년 초기사육 기간 동안 수온 변화	-----	162
그림 46.	로티퍼	-----	165
그림 47.	알테미아	-----	165
그림 48.	먹이섭식 전	-----	166
그림 49.	로티퍼 섭식	-----	166
그림 50.	알테미아 섭식	-----	166
그림 51.	참조기 수정란의 시간별 크기 변화	-----	169
그림 52.	부화자어의 난황 흡수 및 유구 크기와 성장과의 관계	-----	170
그림 53.	참조기 수정란의 수온별 부화율	-----	171
그림 54.	참조기 수정란의 염도농도별 부화율	-----	172
그림 55.	참조기 치어의 수온별 생존율	-----	174
그림 56.	참조기 치어의 염도농도별 생존율	-----	175
그림 57.	참조기 치어의 사육밀도별 생존율	-----	176
그림 58.	2005년과 2006년산 참조기 종묘의 초기 길이성장	-----	177
그림 59.	2005년과 2006년산 참조기 종묘의 초기 체고변화	-----	178
그림 60.	참조기 치어 사육	-----	179

그림 61.	수온별 충격에 대한 참조기 치어의 생존율	-----	183
그림 62.	참조기 치어 방류행사	-----	186
그림 63.	참조기 특성과 회유경로 설명	-----	186
그림 64.	참조기 치어 방류-1차(3만마리)	-----	187
그림 65.	참조기 치어 방류-2차(7만마리)	-----	187

## LIST OF FIGURE

Fig. 1.	Migration route on the groups of the wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> (Shojima & Otaki, 1982). -----	9
Fig. 2.	Schematic diagram of catching station in living area of the wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> surveyed in the present experiment. CP: Catching point. -----	62
Fig. 3.	Monthly body size of female wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> surveyed in this experiment (N=30). -----	63
Fig. 4.	Hormone injection for spawning induction with small yellow croaker. ---	74
Fig. 5.	Net for fertilized eggs collection of small yellow croaker. -----	75
Fig. 6.	Annual water temperature change at catching station of wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	83
Fig. 7.	Annual specific gravity change of catching station of wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	84
Fig. 8.	Morphology of female and male of wild small yellow croaker matured in spawning season, May. -----	88
Fig. 9.	Gonad of matured the wild small yellow croaker. -----	89
Fig. 10.	Feeds (shrimp) in stomach of small yellow croaker. -----	90
Fig. 11.	Seasonal changes of condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), visceral index (VSI) and gonadosomatic index (GSI) in wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> captured from the western coast of Korea. -----	91
Fig. 12.	Photomicrographs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> ovaries during the reproductive cycle. -----	95
Fig. 13.	Relationship between egg fecundity/g Ovary and body size in female wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> (N=40). The fecundity is expressed as Eggs/g ovary. -----	96
Fig. 14.	Relationship between egg fecundity/g Ovary and GSI in female small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> (N=40). The fecundity is expressed as Eggs/g ovary. -----	97
Fig. 15.	Monthly fecundity of female small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> from maturation stage to spawning stage (N=180). The fecundity is expressed as Eggs/g Ovary (P<0.05). -----	98



Fig. 16.	Monthly fecundity of female small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> from maturation stage to spawning stage (N=180). The fecundity is expressed as Eggs/fish (P<0.05). -----	99
Fig. 17.	Gradient PCR on the MS marker Hdhka 1 and Hdhk 2. -----	105
Fig. 18.	Gene expression of 16S ribosomal RNA of small yellow croaker caught from Mok-po and Yeong-gwang, jeollanam-do in korea. -----	107
Fig. 19.	Gene identification of 16S ribosomal RNA cutted by restriction enzyme of small yellow croaker caught from Mok-po and Yeong-gwang, jeollanam-do in korea. -----	108
Fig. 20.	Comparison analysis of 16S Ribosomal RNA gene sequencing between small yollow croaker, <i>Larimichthys polyactis</i> (Query) and large yellow croaker, <i>Pseudosciaena crocea</i> (Sbjct). -----	109
Fig. 21.	Comparison of Salmon type GnRH gene sequencing with fish species. --	115
Fig. 22.	Comparison of Chicken 2 type GnRH gene sequencing with fish species. -----	116
Fig. 23.	Mean number of Allele between culture group and wild group of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	120
Fig. 24.	Mean number of expected heterozygosity between culture group and wild group of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	121
Fig. 25.	Frequency of allele in culture group of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	123
Fig. 26.	Wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> captured by the triangular net. --	126
Fig. 27.	Development and supplementation of reconstruction combine for transportation on the foreshore. -----	130
Fig. 28.	Shrimp supplied to wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> culturing at the indoor. -----	131
Fig. 29.	Supply shrimp to wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> culturing at the indoor tank. -----	132
Fig. 30.	Catching process of wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	133
Fig. 31.	Transportation and accommodation in indoor with wild small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	134

Fig. 32.	Spawning state of small yellow croaker by hormone injection.	-----	140
Fig. 33.	Fertilized eggs rising to the water surface.	-----	142
Fig. 34.	Egg development process of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> .	-----	147
Fig. 35.	Morphological change on growth of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> .	--	149
Fig. 36.	Juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> .	-----	150
Fig. 37.	Total length growth of the larvae and juvenile of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> for 70 days.	-----	151
Fig. 38.	Body height change of the larvae and juvenile of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> for 70 days.	-----	152
Fig. 39.	Gonad state of small yellow croaker before GnRH hormone injection.	---	154
Fig. 40.	Spawning cavity of female small yellow croaker after hormone injection.	----	155
Fig. 41.	Gonad of female small yellow croaker after hormone injection.	-----	156
Fig. 42.	Separation of fertilized eggs of small yellow croaker in the beaker.	-----	159
Fig. 43.	Fertilized eggs of small yellow croaker accommodated in the culture tank.	--	160
Fig. 44.	Larvae of small yellow croaker.	-----	161
Fig. 45.	Change of water temperature for the early days of culture in 2005 and 2006 years.	-----	162
Fig. 46.	Morphology of Rotifer.	-----	165
Fig. 47.	Morphology of Artemia.	-----	165
Fig. 48.	Before feed feeding.	-----	166
Fig. 49.	Rotifer feeding.	-----	166

Fig. 50.	Artemia feeding. -----	166
Fig. 51.	Size change according to elapsed time of fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	169
Fig. 52.	Growth relationship between yolk sac absorption and oil sac of hatching larvae of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> . -----	170
Fig. 53.	Hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> by various water temperature. -----	171
Fig. 54.	Hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> by various salinity concentration. -----	172
Fig. 55.	Survival rate of juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> by various water temperature. -----	174
Fig. 56.	Survival rate of juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> by various salinity concentration. -----	175
Fig. 57.	Survival rate of the juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> by various culture density. -----	176
Fig. 58.	Total length comparison between 2005 and 2006 year of the larvae and juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> cultured in tank for 60 days. -----	177
Fig. 59.	Body height comparison between 2005 and 2006 year of the larvae and juvenile of small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> cultured in tank for 60 days. -----	178
Fig. 60.	Culture of the juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> in the culture tank. -----	179
Fig. 61.	Survival rate of the juvenile small yellow croaker, <i>L. polyactis</i> to the water temperature stress. -----	183
Fig. 62.	Releasing event for juvenile small yellow croaker. -----	186
Fig. 63.	Explanation of trait and migration route of juvenile small yellow croaker. -	186
Fig. 64.	First-releasing of juvenile small yellow croaker 30 thousand. -----	187
Fig. 65.	Second-releasing of juvenile small yellow croaker 70 thousand. -----	187

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 목적

서해안의 특산 고급어류로 알려져 있는 참조기의 종묘생산 기술과 양성기술을 개발함으로써 새로운 양식대상종에 대한 산업화 가능성을 타진하고 동시에 양질의 방류용 종묘생산을 위한 대량생산 체계를 구축하여 자연 자원회복 및 자원조성 연구에 활용할 수 있는 방안을 제시한다. 또한 참조기의 양식산업화 시기 단축을 위한 표준화된 체계적인 양식기반 조성 프로그램을 운영함으로써 침체된 해면양식 수산업의 활성화와 어업 생산성 증대를 도모하고자 한다.

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적인 측면

현재까지 참조기의 종묘생산과 양식기술에 관한 연구는 전 세계적으로 보고된바 없으며 연구수행과 결과가 부진한 이유는 참조기를 비롯한 조기류의 생산기술은 현재 우리나라에서 양식 중인 다른 어종과 달리 종묘수집과 어미채포 등 종묘생산에 가장 기본이 되는 개체 확보와 같은 제반 여건이 매우 불리하다. 결국 건강하고 완벽한 종묘생산용 어미개체를 확보할 수 있는 기술이 개발되지 못한 것이 주 원인이었다. 따라서 본 연구진은 개막이 시설에서 채포되는 어미개체의 상처발생과 비늘탈락을 방지하기 위하여 채포 전체과정을 수중에서 실시하였으며, 자체 설계 제작한 개조 콤바인을 이용함으로써 건강하고 안정된 참조기 채포기술개발이 종묘생산의 기반이 되었다.

### 2. 경제·산업적 측면

국내 경제 산업의 침체와 WTO 가입에 따른 수산물의 전면 수입개방으로 중국산 활어의 수입과 부세의 냉동식품 수입이 급증하면서 우리나라 수산양식업은 그 무엇보다 어려운 침체에 있는 실정이다. 국민 식생활의 단백질 공급원은 수산물에서 48%를 차지하여 해마다 증가하고 있으나, 연근해에서 생산되는 수산물의 생산량은 자원 감소와 환경오염으로 점차 감소하는 추

세에 있다. 또 어선어업의 수익성 감소와 인력수급의 어려움 그리고 어선의 노후화 등 수산여건이 악화되고, 세계 국가들이 연안 200해리 경제수역선포로 원양 어장마저 점차 감소되고 있는 형편이다.

2000년대 국내 수산물 수요량은 500만톤으로 추정되고 있으나 이러한 수요를 충족하기 위한 생산목표 달성이 불투명한 실정이다. 수산물 생산량을 늘리기 위해서는 어장 및 산란장의 보호와 함께 자원 증강을 위한 치어 방류사업이나 양식사업을 통한 적극적인 자원생산 관리가 필요하다.

우리나라 해면양식 산업은 1980년대 후반기부터 발달하기 시작하여 최근 육상시설을 이용한 종묘생산기술이 발달하면서 생산시스템의 다양화와 생산량의 증대를 가져왔다. 그러나 양식대상종은 넙치, 조피볼락, 참돔, 방어 등 일부의 온수성 어종에 국한되어 있는 실정이며, 또 사육기간도 제한되어 있어 다양한 양식품종의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 특히 전남 영광지역에서 연간 굴비 생산량은 약 1만여톤 정도이며 매출액은 1천억원에 이르고 있으나, 최근 연안 참조기자원 감소로 인하여 중국산을 수입하고 있는 실정이며, 맛과 품질이 뛰어난 연안산 참조기가 잡히지 않아 굴비 질이 떨어지고 있으며 소비촉진에도 여러 가지 문제점이 발생되고 있다.

따라서 본 연구는 우리나라 서해안과 제주도 근해에 분포하는 참조기를 중심으로 종묘생산과 해상 사육기술 단계까지 발전시키며, 참조기의 종묘생산기술을 바탕으로 부세, 수조기와 같은 새로운 국민적 관심 양식대상종에 대한 생태적 기초 자료를 제공함은 물론 자원증대를 위한 방류사업에 의한 자원관리 등 우리나라 해면양식 산업의 활성화에 크게 기여할 것으로 생각된다.

### 3. 사회·문화적 측면

최근 우리사회는 핵가족화와 서구문화 현상으로 급격히 바뀌고 있고 중국산 활어와 냉동식품 수입으로 국민들의 수산물 선호도가 감소하고 있어 국내외적으로 수산양식 산업이 매우 어려운 실정에 놓여 있다. 참조기는 1960년대 어획량이 3~5만톤으로 멸치, 참치에 이어 제 3위를 차지하였으나, 1980년대에 들어와서는 7,000여톤 전후로 크게 감소되었다. 참조기 어획량의 감소는 그 동안 어구의 발달이나 어선세력이 확대되면서 나타난 심각한 자원감소에 기인하는

것이라고 할 수 있다. 참조기는 예로부터 고급 수산가공어류로서 국민들의 건강식품(굴비)으로 널리 인식되어 왔으나 최근에는 수질오염, 남획 및 간척사업으로 자원이 고갈되어 있는 실정이다.

굴비는 예로부터 원기를 돋우는 생선으로 알려져 왔으며 활어와 달리 냉동이나 말린 상태로 유통되기 때문에 유통비용이 절감되고 요리가 간편하여 선물용이나 제수용품으로 꾸준한 소비가 이루어지고 있다. 따라서 우리나라 서해안과 제주도 근해에 분포하는 참조기에 대한 종묘생산과 해상 가두리양식 기술개발에 의한 양식산업화에 그 목표를 두고 국민의 기호와 건강식품에 알맞은 수산물 생산보급에 부응하고자 한다.

### 제 3절 연구개발의 범위

#### 1. 1차년도(2003. 8~2004. 7)

- 가. 채포어장 환경, 시기별 성숙도, 생물학적 최소형 조사, 월별 크기변화와 같은 기초 생태 조사 및 번식생물학적 정보 수집
- 나. 안정적 어미확보를 위한 개막이 시설 및 수송방법을 고안하며, 실내 적응 및 월동사육 환경조사를 바탕으로 실내사육 방법 개발
- 다. 참조기의 microsatellite DNA 분리 및 primer(시발물질)개발하여 산란관련 호르몬 및 물질 자극에 활용할 수 있는 고유 유전자 확인을 위한 기초 유전학적 분석

#### 2. 2차년도(2004. 8~2005. 7)

- 가. 자연산 참조기 채포, 수송 및 실내순치 사육기술 개발로 참조기 어미개체군 확보
- 나. 자연산 참조기의 생식주기, 인공성숙유도(어미의 성성숙 유도, 생식소의 조직학적 변화, 인공배우자 생산 가능성), 수정란 확보, 수정란 부화관리 및 치어사육 기술 등 인공배우자 생산 기초기술 개발
- 다. 부화에서 초기 성장까지 그리고 사육환경에서 나타나는 기초 양식생물학적 특성 분석
- 라. 2차년도 초과실적으로 치어방류 및 무상분양으로 참조기 양식산업화를 위한 초석 마련

### 3. 3차년도(2005. 8 ~ 2006. 7)

- 가. 개막이 시설과 개조콤바인을 이용한 자연산 참조기 채포기술과 실내 사육환경에서 적응 및 양성에 필요한 핵심기술의 표준화
- 나. 인위적 산란 최적시기 판정과 수정란 부화, 관리 및 치어생산을 위한 안정적 인공번식 유도 기술개발로 대량 종묘생산과 양식기반 구축

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 기술개발 현황

국내에서 참조기의 연구는 황해·동지나해에서 어획된 참조기의 연령과 성장(최, 1980), 서해안 참조기의 성숙과 산란(박, 1981), 동지나해·황해의 참조기 어장 분포와 해황과의 관계(양 등, 1982) 등 주로 참조기의 생리생태와 자원학적 연구가 진행되었으며, 1993년 한국 해양연구소에서 조기류 생산기술 연구(명 등, 1993)를 수행하면서 4~6 cm 치어를 채포하여 해상가두리에서 1년간 사육한 후 소량의 수정란을 확보하는 등 기초적인 초기 자치어 사육시험 연구가 수행된 바 있었으나, 대량 종묘생산 기술에는 미치지 못하였다. 그리고 국립수산과학원 서해수산연구소 부안시험포에서는 1998년부터 조기류인 부세 이식기반조사에 대한 연구를 위해 중국에서 부세 어미를 이식하여 양식 가능성에 대한 양식생물학적 자료와 사육관리 기술을 축적한 바 있다.

국외는 중국에서 자원보호법상 내만 산란장에서 산란군체를 잡을 수 없게 하여 이 군체를 살리고 해역자원을 회복하기 위하여 1985년 福建省 水産資源研究所 및 寧德地區水産技術推進黨의 단위에서 "國家 七五 重點推進黨目"으로 조기인공번식 및 육묘기술연구 과제를 수행하여 그 해에 종묘생산에 성공하고 1990년까지 모든 인공종묘생산 및 양식능력에 도달하였다. 현재는 10여년의 연구를 거쳐 이미 비교적 산업화된 종묘생산 및 양식기술을 확립하였다. 동시에 복건성(福建省), 광둥(廣東) 그리고 절강성(浙江省) 등 주변 省에서도 대량양식을 추진하여 부세(大黃魚) 종묘생산의 빠른 발전을 촉진하였다.

현재까지 전 세계에서 참조기를 대상으로 수행된 양식관련 연구성과 및 연구보고는 전무한 실정이다. 그러나 2004년 자연산 어미 포획 및 실내사육 기술개발을 바탕으로 2005년 호르몬 주사를 이용하여 산란을 유도한 결과, 본 연구진에 의해 세계최초로 참조기 대량 종묘생산에 성공하였다. 현재 수정란 및 치어를 서·남해 지역 양식장에 무상으로 분양하여 양식 및 산업화 가능성에 대한 실질적 기반 기술을 확보하고 있으며, 또한 참조기의 일반 생태, 유전적 정보 및 양식 생물학적 특성에 관한 과학적 자료들 중 일부는 이미 학계에 보고된 바 있다.



## 제 2절 문제점

참조기는 봄철 월동장에서부터 무리를 지어 북상하는 회유성 어종으로서 3월 하순에서 4월 중순경에는 전북 위도 칠산어장 부근에서, 4월 하순부터 5월 중순까지 연평도 부근에서, 6월 상순경에는 압록강 입구 대화도 부근과 같은 천해의 간석지에서 산란을 한다. 산란기 중에는 떼를 지어 바다 밑 가까이 헤엄쳐 다니다가 개구리의 울음소리와 비슷한 소리를 내면서 물위로 튀어 올라오는 습성이 있다. 참조기의 완전양식을 위해서는 종묘생산에서부터 어미사육관리에 의해 양질의 수정란 확보 등이 이루어져야 하나, 자연에서 어획되는 어미는 대부분 폐사하기 때문에 친어 확보에 매우 어려운 생태적 특징이 있다.

특히 참조기는 회유성 어종으로서 성격이 급하여 어획 시 비늘탈락에 의한 대량 폐사로 활어의 생존율이 매우 낮다. 참조기는 양식중인 타 어종과 달리 종묘의 수집, 어미의 채포 등 제반 여건이 매우 불리하여 건강하고 완벽한 시료의 확보에 어려움이 많아 이러한 이유로 최근까지 참조기의 양식 가능성에 매우 회의적이었던 것이 사실이다.

본 연구진에 의해 개발된 어미채포, 수송 및 실내사육 기술이 확보되었으나 어미를 지속적으로 유지 확보할 수 있는 확률은 최초 채포량의 4~32%에 불과하다. 개체 확보확률이 낮은 이유는 첫째, 호르몬 유도에 의한 산란 후 또는 산란 시기가 끝나는 6월말에서 7월 초에 산란을 마치거나, 산란을 하지 못한 개체의 자연폐사 현상이 나타난다. 이때 보통 2~3% 정도가 폐사하게 된다. 둘째, 8~9월 초순 하절기 고수온 시기와 반복되는 백점충 감염에 의해 폐사가 발생하는데 이때 수온을 27℃ 이하로 낮추지 못하거나 백점충 치료시기를 놓치게 될 경우 많은 폐사가 일어난다. 셋째, 하절기를 무사히 넘기더라도 10~11월 월동기에 접어들 시기와 월동기가 끝나는 3~4월 중순에 허약한 개체의 폐사가 일부 나타난다. 상기와 같은 자연 폐사 현상과 하절기 고수온으로 인한 스트레스 및 부적응 개체의 폐사현상을 예방하고 감소시키기 위해서는 과학적 사육시설이 절대적으로 요구된다.

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1절 연구방법

### 1. 번식생물학적 특성

#### 가. 실험시료 채집

본 실험은 2004년 2월부터 2005년 2월까지 제주 추자군도 부근에서 유자망에 의해 포획되는 자연산 참조기를 주 대상으로 하였지만, 2004년 6~9월 사이에는 참조기의 생태학적 습성으로 추자군도 부근의 자연산 참조기 어군이 형성되지 않아(김, 2005), 6~8월 사이에 경기도 강화 부근에서 안강망으로 포획된 것을 이용하였고, 9월은 영광 범성포의 개막이 시설에서 포획된 자연산 참조기 암수 개체를 월별로 각각 30마리씩 채집하여 사용하였다(그림 2).

#### 나. 측정항목

실험에 사용한 참조기의 크기는 평균 전장 16.5~23.5 cm, 평균 체중 41.7~129.6 g이었다(그림 3). 실험어는 전장 0.1 cm, 체중 0.1 g까지 측정 후, 간, 내장 및 난소를 적출하여 0.01 g까지 계측하고, 이를 통해 생식소중량지수(gonadosomatic index: GSI), 간중량지수(hepatosomatic index: HSI), 내장중량지수(viscerasomatic index: VSI) 및 비만도(condition factor, CF)를 구하였다.

$$\diamond \text{GSI}(\%) = (\text{생식소중량}/\text{체중}) \times 100$$

$$\diamond \text{HSI}(\%) = (\text{간중량}/\text{체중}) \times 100$$

$$\diamond \text{VSI}(\%) = (\text{내장중량}/\text{체중}) \times 100$$

$$\diamond \text{CF} = (\text{체중}/\text{전장}^3) \times 100$$

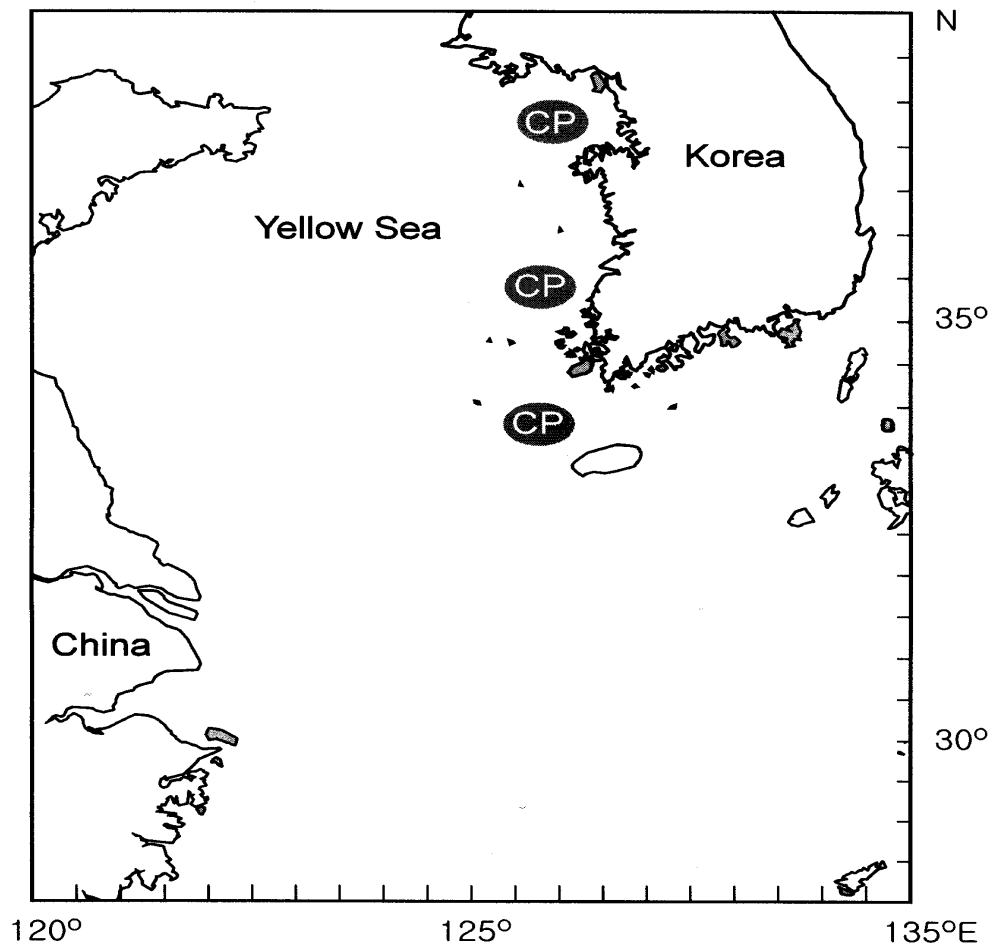


그림 2. 자연산 참조기 시료의 포획 지점.

Fig. 2. Schematic diagram of catching station in living area of the wild small yellow croaker, *L. polyactis* surveyed in the present experiment. CP: Catching point.

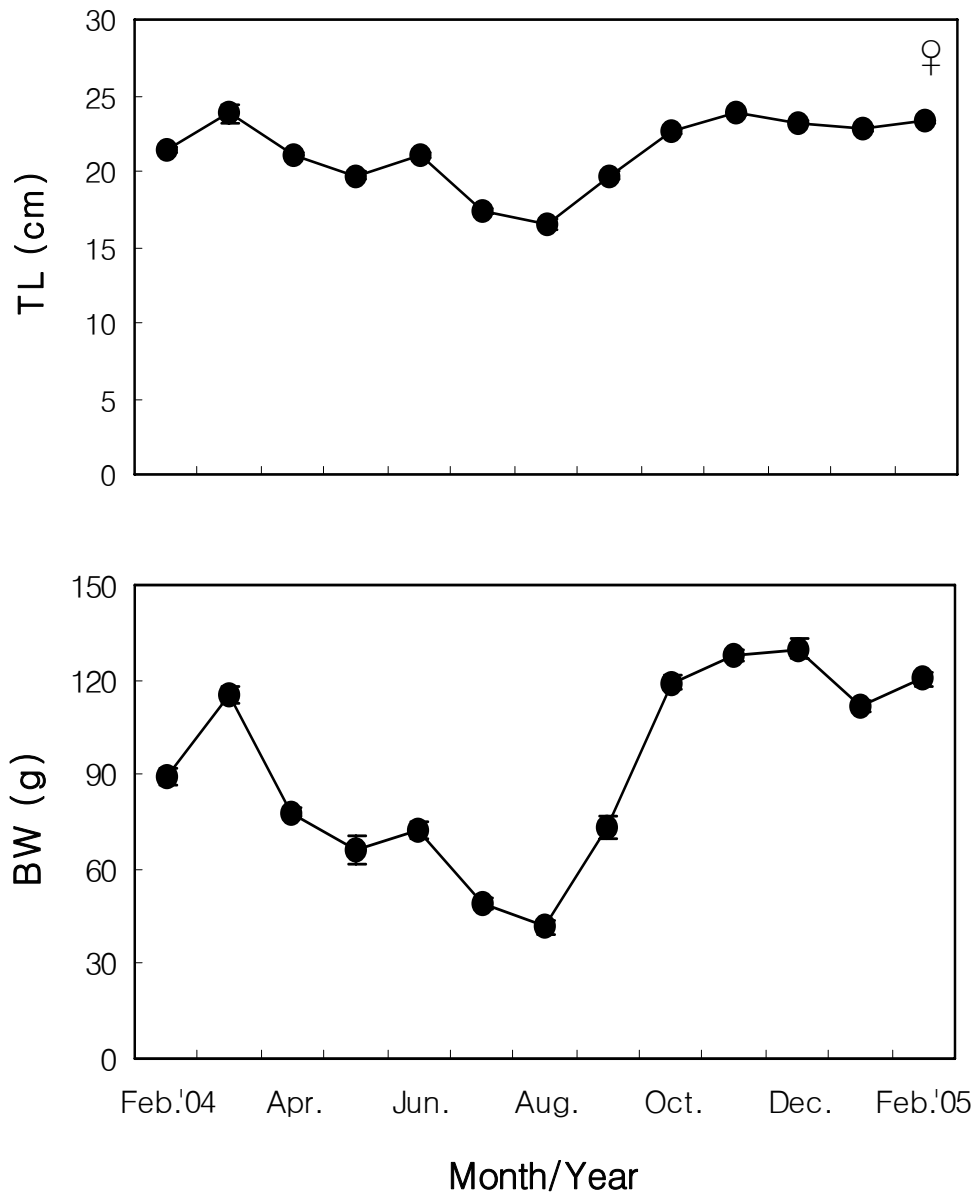


그림 3. 자연산 참조기의 월별 성장(개체수=30).

Fig. 3. Monthly body size of female wild small yellow croaker, *L. polyactis* surveyed in this experiment (N=30).

#### 다. 조직학적 분석

조직표본 제작을 위해 적출한 난소를 10% 포르말린에 고정하였다. 이후 조직학적 검경을 위해 Bouin's solution에 24시간 재고정하여, 파라핀 절편법에 의해 4~6  $\mu\text{m}$  두께로 연속 절편하였으며, 이들 제작된 표본은 Harris's hematoxylin과 eosin으로 이중 염색하여 현미경용 디지털카메라(7.3 Mpixel DFC320, Leica Microsystem, Germany)로 촬영한 후 화상해석분석시스템인 Leica QWin & Imaging Workstation (Leica Microsystem, Germany)를 이용해, 월별 30마리 어미로부터 생식소 발달 양상과 난소 내 생식세포의 크기를 파악하였다.

생식소 발달 양상은 Nagahama(1983)의 보고를 기준으로 번식기를 확인하여 표 4에 나타내었다. 생식세포의 크기는 생식소 절편에서 정중앙 단면이 절단된 생식세포 30개를 찾아, 개체별 생식세포 직경 대표값으로 하였으며, 월별 30마리의 대표값들을 평균하여 월별 생식세포 크기를 나타내었다.

표 4. 배우자 및 조직학적 특성에 의한 자연산 암컷 참조기의 성숙기 구분

**Table 4. Maturity stages of female, as defined by the germ cells present and other histological characteristics in wild small yellow croaker, *L. polyactis***

Stage	General characteristics
<i>Primary Growth</i>	
Chromatin-nucleolus stage	Apparent nucleolus and chromatin threads in nucleus
Perinucleolus stage	Multiple nucleoli located around the periphery of the nucleus
<i>Secondary Growth</i>	
Cortical alveoli stage	Cortical alveoli appear at the periphery of the oocyte
Oil drop stage	Oil droplets appearance in oocyte
<i>Vitellogenesis</i>	
Primary yolk stage	Yolk globules appearance at the periphery of the oocyte
Secondary yolk stage	More yolk globules appear throughout the oocyte
Tertiary yolk stage	The oocyte is filled with yolk globules
<i>Maturation and Spawning</i>	
Early maturation stage	Germinal vesicle migrating, coalescence of yolk globules & lipid droplets
Final maturation stage	Germinal vesicle breakdown & hydration
Ovulation stage	Oocyte are hyaline and free of cellular envelopes
Spawning stage	Appearance of ovulated eggs in gonoduct and near gonopore
<i>Degeneration and Resting</i>	
Atretic oocytes stage	Observation of atretic oocytes & chromatin-nucleolus oocytes in ovary

## 2. 참조기 확인 및 GnRH 유전자 동정

### 가. 시료 및 뇌 수집

실험에 사용한 시료는 국립수산물과학원 서해수산연구소 부안시험포에서 사육중인 어미 참조기를 이용하였다. 뇌를 분리하여 액체질소에 즉시 침지시킨 후 실험에 사용하기까지 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다.

### 나. Total RNA 분리

Total RNA를 추출하기 위하여 뇌 조직에 TRIzol 용액(TRIZOL Reagent, GibcoBRL) 1000  $\mu$ l를 첨가하고 homogenizer로 분쇄하여, 4℃에서 15분간 정치시켰다. 그리고 chloroform (Sigma) 200  $\mu$ l을 첨가한 후 15초간 진탕한 뒤 4℃에서 15분간 정치시켰다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 분리하여 새로운 시험관에 옮기고, isopropanol (Sigma) 500  $\mu$ l을 첨가한 뒤, -20℃에서 30분간 정치시켰다. 그리고 4℃, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고, 70% ethanol로 세척한 후 14,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후, DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -80℃에 보관하였다.

### 다. c-DNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA 1  $\mu$ g을 95℃에서 5분간 변성시킨 후 사용하였다. 최종 cDNA 합성물이 20  $\mu$ l이 되도록 하였으며, 20 U/ $\mu$ l MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer), 10  $\times$  MuLV RT buffer, 10 mM dNTP, 10 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (Perkin-Elmer), Oligo dT primer (Perkin-Elmer) 그리고 DEPC-treated water를 혼합하여 42℃에서 60분간 역전사반응을 하여 cDNA를 합성하였다.

### 라. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)

PCR 반응은 Taq DNA polymerase 1 U, 10 $\times$ RNA PCR buffer 2  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mixtures 1.6  $\mu$ l, primer 1  $\mu$ l (20 pmol)과 cDNA 1  $\mu$ l를 넣은 후 volume을 20  $\mu$ l로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation 과정을 거친 후, 95℃로 30초간 denaturation을 하였고, annealing은 55℃에서 30초간 진행하였으며, 72℃에서 30초간 elongation과정을 거친 후 72℃ 10분 동안 extension과정을 진행하였다.

실험에 사용한 primer는 sGnRH Forward 5'-ATG CTA ACA AGG CAA ATA CA-3' Reverse 5'-TCT TCA GGA AGA GAC ACC AC-3' 이며, cGnRH-2 primer는 Forward 5'-AGG TGG GAA TAT CAT GTG TG-3'이며, Reverse 5'-GGT CTC AAA TAG CTG CAT TC-3' 이다. PCR 반응의 횟수는 35회 하였으며, PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 결과를 확인하였다.

#### 마. Ligation, transformation, plasmid DNA 분리 및 염기서열 분석

PCR 산물은 agarose gel로부터 분리 정제한 후에 ligation하였다. Ligation은 정제한 PCR산물 (20 ng), ligase (3 unit/ul), pGEM T-easy vector (50 ng)을 이용하여 4°C에서 18시간 수행하였다. Ligation 산물은 JM 109 숙주세포를 이용하여 transformation한 후에 plasmid DNA를 분리하였다. 그리고 분리한 Plasmid DNA의 염기서열을 분석하였다.

### 3. 유전적 다양성 분석

#### 가. 실험어

Microsatellite DNA 분리에 사용된 시료는 전남 영광 해역에서 채집한 것이며, 유전적 다양성 분석에 사용된 자연산 집단은 추자군도, 경기도 강화 및 전남 영광에서 채집한 30마리를 이용하였으며, 양식산 집단은 서해수산연구소 부안시험포에서 2004년산 어미로부터 2005년도에 생산된 치어 50마리를 이용하였다.

#### 나. Genomic DNA 분리

참조기의 genomic DNA는 Asahida 등(1996)의 방법에 따라 TNES-urea 완충용액 (10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA; pH 8.0, 0.5% SDS, 8M urea)과 proteinase K (Sigma, USA)를 사용하여 꼬리지느러미에서 분리하였다.

#### 다. Microsatellite DNA 분리

##### (1) 제한효소에 의한 DNA절단 및 adapter의 ligation

Microsatellite DNA는 Hamilton 등(1999)의 방법에 의해 분리하였다. Genomic DNA 중 분석에 적합한 크기(200~1000 bp)를 회수하기 위하여 Rsa I, Alu I 그리고 Hae III 제한효소(New England Biolabs, England)를 이용하여 Genomic DNA를 절단하였다. 절단된



DNA 단편을 1.5% agarose gel로 전기영동한 후 QIAquick Gel Extration Kit (QIAGEN, USA)을 이용하여 200~1000 bp의 DNA 단편을 회수하였다. 회수된 DNA 단편에 adapter (SNX/SNX reverse linker)와 1000 U T4 ligase, rATP를 넣고 16°C에서 30분, 37°C에서 10분을 30번 반복하여 ligation하였다. Ligation된 DNA는 이중가닥으로 만들기 위해 SNX forward linker를 이용하여 PCR하였다.

## (2) Hybridization에 의한 microsatellite DNA의 enrichment

Microsatellite DNA 영역을 선택적으로 회수하기 위하여 Magene Sphere Magnetic Separation Products (Promega, USA)와 Biotin-labelled (GT)<sub>10</sub>을 Probe로 이용하였다. Linker-ligated DNA에 Hybridization 용액(12× SSC, 0.1% SDS)과 Biotin-labelled (GT)<sub>10</sub>을 첨가한 후 95°C에 15분간 변성하고, 60°C에서 4시간 반응시켰다. Streptavidin Paramagnetic Particles (SA-PMPs)은 사용하기 전에 0.5% SSC로 3회 세척하였다. Hybridization 용액에 SA-PMP를 넣은 후 이 용액에서 43°C에서 4시간 반응하였다. 그 후에 이 용액을 2× SSC와 0.1% SDS를 이용하여 2회 세척(매회 5분간, 실온)하고, 다시 1× SSC와 0.1% SDS를 이용하여 2회 세척(매회 5분간, 45°C)한 후, 마지막으로 1× SSC와 0.1% SDS를 이용하여 2회 세척(매회 5분간, 60°C)하였다. 세척이 끝나면 TE 완충용액을 넣은 후 95°C에 10분간 변성한 후 자석을 이용하여 DNA를 회수하였다.

## (3) Adapter 배열을 이용한 PCR

회수되어진 microsatellite 영역을 포함한 단일가닥 DNA 단편을 vector에 ligation하기 위하여 adapter 배열로부터 합성된 primer를 이용하여 PCR을 통해 이중가닥의 DNA를 만들었다. 단일가닥 DNA 5  $\mu$ l(0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l), SNX primer 1.5  $\mu$ l, Ampli Taq GOLD (Perkin Elmer) 0.25  $\mu$ l, dNTP mix 4  $\mu$ l, 10×PCR 완충용액 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, 증류수 31.25  $\mu$ l을 넣고 PCR 반응을 하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 열변성한 후 94°C 1분, 63°C 1분, 72°C 1분을 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 반응 후 4°C에 보존하였다. 이 PCR 산물을 1.2%의 agarose gel을 이용하여 증폭을 확인한 후 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA)을 이용하여 정제, 최종적으로 TE 50  $\mu$ l에 용해하여 이중가닥의 DNA를 얻었다.

#### (4) Adapter의 Nhe I 영역의 절단과 vector의 Xba I 절단

PCR 반응으로 얻어진 이중가닥 DNA 단편을 vector에 ligation하기 위하여 이중가닥 DNA 단편의 양측에 부착되어 있는 adapter의 배열을 Nhe I으로 절단하였고, vector pTZ-18U를 Xba I으로 절단한 후 Calf Intestine Phosphatase (CIP)를 처리하여 탈 인산화하였다. 각각을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 정제한 후, ligation kit (NEB, England)를 이용하여 ligation하였다.

#### (5) 형질전환(Transformation)

Ligation한 vector를 competent cell (DH5a)에 형질전환시켜 microsatellite DNA 영역을 포함한 colonies를 배양하였다. Competent cell을 사용직전에  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 꺼내어 competent cell  $100\ \mu\text{l}$ 에 ligated-vector  $50\ \text{ng}$ 을 넣고 30분간 얼음에 놓아둔 후,  $42^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에서 90초간 반응하였다. 여기에 SOC 배지( $42^{\circ}\text{C}$ )  $890\ \mu\text{l}$ 을 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 200 rpm으로 회전시켜 1시간동안 배양하였다. 이 배양액을 SOC 배지로 적당히 희석하여  $100\ \mu\text{l}$ 을 LB plate (10 mM IPTG  $100\ \mu\text{l}$ , 2% X-Gal  $100\ \mu\text{l}$ )에 도말한 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에 over-night 배양하여 양성 colonies를 확인하였다.

#### (6) Colony hybridization에 의한 양성 colony 확인

$37^{\circ}\text{C}$ 에 over-night 배양하여 얻어진 양성 colonies 중 목적의 microsatellite 영역을 포함하고 있는 colonies를 biotinylated (GT)<sub>10</sub> probes와 Phototope-Star Detection Kit (NEB, England)를 사용하여 선별하였다. 선별된 양성 colonies를 LB 액체 배지에서 배양한 후 QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, USA)을 이용하여 vector를 분리하였다.

#### (7) 양성 colony의 DNA 염기서열 분석

모든 양성 colonies들의 염기서열을 Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PerkinElmer Applied Biosystems)를 이용하여 자동염기서열분석기(ABI Prism 3100 genetic analyzer, Perkin Elmer Applied Biosystems)로 결정하였다.

### 라. Microsatellite DNA에 의한 다양성 분석

#### (1) Primer 설계 및 표지

Microsatellite 영역의 염기서열이 확인된 배열 중, 중복되는 영역과 primer를 제작하기

어려운 영역은 모두 제거하였다. 이를 microsatellite의 상류부분과 하류부분의 염기배열로부터 PCR를 하기에 적합한 primer 염기서열을 PRIMER 3 software (Rozen and Skaletsky, 1998)를 이용하여 제작하였다. 제작된 primer는 밴드가 여러 개 증폭되지 않는 8개의 최적 primer만을 최종적으로 선별하여 forward primer에 6FAM을 표지하였다.

## (2) Microsatellite 유전자형 분석

최종 선별된 labelled forward primer와 unlabelled reverse primer set 8개를 이용하여 유전자를 증폭하였다. PCR 반응액은 genomic DNA 100 ng, 각 primer 0.5 pmol을 넣고 f-Taq polymerase (Solgent, Korea)를 사용하여 최종 20  $\mu$ l로 증폭하였다. PCR 조건은 처음 95°C에서 15분간 열변성하고, 95°C 20초, 55~65°C 40초, 72°C 1분을 35회 반복한 후 72°C에서 15분간 반응하였다. Annealing 온도는 gradient PCR을 통해 가장 적합한 온도를 각각 설정하였다. 모든 PCR 산물을 전기영동으로 증폭정도를 확인하여 희석 배율을 결정하였다. 희석한 PCR 산물과 400 HD marker, HiDi formamide를 섞고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 ABI 3100 genotype sequencer를 이용하여 유전자형 분석을 실시하였다.

## (3) 통계처리 및 분석방법

분석에 사용한 8개의 유전자좌위에 대해서 각각의 대립유전자를 크기별로 정렬하여 각 집단 내의 대립유전자 빈도(allele frequency), 관찰치 이형접합률(observed heterozygosity,  $H_o$ ), 기대치 이형접합률(expected heterozygosity,  $H_e$ )은 Cervus (ver. 2.0; <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/>) 프로그램을 사용하여 계산하였다(Slate et al., 2000). Microsatellite 마커의 Hardy-Weinberg 평형을 검정하기 위해 Weir & Cokerham(1984)의 방법을 사용하였으며, Fis 수치를 근거로 하여 Markov chain 방법에 따라 무작위 대립유전자 치환(random allelic permutation) 과정을 최소한 10,000번 이상 수행하여 유의성(\*P)을 검정하였다.

## 4. 종료생산

### 가. 어미개체군 확보

참조기 친어 확보는 자연산 미성어를 채포한 후 육상수조에 적응시켜 사육함으로써 어미 개체군 확보 가능성이 높아진다. 그러나 참조기는 채포과정 중에 비늘탈락이 심하고 미세한

상처에도 폐사율이 높기 때문에 안전한 채포방법이 절대적으로 필요하다. 그러므로 본 연구진은 연안 밖의 어장에서 대형그물로 채포 시 이러한 문제점을 피하기 어렵다고 판단하여, 연안에서 수행 가능한 어법들 중에 효과적인 채포방법을 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 채포어법별 및 수송방법별 생존율을 비교함으로써 효과적인 채포방법을 밝히고, 육상수조에 적응시키기 위해 2003년 8~11월까지 연안에서 손으로 채포할 수 있는 서해안 개막이, 이각망, 삼각망 어법을 이용해 참조기를 채포하고, 현장에서 운반과 운송과정 중에 대기에 노출시키지 않은 상태로 개조 콤바인과 활어차를 이용하여 육상수조에 수용 후 생존율을 조사하였다.

또한 채포한 참조기를 수정란 확보용 어미로 활용하기 위해서는 육상수조에 적응시키고 충분한 먹이공급과 월동이 가능해야 한다. 그래서 2003년 8월~2004년 7월에 자연산 참조기를 어미로 활용할 수 있도록 실내 사육기술을 개발하였다. 육상수조에 적응한 참조기는 질병 발생 예방을 위한 약육 후 선새우류, 냉동사료, EP 등으로 먹이붙임을 하였다. 겨울철 저수 온기에는 보일러를 가동하여 사육수온을 13℃ 내외로 유지시켰다.

## 나. 어미 사육, 성성숙 및 산란유도

### (1) 실내 어미 월동사육 관리

참조기는 월동 후 산란장으로 이동하는 생태학적 습성을 파악하여 그 환경조건에 맞추어 주기 위해 본 연구에서도 겨울철 수온이 12℃ 이하로 내려가는 2004년 12월 9일부터 2005년 4월 10일까지 30,000 Kcal 용량의 보일러 4대를 가동시켰다. 보일러 가온시스템은 1개 수조에  $\varnothing 13$  mm 티타늄 파이프를 사용하여 가로 3 m×세로 3 m의 정사각형으로 열교환기를 설치하여 수온  $13\pm 0.3$ ℃를 유지하면서 월동 및 성성숙을 유도하였다.

### (2) 성성숙에 의한 자연산란 유도

2004년 12월 9일부터 2005년 4월 10일까지 123일 동안 월동사육에 의한 인위적인 성성숙을 유도하였고 2005년 5월 11일부터 6월 7일까지 4회에 걸쳐 표 5에서와 같이 암·수를 구분하여 호르몬을 주사한 후 자연산란을 유도하였다(그림 4).

## 다. 인공 종묘생산

### (1) 수정란 관리

호르몬 주사로 산란이 유도된 어미에서 생산된 수정란은 수중에서 부상하다가 배수관을 통해 유출시킨 후 미리 준비한 수정란 수집그물( $\varnothing 60 \times H 45$  cm, mesh size 700  $\mu m$ )을 이용하여 배출된 수정란을 수집하였다(그림 5). 수집된 수정란은 18톤 콘크리트 원형수조에 수용하여 관리하였으며 수용 시 사육환경은 표 6과 같다.

표 5. 산란유도를 위한 호르몬 주사

Table 5. Hormone injection for spawning induction with small yellow croaker, *L. polyactis*

날 짜	암 컷 (마리)	수 컷 (마리)	호르몬
2005. 5. 11	20	4	GnRH
2005. 5. 24	40	3	GnRH
	91	13	HCG
2005. 5. 27	136	7	GnRH
2005. 6. 07	67	2	HCG



그림 4. 산란유도를 위한 호르몬 주사.

Fig. 4. Hormone injection for spawning induction with small yellow croaker.



그림 5. 참조기 수정란 수집 시설.

Fig. 5. Net for fertilized eggs collection of small yellow croaker.



표 6. 참조기 수정란 사육환경 조건

Table 6. Culture condition for the fertilized eggs of small yellow croaker, *L. polyactis*

WT (°C)	DO (ppm)	pH	Salinity (ppt)	NO <sub>2</sub> -N (ppm)	NH <sub>4</sub> -N (ppm)
21.4	11.8	7.37	27.2	0.1	0.025

## (2) 참조기 치어 사육관리

### (가) 로티퍼(Rotifer) 공급

부화 자어의 초기 먹이 공급은 부화 후 3일째부터 로티퍼를 공급하였으며, 공급량은 사육수조에 로티퍼가 5~10개체/ml 유지되도록 매일 2~3회를 공급하였다. 로티퍼 투여 기간은 27일째까지 계속 공급하였다. 부화자어의 사육수에는 자어가 먹고 남은 로티퍼의 먹이 유지 및 사육수의 안정과 광합성 작용을 돕기 위하여  $5 \times 10^3$  cell/ml의 밀도로 클로렐라(Chlorella)를 첨가하여 주었다.

### (나) 알테미아(Artemia) 공급

알테미아는 28~30°C에서 부화시켜 난각을 제거한 후 각 수조 당 3~4 개체/ml의 농도로, 부화 후 13~30일까지 공급하였다.

### (다) 배합사료 공급

초기 배합사료는 부화 후 13~25일째까지는 L1 타입(0.2~0.3 mm), 19~21일째까지는 L2 타입(0.3~0.4 mm), 30~35일째까지는 L3 타입(0.4~0.6 mm), 35~40일째까지는 L5 타입(0.6~1.0 mm)을 2시간 간격으로 매일 8회씩 공급하였다.

### (라) 치어 사육

수정란을 수용한 사육수조(18톤 콘크리트 사각수조)에서 연속적으로 치어가 될 때까지 사육하였으며, 사육 환경조건은 표 7에 나타내었다. 부화 후 7일째까지는 지수식으로, 이후에는 매일 2회(07:00, 16:00) 총 수량의 20~30%씩 여과해수로 매일 보충하는 반 지수식 방법을 사용하였다. 부화 30일째부터는 깨끗한 여과해수를 사용하여 유수식으로 사육 관리하였다.

표 7. 참조기 치어의 사육환경 조건

Table 7. Culture condition for juvenile small yellow croaker, *L. polyactis*

WT (°C)	DO (ppm)	pH	Salinity (ppt)	NO <sub>2</sub> -N (ppm)	NH <sub>4</sub> -N (ppm)
23.1±3.30	9.33±1.33	7.46±1.07	27.2±3.88	0.14±0.02	0.18±0.03

## 5. 양식생물학적 특성

### 가. 난 발생

원형 유리수조(5 L)에 수정란을 수용하여 수온은 22.4℃, 산소는 난에 충격이 가지 않는 범위로 소량 공급하면서 연속적으로 발생과정을 조사하였다. 수정란과 자어의 변화는 petri dish (∅50 mm)에 옮겨 광학 및 입체 현미경하에서 관찰하였으며, 난발생과정은 위란강 형성, 배반 형성기, 상실기, 포배기, 낭배기, 신경배 형성기, 기관형성기, 부화자어 단계, 난황흡수기를 중심으로 조사하였다.

### 나. 수정란 크기

수정란은 200 ml 유리 비이커에 수용한 후 1, 15, 30시간대별로 수정란의 크기를 만능투영기(V-12A, Nikon Corp., Japan)를 이용하여 30개씩 측정하였으며, 수정란의 크기는 표면적( $A=\pi \times X \times Y/4$ )으로 계산하였다.

### 다. 부화율

#### (1) 수온별

수온(22.4, 15, 20, 25, 30℃)에 따른 참조기 수정란의 부화율은 시험구별 2반복으로 수조당 2,000개의 수정란을 사용하였다.

#### (2) 염분농도별

참조기 수정란의 부화 시 최적 염분농도를 조사하기 위해 5, 10, 20, 30 ppt 시험구와 대조구로서 자연 염분농도인 27 ppt 시험구로 나누어 각 시험구당 200개의 수정란을 수용하여 부화율을 조사하였다.

### 라. 생존율

#### (1) 수온별

수온별(22.4, 15, 20, 25, 30℃) 치어의 생존율을 조사하기 위해 130 L HDPE (High-Density Polyethylene) 사각수조에 전장 22.0 mm의 치어 800마리씩을 수용하여 3반복으로 10일간 실시하였다.

#### (2) 염도농도별

전장 25.1 mm의 치어를 각 수조(2 L, Glass beaker)당 10마리씩 수용하였고 시험구는 3반복으로 10일간 사육하면서 조사하였다.

#### 마. 적정 산란시기 판정

2005년도에 채포하여 실내사육조건에서 순치시킨 어미(24.6±0.12 cm, 163.6±3.31 g)를 대상으로 호르몬을 주사할 경우 산란량과 부화율을 높일 수 있는 가장 적절한 시기를 판정하고자 수행하였다. 호르몬 주사 시기는 자연산란 기간이 5~6월초인 점을 감안하여 이 시기와 유사한 4월 하순(4. 28일), 5월 초순(5. 10일), 5월 중순(5. 20일), 6월 초순(6. 8일), 6월 중순(6. 22일)별로 나누어 각각 호르몬을 주사하였다. 호르몬 주사 농도는 GnRH 0.1 mg/kg 으로 동일하게 처리하였다.

#### 바. 행동특성

수정란(2006년산)이 부화되기 시작하면서 사육수조내에서 나타나는 행동학적 특성들을 성장 시기별(5, 10, 15, 20, 30, 40, 50일)로 나누어 유영, 먹이섭식, 무리형성 및 특이적 행동양상을 지속적으로 관찰하였다.

#### 사. 밀도별 생존율

평균 20.2±0.18 mm (0.07 g)인 2006년에 생산된 치어를 대상으로 10 L 아크릴 수조에 5, 10, 15, 20, 25마리씩을 수용한 5개 시험구를 설정하여 3반복 처리하였으며, 생존율과 성장을 근거로 적정 사육밀도를 간접적으로 구명하고자 하였다.

#### 아. 수온 충격 실험

실내수조(13℃)에서 월동 사육중인 2005년산 치어(전장 16.7 cm, 체중 62.5 g)를 대상으로 얼음을 이용하여 수온을 11℃, 9℃, 7℃, 5℃, 3℃로 하강시킨 후 시험구당 치어를 10마리씩 수용하였다. 시험구별 수온은 6시간 동안 지속적으로 유지하였다. 그리고 24시간 동안 수온충격에 대한 반응형태와 생존율을 조사하였다.

## 제 2절 연구결과 및 고찰

### 1. 번식생물학적 특성

경골어류의 생식주기는 수온, 염분 및 광주기와 같은 환경인자들에 의해 영향을 받는 중추신경계의 내분비적 활성화에 의해 조절된다(Aida, 1991). 수계 동물인 어류를 인위적으로 양식하기 위해서는 인공사육조건 아래에서 생식기능을 정상적으로 유지하여, 세대 번식을 이루어내는 것이 기본이다. 하지만 인위적인 사육조건에서 많은 경골어류들은 정상적인 생식기능과 세대번식을 하지 못하는 것으로 알려져 있다. 그 이유는 해당 종의 생태학적 특성 파악이 미흡하고, 생식생물학적 정보가 부족한 데서 찾아 볼 수 있다.

양식대상종에게는 자연계에 서식하던 환경에 적합한 사육조건을 제공해 주어야 할 뿐 아니라, 자연생태계 내에서 해당 종의 생식현상과 번식시기를 파악하고 있어야 한다. 그렇지 못할 경우 암컷은 성성숙 또는 산란이 정지되며, 수컷의 경우 질이 좋지 않은 정액을 생산하거나, 정액 생산량이 크게 낮아지기도 한다. 따라서 어떤 특정 대상어류를 인위적 환경에 순치시켜 이들에게서 후속세대를 만들어내기 위해서는 대상 종의 번식생물학적 정보를 자연계에서 얻을 필요가 있다.

참조기(*Larimichthys polyactis*)는 농어목 민어과 어류로서 수심 40~200 m의 바닥이 모래나 빨린 해역에 서식하는 연안 회유성 어류에 속하며(Baik et al., 2004), 부세(*Larimichthys crocea*)와 생물학적 특성이 매우 유사하지만, 개체의 외형, 크기와 생태학적 습성 차로 인해 육질이 부세보다는 월등히 우수한 어종으로 알려져 있다(정, 1977; Lee and Park, 1992). 산업적인 측면에서 이 종은 굴비의 원재료로서 사용되는데, 과거 1990년대 초반 약 35,000 MT/year의 생산량이 2000년대에 접어들면서 평균 12,635 MT/year 정도로 급격히 감소한 경향을 나타내고 있어(김, 2005; 해양수산통계연보, 2005), 영광 등지의 굴비 생산업체들에서는 중국산 조기 수입을 통해 굴비의 원재료를 대체하고 있다.

따라서 관련 산업의 유지·발전과 대상생물의 보존 가치 측면에서 연안 자원량의 유지 또는 증대가 절실히 요구되며, 이를 위한 인공종묘의 생산·방류 사업이 국가적 차원에서 진행되어야 한다. 그러므로 참조기 인공종묘생산을 위해서는 자연산 참조기의 생식년주기 조사를

통한 생식생물학적 생체정보가 우선 확보되어야 하며, 이를 통한 인공번식 유도과 같은 기반 기술이 확립되어야 할 것으로 본다. 하지만 계절 이동성이 강한 참조기의 생태학적 습성으로 인해, 아직까지 국내에서는 이 종의 생식생물학적 특성을 완전하게 파악한 적이 없으며, 그로 인해 자연산 채집을 통한 인공사육어미(broodstock) 확보, 인공사육에 의한 수정란과 종묘 생산에 많은 어려움을 겪어 왔다.

최근 들어 Myoung et al.,(2004)에 의해 자연산 어미로부터 소량의 인공 수정란을 생산하여 배발생 실험결과가 보고 된 바 있지만, 여전히 번식생물학적 특성과 생식생리학적 정보가 부족하여 번식현상의 인위적 제어를 통해 대량의 수정란을 확보하지는 못하고 있다. 따라서 본 연구는 참조기의 번식생물학적 정보를 확보하기 위한 방안의 일환으로, 우리나라 서해안과 서남해안(제주 추자도, 전남 영광, 경기 강화) 부근에서 어획된 자연산 참조기 어미들을 대상으로 2004년 2월~2005년 2월까지 1년간 연중 생식주기를 파악하여 이들의 주 산란기와 생식생물학적 특성을 구명하였다.

#### 가. 채포 어장의 수온변화

서해안에서 참조기의 주요 회유 경로인 칠산어장 인근의 어장에서 측정한 연중 수온 및 비중 변화는 그림 6과 7에 나타내었다. 수온의 연중 변화는 2003년 8월에 26.3℃로 가장 높았으며 9월부터 하강하기 시작하여 2004년 1월에 3.8℃에 이르렀다. 이 후 다시 수온은 상승하기 시작하여 2004년 5월 17.1℃까지 높아졌다.

이러한 연중 변화는 최근 10년간의 평균 수온(1993~2002년)과는 큰 차이 없는 비슷한 변화 경향을 나타내었으나, 전년에 비교해서는 4~5월에 약 2~3℃의 차이가 있었다. 비중은 2003년 8월에 1.018로 가장 낮았으며 9월부터 차츰 높아져 2004년 1월 1.025에 이르렀으며 5월까지 소폭의 월간 변동을 나타내었다. 이러한 변화 경향은 평년에 비해 2003년 8월부터 12월까지의 낮은 수온과 높은 비중을 나타내었다.

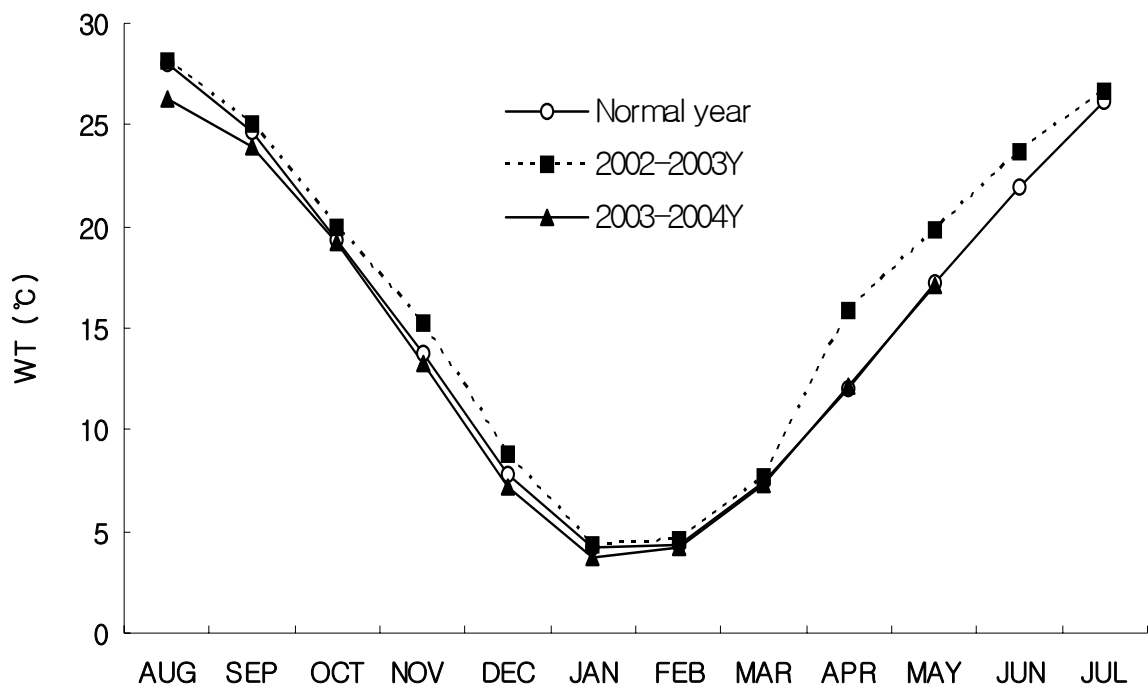


그림 6. 자연산 참조기 채포어장의 연중 수온 변화.

Fig. 6. Annual water temperature change at catching station of wild small yellow croaker, *L. polyactis*.



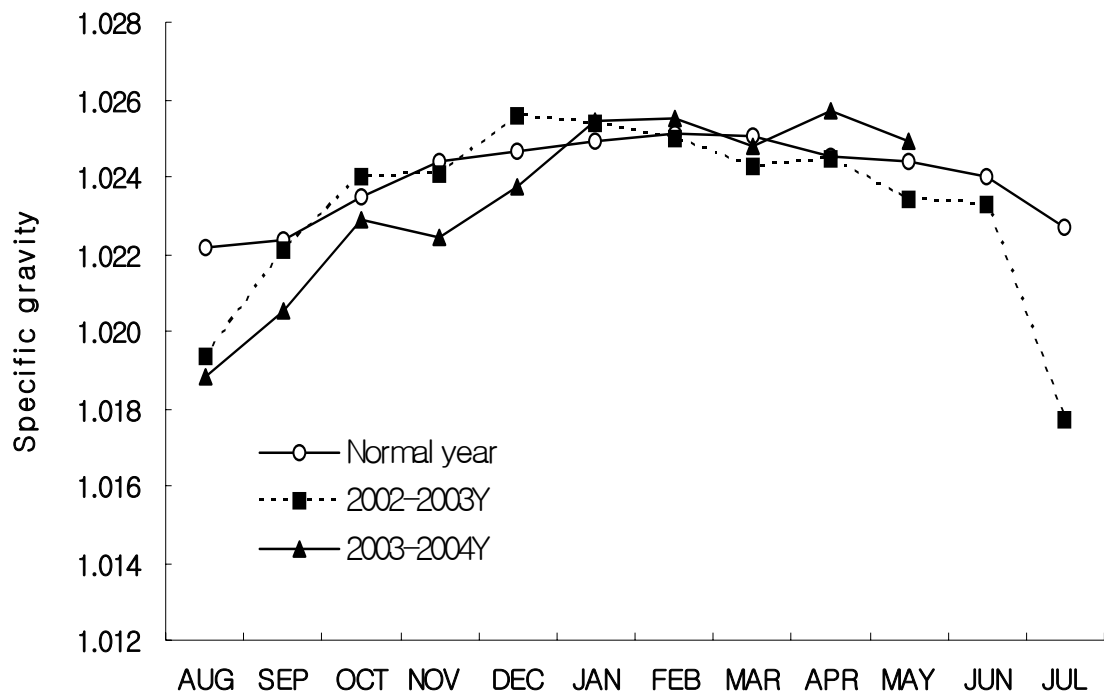


그림 7. 자연산 참조기 채포어장의 연중 비중 변화.

Fig. 7. Annual specific gravity change of catching station of wild small yellow croaker, *L. polyactis*.

## 나. 번식생물학적 정보

### (1) 월별 생체지수 변화

자연산 참조기의 월별 GSI, HSI, VSI 및 CF 변화는 그림 11에 나타내었다. 암컷의 경우 2004년 2월에 GSI가  $3.87 \pm 0.32\%$ 였으며, HSI는  $2.40 \pm 0.08\%$ 였고, 이때 VSI는  $1.22 \pm 0.05\%$ , CF는  $9.0 \pm 0.1\%$ 였다. 수온이 상승하기 시작하는 3월에 들어서면서 GSI는  $10.43 \pm 0.60\%$ 으로 급격히 증가하였으며, HSI는  $1.67 \pm 0.09\%$ 로 감소하였으나, VSI는  $1.54 \pm 0.07\%$ 로 2월과 큰 차이가 없었고, CF는 역시  $8.9 \pm 0.3$ 로 2월에 비해 큰 변화는 없었다.

이후 4월에는 GSI가  $10.18 \pm 0.51\%$ 로 전월과 거의 비슷한 수준을 유지하였으나, HSI와 VSI 역시 3월에 비해 큰 변화는 없었다. 그러나 CF는 앞 달에 비해 다소 낮아지는 경향을 보였다. 5월에 이르러서는 GSI가  $13.45 \pm 0.82\%$ 로 연중 최고값을 나타내었으며, HSI 역시  $2.08 \pm 0.09\%$ 로 앞 달에 비해 수치가 급격히 높아졌으나, VSI와 CF에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

한편 6월에 도달해서는 GSI가  $5.12 \pm 0.49\%$ 로 앞 달에 비해 크게 감소하는 형태를 나타내었으며, 그에 따른 VSI의 유의한 증가와 CF의 유의한 감소가 관찰되었다. 이후 GSI는 8월  $0.23 \pm 0.05\%$ 까지 지속적으로 감소한 뒤 9월에 이르러  $0.40 \pm 0.03\%$ 로 다시 증가하는 경향을 나타내기 시작하여, 10월  $0.56 \pm 0.03\%$ , 12월  $1.29 \pm 0.06\%$ , 2005년 1월  $3.31 \pm 0.21\%$ , 그리고 실험 종료시기인 2005년 2월에  $8.44 \pm 0.41\%$ 로 유의한 증가를 나타내는 것을 알 수 있었다.

HSI는 여름철 고수온기에 다소 감소하는 경향을 보여, 9월에  $1.76\%$ 까지 떨어지다가, 10월에 이르러  $2.61 \pm 0.13\%$ 로 급격히 증가하여, 12월까지  $2.6\%$ 대의 높은 값을 유지하였다. 이후 2005년 1월부터 다시 감소하는 경향을 나타내었다. VSI의 경우 8월  $2.65 \pm 0.07\%$ 였다가 9월부터 감소하여 12월까지  $2.04 \sim 2.38\%$  범위를 유지하다가, 겨울철이며 성숙개시기인 2005년 1월과 2월에  $1.37 \pm 0.08\%$ 와  $1.74 \pm 0.12\%$ 로 급격히 감소하는 경향을 보였다. CF의 경우 역시 8월 이후 증가하는 경향을 보여, 10월~12월에 약 10%대의 값을 나타내다가, 2005년 1월에 이르러  $9.3 \pm 0.1$ 로 유의하게 감소하여, 실험 종료시기인 2005년 2월에 1월과 비슷한  $9.4 \pm 0.1$ 를 나타내었다(그림 11).

수컷은 2004년 2월에 GSI가  $4.67 \pm 0.26\%$ 이며, HSI는  $1.63 \pm 0.09\%$ 였다. 이때 VSI는  $1.05 \pm 0.06\%$ , CF는  $8.9 \pm 0.1\%$ 였다. 3월에 들어서면서 GSI는  $3.79 \pm 0.23\%$ 로 급격히 낮아졌으며, HSI 역시도  $0.85 \pm 0.04\%$ 로 감소하였고, VSI는  $1.18 \pm 0.05\%$ 로 앞 달에 비해 다소 증가하는 경향을 보였다. 그러나 CF는  $8.8 \pm 0.1\%$ 로 2월에 비해 큰 차이가 없었다. 이후 4월에 접어들면서 GSI는  $4.12 \pm 0.24\%$ 로 앞 달에 비해 큰 차이가 없었으며, HSI도 역시 같은 경향을 보였다.

그러나 VSI는 3월에 비해 크게 증가하여  $1.32 \pm 0.11\%$ 로 이 시기부터 증가하는 경향을 나타내었고, CF는  $8.0 \pm 0.1$ 로 반대로 낮아지는 경향을 보이기 시작하였다. 5월에 이르러서는 GSI가 다시 감소하기 시작하여  $3.05 \pm 0.27\%$ 를 나타내었으며, 8월에 연중 최저값인  $0.09 \pm 0.18\%$ 을 나타내었다. 이후 9월부터 다소 상승하여 12월에  $1.86 \pm 0.164\%$ 로 본격적인 재상승 경향을 나타내었다. 2005년 1월에 접어들면서  $2.82 \pm 0.23\%$ , 실험 종료 시 2005년 2월 다시  $4.07 \pm 0.18\%$ 로 성숙기의 정소 형태를 나타내었다.

HSI는 5월에 접어들면서 앞 달과 큰 차이를 나타내지만 않았지만, 본격적인 상승 경향을 나타내어 12월  $2.20 \pm 0.13\%$ 로 연중 최고값을 나타내었고, 2005년 1월 성숙기에 접어들면서 다시 감소하는 경향을 나타내었다.

VSI는 5월부터 상승 경향을 보여 8월에 연중 최고값인  $2.53 \pm 0.25\%$ 를 나타내어 휴지기에 내장중량이 충분해 지는 것을 알 수 있었다. 이후 9월부터 다시 감소하기 시작하여 10월에  $1.84 \pm 0.14\%$ , 성숙기인 2005년 1월에  $1.19\%$ 로 감소하는 모습을 보였다. CF의 경우는 산란기인 5월과 6월에  $7.2 \sim 7.7\%$ 였으며, 휴지기인 8월부터 급격히 상승하여 성숙기인 2005년 1월 까지  $9.0\%$  이상의 높은 비만도를 나타내었다. 그러나 이후 2월부터 다시 감소 경향을 보이는 것으로 나타났다(그림 11).

표 8. 참조기 선어 구입 개체의 크기

Table 8. Size of wild fresh small yellow croaker purchased in Mok-po and Gang-hwa

조사일	구 분	수량 (마리)	평균전장 (cm)	평균체중 (g)	비 고
2004. 2. 25	암 컷	30	21.5±0.1	89.4±1.0	목포산
	수 컷	30	21.2±0.1	85.9±0.9	
2004. 3. 24	암 컷	30	23.4±0.2	115.0±0.9	목포산
	수 컷	30	22.9±0.2	103.5±0.8	
2004. 4. 20	암 컷	30	21.1±0.1	78.4±0.5	목포산
	수 컷	30	20.9±0.1	73.5±0.4	
2004. 5. 25	암 컷	30	19.7±0.1	65.2±1.6	강화산
	수 컷	30	19.7±0.1	59.6±0.7	
2004. 6. 9	암 컷	30	21.1±0.1	72.2±0.9	강화산
	수 컷	30	19.6±0.1	54.9±0.8	

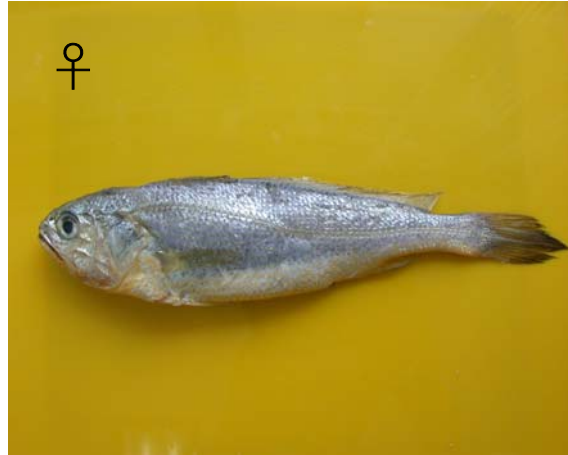


그림 8. 산란기(5월)에 성숙한 자연산 참조기 암·수의 외부 형태.

Fig. 8. Morphology of female and male of wild small yellow croaker matured in spawning season, May.



그림 9. 성숙(5월) 어미의 생식소 형태.

Fig. 9. Gonad of matured the wild small yellow croaker.



그림 10. 참조기 위 내용물(새우류).

Fig. 10. Feeds (shrimp) in stomach of small yellow croaker.

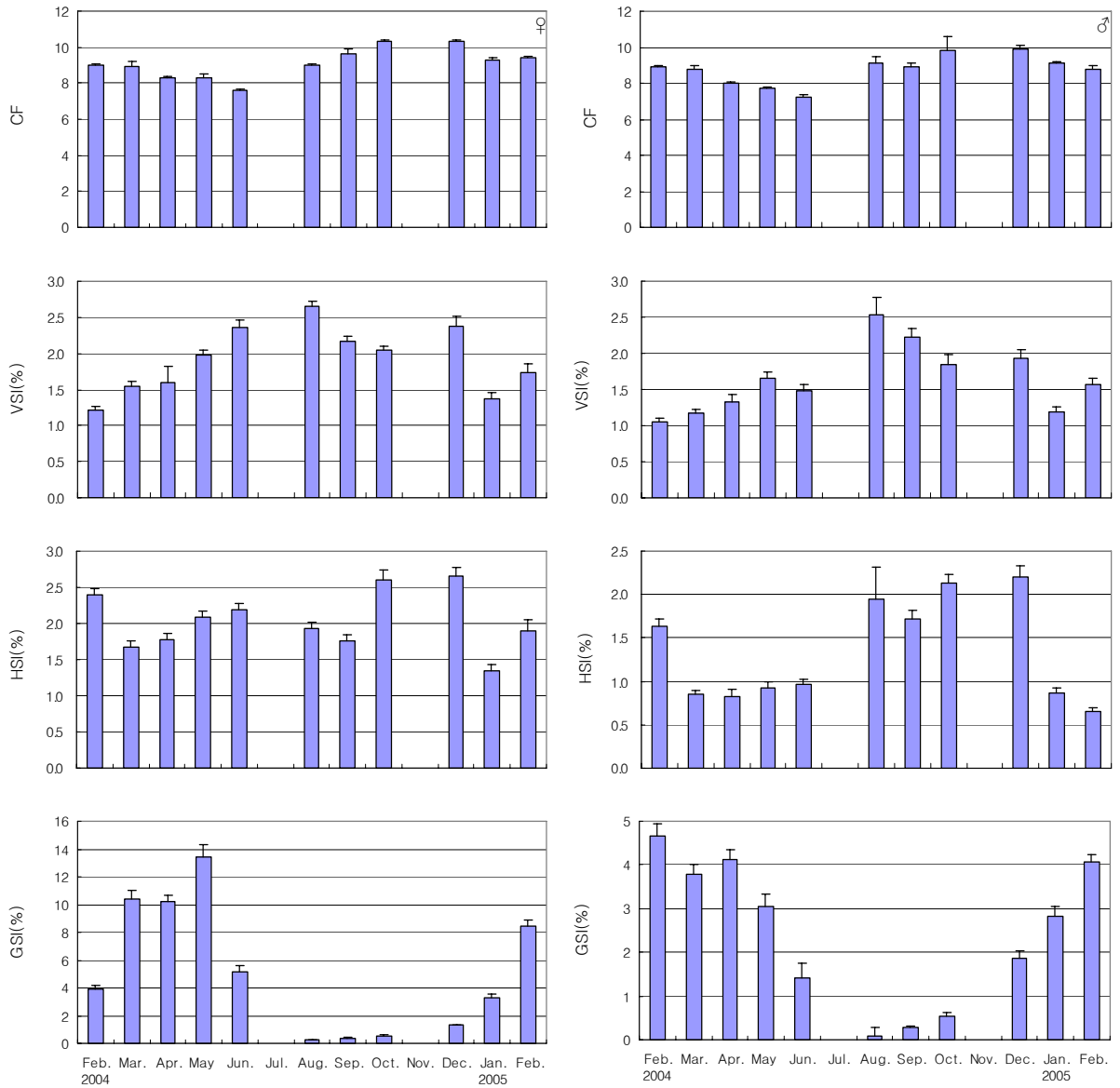


그림 11. 자연산 참조기의 비만도, 내장중량지수, 간중량지수 및 생식소중량지수의 월별 변화.

Fig. 11. Seasonal changes of condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), visceral index (VSI) and gonadosomatic index (GSI) in wild yellow croaker, *L. polyactis* captured from the western coast of Korea.



## (2) 월별 생식소 발달

### (가) 난소

난소는 좌우 비대칭의 낭상형으로 복강 배측(背側) 후방부에 위치하며, 복강의 가장자리 뒤끝 부위에서 합일되어 다시 노관과 연결되어 비노생식공으로 개구되어 있었다. 2004년 2월(그림 12, A)과 3월(그림 12, B)에 채집된 개체들은 육안으로도 난소가 매우 발달한 개체들로서 조직학적 검경을 통해 난황구들의 축적과 이들 사이에 지방포의 축적도 활발히 진행되어 있는 성숙란을 관찰할 수 있었다. 4월에 이르러서는 난황구와 지방구의 형성이 이루어지면서 산란 직전의 초기 완숙난들이 관찰되었다(그림 12, C).

5월의 난소 조직은 대부분이 완숙난들로 이루어져 있었으며, 일부 개체에서는 성숙 난모세포 사이에 배란 후 잔존여포와 초기 난모세포들을 관찰할 수 있었다(그림 12, D). 6월에 채집된 대부분 개체들의 난소 조직상은 미처 산란되지 않은 난모세포들의 퇴화, 흡수가 일어나면서, 난소를 구성하고 있는 난소소낭들의 형태가 뚜렷하게 되었고, 이들 사이에 주변인기 난모세포들이 있었다(그림 12, E). 또한 8월에 이르러 일부 퇴화 변성중인 난들이 잔존하고 있는 난소를 가진 개체들도 있었으나, 대부분이 난소피막의 근조직에서 유래된 난소소낭으로 구성되어 있으며, 그 속에는 결체성 조직 사이에 파묻혀 있는 난원세포들과, 염기성 색소에 짙게 염색되어 있는 염색인기(20~40  $\mu\text{m}$ ) 및 주변인기(40~100  $\mu\text{m}$ ) 난모세포들이 대부분을 차지하고 있었다. 이런 난소조직상은 10월까지 관찰할 수 있었다(그림 12, F).

2004년 11~12월이 되면서 난소 내 일부 난모세포들은 세포질에 난황포가 나타나고, 150  $\mu\text{m}$  전후로 성장하면서 세포질의 염색성은 짙은 청색에서 보라색으로 바뀌었다(그림 12, G). 2005년 1월로 접어들면서 각 개체들의 난소에는 난모세포의 방사선대가 두꺼워지고, 유구들과 함께 난황구들의 축적이 진행되고 있는 난황구기 난모세포들의 수가 증가하였다. 1월과 2월에 채집된 개체들 중 육안으로도 난소가 매우 발달한 개체들에서는 크기가 15  $\mu\text{m}$  전후인 난황구들의 축적과 이들 사이에 지방구의 축적도 활발히 진행되어 있는 성숙난들이 관찰되었다(그림 12, H).

성숙 산란기에 있어 어체 크기와 GSI에 대한 단위 생식소 중량당 포란수를 파악해 본 결과, 생식소 단위중량당 포란수는 어체의 크기와는 상관없었지만, GSI와는 역상의 상관

관계를 나타내는 것으로 확인되었다(그림 12, 13).

한편 월별 단위중량당 포란수와 개체별 포란수를 조사한 결과, 조사 개시점인 2004년 1월 단위중량당 포란수는  $6,927 \pm 135$  eggs/g ovary였으며, 개체별 포란수는  $23,933 \pm 465$  eggs/fish으로 나타났다(그림 13, 14). 이러한 단위중량당 포란수와 개체별 포란수는 2월에 접어들면서 유의하게 증가하고, 단위중량당 포란수는  $8,439 \pm 120$  eggs/g ovary로 연중 최고값을 나타내었다. 그러나 개체별 포란수는  $28,268 \pm 816$  eggs/fish로 아직은 최고치에 이르지 못하는 것이 확인되었다.

라서 2월의 수치들이 의미하는 바는 아직까지 알의 성장과 성숙이 완전히 이루어지지 않아, 알의 크기가 상대적으로 3~6월에 비해 작다는 것을 의미하며, 아직까지 암컷의 산란이 진행되지 않고 있음을 간접적으로 나타내주는 것이다. 그러나 2004년 3월에 접어들면서 생식소 단위중량당 포란수가 2월에 비해 급격하게 줄어드는 경향을 보였으며, 개체별 포란수는  $44,951 \pm 871$  eggs/fish로 가장 높은 수치를 나타내어, 알의 성숙이 거의 완성단계에 접어들었지만, 아직까지 산란단계에 접어들지 않다는 것을 간접적으로 분석되었다.

4월 접어들면서 생식소의 단위중량당 포란수는  $3,303 \pm 45$  eggs/g ovary로 전 달과 비교해 큰 차이를 찾아볼 수 없었지만, 개체별 포란수는 25,478 eggs/fish로 전달에 비해 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었다(그림 13). 이것은 참조기 암컷이 4월에 이르면 산란을 개시한다는 사실을 간접적으로 보여주고 있는 자료라 생각된다. 그 이유인 즉은 단위중량당 포란수는 3월과 비교해서 큰 차이가 없음에도 불구하고, 개체별 포란수가 유의하게 감소했다는 것은 알의 신규 생성보다도 알의 배란과 산란에 의한 어미 체내 성숙란의 수적 감소에 의한 결과로 사료된다. 이러한 수적 감소는 난소 퇴화에 의한 것이라기보다는 생식소 외부로 방출에 의한 결과, 즉 배란과 산란의 결과로 해석해 볼 수 있다. 따라서 우리나라 서해연안에 서식하는 참조기의 주 산란개시기는 4월로 추정해 볼 수 있다.

이후 5월의 경우에는 참조기 어미의 생식소 단위중량당 포란수는 전 달인 4월과 비교해서 큰 차이가 없었지만, 개체별 포란수가 4월에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내고

있어, 참조기 암컷 생식소에서 지속적인 알의 성장, 성숙, 그리고 산란이 진행되고 있음을 뜻하는 것으로 보인다. 이후 6월에 접어들면서 생식소 단위중량당 포란수는 여전히 5월과 같은 값을 나타내지만(그림 15), 전달에 비해 개체별 포란수에 있어서 급격한 감소가 나타나기 시작하는 것으로 관찰되었다(그림 16). 이것은 참조기 어미의 산란이 마무리 단계에 접어들고 있음을 판단할 수 있게 해 준다.

#### (나) 정소

정소는 긴 엽상형으로 난소와 마찬가지로 복강 배측 후방부에 좌우 1쌍이 위치하며, 복강 가장 뒤끝 부위에서 좌우 정소가 합일된 후 다시 노관과 연결되어 비노생식공으로 개구되어 있었다. 2월과 3월에 채집된 대부분 개체들의 정소 조직은 정소세관 내의 생식세포들이 발달 단계별로 포낭을 형성하고 있었으며, 정소세관 내강에서는 변태된 정자들을 관찰할 수 있었다.

그리고 4월과 5월로 접어들면서는 세관벽을 따라 정세포군들과 변태된 정자들로 가득 찬 정소세관으로 구성되어 있는 정소 조직상과, 정소세관 내강에는 여전히 정자들이 관찰되지만, 정소세관벽을 구성하고 있는 결합조직들이 호산성 색소에 뚜렷하게 염색되며, 이들 정소세관벽의 결합조직에 연접하여 정원세포들이 관찰되는 정소 조직상이 주로 관찰되었다.

6월에 접어들면서 대부분의 수컷들의 정소세관 내강에서는 여전히 잔존 정자들이 관찰되었지만, 정소 세관벽을 구성하는 결합조직과 정소세관 내 정원세포 및 중간조직들은 모두 호산성 색소에 붉게 염색되어 있었다. 8월에는 정소 조직의 염색성이 호염기성으로 바뀌었으며, 정소세관 내에는 세관벽을 따라 정원세포들이 줄지어 있었다. 이런 조직상은 11월까지 관찰할 수 있었다.

12월이 되면서는 정원세포들의 핵내에서 인이 사라지면서 핵질의 변화가 일어나고 있었으며, 다음해 1월과 2월로 접어들면서 정소세관은 점차 비후되기 시작하고, 세관 내에는 여러 단계의 생식세포들이 출현하기 시작하였다.

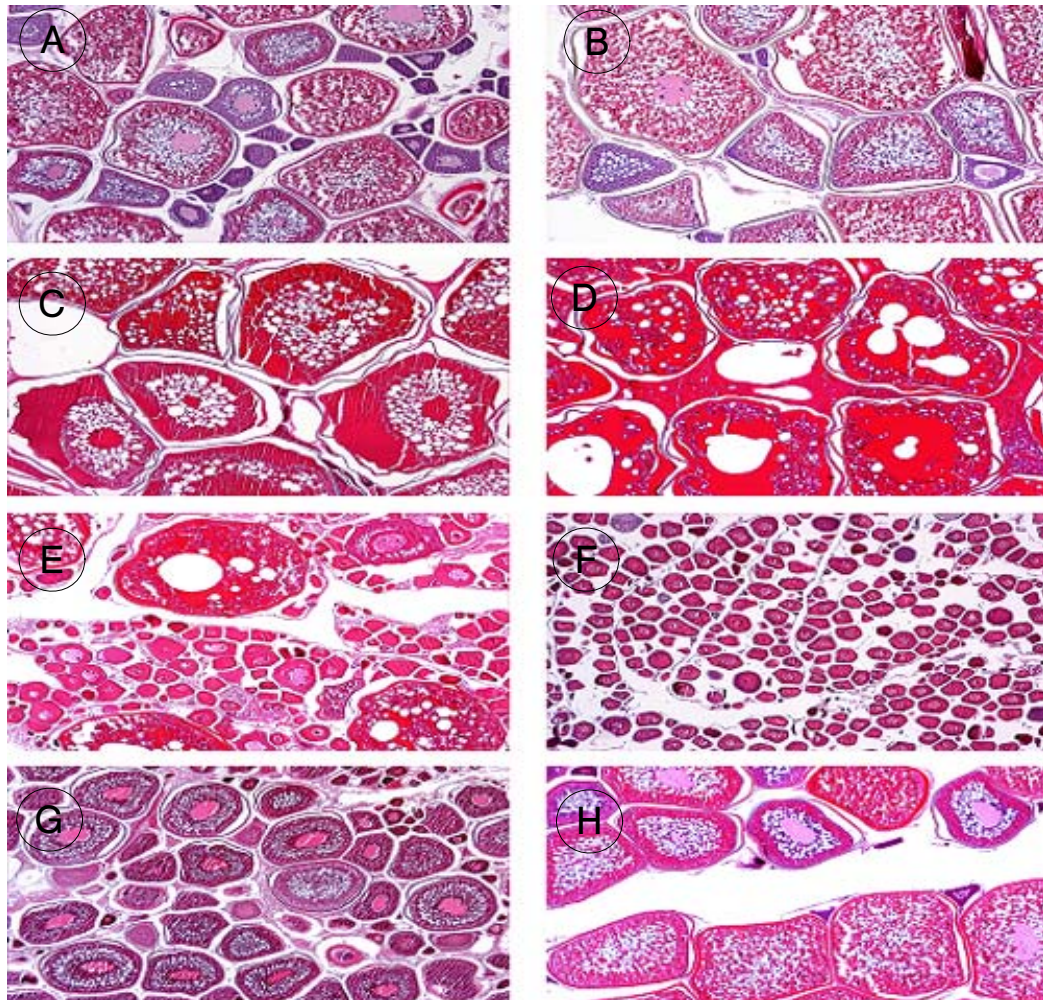


그림 12. 자연산 암컷 참조기의 연중 생식소의 변화.

Fig. 12. Photomicrographs of wild small yellow croaker, *L. polyactis* ovaries during the reproductive cycle. (A) Section of an ovary in February 2004, showing yolk vesicle oocytes at the growing stage. (B) Section of an ovary in March, showing maturing oocytes. (C) Section of an ovary in April, showing ripe oocytes. (D) Section of an ovary in May, showing mature oocyte and atretic follicle at the spawning stage. (E) Section of an ovary in June, showing many degenerative oocytes at the degenerative stage. (F) Section of an ovary in August-October, showing oogonia the resting stage. (G) Section of an ovary in November-December, showing chromatin nucleolus and perinucleolus oocytes at the growing stage. (H) Section of an ovary in February 2005, showing yolk vesicle oocytes at the growing stage.

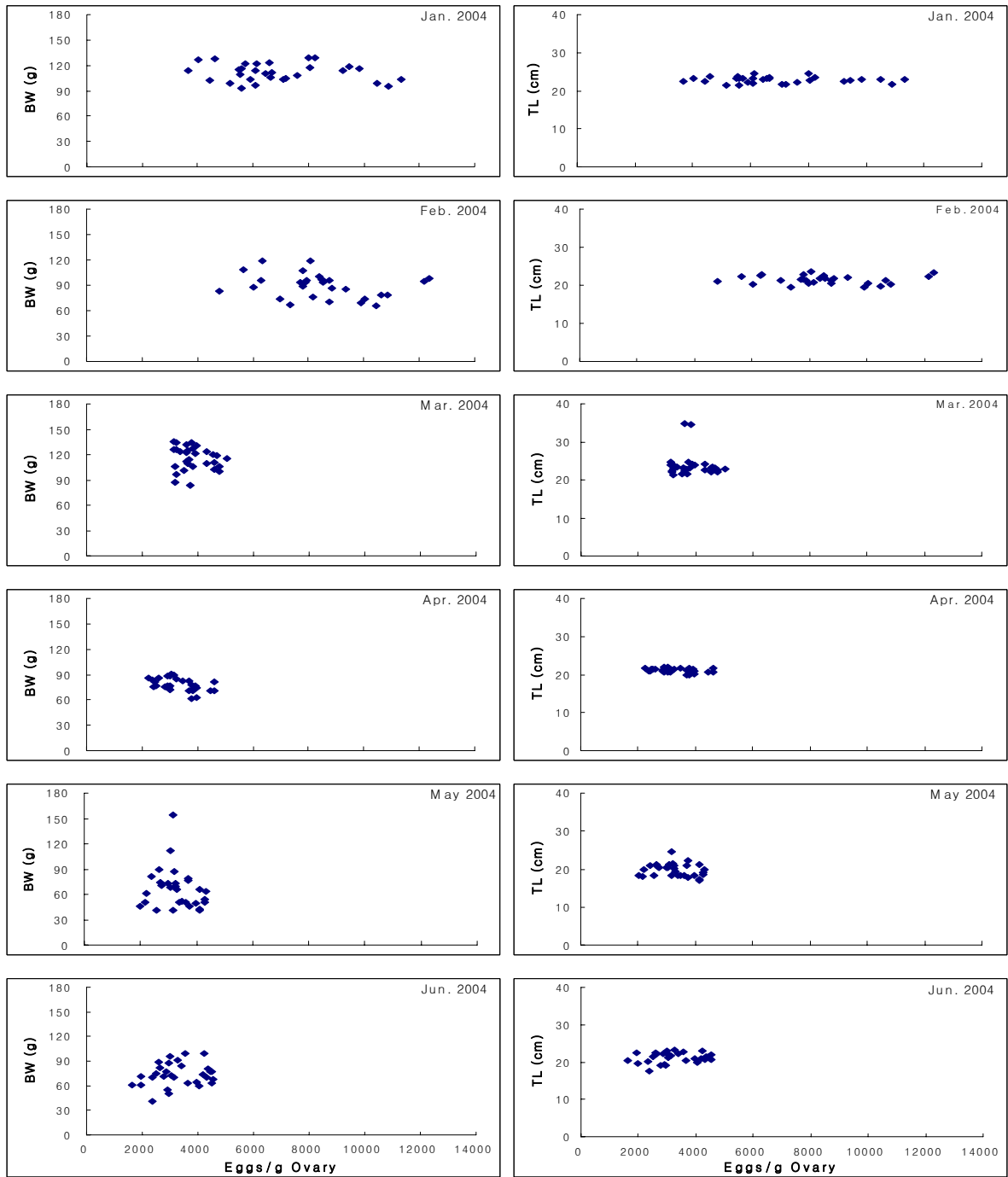


그림 13. 자연산 암컷 참조기의 생식소 단위중량당 알의 수 및 크기별 알의 수.

Fig. 13. Relationship between egg fecundity/g Ovary and body size in female wild small yellow croaker, *L. polyactis* (N=40). The fecundity is expressed as Eggs/g ovary.

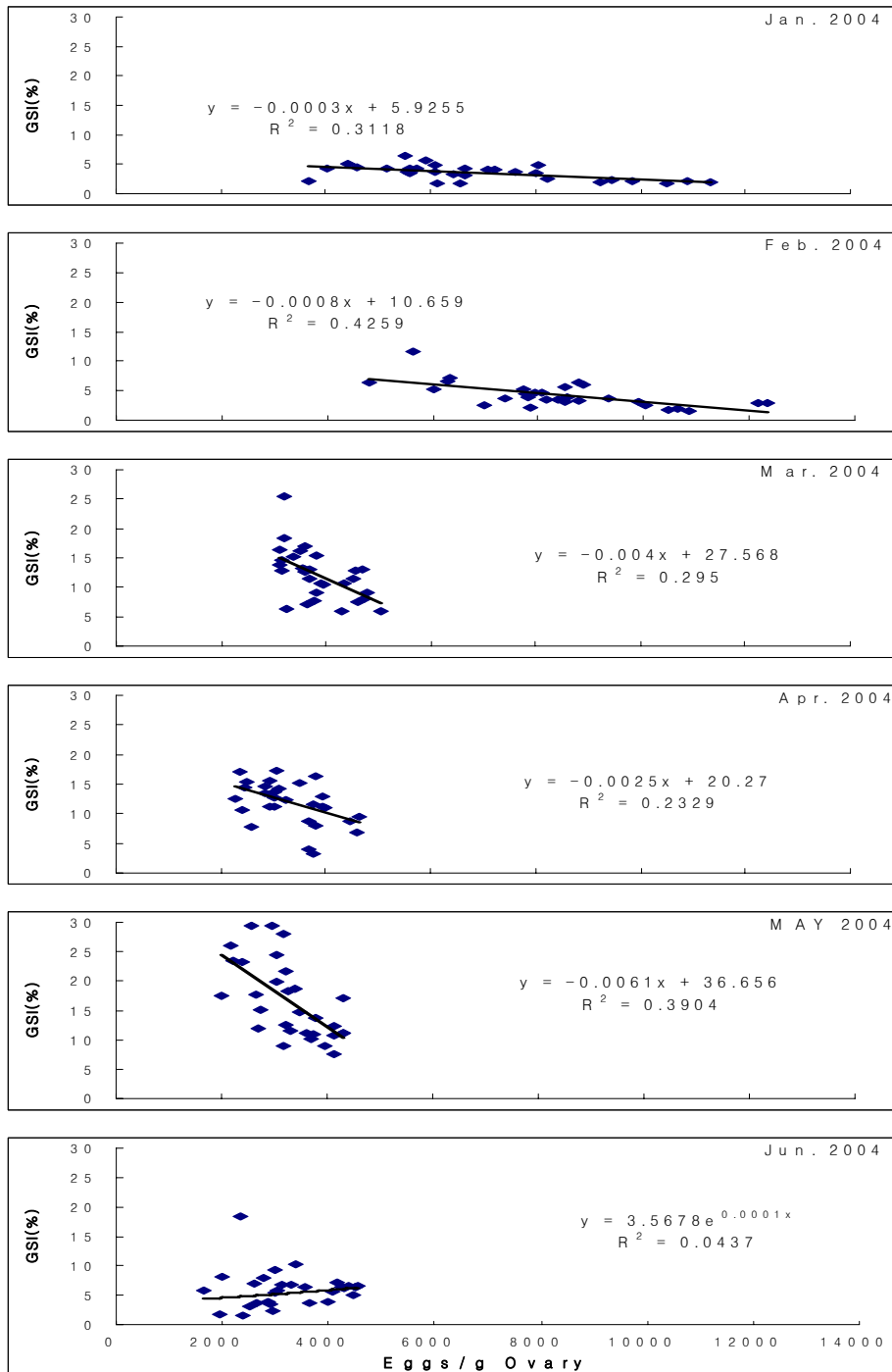


그림 14. 암컷 참조기의 난소 단위중량당 포란수와 생식소중량지 수와의 상관관계.

Fig. 14. Relationship between egg fecundity/g ovary and GSI in female small yellow croaker, *L. polyactis* (N=40). The fecundity is expressed as Eggs/g ovary.

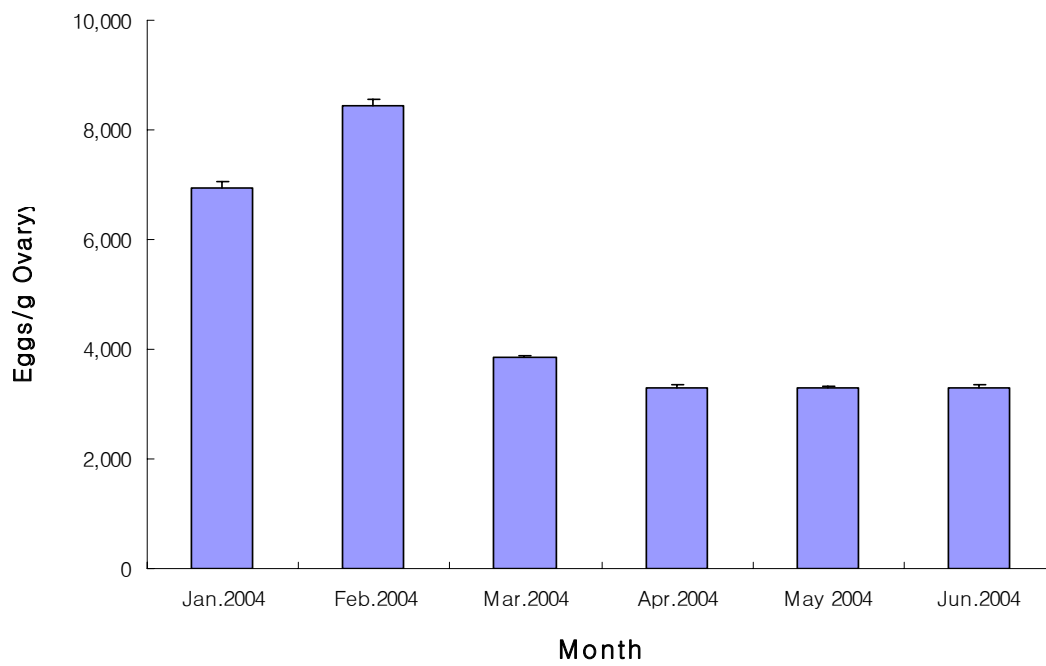


그림 15. 성숙 및 산란기 동안 월별 암컷 참조기의 포란수(1).

Fig. 15. Monthly fecundity of female small yellow croaker, *L. polyactis* from maturation stage to spawning stage (N=180). The fecundity is expressed as Eggs/g Ovary (P<0.05).

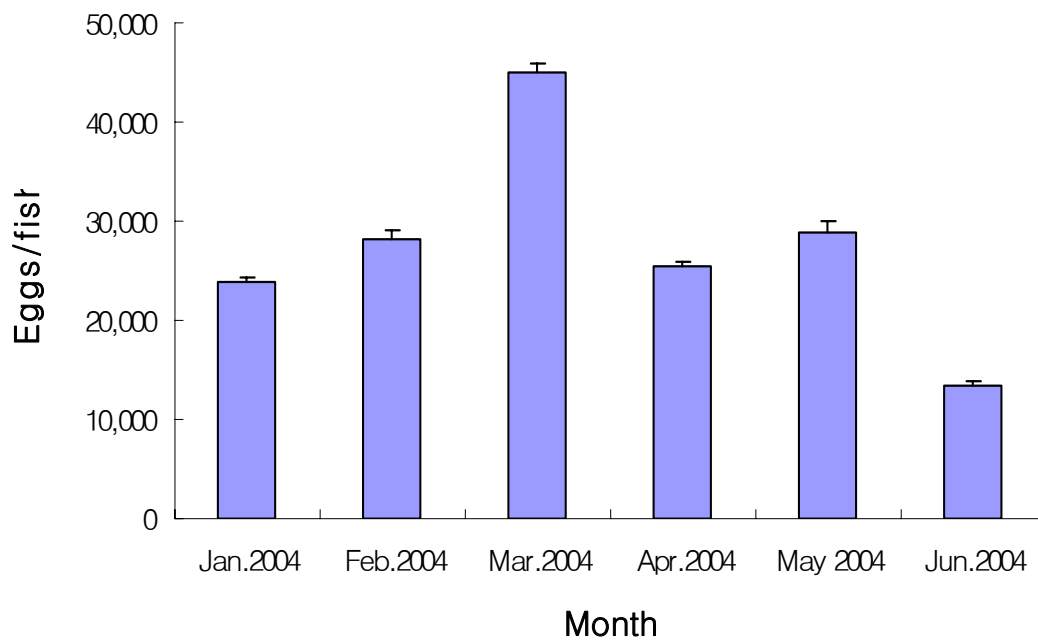


그림 16. 성숙 및 산란기 동안 월별 암컷 참조기의 포란수(II).

**Fig. 16. Monthly fecundity of female small yellow croaker, *L. polyactis* from maturation stage to spawning stage (N=180). The fecundity is expressed as Eggs/fish, respectively (P<0.05).**



### (3) 생식년주기 분석

생식소 발달의 조직학적 조사와 생체지수의 연간 변화자료를 기반으로 참조기의 생식년주기를 성장기, 성숙기, 완숙 및 산란기 그리고 퇴화 및 휴지기와 같은 연속적인 단계로 구분할 수 있었다(표 9, 10).

#### (가) 성장기

생식소는 10월부터 활성화되기 시작하여, 성장기 생식소를 가진 개체들의 출현율은 암컷에서는 11월에 48%, 수컷에서는 11월에 53%였으며, 이들 성장기 개체들은 12월 중순까지 암수 모두에서 관찰되었다.

#### (나) 성숙기

수컷은 암컷 보다 빨리 11월에 성숙기 개체들이 출현하였으며, 암컷은 12월에 성숙 개체들이 관찰되었다. 이들 성숙기 개체들은 암컷이 2월에, 수컷은 1월에 가장 많이 출현하여 시기적인 차이를 보였다.

#### (다) 완숙 및 산란기

암·수 모두 4월로 접어들면서 완숙 및 산란기 개체들의 출현이 관찰되었으며, 4월에 암컷이 52%, 5월에 63%의 출현율을 보였으며, 수컷은 4월에 69%, 5월에 48%의 출현율을 보였다. 이들 산란 및 방정시기 개체들은 암수 모두 6월까지 출현하였다.

#### (라) 퇴화 및 휴지기

생식세포들의 퇴화가 일어나는 개체들은 수컷은 5월에서부터, 암컷은 6월부터 나타나기 시작하였으며, 7월부터 9월까지 채집된 모든 개체들의 난소는 초기 난모세포들이 재배치되어 뚜렷한 생식세포의 발달상이 보이지 않는 휴지기 상태였다. 수컷에서는 5월부터 생식소가 위축되는 개체들이 출현하여 역시 6월부터 10월까지 채집된 모든 개체들은 정원세포로 구성된 정소를 가지고 있는 휴지기 상태였다.

표 9. 자연산 암컷 참조기의 생식주기

Table 9. Reproductive cycle in female wild small yellow croaker, *L. polyactis*

Stage	2004					2005							
	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
Primary Growth	+								+/-	++	+	+/-	
Secondary Growth	++									+/-	++	+	+/-
Vitellogenesis	++	+++	++								+/-	+	++
Maturation			++	+++	+								
Spawning		+	++	+++	++								
Degeneration						+/-	++						
Rest							+/-	+++	+++	+/-			

\* Symbols (from + to +++) indicates the relative abundance of each germ cell type; +/-: present in some individuals, (+): rare.

표 10. 자연산 수컷 참조기의 생식주기

Table 10. Reproductive cycle in male small yellow croaker, *L. polyactis*

Stage	2004						2005						
	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
Spermatogonia (Rest)	+	+	+	+/-	+/-	+	+++	+++	+++	++	++	+	+
Spermatogenesis	++	+	+/-						+/-	+	++	+++	++
Maturation	+	++	+++	++	+/-						+/-	+	++
Spermiation	+/-	+	+++	+++	++							+/-	+
Degeneration						++	++						

\* Symbols (from + to +++) indicates the relative abundance of each germ cell type; +/-: present in some individuals, (+): rare.

## 2. 유전학적 분석

### 가. 참조기의 유전학적 확인

어류 및 해양수산동물의 종(species)간의 분류에 있어서 형태학적인 분류와 더불어 종 특이적인 유전자를 확인하는 방법은 유사한 종간의 분류에 있어서 정확한 분류방법이라 생각된다. 참조기에 있어서도 형태 및 생태학적으로 유사한 어종인 부세가 있으므로 이들 종간의 분류에 있어서 형태학적인 차이와 더불어 참조기의 특이적인 유전자를 확인함으로써 종간의 차이를 명백히 제시하는 작업은 매우 유용한 종 분류 및 확인 방법이라 생각된다.

본 연구는 참조기에서 발현이 확인된 16S ribosomal RNA 유전자를 대상으로 참조기를 확인하였다. 참조기 16S ribosomal RNA는 중국의 Meng에 의해 2003년 8월에 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Gene-bank에 보고되었다. 전체 염기서열은 밝혀지지 않은 상태이며, 현재는 일부분인 526개의 염기서열만 밝혀져 있는 상태이다. 참조기와 부세의 알려진 염기서열에 의한 유전적 상동성(homology)은 97%로 526개의 염기중 514개만이 같고 12개의 염기는 서로 다르게 나타난다고 보고되었다. 따라서 본 연구진은 참조기의 DNA를 주형으로 PCR (Polymerase chain reaction)를 시행하여 유전자를 증폭한 후에 제한 효소를 통한 참조기의 확인 및 염기서열분석(Sequencing)을 시행하여 참조기를 확인하였다.

#### (1) Microsatellite DNA 분리

현재 350 여개의 candidate colony로부터 positive plasmid DNA를 추출하여 ABI 3100에서 염기서열을 결정하였으며, 250여개로부터 염기서열을 분석한 결과 90% 이상이 microsatellite DNA임이 확인되었고 350 여개의 후보 microsatellite DNA 염기서열을 토대로 Oligo program에 의해 150 여개의 primer set을 작성하였다. 합성된 oligo에 대해서는 primer의 정보에 따라 45~59℃의 온도구간을 12단계(45, 45.4, 46.1, 47.3, 48.9, 51, 53.3, 56.8, 57.9, 58.7, 59℃)로 나누어 PCR 증폭을 함으로써 적정 annealing 온도를 예상할 수 있는 gradient PCR로 그 증폭여부를 확인하였다. 그림 17은 참조기 MS marke (HdhKA 1과 HdhK 2)의 PCR 증폭여부를 agarose gel로 확인한 것이다. 증폭의 여부가 확인된 일부 primer에 대해 repeat motif와 primer sequence 및 PCR product size를 표 11에 나타내었다.

PCR 증폭조건은 여러 가지 factor에 의해 좌우되므로 우선은 실험방법에 나타난 기존의 참조기 MS marker를 증폭시키는데 사용한 조건으로 1차 스크리닝(screening) 하였다. 증폭이 확인된 primer에 대해서는 임의의 한 집단내 일정수의 개체에 대해 genotyping하여 각 marker loci에 대한 polymorphism 및 allele 수를 조사하였다.

## (2) 유전학적 확인

16S ribosomal RNA 유전자 PCR 수행 결과, 목포산 및 영광산 조지에서 유전자의 발현이 확인되었다. 16S ribosomal RNA 유전자 PCR 산물을 제한효소 HpaII 와 MboII로 절단하여 PCR 산물이 16S ribosomal RNA 유전자인지 혹은 비특이적인 PCR (nonspecific PCR production) 산물인지 확인하였다. 제한효소 절단후 전기영동 확인한 결과 예상되는 size의 산물이 나타남으로서 본 실험의 PCR 산물은 16S ribosomal RNA 유전자임이 확인되었다(그림 18).

## (3) 염기서열 분석에 의한 16S ribosomal RNA 유전자 확인

16S ribosomal RNA 유전자를 PCR 방법을 이용하여 PCR 산물의 예상 size 확인과 제한효소 처리에 의해 참조기임을 확인하였다. 마지막으로 염기서열을 분석함으로써 중국의 Meng (2003)이 보고한 참조기 염기서열과 동일성 여부를 확인하였다. 그 결과 영광에서 포획된 조기와 목포산 조기의 염기서열은 Meng의 결과와 일치하였다. 따라서 본 연구사업에 사용한 조기는 참조기임이 확인되었다(그림 19).



그림 17. MS marker Hdhka 1과 Hdhk 2의 gradient PCR 결과.

Fig. 17. Gradient PCR on the MS marker Hdhka 1 and Hdhk 2.

표 11. MS 표식자의 반복 motif와 시발물질 염기서열 및 PCR 산물 크기

Table 11. Repeat motif, primer sequence and PCR product size with MS marker

locus	repeat motif	mer	5'-Forward	mer	5'-Reverse	product size(bp)
HtkA1	(CA) <sub>7</sub> GG(CA) <sub>3</sub> CC(CA) <sub>3</sub>	21	CAATATTGCTGAGTGTGGTGT	21	CATCGGTGGAACTCAATCTA	262
Htk2	(GT) <sub>51</sub>	18	TATGACGGGGTCTGTAA	21	ATTGTCTTGACTGGAGGGTA	287
Htk3	(TG) <sub>10</sub>	21	GTCACATACCAGCACTGT	20	GTCACACACAGCCCTCA	402
Htk6	(CA) <sub>7</sub> GG(CA) <sub>3</sub>	21	ACACACACAGCATACTGA	18	GCTACTCATCGGTGGAT	244
Htk7	(TGG) <sub>9</sub> (CG) <sub>2</sub> (TG)CG(TG) <sub>2</sub> TC(TG) <sub>30</sub>	19	GCTCAGTATGCTTGTGG	21	ACATACCTCACAAACCGCA	175
Htk8-1	(TG) <sub>27</sub>	21	GCTCTGATGCAATATGGTAG	18	GGCATCAGTCCGGTCTAG	146
Htk12	(TG) <sub>11</sub>	17	AACAAAGGTGGTGTGT	21	TTGCAATTTATGGTCTCA	179
Htk22-1	(TG) <sub>55</sub>	19	CCTCACAGTGCACAC	21	ACTATCCAGTACCACTCC	201
Htk23-1	(TG) <sub>47</sub>	21	GTCAGTGTGACCCCTTACC	17	GGGCAACAGCCCTGATA	253
Htk28	(AC) <sub>20</sub>	21	TAAACAGTAAAGACTACATT	18	CGTTATCCCTTTTCCAT	149
Htk35	(AC) <sub>10</sub>	21	AAGAGGTATGGCGTGAATAA	21	TTCCGAGGATAACTCTCAA	120
Htk36	(GT)G(GT) <sub>25</sub>	21	GGGTGTATCGTTACGATGG	21	GCATGGCAATCTAATAAT	338
Htk37	(GT) <sub>23</sub>	20	GAGGTGAGTGAATAAGGT	21	CTCTGTATTGTCTGTGG	143
Htk38	(GT) <sub>25</sub>	16	TTTTGTACCAATCGG	17	ACGTTGCTGAAACAACA	91
Htk40	(AC) <sub>51</sub>	21	CTGGAGGATTAACAACAC	19	TCCTTACGGAGGCTTCATC	207
Htk41	(TGAG) <sub>2</sub> TG(TGAG) <sub>2</sub>	21	TTCGAATATATACCCGGTG	18	CGTAGTGGCAGTCCCTTA	124
Htk43	(GT) <sub>21</sub>	21	CAGCAACATACAGGATTA	20	ACTGTGCTAAGCAGTGGAGA	182
Htk44	(TG) <sub>34</sub>	21	CTAAACTATCCACCGATGT	21	CATGGAAATGTCATCAGTA	161
Htk45	(TTG) <sub>5</sub>	19	GGGAGTGTCAAGAGT	21	AAGCGTCTCCCTACCTCTAC	260
Htk46	(AC) <sub>10</sub> TC(AC) <sub>8</sub> AT(AC) <sub>3</sub>	21	TGATAGACCGACGTAAACA	19	GGTACGGTCAATGGGAT	226
Htk47	(AC) <sub>64</sub>	21	CCCTCTCGAATAACTCTC	20	GAACCAACACAGCAAC	221
Htk48	(GT) <sub>7</sub> AT(GT) <sub>6</sub>	20	CAGAACTTATACCGATGT	21	TAAACAGTAAAGACTACATT	161
Htk50	(AC) <sub>12</sub>	17	CACGACGATGCACAT	21	GAACCACTCAAGTGTACTA	123
Htk51	(TG) <sub>36</sub>	21	GTCGGTCCACAGATTATA	19	GTAGTCCGCAACAGAGT	124
Htk53-1	(TTG) <sub>5</sub> ~(TTG) <sub>4</sub>	20	GTTGTTGTTGTTGTTGGAC	21	GCACCCATTTGGAGTTGAGAT	132
Htk53-2	(TTG) <sub>5</sub> ~(TTG) <sub>5</sub>	17	GGGACCTGTTGGACA	21	GAACAGTAGCCACATCTCA	279
Htk54	(TAC) <sub>4</sub>	21	TTGATACATGACATCCATC	17	GCATGGAAATCCGGTGT	320
Htk55	(AC) <sub>4</sub> (AT) <sub>2</sub> (AC) <sub>4</sub>	19	ATAGTGTGTTGGCCAGTT	21	GGCCATATAACATGAAATGAA	178
Htk57	(ACCG) <sub>4</sub> (AC) <sub>2</sub> ACCG(AC) <sub>2</sub> ACCG(AC) <sub>3</sub>	16	CAGCCGACACATACG	21	ATCAAAACCGCAGATTACAC	243
Htk58	(GTT) <sub>6</sub>	21	GCATGTGCTCTGAGGTTAT	20	TGTGCAAGAGGTCAGTAC	219
Htk59	(AAC) <sub>8</sub> AT(AAC) <sub>3</sub>	18	GGCCCTGCTTTGTTTCT	21	ATTTGGGATCAAGTGTGACA	250
Htk61	(TG) <sub>35</sub>	20	AGCTGGACATCAACACTA	21	AGTTATCAAGGCATTCAGA	214
Htk64	(AC) <sub>8</sub>	21	TGATCTGTGTAATCCCTTTC	21	TTTTCATGTCCTCCCTGAT	249
Htk71-1	(TC) <sub>6</sub> TCCG(TG) <sub>9</sub>	19	AGCATTCACAGAGTGT	21	TCATTTGCAAGTTTGATGA	134
Htk71-2	(TC) <sub>6</sub> TCCG(TG) <sub>10</sub>	17	TCATGGATGCCCTCTCT	21	AATGTCGTGGCCCTCTCAT	99
Htk72	(GT) <sub>22</sub> AT(GT) <sub>7</sub> ATCG(GT) <sub>20</sub> (GT) <sub>13</sub>	21	ATGGGATCCCAATCAAAAT	20	CCCGCTCAGATAACCTTAC	242
Htk73-1	(AAC) <sub>10</sub>	21	TGAGCCGACTTTTGATCA	20	GGATGCAAGTGTGACATTC	184
Htk73-2	(AAC) <sub>11</sub>	20	GCAGATGACGAAATTTGGT	21	CGAAAGCAGGTCATATAT	308
Htk76	(TG) <sub>16</sub>	21	CAGACACACGTTTATCG	21	AGCCAGTTCTGTGTACTT	194
Htk82-2	(TG) <sub>56</sub>	20	CTACACCGATGTAACAGG	21	GTTTACACCATATCCCTGAG	239
Htk83	(TG) <sub>3</sub> TATG(TG) <sub>3</sub> ~(TG) <sub>9</sub> ~(TG) <sub>2</sub> ~(TG) <sub>5</sub>	19	GCTGTTGAGTGTGAGT	21	AACATAGATAACCTCTCTCTC	167
Htk84-1	(TG) <sub>22</sub>	21	CACCCGTAATATGACTGATA	20	CATCTCCGAACTATGTTG	164
Htk86-1	(AC) <sub>2</sub> ~(AC) <sub>4</sub> ~(AC) <sub>5</sub>	21	AGTTGTTGACCCCTTCTGTTG	21	GAAACTTCAACCACTACTG	133
Htk86-2	(AC) <sub>2</sub> ~(AC) <sub>4</sub> ~(AC) <sub>6</sub>	20	GTTGTTGACCCCTTCTGTTG	21	AGCAACACAAACTTACC	120
Htk87	(TC) <sub>7</sub> TCCG(TG) <sub>9</sub> ~(TG) <sub>9</sub>	21	TATTCATCCGGTATATAATC	17	AATGTCGTGGCCCTCTC	103
Htk88	(TG) <sub>3</sub> (TATG) <sub>2</sub> TCCG(TG) <sub>2</sub> ~(TG) <sub>9</sub> ~(TG) <sub>5</sub>	21	TGTGGTATGTGAGGTAAT	20	ATACCCCTCTCCCTCAAC	119
Htk89-1	(AC) <sub>10</sub>	19	ACACGACACTCAACATA	21	CACACAGGCAACACTTAC	100
Htk89-2	(AC) <sub>11</sub>	20	CACACGACACTCAACATA	21	ACTAGTTTTCTTCCCTGCT	170

## 목포      영광

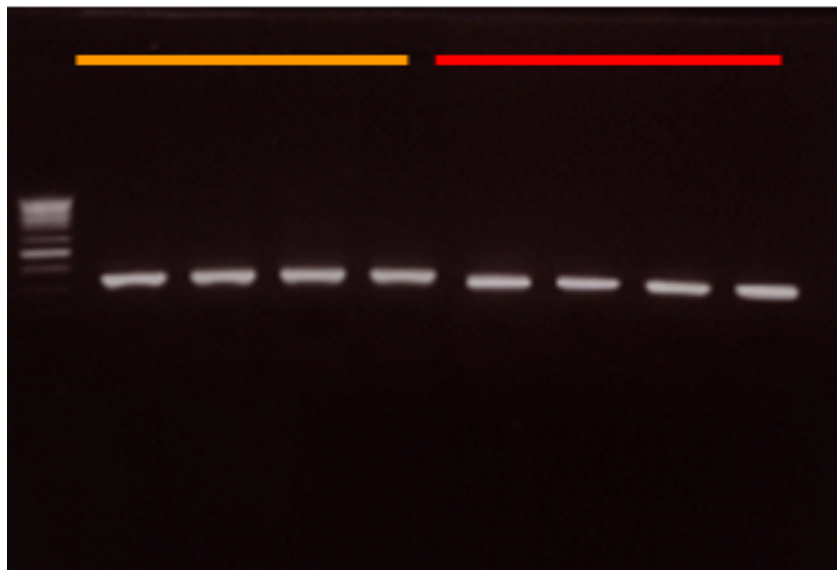


그림 18. 목포산과 영광산 참조기의 16S ribosomal RNA 유전자의 발현.

Fig. 18. Gene expression of 16S ribosomal RNA of small yellow croaker caught from Mok-po and Yeong-gwang, jeollanam-do in korea.



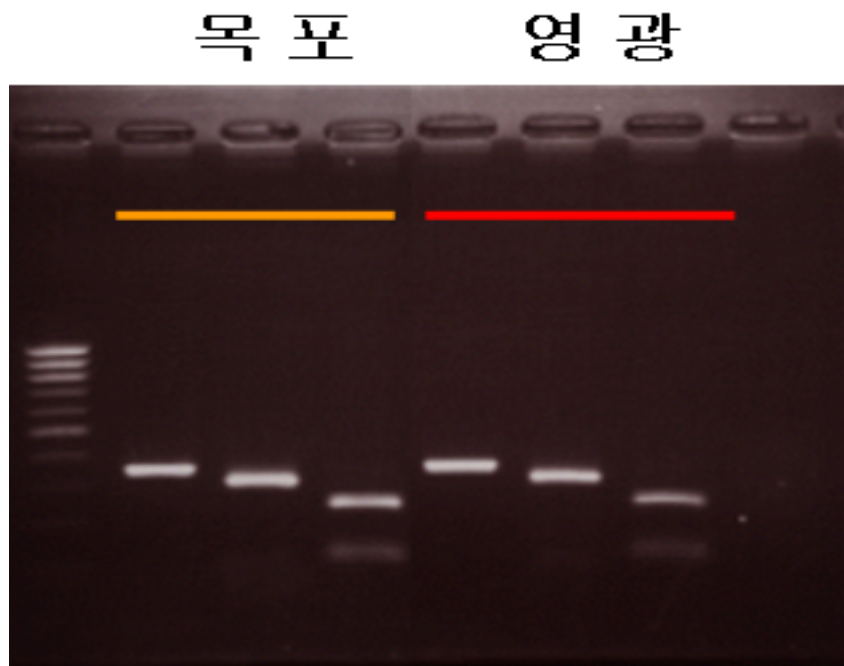


그림 19. 제한효소 절단에 의한 16S ribosomal RNA 유전자의 확인.

Fig. 19. Gene identification of 16S ribosomal RNA cutted by restriction enzyme of small yellow croaker caught from Mok-po and Yeonggwang, jeollanam-do in korea.

```

Query 1 CCTGCCTGCCCTGTGACCATGAGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGC 60
      |
Sbjct 1 CCTGCCTGCCCTGTGACCATGAGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGC 60

Query 61 GCAATCACTTGTCTTTTAAATAAAGACCCGTATGAATGGCAAGACGAGGGCTTAGCTGTC 120
      |
Sbjct 61 GCAATCACTTGTCTTTTAAATAAAGACCCGTATGAATGGCAAGACGAGGGCTTAGCTGTC 120

Query 121 TCCTTTTTTCAGGTCAATGAAATTGATCTTTCCGTGCAGAAAGCGGGAATATCAACATAAGA 180
      |
Sbjct 121 TCCTTTTTTCAGGTCAATGAAATTGATCTTTCCGTGCAGAAAGCGGGAATATTTTCATAAGA 180

Query 181 CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACACCAAGACAGATCACGTCAAAGCCCCCTAATTAA 240
      |
Sbjct 181 CGAGAAGACCCTATGAAGCTTTAGACACCAAGACAGATCACGTCAAAGCCCCCTAATAAA 240

Query 241 GGATTAAC-CTAACTGAGCCCTGTCCTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAACTA 299
      |
Sbjct 241 GGACTAAAACCTAACTGAGCCCTGTCCTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAACTA 300

Query 300 CAAAACCCCGCGTGGAATGAAAGCACCACCCTGCTTTTACAACCTAAGAGCCTCCGCTCT 359
      |
Sbjct 301 CAAAACCCCGCGTGGAACGAAAGCACCACCCTGCTTTTACAACCTAAGAGCCTCTGCTCT 360

Query 360 AATAAACAGAATATCTGACCAACAAGATCCGGCAACGCCGATCAACGAACCCAGTTACCC 419
      |
Sbjct 361 AATAAACAGAATATCTGACCAACAAGATCCGGCAACGCCGATCAACGAACCCAGTTACTC 420

Query 420 TAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCG 479
      |
Sbjct 421 TAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCG 480

Query 480 ATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTTCG 526
      |
Sbjct 481 ATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTTCG 527

```

그림 20. 참조기, *Larimichthys polyactis* (Query)와 부세, *Pseudosciaena crocea* (Sbjct)의 16S Ribosomal RNA 유전자 염기서열 비교 분석.

Fig. 20. Comparison analysis of 16S ribosomal RNA gene sequencing between small yellow croaker, *L. polyactis* (Query) and large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Sbjct).

## 나. 참조기 특이적인 GnRH 유전자의 동정

### (1) GnRH의 역할

시상하부에서 합성, 분비되는 gonadotropin releasing hormone (GnRH)은 일종의 신경호르몬으로서 뇌하수체 전엽에 작용하여 gonadotropin의 합성과 분비를 조절한다(Norris, 1977; Schulz et al., 2001; Weltzien et al., 2004). GnRH는 두개의 gonadotropin의 합성과 분비를 조절하는데, 여포자극호르몬(follicle-stimulating hormone; FSH)인 gonadotropin hormone I (GTH I), 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)인 gonadotropin hormone II(GTH II)이다(Kah et al., 1993; Norris, 1977). 시상하부의 GnRH 신경내분비세포의 활성은 생식소 스테로이드 성호르몬 등 뇌로 피드백한 호르몬에 의한 입력과 중추신경절인 신경전달물질에 의한 입력에 의해서 이중적으로 조절을 받고 있다는 사실이 과학적으로 증명되었다(Barraclough & Wise, 1982).

척추동물에는 적어도 14종의 서로 다른 GnRH isoform이 존재하며(Vickers et al., 2004), 경골어류에서는 8종의 GnRH isoform이 발견되었다(Adams et al., 2003). 척추동물에 존재하는 한 종의 GnRH에는 2개 혹은 3개의 GnRH형이 존재한다. 첫 번째 GnRH형은 시상하부형 GnRH (hypothalamic GnRH)로서 뇌하수체 성호르몬의 자극에 의한 생식소의 성숙을 조절한다. 두 번째 GnRH형은 chicken GnRH-II(cGnRH-II) 형으로 어류에서 포유류까지 매우 높은 상동성으로 보존되어 있으며, 대부분의 척추동물 중에서 성성숙 및 성적행동 (sexual behavior)을 조절하는 것으로 알려져 있다(Suzuki et al., 1992; Yahalom et al 1999; Millar, 2003). 또한 세 번째 형인 sGnRH는 성성숙과 귀소 행동(homing behavior)에 관여한다고 알려져 있다 (Amano et al., 1997). GnRH 유전자는 아미노산 10개로 이루어진 GnRH 뿐만 아니라 앞부분에 23개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide와 뒷부분에 아미노산 56개의 GnRH-associated-peptide (GAP)를 coding한 부위를 포함하고 있다 (Matsuo et al., 1971; Burgus et al., 1972).

GnRH는 임상적 중요성으로 현재까지 수천 가지의 GnRH analogue들이 합성되었고 생식내분비 및 암세포 치료에 사용되고 있다(Sealfon et al., 1997). 어류양식에 있어서 건강한 종묘를 안정적이고 효율적으로 잘 확보하는 것은 양식에 있어서 중요한 사항이다. 현재 인위적으로 어미 양성부터 종묘생산까지 가능한 어종은 잉어과 어류, 메기, 무지개송어, 넙

치, 참돔, 조피볼락 등에 한정되어 있다. 따라서 어류에서 종묘를 인위적으로 안정되게 확보하기 위해서는 건강한 정자나 난을 얻는 것이 무엇보다 중요한 과제이다. 어류의 난자나 정자가 만들어지는 기작은 기본적으로 사람을 포함한 포유류와 동일하다. 시상하부에서 생식선자극 호르몬 방출호르몬 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)을 분비하여 문맥계를 통해 뇌하수체에 도달하면 뇌하수체 전엽은 생식선자극호르몬(GTH)을 분비하고 혈액을 타고 생식소에 도달한다. GTH는 난소나 정소에서 스테로이드 호르몬의 합성 및 분비를 촉진하여 난자나 정자의 형성 및 성숙을 조절한다.

어류에서는 광이나 수온 등의 환경인자에 생식내분비계가 반응하여 성숙을 개시하거나 산란을 진행하는 특성이 있다. 어류양식에서 종묘생산을 목적으로 어미의 성숙 촉진 또는 배란을 조절하거나 정자 방출을 자극하기 위하여 호르몬을 사용한다. 그러나 호르몬은 소수의 제한된 종에만 효과가 나타나기 때문에 호르몬을 사용하는 경우는 첫째 정상적인 사육조건에서 산란하지 않는 어종 둘째 자연 산란이 가능한 어종이지만 산란기 이외의 시기에 종묘를 생산하고자 할 경우에 주로 사용되었기에 지금도 여전히 호르몬의 작용과 적용에 대한 기초적인 연구는 충분하지 않은 실정이다.

어류의 배란 유도에는 포유류 기원의 GTH인 LH와 HCG는 효과가 낮은 것으로 알려져 있으며, 어류의 GTH를 사용하는 것이 효과적인 것으로 보인다. 어류의 GTH는 난소에 직접 작용하여 배란 및 난황형성에 효과적이거나 일반적으로 성성숙의 유도에는 비교적 장시간이 필요하므로 GTH의 반복 투여는 다른 내분비계의 변동을 초래하여 대상어의 생리적 상태를 손상시킬 수 있는 문제점이 있다. 또한 단백질성 호르몬이기 때문에 유전자 구조에 따른 종 특이성이 있으므로 동일한 어종 및 근연종의 것을 사용하여야 한다.

GnRH는 종 특이성이 낮고 투여한 어류 자체의 GTH를 방출시켜 성숙, 배란을 유도하기 때문에 모든 어종에 대하여 성숙유도 효과를 기대할 수 있다. 그러나 어종에 따라서는 성숙 및 배란을 유도하지 못하는 경우도 있는데 아마도 유전자 구조가 다르기 때문으로 추측된다.

전 세계적으로 참조기는 인공적으로 산란을 유도하여 종묘를 확보하지 못하였으나, 본 연구진에 의해 종묘생산이 가능하게 되었다. 그러나 산란기가 아닌 시기에도 종묘를 생산

하기 위해서는 성숙을 유도할 수 있는 참조기의 특이적인 호르몬을 개발하여야 한다. 따라서 참조기가 가지고 있는 특이적인 GnRH 펩타이드 호르몬을 개발하여 난자나 정자의 형성 및 성숙을 인위적으로 조절할 필요가 있다고 사료되어 GnRH 유전자를 동정하였다.

표 12. 척추동물에서 발견된 GnRH의 종류 및 분류

Table 12. Classification and kind of GnRH in vertebrate

뇌에서의 분포		GnRH 아미노산 서열	종(species)
GnRH-1	시상하부	mGnRH: Q-H-W-S-Y-G-L-R-P-G	척추동물(어류 제외)
		cGnRH-I: Q-H-W-S-Y-G-L-Q-P-G	닭
		TrpGnRH: Q-H-W-S-Y-G-L-W-P-G	북방산 개구리
		sbGnRH: Q-H-W-S-Y-G-L-S-P-G	대부분의 어류
		hGnRH-I: Q-H-W-S-H-G-L-S-P-G	청어
		dfGnRH: Q-H-W-S-H-G-W-L-P-G	돔발상어
		cfGnRH: Q-H-W-S-H-G-L-N-P-G	메기
GnRH-2	중 뇌	cGnRH-II: Q-H-W-S-H-G-W-Y-P-G	모든 척추동물
GnRH-3	중 뇌	sGnRH: Q-H-W-S-Y-G-W-L-P-G	어류, 포유류

## (2) 염기서열 비교

본 연구진은 참조기에서 cGnRH-2, sGnRH의 참조기 특이적인 GnRH 유전자를 동정하고자, 참조기와 계통 분류학적으로 가까운 어종에서부터 양서류 포유류에 이르기까지 유전적으로 매우 상동성 있는 부분의 염기서열로부터 primer을 design하여 PCR을 수행한 후 PCR산물을 확인(그림 21, 22)하였고 또한 PCR 산물의 cloning, 염기서열 분석방법을 통하여 참조기 특이적인 GnRH 유전자를 동정하였다.

참조기에서 동정 및 cloning된 2종의 GnRH (sGnRH, cGnRH-2) 유전자 염기서열은 그림 20과 21에 나타내었다. sGnRH 및 cGnRH-2는 어류에서 성성숙 및 성적행동, 귀소본능에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구진의 참조기 특이적인 GnRH 유전자의 동정은 향후 peptide 호르몬의 생산과 더불어 참조기의 인공종묘 생산에 있어서 산란시기 이외의 시기에도 성성숙을 유도하여 종묘를 생산해 낼 수 있는 중요한 결과라고 생각된다.

현재 어류의 인공종묘 생산을 위한 펩타이드 호르몬의 사용은 종에 따른 특이성이 있기 때문에 아직까지 실용적인 기술이 확립되었다고 볼 수 없다. 따라서 참조기에서 동정된 GnRH 유전자는 참조기 인공종묘생산을 위한, 참조기 특이적인 GnRH 펩타이드 호르몬 개발에 중요할 것으로 생각된다. 또한 참조기 인공종묘생산을 위해서는 GnRH 유전자 뿐만 아니라 참조기 특이적인 GnRH 수용체 및 GTH 유전자의 동정도 필요하리라 생각되며, 본 연구진이 참조기를 대상으로 특이적인 GnRH 유전자 동정에 관한 연구는 현재까지 전혀 이루어지지 않고 있기 때문에 학문적으로도 매우 중요하고, 선도적이라 사료된다.

<i>Larimichthys polyactis</i> (참조기)	caacactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Sciaenops ocellatus</i> (민어, Drum)	cagcactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Micropogonias undulatus</i> (Atlantic croaker)	cagcactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Oreochromis niloticus</i> (나일 틸라피아)	cagcactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Rachycentron canadum</i> (날새기)	cagcactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Dicentrarchus labrax</i> (European sea bass)	cagcactggtcctatggatggctaccaggt
<i>Cynoscion nebulos</i> (spotted seatrout)	cagcactggtcctacggatggctaccaggt
<i>Mugil cephalus</i> (송어)	cagcactggtcgtatggatggctaccaggt
<i>Sparus aurata</i> (Sea bream, 도미)	cagcactggtcctacggatggctaccaggt
<i>Verasper moseri</i> (노랑가자미)	cagcactggtcctatggatggcttccaggt

그림 21. 어류 Salmon type GnRH gene의 염기서열 비교.

Fig. 21. Comparison of Salmon type GnRH gene sequencing with fish species.



<i>Larimichthys polyactis</i> (참조기)	cagcactggtcccacggttggtaccccgga
<i>Cynoscion nebulosus</i> (무지개송어)	cagcactggtcccacggttggtaccccgga
<i>Mugil cephalus</i> (송어)	cagcactggtcccacggttggtaccccgga
<i>Sparus aurata</i> (Sea bream, 도미)	cagcactggtcccacggttggtaccccgga
<i>Morone saxatilis</i> (Striped bass)	cagcactggtcccatggttggtaccccgga
<i>Rachycentron canadum</i> (날새기)	cagcactggtcccatggttggtaccccgga
<i>Dicentrarchus labrax</i> (European sea bass)	cagcactggtcccatggttggtaccctgga
<i>Oryzias latipes</i> (송사리)	cagcactggtcccatggttggtaccccgga
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (무지개송어)	cagcactggtcccatggctggtaccctgga
<i>Paralichthys olivaceus</i> (넙치)	cagcactggtcccatggttggtaccggga

그림 22. 어류 Chicken 2 type GnRH gene의 염기서열 비교.

Fig. 22. Comparison of Chicken 2 type GnRH gene sequencing with fish species.

## 다. 유전적 다양성 분석

### (1) Microsatellite 분리

참조기 genomic DNA를 제한효소로 절단하고 이중 200~1000 bp 부분을 gel에서 분리하여 DNA에 linker를 붙인 결과, linker를 붙인 DNA가 gel상에서 linker 크기만큼 약간 증가되어 효율적으로 linker 결합되었음을 확인하였다.

Linker가 붙은 DNA를 linker 중 하나의 primer를 이용하여 증폭된 CA microsatellite DNA를 vector (pTZ-18U)에 삽입한 후, 세균(DH5α)에 형질전환시킨 결과, 약 200개의 colony를 얻었다. 이 중 CA microsatellite가 들어 있는 colony를 선별하기 위하여 biotin-labeled (GT)<sub>10</sub>를 probe로 하여 colony hybridization한 결과, 약 50여개의 양성 colony를 얻었다. 양성 colony의 plasmid를 분리하여 EcoR I과 Pst I의 제한효소로 절단한 결과, 모든 양성 colony에서 200~500 bp의 단편이 포함되어 있었다. CA microsatellite DNA가 들어 있는 양성 colony를 염기서열 분석하여 총 40개 colony들이 microsatellite DNA를 포함하고 있음이 확인되었으며 이 중 총 25개 colony의 염기서열이 완벽하게 결정되었다. 이 중 염기서열이 중복되거나 반전되어 중복되는 경우, 또는 primer를 제작할 수 없도록 반복서열만이 결정된 것들을 제외하고 8개를 최종적으로 선정하였다.

분리된 8개 microsatellite DNA는 polymorphic하였으며, 우리나라 연안에서 수집된 자연산 참조기 30마리 시료를 대상으로 genotyping한 결과, 대립유전자 수는 3~27개였으며, 관찰치(Ho) 및 기대치(He) heterozygosity는 각각 0.45~1.0 및 0.48~0.98이었다(표 13). 8개 loci 모두 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)을 따랐다.

### (2) 유전적 다양성 분석

자연산 어미를 인위적인 사육환경에서 1년간 순치시킨 후 그 어미로부터 생산된 치어 50마리 개체를 이용하여 유전적 다양성을 분석한 결과를 표 14에 나타내었다. 대립유전자 수는 1~24개였으며, 관찰치(Ho) 및 기대치(He) heterozygosity는 각각 0~0.94 및 0~0.89이었다. 종묘생산에 의해 생산된 양식집단의 유전적 다양성을 자연집단에서 조사된 결과와 비교한 결과를 그림 22에 나타내었다.

표 13. 참조기에서 분리된 8개 microsatellites의 특징

Table 13. Specification of 8 microsatellites loci divided from small yellow croaker, *L. polyactis*

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5'→3')	Ta (°C)	Allele No	Allele size range (bp)	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>
LP1	(AC) <sub>20</sub>	F-CAAAAACCAAACTACGACC R-CGTTGAAAACCTCGCTTGTT	58	11	149-175	0.85	0.86
LP2	(AC) <sub>14</sub>	F-ACTTCCAGCCGTTACACA R-TCAGACGCTCTATTTGAG	56	14	131-187	0.88	0.91
LP3	(AC) <sub>17</sub>	F-CAGCAGGTAAAACATGACAC R-GCTGCAGATCAGAAGGAGAT	58	17	90-148	0.94	0.86
LP4	(TG) <sub>20</sub> TC(TG) <sub>7</sub>	F-CTGCTGGTTCTGGATGAG R-CACACTGAGCCGTCACA	55	3	245-263	0.45	0.48
LP5	(CA) <sub>23</sub> (CA) <sub>16</sub>	F-TTGTGGTATGACGAGGTAGG R-GAAAGTGTTGAGGGTTGGTC	58	27	181-281	1.00	0.98
LP6	(AC) <sub>9</sub> AT(AC) <sub>7</sub>	F-AAAGCGTTAAACGTGTTGG R-TGGTAAAGAAGCAGCATCC	58	19	196-252	0.92	0.93
LP7	(AC) <sub>16</sub>	F-ATCAGAGGAACAGACCCATC R-GCAGCAGAACAAAGTCAAAG	60	13	199-259	0.85	0.87
LP8	(AC) <sub>12</sub>	F-GCAGTAGCCAGATCTCCATT R-ACATCAAACAGGTCATAGCG	60	7	157-185	0.65	0.66

표 14. 양식산 참조기의 유전적 다양성

Table 14. Genetic diversity of F1 generation of adult small yellow croaker, *L. polyactis* cultured in the indoor for an year

Locus	Allele No	Allele size range (bp)	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>
LP1	8	149-163	0.79	0.74
LP2	12	131-165	0.80	0.83
LP3	15	92-148	0.77	0.82
LP4	1	225	0.00	0.00
LP5	24	187-279	0.94	0.89
LP6	17	198-248	0.91	0.85
LP7	10	205-241	0.77	0.78
LP8	5	157-175	0.55	0.49

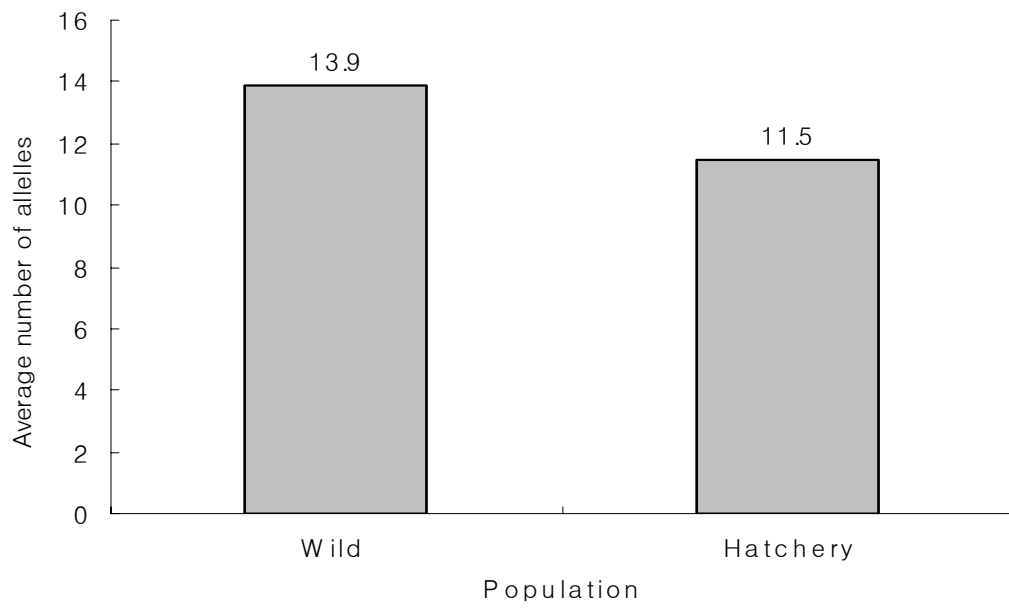


그림 23. 양식집단과 자연집단과의 평균 대립유전자 수

Fig. 23. Mean number of Allele between culture group and wild group of small yellow croaker, *L. polyactis*.

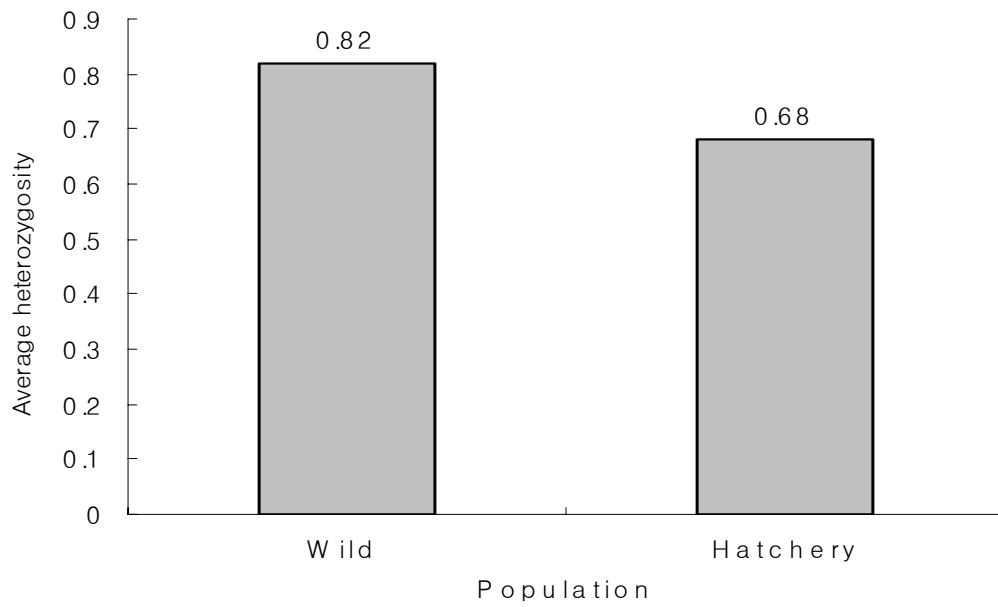


그림 24. 양식집단과 자연집단과의 평균 이형접합을 기대치.

Fig. 24. Mean number of expected heterozygosity between culture group and wild group of small yellow croaker, *L. polyactis*.

평균 대립유전수(allele)는 자연집단이 13.9개인 반면 양식집단은 11.5개로 낮았으며(그림 23), 평균 기대치 이형접합률(heterozygosity) 또한 자연집단이 0.82로 0.68을 보인 양식집단이 낮게 나타났다(그림 24). 양식집단의 대립유전자 빈도를 조사한 결과, 양식집단은 특정 대립유전자에 국한하여 빈도가 높게 나타나는 경향을 보였다. 예를 들면, LP1 유전자좌에서는 157과 159 대립유전자의 빈도가 각각 0.37과 0.33으로 전체의 70%를 차지하였다. LP2 유전자좌에서는 139와 165 대립유전자의 빈도가 각각 0.30과 0.23으로 전체의 50%를 차지하였으며, LP7 유전자좌에서도 동일한 결과로 225와 235 대립유전자의 빈도가 0.33과 0.30으로 전체의 60%를 나타내었다(그림 23).

위에서 나타난 결과에서 보듯이 양식집단이 자연집단에 비해 평균 대립유전자 수와 평균 이형접합률이 아주 낮게 나타났으며, 대립유전자의 빈도에 있어도 특정 대립유전자에만 국한되어 높게 나타나는 결과를 보였다(그림 25).

이러한 결과는 양식집단의 경우 종묘생산에 관여하는 어미의 수가 적기 때문에 유전적 다양성이 낮은 것으로 추정된다. 유전적 다양성의 낮은 원인은 대부분의 경우 낮은 유효 어미수와 근친교배에 의해 야기된다. 향후 참조기 양식을 여러 세대를 거쳤을 경우 유전적 열성화의 원인이 될 수 있으므로 초기 참조기 양식에 있어 어미의 선택이나 집단의 크기를 고려하여야 하며, 또한 계획적이고 과학적인 어미의 선택을 통해 유전적 다양성을 유지할 수 있는 어미의 관리가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

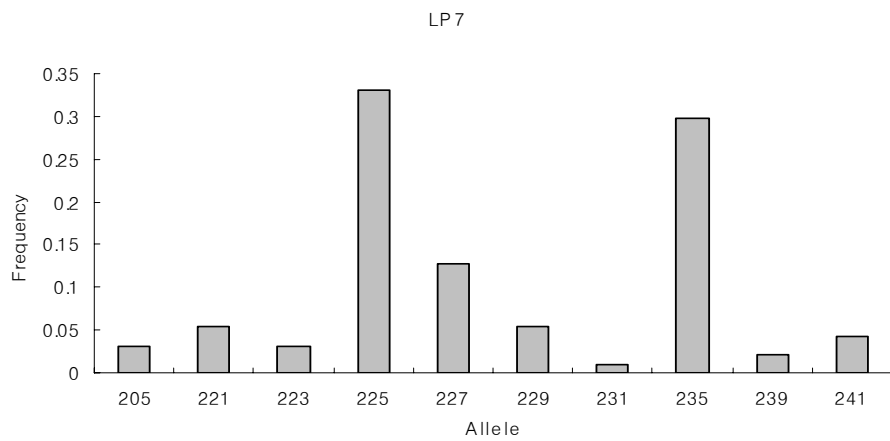
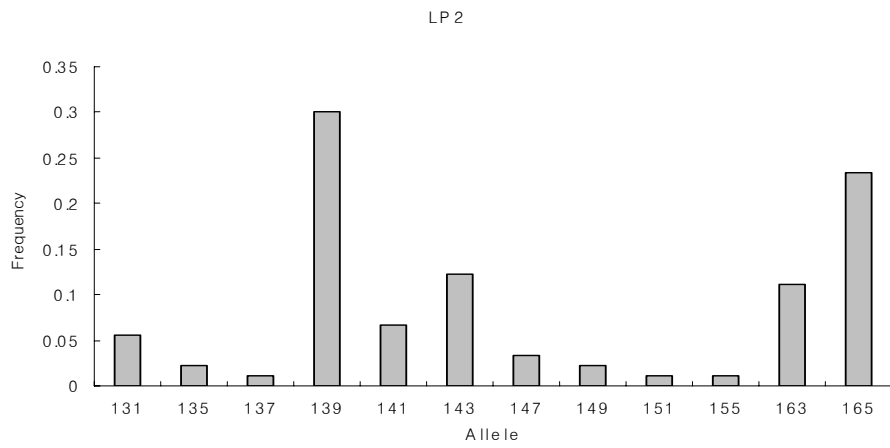
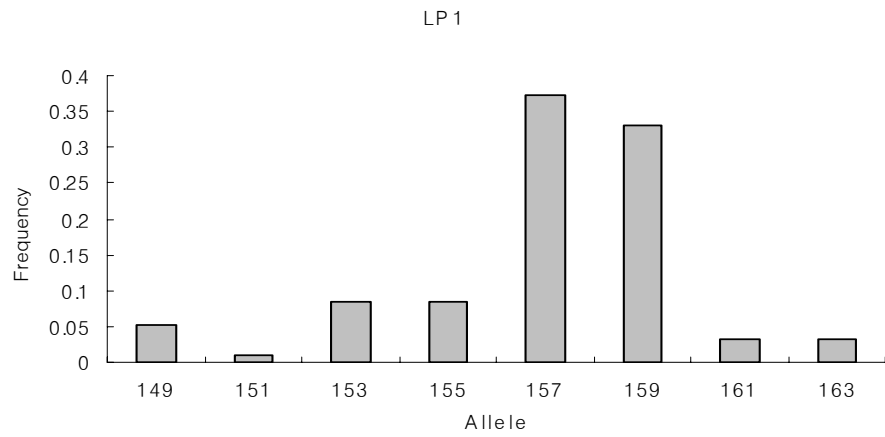


그림 25. 양식집단에서 대립유전자의 빈도.

Fig. 25. Frequency of allele in culture group of small yellow croaker, *L. polyactis*.



### 3. 종묘생산

#### 가. 채포, 수송 및 실내사육지 수용방법 개발

##### (1) 채포어법

참조기 채포어법으로는 이각망, 삼각망, 서해안 개막이 어법을 이용하였으며, 각 어업별 생존율을 비교함으로써 효과적인 채포방법을 선별하였다(표 15). 또한 연구과정중 해수 저수지에서 채포할 수 있는 방법과 기존의 채포방법을 비교할 수 있었다.

채포방법에 따른 비교시험 결과 다른 어법에 비해 개막이 시설을 이용할 경우 채포량도 많아지고, 잡는 기술에 따라 건강하고 양호한 개체를 선별하여 채포 할 수도 있으며, 폐사량도 가장 적었다. 하지만 단점으로는 첫째, 채포현장까지의 거리가 멀고, 둘째, 간만의 조석차에 따라 채포시간이 제한되며, 셋째, 수중채포 작업 거리가 멀며(약 2 km), 넷째, 포획에 필요한 인원이 많아야 된다는 것이다. 상기와 같은 단점은 있었으나 본 연구진이 실시한 살아있는 자연산 참조기 채포를 위해서는 개막이 시설을 이용하는 것이 가장 효율적이었으며, 본격적인 채포가 이루어진 2005년부터 개막이 시설을 이용하여 자연산 참조기 어미개체를 채포하였다.

##### (가) 이각망(二角網)

포획된 어류들에서 참조기만을 선별하는 과정 중에 비늘탈락이 심하고 그물에 의한 상처 발생 ⇒ 55마리를 채포하여 2일 이내 모두 폐사.

##### (나) 삼각망(三角網)

망의 크기가 작아 타 어종과의 마찰로 상처 발생 및 비늘 탈락이 심함 ⇒ 65마리를 채포하여 2일 이내에 모두 폐사(그림 26).

##### (다) 개막이

작업 가능 시간이 짧고 넓은 면적으로 인한 어려움은 있으나 상처없이 채포하는데 가장 양호함.

##### (라) 저수지

축제식 양식장이 번성한 영광지역의 해수를 저장하는 저수지에 배수로를 따라 들어온 참조기 치어는 채포하기는 쉽지만 채포할 수 있는 양이 극히 제한되었음.

표 15. 채포 어법에 따른 생존율 비교

Table 15. Comparison of survival rate on the various catching method of wild small yellow croaker, *L. polyactis*

채포어법	채포마리수	생존마리수	비 고
이각망	55	0	2일 이내 전량폐사
삼각망	65	0	"
개막이	178	33(18.5%)	생존율 높음
해수저수지	8	8(100%)	채포 가능량 극소, 삼각망 이용
계	306	41(13.4%)	



그림 26. 삼각망을 통한 자연산 참조기 포획.

Fig. 26. Wild small yellow croaker, *L. polyactis* captured by the triangular net.

## (2) 수송방법

참조기 채포지역에서 양성지까지 수송방법은 시기별로 달리하였다. 먼저 채포현장에서 활력보전 및 상처없는 안전한 수송을 위해 자체적으로 콤바인을 개조하여 제작하였으며, 보다 적합한 수송방법을 고안하기 위해 다양한 방법(저온 수송, 플라스틱컨테이너 수송, 비닐 산소포장 수송)을 실시하였다. 수온이 높은 시기에는 얼음으로 수온을 낮추어 수송하였으며, 해수 수온이 낮아지면서부터는 채포현장에서 채포 즉시 비닐 산소포장을 하여 스티로폼박스 속에 넣어 수송을 하기도 하였다.

참조기의 채포량이 많을 경우 수송 중 비늘탈락 방지와 스트레스를 최소화하기 위해서는 스티로폼상자 속에서 비닐 산소포장을 하는 것도 어느 정도 효과가 있었지만, 참조기가 대량으로 포획될 경우 채포 개체를 손쉽게 빠르게 수용하고 스트레스 부여시간을 감소시켜 수송할 수 있는 콤바인 자체 운반용 수조(1톤)에 직접 수용하여 운반하는 것이 가장 효율적인 수송방법이었다.

## (3) 채포, 수송 및 수용방법의 표준화

자연산 참조기는 생태학적 특성상 월동장과 산란장을 회유하는 어종으로 연중 어획이 되지 않아 채포하는데 어려움이 많았다. 채포에 따른 어려움은 1) 대기 중 노출시 강한 스트레스를 받으며, 2) 근육조직이 매우 약하여 비늘탈락에 의한 작은 상처에도 폐사되고, 3) 자연 환경조건과 다른 변화된 환경에 대한 적응력이 부족하여 짧은 시간에 대량폐사가 일어나기 때문에 인위적인 사육환경에 순치시키기에 많은 어려움이 있었다. 하지만 본 연구진은 아래와 같이 채포와 관련된 방법들을 개발함으로써 상기 언급한 자연산 어미개체의 확보에 따른 어려움을 해결하였으며, 특히 보다 안전하게 채포하기 위하여 공기 중에 노출시키지 않고 채포하는 수중 채포방법 기술은 기존 채포방법 중 생존율을 높이는데 가장 효과적이었다.

- ① 채포에 적합한 개막이 시설(길이 2.0 km×높이 1.2 m) 및 그물망 크기 개선(가로 1 cm×세로 1 cm)
- ② 콤바인 개조설계에 의한 갯벌 수송용 기구 개발
- ③ 수중 채포방법 개발

#### (가) 갯벌 운반용 개조콤바인

개막이 시설까지 이동수단으로 사용하고 있는 개조 콤바인은 2004년에 사용하던 것을 엔진과 궤도를 교체하고 산소공급 장치 설치, 수용 탱크용량 확대 및 조명시설 등을 보완 또는 개선하여 활용하였다(그림 27).

#### (나) 채포방법

개막이 그물 가까이에 있는 참조기를 뜰채(무결절망)로 포획한 후 수중상태에서 플라스틱 바가지로 해수와 함께 상처나 비늘이 손상되지 않도록 1마리씩 조심스럽게 떠서 20L 플라스틱 용기에 담는다. 용기에는 한번에 3~5마리 정도가 적당하며 수량이 채워지면, 즉시 운반용 개조콤바인에 설치된 1톤 수조에 수용한다. 용존산소는 6.5~7.5 ppm으로 유지시켰으며, 1톤 수조의 수용능력은 200마리 정도가 가장 적당하였다. 250마리 이상이 되면 운반과정에서는 폐사가 없거나 극소량 발생할 수도 있으나 채포된 개체가 전반적으로 스트레스를 받아 최종 사육지에 수용할 경우 폐사량(25~35%)이 높아지는 경향이 있다(그림 30).

#### (다) 운반 및 수송

개조콤바인 수조에서 활어차로 옮겨주는 과정 또한 바가지를 사용하여 해수와 함께 운반한다. 활어차의 수온은 수용할 실내사육지의 수온(24~26℃)과 동일하게 맞추어 주며 수온이 높은 8월은 얼음을 이용하여 수온을 조절하여 준다. 활어차에 수용이 끝나면 항생제(OTC 계열)를 250 ppm 농도로 처리하고 용존산소는 7 ppm으로 유지하여 약육상태로 수송한다(그림 31).

#### (라) 실내사육지 수용

실내 사육지에 수용된 개체들은 채포와 수송 그리고 환경변화에 대한 스트레스로 인해 수면 위 대기 중으로 70° 각도로 머리를 들고 비정상적인 유행형태를 보이게 되며, 스트레스를 받지 않은 개체는 수중에서 정상적으로 유행하게 된다. 보통 24시간이 경과하게 되면 안정을 찾으며 밝은 곳보다는 빛이 약하고 물의 흐름이 약한 곳에서 무리를 지어 조심스레 유행하게 된다. 채포된 참조기 중 약 50~60% 정도가 두부와 윗부분 등 지느러미가 시작되는 부분이 그물에 부딪쳐서 생긴 상처가 남아 있으므로 실내 수용 후에도 2일 동안 항생제를 250 ppm 농도로 약육해야 한다(그림 31).

(마) 실내사육

약 3~4일이 경과하게 되면 무리지어 유명하게 되는데 이시기부터 전체적으로 생사료(선새우)를 구입하여 공급하기 시작하였다. 그리고 활력이 양호하고 적응력이 빠른 일부 개체는 실내사육지에 수용된 후 안정이 되며 섭식현상을 보이기도 하지만, 5일 이후부터 유속을 높이고 1일 3회 새우 생사료를 충분히 공급하여 주면서 완전한 먹이순치 사육을 위해 사육 관리하였다(그림 28, 29).



개조콤바인- I (2003년)



개조콤바인- II (2004년)



개조콤바인- III (2005년)

그림 27. 갯벌 이동 및 수송용 개조콤바인의 개발 및 보완.

Fig. 27. Development and supplementation of reconstruction combine for transportation on the foreshore.



그림 28. 사육순치중인 참조기의 공급 새우.

Fig. 28. Shrimp supplied to wild small yellow croaker, *L. polyactis* culturing at the indoor.





그림 29. 새우를 공급하는 모습.

Fig. 29. Supply shrimps to wild small yellow croaker,  
*L. polyactis* culturing at the indoor tank.



개막이까지 갯벌 상태(5 km)  
Foreshore state (5 km) from land to  
raising the curtain facility



채포 현장(개막이 시설)  
Catching field (raising the curtain  
facility) for small yellow croaker



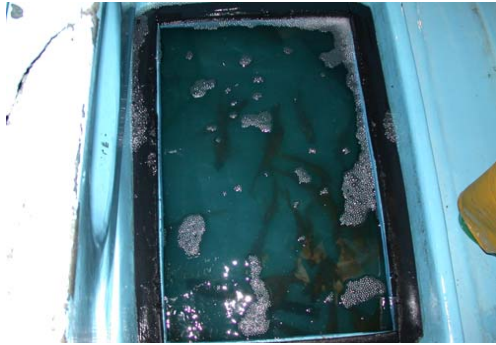
개막이에 갇힌 참조기  
Small Yellow croaker confined at  
raising the curtain facility



야간 채포  
Researcher catching small yellow  
croaker, at night

그림 30. 자연산 참조기의 현장채포

Fig. 30. Catching process of wild small yellow croaker, *L. polyactis*.



채포 참조기 수송  
Transportation of small yellow croaker using the live-fish transport vehicle



실내 사육수조로 이동  
Transport of small yellow croaker to culture tank in indoor



실내 사육수조에 수용된 참조기  
Small yellow croaker accommodated at tank in indoor



참조기의 외형  
Shape of caught a wild small yellow croaker

그림 31. 자연산 참조기의 수송 및 실내사육지 수용

Fig. 31. Transportation and accommodation in indoor with wild small yellow croaker, *L. polyactis*.

## 나. 자연산 참조기 어미 확보와 생존율

### (1) 참조기 채포현장, 수온 및 사육수온

채포기간 중 채포현장 수온과 수송수온 및 사육수온을 표 16에 나타내었다. 채포현장 수온은 17.2~28.5℃였으며, 3차 채포시기인 8.14~22일 사이에 수온이 28.5℃로 가장 높았다. 채포기간 동안 평균 수온은 23.1℃이었다. 채포된 참조기의 수송수온은 평균 21.3℃로 평균 22.6℃인 실내 사육수조와의 수온차이에 대한 수온 스트레스를 최소화하기 위해서 수온차가 3.0℃(0.3~2.8℃)이상 나지 않도록 수온을 유지하며 수송하였다.

### (2) 어미개체 확보 및 생존율

2004년 7월 16일부터 11월 2일까지 65일 동안 채포한 참조기 어미의 채포현황은 표 17과 같다. 채포된 참조기의 평균전장은 18.7 cm, 평균체중은 68.9 g 으로, 총 채포량은 6,142마리였으며, 채포된 개체중 4,982마리(81.1%)가 폐사하였고 최종적으로 1,160마리가 생존하여 18.9%의 생존율을 나타내었다. 채포 기간 중 채포량이 가장 많았던 시기는 9월 12일부터 9월 25일 사이로 총 채포량의 60.3%인 3,703마리였다. 그리고 이 시기에 채포된 개체의 생존율은 24.1%(951마리)로 다른 시기에 비해 가장 높게 나타났다. 채포 기간 중 수온이 17.2℃로 가장 낮은 7차 채포시기(10.25~11. 2일)에는 채포 해역인 칠산어장으로 소상하는 참조기 개체를 발견할 수 없었다. 이것은 참조기의 생태학적 습성을 고려하여 불 때 월동을 위해 소흑산도 남쪽으로 이동한 것으로 추정된다.

표 16. 자연산 참조기 채포현장, 수송 및 사육수온

Table 16. Water temperature of catching field, transport and culture tank with small yellow croaker, *L. polyactis*

채포기간	수온(°C)			
	현장	수송	사육수조	$\Delta t$ (현장-사육)
2004.7.16~7.22	23.5	21.0	21.4	2.5(°C)
2004.7.28~8.6	26.5	21.3	23.7	2.8(°C)
2004.8.14~8.22	28.5	21.4	25.8	2.7(°C)
2004.9.12~9.25	22.7	22.0	23.2	$\Delta 0.5$ (°C)
2004.9.26~10.3	22.6	22.4	22.3	0.3(°C)
2004.10.12~10.19	20.8	19.8	19.1	1.7(°C)
2004.10.25~11.2	17.2	-	-	-

표 17. 자연산 참조기 채포량과 생존율

Table 17. Catch amount and survival rate of wild small yellow croaker, *L. polyactis*

채포기간	채포량 (마리)	평균전장 (cm)	평균체중 (g)	폐사량 (마리)	생존량 (마리)	생존율 (%)
2004.7.16~7.22(1차)	712	15.9	47.1	696	16	0.2
2004.7.28~8.6(2차)	264	18.8	72.7	251	13	0.4
2004.8.14~8.22(3차)	818	17.9	61.2	789	29	0.7
2004.9.12~9.25(4차)	3,703	19.9	76.4	2,782	921	24.1
2004.9.26~10.3(5차)	497	19.5	76.2	407	90	6.3
2004.10.12~10.19(6차)	148	20.1	80.0	57	91	6.5
2004.10.25~11.2(7차)	-	-	-	-	-	-
<b>합 계</b>	<b>6,142</b>	<b>18.7</b>	<b>68.9</b>	<b>4,982</b>	<b>1,160</b>	<b>18.9</b>

## 다. 인공번식 유도

### (1) 성숙유도

채포한 참조기 어미가 정상적으로 성숙하도록 유도하기 위해서 칠산어장에서 생산되는 새우를 구입하여 지속적으로 공급하였다. 이는 배합사료 공급시 성숙도에 장애요인으로 작용할 수도 있을 가능성을 배제하지 않은 안전장치로 수행한 것이며, 이러한 먹이공급 방법으로 2004, 2005년산 채포 어미를 관리한 결과 성장과 성숙에 큰 문제가 발생하지 않았다. 그리고 3일 간격으로 단백질 공급을 위해 전갱이 생사료도 충분히 공급하여 건강 상태를 유지시켜 주었다. 하지만 성숙단계까지 도달하는 개체는 약 40% 정도이며 그림 32와 같이 배가 부른 상태의 완전성숙단계에 이르는 개체는 1~2%에 불과하였으며 자연산란에 이르는 개체는 없었다.

### (2) 자연산란 유도

2004년 12월 9일부터 2005년 4월 10일까지 123일 동안 월동사육에 의한 인위적인 성성숙을 유도하여 2005년 5월 11일부터 6월 7일까지 4회에 걸쳐 표 18에서와 같이 암·수를 구분한 후 GnRH는 0.1 mg/kg/fish, HCG는 500 IU/kg/fish 농도로 주사하여 자연산란을 유도하였다.

표 18. 산란유도에 이용한 호르몬 및 주사 시기

Table 18. Hormone injection for spawning induction of small yellow croaker, *L. polyactis*

Injection day	Sex		Hormone
	female	male	
2005. 5. 11	20	4	GnRH
2005. 5. 24	40	3	GnRH
	91	13	HCG
2005. 5. 27	136	7	GnRH
2005. 6. 7	67	2	HCG





그림 32. 산란유도 개체.

Fig. 32. Spawning state of small yellow croaker by hormone injection.

### (3) 성성숙 유도에 의한 산란

월동사육 시스템에 의해 성성숙이 유도된 5개 어미 사육수조 중 1개 수조에서는 2005년 5월 13일 자연산란이 이루어졌으며, 채집된 산란량은 20 ml, 부상란 5 ml, 수정율은 25%로 매우 저조하였다. 이후 자연산란이 이루어지지 않은 나머지 4개 수조에 수용된 어미는 4회에 걸쳐 호르몬(GnRH, HCG)을 주사하였다. 그 결과, 총 140만개의 산란된 난을 얻을 수 있었다.

## 라. 수정란 부화 사육

### (1) 수정란 부화

3차에 거친 수정란 생산결과는 표 20과 같다. 2005년 5월 13일부터 5월 29일까지 10회에 걸쳐 총 산란량은 140만개였으며, 이들 중 정상적으로 수면위로 부상한 부상란 수는 74만개로 산란량 대비 수정율은 52.3%를 나타내었다. 부상란을 기준으로 부화된 자어는 40만마리로서 부화율이 60.8%를 나타내었다.

### (2) 수정란 관리

산란유도를 위해 호르몬을 주사한 어미로부터 생산된 참조기 수정란은 수중에서 부상(그림 33)하다가 배수관을 통해 유출되어 준비된 수정란 수집그물( $\varnothing 60 \times H 45$  cm, mesh size 700  $\mu$ m)을 이용하여 수정란을 수집하였다. 수집된 수정란은 18톤 콘크리트 원형수조에서 관리하였으며 수용시 수질은 표 19와 같다.

### (3) 난 발생

참조기 수정란은 산소공급과 물의 흐름이 있는 일반 수중에서는 반부상과 완전부상 형태로 존재하는데 이때 부상하는 난은 반부상하는 난에 비해 개체수가 많다. 하지만 물의 흐름이나 산소의 공급이 없이 사육수가 정체된 상태인 경우에는 사란(死卵)은 완전히 침강하며, 정상적인 수정란은 처음에는 부상되는 난과 반부상하는 난으로 분리되지만 약 10~20분이 경과하게 되면 완전 부상하게 된다. 수정된 난은 위란강을 형성하고 수정 10~20분에 배반형성, 1~2시간에 4~8세포기, 2.5~3시간에 상실기, 4~9시간에 포배기, 10~15시간에 낭배기, 16~22시간에 신경배 형성기, 23~32시간에 기관형성기, 35~60시간에 부화자어단계 그리고 122시간 후 난황흡수기로 발달하였다(표 21, 그림 34).

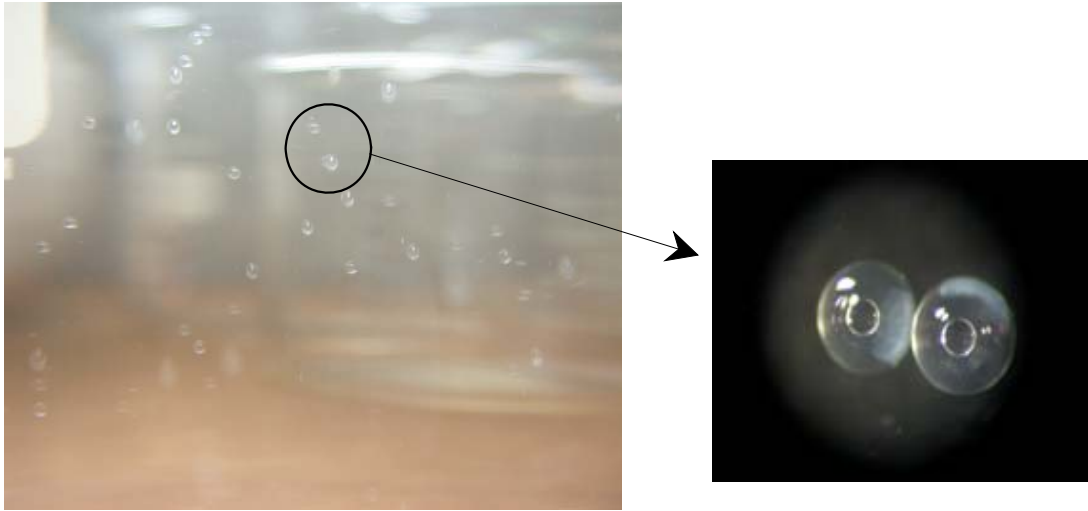


그림 33. 수면으로 부상중인 수정란.

Fig. 33. Fertilized eggs rising to the water surface.

표 19. 수정란 부화 수질환경

Table 19. Hatching condition of fertilized eggs of small yellow croaker,  
*L. polyactis*

WT (°C)	DO (ppm)	pH	Salinity (ppt)	NO <sub>2</sub> -N (ppm)	NH <sub>4</sub> -N (ppm)
19.7±1.2	11.72.8	7.21±1.6	27.4±0.4	0.025 ~ 0.3	0.0 ~ 0.025

표 20. 수정란 생산 및 부화율

Table 20. Production and hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, *L. polyactis*

일 자	부 상 란 (개)	부 화 량 (마리)	부 화 율 (%)	부화자어 (마리)	부화자어 발생률(%)
2005.5.13	200,000	130,000	65.0	130,000	65.0
2005.5.26	230,000	120,000	52.2	100,000	43.5
2005.5.29	310,000	200,000	64.5	170,000	54.8
계/평균	740,000	450,000	60.8	400,000	54.1

표 21. 난 발생과정과 형태 변화

Table 21. Egg development process and morphological change of small yellow croaker, *L. polyactis*

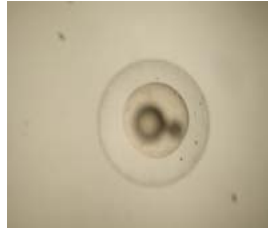
발생시간 (수정 후)	발생 형태 변화	발생단계
수정란	▷ 수정 후 위란강 형성	위란강(Perivitelline space) 형성
10분	▷ 평면 관찰시 유구를 중심으로 배반 형성	배반(Blastodisc) 형성기
20분	▷ 배반 확대 성장	
1~2시간	▷ 동물극에서 난할 시작	4세포기, 8세포기
2.5~3시간	▷ 난할(16, 64-cell phase)	상실기 (Molura stage)
4~9시간	▷ 상실기 초기에서 상실기 말기 ▷ 세포액으로 가득찬 공간에 동물극에서 반구형 세포층 형성	포배기 (Blastula stage)
10~15시간	▷ 함입(invagination)하여 낭배형성 ▷ 3개의 배세포층(내배엽, 중배엽, 외배엽)형성	낭배기 (Gastrula stage)
16~22시간	▷ 신경관 부위의 분화로 뇌와 척수 형성	신경배 형성기
23~32시간	▷ 각 배엽에서 기관 형성 - 외배엽 : 표피, 신경계, 감각기관 - 중배엽 : 중앙부에 척색이 척추로 분화 - 내배엽 : 소화계, 호흡계	기관형성기
35~60시간	▷ 부화 및 성장	부화자어 단계
122시간	▷ 난황완전 흡수	난황흡수기



수정란



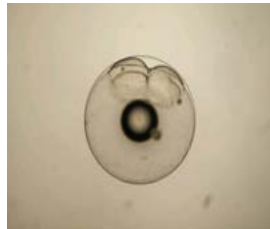
10분



20분



1시간



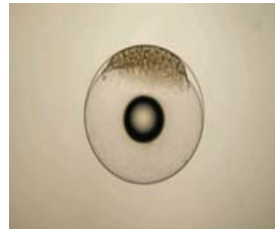
1.5시간



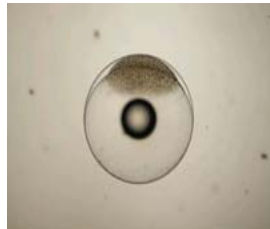
2시간



2.5시간



3시간



4시간



5시간



8시간



9시간



10시간



12시간



14시간



15시간

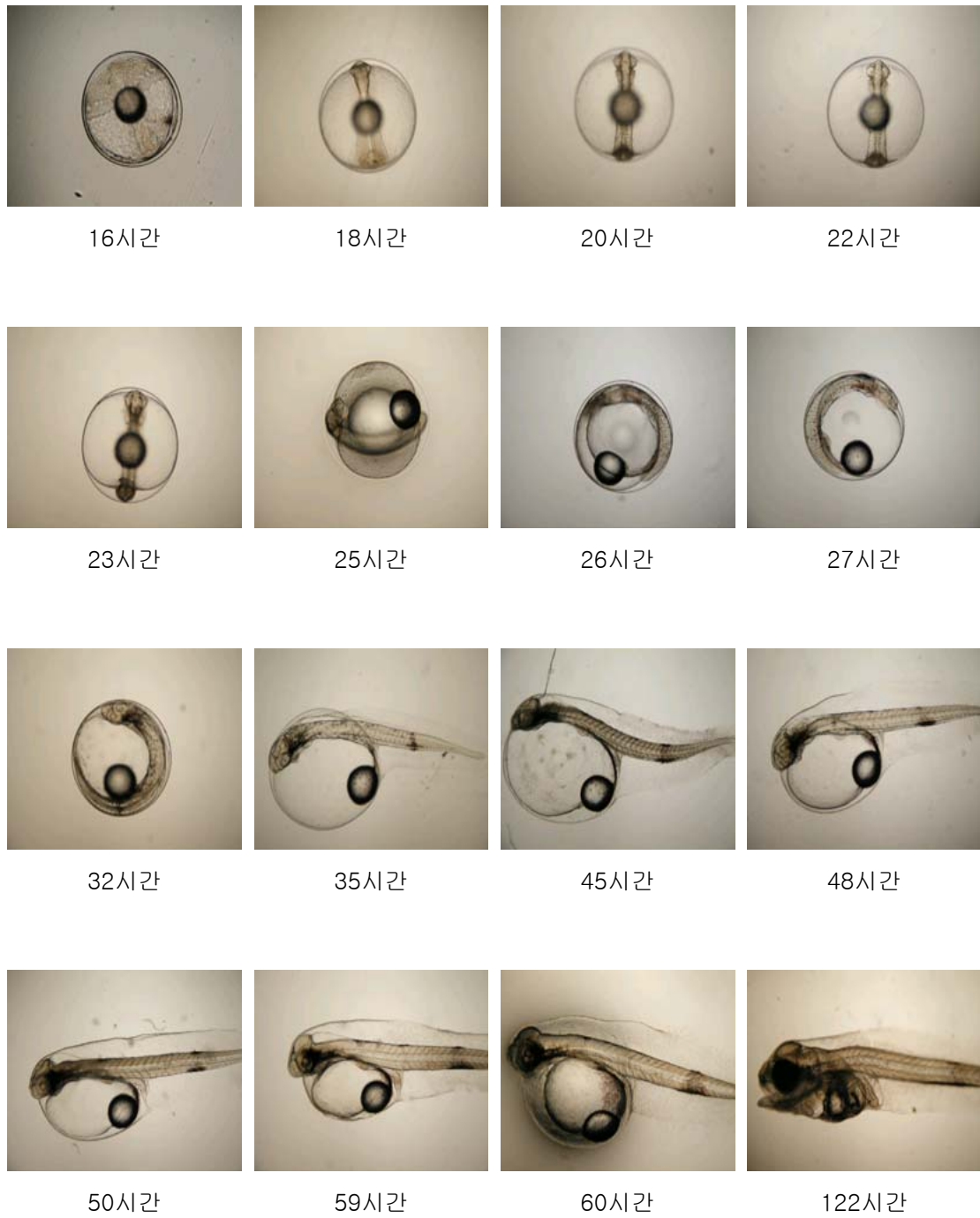


그림 34. 참조기의 난 발생과정.

Fig. 34. Egg development process of small yellow croaker, *L. polyactis*.



#### 마. 자치어 성장

참조기 수정란은 수정 후 122시간 지나면 난황이 완전 흡수되면서 부화자어로서의 모양을 갖추게 되며, 그 후 15일이 경과하면서부터 어류의 외형이 나타나기 시작하며 40~50일이 경과하게 되면 완전한 어류의 형태를 갖추게 된다. 부화자어에서 치어로의 성장발달 형태는 그림 35과 같다.

수정란에서 난막을 깨고 부화된 부화자어의 크기는  $2.32 \pm 0.15$  mm이며 사육 70일 후에는 68.36 mm가 성장하여  $70.68 \pm 0.15$  mm를 나타내었다. 참조기의 전장성장은 그림 37과 같으며, 부화자어에서 치어까지 70일간의 성장 형태를 살펴보면, 성장이 유사하게 증가하는 시기와 성장이 급격히 증가하는 단계로 나누어지는데, 1단계는 부화 1일에서 15일까지의 전장성장은  $2.32$  mm  $\Rightarrow$   $6.39$  mm로 이 시기에 4.07 mm가 성장하였고, 2단계는 20일부터 40일까지로  $10.11$  mm  $\Rightarrow$   $27.27$  mm로 17.16 mm가 성장하였으며, 3단계는 45일에서 70일까지로  $39.15$  mm  $\Rightarrow$   $70.68$  mm로 31.53 mm가 성장하여 성장단계가 높을수록 성장량이 크게 증가하였다(그림 36, 37).

체고(頭部 부분)의 성장은 수정 후 10일에  $1.34 \pm 0.09$  mm로 전장의 57.9%를 차지하고 있었으며, 70일 후  $17.48 \pm 1.16$  mm로 16.13 mm가 증가하였다(그림 38). 이때 전장에 대한 체고의 길이는 24.7%로 감소하였는데 이는 최초 체고의 비율에 비해 33.2%가 감소한 것이다. 그러므로 참조기는 부화 후 체고 즉, 두폭의 비율이 높지만 성장하면서 점차적으로 체고의 비율이 감소하는 경향을 보였다.

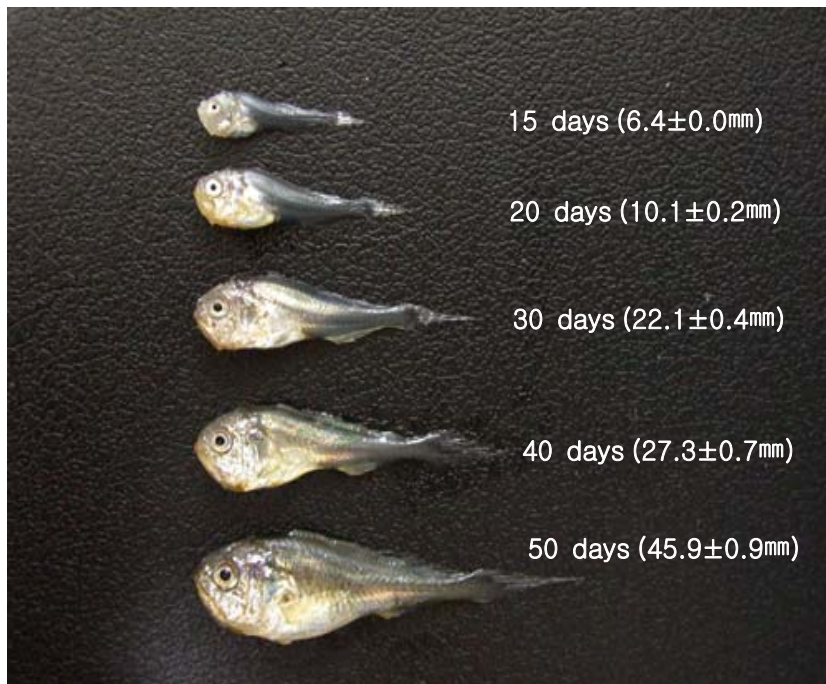


그림 35. 성장에 따른 형태 변화.

Fig. 35. Morphological change on growth of small yellow croaker, *L. polyactis*.



그림 36. 치어(7.0 cm)로 성장한 참조기.

Fig. 36. Juvenile small yellow croaker, *L. polyactis*.

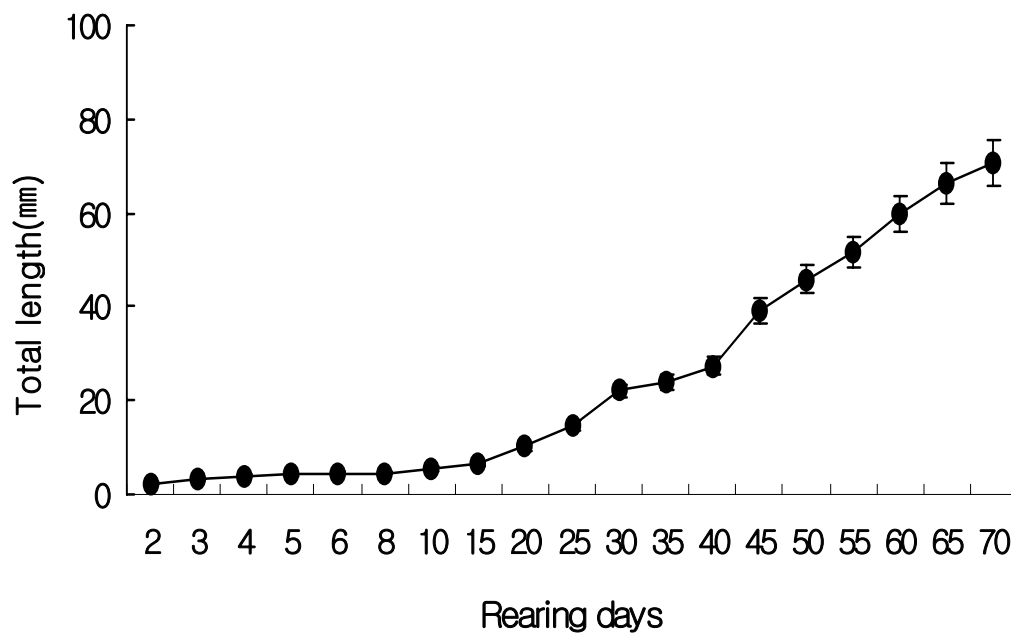


그림 37. 참조기 치어의 길이(전장) 성장.

Fig. 37. Total length growth of the larvae and juvenile of small yellow croaker, *L. polyactis* for 70 days.

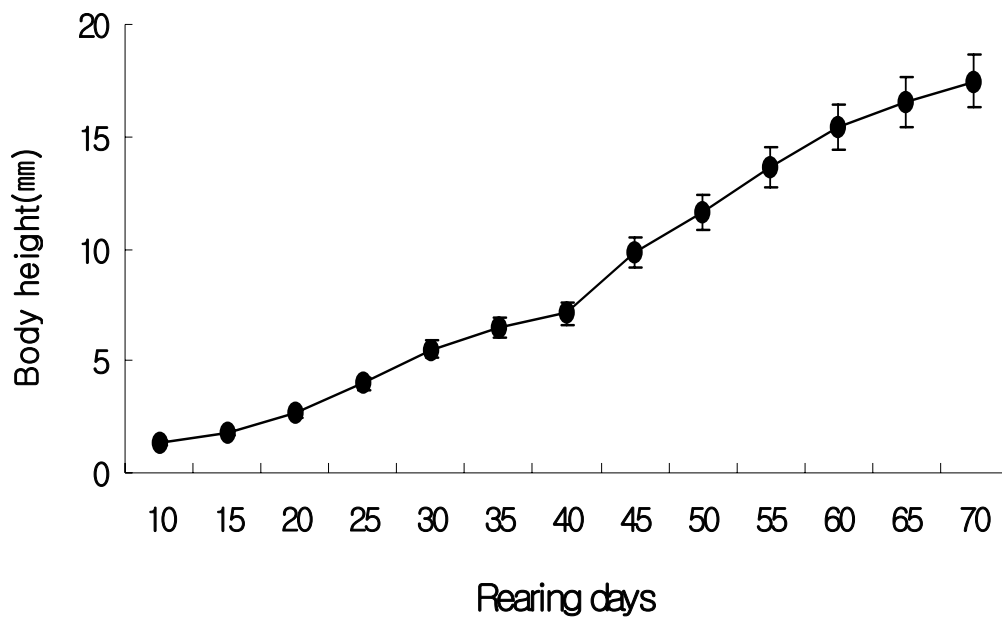


그림 38. 참조기 치어의 체고 변화.

Fig. 38. Body height change of the larvae and juvenile of small yellow croaker, *L. polyactis* for 70 days.

#### 4. 대량 종묘생산 표준화

##### 가. 산란유도 시기 판정

산란유도는 2005년도에 채포하여 실내 사육조건에서 순치시킨 어미(전장  $24.6 \pm 0.12$  cm, 체중  $163.6 \pm 3.31$  g)를 대상으로 실시하였다. '04. 2~'05. 2월 목포(동중국해, 소흑산도), 영광, 강화 등 서해연안을 회유하는 개체를 수집하여 생식소중량지수(GSI)를 조사한 결과 암컷의 경우 5월  $13.45 \pm 0.82\%$ 로 연중 최고값에 달하고 6월에  $5.12 \pm 0.49\%$ 로 크게 감소한 것으로 보아 5~6월을 산란시기로 판정할 수 있었다.

그러나 2003년 채포산 어미 전체와 호르몬을 주사하지 않은 2004년 채포한 시험 그룹에서는 산란시기가 되더라도 산란을 하지 못하였다. 이러한 생리적 비적응 현상을 극복하기 위해 인위적인 산란자극 방법인 성성숙 자극 호르몬을 주사하여 수중에서 산란을 유도하였다. GnRH-a는 뇌하수체의 여포자극호르몬방출호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH) 분비를 자극하며, FSH는 생식소의 발육을 촉진시키고 LH는 특히 암컷의 배란을 유도한다. 두 호르몬에 의해 생식소에서는 스테로이드 호르몬이 분비되면서 정자와 난자가 성숙에 이르게 된다. 그러므로 보다 효과적인 수정란 생산을 위해서는 참조기의 산란 생리적 리듬에 적합한 시기를 파악하는 것이 무엇보다 중요하다고 사료되어, 호르몬 주사 시점을 자연상태의 산란시기와 유사하게 4월 하순에서 6월 초순(4. 28~6. 8일)으로 선정하였다. 호르몬 주사 전후 어미의 생식소 성숙상태는 그림 39~41과 같이 비교하였으며, 주사시기별 산란량 및 수정율을 조사하고 그 결과를 표 22에 나타내었다.

호르몬 주사시기별 산란량과 수정률은 5월 10일 > 5월 20일 > 4월 28일 > 6월 8일 순으로 나타났으며 6월 22일 주사한 경우는 산란이 이루어지지 않았다. 산란량에 대한 수정률의 비율은 5월 10일(42.9%) > 4월 28일(42.6%) > 5월 20일(41.0%) > 6월 8(21.4%)로 4월 28일 산란량은 적었지만 수정률은 5월 10일과 유사한 양을 나타내었다. 그러므로 주사시기는 4월말에서 5월 중순이 적당한 시점이라 여겨지며, 이러한 결과로는 5월 10일 전후가 최적기라 볼 수 있다. 그러나 6월 중순부터는 산란량이 전혀 없어 호르몬에 대한 효과가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 수온에 따라 달라질 수 있으며 수온이 높은 경우 주사시기를 앞 당겨야 할 것으로 판단된다.



그림 39. 주사 전 생식소.

Fig. 39. Gonad state of small yellow croaker before GnRH hormone injection.



그림 40. 주사 후 산란공(♀).

**Fig. 40. Spawning cavity of female small yellow croaker after hormone injection.**





그림 41. 주사 후 생식소.

**Fig. 41. Gonad of female small yellow croaker after hormone injection.**

표 22. 호르몬 주사시기별 산란량과 수정란 생산

Table 22. Production of spawned and fertilized eggs by hormone injection time

Hormone (Conc.)	Injection day	Injection individuals		Spawning day	Spawned eggs (ind.)	Fertilized eggs (ind.)
		female	male			
GnRH-a (0.1mg/kg)	2006. 4. 28	5	1	2006. 5. 1	8,495	3,624
	2006. 5. 10	5	1	2006. 5. 12	15,613	6,713
	2006. 5. 20	5	1	2006. 5. 22	12,491	5,121
	2006. 6. 8	5	1	2006. 6. 11	5,315	1,136
	2006. 6. 22	5	1	-	-	-

## 나. 부화관리 기술

### (1) 수정란 수집

어미사육 수조내에서 산란된 난은 2005년도와 같은 방식인 배수관으로 유출시켜 원형통에 그물망을 사용하여 난을 받은 후 비이커를 사용하여 부상한 수정란을 선별(그림 42)하여 2톤 FRP 원형수조에 옮겨 수용하였다(그림 43).

### (2) 부화조건

수정란 부화를 위한 환경조건은 분당 30 L 사육수를 유수식으로 공급하면서 수정란이 유동하지 않도록 가급적 유속을 최대한 감소시키고 용존산소는 평균 7 ppm 정도를 유지시켜 주었다. 이와 같은 경우 수정란은 18℃에서 48시간 전후로 거의 모든 수정란이 부화되었다. 이후 원형수조에서 부화된 부화자어(그림 44)는 10톤 사육수조로 다시 옮긴 후 본격적인 사육관리를 실시하였다.

### (3) 부화자어 사육환경

2005년도에는 5. 11~6. 30일까지 평균수온이 21.3℃였으나 2006년도 같은 시기 20.1℃로 평균 1.2℃가 낮았다(그림 45). 수정 후 난황흡수기까지 소요기간이 6일로서 전년도와 동일하게 소요되었고, 동물성 먹이를 섭식하는 초기 성장기간에도 먹이를 충분히 공급하여 성장이 오히려 빨라지는 경향을 보인 것으로 보아 자연수온 1~2℃ 차이에 대한 영향은 없는 것으로 판단되었다.



그림 42. 수정란 분리.

Fig. 42. Separation of fertilized eggs of small yellow croaker in the beaker.



그림 43. 사육조에 수용된 수정란.

Fig. 43. Fertilized eggs of small yellow croaker accommodated in the culture tank.



그림 44. 부화자어.

Fig. 44. Larvae of small yellow croaker.

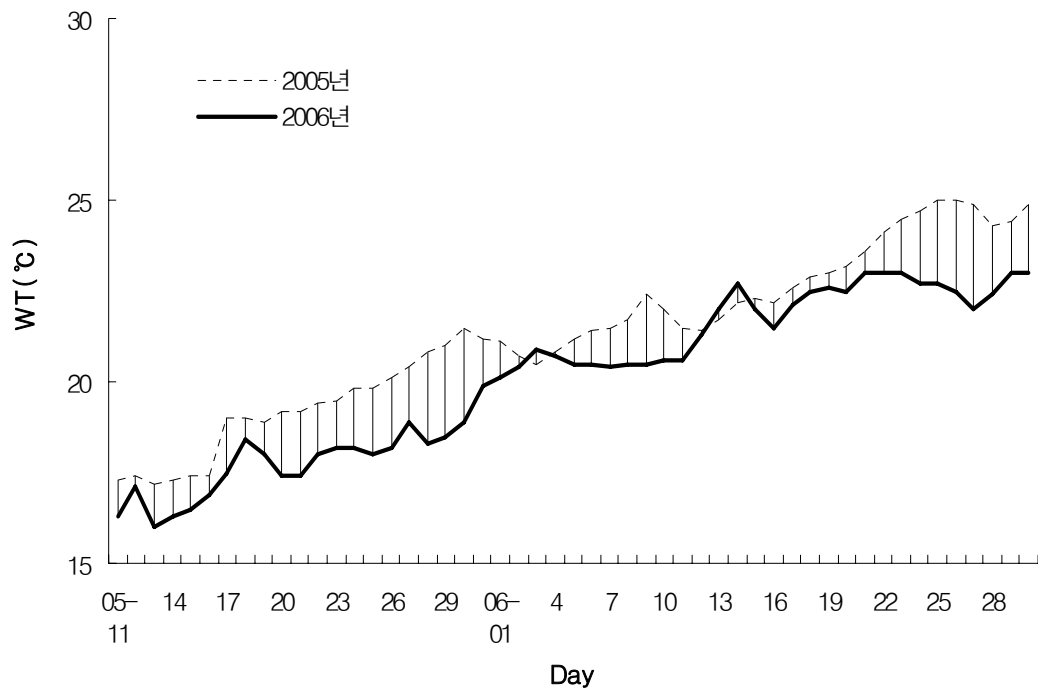


그림 45. 2005년과 2006년 초기사육 기간 동안 수온 변화.

Fig. 45. Change of water temperature for the early days of culture in 2005 and 2006 years.

## 다. 초기먹이 전환 시기 구명

### 먹이공급 방법 및 시기

#### (1) 로티퍼(Rotifer) 영양강화

초기 먹이공급과정에서 로티퍼(그림 46)의 배양이 완벽하지 못한 먹이를 지속적으로 공급하게 되면 영양결핍 현상이 나타날 수 있으므로 영양강화를 시켜서 주는 것이 바람직하다. 로티퍼 영양강화에 사용된 강화제는 해양미세조류를 원료로 한 DHA함유 시판 제품인 마린그로스(일본산)를 사용하였다. 마린그로스 사용량은 로티퍼 1억 개체 당 40 ml를 넣어 최소 6시간 영양강화시킨 후 공급하였으며, 이때 산소를 충분하게 넣어 폭기하여 주었다.

#### (2) 로티퍼 공급

부화 후 1일째부터 사육수에 해산 클로렐라가 약  $5 \times 10^5$  cells/ml 되도록 유지시켜 주었으며, 로티퍼 공급은 부화 후 3일째부터 밀도가 10개체/ml가 되도록 2~3회/일 공급 관리하였다. 부화 후 15일째부터는 로티퍼 밀도를 8개체/ml, 21일째부터는 3~4개체/ml로 27일째까지 공급하여 주었다. 로티퍼는 참조기 부화자의 초기성장과 생존을 그리고 개체간 성장차이를 감소시키는데 있어 매우 중요한 작용을 하기 때문에 공급기간을 다소 연장하여 주었다.

#### (3) 알테미아(Artemia) 영양강화

알테미아(그림 47)는 영양적으로 매우 낮기 때문에 자치어에 그대로 먹이거나 영양강화가 제대로 이루어지지 않으면 자치어의 성장과 생존율에 많은 문제점이 나타날 수 있다. Artemia 부화는 500 L 원형수조에 1억 개체를 넣고 부화수온  $28 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , 용존산소 12~14 ppm으로 부화시켜 난각을 완전히 분리한 후 영양강화를 시켰다. 영양강화는 마린그로스 100 ml를 넣고 6시간 강화시킨 후 다시 깨끗한 여과해수로 세척하여 주었다.

#### (4) 알테미아 공급

알테미아 공급시 주의할 점은 난각을 철저히 분리해 주어야 하는데 이는 부화 자어가 섭식시 위에서 소화를 못시키기 때문에 결국 항문을 차단하여 폐사를 유발하는 원인



이 된다. 알테미아 공급량과 공급 시기는 부화 후 13일째부터 3~4개체/ml로 30일째까지 공급하였다.

(5) 배합사료 공급

초기 배합사료 공급은 부화 13일째부터 시판중인 넙치 초기배합사료 L1 Type (0.2 mm)을 공급하였으며, 부화 후 17~21일째부터는 L3 Type (0.4 mm), 그 이후부터는 배합사료의 입자 크기를 조절하여 공급하였다. 공급횟수는 초기에는 소량씩 2시간 간격으로 8회/일 공급하였으며, 성장단계별로 공급횟수를 최종적으로 1일 3~5회로 줄이면서 충분한 양의 사료를 공급하였다.



그림 46. 로티퍼.

Fig. 46. Morphology of Rotifer.



그림 47. 알테미아.

Fig. 47. Morphology of Artemia.



그림 48. 먹이섭식 전.

Fig. 48. Before feed feeding.

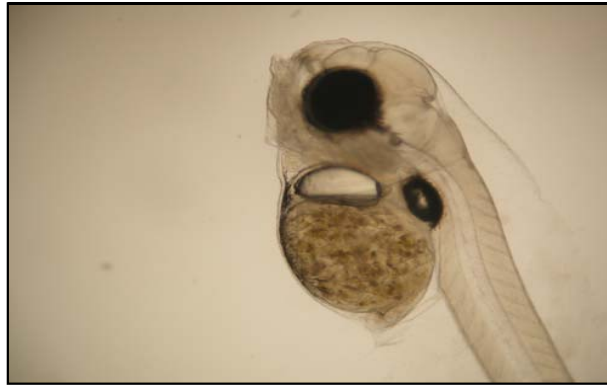


그림 49. 로티퍼 섭식.

Fig. 49. Rotifer feeding.



그림 50. 알테미아 섭식.

Fig. 50. Artemia feeding.

## 5. 양식생물학적 특성

### 가. 수정란 크기

참조기 수정란은 타원형으로 X축의 길이와 Y축의 길이가 서로 다르다. 그러므로 수정란의 크기는 표면적( $A=\pi \times X \times Y/4$ )으로 계산하였다. 참조기의 수정란과 유구의 시간(1, 15, 30시간)에 따른 크기변화를 관찰한 결과, 그림 51과 같다. 수정 1시간 후 수정란의 표면적은  $1.406 \pm 0.09 \text{ mm}^2$  이었고 유구의 표면적은  $0.139 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 이였으며, 수정 15시간 경과시 수정 1시간 후의 크기와 동일하였으며, 수정 30시간 경과 시에는 수정란과 유구의 크기가 각각  $1.351 \pm 0.09 \text{ mm}^2$ 과  $0.157 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 이었다. 수정 30시간 후에는 수정 1시간과 30시간 경과한 것에 비해 수정란 표면적은  $0.055 \text{ mm}^2$  (7.75%)가 감소한 반면 유구의 표면적은 다소 크기의 변화가 있었으나 통계적으로 유의차는 없었다.

### 나. 부화자어의 성장에 따른 변화

난막(egg's membrane)을 깨고 부화한 자어는 전장이  $2.34 \pm 0.15 \text{ mm}$ 로서 난황 표면적은  $1.33 \pm 0.09 \text{ mm}^2$ , 유구 표면적은  $0.15 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 를 가지고 있다. 시간이 지나면서 즉, 부화자어의 성장과 반비례하여 난황의 크기는 점차 줄어들었다. 유구크기는 수정 후 5일 동안에는 크기가 거의 유사하였고 6일째 그 크기가 73.3% 감소하였고, 8일째에는 유구가 완전히 흡수되었다(그림 52).

### 다. 부화율

#### (1) 수온별

수온(22.4, 15, 20, 25, 30℃)에 따른 참조기 수정란의 부화율은 일반 자연수온 시험구인 대조구가 51.1%로 가장 높았으며, 25℃ 시험구가 44.5%, 20℃ 시험구가 37.8%, 15℃ 시험구가 3.5% 순으로 나타났다. 그리고 30℃ 시험구에서는 부화가 전혀 이루어지지 않았다(그림 53).

#### (2) 염분농도별

수정란 부화시 최적 염분농도를 조사하기 위해 5, 10, 20, 30 ppt 시험구와 대조구로서 자연 염분농도인 27 ppt 시험구로 나누어 부화율을 측정한 결과, 30 ppt 시험구에서 49.7%로

자연 염분농도인 27 ppt 구간(41.5%)에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. 반면 대조구와 30 ppt 구간을 제외한 다른 시험구에서는 수정란이 100% 폐사하여 부화율이 0%로 나타났다 (그림 54). 그러므로 참조기가 부화하는데 필요한 적정한 염분농도는 27 ppt 이상 30 ppt 정도인 것으로 판단되며, 차후 최적 부화 염분농도를 추가적으로 조사하기 위해서는 30 ppt 이상의 염분농도에서 부화율을 조사하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

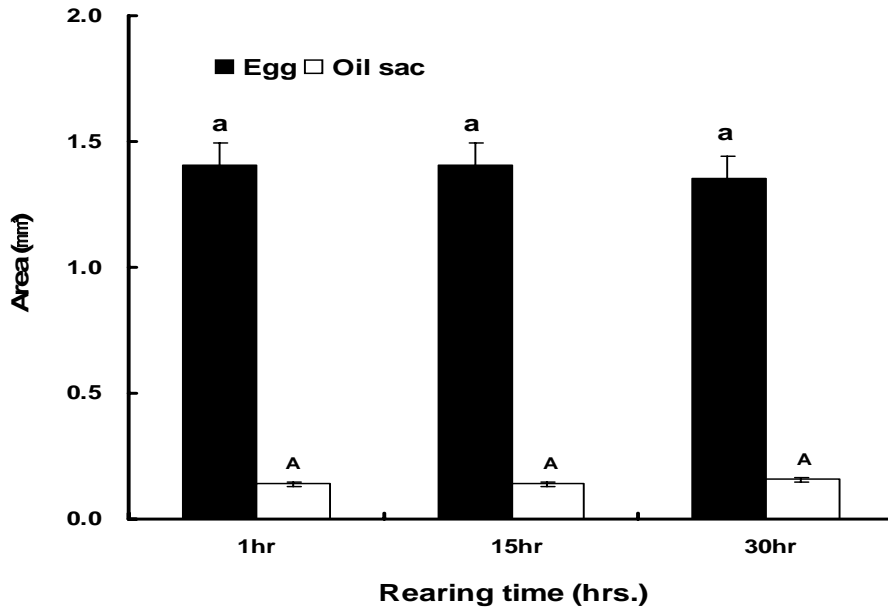


그림 51. 참조기 수정란의 시간별 크기 변화.

Fig. 51. Size change according to elapsed time of fertilized eggs of small yellow croaker, *L. polyactis*.

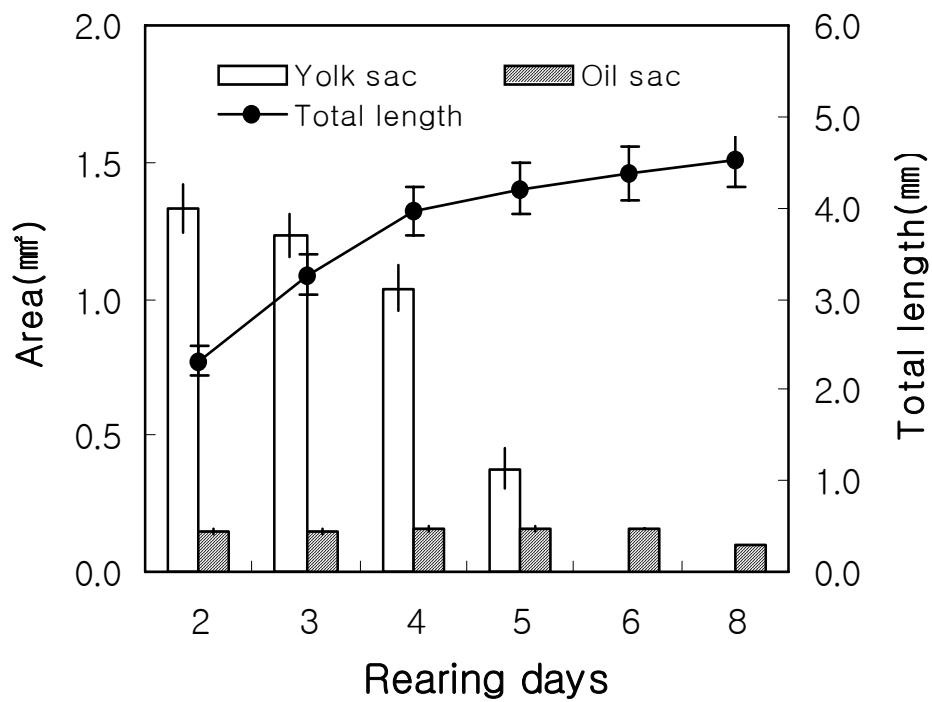


그림 52. 부화자어의 난황 흡수 및 유구 크기와 성장과의 관계.

Fig. 52. Growth relationship between yolk sac absorption and oil sac of hatching larvae of small yellow croaker, *L. polyactis*.

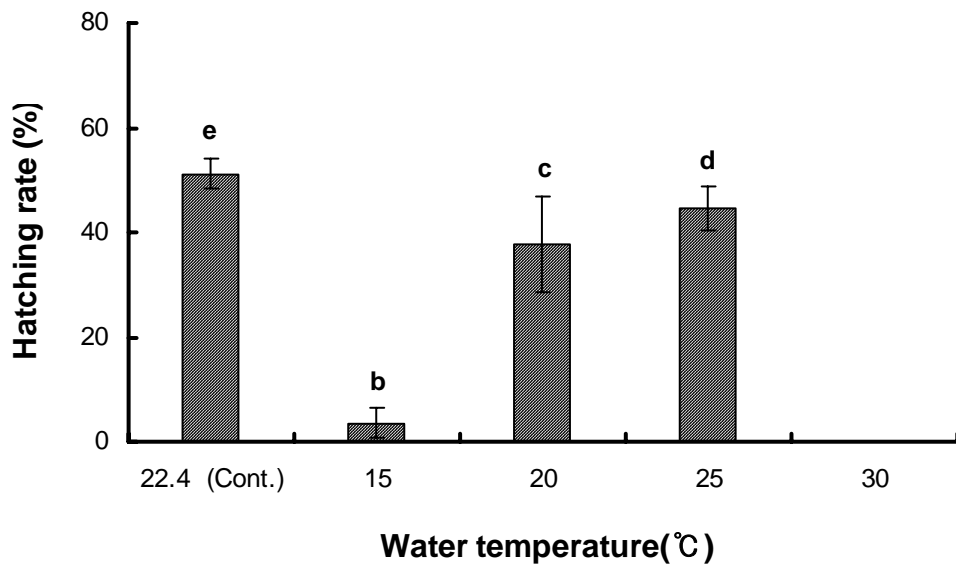


그림 53. 참조기 수정란의 수온별 부화율.

Fig. 53. Hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, *L. polyactis* by various water temperature.



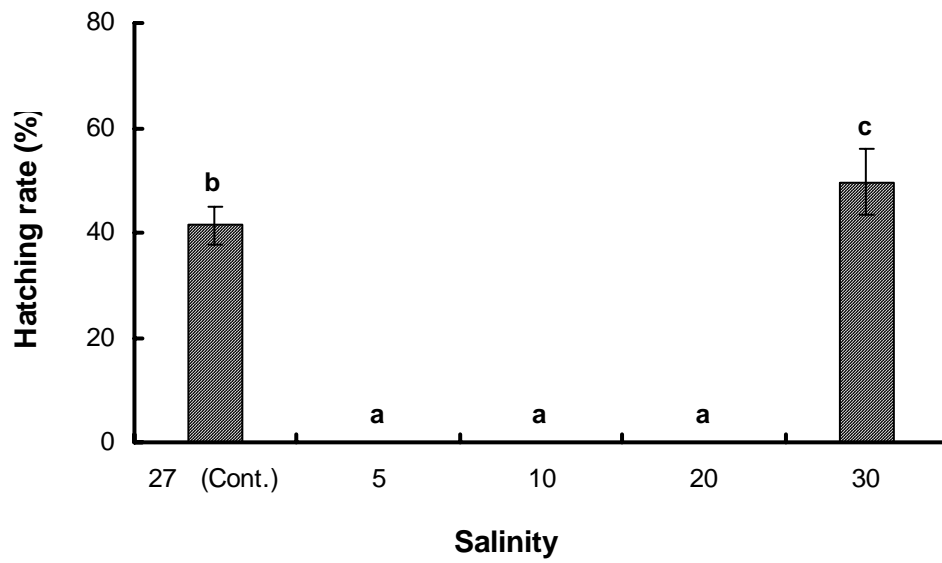


그림 54. 참조기 수정란의 염분농도별 부화율.

Fig. 54. Hatching rate of fertilized eggs of small yellow croaker, *L. polyactis* by various salinity concentration.

## 라. 생존율

### (1) 수온별

수온별 치어의 생존율을 조사하기 위해 130 L HDPE 수조당 전장 22.0 mm의 치어 800마리를 수용하여 10일간 시험구는 3반복으로 실시하였다. 생존율은 자연수온 시험구가  $73.0 \pm 4.2\%$ 로 가장 높았으며,  $25^\circ\text{C}$  시험구  $55.0 \pm 4.2\%$ ,  $20^\circ\text{C}$  시험구  $37.0 \pm 1.4\%$  그리고  $15^\circ\text{C}$ 와  $30^\circ\text{C}$  시험구는  $7.0 \pm 4.2\%$ 로 동일한 생존율을 나타내었다(그림 55).

### (2) 염분농도별

염분농도별 치어의 생존율을 조사하기 위해 전장 25.1 mm의 치어를 각 수조(2 L, beaker)당 10마리를 사용하였고 시험구는 3반복으로 10일간 실시하여 최종 생존율을 조사하였다. 생존율은 염분농도가 낮을수록 높게 나타났다. 5ppt 시험구의 생존율이  $90.0 \pm 10.0\%$ 로 가장 높았고 10ppt 시험구  $50.0 \pm 26.5\%$ , 20ppt 시험구  $40.0 \pm 10.0\%$ , 27ppt(대조구) 시험구  $23.3 \pm 20.8\%$ , 30ppt 시험구  $6.7 \pm 11.5\%$  순으로 나타났다(그림 56).

## 마. 자치어의 적정밀도

평균전장  $20.2 \pm 0.18$  mm (체중 0.07 g)인 치어를 대상으로 10 L 아크릴 수조에 5, 10, 15, 20, 25마리씩을 수용한 5개 시험구를 3반복으로 설정하여 생존율과 성장도를 근거로 적정 사육 밀도를 간접적으로 구명하고자 실험을 실시하였다. 최초 수용 후 7일간 적응기간을 두었고 실험은 60일간 수행한 결과를 제시하였다(그림 57). 실험에 따른 생존율은 5마리 ( $100 \pm 0.0\%$ ) > 25마리 ( $90.7 \pm 6.1\%$ ) > 10마리 ( $83.3 \pm 5.8\%$ )  $\geq$  20마리 ( $83.3 \pm 11.5\%$ ) > 15마리 ( $80.0 \pm 6.7\%$ ) 순으로 나타났으며, 10 L에 25마리를 수용하였을 경우 사육 효율성이 가장 높은 것으로 나타났다.

## 바. 자치어의 초기성장 관계

참조기 부화자어에서 치어까지의 60일간 길이성장과 체고성장의 변화형태는 시기별로 동일한 성장형태를 나타내었으며, 2005년산과 2006년산 개체의 연도별 비교 결과 또한 거의 유사한 성장변화를 보여주었다. 그러므로 참조기는 부화시기부터 60일까지 길이성장과 비례하여 체고가 증가하며 형태학적으로 초기 자치어 시기에는 두부가 상당히 발달한 모양을 가지고 있었다(그림 58, 59).

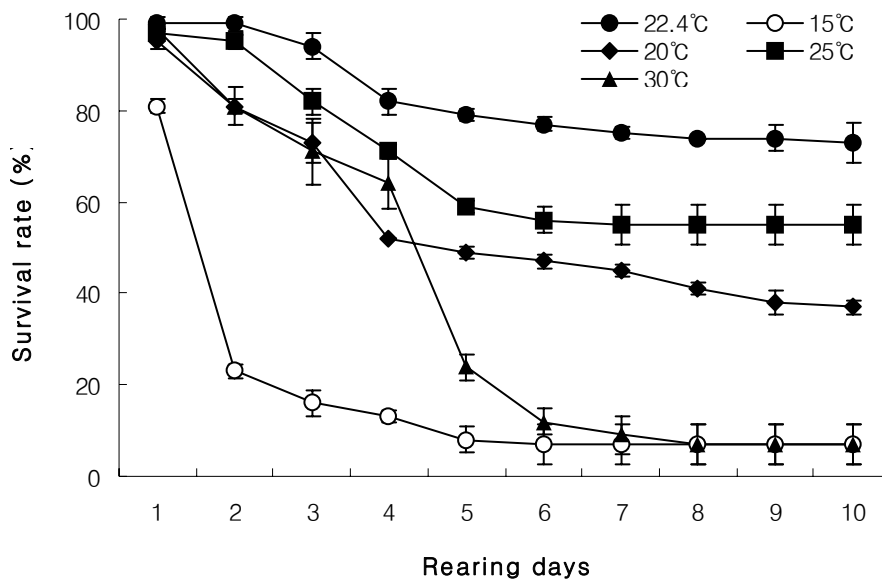


그림 55. 참조기 치어의 수온별 생존율.

Fig. 55. Survival rate of juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* by various water temperature.

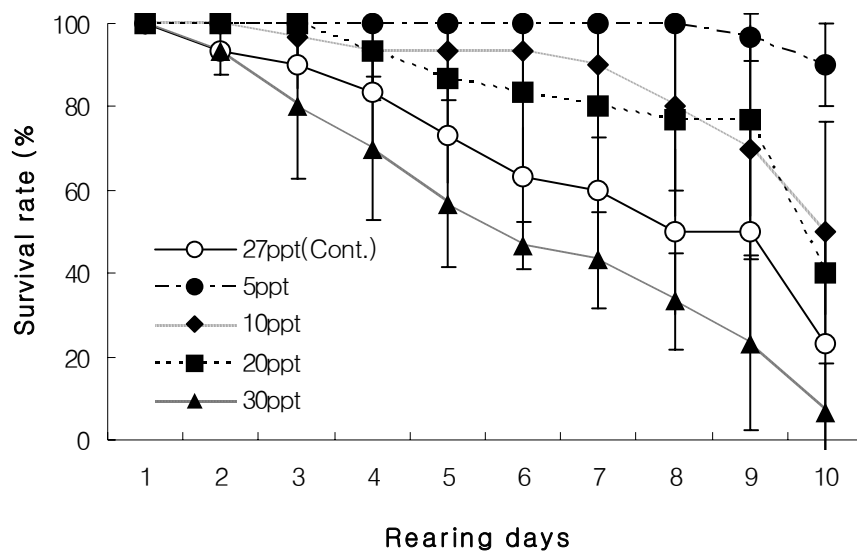


그림 56. 참조기 치어의 염분농도별 생존율.

Fig. 56. Survival rate of juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* by various salinity concentration.

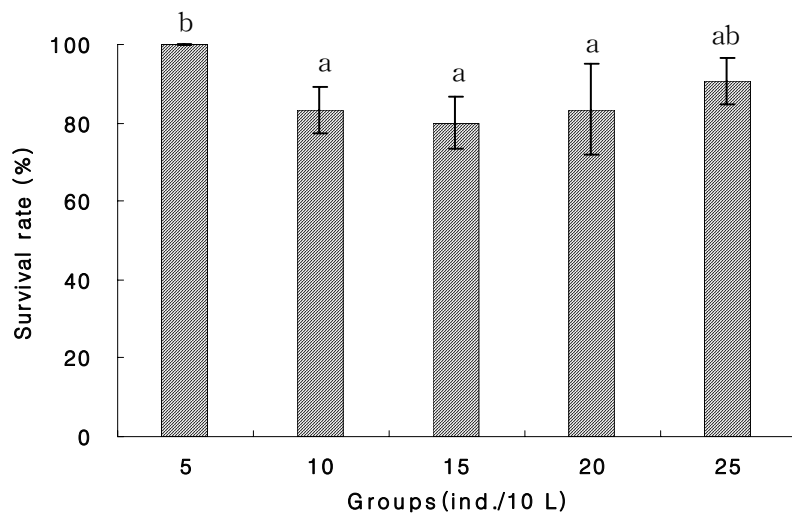


그림 57. 참조기 치어의 사육밀도별 생존율.

Fig. 57. Survival rate of the juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* by various culture density.

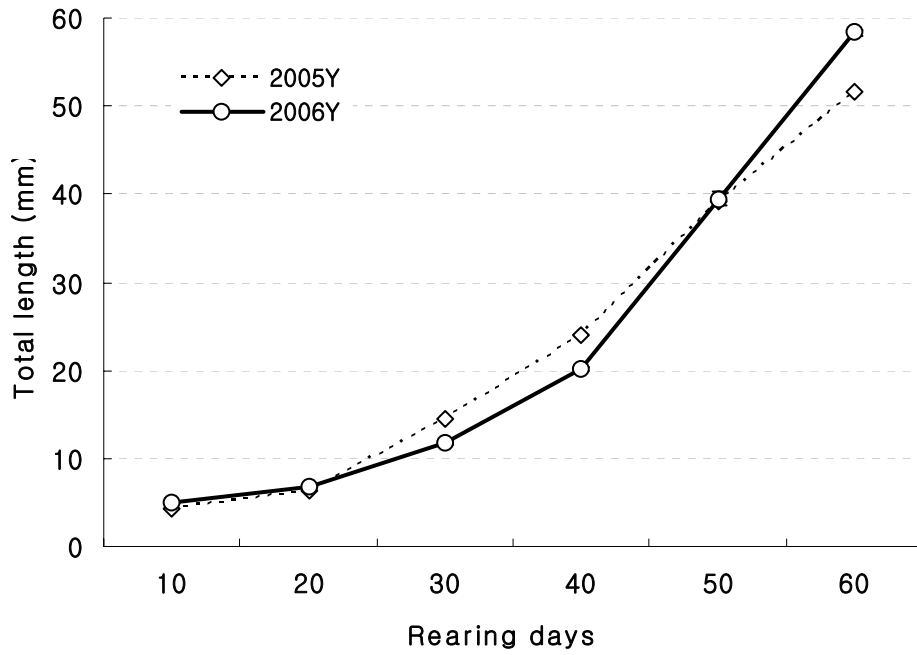


그림 58. 2005년과 2006년산 참조기 종묘의 초기 길이성장.

Fig. 58. Total length comparison between 2005 and 2006 year of the larvae and juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* cultured in tank for 60 days.

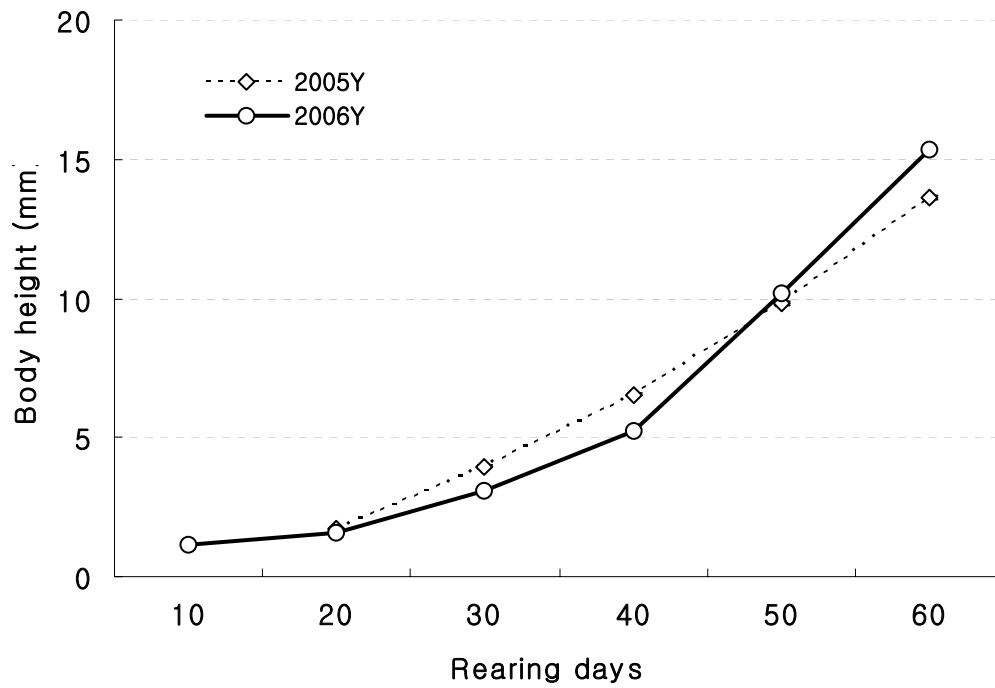


그림 59. 2005년과 2006년산 참조기 종묘의 초기 체고변화.

Fig. 59. Body height comparison between 2005 and 2006 year of the larvae and juvenile of small yellow croaker, *L. polyactis* cultured in tank for 60 days.



그림 60. 참조기 치어 사육.

Fig. 60. Culture of the juvenile small yellow croaker,  
*L. polyactis* in the culture tank.



사. 초기 성장행동 특성

형 태	크 기	행동특성
	5일령 전장: 3.9~4.4 mm	○부화자어는 주로 수면에 분포하며 수평으로 유영 ○주기적으로 수면과 수중(10 cm)을 반복하여 운동 ○활력이 약한 개체는 힘없이 수중으로 깊게 떨어 지다가 수면부상 운동을 반복함
	10일령 전장: 4.6~5.8 mm 체고: 1.1~1.4 mm	○개구(開口) 되었으며 먹이(로티퍼) 섭식능력 소유 ○주로 주변의 먹이만을 인지하여 섭식 ○입벌림 운동을 자주하며 외부자극에 반응함 ○수면과 수중 약 10~20 cm 정도에서 분포 및 유영 ○유영 활력이 5일령에 비해 2~3배 증가
	15일령 전장: 5.6~6.8 mm 체고: 1.5~1.8 mm	○먹이 섭식량 증가 ○활동 및 유영능력이 증가하여 주변의 먹이뿐만 아니라 먹이를 찾아 섭식하는 단계임 ○건강한 개체는 주로 수중(30~40 cm)에 분포
	20일령 전장: 8.2~12.2 mm 체고: 2.2~3.2 mm	○알테미아 섭식력 왕성, 배합사료 섭식 개시 ○주로 수중에 분포하며, 활력이 약한 개체들은 수 면에서 입을림 현상을 반복 ○수면과 수중을 자유로이 이동하며, 물 흐름을 가 르며 수면을 따라 유영하기도 함
	30일령 전장: 16.1~26.3 mm 체고: 4.1~6.5 mm	○전체적으로 배합사료 섭식이 가능하며 수면에서 수중까지 전반에 걸쳐 분포하여 유영 ○사료 탐색능력 소유하며 유영무리 형성 ○소형 및 활력이 약한 개체에 대한 공식현상 심화 ○공식현상은 사료전환 지체, 폐사개체 증가
	40일령 전장: 16.8~32.2 mm 체고: 5.6~8.2 mm	○적극적인 사료 섭식 행동 나타남 ○유속에 반응, 무리형성으로 물 흐름에 역행유영 ○대부분 개체가 다시 수면으로 부상하여 무리유영 ○외부 충격에 민감하게 반응
	50일령 전장: 40.8~50.1 mm 체고: 10.2~13.3 mm	○무리유영 중에도 사료를 섭식하며, 사료가 침강 하면 수중으로 같이 내려가면서 만족할 때까지 사료를 섭식함 ○공식현상이 완전히 사라짐 ○항문으로부터 배설물 분비 현상이 뚜렷함

#### 아. 수온충격 반응 및 생존율

13℃에서 수온을 11, 9, 7, 5, 3℃로 급격하게 저하시킨 후 24시간 동안 수온충격에 대한 반응 및 생존율을 조사한 결과, 11℃와 9℃ 구간에서는 폐사가 없었으나, 5℃와 3℃로 수온을 급감시킨 구간에서 21~22시간만에 시험어 전량이 폐사하였다(표 23, 그림 61).

표 23. 수온 충격에 대한 참조기 치어의 반응 및 폐사

Table 23. Response and mortality rate of the juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* to the low water temperature stress

실험구	반응 형태
대조구 (13℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 적정 월동수온에서 활발한 유영활동</li> </ul>
11℃ (Δ2℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 대조구 개체와 활력 차이 없음</li> </ul>
9℃ (Δ4℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 27' : 수표면에 소량의 점액질 분비현상</li> <li>◦ 대조구에 비해 다소 유영능력이 약해 보임</li> <li>◦ 전복되거나 폐사개체 없음</li> </ul>
7℃ (Δ6℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 12'00" : 1마리 옆으로 저면에서 유영</li> <li>◦ 25' : 수면에 점액성분 부유</li> <li>◦ 1h 44'~7h 12' : 5마리 전복, 불규칙적 유영상태 반복</li> <li>◦ 7h 18' : 1마리 폐사</li> <li>◦ 24h : 3마리 비정상적 유영 나머지 6마리는 정상 유영</li> </ul>
5℃ (Δ8℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 2'24"~2'50" : 동시에 7마리 순간적으로 전복</li> <li>◦ 3'50"~11'00" : 머리를 수면으로 향하거나 전복되어 불규칙한 유영</li> <li>◦ 1h 25' : 전복된 개체 움직임 미약</li> <li>◦ 2h 20' : 1마리 폐사</li> <li>◦ 4h 20' : 3마리 가사 상태</li> <li>◦ 7h 19' : 6마리 폐사</li> <li>◦ 22h 06' : 전량폐사</li> </ul>
3℃ (Δ10℃)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 즉시 유영능력 급감</li> <li>◦ 1'30"/2'30" : 최초 1마리 전복(overthrow)/10마리 모두 전복</li> <li>◦ 3'30" : 9마리 유영능력 상실</li> <li>◦ 22'~31' : 3~6마리 가사상태</li> <li>◦ 1h 39' : 1마리 폐사</li> <li>◦ 2h 33'~18h 32' : 9마리 폐사</li> <li>◦ 21h 06' : 전량폐사</li> </ul>

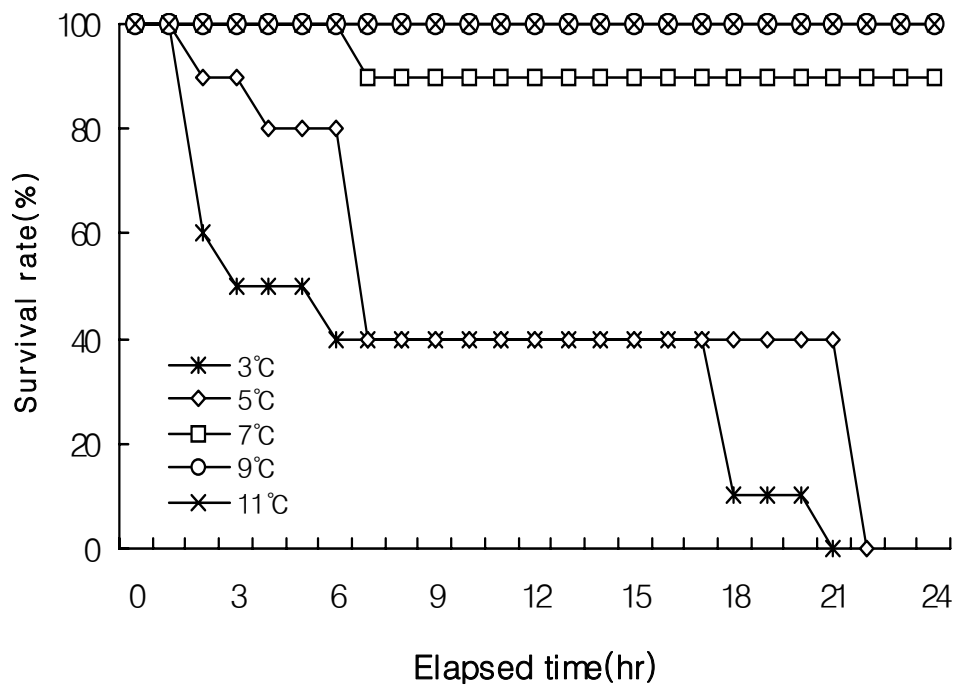


그림 61. 수온별 충격에 대한 참조기 치어의 생존율.

Fig. 61. Survival rate of the juvenile small yellow croaker, *L. polyactis* to the water temperature stress.

## 6. 종묘방류 및 분양

참조기 종묘생산은 2005년도 25만마리, 2006년도 10만마리와 같은 대량 종묘생산 기술개발 성과를 바탕으로 자원회복 및 양식산업화 기반을 조성하기 위해 세계최초로 2005년 8월 2일 전북 부안군 변산면 가력도 지선에 10만마리(전장 7.0 cm)를 방류하였다(표 25).

### 가. 방류 치어 수송

1차 방류용 참조기 치어를 수송하기 위해 미리 얼음을 이용하여 운반용 해수의 수온을 18℃로 맞추어 놓은 후 사각형 스티로폼상자(56×37×25cm)에 두께가 0.5 mm인 비닐(90×51 cm)을 사용하였으며, 비닐봉지당 치어 30~50마리를 수용하고 산소를 충분히 공급하여 밀봉한 후 수송시 수온의 상승을 억제하기 위해 약 500 g 정도의 얼음을 스티로폼상자 구석에 넣어주었다. 2차 방류용 치어는 활어차(1.5ton)를 이용하여 여과된 해수를 사용하였고 얼음으로 수온을 18~19℃로 유지하여 방류장소까지 안전하게 운반하였다.

### 나. 방류

- 일 시 : 2005. 8. 2(화) 11:00~12:00
- 장 소 : 전북 부안군 변산면 가력도 지선
- 방류량 : 참조기 치어 10만마리(전장 7.0 cm)
  - 스티로폼 상자 : 3만마리 / ○ 활어차 : 7만마리
- 참석인원 : 162명(국립수산과학원장 외)

### 다. 분양

양식산업화를 조기에 정착시키기 위해 2005년 11월 22일 통영시 해상가두리, 태안군 축제식, 함평군 육상양식장에 각각 5,000마리(전장 13.0 cm)씩 시험분양하여 모니터링한 결과, 만 1년에 전장 16.0~21.0 cm (평균 18.5 cm)로 성장하였다. 그리고 2006년도에는 국립수산과학원과 부산 해양수산청에 각각 500마리(전장 16.0~18.0 cm)씩 분양하였으며, 우리나라 최초로 외해가두리양식에 대한 효과 및 가능성을 시험연구중인 제주수산연구소에 2006년 7월 22일 당년산 치어 30,000마리(전장 7.0 cm)와 2005년 생산된 1년생 참조기 350마리(전장 18~21 cm)를 분양하였다(표 25).

표 24. 방류해역 수질환경

Table 24. Water temperature condition at releasing waters of juvenile small yellow croaker

WT (°C)	DO (ppm)	pH	Salinity (ppt)	NO <sub>2</sub> -N (ppm)	NH <sub>4</sub> -N (ppm)
25.4	7.12	7.33	27.8	0.05	0.0



그림 62. 참조기 치어 방류행사

Fig. 62. Releasing event for juvenile small yellow croaker.



그림 63. 참조기 특성과 회유경로 설명.

Fig. 63. Explanation of trait and migration route of juvenile small yellow croaker.



그림 64. 참조기 치어 방류-1차(3만마리).

Fig. 64. First-releasing of juvenile small yellow croaker 30 thousand.



그림 65. 참조기 치어 방류-2차(7만마리).

Fig. 65. Second-releasing of juvenile small yellow croaker 70 thousand.



**표 25. 무상분양 현황**

**Table 25. Free distribution of juvenile small yellow croaker**

분양일	양식방법	양식장 위치	분양수량(마리)	크기(cm/g)
2005.11.22	해상가두리식	경남 통영	3,000	14.6/32.3
"	육상수조식	전남 함평	3,000	14.6/32.3
"	축제식	충남 태안	3,000	14.6/32.3
2006. 4. 4	육상수조식	부산해양수산청	500	16.7/50.7
2006. 5.25	육상수조식	국립수산과학원	600	18.0/62.4
2006. 7.22	외해가두리	제주수산연구소	30,000	7.4/3.8

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 기여도	
	착 안 사 항	기여도 (100점 만점)
1차년도		100
	<b>(1) 기초 생태조사 및 번식생물 정보 수집</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생식소의 조직학적 조사를 통한 산란시기 구명</li> <li>○ 서식 어장 및 산란어장 추적 조사</li> <li>○ 월별 포획 개체들의 크기, 성성숙도, 생물학적 최소형 조사</li> </ul>	30
	<b>(2) 자연산 친어 채포방법 및 실내사육</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 치어 채포 어구(서해안 개막이, 각망) 및 채포방법 - 저온마취, 마취제에 따른 생존율 조사</li> <li>○ 운송방법(활어통, 산소포장, 저온처리)생존율 조사</li> <li>○ 최적 사육조건 구명(수온, 먹이 등)</li> </ul>	60
	<b>(3) 참조기 유전학적 분석</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 참조기 microsatellite DNA 분리</li> <li>○ microsatellite DNA primer(시발물질)개발</li> <li>○ 참조기 유전적 다양성 분석</li> </ul>	10

구 분	평가의 착안점 및 기여도	
	착 안 사 항	기여도 (100점 만점)
2차년도		100
	<p><b>(1) 참조기 Broodstock 확립</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 자연산 참조기 채포 및 수송방법 개발</li> <li>○ 자연산 참조기의 실내사육 기술개발</li> </ul> <p><b>(2) 인공배우자 생산 기초기술 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 자연산 참조기의 생식주기 조사 (10) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생물학적 최소형 조사, 월별 크기변화</li> <li>- 최적 산란기, 생식주기 및 생체지수 조사</li> </ul> </li> <li>○ 인공성숙유도 시험 (10) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인공번식유도 기술에 의한 어미의 성성숙 유도</li> <li>- 암·수 어미의 생식소 조직의 변화 조사</li> <li>- 인공배우자 생산 가능성 조사</li> </ul> </li> <li>○ 자연산 채란에 의한 인공수정란 확보 (20) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시기별 자연산 어미의 성숙도 조사</li> <li>- 자연산 성숙어미로부터 인공 채란</li> <li>- 포란수 및 산란 특성 조사</li> </ul> </li> <li>○ 수정란 부화관리 기술개발 (20) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수정율, 부화율, 기형율 조사</li> <li>- 난 발생 과정 조사 및 최적 부화수온 구명</li> </ul> </li> <li>○ 자치어 사육기술개발(초과 실적) (10) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 종묘생산 : 15만마리</li> </ul> </li> <li>○ 인공종묘 10만마리 방류 실시(초과 실적) (10) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전북 부안 가력도 해역</li> </ul> </li> </ul>	

구 분	평가의 착안점 및 기여도	
	착 안 사 항	기여도 (100점 만점)
3차년도		100
	(1) 자연산 참조기 채포 및 실내사육 기술 표준화 ○ 어미개체 채포 및 수송방법 표준화 ○ 실내 적응과 월하 및 월동사육 기술개발	25
	(2) 안정적 인공번식 유도기술 개발 확립 ○ 적정 산란유도 시기 판정 ○ 수정란 부화 및 자치어 사육	40
	(3) 대량 인공종묘 생산기술 개발 확립 ○ 먹이계열 분석 ○ 종묘생산 사육조건 구명 ○ 생물학적 특성 조사	35
	(4) 양식기반 조성(초과 실적) ○ 종묘생산 : 10만마리 ○ 수정란 분양 : 60만개(태안 축제식양식장) ○ 치어 무상분양 : 외해가두리(제주도), 민간양식장	20

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 핵심기술 또는 연구결과

#### 1. 핵심기술

- 가. 자연산 참조기 어미채포 및 수송방법
- 나. 어미 실내순치 사육기술
- 다. 인공번식유도 기술
- 라. 대량 종묘생산 표준화

#### 2. 핵심 연구결과

- 가. 생체지수 및 생식년주기
- 나. 유전학적 정보 확보
  - (1) 16S ribosomal RNA 유전자를 이용한 참조기 확인
  - (2) Microsatellite DNA 분리 및 primer개발
  - (3) GnRH 유전자의 동정
- 다. 초기 발생과정 구명
  - (1) 난경 및 난 발생 과정
  - (2) 부화자어부터 치어까지의 성장도
  - (3) 수온별, 염분농도별 부화율 및 생존율
- 마. 양식생물학적 특성
  - (1) 최적 산란유도 시기 판정
  - (2) 초기 적정 먹이전환 시점
  - (3) 치어의 적정 사육밀도 구명
  - (4) 성장시기별 생태적 행동특성
  - (5) 수온 충격에 대한 반응 및 생존율

## 제 2절 논문발표 실적

### 1. 논문게재 실적

제 목	발표자	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관
자연산 암컷 참조기, <i>Larimichthys polyactis</i> 의 생식년주기	<b>강덕영</b> · 조기채 · 이진호 · 강희웅 · 김효찬 · 김규희	한국 양식학회지	제19권 제3호	2006. 8	한국 양식학회

### 2. 학술회의 발표실적

제 목	발표자	학술회의명	호	발표년월일	발행기관
참조기 생물학적 특성	<b>조기채</b> · 이진호 · 강덕영 · 강희웅 · 이종윤	한국 양식학회		2006. 5.	
자연산 참조기 암컷의 번식 생물학적 특성과 생식연주 기	<b>강덕영</b> · 조기채 · 이진호 · 강희웅 · 김효찬 · 김규희	한국 양식학회		2006. 5.	
참조기 <i>Larimichthys polyactis</i> GnRH 유전자 동정	<b>강한승</b> · 나원흠 · 조기채 · 강덕영 · 이진호 · 강희웅 · 이종윤 · 김문규	한국 양식학회		2006. 5.	

### 제 3절 핵심기술(연구내용) 수준 및 활용유형

핵심기술 (연구내용)	핵심기술(연구내용) 수준					기술(연구결과) 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
성성숙 및 산란유도 기술	○							○		
종묘생산 및 사육기술	○						○	○		

## 제 4절 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술(연구내용)	활용계획(활용시기, 활용방법 등을 요약하여 기재)
양식산업화를 위한 치어분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 민간인 분양</li> <li>- 시기 : 2005. 11.</li> <li>- 육상수조양식, 가두리 양식, 축제식 양식</li> </ul>
양식산업화를 위한 치어분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 외해가두리 양식장 치어분양(제주도)</li> <li>- 시기 : 2006. 7.</li> </ul>
양식산업화를 위한 수정란분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수정란 분양</li> <li>- 시기 : 2006. 5.</li> </ul>



### 제 5절 연구결과의 기술이전 조건

핵심 기술명	산란유도 및 종묘생산 기술		
이전 형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	최저기술료(예정)	천원
이전 방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(                      )		
이전소요기간	3년    개월	실용화예상시기	2008~2009년도
기술이전시 선행조건	종묘생산 시설이 완비된 양식장에 한함		

핵심 기술명	양성 사육기술		
이전 형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	최저기술료(예정)	천원
이전 방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(                      )		
이전소요기간	3년    개월	실용화예상시기	2008~2009년도
기술이전시 선행조건	월하 및 월동 시설구비		

## 제 6절 기대효과

### 1. 정량적 효과

- 예상매출액(1천억원), 수입대체 효과(1만톤)

### 2. 정성적 효과

- 새로운 고소득 양식품종 개발
- 생물학적 과학자료 및 양식기술 종주국으로 국제적 위상 제고
- 국내 양식산 브랜드화로 수산물 안전성과 소비부진 회복
- 대량 종묘생산 기술개발로 자원회복에 기여

## 제 6 장 참고문헌

- Adams B.A., Tello J. A., Erchegeyi J., Warby C., Hong D. J., Akinsanya K. O., Mackie G. O., Vale W., Rivier J. E., Sherwood NM. 2003. Six novel gonadotropin releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, 144: 1907-1919.
- Aida, K., 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms in teleostes. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph*, 16: 173-187.
- Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fujimara, 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1071-1077.
- Allendorf, F. W. and S. R. Phelps, 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109: 537-543
- Amano M, Urano A, Aida K., 1997. Distribution and function of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the teleost brain. *Zool Sci.*, 14: 1-11.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama, 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science*, 62: 727-730.
- Bae, T. M. 1960. The biological study on the Yellow Sea corvenia in the adjacent sea of Korea. *Rept. Res. Fish. Resource*, 4: 1~89.
- Baeck, G. W., J. W. Kim and S.-H. Huh, 2004. Maturation and spawning of striped goby (*Acentrogobius pflaumi*) (Teleostei; Gobiidae) collected in the Gwangyang Bay, Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 37(3): 226-231.
- Baek, H. J. and T. Y. Lee, 1985. Experimental studies on the mechanism of reproductive cycle in the longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus* (HILGENDORF). *J. Kor. Fish. Soc.*, 18(3): 243-252.
- Bagenal, T. B. and E. Braum, 1978. Eggs and early life history. In T. Bagenal(editor), *Methods for assensment of fish production in fresh waters*. IBP(Int. Biol. Programme) Handbook 3, pp.165-201.

- Baik, C. I., K. D. Cho, C. I. Lee and K. H. Choi, Oceanographic conditions of fishing ground of yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) in Korean Waters. J. Kor. Fish. Soc., 37(3): 232-248.
- Barraclough C. A., Wise P. M., 1982. The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. Endocrine Rev., 3: 91-119.
- Beacham, T. D., S. Pollard and K. D. Le., 2000. Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena Rivers in Northern British Columbia. Mar. Biotechnol., 2: 587-600.
- Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R, 1972. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor(LRF)(LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 278-282.
- Chang, Y. J., H. K. Lim and S. K. Byun, 1995. Gonadal maturation and reproductive cycle in oblong rockfish, *Sebastes oblongus*. J. Aquacult., 8: 31-46.
- FAO, 1993. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. FAO Fisheries Report No. 491. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hamilton, M. B., E. L. Pincus, A. Di Fiore and Fleischer R. C., 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. Biotechniques, 27: 500-507.
- Hwang, H. K., C. B. Park, Y. J. Kang, J. H. Lee, S. Rho and Y. D. Lee, 2004. Gonadal development and reproductive cycle of the rabbitfish (*Siganus canaliculatus*). J. Kor. Fish. Soc., 37(5): 393-399.
- Kah O, Anglade I, Leperte E, Dubourg P, de Monbrison, D., 1993. The reproduct brain in fish. Fish Physiol Biochem., 11: 85-98.
- Kakuda, S. and K. Nakai, 1980. On the age and growth of *Nibea albiflora*, Bull. JapanSci. Fish., 46(2): 139-143.
- Kang, D. Y., H. K. Han and C. M. An, 2001. Reproductive cycle of seabass, *Lateolabrax japonicus*, Korean J. Ichthyol. 13(3), 201-209.

- Lam, T.J., 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. (in) W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.) Fish Physiology Vol. IX (B), Academic Press, New York, pp.65-116.
- Lee, C. L. and M. H. Park, 1992. Taxonomic revision of the family Sciaenidae (Pisces, Perciformes) from Korea. Korean J. Ichthyol., 4(1): 29-53.
- Lee, J. S., J. W. Kim, J. C. Kang, Y. K. Shin and P. Chin, 2000. Reproductive cycle and gonadal development of the naked-headed goby, *Favonigobius gymnauchen* (Teleostei : Gobiidae). J. Kor. Fish. Soc., 33(3): 219-224.
- Lee, S.J., Y.B. Go and Y.D. Lee, 2000a. Annual reproductive cycle of the File fish, *Stephanolepis cirrhifer*, on the southern coast of Cheju Island. Korean J. Ichthyol. 12(1): 62-70.
- Lee, S.J., Y.B. Go, Y.D. Lee, J.H. Jung and C.H. Han, 2000b. Annual reproductive cycle of the File fish, *Thamnaconus modestus*, on the southern coast of Cheju Island. Korean J. Ichthyol., 12(1): 71-84.
- Lee, T.Y. and J.-J. Jin, 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets, *Pampus* spp. in the Korea waters 2. Gonadal maturation and spawning. J. Kor. Fish. Soc., 22(5): 266-280.
- Lee, Y.D. and T.Y. Lee, 1987. Studies on the reproductive cycle of damselfish, *Chromis notatus* (Temminck et Schlegel). J. Kor. Fish. Soc., 20(6): 509-519.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV, 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43: 1334-1339.
- Matsuo H, Baba Y, Nair R. M., Arimura A, Schally A. V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43: 1334-1339.
- McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright, 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. Aquaculture, 137: 19-30.
- Millar R. P., 2003. GnRH II and type II GnRH receptors. Trends Endocrinol .Metab., 14: 35-43.
- Myoung, J. G., Y. U. Kim, Y. J. Park, P. K. Kim, J. M. Kim and H. T. Huh, 2004. Embryonic development, larvae and juveniles of the small yellow croaker (*Larimichthys*

- polyactis*) reared in aquarium. J. Kor. Fish. Soc., 37(6): 478-484.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (Eds.), Fish Physiology IXA, Reproduction. Academic Press, London, pp.233-275.
- Nelson, R. J., T. D. Beacham and M. P. Small, 1998. Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Onchyrhynchus merka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. Mol. Mar. Biotechnol., 7: 312-319.
- Norris D. O. (Ed), 1997. Comparative aspects of vertebrate reproduction. In: Vertebrate endocrinology, 3rd ed. San Diego: Academic Press, pp.410-495.
- Park, M. H., I. J. Hwang, D. J. Kim, Y. D. Lee, H. B. Kim and H. J. Baek, 2005. Gonadal development and sex steroid hormone levels of the yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus*. J. Kor. Fish. Soc., 38(5): 309-315.
- Razani, H., I. Hanyu and K. Aida, 1988. Environmental influences on ovarian activity and related hormones in yearling goldfish. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1505-1511.
- Rozen, S. and H. J. Skaletsky, 1998. Primer3. Code available at [http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
- Schulz R. W., Vischer H.F., Cavaco J. E., Santos E. M., Tyler C. R., Goos H. J., Bogerd J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comp. Biochem. Physiol. B., 129: 407-417.
- Sealfon S. C., Weinstein H, Millar R. P., 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. Endocr. Rev. ,18: 180-205.
- Shimizu, A., K. Aida and I. Hanyu, 1994. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in an autumn-spawning bitterling, *Acheilognathus rhombea*, during different phase of its annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol., 93: 137-150.
- Shojima, E. and H. Otaki, 1982. Lunar rhythmic catch fluctuation in the *yellow croaker*, *Pseudosciaena polyactis*. Bull. Fish. Res. Dev. Agency, 28: 147-158.
- Slate, J., T. Marshall and J. Pemberton, 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. Mol. Ecol., 9: 801-808.
- Smith, C. T., B. F. Koop and R. J. Nelson, 1998. Isolation and characterization of coho

- salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.*, 7: 1613-1621.
- Sunnucks. P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE (Trends Eco. Evol.)*, 15: 199-203.
- Suzuki M, Hyodo S, Kobayashi M, Aida K, Urano A., 1992. Characterization and localization of mRNA encoding the salmon-type gonadotrophin releasing hormone precursor of the masu salmon. *J. Mol. Endocrinol.*, 9: 73-82.
- Vickers E. D., Laberge F., Adams B. A., Hara T. J., Sherwood N. M., 2004. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol. Reprod.*, 70 : 1136-1146.
- Wallace, R. A. and K. Selmen, 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zoo.*, 21: 325-343.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weltzien F. A., Andersson E., Andersen O., Shalchian-Tabrizi K., Norberg B., 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comp. Biochem. Physiol. A*. 137 : 447-477.
- Yahalom D., Chen A., Ben-Aroya N, Rahimipour S., Kaganovsky E., Okon E., Fridkin M., Koch Y., 1999. The gonadotropin releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS. Lett.* 463: 289-294.
- Yamada, U., 1974. Postlarvae and Juveniles of little yellow croaker, *Pseudosciaen manchurica* and large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* in the East China Sea *Cont. Seikai Regional Fish. Res. Lab. No. 290: 51-70*(in Japanese).
- Yang, S. G., J. M. Lee, J. H. Lee, K. M. Kim and C. M. An., 1997. Reproductive cycle of red horsehead, *Branchiostegus japonicus*. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 53: 73-79.
- 福所邦彦・岩本 浩, 1980. シオミズツボワムシの大きさの季節変化. *養殖研究*, 1: 20-37.
- 福原 修, 1969. マダイの卵発生と初期における形態の変異についての観察. *水産増殖*, 17(2): 72-76.
- 北島 力, 1978. マダイの採卵の稚魚の量産に関する研究. *長崎縣 水産試験場*, 5: 25-86.
- 會田勝美, 1974. 魚類の成熟と産卵IV成熟と物質代謝. *日本水産學會編, 恒星社厚生閣. pp.88-100.*

- 구자현, 1971. 한국 남해산 보구치의 연령과 성장. 수진연구보고, 7: 67~77.
- 김영규, 2005. 연근해 주요 어업자원의 생태와 어장. 국립수산과학원, pp.284~286.
- 김용익·김인배, 1965. 한국산 어류골격에 관한 연구(I). 민어과 어류의 골격비교. 부산수대 연구보, 6(2): 61~75.
- 명정구·김용익·박용주·김병기·김종만·허형택, 2004. 실내수조에서 사육한 참조기 배발생 및 치어의 형태. 한수지, 37(6): 478-484.
- 박차수, 1981. 한국 서해산 참조기의 성숙과 산란. 수진연구보고, 27: 93-101.
- 양석기·조규대, 1982a. 동지나해. 황해의 참조기 어장분포와 해황의 관계. 한수지, 15(1): 6-34.
- 양석기·조규대, 1982b. 동지나해. 황해의 해황이 강달이 어장의 변동에 미치는 영향. 어업기술, 18(2): 81-89.
- 이영돈·이택열, 1988. 자리돔, *Chromis notatus*의 성성숙에 따른 간세포 및 GTH 세포의 활성 변화. 제주대 해양연보, 12: 73-78.
- 이장욱, 1977. 황해 동지나해산 참조기의 연령과 생산율의 추정. 수진연구보고, 16: 7-31.
- 정문기, 1977. 한국어도보. 일지사, pp.298-299.
- 정문기, 1977. 한국어도보. 일지사. 727p.
- 정상철, 1970. 한국 서해안 참조기의 연령과 성장. 한수지, 3(3): 154-160.
- 정의영·이택열, 1985. 노래미, *Agrammus agrammus* (Temminck et Schlegel)의 생식주기에 관한 연구. 부산수대연보, 25: 26-42.
- 주우일, 1971. 한국 서해안 안강망어업의 대상자원에 대한 연구. 수진연구보고, 7: 79-95.
- 최수하, 1980. 황해 동지나해산 참조기의 연령과 성장. 수진연구보고, 23: 171-178.
- 해양수산부 해양수산통계연보, 2005.
- 황번일·최수하, 1980. 황해 동지나해산 참조기의 연령과 성장. 수진연구보고, 23: 171-178.