

최 종  
연구보고서

# 대하(*Penaeus chinensis*)의 친하 관리와 성 성숙 조절에 의한 수정란 대량확보 기술개발

Mess Production of Fertilized Eggs of Flesh Prawn  
(*Penaeus chinensis*) by Maintaining Broodstock  
and Control of Gonadal Maturation

2000. 12

주관연구기관 : 동 의 대 학 교

해 양 수 산 부



# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “대하의 친하 관리와 성 성숙 조절에 의한 수정란 대량확보 기술개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월

주관연구기관명 : 동의대학교

총괄연구책임자 : 한 창 희

연 구 원 : 김 광 현, 김 병 기

김 명 희, 정 지 현

한 명 숙, 김 위 중

이 재 용, 이 재 훈

협동연구기관명 : 국립수산진흥원 서해수산

연구소

협동연구책임자 : 장 인 권

연 구 원 : 장 계 남, 김 대 중

정 달 상, 최 용 석

한 형 균, 이 권 혁

김 대 현, 임 현 정

이 승 환

# 요 약 문

## I. 제 목

대하(*Penaeus orientalis*)의 친하 관리와 성 성숙 조절에 의한 수정란 대량확보 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 목적

종묘생산용 바이러스 비 감염 모하의 생산과 생식소 성숙 및 산란에 대한 내분비기구를 이용하여 조기 성숙과 산란을 유도할 수 있는 system을 개발하여 건강한 수정란의 대량확보기술을 확립하고, 이를 이용하여 바이러스에 비감염된 건강한 종묘를 생산하여 바이러스에 의한 피해를 최소화함으로써 대하의 생산량을 극대화하는데 목표를 두고 있다.

### 2. 중요성

대하(*Penaeus chinensis*)는 황해 전 해역에 분포하고 있으며, 최대 두흉갑의 크기가 50mm, 체장이 200mm, 무게가 70g에 이르는 대형종으로 우리나라에서는 경제성이 매우 높은 양식 대상 종이다.

우리 나라에서 대하의 양식생산량은 1985년부터 매년 증가하여 1997년에는 1,533톤으로 최대의 생산량을 기록한 후 바이러스에 의한 피해로 1998년에는 998톤을, 1999년에는 1,142톤으로 감소하였다.

최근 중국에서부터 발생한 흰반점바이러스 (WSSV, white spot syndrome virus)에 의한 흰반점증후군(WSSD, white spot syndrome disease)이 아시아 전역으로 확산되면서 우리 나라에서도 1993년 충남과 전

북의 일부 새우 양식장에서 처음 발견되었고 1996년도에는 대하의 생산량이 지역에 따라 50~75%나 감소하는 피해를 입었으며 그 피해는 앞으로 더욱 커질 전망이다.

바이러스 감염과정은 어미새우에서 치하에게 감염되는 수직감염과 환경으로부터 전염되는 수평감염이 있으며, 대하 종묘는 대부분 보균 상태에 있는 자연상태의 성숙한 모하로부터 채란하여 종묘를 생산하고 있기 때문에 우리나라에서 생산되고 있는 대하 종묘는 바이러스의 수직감염으로부터 완전히 노출되어 있는 상태에 있다.

그러나 이 바이러스에 대한 예방이나 치료법은 아직 개발되지 않아 일차적으로 바이러스에 감염되지 않은 건강 종묘를 생산하여 수직감염 차단에 의한 바이러스로부터 피해를 최소화할 필요성을 제시하고 있다.

바이러스에 비감염된 건강한 종묘생산 방안을 마련하기 위해서는 바이러스에 감염되지 않은 건강한 어미새우의 확보방안 마련과 이들을 인위적으로 사육관리하면서 생식소 성숙을 인위적으로 조절하여 건강한 수정란을 대량으로 확보할 수 있는 방법 개발이 무엇보다 중요하다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 친하관리

##### 1-1. 생식주기와 교미율

###### 1) 생식주기

생식년주기는 서해 보령 외연도 부근에서 낭장망으로 채집한 것을 이용하였으며, 채집이 되지 않은 기간은 보령지역에 양성중인 대하를 구입하여 야외 수조에서 수용중인 암컷을 대상으로 생식소숙도지수(gonad somatic index, GSI)를 조사하고 난소조직에 대한 난형성과정과 성숙상태를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 조사하였다.

## 2) 교미율

자연상태와 양성장에서의 교미율 변화와 교미시기를 조사하였으며 이를 위하여 대하새우 양성장으로부터 11월 10일과 22일, 12월 5일에 각각 50마리를 채집하였으며, 자연상태에서는 11월 22일, 12월 3일과 19일에 어획된 것을 구입하여 암컷 교접기 저장냉 내의 정자를 확인하여 교미상태를 확인하여 교미율을 조사하였다.

### 1-2. 친하의 실내 양성

#### 1) 추계 사육관리

친하의 추계 실내양성조건을 조사하기 위해 0.5 Ton 원형수조에 5마리씩 수용하였으며, 수조 4개를 하나의 실험구로 구획한 후 차광막을 장치하여 일장을 9L15D, 12L12D, 15L9D 그리고 자연조건의 4개의 실험구로 나누었다. 8월 25일부터 10월 13일까지 50일간 실험 사육하여 각 일장조건에 따른 생존율과 두흉갑장, 전장, 체중 등을 조사하였다.

#### 2) 동계사육관리

1차로 수온 10℃, 15℃ 그리고 20℃의 3개의 실험구로 나누어 1997년 12월 5일부터 이듬해 2월 3일까지 60일간 사육하여 생존율, 탈피회수를 조사하였으며, 다음해 2차로 수온조건을 8℃, 10℃ 그리고 12℃로 나누어 3개의 실험구를 설정하여 1998년 12월 29일부터 이듬해 2월 29일까지 60일간 사육하여 상기한 생존율, 먹이 섭취율을 조사하였다.

## 2. 생식소 성숙 유도

### 2-1. 생식소 성숙에 대한 수온과 일장의 영향

#### 1) 추계 난소 성숙에 대한 일장의 영향

추계 난소 성숙에 미치는 일장의 조건을 조사하기 위하여 자연수온조

건에서 일장을 9L15D와 15L9D의 두 개의 실험조건을 설정하여 9월 20일부터 11월 20일까지 60일간 사육하여 일장조건에 따른 난소성숙 상태를 조직학적으로 조사하였다.

## 2) 동계 난소성숙에 대한 수온과 일장의 영향

모하로 이용할 수 있는 월동사육 수온과 일장조건을 밝히기 위하여 1차로 12월5일부터 3월 25일까지 수온 8℃, 15℃ 그리고 22℃, 일장 9L15D와 15L9D의 조건을 조합한 6개의 실험구로 나누어 60일간 사육실험을 하였다. 1차의 실험 결과로부터 다음해 1월 2일부터 3월 3일까지 9L15D조건에서 수온 8℃, 10℃, 12℃ 그리고 14℃의 4개의 실험구로 나누어 사육실험을 하여 GSI와 난소의 조직학적 발달상태를 조사하였다.

## 2-2. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도

12월 20일부터 1월 20일까지 자연 일장조건과 월동적수온이 아닌 고수온 조건인 15℃의 조건에서 안병 한쪽만을 절제한 실험군과 안병 양쪽모두 절제한 실험구 그리고 무처리 실험구로 나누어 난소 발달에 대한 안병절제 효과를 조사하였으며, 다음해 1월 2일부터 4월 12일까지 적정 월동수온인 8℃, 10℃, 12℃에서 안병절제에 의한 생식소 성숙유도 효과를 조사하였다.

## 2-3. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬 처리에 의한 생식소 성숙효과

생식소 성숙을 억제하는 호르몬이 생성·분비하는 안병과 생식소 성숙을 촉진하는 요인이 생성·분비된다고 알려진 흉부신경절의 생리활성물질을 분리하기 위하여 대하의 안병과 흉부신경절을 절취하여 추출액은 역상계 mini-column(Capcell Pak C18)에 의해 분리한 후 Sephadex G50으로 재 분리하였으며 신경분비호르몬 분획에 대한 생식소 활성을 징거미새우를 이용하여 bioassay를 하였다.

#### 2-4. 성숙 유도물질에 의한 생식소 성숙 유도

성 성숙 유도 호르몬제로는 5-Hydroxytryptamine (5-HT), ecdysterone (EDS), HCG를 사용하였다. 1998년 4월 1일부터 20일까지 교미한 암컷을 대상으로 수온 16℃, 일장 12L12D의 조건에서 사육하면서 EDS는 5 ng/g BW, 10 ng/g BW, 20 ng/g BW가 되도록 주사하였으며, HCG는 5 IU/g BW와 10 IU/g BW가 되도록 주사하였고 5-HT는 5ng/g과 15ng/g되도록 6일 간격으로 3회 주사하여 생식소 성숙 상태를 조사하였다.

### 3. 산란유도

#### 3-1. 월동조건과 안병절제에 따른 산란양과 부화율

월동을 위해 남하 회유하여가는 자연상태의 대하를 낭장망으로 채집하여 교미전을 가진 암컷만 선택한 후, 월동수온을 8℃, 10℃, 12℃로 나누고 일장조건을 12L12D로 하여, 1개월 월동과 2개월 월동으로 나누어 월동하여 19℃로 성숙유도 후, 산란까지 걸리는 시간(일수)과 산란양 그리고 부화율을 조사하였다. 안병절제에 의한 성숙 유도가 산란양과 부화율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 실험군에서 안병 한쪽을 절제하여 월동후 난소성숙과 산란 유도하여 산란양과 부화율을 조사하여 비교하였다.

#### 3-2. 수온과 염분농도에 따른 산란유도 효과

10℃에서 2개월 동안 월동한 모하를 이용하여 수온자극 종류에 따른 산란율과 일장 12L12D의 조건에서 수온 21℃, 24℃, 27℃, 염분농도 15‰, 20‰, 25‰, 30‰, 35‰의 조건을 서로 조합한 15개의 산란수조를 만들어 완숙상태의 모하를 산란 수조에 옮겼을 때 산란율을 조사하였다.



### 3-3. 안병절제에 의한 산란유도

수온자극에 의해서도 산란이 유도되지 않은 개체들에 대하여 양쪽 안병을 절제하여 안병절제에 의한 산란유도효과를 조사하였다.

### 3-4. HCG 투여에 의한 산란유도

HCG가 산란유도에 효과가 있는지를 보기 위하여 19℃에서 사육중인 완숙한 모하를 대상으로 수온자극 없이 HCG를 50IU/g BW가 되도록 두흉부에 microsyringe로 1회 주사하여 산란유도 효과를 조사하였다.

## 4. 바이러스 비감염 건강종묘생산과 양성

### 4-1. 친하의 채집 및 월동사육관리

1998년 12월 21일에 충남 태안 연안에서 월동장으로 남하회유하는 개체군을 낭장망 어선을 이용하여 포획한 후 수컷 194마리, 암컷 452마리 (B.W. 60.9g; B.L. 16.7cm)를 선별하여 42일간 (98. 12. 21~1. 31) 태안수산종묘시험장에 있는 여과해수가 공급되는 30톤 원형 콘크리트수조 2개에 수용하여 수온 10℃에서 월동사육하면서 생존율 및 탈피율 생체변화 등을 측정하였다.

### 4-2. 자연산 대하의 바이러스 감염율

#### 1) 동계 남하회유 개체군의 바이러스 감염율

1998년 12월 21일 충남 태안 연안 (36° 4' N, 126° 2' E)에서 월동장으로 남하 회유하는 대하 개체군을 포획한 후 친하 495개체 (암컷 369개체, 수컷 127개체)에 대하여 바이러스 감염율 조사하였으며, 다음해인 1999년 12월 9일에 동일한 지역에서 포획한 대하 암컷 845개체 중 444개체를 선별하여 바이러스 감염율을 분석하였다.

바이러스 감염여부의 분석은 바이러스에 대한 genomic DNA를 추출한 후

PCR법을 이용하여 조사하였다.

## 2) 춘계 산란 개체군의 바이러스 감염율

월동을 마치고 산란장으로 이동하는 춘계 산란군에 대하여 바이러스 감염율을 조사할 조사하였다. 이를 위하여 4~5월에 4회에 걸쳐 약 500마리의 암컷을 채집하여 바이러스 감염율을 분석하였다.

## 4-3. 건강종묘생산

### 1) 월동 친하를 이용한 건강종묘 생산

월동장으로 남하회유해 가는 대하를 1998년 12월 19일 채집하여 태안수산종묘시험장의 실내수조에 수용하고 이중 활력이 좋은 개체들을 분리하여 개체별 표식한 후 genomic DNA 추출과 PCR에 의해 바이러스에 대해 negative반응을 하는 비감염 건강모하들 만을 별도로 소독된 수조에 수용한 후 종묘생산에 이용하였다.

### 2) 춘계산란군을 이용한 건강종묘 생산

춘계 산란군의 바이러스 비감염 건강종묘를 생산하기 위하여 2000년 4~5월에 흑산도 및 영광 연안에서 산란장으로 북상중인 모하를 채집하고 이들 중 건강한 모하 만을 선별하여 개체별표식후 genomic DNA를 추출과 PCR에 의해 바이러스 비감염 모하를 선별하여 소독된 수조에 수용한 후 종묘생산에 이용하였다.

## 4-4. 건강종묘를 이용한 새우양식

### 1) 종묘의 입식과 양성

건강종묘는 경기 대부도, 충남 대산 소재 3개 양식장 5개 양식호지에 100

마리/평의 밀도로 입식하고 사육수를 소독하여 사용한 양식장과 소독하지 않은 사육수를 사용한 양식장으로 구분하여 사육수를 통한 수평감염을 조사하였다.

## 2) 건강종묘 양식장 바이러스 감염율 및 생존율 조사

건강종묘의 바이러스 감염율을 추적하기 위하여 6월부터 월별로 각 양식호지에 대하여 바이러스 감염율을 조사하였고, 건강종묘 양식장의 수확시 최종 생존율, 총 생산량, 단위생산량을 조사하여 일반 종묘를 입식한 양식장과 비교하였다.

# IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

## 1. 연구개발 결과

### 1-1 친하관리

#### 1-1-1. 생식주기와 교미율

##### 1) 생식주기

난 형성 과정은 전난황형성기 (previtellogenesis stage), 1차 난황형성기 (primary vitellogenesis stage), 2차 난황형성기 (secondary vitellogenesis stage), 완숙기 (ripe stage)의 4단계로 나눌 수 있었으며, GSI의 연간 변화와 조직학적인 변화에 의해 생식년주기를 미숙기(virgin period)(8월~다음해 2월), 성장기(growing period)(2월~3월), 난황형성기(vitellogenesis period)(3월~5월), 완숙 및 산란기(ripe and spawning period)(5월~6월), 퇴화기(resting period)(7월)로 나눌 수 있었다.

두흉갑장의 월별 변화의 결과로부터 대하는 6월경에 부화되어 성장하여 다음해 5~6월경에 산란하고 7월에 죽는 단년생인 것으로 확인되었다.

## 2) 교미율

양식장의 교미율은 11월초에 21.6%, 11월말 경에는 80%이상을 나타내었다. 그러나 자연상태에서는 11월말에 55.6%가, 12월초에는 90%이상이 교미율을 보였다.

### 1-1-2. 친하의 실내 양성

#### 1) 추계 사육관리

가을철 대하의 성장에 미치는 일장조건의 영향을 조사한 결과 대하는 일장조건에 따라 성장 양상과 생존율에 어떠한 영향도 찾아볼 수 없었다. 이러한 결과는 대하에서는 일장조건이 성장에는 아무런 영향을 주지 않음을 보여주는 것이다. 탈피율에서도 장일조건이 탈피율이 높지만 유의한 차이는 없었다.

#### 2) 동계사육관리

10℃, 15℃ 그리고 20℃에서 사육했을 경우 생존율은 초기에는 각각 88%, 90%, 그리고 94%로 수온이 높을수록 생존율이 좋았으나, 사육 60일째의 생존율은 10℃ 78%, 15℃ 74%, 20℃ 70%로 수온이 낮을수록 생존율이 좋게 나타났다. 그리고 10℃에서는 한 마리도 탈피지 않았으나, 15℃에서는 5.40%의 탈피율을 나타냈고 20℃에서는 11.43%의 탈피율을 보였다.

8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 사육하였을 때는 사육수온이 증가할수록 섭식량이 증가하였다. 그리고 같은 수온조건에서도 안병을 절제한 개체들이 상대적으로 보다 많은 먹이를 섭취하는 경향을 보였다. 8℃에서는 안병절제 실험구에서는 생존율이 40%, 무 처리구는 60%를 나타내었으며, 10℃에서는 안병절제구가 70%, 무 처리구가 78%의 생존율을, 12℃에서는 안병절제 실험구의 생존율이 80%, 무 처리구의 생존율이 82%로 나타났다.

## 1-2. 생식소 성숙 유도

### 1-2-1. 생식소 성숙에 대한 수온과 일장의 영향

#### 1) 추계 난소 성숙에 대한 일장의 영향

장일조건(15L9D)보다 단일조건(9L15D)에서 GSI의 값이 다소 증가하는 경향을 보였으며 단일조건이 난모세포의 난황형성이나 성숙을 촉진하는 것이 아니라 단지 시원생식세포의 분열과 증식을 촉진하고 이로부터 주변인기의 난모세포 수의 증가에 의한 것이라고 보여져, 단일조건으로 사육하는 것이 대량의 난을 생산하는데 보다 유리하다.

#### 2) 동계 난소성숙에 대한 수온과 일장의 영향

8℃, 15℃, 22℃의 조건과 일장 15L9D, 9L15D의 조건을 조합한 실험구에서 사육 40일 후(1월 14일) 8℃, 9L15D에서는 GSI가  $2.25 \pm 0.22\%$ , 15L9D에서는  $2.05 \pm 0.25\%$ 로 유의한 상승을 보였으나, 15℃와 22℃조건에서는 일장에 관계없이 GSI의 변화를 전혀 볼 수 없었다. 사육 80일 후(2월 25일), 120일 후(3월 25일)에도 15℃와 22℃조건에서는 GSI의 상승이나 난소의 조직학적 변화는 전혀 볼 수 없었다.

그러나 2월 25일 8℃에서 사육하던 대하 일부를 15℃로 수온을 상승시킨 실험구에서는 30일 후(3월 25일)에 GSI가  $11.99 \pm 1.86\%$ 으로 급격하게 상승하였으며 대부분 개체들의 난소는 모두 완숙상태의 난모세포들로 이루어져있었다

최적 월동 수온범위를 조사하기 위하여 수온 8℃, 10℃, 12℃ 그리고 14℃의 수온 조건에서 사육하였을 때 사육 60일후(3월 3일)에 각 실험구의 GSI는 8℃에서는  $3.65 \pm 0.33\%$ , 10℃와 12℃에서는 각각  $3.45 \pm 0.26\%$ 과  $2.94 \pm 0.24\%$ 로 대조구에 비해서는 유의한 상승을 보였으나 14℃에서는  $2.01 \pm 0.17\%$ 로 유의한 변화는 보이지 않았다.

1-2-2. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도

15℃이상의 조건에서는 사육 30일 후(1월 20일)에는 무 처리 실험구나 한 쪽 안병을 절제한 실험구에서는 GSI가 각각  $2.17 \pm 0.13\%$ 과  $2.01 \pm 0.07\%$ 로 생식소 성숙 촉진 효과는 전혀 나타나지 않았으나, 양쪽 안병을 절제한 실험구에서는 대부분의 개체들의 난소는 난황형성기의 후기에 들어가 표층포를 형성한 완숙 상태의 난모세포를 가지며, GSI도  $7.73 \pm 1.61\%$ 로 모든 실험구들에 비하여 유의한( $p < 0.05$ ) 상승을 보였다.

수온 8℃, 10℃ 그리고 12℃로 사육하였을 때는 사육 90일 후(4월 12일)에 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구의 GSI는 각각 3.65%, 5.08% 그리고 3.79%로 유의한 상승은 보이지 않았으나 안병을 절제한 실험구에서는 각각 10.27%, 8.87% 그리고 6.25%로 12℃조건을 제외하고 모두 유의한 GSI의 상승을 보여주었다.

1-2-3. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬 처리에 의한 생식소 성숙효과

안병내의 peptide hormone의 분리를 위하여 안병의 peptide를 추출하여 역상계 mini-column (Capcell Pak C18)에 의해 10%CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA로 분리한 후 Sephadex G50으로 분리하여 그 결과 5개의 Peak가 나왔다. Pool I (Peaks 1 and 2)을 주사한 실험구에서는 50%가 성숙 억제 효과를 나타내었으며, Pool II (Peaks 3, 4 and 5)를 주사한 실험구에서는 80%가 생식소 성숙억제효과를 보였다. 흉부신경절로부터 추출한 신경분비 peptide를 분리한 결과 주된 4개의 peak가 나타났으며, 이들 모두 생식소 성숙 효과는 보이지 않았다.

1-2-4. 성성숙 유도물질에 의한 생식소 성숙 유도

5-Hydroxytryptamine (5-HT)는 15ng/gBW을 주사한 실험군에서는 평

균 GSI가  $7.67 \pm 2.02$ 로 상승하여 성숙효과를 보여주었으나 Ecdysone(EDS)나 HCG는 성숙효과를 보이지 않았다.

### 1-3. 산란유도

#### 1-3-1. 월동조건과 안병절제에 따른 산란양과 부화율

1월 2일부터 수온  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 로 1개월 동안 월동 사육한 후  $19^{\circ}\text{C}$ 로 사육수온을 상승시켜 성숙 유도하였을 때 안병을 절제하지 않은 실험구의 산란수는 각각  $227,413 \pm 105,233$ 개,  $249,850 \pm 13,158$ 개로 나타났으며, 안병을 절제한 실험구에서는  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $207,980 \pm 41,558$ 개와  $184,853 \pm 43,635$ 개로 나타났다.  $19^{\circ}\text{C}$ 로 사육수온을 올린 후 산란까지 걸리는 평균 시간은 안병을 절제한 실험구의  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $30.7 \pm 5.3$ 일과  $21.0 \pm 8.1$ 일 걸렸으며, 안병을 절제하지 않은 실험구의  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 에서는 각각  $33.7 \pm 4.4$ 일과  $27.5 \pm 5.1$ 일이 걸렸다. 부화율은 안병을 절제한 실험구에서는  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $85.80 \pm 5.19\%$ 와  $89.52 \pm 3.84\%$ 로 나타났고, 안병을 절제하지 않은 실험구에서는  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $88.75 \pm 1.20\%$ 와  $86.30 \pm 2.42\%$ 로 나타났다.

1월 2일부터 3월 9일까지  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 약 2개월간 월동사육 기간을 거친 후  $19^{\circ}\text{C}$ 로 사육수온을 상승시켜 성숙 유도하였을 때 안병을 절제한 실험구의 산란수는 각각  $332,220 \pm 67,345$ 개,  $322,800 \pm 29,975$ 개,  $341,779 \pm 74,163$ 개로 나타났다. 그리고 안병을 절제하지 않은 실험구에서는  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $441,040 \pm 8,7122$ 개,  $447,280 \pm 40,390$ 개 그리고  $314,453 \pm 32,563$ 개로 나타났다.  $19^{\circ}\text{C}$ 로 사육수온을 올린 후 산란까지 걸리는 평균 시간은  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $15.5 \pm 0.71$ 일,  $18.3 \pm 4.27$ 일 그리고  $13.3 \pm 4.72$ 일 걸렸으며, 안병을 절제하지 않은 실험구의  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$  그리고  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $26.5 \pm 9.19$ 일,  $25.6 \pm 6.5$ 일 그리고  $21.6 \pm 1.2$ 일이 걸렸다. 부화율은 안병을 절제한 실험구에서는  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$  그리고  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 각각  $93.0 \pm 4.2\%$ ,  $86.2 \pm 8.8\%$

그리고  $90.1 \pm 9.0\%$ 로 나타났으며, 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구에서는  $8^\circ\text{C}$ ,  $10^\circ\text{C}$  그리고  $12^\circ\text{C}$ 에서 각각  $90.5 \pm 1.6\%$ ,  $91.2 \pm 5.6\%$  그리고  $87.1 \pm 5.5\%$ 로 나타났다.

#### 1-3-2. 수온과 염분농도에 따른 산란유도 효과

수온  $19^\circ\text{C}$ 를 계속 유지하였을 때는 40%의 산란율을 보였지만 수온을  $2^\circ\text{C}$  올린  $21^\circ\text{C}$ 의 수조에서는 90.7%가 산란을 하였다.  $19^\circ\text{C}$ 에서  $4^\circ\text{C}$  올린  $23^\circ\text{C}$ 에서는 72.7%의 산란율을 보였다.

$20^\circ\text{C}$ 에서는 염분농도 15‰와 35‰에서는 65%의 산란율을 나타내었지만 염분농도 20‰와 30‰사이에서는 모두 100%의 산란율을 나타내었다. 40‰의 조건에서는 한 마리도 산란한 개체들이 보이지 않았다.  $24^\circ\text{C}$ 에서는 염분농도가 30‰일 때 만 100%의 산란율을 나타내었으며 35‰와 40‰에서 그리고 15‰에서는 산란하지 않았다.  $28^\circ\text{C}$ 의 조건에서는 염분농도의 어떠한 조건에서도 산란한 개체들이 보이지 않았다.

#### 1-3-3. 안병절제에 의한 산란유도

한쪽 안병이든지 양쪽 안병을 절제하면 거의 모든 개체들이 절제 후 2일 이내에 모두 산란을 하여 90~100%의 산란율을 보였다.

#### 1-3-4. HCG 투여에 의한 산란유도

무 처리한 개체들에서는 30%의 산란율을 보였으나 HCG를 처리한 개체들 중에서는 40%의 산란율을 나타내었다.

### 1-4. 바이러스 비감염 건강종묘생산과 양성

#### 1-4-1. 친하의 채집 및 월동사육관리

친하 사육관리를 위해 1998에 12월 채집된 646마리 (암컷 452, 수컷 194)



의 친하를 30톤 실내수조에서 월동사육하면서 성숙유도를 실시하였다. 1998년 12월 21일~1999년 1월 31일까지 월동사육기간 동안 평균 수온은 9.6°C (range 8.0~10.8°C), 생존율 76.8% (암컷 79.9%, 수컷 69.6%), 탈피는 일어나지 않았다. 성숙유도를 위하여 안병절제구와 대조구 각 130마리의 암컷을 99.2. 1일부터 30일간 30톤 원형수조에서 수온 16.2°C (range 11.4~19.6°C)로 사육하였다. 생존율은 88.6%였으며 GSI의 변화는 대조구는 성숙유도 5일째 3.1로 최대치를 보인 이후 27일째에는 2.02로 퇴행한 반면 안병절제구는 5일째 3.0, 19일째 4.44, 27일째 9.96로 증가하여 대조구에 비해 5배 높았다.

난소 발달단계의 빈도는 성숙유도 23일째 대조구는 stage I과 II의 난소가 97%를 차지하였으며 안병절제구는 stage III 이상의 난소를 가진 암컷이 78.6%를 차지하였다. 최초의 산란은 성숙유도 20일째 (2월 20일)에 일어났으며 4톤 산란용 수조와 30톤 수조 모두에서 3월 17일까지 총  $9.3 \times 10^6$ 개 산란하였다.

#### 1-4-2. 자연산 대하의 바이러스 감염율

##### 1) 동계 남하회유 개체군의 바이러스 감염율

자연산 대하의 바이러스 감염율을 조사하기 위하여 1998년과 1999년 월동장으로 남하하는 개체군을 채집하여 PCR에 의해 조사한 결과, 1998년 12월 개체군은 495개체 중 431개체가 positive로 나타나 바이러스 감염율은 87.7%였으며, 1999년 12월 개체군은 암컷 444개체 중 294개체가 positive로 나타나 감염율은 66.2%였다.

##### 2) 춘계 산란 개체군의 바이러스 감염율

춘계산란군의 바이러스 감염율 조사를 위하여 2000년 4~5월 동안 흑산도와 영광 연안에서 4회에 걸쳐 채집된 483개체의 암컷을 PCR 분석 결과, 바이러스 감염율은 4.3~9.0% (평균 6.1%)로서 채집시기와 장소에 따라 약간의 차이가 있었다.

### 1-4-3. 건강종묘생산

#### 1) 월동 친하를 이용한 건강종묘 생산

월동 친하를 이용한 건강종묘 생산을 위하여 월동 사육중인 친하 중 PCR 검사를 거쳐 선별된 바이러스 비감염 친하 61개체 (암컷 43, 수컷 18)을 1999년 1월 27일~3월 1일까지 (34일간) 수온 11.2~18.5℃ (평균 16.1℃)에서 오징어, 바지락, 갯지렁이를 공급하여 사육한 결과 25일째 (99. 2. 20일)에  $6 \times 10^5$ 개가 최초로 산란되었으며 33일째까지 총  $19 \times 10^5$ 개가 산란되었고 부화된 유생은 모두 바이러스 비감염으로 조사되었다.

#### 2) 춘계산란군을 이용한 건강종묘 생산

춘계 산란군을 이용한 건강종묘 생산을 위하여 2000년 4~5월에 흑산도 및 영광 연안에서 채집된 모하로부터 PCR에 의해 선별된 416개체의 비감염 모하를 이용하여 종묘생산을 하고 바이러스 분석을 하였다. 조사된 14개의 50톤 유생사육 수조 중 13개가 PCR negative 였으며 일반모하에 생산된 종묘가 사육중인 11개 수조 중 9개가 바이러스에 감염되어 일반종묘의 감염율은 81.6% 였다.

### 1-4-4. 건강종묘를 이용한 새우양식

건강종묘와 일반종묘를 입식한 양식장의 바이러스 감염율 변화를 비교하기 위하여 건강종묘를 입식한 5개 양식호지와 일반종묘를 입식한 6개 양식호지의 월별 바이러스 감염율을 조사한 결과, 소독된 사육수를 사용한 2개의 건강종묘 양식장은 6~9월의 평균 감염율은 8.8%, 비소독 사육수를 사용한 3개의 건강종묘 양식장의 감염율은 28.4%였으며 일반종묘 양식장의 평균 감염율은 56.8%였다. 소독 사육수를 사용한 2개 양식장의 단위면적당 평균생산량은  $0.4 \text{ kg/m}^2$ 로서 비소독 양식장의  $0.26 \text{ kg/m}^2$ 에 비해 53.8%가 높았으며 생존율은 48.6%로서 비소독 양식장의 40%에 비해 21.5% 높았다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 대하에 대하여 모하로 이용하기 위한 인위적인 월동방법이 밝혀짐으로써 대하 월동사육으로 겨울철 쉬고있는 배양장을 활용하게 함으로써 어민소득을 증대시킬 수 있고 이로 인하여 모하의 안정적 공급을 도모할 수 있음으로 이에 대한 홍보와 교육이 필요하다.

생식소 성숙의 인위적 조절과 수정란 대량 생산방안이 밝혀짐으로써 인위적인 종묘의 수급시기를 조절할 수 있고 대하 양식을 보다 더 효율적으로 할 수 있어 경제성을 높일 수 있다.

흰반점 바이러스에 비감염된 건강한 대하종묘의 생산방법이 개발되고, 또한 이를 이용한 대하 양식으로 바이러스 피해로부터 줄일 수 있어 대하양식 생산량을 높일 수 있는 획기적인 방법이 제시됨으로써 대하 종묘생산방법에 대한 방향 전환이 요구되며 이를 위한 대하양식 어민 교육이 필요하다.

이를 위해서 수산진흥원 등 전문 연구기관이나 지도소에 흰반점바이러스를 검색할 수 있는 전문 연구원과 시설확보가 필요하며 대하의 건강종묘를 생산하여 분양할 수 있는 시설과 인원 확보가 요구된다.

# Summary

## I. Title

Mass production of fertilized eggs and SPF larvae of flesh prawn (*Penaeus chinensis*) by maintaining broodstock and control of gonadal maturation

## II. Objective and significance

The natural distribution of *P. chinensis* is limited to the Asian coast from the East China Sea to Bohai Bay in the northern Yellow Sea. *P. chinensis* is cultured semi-intensively on the west coast of Korea in which total production of cultured prawn was 1,533 metric tones in 1997.

Since WSSD(white spot syndrome disease) appeared to prawns cultured in many shrimp farms, the farming production of *P. chinensis* has decreased to 998 metric tones in 1998 and to 1,142 metric tones in 1999. Recently, serious decrease in farming production of *P. chinensis* has brought about the necessity of producing the WSSV(white spot syndrome virus)-free larvae. Broodstocks for seed production of this prawn are caught from natural fishing ground in the spring. Since the most of wild broodstock are infected with virus, we have to fine stock technique of virus-free prawns and establish the system that gonadal maturation and spawning can be attained artificially. But, little is known about the physiological regulation of gonadal maturation and spawning in this species.

The aims of this study were to fine detailed data for controlling

artificially precocious gonadal maturation and spawning by use of overwintered broodstock in indoor tank, and to develop mass production of WSSV-free eggs and larvae.

### III. Contents and scope

To find the detailed data for controlling artificially for precocious gonadal maturation and spawning, we studied on the reproductive cycle, influence of temperature and photoperiod on growth, molt, ovarian maturation and spawning, and kept broodstock in indoor tank. Then, we separated the virus-free broodstock by PCR analysis, produced the WSSV-free eggs and larvae, and carried out the culture in ponds stocked with WSSV-free larvae.

### IV. Results

To determine the developmental stages of oogenesis, ovaries were studied histologically with light and electron microscope. General aspects of oogenesis were similar to those of other penaeidian shrimps. Based on the developmental processes of oocytes the oogenesis could be classified into 4 stages: previtellogenesis, primary vitellogenesis, secondary vitellogenesis and ripe stage.

The histological changes of ovary were studied in prawns captured at coast of Poryong in order to obtain the aspect of reproductive cycle. From results of changes in GSIs and histological observations of ovary, annual reproductive cycle of female could be classified into 5 periods as following : virgin period (August~February of the next year), growing

period (February ~ March), vitellogenesis period (March~May), ripe and spawning period (May~June) and resting period (July).

The copulation rates of prawn reared in pond were 21.6% in the early November and over 80% in the late November. In natural fishing ground, however, it was 55.6% in the late November and over 90% in the early December.

Influence of photoperiod on the growth, molting and survival rates was examined for prawn collected in fall (August~October). Photoperiod has no a significant effect on growth, molting and survival rates in fall population.

To investigate the influence of temperature on the molting and survival rates in winter population, prawns were reared in 3 experimental regimes of 10°C, 15°C and 20°C under natural photoperiod. After rearing 60days, survival rates at 10°C, 15°C and 20°C were 78%, 74% and 70%, respectively. Molted specimens showed in experimental regimes of 15°C and 20°C. Molting rates of experimental regimes of 10°C, 15°C and 20°C were 0%, 5.40% and 11.43%, respectively. In unilateral eyestalk-ablation groups, the survival rates of 8°C, 10°C and 12°C were 40%, 70% and 80%, respectively. The survival rates of unablation groups in experimental regimes of 8°C, 10°C and 12°C were 60%, 78% and 82%, respectively.

The influence of temperature and photoperiod on gonadal maturation was examined for prawns collected from farming ponds in fall and winter. In fall, photoperiod has no a significant effect on gonadal maturation. In winter (December to February), no changes in the GSI and the histology of the ovary were observed in the groups reared under 15°C and 22°C

irrespective of photoperiod. At 8°C, GSIs significantly increased to  $2.25 \pm 0.22\%$  in 9L15D and  $2.05 \pm 0.25\%$  in 15L9D. Some specimens transferred from experimental regime of 8°C to 15°C attained maturity after one month. To find water temperature suitable for overwintering, prawns were reared at 8°C, 10°C, 12°C and 14°C under 12L12D. After rearing 60 days, GSIs at 8°C, 10°C and 12°C increased significantly. However significant increase in GSI was not observed in experimental regime of 14°C. This result suggests that GIH (gonad inhibiting hormone) should be secreted actively at temperature of 14°C or higher.

To prove the suggestion of GIH secreting in eyestalks, the effects of eyestalk-ablation on gonadal maturation were examined in winter (Dec. 20 ~ Jan. 20). At 15°C bilateral eyestalk-ablation group showed significant increase in GSI and gonadal maturation. However no changes in the GSI and the histology of the ovary were observed in unilateral eyestalk-ablation and unablation groups. At low temperatures of 8°C, 10°C and 12°C, unilateral eyestalk-ablation groups has no effect on inducing gonadal maturation for rearing one month. After rearing 3 months, however, unilateral eyestalk-ablation has effect on increasing GSI and developing oocytes.

Chromatographic neuropeptides were purified from extracts of eyestalk and thoracic ganglion of this prawn by reverse-phase HPLC. Pool II (peak 3, 4 and 5) separated from eyestalk extract has activity in gonadal maturation inhibit in freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*. Neuropeptides fractions separated from extract of thoracic ganglion did not show inducing activity for gonadal maturation in *M. nipponense*.

The prawns in previtellogenesis stage were treated with EDS (ecdysone), 5-HT (5-hydroxytryptamine), and HCG (human chorionic gonadotropin) to determine their effects on inducing gonadal maturation. Except for 5-HT treatment, there was no effectiveness on inducement of gonadal maturation.

To know most adequate overwintering temperature for producing eggs and nauplii, copulated female prawns, which divided into two groups of unilateral eyestalk-ablation and unablation, were reared at 8°C, 10°C and 12°C for one or two months, thereafter rearing temperature increased until 19°C for gonadal maturation and spawning. In overwintering for one month, the number of spawning eggs of unablation groups were  $227,413 \pm 105,233$  at 10°C and  $249,850 \pm 13,158$  at 12°C. In unilateral eyestalk-ablation groups, the number of spawning eggs of 10°C and 12°C were  $207,980 \pm 41,558$  and  $184,853 \pm 43,635$ , respectively. Hatching rates of unilateral eyestalk-ablation groups were  $85.85 \pm 5.19\%$  at 10°C and  $89.52 \pm 3.84\%$  at 12°C. In unablation group, hatching rates of 10°C and 12°C were  $88.75 \pm 1.20\%$  and  $86.30 \pm 2.42\%$ , respectively. Number of spawning eggs and hatching rates indifferent from eyestalk-ablation and overwintering temperatures.

In overwintering for two months, the numbers of spawning eggs of unilateral eyestalk-ablation groups were  $332,220 \pm 67,345$  at 8°C,  $322,800 \pm 29,975$  at 10°C and  $341,779 \pm 74,163$  at 12°C. In unilateral eyestalk-ablation groups, the number of spawning eggs of 8°C, 10°C and 12°C were  $441,040 \pm 87,122$ ,  $447,280 \pm 40,390$  and  $314,453 \pm 32,563$ , respectively. Hatching rates of unilateral eyestalk-ablation groups were  $93.0 \pm 4.2\%$  at 8°C,  $86.2 \pm 8.8\%$



at 10°C and 90.1±9.0% at 12°C. In unablation group, hatching rates of 8°C, 10°C and 12°C were 90.5±1.6%, 91.2±5.6% and 87.1±5.5%, respectively. There was significant difference in number of spawning eggs between the unilateral eyestalk-ablation and unablation groups at same overwintering temperatures. However hatching rates indifferent from eyestalk ablation and overwintering temperatures. The number of spawning eggs by broodstock overwintered for two months was greater than that of the broodstock overwintered for one month. The Optimum temperature for inducing spawning was 20°C at which the proper salinity range from 20‰to 30‰. Unilateral and bilateral eyestalk-ablation has an effect on induction of raped spawning in this prawn.

Broodstock (female 452 and male 194) was maintained indoor tanks and maturation was artificially induced during winter period. Water temperature was mean 9.6°C (range 8.0 10.8°C) and survival rate was 76.8% (female 79.9% and male 69.6%) during overwintering culture from Dec. 12, 1998 to Jan. 31, 1999. To induce ovarian maturation, the control group and the eyestalk ablation group (130 females respectively) were maintained in 30-ton circular tank at 16.2°C (range 11.4 19.6°C) of water temperature for 30 days from Feb. 1, 1999. The survival rate was 88.6%. In control group, GSI was the highest (3.1) on day 5 and decreased to 2.02 on the day 27. In the eyestalk ablation group, GSI was 3.0 on the day 5, 4.44 on day 19 and 9.96 on the day 27.

On the day 23, the ovarian developmental stages I and II consisted of 97% in the control and those of stages III, IV and V consisted of 78.6% in the eyestalk-ablation group. The spawning occurred on the day 20

(Feb. 20, 1999) for the first time and continued to Mar. 17, 1999. The total number of eggs was  $9.3 \times 10^6$ .

The viral infection rate of winter population was investigated by PCR (polymerase chain reaction) analysis. The infection rate was 87.7% (431 out of 495 females) in the population of Dec. 1998 and 66.2% (294 out of 444) in the population of Dec. 1999.

The total 483 females of four populations sampled in April to May, 2000 were analysed by PCR and the viral infection rate was 4.3~9.0% (mean 6.1%).

To produce WSSV-free larvae with overwintered broodstock, 61 shrimps (male 18, female 43) were separated by PCR analysis, maintained at 11.2~18.5°C (mean 16.1°C) for 34 days from Jan. 27 to Mar. 1, 1999 and fed squids, clams and bloodworms. The spawning occurred on day 25 for the first time and continued to the day 33. The total number of eggs was  $19 \times 10^5$  and the hatched larvae were PCR negative.

To produce SPF (WSSV-free) larvae with spring broodstock, 416 females out of four populations from Heuksan Is. and Yeongkwang were separated by PCR analysis and induced to spawn. The larvae produced from the females were checked for viral infection and the larvae in 13 out of 14 tanks were PCR negative. The larvae of 9 out of 11 tank produced from non-SPF broodstock were PCR positive and viral infection rate was 81.6%.

The viral infection rate was compared between the ponds stocked with SPF and non-SPF larvae. The mean infection rate for four months from June to September was 8.8% in two ponds stocked with SPF larvae and

supplied with sterilized seawater, 28.4% in three ponds stocked with SPF larvae and supplied with unsterilized seawater and 56.8% in six ponds stocked with non-SPF larvae and supplied with unsterilized seawater. The unit production and survival rate were 0.4 kg/m<sup>2</sup> and 48.6% respectively in two ponds stocked with SPF larvae and supplied with sterilized seawater and 0.26 kg/m<sup>2</sup> and 40.0% respectively in three ponds stocked with non-SPF larvae and supplied with unsterilized seawater.

# Contents

List of tables .....	28
List of figures .....	31
Chapter 1. Introduction .....	45
Chapter 2. Adult prawn broodstock .....	47
Section 1. Introduction .....	47
Section 2. Materials and methods .....	48
1. Animals .....	48
2. Rearing condition .....	48
3. Histological survey .....	50
4. Copulation rate .....	50
Section 3. Results and discussion .....	51
1. Reproductive cycle and copulation rate .....	51
2. Maintaining broodstock in indoor tank .....	60
Chapter 3. Inducement of gonadal maturation .....	73
Section 1. Introduction .....	73
Section 2. Materials and methods .....	74
1. Animals .....	74
2. Rearing experiment on temperature and photoperiod .....	75
3. Experiment on inducement of gonadal maturation by eyestalk ablation .....	75
4. Purification of neuropeptides .....	76
5. Bioassay of neuropeptides on gonad maturation .....	78

6. Treatment of hormones .....	78
Section 3. Reults and discussion .....	79
1. Effects of temperature and photoperiod on gonad maturation ..	79
2. Effects of eyestalk ablation on gonad maturation .....	91
3. Effects of treatment of purified neuropeptides on gonad maturation .....	97
4. Effects of maturation inducing hormones on gonad maturation .....	102
Chapter 4. Induction of spawning .....	109
Section 1. Introduction .....	109
Section 2. Materials and methods .....	110
1. Collection of broodstock .....	110
2. Count of spawning eggs and hatching nauplii .....	111
3. Spawning .....	111
Section 3. Results and discussion .....	112
1. Number of spawning eggs and hatching rate on overwintering period and eyestalk ablation .....	112
2. Induction of spawning on temperature and salinity .....	119
3. Induction of spawning on eyestalk ablation .....	123
4. Induction of spawning on HCG .....	124
Chapter 5. Production of SPF larvae and culture .....	127
Section 1. Introduction .....	127
Section 2. Materials and methods .....	128
1. Collection and maintaining broodstock .....	128
2. Viral infection rate .....	129

3. Larval production .....	131
4. Culture of SPF larvae .....	134
Section 3. Results and discussion .....	135
1. Maintaining broodstock and mass production of early seedlings .....	135
2. The viral infection rate of natural population .....	141
3. Production of WSSV-free larvae .....	143
4. The culture in ponds stocked with SPF larvae .....	150
Chapter 7. Reference .....	155

## List of Tables

Table 1. The copulation rate of <i>P. chinensis</i> reared in natural habitat and a pond in 1998 .....	59
Table 2. Molt frequency of <i>P. chinensis</i> reared in different water temperature during winter (Dec. 5 ~ Feb. 3) .....	66
Table 3. Effects of unilateral eyestalk ablation on the daily feeding amount of <i>P. chinensis</i> according to rearing water temperatures .....	67
Table 4. Effects of fraction groups (Pool I and Pool II) which were isolated from eyestalk extract by Sephadex G50 column on inhibition of gonadal maturation and spawning in freshwater prawn, <i>Macrobrachium nipponense</i> .....	99
Table 5. Effects of elution peak (Pool I, Pool II and Pool III) which were isolated from thoracic ganglion extract by Sephadex G50 column on stimulating of gonadal maturation in freshwater prawn, <i>M. nipponense</i> .....	101
Table 6. The number of spawning eggs and the time required for spawning in wintering conditons .....	118
Table 7. Spawning rate of <i>P. chinensis</i> reared under different treatment of water temperature .....	121

Table 8. Effects of water temperature and salinity on spawning rate of <i>P. chinensis</i> .....	122
Table 9. Effects of eyestalk ablation on induce spawning of <i>P. chinensis</i> .....	123
Table 10. Effects of HCG injection on induce spawning of <i>P. chinensis</i> .....	125
Table 11. Pond size and date stocked with SPF postlarvae .....	134
Table 12. Change of GSI (gonad somatic index) of <i>P. chinensis</i> during maturation induction culture .....	138
Table 13. The frequency of ovarian developmental stages basedon external observation on 23 days-culture .....	139
Table 14. Viral infection rate of winter populations of <i>P. chinensis</i> .....	142
Table 15. Viral infection rate of spring populations of <i>P. chinensis</i> .....	143
Table 16. Number of eggs produced from WSSV-free <i>P. chinensis</i> broodstock by indoor maturation induction .....	146
Table 17. Results of PCR amplification with larvae from SPF broodstock of <i>P. chinensis</i> .....	149
Table 18. Results of PCR amplification with larvae from non-SPF broodstock of <i>P. chinensis</i> .....	150



Table 19. Monthly viral infection rate of ponds stocked with SPF larvae .....	151
Table 20. Monthly viral infection rate of ponds stocked with non-SPF larvae .....	152
Table 21. Survival rate and production of ponds stocked with SPF larvae .....	153

## List of Figures

- Fig. 1. Monthly variation of water temperature in Poryong area. ....52
- Fig. 2. Developmental stages of oogenesis of *P. chinensis*. 1 and 2: previtellogenesis stage, 3 and 4: primary vitellogenesis stage, 5 and 6: secondary vitellogenesis stage, 7 and 8: maturation stage. Cg, cortical granule; Fc, follicle cell, M, mitochondria; Ne, nucleolus; PO, previtellogenesis oocyte; PVO, primary vitellogenesis oocyte; SVO, secondary vitellogenesis oocyte; RER, rough endoplasmic reticulum; RO, ripe oocyte. ....54
- Fig. 3. Monthly variation of GSI in female prawn, *P. chinensis* captured at Poryong area. ....57
- Fig. 4. Annual changes of carapace length of female prawns, *P. chinensis* captured in natural condition. ....58
- Fig. 5. Changes of water temperature and day length in rearing tanks during experimental period (August 25~October 13). ....61
- Fig. 6. Effects of photoperiods on the growth of body length(A), bodyweight (B) and carapace length (C) of *P. chinensis* (August 20 to October 5). ....62
- Fig. 7. Effects of photoperiods on the daily molting frequency of *P. chinensis* during fall (August 25 to October 13). ....64
- Fig. 8. Changes of survival rate on rearing water temperature during winter of *P. chinensis*. closed circle: regime of unilateral eyestalk ablation; open circles: intact regime. ....70

- Fig. 9. Scheme for extraction method of neuro-secretion hormones of *P. chinensis* (modified Yang et al, 1996). .....77
- Fig. 10. Changes of water temperature during experiment(A) and GSI of female prawn, *P. chinensis* on rearing day length conditions (15L9D and 9L15D)(B). .....80
- Fig. 11. Effects of water temperatures and photoperiods on ovarian maturation of adult female prawns, *P. chinensis*. Asterisk denotes significant difference from initial control (p,0.05). .....82
- Fig. 12. Histological changes of ovary of adult female prawns, *P. chinensis* on rearing temperatures and photoperiods during winter (Dec. 5 - Feb. 6). A: Section of ovary in initial control, B and C: Section of ovary in experimental regimes of long and short photoperiod at 8°C, D: Section of ovary in experimental regimes of 15°C. Fc, follicle cell; PO, previtellogenesis oocyte; PVO, primary vitellogenesis oocyte. ....83
- Fig. 13. Effects of water temperatures on ovarian maturation of adult female prawns, *P. chinensis* during winter (Feb. 5-Mar. 25). Asterisk denotes significant difference from initial control (p<0.05). Different letters(a-d) are significantly different (p<0.05). .....86
- Fig. 14. Effects of increasing temperature from 8°C to 15°C on ovarian maturation in female prawn, *P. chinensis*. A: Section of ovary in experimental regime of 8°C in February 25, B: Section of ovary in experimental regime of increasing temperature from 8°C to 15°C, C: Section of ovary experimental regime of 15°C in March 25. Cg, cortical granule; Fc, follicle cell; PO, previtellogenesis oocyte;

RO, ripe oocyte. ....	87
Fig. 15. Changes of GSI on water temperatures of overwintering broodstock in female prawn, <i>P. chinensis</i> . ....	90
Fig. 16. Changes of GSI on eyestalk ablation in female prawn, <i>P. chinensis</i> reared at 15°C. ....	92
Fig. 17. Changes of GSI on eyestalk ablation in female prawn, <i>P. chinensis</i> kept at 8°C, 10°C, 12°C and 15°C ....	95
Fig. 18. Elution profile on Sephadex G50 column of extracts from eyestalk of <i>P. chinensis</i> chromatographed on a Capcell Pak C18. ....	98
Fig. 19. Elution profile on Sephadex G50 column of extracts from thoracic ganglion of <i>P. chinensis</i> chromatographed on a Capcell Pak C18. ....	100
Fig. 20. Changes of GSI on 5-hydroxytryptamine (5-HT) injection in female prawn, <i>P. chinensis</i> . ....	103
Fig. 21. Changes of GSI values on ecdysone(EDS) and HCG injection in female prawn, <i>P. chinensis</i> kept at 10°C and 12L12D condition. Experimental duration : March 5 ~ March 20. ....	105
Fig. 22. Changes of GSI values on 5-hydroxytryptamine (5-HT), HCG and Ecdysone (EDS) injection in female prawn, <i>P. chinensis</i> kept at 10°C and 12L12D condition. Experimental duration : March 5 ~March 20. ....	107
Fig. 23. Comparison of number of spawning eggs in unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, <i>P. chinensis</i> kept	

	at 10°C and 12°C during one months (from January 2 to February 7). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group) .....	114
Fig. 24.	Haching rates of unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, <i>P. chinensis</i> ketp at 10°C and 12°C during one month (from January 2 to February 7). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group) .....	115
Fig. 25.	Comparison of number of spawning eggs in unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, <i>P. chinensis</i> ketp at 8°C, 10°C and 12°C during two months (from January 2 to March 9). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group) .....	117
Fig. 26.	Haching rates of unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, <i>P. chinensis</i> ketp at 8°C, 10°C and 12°C during two months (from January 2 to March 9). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group) .....	120
Fig. 27.	Identification of WSSV-infected prawn by nested PCR amplification. ....	132
Fig. 28.	Changes of water temperature during the maturation induction. (range : 11.4 - 19.6 °C, mean 16.5°C) .....	136
Fig. 29.	Changes of survival rate of <i>P. chinensis</i> during the maturation induction. ....	137

Fig. 30. Comparison of ovarian development stages on 23 days-culture. Eystalk ablation A and B, data from tanks A and B. ....140

Fig. 31. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product from winter population of *P. chinensis*, 1998. White bands indicete WSSV-porsitive individuals. ....144

Fig. 32. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product from spring population of *P. chinensis*, 2000. White bands indicete WSSV-porsitive individuals. ....145

Fig. 33. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product with larvae from non-SPF broodstock (above) and broodstock (below). White bands indicete WSSV-infercted individuals. + and -: positive and negative controls. ....148

여 백

# 목 차

표 목차 .....	40
그림 목차 .....	42
제 1 장 서 론 .....	45
제 2 장 친하 관리 .....	47
제 1 절 서 론 .....	47
제 2 절 재료 및 방법 .....	48
1. 실험 동물 .....	48
2. 사육 조건 .....	48
2. 조직학적 조사 .....	50
4. 교미율 조사 .....	50
제 3 절 결과 및 고찰 .....	51
1. 생식주기와 교미율 .....	51
2. 친하의 실내 양성 .....	60
제 3 장 생식소 성숙 유도 .....	73
제 1 절 서 론 .....	73
제 2 절 재료 및 방법 .....	74
1. 실험 동물 .....	74



2. 수온과 일장에 대한 사육실험 .....	75
3. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도실험 .....	75
4. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬의 분리 .....	76
5. 신경분비 호르몬에 의한 성 성숙 유도 효과 실험 .....	76
6. 성성숙 유도 호르몬제의 투여에 의한 생식소 성숙 유도실험 .....	78
제 3 절 결과 및 고찰 .....	79
1. 생식소 성숙에 대한 수온과 일장의 영향 .....	79
2. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도 .....	91
3. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬 처리에 의한 생식소 성숙효과 .....	97
4. 성성숙 유도물질에 의한 생식소 성숙 유도 .....	102
제 4 장 산란 유도 .....	109
제 1 절 서 론 .....	109
제 2 절 재료 및 방법 .....	110
1. 대하 채집과 수육 .....	110
2. 산란양 및 부화율조사 .....	111
3. 산란유도 실험 .....	111
제 3 절 결과 및 고찰 .....	112
1. 월동조건과 안병절제에 따른 산란양과 부화율 .....	112
2. 수온과 염분농도에 따른 산란유도효과 .....	119
3. 안병절제에 의한 산란유도 .....	123

4. HCG 투여에 의한 산란유도 .....	124
제 5 장 바이러스 비감염 건강종묘생산 및 양성 .....	127
제 1 절 서 론 .....	127
제 2 절 재료 및 방법 .....	128
1. 친하의 채집 및 월동사육관리 .....	128
2. 자연산 대하의 바이러스 감염율 .....	129
3. 건강종묘 생산 .....	131
4. 건강종묘를 이용한 새우양식 .....	134
제 3 절 결과 및 고찰 .....	135
1. 친하의 채집 및 월동사육관리 .....	135
2. 자연산 대하의 바이러스 감염율 .....	141
3. 건강종묘생산 .....	143
4. 건강종묘를 이용한 새우양식 .....	150
제 6 장 참 고 문 헌 .....	155

## 표 목 차

표 1. 대하의 자연상태와 양성장에서의 교미율 비교 .....	59
표 2. 동계 사육수온에 따른 대하의 탈피빈도 .....	66
표 3. 월동 사육 수온에 따른 대하의 개체당 일일 먹이 섭취량 .....	67
표 4. 안병으로부터 추출하여 Sephadex G50로 분리하여 얻은 fraction group의 징거미새우에 대한 성숙속 및 산란억제효과 .....	99
표 5. 흉부신경절 추출물을 Sephadex G50으로 분리하여 얻은 fraction에 대한 징거미새우의 생식소 성숙 유도 효과 .....	101
표 6. 월동조건에 따른 산란양과 산란까지 걸리는 소요일수 .....	118
표 7. 수온처리에 의한 대하의 산란율 .....	121
표 8. 수온과 염분농도에 따른 대하의 산란율 .....	122
표 9. 안병절제에 의한 대하의 산란 유도 효과 .....	123
표 10. HCG 투여에 의한 대하의 산란유도 효과 .....	125
표 11. 건강종묘를 입식한 양식장 현황 .....	134
표 12. 친하 성숙유도 사육기간동안의 생체량 및 생식소 속도지수(GSI)의 변화. ....	138
표 13. 23일의 성숙유도기간 동안 난소발달단계 빈도 .....	139

표 14. 대하 자연산 동계군의 바이러스 감염율 .....	142
표 15. 춘계산란군 자연산 모하의 바이러스 감염율 .....	143
표 16. 실내 성숙유도의해 바이러스 비감염 대하에서 생산된 산란량 .....	146
표 17. 바이러스 비감염 건강모하에서 생산된 유생의 PCR 분석 결과 .....	149
표 18. 일반 모하에서 생산된 유생의 PCR 분석 결과 .....	150
표 19. 건강종묘 양식장의 월별 바이러스 감염율 .....	151
표 20. 일반종묘 양식장의 월별 바이러스 감염율 .....	152
표 21. 건강종묘를 입식한 양식장의 생산량 및 생존율 .....	153

## 그 립 목 차

그림 1.	보령지역의 월별 수온 변화. ....	52
그림 2.	대하 난형성과정 과정. 1과 2: 전 난황 형성기, 3와 4: 1차 난황형성기, 5와 6: 2차 난황형성기, 7과 8: 완숙기. Cg, 표층포 과립; Fc, 여포세포; M, 미토콘드리아; Ne, 인; PO, 전난황형성기 난모세포; PVO, 1차 난황형성기 난모세포; SVO, 2차난황형성기 난모세포; RER, 조면소포체; RO, 완숙기 난모세포. ....	54
그림 3.	보령지역에서 채집된 대하새우 암컷의 월별 GSI의 변화. ....	57
그림 4.	자연상태에서 채집된 대하 암컷 두흉갑장의 월별 변화. ....	58
그림 5.	친하의 사육실험 기간동안 사육수조의 수온과 자연일장변화. ....	61
그림 6.	사육 일장조건에 따른 대하의 성장. ....	62
그림 7.	사육 일장조건이 추계의 대하 일일탈피빈도에 미치는 영향. ....	64
그림 8.	월동수온에 따른 생존율의 변화. ●: 안병 한쪽을 절제한 실험군; ○: 안병을 절제하지 않은 무처리 실험군. ....	70
그림 9.	대하새우 신경분비 hormone 추출방법. (modified Yang et al., 1996). ....	77
그림 10.	사육기간동안 수온변화와 일장 조건에 따른 GSI의 변화 (9월20~11월20일). *는 사육실험 초기의 대조구 GSI와 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타냄. ....	80
그림 11.	겨울철 대하의 난소 성숙에 미치는 수온과 일장 영향. ....	82
그림 12.	겨울철(12월5일 - 2월6일) 사육 수온과 일장 조건에 따른 난소조직	

의 변화. A: 대조구, B and C: 8°C의 장일과 단일 실험구, D: 15°C와 22°C 실험구. Fc, 여포세포; PO, 전난황형성기 난모세포; PVO, 1차 난황형성기 난모세포. ....83

그림 13. 동계 (2월 5일~3월 25일) 대하의 난소 성숙에 미치는 수온의 영향. ....86

그림 14. 수온 상승에 의한 난소성숙효과. A: 2월 25일 8°C의 난소 조직상, B: 수온을 8°C에서 15°C로 상승시켰을 때 3월 25일의 조직상, C: 3월 25일 15°C의 조직상. C: 3월 25일 15°C의 조직상. Cg, 표충포 과립; Fc, 여포세포; PO, 전난황형성기 난모세포; RO, 완숙기 난모세포. ....87

그림 15. 월동 사육수온에 따른 GSI의 변화. ....90

그림 16. 15°C에서 사육한 대하의 안병질제에 따른 GSI의 변화. ....92

그림 17. 월동수온 8°C, 10°C 그리고 12°C에서 사육한 대하의 안병질제에 따른 GSI의 변화. ....95

그림 18. 대하의 안병추출물을 Capcell Pak C18)에 의해 분리한 후 Sephadex G50으로 분리한 분획상. ....98

그림 19. 대하의 흉부신경절 추출물을 Capcell Pak C18)에 의해 분리한 후 Sephadex G50으로 분리한 분획상. ....100

그림 20. 5-hydroxytryptamine(5-HT)의 투여에 의한 대하 암컷의 GSI 변화. ....103

그림 21. Ecdysone (EDS)와 HCG 처리에 의한 대하 암컷 GSI의 변화. 사육실험기간: 3월 5일부터 3월 20일까지 .....105

그림 22. 5-hydroxytryptamine (5-HT), HCG 그리고 Ecdysone (EDS)처리에 따른 GSI의 변화. ....107

그림 23. 1개월간의 월동 수온조건(10℃와 12℃)에서 산란양에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 2월 7일. ....	114
그림 24. 1개월간의 월동 수온조건(10℃와 12℃)에서 대하의 부화율에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 2월 7일. ....	115
그림 25. 2개월간의 월동 수온조건(8℃, 10℃ 그리고 12℃)에서 대하의 산란양에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 3월 9일. ....	117
그림 26. 2개월간의 월동 수온조건(8℃, 10℃ 그리고 12℃)에서 대하의 부화율에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 3월 9일. ....	120
그림 27. PCR 증폭에 의한 흰반점바이러스 감염 새우의 분석 모식도. ....	132
그림 28. 친하의 성숙유도 사육기간동안 사유구의 수온변화. ....	136
그림 29. 대하 친하의 성숙유도 사육 기간동안 생존율 변화. ....	137
그림 30. 23일 성숙유도 사육기간동안 난소발달단계의 비교. 안병절제구 A, B는 사육수조 A, B의 data임. ....	140
그림 31. 1998년도 겨울 남하개체군 암컷의 PCR 결과의 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 PCR 양성반응 개체들임. ....	144
그림 32. 2000년도 춘계 산란개체군 암컷의 PCR 결과의 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 PCR 양성반응 개체들임. ....	145
그림 33. 일반 모하 (위) 및 바이러스 비감염 모하 (아래)에서 생산된 유생의 PCR 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 바이러스에 감염된 개체들임. ....	148

# 제 1 장 서 론

보리새우과(Penaeidae)에 속하는 새우들은 대부분 중·대형 새우로 산업적으로 매우 중요한 종들이며, 우리 나라에는 12종이 서식하고 있다고 알려져 있다(Kim,1977). 이들 중 대하(*Penaeus chinensis*)는 북위 30°에서 40°사이의 서해남부에서부터 발해만에 이르기까지 황해 전 해역에 분포하고 있으며, 최대 두흉갑의 크기가 50mm, 체장이 200mm, 무게가 70g에 이르는 대형종으로 우리 나라와 중국에서는 보리새우와 함께 경제성이 큰 양식 대상종으로 높이 평가받고 있다.

우리 나라에서 보리새우류 양식생산량을 보면 보리새우의 경우는 1985년에 44톤, 1990년에 55톤, 1994년에 58톤을 생산하였으나 1999년에는 35톤이하로 생산량이 감소하였다. 그러나 대하는 1985년에 39톤, 1990년에 257톤, 그리고 1994년에 517톤을 생산하여 매년 증가추세에 있으며 1997년에는 1,533톤으로 최대의 생산량을 기록하였다. 그후 바이러스에 의한 피해로 1998년에는 998톤을, 1999년에는 1,142톤을 생산하였다 (해양수산통계연보, 2000).

10여년 전에 중국에서부터 처음으로 흰반점바이러스(WSSV, white spot syndrome virus)에 의한 흰반점증후군(WSSD, white spot syndrome disease)이 보고된 이후로 중국, 대만 일대뿐만 아니라 아시아 전역으로 확산되기 시작하여 새우류 생산에 막대한 피해를 입히고 있다. 중국의 일부 지역에서는 바이러스에 의한 보리새우류의 전멸로 막대한 피해를 주어 자원회복이 불가능할 정도에 이르렀으며, 일본에서는 4년 전부터 이 바이러스에 의한 질병이 나타나기 시작하여 바이러스에 감염되지 않은 건강 종묘생산의 필요성을 제시하고 있다. 우리 나라에서도 1993년 충남과 전북의 일부 새우 양식장에서 처음 발견되면서 피해가 나타나기 시작하여 1996년도에는 대하의 생산량이 지역에 따라 50~75%나 감소하는 피해를 입었으며



그 피해는 앞으로 더욱 커질 전망이다. 그러나 이러한 바이러스에 대한 예방이나 치료법은 아직 개발되지 않아 대하양식업자들은 단지 사육시설의 청결이나 사육수의 관리에 최선을 다하여 수평감염의 기회를 줄이는데 전적으로 의존하고 있는 실정이다.

바이러스 감염과정은 어미새우에서 치하에게 감염되는 수직감염과 부화후 주위로 환경으로부터 전염되는 수평감염이 있는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서 대하 종묘는 초봄 자연에서 대부분 보균 상태에 있는 성숙한 친하를 채집한 후 실내에서 채란하여 종묘를 생산하고 있기 때문에 우리나라에서 생산되고 있는 대하 종묘는 바이러스의 수직감염으로부터 완전히 노출되어 있는 상태에 있다고 할 수 있다.

대하는 바이러스 감염시기가 늦을수록 발병시기가 늦고 단위면적 당 생산량도 높다는 보고가 있기 때문에 대하의 양식생산을 지속적으로 증가시키기 위해서는 바이러스에 감염되지 않은 건강한 종묘를 생산하여 일차적으로 수직감염을 차단하여 양성한다면 높은 양식생산량을 기대할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 바이러스에 비감염된 건강한 종묘생산 방안을 마련하기 위하여 바이러스에 감염되지 않은 건강한 어미새우의 확보방안을 마련하고 이들을 인위적으로 사육관리하면서 성 성숙을 인위적으로 조절하여 건강한 수정란을 대량으로 확보할 수 있는 방법을 개발하고자 한다. 또한 건강한 수정란으로부터 종묘생산하여 수직감염이 안된 종묘를 양성하였을 때 바이러스로부터 수평감염과 피해양상을 조사하고 아울러 생산효과를 조사하여 바이러스로부터 피해를 최소화함으로써 대하의 생산량을 증대시킬 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

## 제 2 장 친하관리

### 제 1 절 서 론

우리나라에서 대하의 종묘생산은 3-4월경 자연상태에서 생식소가 완숙한 상태의 모하를 채집하여 실내에서 수온 자극에 의해 채란하여 종묘를 생산하고 있기 때문에 대부분의 양식업자들이나 연구자들은 채묘를 위한 친하의 장기간 사육관리에 대한 중요성을 인식하지 못해 이에 대한 연구가 전무한 상태이다.

그러나 대하의 분포와 회유생태에 대한 연구는 오래 전부터 보고되어져 왔으며(池末, 1962; Lui, 1989), 유생사육이나 양성을 위한 저질조건, 적정수온범위, pH, 염분농도 등 물리 화학적 사육 환경의 최적요인에 대해서는 많은 연구들이 있었다(Choi and Song, 1971; Song et al., 1971; Rho, 1990; Hu, 1990; Yang, 1990). 이들 연구에 의하면 대하는 5-6월경에 산란 부화한 후 4-5개월 후면 친하로 성장하여 교미하여 다음해 봄에 산란 후 죽는 단년생으로 알려져 있으며, 주로 황해에서 서식하는 廣溫性種(eurythermal species)으로 수온이 18℃에서 30℃사이에 성장이나 활동이 활발하며 13℃이하가 되면 행동이 둔화되며, 3℃나 4℃이하가 되면 저질속에 동면을 하든지 그렇지 않으면 죽는다고 알려져 있다(Yang, 1990). 그리고 Okamasao (1970)는 24℃가 가장 성장이 좋으며 25℃이상에서는 그 성장이 둔화된다고 보고하고있다. 생존가능 염분농도의 범위도 5-40‰로 광염성 종으로 알려져 있으며 최적 염분농도는 31‰전후로 보고하고 있다.

그러나 이들 연구는 주로 치하나 12월 전까지 대하의 성장효과에 대해서만 연구되어 있고 그 후 월동하여 채란용 모하로 이용하기 위한 생식소 성숙시기에서 산란시기까지의 친하의 사육관리에 대한 연구는 거의 찾아보

기 힘들며, 단지 부화율에 미치는 지질의 영향(Xu et al., 1994)과 증금속의 영향(Yuan et al., 1992) 등의 보고만 찾아볼 수 있었다.

본 연구에서는 생식주기와 교미시기, 그리고 지금까지 밝혀지지 않은 성장과 일장과의 관계를 비롯하여 교미 후 성 성숙시기와 산란시기까지의 동절기와 춘계사이의 모하의 월동수온에 따른 성장과 탈피, 생존율, 먹이 섭취 등에 대하여 조사하여 체란용 모하의 사육관리 방안을 마련하고자 한다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 실험 동물

생식년주기를 조사하기 위한 대하는 서해 보령 외연도 부근에서 낭장망(망목: 9.8mm)으로 채집한 것을 이용하였으며, 채집이 되지 않은 기간은 보령지역에 양성중인 대하를 구입하여 이용하였다.

대하의 추계 실내양성 실험을 위하여 8월 20일과 9월 10일 태안 소재의 양식업자로부터 대하새우를 구입하였으며, 동계 실내월동 사육실험을 위하여 11월 29일과 12월 15일에 자연상태의 대하를 구입하였다. 구입된 대하는 국립수산진흥원 태안수산시험장과 동의대학교 생물생산연구소 사육실로 옮겨 사육실험이 시작될 때까지 약 5 Ton 원형 수조( $\phi 2.5\text{m} \times 1.0\text{m}$ ) 4개에 각각 150마리씩을 수용하여 자연 수온조건하에서 수용하였다.

### 2. 사육 조건

#### 1) 추계 실내양성실험

사육 일장조건이 대하의 성장과 탈피에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.5 Ton 원형수조에 5마리씩 수용하였으며, 수조 4개를 하나의 실험구로 구

획한 후 차광막을 장치하여 일장을 조절하였다. 일장의 길이는 차광막 상부에 부착시킨 형광등에 timer를 설치하여 조절하였다. 일장실험 조건은 9L15D, 12L12D, 15L9D 그리고 자연조건의 4개의 실험구로 나누었다. 8월 25일부터 10월 13일까지 50일간 실험 사육하여 각 일장조건에 따른 생존율과 두흉갑장, 전장, 체중 등을 조사하였다. 이때 수온은 자연수온 조건으로 하였으며 매일 수온을 조사하였다. 먹이로는 반지락 육편과 갯지렁이를 하루에 2회 투여하였다.

## 2) 동계 월동사육실험

동계의 적정 월동수온 조건을 조사하기 위하여 상기한 사육수조를 이용하여 1차로 수온 10℃, 15℃ 그리고 20℃의 3개의 실험구로 나누고, 1997년 12월 5일부터 이듬해 2월 3일까지 60일간 사육하여 생존율, 탈피회수를 조사하였다.

2차로 월동 수온조건을 8℃, 10℃ 그리고 12℃로 나누어 3개의 실험구를 설정하고 1998년 12월 29일부터 이듬해 2월 29일까지 60일간 사육하여 상기한 생존율, 먹이 섭취율을 조사하였다.

수온조절은 히터에 온도조절기를 부착하여 조절하였으며 일장은 자연일장조건으로 하였다.

월동사육 기간동안 오징어(*Todarodes pacificus*) 육편을 1일 1회 16:00경에 먹이로 공급하고 다음날 공급하기 전 먹고 남은 먹이를 전량 수거하여 일간 섭취량을 조사하였다. 일간 섭취량의 조사는 공급하기 전에 습중량으로 50g의 먹이를 공급하고 섭이 후의 남은 잔량을 전량 회수하여 건중량으로 환산하여 일간 섭취량으로 계산하였다. 건중량은 70℃에서 24시간 건열 후 0.001g까지 측정하였다.

### 3. 조직학적 조사

생식주기를 조사하기 위해 매월 구입된 대하는 실험실에서 두흉갑장, 체장 및 체중 그리고 생식소의 무게를 계측한 후 생식소는 Bouin's 용액에 24시간 고정하여 상법인 파라핀 절편 법에 의해 4~6 $\mu$ m 두께로 연속 박편하여 조직 절편을 만들었다. 조직절편은 Hansen's hematoxylin 과 eosin 으로 이중 염색하여 조직의 발달상태를 검경하였으며 생식소의 성숙상태는 생식소 성숙도 지수 (gonadosomatic index :  $GSI = \text{생식소 중량} / \text{체중} \times 100(\%)$ )로 나타내었다.

난소발달의 미세구조 조사하기 위해 2.5% glutaraldehyde (0.2M phosphate buffer, pH 7.2)에 4시간 동안 1차 고정한 후, 1% osmium tetroxide 에 2시간 동안 후고정하여 ethyl alcohol series로 탈수하였다. 포매는 epon 812를 사용하였다. ultra-microtome에 의한 초박편 절편은 200 mesh copper grid에 부착한 후 uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색하였다. 염색된 절편은 투과형 전자 현미경 (JEM 1200EX-II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

난 형성 단계는 Hong(1977)의 방법 따라 난황형성전기 (previtellogenesis stage), 제1차 난황형성기 (primary vitellogenesis stage), 제2차 난황형성기 (secondary vitellogenesis stage), 완숙기(ripe stage)의 4단계로 나누었다.

### 4. 교미율 조사

자연상태와 양성장에서의 교미율 변화와 교미시기를 정확하게 조사하기 위하여 3,000평의 대하새우 양성장으로부터 11월 10일과 22일, 12월 5일에 각각 50마리를 채집하였으며, 자연상태에서는 11월 22일, 12월 3일과 19일에 어획된 것을 구입하였다. 암컷 교접기의 저정낭내의 정자를 확인하여 교미상태를 확인하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 생식주기와 교미율

#### 1) 생식주기

##### 수온의 변화

1997년 3월에서 1998년 12월까지의 생식년주기 조사 기간중 수온의 월별 변화는 그림 1에 나타내었다. 조사 기간 중 수온의 변화는 4~27℃ 범위로 4월에는 8.5℃를 나타내었으며 산란기인 5월과 6월에는 14, 19℃를 나타내었다. 수온은 더욱 상승하여 8월에는 27℃에 이르렀다. 9월의 수온은 23℃로 하강하기 시작하여 11월에는 7℃, 다음해 2월에는 4℃로 연중 최저 수온을 나타내었다. 그후 3월부터는 수온이 상승하기 시작하여 4월에는 12℃, 5월에는 14℃에 이르렀다.

##### 난 형성 과정

대하 새우의 난소는 두흉부의 심장이 있는 부분을 중심으로 전방은 세엽으로 된 돌기가 좌우로 7쌍이 복부 끝까지 뻗어 있으나 항문 주위에서 다시 융합하며, 앞쪽으로 길게 1쌍이 뻗어 있다. 난소의 크기는 성숙됨에 따라 급속도로 커지며 색은 무색에서 황색, 담황록색, 청록색으로 나타난다.

난 형성 과정은 Hong(1977)의 구분 방법을 이용하여 4단계로 나누었으며, 난소내에 있는 난세포들의 조직학적인 발달상태는 그림 2에 나타내었다.

#### ① 전 난황 형성기 (previtellogenesis) (그림 2-1, 2-2)

난소가 가늘지만 완전한 형태를 갖추고 있으며 이 단계의 조직은 광학 현미경상으로는 주변인기 상태의 세포들이 hematoxylin에 농염되어있는 모습을 관찰할 수 있으며, 여포세포층은 아직 발달되지 않은 상태이다(그림 2-1). 전자 현미경상으로는 세포막이 뚜렷하고 인이 핵의 가장자리에 위치하고 있다.

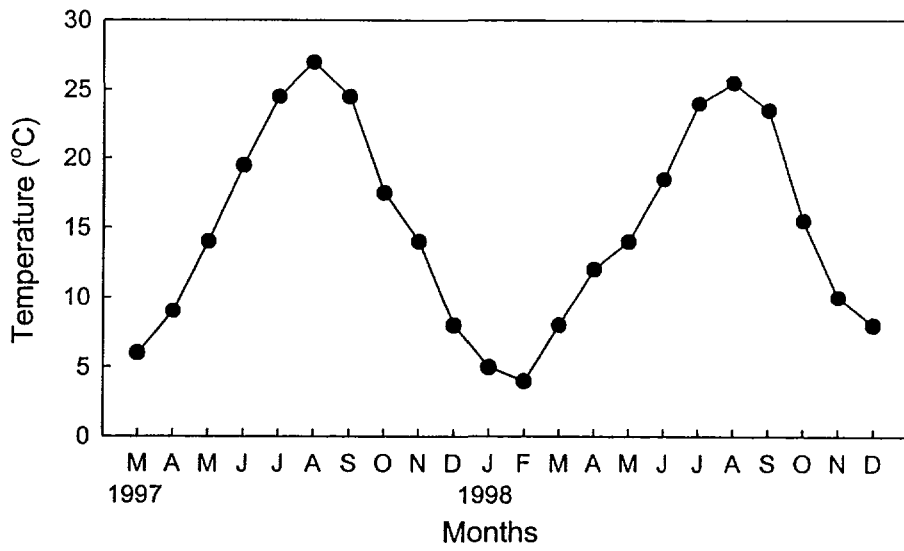


그림 1. 보령지역의 월별 수온 변화

Fig. 1. Monthly variation of water temperature in Poryong area.

조면소포체는 아직 발달되어 있지 않으며, 미토콘드리아는 일부 관찰되었다(그림 2-2).

② 1차 난황형성기 (primary vitellogenesis) (그림 2-3, 2-4)

난소는 약간 팽대 해지고 옅은 황색을 띤다. 조직상은 인이 불명확해지고 난세포를 둘러싼 여포세포층이 잘 발달하기 발달한다(그림 2-2). 전자 현미경 상으로 세포막이 뚜렷하고 핵 근처의 세포질에는 잘 발달된 부정형의 조면 소포체들이 관찰되며 미토콘드리아도 많이 관찰된다(그림 2-4).

③ 2차 난황형성기 (secondary vitellogenesis)(그림 2-5, 2-6)

난소는 담황록색을 띠며 난모세포가 더욱 성장하면서 세포질이 비대해지고 세포질에는 eosin에 적색으로 염색된 난황구가 축적되어 있다. 핵은 편평하거나 불규칙한 형상으로 되며 여포세포층의 두께는 감소한다(그림 2-5). 전자 현미경상으로는 세포질에는 지방과립과 난황 과립, 조면 소포체들로 채워져 있었으며 세포막에서는 미세융모가 발달되어 외부로부터 난황물질의 모습도 관찰된다(그림 2-6).

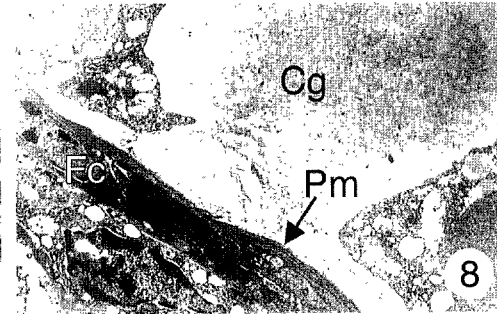
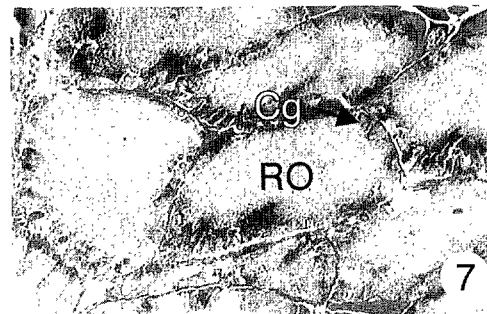
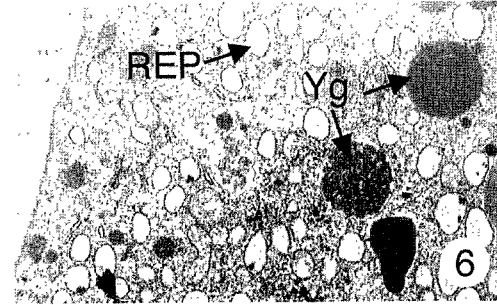
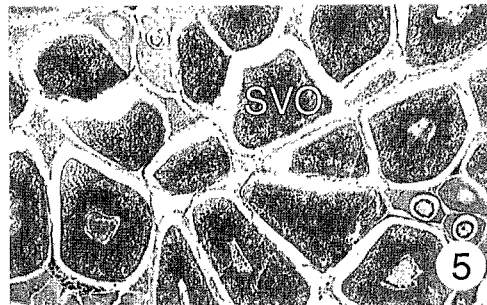
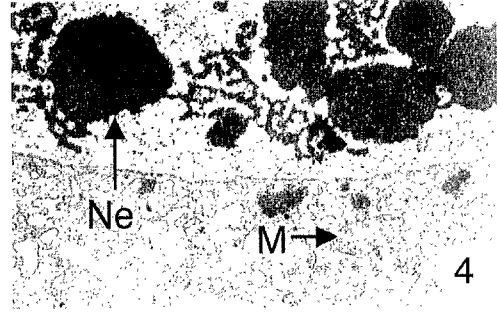
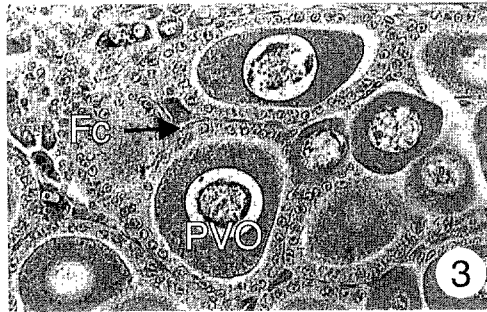
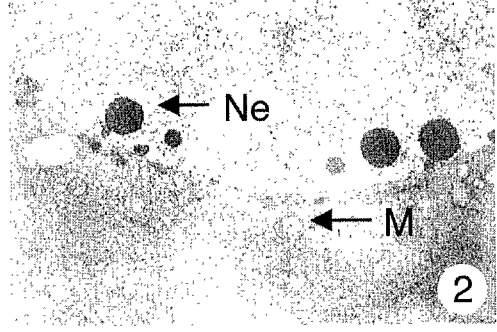
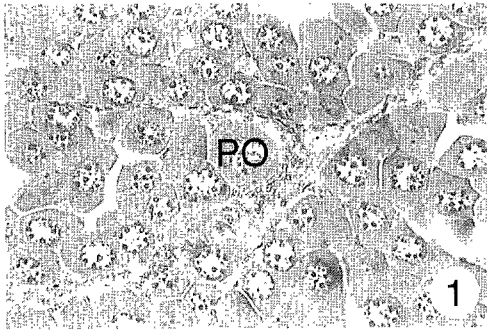
④ 완숙기 (maturation stage) (그림 2-7, 2-8)

난소가 짙은 청록색이 되고 최대로 비대해진다. 세포의 가장자리에 표층포(cortical alveoli)가 관찰된다(그림 2-7). 전자 현미경상으로는 표층포로부터 난막형성이 되는 것을 관찰할 수 있다(그림 2-8). 이러한 표층포는 보리새우과(Family Penaeidae)에 속하는 성숙한 난모세포에 나타나는 특성으로 표층포의 유무에 의해 난모세포의 완숙상태를 판단하는 기준이 되기도 한다(Josefa and Pudadera, 1989; Chow, 1993). Hong(1977)은 전자현미경상에서 보리새우의 표층포는 결정상태로 존재하고 있다고 보고하고 있으나, 본 종에서 표층포는 결정상태로 존재하는 모습은 보이지 않고 구성 형태가 보리새우와는 다른 모습이었다. 이는 표층포의 성분이나 특성이 종에 따라 다를 수 있음을 보여주고 있다.



그림 2. 대하 난형성과정 과정. 1과 2: 전 난황 형성기, 3와 4: 1차 난황 형성기, 5와 6: 2차 난황형성기, 7과 8: 완숙기. Cg, 표층포 과립; Fc, 여포세포, M, 미토콘드리아; Ne, 인; PO, 전난황형성기 난모세포; PVO, 1차 난황형성기 난모세포; SVO, 2차난황형성기 난모세포; RER, 조면소포체.

Fig. 2. Developmental stages of oogenesis of *P. chinensis*. 1 and 2: previtellogenesis stage, 3 and 4: primary vitellogenesis stage, 5 and 6: secondary vitellogenesis stage, 7 and 8: maturation stage. Cg, cortical granule; Fc, follicle cell, M, mitochondria; Ne, nucleolus; PO, previtellogenesis oocyte; PVO, primary vitellogenesis oocyte; SVO, secondary vitellogenesis oocyte; RER, rough endoplasmic reticulum.



## 암컷의 월별 GSI의 변동

대하 새우의 암컷의 GSI의 월별 변화는 그림 3에 나타내었다. 97년 4월에 9.5%로 높은 값을 보였고 5월에는 연중 최고 값인 10%에 이르렀으며, 이때 암컷들은 대부분 완숙상태에 있었다. 이러한 높은 값은 6월까지 유지되었으며, 간혹 산란하여 생식소가 퇴화상태에 있는 개체들이 보였다. 그후 7월에는 GSI가 2%로 급격히 하강하여 대부분 퇴화상태의 난소를 가진 암컷들이어서 대부분 산란된 것으로 생각되었다. 이러한 결과로 보아 대하의 주산란시기는 5월에서 6월이라고 보여진다. Rho(1990)는 우리 나라의 대하의 산란시기는 수온이 14℃에서 18℃에 이르는 4월에서 6월까지이며 주 산란기는 5월중순경이라고 하였다. 본 연구의 조사에서 산란시기가 Rho(1990)의 보고보다 보름정도 다소 늦어진 경향을 보였으나 이는 매년 변하는 수온의 변화에 의한 것이라고 보여진다. 산란기가 지나 8월에는 0.5%로 연중 최저 값을 나타내었으며, 이어 9월에는 0.75% , 10, 11, 12월에는 1%정도의 낮은 GSI값이 지속되었다. 그후 다시 GSI가 조금씩 상승하여 다음해 4월에는 7%였으며 5월에는 8%, 6월에는 15%로 연중 최고 값을 나타내었으며 산란한 개체들이 나타나기 시작하였다. 다시 8월에는 0.5%로 떨어져서 9, 10, 11, 12월에는 0.6, 0.9, 2.2, 2.3%로 낮은 값이 지속되었다.

이러한 GSI의 연간 변화와 조직학적인 변화에 의해 미숙기(virgin period)(8월~다음해 2월), 성장기(growing period)(2월~3월), 난황형성기(vitellogenesis period)(3월~5월), 완숙 및 산란기(ripe and spawning period)(5월~6월), 퇴화기(resting period)(7월)로 나눌 수 있었다.

또한 자연상태에서의 성장과 수명을 확인하기 위하여 4월부터 12월까지 채집된 개체들의 두흉갑장의 평균 크기의 월별 변화를 조사하여 비교한 결과를 그림 4에 나타내었다. 4월부터 7월까지 채집된 개체들의 두흉갑장의 크기가  $45.13 \pm 3.55\text{mm} \sim 47.70 \pm 2.16\text{mm}$  범위의 것들이었는데 반하여 8월에 채집된

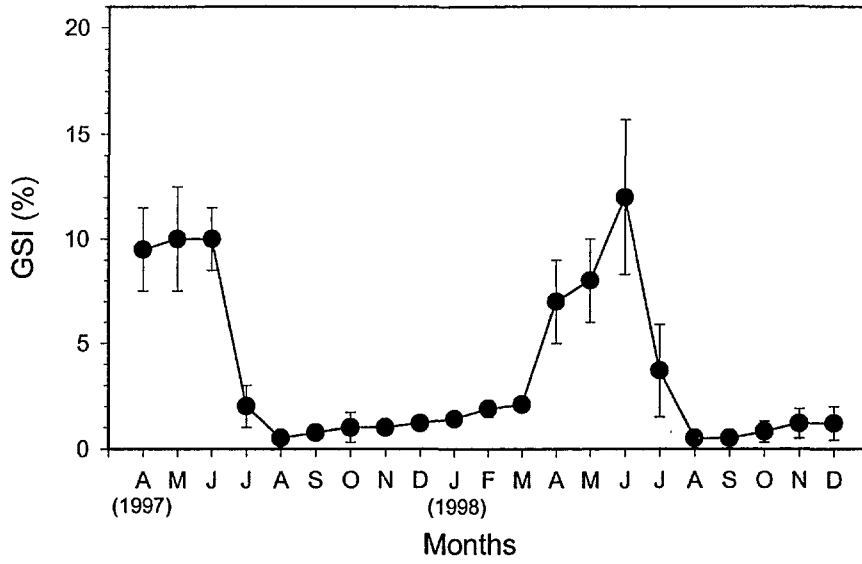


그림 3. 보령지역에서 채집된 대하새우 암컷의 월별 GSI의 변화  
 Fig. 3. Monthly variation of GSI in female prawn, *P. chinensis* captured at Poryong area

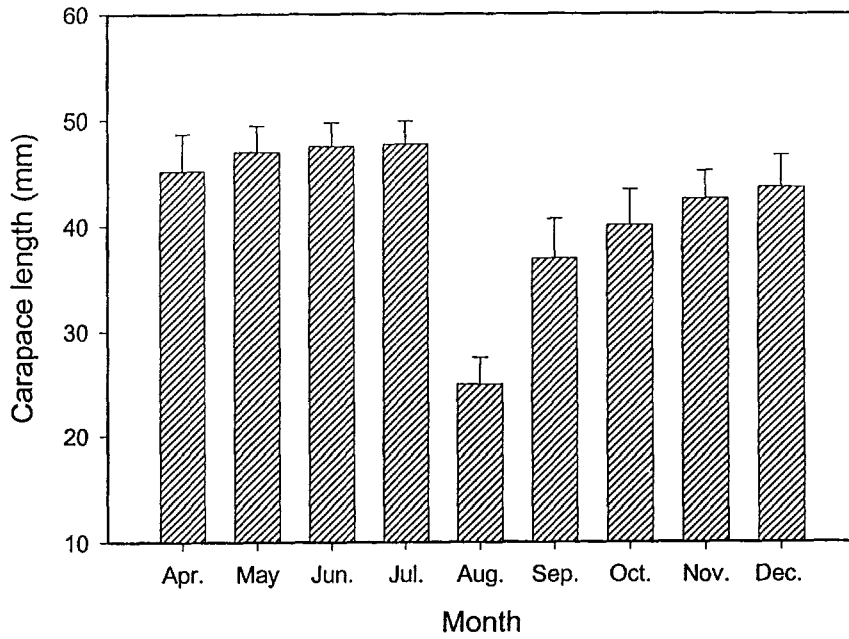


그림 4. 자연상태에서 채집된 대하 암컷 두홍갑장의 월별 변화  
 Fig. 4. Annual changes of carapace length of female prawns, *P. chinensis* captured in natural condition.

개체들의 두흉갑장은  $24.89 \pm 2.57\text{mm}$ 로 두흉갑장이 45mm이상의 개체들은 전혀 채집이 되지 않았다. 9월에서도 채집된 개체들의 두흉갑장은  $36.92 \pm 3.75\text{mm}$ 로 8월에 비해 유의한 성장을 보였으며, 그후 12월까지 점차로 성장하여 12월에는 두흉갑장의 길이가  $43.58 \pm 3.03\text{mm}$ 에 이르렀다. 이러한 두흉갑장의 월별 변화의 결과로 대하는 6월경에 부화되어 성장하여 다음해 5~6월경에 산란하고 7월에 죽는 단년생인 것으로 확인되었다.

## 2) 교미율

대하의 교미 완료시기가 언제인지를 알기 위해 자연상태에서 채집한 대하와 양성장에서 채집한 대하의 월별 교미율을 조사하여 표 1에 나타내었다.

표 1. 대하의 자연상태와 양성장에서의 교미율 비교  
Table 1. The copulation rate of *P. chinensis* reared in natural habitat and a pond in 1998.

Date (1999)	Copulation rate (%)	
	Pond	Natural habitate
Nov. 10	21.63	
Nov. 22	80.89	55.63
Dec. 3		90.10
Dec. 5	96.87	
Dec. 19		94.76

대하는 11월초에 양 성장에 서식하고있는 암컷들은 약 1/5에 해당하는 21.6%가 교미를 완료한 상태였으며 11월말 경에는 80%이상이 교미를 한 상태이었

다. 그러나 자연상태에서는 11월말에 약 1/2에 해당하는 55.6%가 교미를 한 상태이었다. 12월초가 되면 양성장이나 자연상태에서 모두 대부분의 암컷들은 교미가 이루어져 90%이상이 교미전을 가진 상태이었다.

이처럼 양성장보다 자연상태가 교미율이 낮은 것은 암컷과 수컷의 만날 수 있는 기회를 제공해주는 서식 밀도에 관계한다고 볼 수 있다.

대하의 암컷들은 11월에 교미를 하고 월동한 후 3월이후 수온이 상승하면서 난모세포내에 난황이 형성되면서 난소가 성숙하고 6월에 산란이 이루어지면서 수정이 된다. 이처럼 대하는 생식보조기내에 정포를 약 6개월 동안 장기간 지니고 있다. 그러나 같은 보리새우과에 속하는 중하(*Metapenaeus joyneri*)는 난모세포 내에 난황이 형성되어 난소가 완전히 성숙한 후 산란 직전에 교미가 이루어진다고 보고하고 있다(차, 1997). 이처럼 교미시기도 종에 따라 특이성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

## 2. 친하의 실내 양성

### 1) 춘계 사육관리

가을철 대하의 성장에 미치는 일장조건의 영향을 조사하기 위하여 자연수온 조건하에서 일장 9L15D, 12L12D, 15L9D와 자연조건(13L11D→11L13D)의 4개의 실험구를 설정하여 50일간 체장, 두흉갑장과 체중의 변화를 조사하였다. 실험기간동안 수온변화와 일장의 변화는 그림 5에 나타내었으며, 체장, 두흉갑장과 체중의 변화의 결과는 그림 6에 나타내었다.

사육실험 직전 사육수온은 27°C이었으며, 8월의 사육수의 수온은 27°C전후로 다소 높았으나 9월, 10월로 접어들면서 차차로 낮아져 실험이 종료되는 10월에는 16°C전후가 되었다. 8월 실험직전 대하의 체장은 9.53mm, 두흉갑장 2.74mm, 체중은 10.28g이었다. 사육 20일후 자연조건에서는 체장은 10.07mm, 두흉갑장은 2.97mm, 체중은 12.27g로 성장하였다. 단일조건

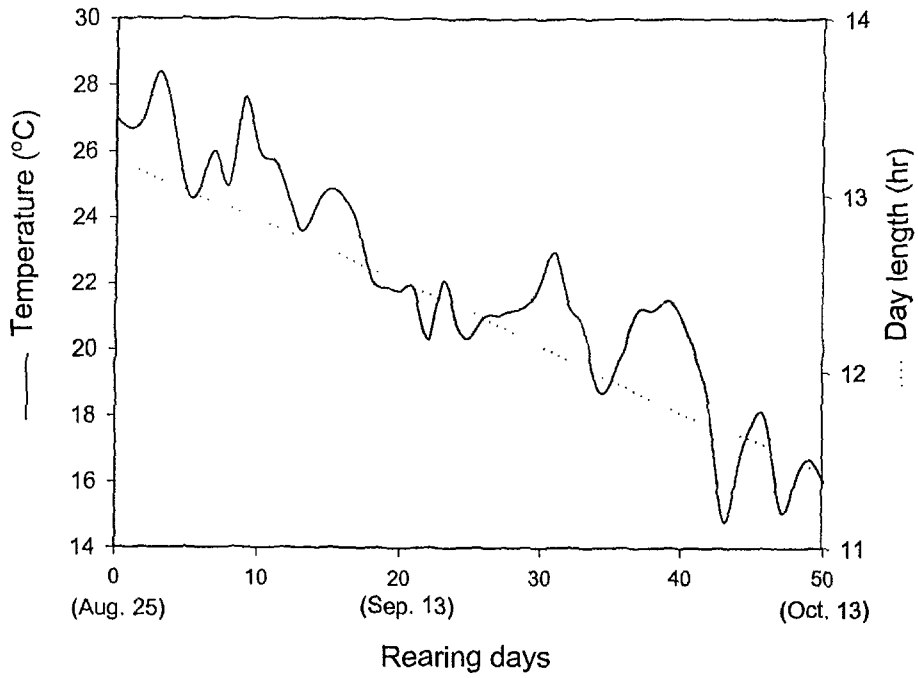


그림 5. 친하의 사육실험 기간동안 사육수조의 수온과 자연일장변화  
 Fig. 5. Changes of water temperature and day length in rearing tanks during experimental period (August 25~October 13).



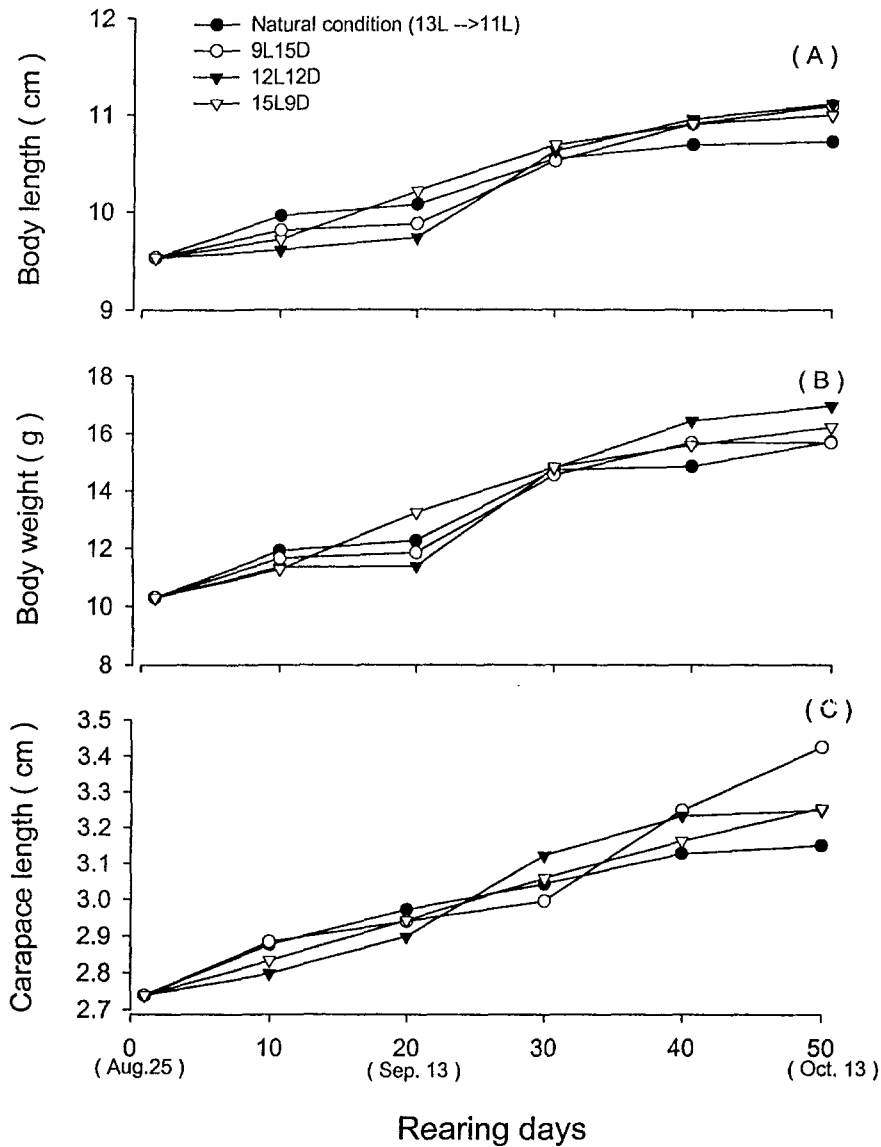


그림 6. 사육 일장조건에 따른 대하의 성장

Fig. 6. Effects of photoperiods on the growth of body length(A), bodyweight (B) and carapace length (C) of *P. chinensis* (August 20 to October 5).

인 9L15D 실험구와 12L12D의 실험구에서는 체장이 각각 9.87mm와 9.73mm, 두흉갑장은 각각 2.94mm와 2.90mm, 체중은 각각 11.86g와 11.39g으로 성장하였다. 그리고 장일 조건인 15L9D 실험구에서는 체장은 10.21mm, 두흉갑장은 2.94mm, 체중은 13.25g로 성장하였다.

실험종료가 되는 10월에 자연조건에서는 체장은 10.73mm, 두흉갑장은 3.15mm, 체중은 15.70g로 성장하였다. 단일조건인 9L15D 실험구와 12L12D의 실험구에서는 체장이 각각 11.10mm와 11.12mm, 두흉갑장은 각각 3.43mm와 3.25mm, 체중은 각각 15.67g와 16.95g으로 성장하였다. 그리고 장일 조건인 15L9D 실험구에서는 체장은 11.10mm, 두흉갑장은 3.25mm, 체중은 16.30g로 성장하였다.

대하는 일장조건에 따라 성장 양상에 어떠한 경향도 찾아볼 수 없었으며 일장에 관계없이 유사한 성장경향을 보여주었다. 이러한 결과는 대하에서는 일장조건이 성장에는 아무런 영향을 주지 않음을 보여주는 것이다.

또한 일장조건에 따른 일일 탈피율의 조사에서 그림 7에서 보는바와 같이 탈피율에서도 9L15D의 조건에서는 0.90%, 13L11D에서 11L13D의 조건으로 서서히 감소한 자연조건에서는 1.01%, 12L12D에서는 1.03%, 그리고 장일조건인 15L9D에서는 1.19%로 일장조건이 길수록 일일 탈피율이 다소 높은 경향을 보이긴 하지만 거의 유의한 경향은 보이지 않았다.

갑각류의 탈피주기에 영향을 미치는 환경요인으로서는 일반적으로 수온과 일장이 알려져 있으며 이에 대한 연구도 많이 이루어져 왔다 (Bliss and Boyer, 1964 ; Aiken, 1969 ; Cheung, 1969 ; Aiken and Waddy, 1975 ; Aiken et al., 1977 ; Marcus, 1980 ; McQueen and Steel, 1980 ; Nelson et al., 1983). 대부분 모든 연구들에서 탈피주기는 수온과 일장의 변화에 영향을 받으며, 수온의 경우가 일장보다 더 큰 영향을 받는다고 보고하고 있다. 특히 Han(1988)의 보고에 의하면 생식과 관련한 생식탈피(reproductive molt)와 성장과 관련이 있는 일반탈피(common

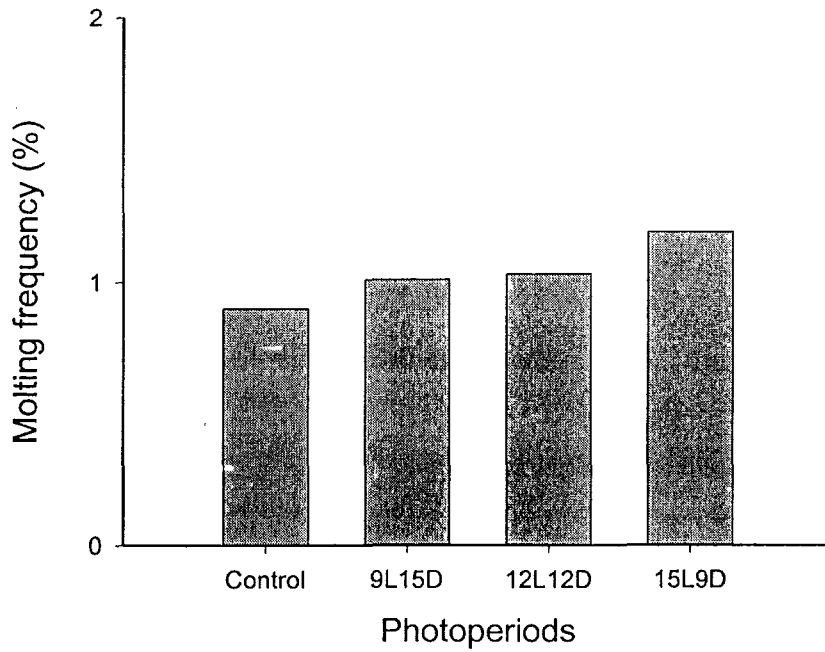


그림 7. 사육 일장조건이 추계의 대하 일일탈피빈도에 미치는 영향.  
 Fig. 7. Effects of photoperiods on the daily molting frequency of *P. chinensis* during fall (August 25 to October 13).

molt)의 두 가지 형태적인 탈피를 행하는 징거미세우(*Macrobrachium nipponense*)에 있어서 수온과 일장에 대하여 탈피주기의 간격과 탈피율을 조사한 실험결과에 의하면 생식탈피의 주기는 수온이 높을 수록 탈피회수가 많아 탈피율이 높지만 같은 수온조건에서는 일장의 길이에 거의 영향을 주지 않은 반면, 일반탈피 주기에서는 수온과 일장 모두 영향을 받는다고 하였다. 즉, 일반탈피 주기에서도 수온은 높을 수록 탈피율이 높게 나타나며, 일장조건에서는 일장시간이 길 수록 탈피간격이 보다 매우 규칙적으로 나타나며 그 길이도 짧다고 보고하고 있다.

본 중에서는 일장의 길이에 따라 탈피율의 유의한 차이는 보이지 않았지만 사육 일장의 조건이 길 수록 탈피율이 높아지는 경향은 보였다. 따라서 본 중에서도 다른 갑각류와 같이 일장의 길이에 다소나마 영향을 받고 있다고 할 수 있다.

## 2) 동계 사육관리

모하로 사용하기 위하여 암컷의 겨울철 적정사육 수온조건을 밝히기 위하여 우선 10℃, 15℃ 그리고 20℃의 수온조건을 설정하여 단일 조건(9L15D)하에서 12월5일부터 다음해 2월 3일까지 각 실험구마다 50마리를 사육하여 생존율과 탈피율을 조사하였다. 수온조건별 생존율의 변화는 그림 8에 나타내었으며, 탈피회수는 표 2에 나타내었다.

그림 8에서 보는바와 같이 사육10일 후의 생존율은 10℃ 88%, 15℃90%, 20℃ 94%로 수온이 높을수록 생존율이 좋았으며 이러한 경향은 30일후에도 유사하였다. 그러나 사육 40일 후부터 20℃실험구가 다른 실험구보다 생존율이 떨어져 3실험구 모두 80%전후로 유사한 값을 보였다. 그후 사육 60일째의 생존율은 10℃ 78%, 15℃ 74%, 20℃ 70%로 수온이 낮을수록 생존율이 좋게 나타났다. 특히 10℃실험구의 경우 사육 30일 이후부터는 사망한 개체들이 한 마리도 나타나지 않았으나 20℃실험구의 경우는 사망한 개체들이 계속적으로 나타났으며 탈피한 개체들이 공식에 의한 피해가 나타났다.

표 2에서 나타낸바와 같이 사육기간동안 탈피여부와 탈피회수에 대하여 조사한 결과를 보면 10℃ 실험구에서는 사육실험 종료할 때까지 한 마리도 탈피하지 않았으나, 15℃ 실험구에서는 사육 50일과 60일 사이에 37마리중 2마리가 탈피하여 5.40%의 탈피율을 나타냈다. 20℃ 실험구에서는 사육 40일째부터 탈피한 개체가 나타나기 시작하여 50일째는 38마리중 2마리가 탈피하여 5.26%의 탈피율을 나타냈고, 60일째에는 35마리중 4마리가 탈피하여 11.43%의 탈피율을 보였다. 탈피한 개체들은 모두 교미전이 탈락되어 수정능력이 상실하게 되었다.

표 2. 동계 사육수온에 따른 대하의 탈피빈도

Table 2. Molt frequency of *P. chinensis* reared in different water temperature during winter (Dec. 5 ~ Feb. 3)

Temperature (°C)	Molting frequency (%)				
	20 days	30 days	40 days	50 days	60 days
10	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	5.40
20	-	-	2.44	5.26	11.43

20℃로 사육한 경우 사육 30일째까지는 가장 높은 생존율을 보였으나 그 후부터 낮은 생존율을 보인 주된 요인은 탈피 후 공식에 의해 폐사되었기 때문이며 15℃에서 사육한 경우의 낮은 탈피율도 탈피 후에 일어나는 공식현상 때문이었다. 10℃에서 사육한 대하들은 한 마리도 탈피를 하지 않아 공식에 의한 폐사는 한 마리도 없었으며 또한 사육 30일 이후부터는 폐사되는 개체가 거의 없었다. 따라서 15℃ 이상의 수온조건에서 월동사육하기 위해서는

공식현상을 줄일 수 있는 충분한 공간을 확보해 주어야될 것이며 이에 대한 밀도실험을 해야할 것이다. 그러나 교미한 암컷이 탈피를 하게되면 교미전도 탈락하게 되어 모하가 산란을 하더라도 수정란을 얻을 수가 없어서 모하로서 이용은 불가능하다. 그러므로 월동사육수온은 10℃전후의 조건이 가장 바람직하다.

10℃전후의 가장 적절한 월동사육 수온을 찾기 위해 수온 8℃, 10℃ 그리고 12℃의 조건에서 12월 29일부터 다음해 2월 29일까지 사육하여 생존율과 섭이율을 조사하였다. 그리고 안병절제에 의한 영향도 조사하기 위해 한쪽 안병을 절제한 후 같은 조건하에서 사육실험을 하였다. 일일 평균 먹이 섭식량은 표 3에 나타내었으며 생존율의 변화는 그림 8에 나타내었다.

표 3. 월동 사육 수온에 따른 대하의 개체당 일일 먹이 섭식량  
Table 3. Effects of unilateral eyestalk ablation on the daily feeding amount of *P. chinensis* according to rearing water temperatures.

Treatment	Daily feeding weight (g)		
	8℃	10℃	12℃
Intact	0.024±0.022	0.064±0.036	0.125±0.114
Unilateral eyestalk ablation	0.046±0.042	0.087±0.038	0.136±0.112

안병을 절제하지 않은 무처리 실험구에서 일일 섭식량은 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 각각 0.024±0.022g, 0.064±0.036g, 0.125±0.114g로 수온이 증가

할 수록 섭식하는 양이 증가하였다. 한쪽 안병을 절제한 실험구에서도 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 각각  $0.046 \pm 0.042g$ ,  $0.087 \pm 0.038g$ ,  $0.136 \pm 0.112g$ 로 사육수온이 증가할수록 섭식량이 증가하였다. 또한 같은 수온조건에서도 무처리한 실험구보다 안병을 절제한 실험구가 상대적으로 보다 많은 먹이를 섭취하는 경향을 보였다.

섭식량은 수온이 높을수록 보다 많은 양을 섭식하였는데, 이러한 결과는 일반적으로 갑각류의 섭식량은 서식 적수온 범위 내에서 온도가 높을 수록 섭식량도 높게 나타나는 것으로 알려진 것과 같은 결과를 보여주고 있다 (Hudinaga and Kitaka, 1966; Fudinaga et al., 1967; 藤永等, 1966).

그리고 한쪽 안병을 절제하였을 경우에 섭식량이 많아지는 것은 안병내에 이와 관련된 여러 가지 호르몬 등의 작용이 있기 때문이라고 생각되어진다. 갑각류는 안병내에서 탈피억제호르몬(molt inhibiting hormone)과 생식소억제호르몬(gonad inhibiting hormone)외에 대사와 관련된 혈액내에 당의 함량을 유지해주는 고혈당호르몬(hyperglycemic hormone, HGH) 등 여러 가지 대사와 관련된 호르몬들이 있다는 것이 밝혀져 있다. HGH는 복질 근육, 생식소, 외피나 아가미 등에 작용하여(Keller and Andrew, 1973) 당을 혈액내로 내놓는데 관여한다고 알려져 있으며(Telford, 1975), 특히 당 대사와 관련된 효소들의 생성이나 활성화에 관여한다고 알려져(Keller, 1966) 안병절제가 이 호르몬의 부족으로 당 대사의 이상이 생기기 때문에 혈당을 조절하기 위해 먹이 섭식량이 증가하는 것이라고 생각한다. 또한 안병을 절제하면 아미노산의 합성 촉진 (Skinner, 1965; McWhinnei and Mohrherr, 1970), 중장선(midgut gland)내의 질소함량의 감소(Nagabhushanam and Diwan, 1974), Amylase 활성의 증가(Fingerman et al., 1967)등 먹이의 소화와 대사를 촉진하는 효과가 있어서 안병절제 개체군이 무처리 개체군 보다 섭식량이 더 많아지는 것이라고 할 수 있다.

한편, 수온별 생존율과 이에 따른 안병효과를 조사한 결과를 나타낸 그림 8을 보면, 8℃ 실험구에서는 사육개시 후 12일간은 급격하게 생존율이 떨어져 안병을 절제하지 않은 무처리군에서는 6일째 80%, 12일째 68%로 줄어들었다. 그 후 23일부터는 60%의 생존율을 보이면서 사육실험이 종료될 때까지 폐사되는 개체는 나타나지 않고 계속 60%를 유지하였다. 안병을 절제한 실험구에서는 사육 2일째에 생존율이 80% 떨어졌으며 7일째에 60%로, 12일째에는 42%로 줄어들었고 15일째에는 생존율이 40%로 나타났다. 그 후로는 거의 폐사되는 개체는 나타나지 않았다. 8℃에서는 안병을 절제한 실험구가 무처리구 보다 생존율이 많이 떨어지는 경향을 보여주었다.

10℃ 실험구에서는 무처리구의 사육 5일째에 88%의 생존율을 보였으며 14일째에 84%, 25일째에 78%의 생존율을 보이고 실험 종료시까지 폐사된 개체는 나오지 않았다. 안병을 절제한 실험구에서는 5일째에 78%의 생존율을 보이고 12일째에 76%의 생존율을 보였다. 19일째에 74%의 생존율을 보인 후 38일째에 70%의 생존율을 보였다. 10℃ 실험구에서도 안병 절제한 실험구가 무처리 실험구보다 낮은 생존율을 보였으나 그 차이는 8℃ 때의 실험구보다 거의 없었다.

12℃ 실험구에서는 사육 13일째까지는 안병을 절제한 실험구의 생존율이 90%로 안병을 절제하지 않은 무처리구의 생존율 88%보다 다소 높은 값을 나타내었다. 그러나 사육 20일째부터 안병을 절제한 실험구의 생존율은 80%로 안병을 절제하지 않은 무처리구 생존율 82%보다 낮은 값을 보였다.

월동수온이 8℃, 10℃ 그리고 12℃의 조건에서는 수온이 높을수록 생존율이 높은 경향을 보여주었으며 안병을 절제한 실험구보다 안병을 절제하지 않은 실험구가 더 높은 생존율을 보여주었다. 10℃와 12℃의 실험구에서는 안병 절제 실험구와 무절제 실험구와의 생존율의 차이가 그렇게 크지 않았지만 8℃ 실험구에서는 안병 절제 실험구와 무절제 실험구사이의 생존율에는



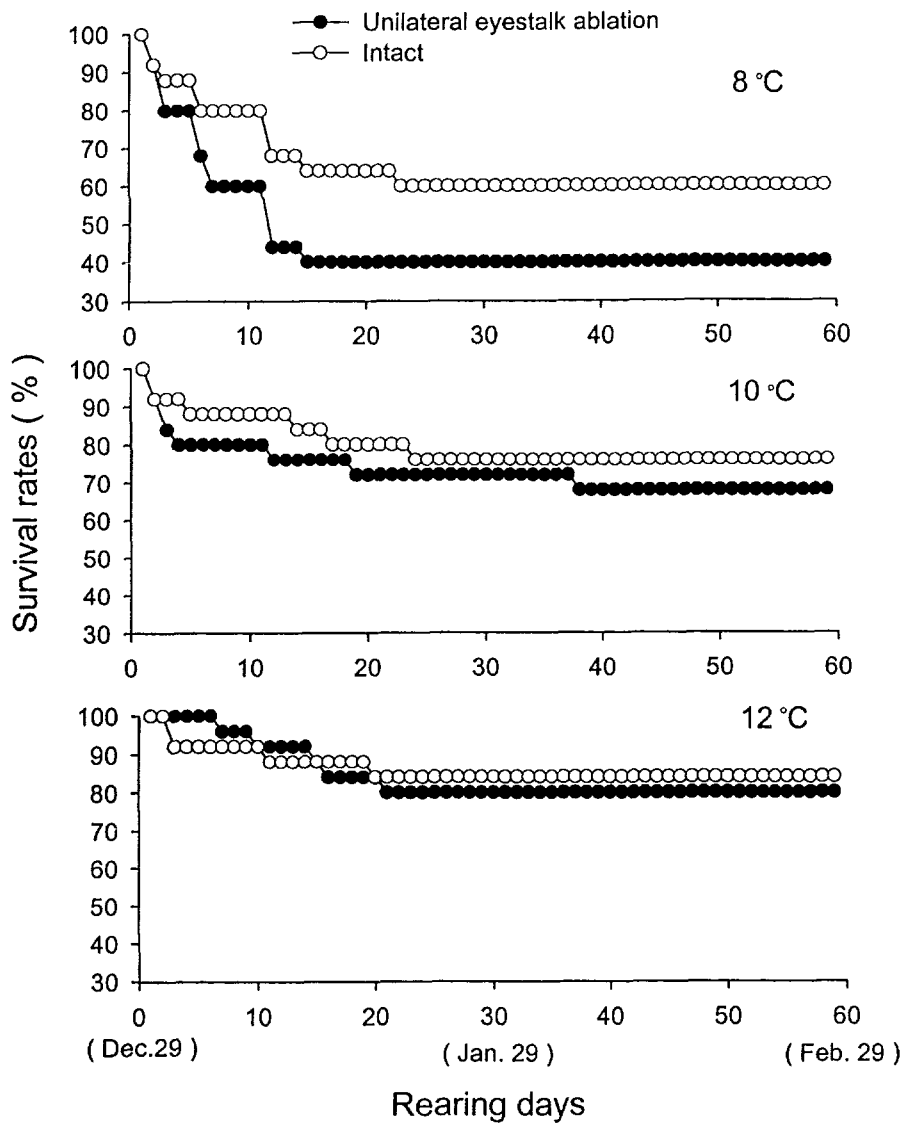


그림 8. 월동수온에 따른 생존율의 변화. ●: 안병 한쪽을 절제한 실험군; ○: 안병을 절제하지 않은 무처리 실험군.

Fig. 8. Changes of survival rate on rearing water temperature during winter of *P. chinensis*. closed circle: regime of unilateral eyestalk ablation; open circles: intact regime

큰 차이를 보였다.

따라서 먹이 섭취량이나 생존율 그리고 난방비용 등을 고려한다면 10℃에서 월동을 하는 것이 가장 바람직하다고 생각된다.

여 백

## 제 3 장 생식소 성숙 유도

### 제 1 절 서 론

대부분의 갑각류는 생식주기의 계절적인 변화를 나타낸다. 이러한 계절적 변화는 환경 요인이 중요하게 작용한다. 특히 생식세포의 형성과 성숙에 관여하는 환경요인에는 주로 수온과 일장(Zuker, 1976; Steel et al., 1977; McQueen and Steel, 1980; Steel, 1980, Han, 1988; Han and Kim, 1993), 염분농도(Kuhl, 1966; Wickins, 1976), 먹이(Hartnoll, 1963; Dearborn, 1967; Hill, 1979; Wolcott, 1978) 등의 요인들이 알려져 있다.

대하는 5~6월에 난에서 부화된 후 고수온기인 7월~8월에 급속하게 성장하여 9월부터 생식세포의 형성이 시작된다. 수컷은 수온이 내려가고 일장이 짧아지는 가을철인 9월에서 10월에 걸쳐 정자형성이 이루어져 11월부터 12월초 사이에 교미가 이루어진다. 그러나 암컷은 3월 이후 수온이 서서히 상승하여 자연수온이 14℃ 이상으로 상승하는 봄철인 4월부터 난황형성이 활발하게 이루어지면서 난소가 성숙된다. 이처럼 대하에서는 암수의 성숙시기가 각각 다르고 또한 성 성숙에 관여하는 환경요인도 다름을 시사하고 있다. 특히 암컷의 생식소가 성숙하는 시기가 봄철이므로 성 성숙에 관여하는 환경요인으로는 일장의 장일화와 수온상승이라고 유추할 수 있다. 그러나 대하의 성 성숙에 관여하는 수온이나 일장의 조건에 대해서는 지금까지 연구된바가 전혀 없다.

그리고 본 연구의 2장에서 월별 성장상태를 보면 부화 후 9월까지 급속하게 성장하고 그 이후부터는 성장이 매우 둔화되는 경향을 볼 수 있어 대하의 성장은 주로 고수온기인 7월~8월이라고 할 수 있다(그림 3). 만일 대하의 산란시기를 1개월 정도 빨리 유도하여 치하를 생산된다면 대하의

생산량을 더욱 증가시킬 수 있을 것이다. 또한 가장 큰 피해를 주는 흰반점 바이러스에 의한 발병은 양식기간 전체에 걸쳐 일어나지만 고수온기인 8월보다 오히려 수온이 다소 내려가는 9월에 발병율이 높게 나타나기 때문에 1개월이상 조기 수확을 한다면 바이러스에 의한 피해를 최소화할 수도 있을 것이라고 생각한다.

따라서 본 연구에서는 대하의 성숙에 관여하는 환경요인을 조사하고 이를 이용하여 환경 조건을 인위적으로 조절하여 조기 생식소 성숙유도 방안을 마련하고자 한다. 그리고 성 성숙에 관여한다고 알려진 내분비 물질과 여러 가지 호르몬제를 이용하여 생식소 성숙을 유도하고 이를 이용할 수 있는 방법들을 찾고자 한다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

대하의 추계 생식소 성숙에 관여하는 수온과 일장의 조건을 조사하기 위해 9월 10일 태안 소재의 양식업자로부터 대하를 구입하였다. 동계 월동 사육 수온에 따른 생식소 성숙 유도 효과를 조사하기 위하여 11월 29일과 12월 15일에 월동을 위해 남하 회유하여가는 자연상태의 대하를 낭장망으로 채집한 것을 구입하였다. 구입된 대하의 평균 전장은 16.6cm, 평균 중량은 57.6g이었으며, 대하는 당일 국립수산진흥원 태안수산시험장에 설치된 콘크리트 수조(2<sup>W</sup>×4<sup>L</sup>×3<sup>H</sup>m)에 수용하였으며 그후 일부는 동의대학교 생물생산연구소 사육실로 옮겨 사육실험이 시작될 때까지 약 5 Ton 원형 수조(φ 2.5m×1.0m) 4개에 각각 150마리씩을 수용하여 자연일장과 수온조건하에서 수용하였으며 자연수온이 7℃이하로 내려가면 히터를 이용하여 8℃까지 수

온을 유지하였으며 먹이로는 하루에 1회 반지락 육편을 투여하였다.

## 2. 수온과 일장에 대한 사육실험

### 실험 1 : 추계 난소 성숙에 대한 일장의 영향

가을철 난소 성숙에 미치는 일장의 조건을 조사하기 위하여 2장의 방법과 같은 방법으로 일장을 9L15D와 15L9D의 두 개의 실험조건을 설정하여 9월 20일부터 11월 20일까지 60일간 사육하여 일장조건에 따른 난소성숙상태를 조사하였다.

### 실험 2 : 동계 난소 성숙에 대한 수온과 일장의 영향

겨울철 난소발달에 알맞은 수온과 일장조건을 조사하기 위하여 1차로 12월 5일부터 2월 5일까지 수온 8℃, 15℃ 그리고 22℃, 일장 9L15D와 15L9D의 조건을 조합한 6개의 실험구로 나누어 60일간 사육실험을 하였다. 그후 9L15D의 실험구는 계속하여 3월 25일까지 사육실험을 하였다. 1차의 실험 결과로부터 다음해 1월 2일부터 3월 3일까지 9L15D조건에서 수온 8℃, 10℃, 12℃ 그리고 14℃의 4개의 실험구로 나누어 사육실험을 하여 GSI와 난소의 조직학적 발달상태를 조사하였다.

## 3. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도실험

난소 성숙유도에 대한 안병절제 효과를 조사하기 위하여 12월 20일부터 1월 20일까지 자연일장조건과 수온 15℃의 조건에서 안병 한쪽만을 절제한 실험군과 안병 양쪽모두 절제한 실험구 그리고 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구로 나누어 난소의 조직학적 발달상태를 조사하였다.

저수온에서 안병 절제효과를 조사하기 위하여 1월 2일부터 4월 12일까지 안병 한쪽을 절제한 후 자연 일장조건에서 수온 8℃, 10℃, 12℃ 그리고 15℃의 4개의 실험구로 나누어 난소의 발달상태를 조사하였다.

#### 4. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬의 분리

생식소 성숙을 억제하는 호르몬이 생성·분비하는 안병과 생식소 성숙을 촉진하는 요인이 생성·분비된다고 알려진 흉부신경절의 생리활성물질을 분리하기 위하여 대하 1,500마리를 10월20일 태안 소재 대하 양성장으로부터 구입하여 안병과 흉부신경절을 절취한 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

보관된 안병과 흉부신경절은 냉동건조하였으며 건조시킨 안병은 그림9와 같이 Yang et al.(1996)의 신경분비호르몬 추출방법을 이용하여 신경분비호르몬 조단백질 추출물을 얻었다. 추출액은 역상계 mini-column(Capcell Pak C18)에 의해 10%CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA로 분리한 후 Sephadex G50으로 분리하였다. 분리된 각 peak들의 생리활성을 조사할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

#### 5. 신경분비 호르몬에 의한 성 성숙 유도 효과 실험

안병의 신경분비호르몬 분획의 생식소 활성화에 대한 bioassay를 위해 징거미새우를 8월 3일 섬진강 하구에서 채집하여 진해내수면 연구소와 동의대학교 생물생산연구소 사육실에서 실험에 사용할 때까지 사육하였다.

흉부신경절의 신경 호르몬의 활성화에 대해 bioassay를 위해서는 Han and Kim(1993)의 결과를 이용하여 징거미새우를 생식소 성숙 억제조건인 일장 12L12D와 수온  $28^{\circ}\text{C}$ 로 사육하여 생식소가 억제되어 생식탈피는 하지 않고 연속적으로 일반탈피만 하는 징거미새우 암컷을 사용하였다. 안병의 성 성숙 억제 호르몬의 활성화에 대한 bioassay를 위해서는 다음해 4월부터 수온을  $26^{\circ}\text{C}$ 로 상승시켜 연속하여 난소 성숙과 산란을 계속하는 암컷을 사용하였다.

안병으로부터 추출하여 분리한 분획의 활성을 조사하기 위하여 우선 fraction No. 16부터 32까지를 하나로 모으고(Pool I), fraction No. 41부터 60까지를 같이 모아서(Pool II) 이들 2개의 분획으로 나누었으며, 징거미새우 한 마리 당 매일 분획  $10\mu\text{l}$ 씩 위십강 주위에 주사하여 성숙 억제 상태를 조

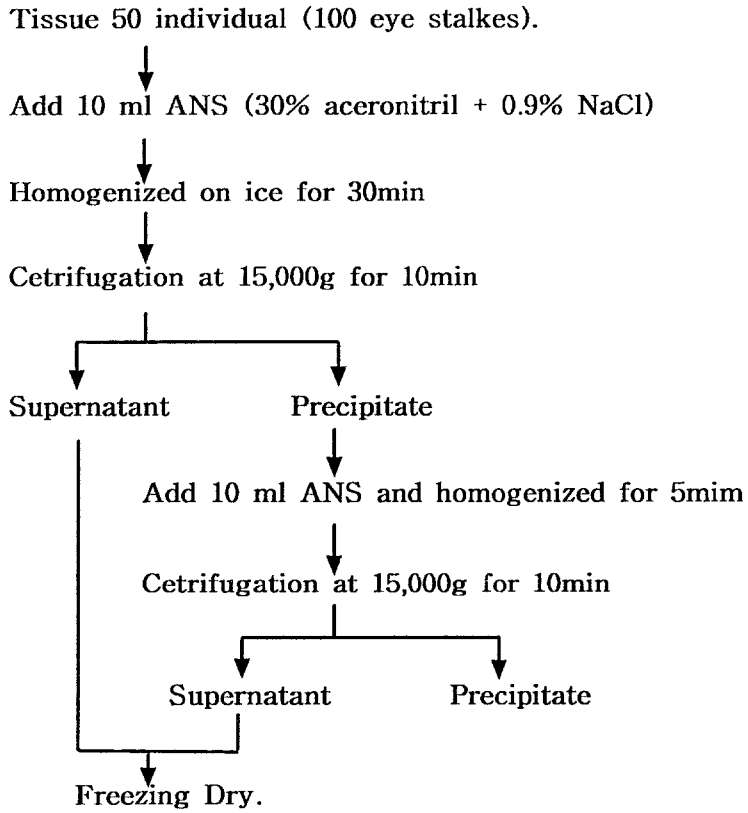


그림 9. 대하새우 신경분비 hormone 추출방법 (modified Yang et al., 1996)

Fig. 9. Scheme for extraction method of neurosecretion hormones of *P. chinensis* (modified Yang et al., 1996).



사하였다.

흉부신경절 추출물로부터 분리한 분획의 활성을 조사하기 위하여 fraction No. 18부터 31까지(Pool I), fraction No. 41부터 49까지(Pool II), fraction No. 55부터 57까지(Pool III)의 3개의 분획으로 나누었다. 각 분획의 활성을 조사하기 위해 징거미새우 한 마리 당 매일 분획 10 $\mu$ l씩 위심강 주위에 주사하여 생식소 성숙 상태를 조사하였다.

#### 6. 성숙 유도 호르몬제의 투여에 의한 생식소 성숙 유도 실험

대하의 생식소 성숙 유도 호르몬제로는 5-Hydroxytryptamine (5-HT), ecdysterone (EDS) 그리고 HCG를 사용하였다.

생식소 성숙 유도에 대한 호르몬제의 투여효과를 조사하기 위하여 1차로 1998년 3월 1일부터 20일까지 교미한 암컷을 대상으로 수온 10 $^{\circ}$ C, 일장 12L12D의 조건에서 사육하면서 5-HT를 5ng/g BW와 15ng/g BW가 되도록 7일 간격으로 3회에 걸쳐 100 $\mu$ l microsyringe를 이용하여 주사하였다.

2차 실험은 3월 5일부터 20일까지 EDS를 에타놀에 용해하여 체중g당 5ng/g BW, 10ng/g BW, 20ng/g BW가 되도록, HCG는 생리식염수에 녹여 5 IU/g와 10 IU/g가 되도록 5일 간격으로 3회 주사하여 생식소 성숙 상태를 조사하였다. 개체별 구별을 하기 위하여 사진II-2와 같이 두흉갑 부분에 번호표를 붙여 사육하였으며 먹이로는 반지락 육편을 주었다.

3차 실험은 1999년 3월 5일부터 20일까지 8 $^{\circ}$ C~10 $^{\circ}$ C에서 월동중인 대하를 대상으로 자연수온조건에서 일장12L12D조건에서 5-HT는 15ng/g BW, EDS는 10ng/g BW, HCG는 10 IU/g BW를 5일 간격으로 3회 주사하여 마지막 주사하여 5일 후에 생식소 성숙 상태를 조사하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 생식소 성숙에 대한 수온과 일장의 영향

##### 1) 추계 난소 성숙에 대한 일장의 영향

가을철 양성기간동안 일장조건이 생식소 성숙에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 9월 20일부터 11월 20까지 2개월 동안 자연 수온 하에서 일장 조건 15L9D와 9L15D의 두 개의 실험구로 나누어 GSI의 변화와 생식소의 조직학적인 양상을 조사하였다. 이때 자연 수온의 변화와 GSI 변화는 그림 10에 나타내었다. 실험초기 대조구의 평균 GSI는 1.19%이었으며, 생식소는 대부분 주변인기의 난모세포들이었으며 일부 여포세포층으로 둘러싸인 난모 세포들도 일부 관찰할 수 있었다. 사육 20일 후 GSI는 15L9D 실험구에서 1.11% , 9L15D에서 1.09%로 대조구와 같은 값을 유지하였으며조직상으로도 별 다른 차이가 없었다.

사육 40일 후에는 15L9D실험구에서는 GSI가 1.31%, 9L15D실험구에서는 1.44%로 다소 증가하는 경향을 보여주었으나 유의적 차이는 없었다. 그러나 사육 60일 후 GSI는 15L9D실험구에서 1.48%, 9L15D실험구에서 1.71%로 증가하여 단일조건인 9L15D실험구에서 사육실험 개시 때의 대조구에 대해 유의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 난소의 조직상에서 난모세포의 발달이 실험초기의 대조구와 큰 차이는 볼 수 없었다.

본 실험결과에서 단일조건이 난모세포의 형태적인 변화는 없었지만 GSI의 값이 다소 증가한 것은 단일조건이 난모세포의 난황형성이나 성숙을 촉진하는 것이 아니라 단지 시원생식세포의 분열과 증식을 촉진하고 이로부터 주변인기의 난모세포 수의 증가에 의한 것이라고 생각된다.

따라서 본 종은 미 성숙시기인 가을철에는 일장이 난소 발달에 크게 영향을 미치지 않지만 장일 조건 보다 단일 조건이 난모세포의 분열증식을 촉진

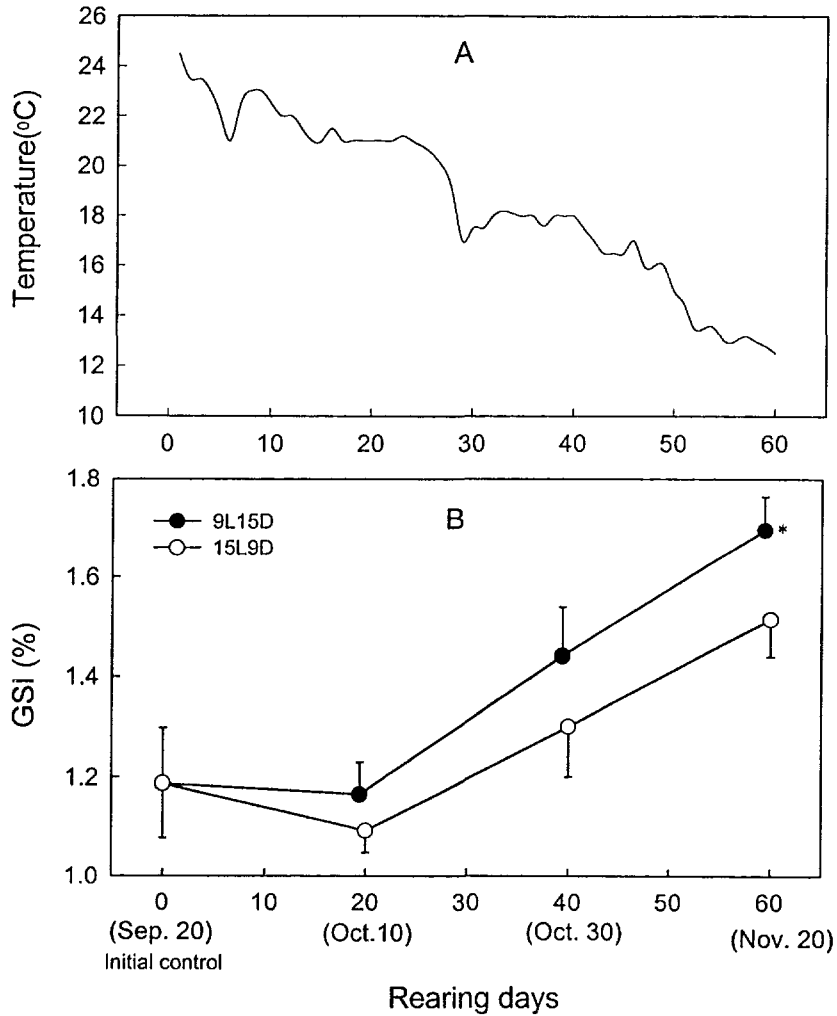


그림 10. 사육기간동안 수온변화와 일장 조건에 따른 GSI의 변화 (9월20~11월20일). \*는 사육실험 초기의 대조구 GSI와 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타냄.

Fig. 10. Changes of water temperature during experiment(A) and GSI of female prawn, *P. chinensis* on rearing day length conditions (15L9D and 9L15D)(B).

하는 효과가 있어 단일조건으로 사육하는 것이 대량의 난을 생산하는데 보다 유리하다고 생각된다.

본 종에서 생식소 성숙에 일장길이가 큰 영향을 주지는 못하지만 단일조건이 생식소 성숙에 유리하다는 결과는 Aiken and Waddy (1986)가 *Homarus americanus*에서 성숙에는 일장조건이 아무런 관련이 없다는 보고와 *Macrobrachium australiense*(Lee and Fielder, 1982)에서도 난소 성숙은 수온과 밀접한 관계가 있으나 일장은 아무런 영향이 없다는 보고와 상반되는 결과를 보여주고 있다.

그리고 Han and Kim(1993)이 징거미새우(*M. nipponense*)에서는 13L11D 이하의 단일 조건에 의해 광주성이 발달하여 안병 X-organ으로부터 생식소 성숙 억제 호르몬이 분비되어 생식소의 성숙이 억제되지만 장일조건에서는 생식소의 발달이 지속된다는 보고와 단각류의 한 종인 *Oniscus asellus* (McQueen and Steel, 1980)가 장일 조건이 생식소 성숙을 촉진한다는 보고와 정 반대의 결과를 보여 주고 있다.

## 2) 동계 난소성숙에 대한 수온과 일장의 영향

12월 5일부터 수온은 8℃, 15℃, 22℃의 3개의 실험 조건으로 나누고 일장은 15L9D, 9L15D의 2개 실험조건으로 나누어 이들 조건을 서로 조합한 6개의 실험구를 설정하고 2월 6일까지 사육 실험하여 각 실험구의 GSI를 조사하여 그림 11에 나타내었으며 조직학적 변화는 그림 12에 나타내었다. 12월 5일 실험 개시 대조구의 GSI는  $1.38 \pm 0.07\%$ 이었으며 난소의 난모세포들은 그림 12-A에서 보는바와 같이 모두 주변인기의 미숙한 상태이었다.

사육 40일 후(1월 14일) 8℃의 조건에서 단일조건인 9L15D에서는 GSI가  $2.25 \pm 0.22\%$ , 장일조건인 15L9D에서는  $20.05 \pm 0.25\%$ 로 약간 상승하여 실험 개시 대조군의 GSI값에 비하여 유의한 상승을 나타내었다. 그러나 단일조건이

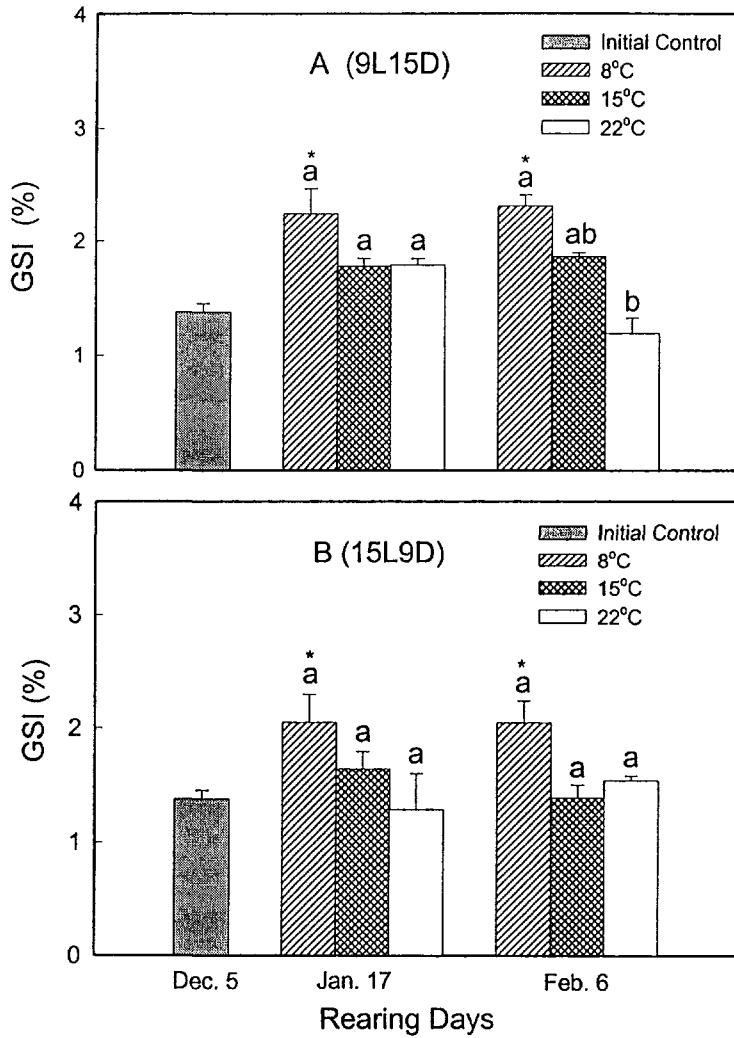


그림 11. 겨울철 대하의 난소 성숙에 미치는 수온과 일장 영향  
 Fig. 11. Effects of water temperatures and photoperiods on ovarian maturation of adult female prawns, *P. chinensis*. Asterisk denotes significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ).

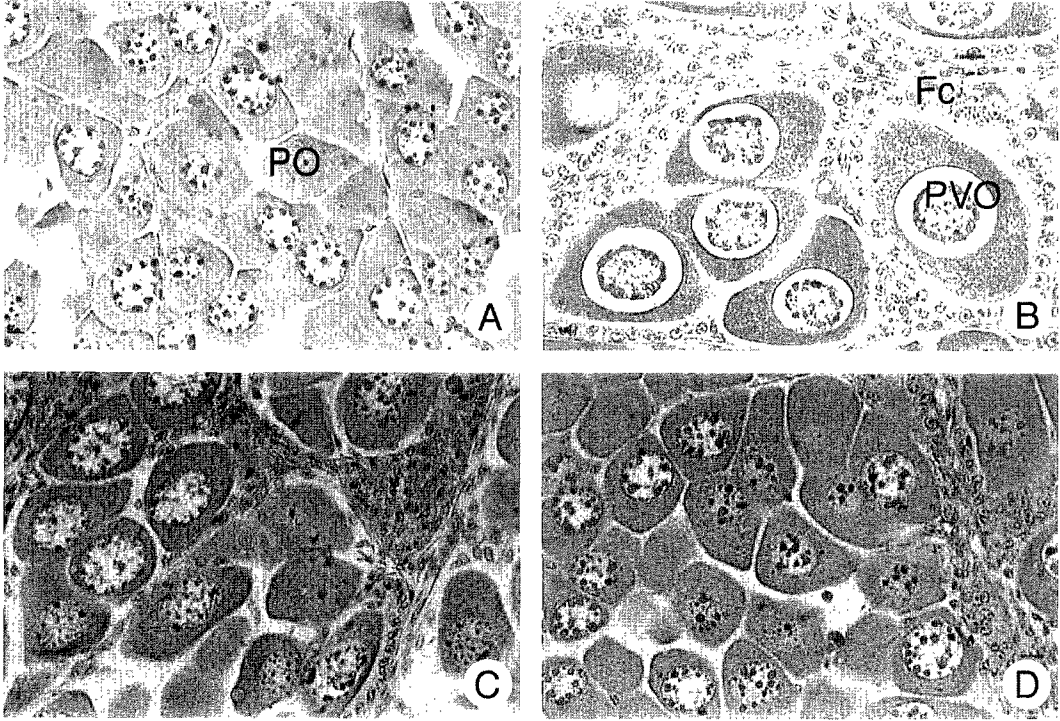


그림 12. 동계(12월5일-2월6일) 사육 수온과 일장 조건에 따른 난소조직의 변화. A: 대조구, B and C: 8°C의 장일과 단일 실험구, D: 15°C와 22°C 실험구. Fc, 여포세포; PO, 전난황형성기 난모세포; PVO, 1차 난황형성기 난모세포.

Fig. 12. Histological changes of ovary of adult female prawns, *P. chinensis* on rearing temperatures and photoperiods during winter (Dec. 5 - Feb. 6). A: Section of ovary in initial control, B and C: Section of ovary in experimental regimes of long and short photoperiod at 8°C, D: Section of ovary in experimental regimes of 15°C. Fc, follicle cell; PO, previtellogenesis oocyte; PVO, primary vitellogenesis oocyte.

장일 조건보다 다소 GSI가 높은 경향은 보였지만 일장에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이때 난소내의 난모세포들은 그림 12-B와 C에서 보는 바와 같이 일장에 관계없이 40일전보다 발달하여 전난황형성기의 상태에 있었으며 난모세포 주위에 여포세포층이 잘 발달하고 있었다. 15℃의 조건에서는 9L15D의 경우 GSI가  $1.79 \pm 0.07\%$ , 15L9D의 경우  $1.64 \pm 0.15\%$ 로 나타나 40일 전에 비하여 유의한 상승은 보이지 않았으며 일장에 따른 차이도 전혀 보이지 않았다. 난소의 조직학적 변화에서도 그림 12-D에서 보는바와 같이 대조구와 차이를 전혀 찾아볼 수 없었다. 22℃조건에서도 9L15D의 경우 GSI가  $1.80 \pm 0.06\%$ , 15L9D의 경우  $1.29 \pm 0.32\%$ 로 나타나 40일 전에 비해 GSI의 변화를 전혀 볼 수 없었다. 난소의 조직학적 관찰에서도 그림 12-D와 같은 난소내 난모세포들이 모두 주변인기 단계에 있어 조직학적인 변화에서도 대조구와 전혀 차이를 보이지 않았다.

2월 5일 8℃ 실험구의 단일조건(9L15D)과 장일조건(15L9D)의 GSI가 각각  $2.32 \pm 0.09\%$ 와  $2.04 \pm 0.19\%$ 로 20일전(1월14일)과 차이가 전혀 없었으며 난소도 전난황형성기의 난모세포로 이루어져있어 조직학적인 변화도 전혀 찾아볼 수 없었다. 15℃ 실험구의 9L15D조건에서는 20일전과 난소의 조직학적인 변화를 전혀 찾아볼 수 없었으며 GSI의 값도 변화가 없었다. 15L9D조건에서도 난소의 조직학적인 변화를 볼 수 없었고 GSI의 값은  $1.39 \pm 0.11\%$ 로 다소 낮은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 22℃ 실험구의 9L15D조건에서는 GSI의 값이  $1.20 \pm 0.13\%$ 으로 다소 낮은 값을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 그리고 15L9D에서도 GSI가  $1.54 \pm 0.04\%$ 로 20일전과 전혀 그 차이를 볼 수 없었다.

그림 11-A와 B에서 나타낸바와 같은 각기 다른 일장조건에서 각 수온에 대하여 GSI의 값을 비교하면 같은 경향을 보여주고 있으며 일장에 관계없이 15℃나 22℃의 고 수온보다 오히려 8℃인 저수온의 경우가 난소발달에 유리

한 조건임을 알 수 있었다. 대하는 봄철에 수온이 14℃이상으로 상승하면서 난소가 발달되어 19℃~22℃로 수온을 올려주면 산란이 일어난다고 알려져 있다. 그러나 초겨울에 수온을 15℃에서 사육한 경우나 22℃로 사육한 경우 모두 성숙은 전혀 되지 않았다. 이러한 결과는 Han and Kim(1993)의 징거미새우를 대상으로 초겨울에 수온 일장에 대한 실험 결과와 다른 결과를 보여주고 있으며 오히려 가을철의 퇴화기에 있는 징거미새우를 16℃, 22℃ 그리고 28℃와 장일조건과 단일조건을 서로 조합한 실험구로 나누어 사육했을 때 수온과 일장에 아무런 생식소 발달에 영향을 미치지 않는다는 결과와 같은 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 단일효과에 의해 광주성이 발달하여 안병의 X-organ 세포들이 활성화되어 이들 세포로부터 GIH(gonad inhibiting hormone)의 왕성한 생성·분비는 생식소 성숙 조건인 장일조건으로 되돌려주어도 쉽게 GIH의 생성·분비가 억제되지 않기 때문이라고 고찰하고 있으며, 12월부터 다시 수온 상승에 의해 생식소가 발달하는 것은 11월경의 10℃이하의 저 수온에 의해 생식소 억제 호르몬 생성 분비 활성이 소실되었기 때문이라고 고찰하고 있다. 본 종에서도 8℃의 저 수온 조건이 다른 고 수온 조건보다 난소발달에 효과적인 것은 가을철에 서서히 발달해온 생식소 억제 호르몬의 생성·분비활성이 고 수온의 조건에서는 그대로 유지가 되는 반면 저 수온에서는 점차로 소실되든지 아니면 활성이 억제되었기 때문에 생식소 발달 효과가 일어난 것이라고 할 수 있다.

그래서 이러한 고수온에 의한 생식소 억제 활성이 언제까지 지속되는지, 그리고 저 수온에 의해 생식소 성숙 호르몬의 생성·분비가 완전히 억제되어지는 것인지를 구명하기 위하여 그후 연속하여 단일조건(9L15D)에서 3월 25일까지 50일간 사육실험하여 그 결과를 그림 13에 나타내었다.

8℃로 계속하여 20일간 더 사육한 2월 25일에 GSI값은  $3.27 \pm 0.16\%$ 으로 약간 상승하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 볼 수 없었다. 그후 30일간 더



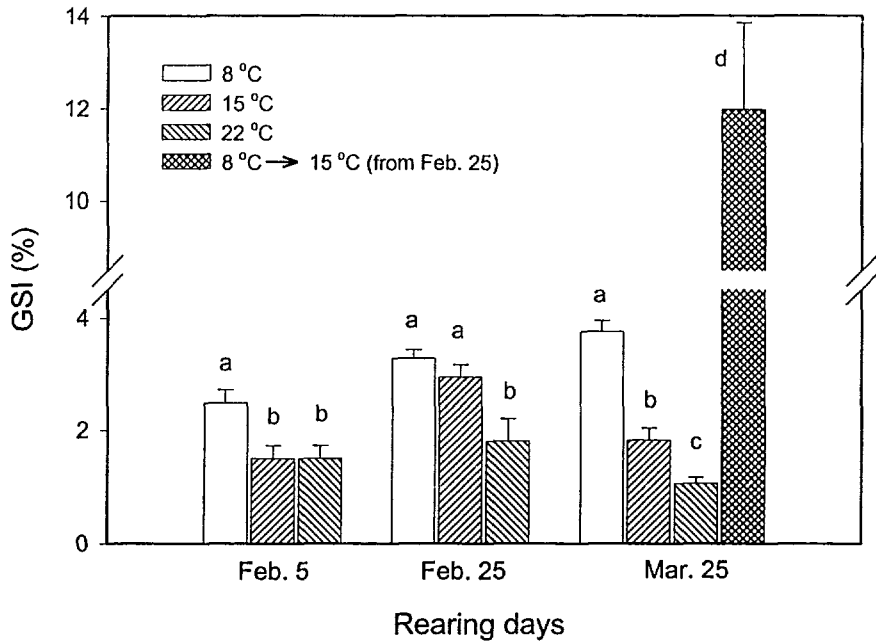


그림 13. 동계(2월 5일-3월 25일) 대하의 난소 성숙에 미치는 수온의 영향

Fig. 13. Effects of water temperatures on ovarian maturation of adult female prawns, *P. chinensis* during winter (Feb. 5-Mar. 25). Asterisk denotes significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ). Different letters(a-d) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

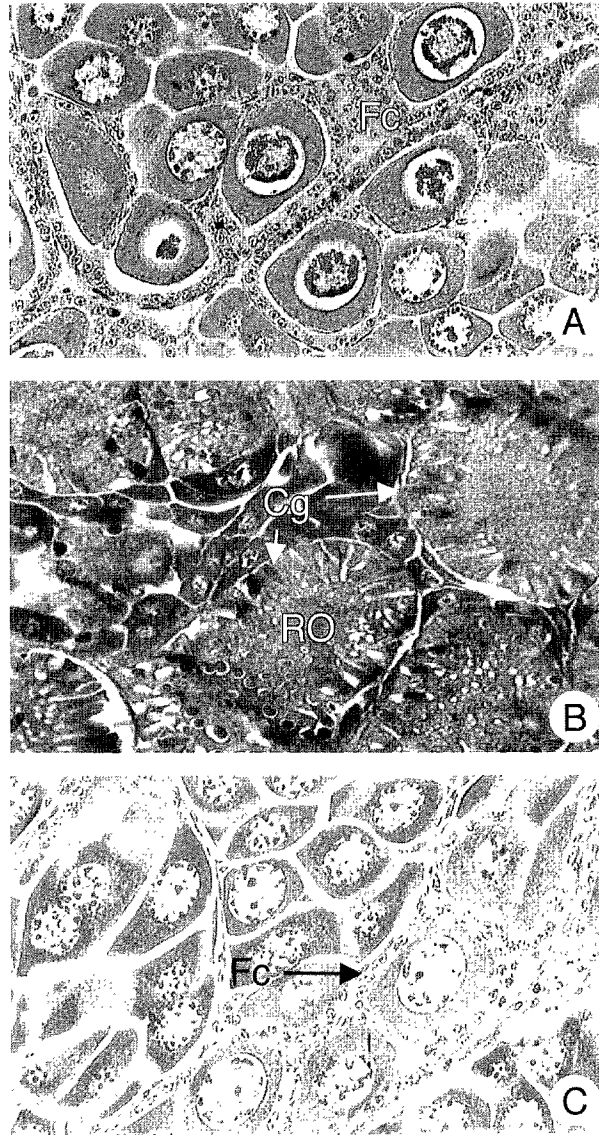


그림 14. 수온 상승에 의한 난소성숙효과. A: 2월 25일 8°C의 난소 조직상, B: 수온을 8°C에서 15°C로 상승시켰을 때 3월 25일의 조직상, C: 3월 25일 15°C의 조직상. Cg, 표층포 과립; Fc, 여포세포; PO, 전난황 형성기 난모세포; RO, 완숙기 난모세포.

Fig. 14. Effects of increasing temperature from 8°C to 15°C on ovarian maturation in female prawn, *P. chinensis*. A: Section of ovary in experimental regime of 8°C in February 25, B: Section of ovary in experimental regime of increasing temperature from 8°C to 15 °C, C: Section of ovary experimental regime of 15°C in March 25. Cg, cortical granule; Fc, follicle cell; PO, previtellogenesis oocyte, RO, ripe oocyte.

사육한 3월 25일에도 GSI는  $3.76 \pm 0.19\%$ 로 좀더 상승은 하였지만 유의한 차이는 보이지 않았다. 난소에 대한 조직학적 조사에서도 여포세포가 잘 발달된 전난황형성기의 난모세포들이 대부분 관찰되었다(그림 14-A). 2월 25일 8°C에서 사육하던 대하의 일부를 15°C로 수온을 상승시킨 실험구에서는 한달 후 GSI가  $11.99 \pm 1.86\%$ 으로 급격하게 유의한( $p < 0.01$ ) 상승을 보여 주었으며 이때 대부분의 개체들의 난소는 성숙하여 난모세포들이 모두 난황형성이 완료되어 완숙상태에 있었다(그림 14-B). 그러나 15°C 실험구에서는 2월 25일에 GSI가  $2.94 \pm 0.22\%$ 로 다소 유의한( $p < 0.05$ ) 상승을 보였지만 그후 30일 더 사육한 3월 25일에는 GSI가 다시  $1.83 \pm 0.21\%$ 로 떨어졌으며 난소에 대한 조직학적 조사에서는 대부분 주변인기의 난모세포로 이루어져 있으나 일부는 발달된 여포세포로 둘러 쌓여있는 전난황형성기의 난모세포들도 관찰되었다(그림 14-C). 22°C의 실험구에서는 2월 25일에는 GSI가  $1.81 \pm 0.39\%$ 로 변화가 없었으며 한달 후인 3월 25일에는 오히려 GSI가  $1.06 \pm 0.04\%$ 로 유의하게 내려가는 결과를 보여주었다. 그리고 난소에 대한 조직학적인 조사에서도 대부분의 난모세포들이 주변인기의 상태에 머물러있었다.

이러한 결과로부터 대하는 8°C의 저 수온에서 2~3개월 정도 사육하면 안병의 X-organ으로부터 생식소 억제호르몬의 생성·분비 활성이 소실되어 수온을 15°C로 수온을 올리면 난황형성이 일어나 생식소가 성숙됨을 알 수 있었다. 그리고 15°C이상의 수온에서는 안병의 X-organ으로부터 생식소 억제호르몬의 생성·분비 활성이 지속되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Han and Kim (1993)이 징거미새우가 저 수온을 경험한 후 수온 상승에 의해 생식소가 발달한다는 결과와 일치하였다. 그리고 징거미새우에서도 저 수온을 경험한 개체들은 난소내 난모세포들이 모두 전난황형성기의 상태에 있었으며 이러한 상태에서는 수온을 올리면 바로 난황형성기에 들어가게 된다는 것을 보고하고 있다. 본 종에서도 8°C에서 사육한 것들은 모두 전난황형

성기의 난모세포들을 가졌으며 2월말에 수온을 15℃로 상승시켰을 경우 난황 형성이 이루졌다. 따라서 난소의 난모세포가 주변인기의 난모세포인지 아니며 여포세포가 발달한 전난황형성기의 난모세포인지를 관찰함으로써 안병의 X-organ의 생식소 억제호르몬의 생성·분비 활성이 지속되고있는지 아니면 소실되었는지를 알 수 있는 지표가 됨을 알 수 있었다.

위의 결과로부터 대하는 다음해 종묘생산용 모하로 이용하기 위한 월동수온은 8℃와 같은 저 수온이 적당하며 15℃와 같은 고 수온은 오히려 부적합함을 보여 주고 있다.

이어서 종묘생산 모하용 대하를 생산하기 위한 알맞은 월동 수온범위를 조사하기 위하여 수온 8℃, 10℃, 12℃ 그리고 14℃의 수온 조건에서 1월 2일부터 3월 3일까지 9L15D의 단일조건에서 사육하여 생식소의 발달 상태를 조사하여 그림 15에 나타내었다.

2000년 1월 2일의 실험 개시 대조구의 GSI는  $1.45 \pm 0.07\%$ 로 난소의 난모세포들은 모두 주변인기의 상태에 있었다. 사육 30일 후인 2월 1일의 GSI를 보면 8℃에서는  $2.10 \pm 0.15\%$ 로 약간 상승하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 난소내의 일부의 난모세포들은 전난황형성기 상태에 있었다. 10℃와 12℃에서는 GSI가 각각  $2.85 \pm 0.18\%$ 과  $2.60 \pm 0.21\%$ 로 유의한( $p < 0.05$ ) 상승을 보였고 난소내의 난모세포들은 대부분 잘 발달되어있는 여포층으로 둘러 쌓여있는 전난황형성기에 있었다. 그러나 14℃의 실험구에서는 GSI가  $0.18 \pm 0.12\%$ 로 유의한 차이도 보이지 않았고 난소의 조직학적인 변화도 대조구에 비하여 차이를 전혀 볼 수 없었다.

사육 60일후 3월 3일에 각 실험구의 GSI를 보면 8℃ 실험구에서는  $3.65 \pm 0.33\%$ 으로 대조구에 비하여 GSI가 유의하게( $p < 0.01$ ) 상승하였다. 그리고 10℃와 12℃에서는 GSI가 각각  $3.45 \pm 0.26\%$ 과  $2.94 \pm 0.24\%$ 로 대조구에 비해서는 유의한 ( $p < 0.01$ )상승을 보였으나 2월 1일의 GSI와 비교하면 약간 상승하기는

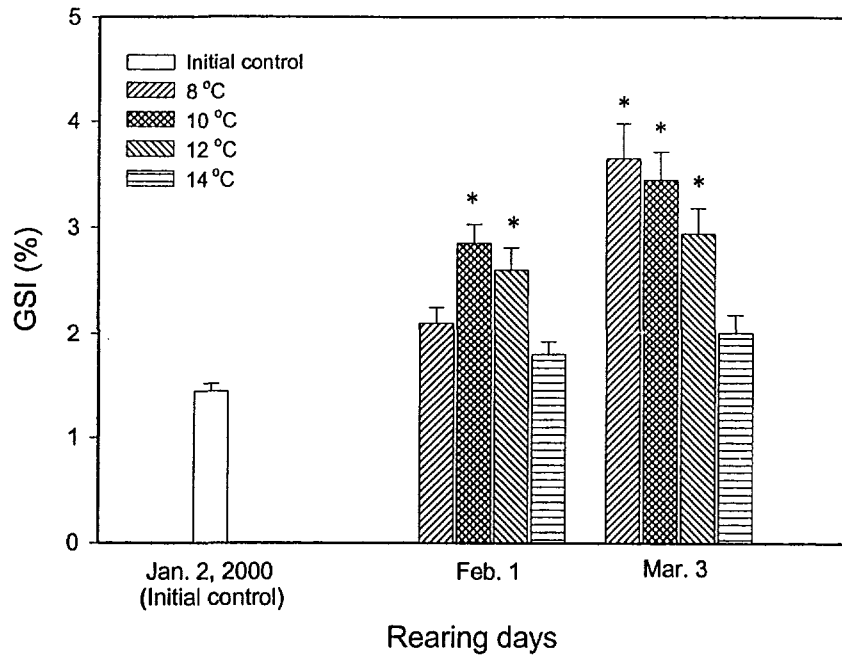


그림 15. 월동 사육수온에 따른 GSI의 변화  
 Fig. 15. Changes of GSI on water temperatures of overwintering broodstock in female prawn, *P. chinensis*.

하였지만 유의한 변화는 보이지 않았다. 14℃의 실험구에서는 사육 30일 후인 2월1일에 GSI가  $1.80 \pm 0.12\%$ , 60일 후인 3월 3일에는  $2.01 \pm 0.17\%$ 로 약간 상승하는 경향을 보였으나 유의한 변화는 보이지 않았다. 그러나 사육 60일 후 GSI에는 유의한 변화가 없었지만 난소의 조직학적인 관찰에서는 일부의 난모세포들이 여포세포들에 둘러 쌓여 전난황형성기에 들어가는 모습들이 보였다.

위의 결과에서 8℃, 10℃ 그리고 12℃ 조건에서는 GSI의 상승과 함께 난모세포들이 전난황형성기로 들어가지만 14℃의 조건에서는 실험개시 대조군과 변화가 없었다는 것은 대하의 안병 X-organ으로부터 생식소성숙 억제 요인의 활성을 제거시킬 수 있는 수온의 범위는 12℃이하라고 할 수 있다. 또한 대하를 종묘생산용 모하로 생산할 때 월동수온의 임계한계는 12℃에서 14℃사이인 것으로 추정할 수 있다.

## 2. 안병절제에 의한 생식소 성숙유도

위의 실험에서 15℃이상의 조건에서는 안병 X-organ으로부터 GIH의 생성·분비의 활성이 지속된다고 밝혀져 12L12D의 일장조건과 수온 15℃의 조건에서 안병절제에 의한 생식소 성숙 유도실험을하여 그림 16에 나타내었다.

실험 개시 때의 대하의 난소는 주변인기의 난모세포를 가지는 성장기의 미숙한 상태에 있었으며 GSI는  $0.52 \pm 0.14\%$ 이었다. 사육 15일 후인 1월 5일에 무처리한 대조 실험구의 GSI는  $1.68 \pm 0.21\%$ 로 실험개시 때와 GSI나 난소의 조직학적 변화는 전혀 찾아볼 수 없었다. 안병을 한쪽만 절제한 실험구에서도 GSI가  $1.79 \pm 0.09\%$ 로 안병절제효과는 전혀 찾아볼 수 없었다. 양쪽 안병을 절제한 실험구에서는 GSI가  $3.97 \pm 1.30\%$ 으로 유의한 차이는 나타나지 않았지만 실험개시 때의 GSI에 비해 상승하는 경향을 보였다. 그리고 일부 미성숙한

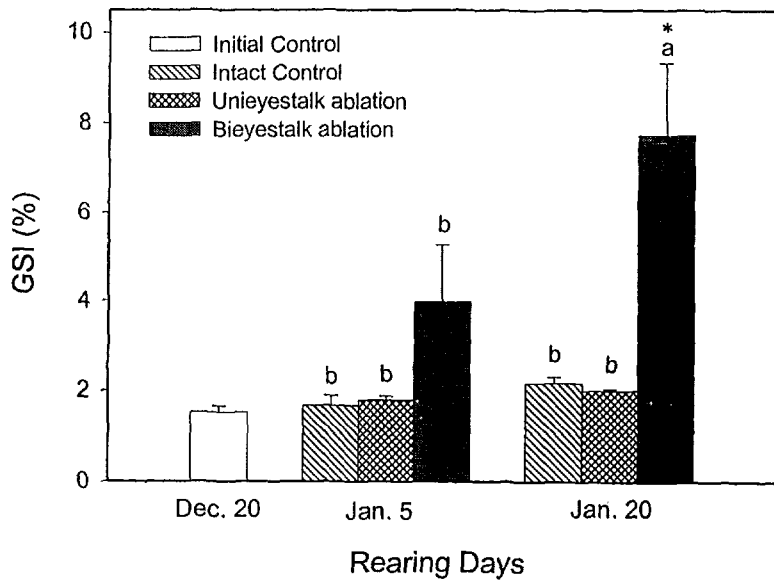


그림 16. 15°C에서 사육한 대하의 안병절제에 따른 GSI의 변화.  
 Fig. 16. Changes of GSI on eyestalk ablation in female prawn, *P. chinensis* reared at 15°C.

개체들도 있었지만 이들은 모두 잘 발달된 여포세포로 둘러 쌓여있는 전난황 형성기의 난모세포를 가지고 있었으며, 몇몇 개체에서는 난황형성기에 들어가 있기도 하였다. 사육 30일 후인 1월 20일에는 무처리 대조 실험구나 한쪽 안병을 절제한 실험구에서는 GSI가 각각  $2.17 \pm 0.13\%$ 과  $2.01 \pm 0.07\%$ 로 생식소 성숙 촉진 효과는 전혀 나타나지 않았다. 그러나 양쪽 안병을 절제한 실험구에서는 대부분의 개체들의 난소는 난황형성기의 후기에 들어가 표층포를 형성한 완숙 상태의 난모세포를 가진 개체들이 대부분이 있었으며, GSI도  $7.73 \pm 1.61\%$ 로 모든 실험구들에 비하여 유의한( $p < 0.05$ ) 상승을 보였다.

갑각류에서는 안병을 절제하게 되면 탈피가 촉진될 뿐만 아니라 생식소의 성숙도 촉진된다는 것이 Panouse(1943)에 의해 보고된 이후, 안병 내에 있는 X-organ에서 생성·분비되는 GIH와 MIH(molt inhibiting hormoen)에 의하여 생식소 성숙과 탈피가 억제되어 지고 있다는 사실과 이에 대한 조직학적 구조에 대해 많은 연구들이 이루어져왔으며(Adiyodi and Adiyodi, 1970; Anikumar and Adiyodi, 1980; Kelemec and Smith, 1980; Kurup and Adiyodi, 1981; Quackenbush and Herrnkind, 1983; Anilkular and Adiyodi, 1985), 이들 물질의 분리·정제 및 특성에 대한 연구들도 진행되고 있다(Chang et al., 1990; Aguilar et al, 1996; Terauchi et al., 1996; Webster and Keller, 1986; Soyez et al., 1991; Aguilar et al., 1992).

안병을 한쪽만 절제하였을 때는 난소의 성숙 촉진 효과가 전혀 없었으나 양쪽 안병을 절제했을 때는 절제 후 15일부터 생식소 성숙 촉진 효과가 나타나기 시작하여 30일 후에는 평균 GSI가 7.73%로 증가하고 대부분이 완숙상태에 이르렀다. 이는 안병의 X-organ sinus gland complex에서 분비되어 지는 GIH가 제거되어짐으로써 성숙된다는 보고들(Herp and Payen, 1991;



Kulkarni and Nagabhushanam, 1980)과 같은 결과를 나타내었다.

한편, Kelmeç and Smith (1980)와 Yano (1984b)는 각각 *Penaeus indicus* 를 대상으로 안병 양쪽을 절제한 것과 한쪽만 절제한 것들의 성 성숙과 탈피 촉진에 대하여 비교 연구 하였다. 이 연구에 의하면 안병을 양쪽 모두 절제 하였을 때는 탈피하려는 경향이 있고 한쪽만 절제하였을 때는 성 성숙을 하려는 경향이 있다고 보고하고 있다. 본 연구의 실험기간동안 안병을 한쪽을 절제한 경우나 양쪽 모두 절제한 경우 어느 경우든지 탈피한 개체는 한 마리도 없었으며 *P. indicus*의 결과와 같은 형상은 전혀 보이지 않았다.

그리고 한쪽 안병을 절제한 개체에서는 실험기간동안 (약 1개월) 생식소 성숙 효과는 전혀 보이지 않았으며 양쪽 안병을 절제한 개체들에서만 생식소 성숙효과를 얻을 수 있었다. 이는 대하를 단기간에 생식소 성숙 효과를 얻기 위해서는 양쪽 안병을 절제해야 한다는 것을 보여 준다.

그림 15에서 보는 바와 같이 안병 X-organ의 GIH 생성·분비, 활성화는 수온에 밀접하게 영향을 받는다고 볼 수 있으므로 한쪽 안병 절제에 의한 생식소 성숙 유도효과 없다는 것은 15°C의 조건에서는 한쪽 안병 X-organ에서 생성·분비되는 GIH가 생식소를 억제하기에 충분하다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 따라서 한쪽 안병 절제에 의한 생식소 성숙 유도효과를 명확히 하기 위해서는 수온에 따른 생식소 성숙에 대한 한쪽 안병 절제 효과를 실험해야 한다.

수온에 따른 안병 한쪽 절제에 의한 성숙 유도효과를 조사하기 위하여 1월 12일부터 수온 8°C, 10°C 그리고 12°C로 나누어 안병 한쪽을 절제하여 4월 12일까지 90일간 사육하여 그림 17에 나타내었다.

실험 개시 때의 평균 GSI는 2.00%이었으며 난소는 모두 미성숙상태인 주변인기의 난모세포를 지니고 있었다. 사육 30일 후 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구에서 8°C, 10°C 그리고 12°C의 GSI는 각각 1.06%, 2.85%, 2.60%

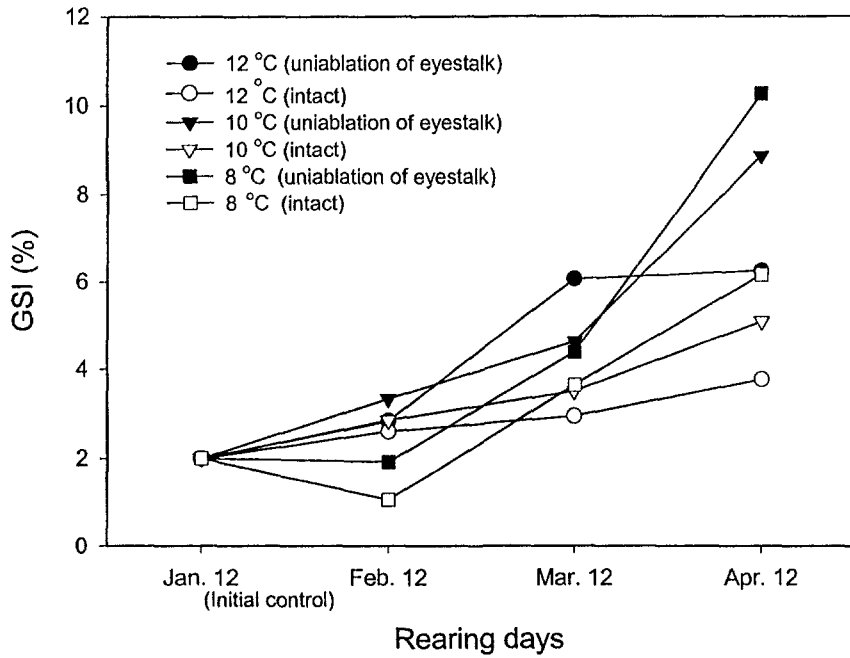


그림 17. 월동수온 8°C, 10°C 그리고 12°C에서 사육한 대하의 안병절제에 따른 GSI의 변화.

Fig. 17. Changes of GSI on eyestalk ablation in female prawn, *P. chinensis* kept at 8°C, 10°C, 12°C and 15°C.

로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 안병 한쪽을 절제한 실험구에서도 8℃, 10℃ 그리고 12℃의 GSI는 각각 1.92%, 3.33% 그리고 2.83%로 유의한 증가는 보이지 않았으며 무처리 실험구와 차이도 보이지 않았다. 사육 60일 이 지난 3월 12일에는 무처리 실험구의 8℃, 10℃ 그리고 12℃의 GSI는 각각 3.64%, 3.49% 그리고 2.95%로 12℃만을 제외하고는 모두 유의한( $p < 0.05$ ) GSI의 상승을 보였으며 안병을 절제한 실험구에서도 8℃, 10℃ 그리고 12℃의 GSI가 각각 4.38%, 4.63% 그리고 6.07%로 30일 전보다 모두 유의한( $p < 0.05$ ) 상승을 보여 주었다. 또한 무처리 실험구에 비해 안병을 절제한 실험구에서 GSI의 값이 높게 나타나기 시작하였다. 사육 90일이 되는 4월 12일에 GSI의 변화를 보면 안병을 절제하지 않은 무처리 실험군에서 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 GSI는 각각 3.65%, 5.08% 그리고 3.79%로 유의한 차이는 아니지만 전월에 비하여 상승하는 경향을 보였다. 그리고 안병을 절제한 실험구의 8℃, 10℃, 12℃ 조건에서 GSI가 각각 10.27%, 8.87% 그리고 6.25%로 12℃ 조건을 제외하고 모두 유의한 GSI의 상승을 보여주었다. 그리고 난소에 대한 조직학적인 조사에서도 안병을 절제한 실험구에서는 모두 난황형성기에 들어가 있어 안병을 한쪽만 절제할 경우에도 생식소 성숙유도 효과가 있었음을 알 수 있었다.

그림 17에서 보는 바와 같이 한쪽 안병을 절제하여 2개월 이후부터는 뚜렷한 절제효과가 나타났으며 수온이 낮을 수록 그 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. 따라서 대하에서 안병의 X-organ에서 GIH의 생성·분비와 활성화는 수온에 매우 의존적이며 15℃ 이상의 수온에서는 생식소를 억제할 수 있을 정도의 충분한 양이 분비되며 이는 한쪽 안병에서 분비되는 양으로도 생식소를 억제시킬 수 있음을 알 수 있다. 그리고 그 이하의 수온이 되면 GIH의 생성·분비가 급격하게 떨어져 생식소를 억제할 수 있을 정도의 충분한 양이 분비되지 못한다고 할 수 있다.

### 3. 안병과 흉부신경절의 신경호르몬 처리에 의한 생식소 성숙효과

#### 1) 안병의 GIH의 분리와 특성

안병내의 peptide hormone의 분리를 위하여 대하 안병을 그림 9와 같이 peptide를 추출하여 역상계 mini-column(Capcell Pak C18)에 의해 10%CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA로 분리한 후 Sephadex G50으로 분리하여 그 결과를 그림 18에 나타내었다. 그림 18에서 보는 바와 같이 주된 peak는 5개로 나눌 수 있었으며 이들 각 peak의 활성을 조사하기 위하여 우선 fraction No. 16부터 32까지 2개의 peak를 Pool I으로 하여 모으고, fraction No. 41부터 60까지 3개의 peak를 Pool II로 하여 같이 모았다. 이들 2개의 fraction group(Pool I과 Pool II)에 대하여 징거미새우를 재료로 하여 성숙억제효과에 대하여 bioassay를 실시하였으며 그 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4에서 보는바와 같이 징거미새우를 15L9D와 28℃로 사육한 대조구에서는 모든 암컷들은 14~16일 간격으로 일정하게 생식탈피(reproductive molt)를 하고 이어서 포란을 하였다. 그리고 생리식염수만 주사한 sham 대조구에서는 10마리중 9마리가 살아남아 모두 생식소가 성숙하여 생식탈피를 한 후 포란을 하였다. 그러나 Pool I을 주사한 실험구에서는 50%(5마리)가 성숙 억제 효과를 나타내었으며 50%(5마리)는 억제효과를 나타내지 못하고 생식소가 성숙하였다. 이중 40%(4마리)는 정상적으로 포란을 한 반면 10%(1마리)는 생식소가 성숙은 하였으나 산란을 하지 못하였다.

한편 Pool II실험구에서는 80%(8마리)가 생식소 성숙억제효과를 보였으며 성숙한 나머지 2개체도 성숙은 하였지만 산란을 하지 못하여 생식소가 그대로 남아 있었다. 이러한 실험 결과로 생식소 억제효과는 Pool II에 속하는 fraction이 더 강하게 나타남을 알 수 있어 GIH의 정제를 위해서는 Pool II에 속하는 fraction을 이용하는 것이 바람직하다.

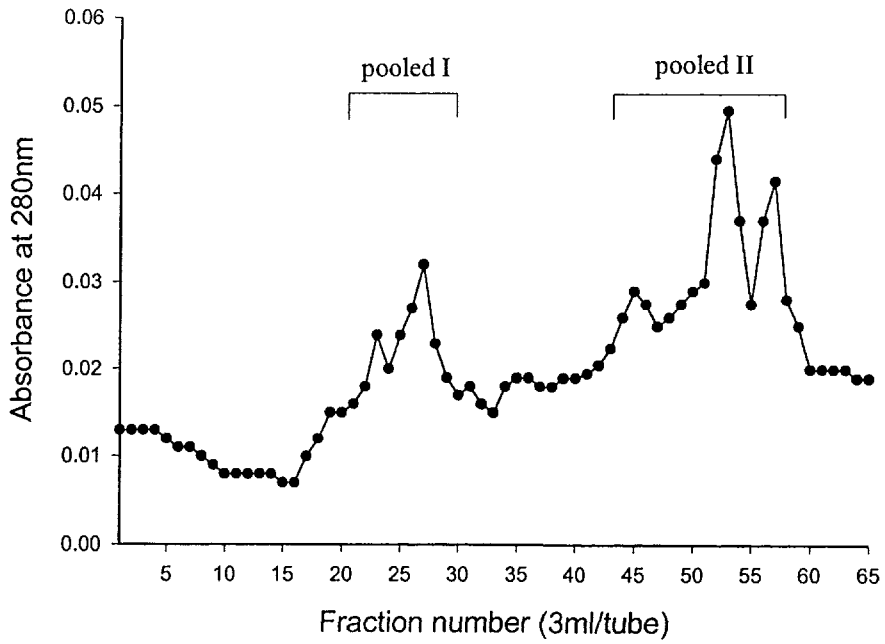


그림 18. 대하의 안병추출물을 Capcell Pak C18)에 의해 분리한 후 Sephadex G50으로 분리한 분획상

Fig. 18. Elution profile on Sephadex G50 column of extracts from eyestalk of *P. chinensis* chromatographed on a Capcell Pak C18.

그리고 지금까지 안병에는 생식소 성숙 억제 호르몬인 GIH만 있는 것으로 알려져 있었으나 산란 억제 요인도 함께 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 산란억제 효과가 동일한 GIH에 의해 일어나는 것인지는 확실하지 않으며 이에 대한 연구는 더 상세하게 할 필요가 있다.

표 4. 안병으로부터 추출하여 Sephadex G50로 분리하여 얻은 fraction group의 징거미새우에 대한 성성숙 및 산란억제효과.  
Table 4. Effects of fraction groups (Pool I and Pool II) which were isolated from eyestalk extract by Sephadex G50 column on inhibition of gonadal maturation and spawning in freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*.

	Common Molt	Reproductive Molt		lecimen
		Spawning	Non-spawning	
Control	0	10	0	10
Sham control	0	9	0	9
Pool I (Fraction No. 16 - 32)	5	4	1	10
Pool II (Fraction No. 41 - 60)	8	0	2	10

그리고 본 조사에서는 대하를 대상으로 실험은 하지 않았으나 같은 효과를 보일 것이라고 생각되며, Pool II에 속하는 단백질 분리 peak를 대상으로 생식소 성숙 억제 요인들이 탈피와 성장에는 어떠한 효과를 나타내는지에 대해서도 조사해볼 필요가 있다.

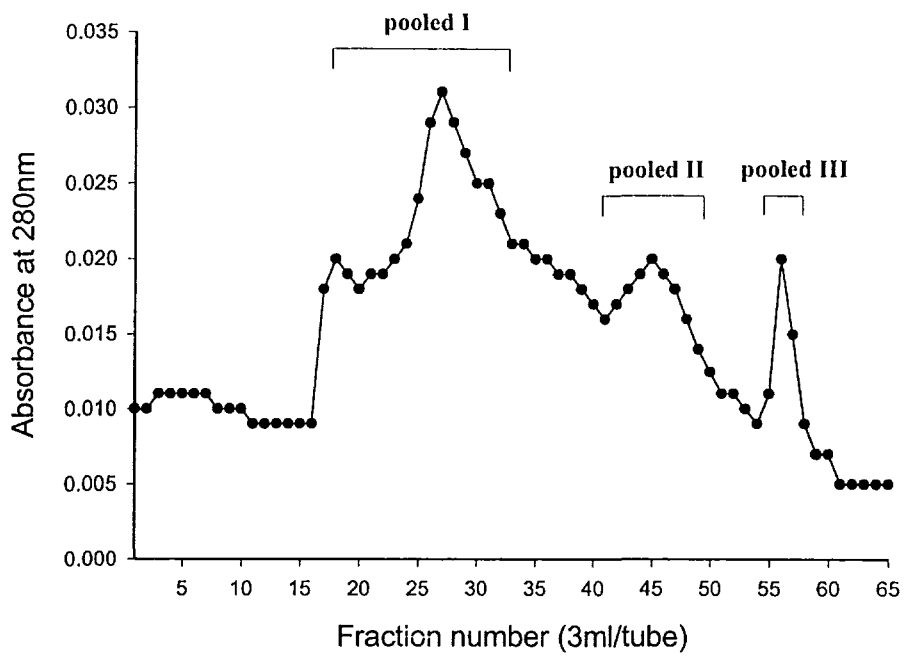


그림 19. 대하의 흉부신경절 추출물을 Capcell Pak C18)에 의해 분리한 후 Sephadex G50으로 분리한 분획상

Fig. 19. Elution profile on Sephadex G50 column of extracts from thoracic ganglion of *P. chinensis* chromatographed on a Capcell Pak C18.

2) 흉부신경절의 gonad stimulating hormone (GSH)의 특성 조사

흉부 신경절내의 GSH도 안병의 GIH 분리와 같은 방법으로 분리하여 그림 19에 나타내었다. 그림 19에서 보는 바와 같이 주된 peak는 4개로 나타났으며 첫 번째 peak와 두 번째 peak를 Pool I으로 하고 세 번째와 네 번째 peak를 각각 Pool II와 Pool II로 하여 fraction들은 모아서 생식소 성숙이 억제되어 있는 휴지기 상태의 징거미새우를 대상으로 bioassay를 하였다. 그 결과는 표 5에 나타내었다.

표 5. 흉부신경절 추출물을 Sephadex G50으로 분리하여 얻은 fraction에 대한 징거미새우의 생식소 성숙 유도 효과

Table 5. Effects of elution peak (Pool I, Pool II and Pool III) which were isolated from thoracic ganglion extract by Sephadex G50 column on stimulating of gonadal maturation in freshwater prawn, *M. nipponense*.

	Common Molt	Reproductive Molt		No. of survived specimen	No. of experimental specimen
		Spawning	Non-spawning		
Intact control	15	0	0	15	15
Sham control	11	0	0	11	15
Pool I	8	0	0	8	15
Pool II	9	0	0	9	15
Pool III	6	0	0	6	15



징거미새우를 12L12D와 28℃로 20일간 사육하여 모두 생식소가 억제되어 성장을 위한 일반탈피를 지속하고 있는 개체들만 선택하여 2일간격으로 한 마리분인 100 $\mu$ 씩 주사하였다. 주사는 20일간 10회 연속하여 주사하였으나 모두 생식소의 성숙은 나타나지 않았다. 그리고 대부분 일반탈피만 하였다.

갑각류에서는 GSH의 생성근원지가 흉부신경절이나 뇌라고 생각하고 있다 (Adiyodi, 1985). 그러나 아직까지 흉부신경절이나 뇌로부터 GSH를 분리하여 생식소 성숙 촉진효과를 밝힌 연구는 없으며, 단지 미숙한 거미게(spider crab)의 일종인 *Libinia emarginata*(Hinsch and Bennett, 1979)에서 안병을 절제한 후 흉부신경절을 삽입한 경우가 그렇지 않은 경우보다 난황형성 효과가 있었다는 보고만이 찾아 볼 수 있으며 그 외에는 흉부신경절이 혈액내의 mineral ion의 balance를 조절한다는 보고가 있을 뿐이다(Bills, 1968, 1979; Mantel et al., 1975). 본 실험에서 징거미새우를 안병을 절제하지 않은 상태에서 흉부신경절 추출물을 주사하였을 때 생식소 성숙 촉진 효과를 전혀 볼 수가 없어서 대하를 대상으로는 실험하지 않았다.

#### 4. 성성숙 유도물질에 의한 생식소 성숙 유도

##### 1) 5-Hydroxytryptamine (5-HT)의 효과

생식소 성숙 유도에 대한 5-HT의 효과를 알아보기 위하여 1998년 3월 1일부터 20일까지 교미한 암컷을 대상으로 수온 10℃, 일장 12L12D의 조건에서 사육하면서 5-HT을 5ng/g BW와 15ng/g BW로 7일 간격으로 3회 주사하여 생식소 성숙 상태를 조사하여 그림 20에 나타내었다. 실험 개시 때 대조구의 GSI는  $1.86 \pm 0.37\%$ 이었으며 난소 내의 난모세포들은 난황형성전기에 있었다. 사육 20일 후에 생리식염수만 주사한 실험구에서도 다소 성숙하여 GSI는  $3.02 \pm 0.22\%$ 로 약간 상승하였다. 5-HT를 5ng/g BW를 주사한 실험구에서는 눈에 띄게 성숙한 개체들은 보이지 않았으며 거의 실험 개시 때의 성숙

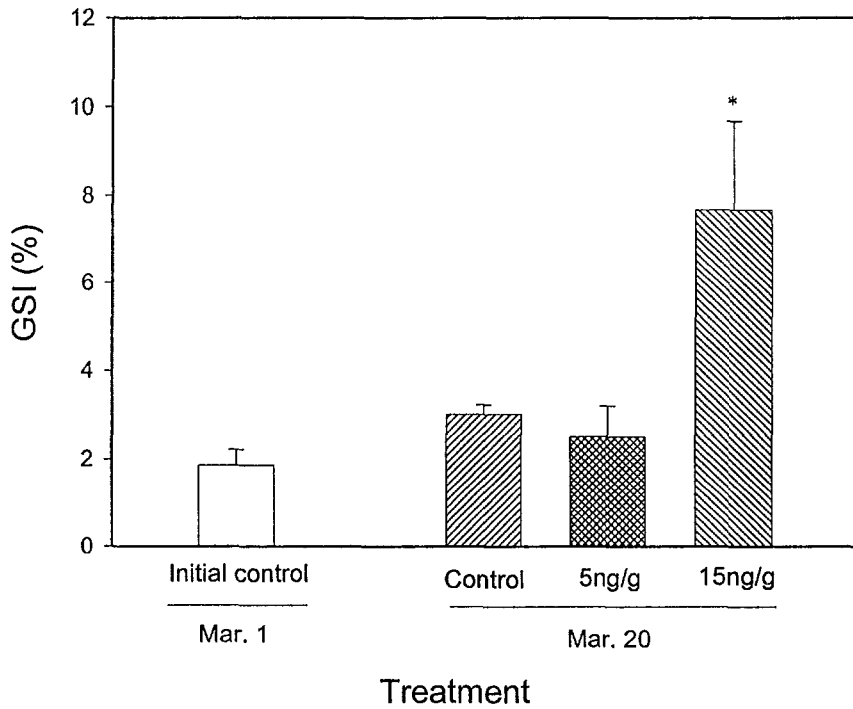


그림 20. 5-hydroxytryptamine (5-HT)의 투여에 의한 대하 암컷의 GSI 변화.  
 Fig. 20. Changes of GSI on 5-hydroxytryptamine (5-HT) injection in female prawn, *P. chinensis*.

상태와 별다른 차이는 없었다. 그러나 15ng/g BW를 주사한 실험군에서는 평균 GSI가  $7.67 \pm 2.02\%$ 로 상승하였으며 5마리 중 1개체는 GSI가 14.82%로 거의 완숙단계에 있었고 다른 한 개체는 GSI가 9.11%로 난황형성후기의 거의 완숙상태에 있었다. 그러나 나머지 개체들은 GSI가 2.05%에서 3.41%의 범위로 난황형성 초기에 있었다.

이러한 실험결과로부터 5-HT는 대하의 생식소 성숙유도에 효과가 있다고 보여진다. 그러나 5-HT의 투여 농도범위를 더 다양하게 하고, 실험 시기도 성장기, 미 성숙시기와 성숙시기로 나누어 다양하게 시행할 필요가 있다고 본다. 또한 다른 성숙 유도요인(예, 수은, 안병절제등)과 병행하여 실험한다면 더 유용한 결과를 얻을 수 있으리라 본다.

## 2) HCG와 Ecdysone의 효과

일부 갑각류에서 성숙 유도 효과가 있다고 알려진 Ecdysone(EDS), HCG의 대하에서 성 성숙 효과를 확인하기 위하여 3월 5일부터 3월 20일까지 10°C에서 사육하면서 EDS와 HCG를 5일간격으로 3회 주사하면서 생식소 성숙 상태를 조사하여 그 결과를 그림 21에 나타내었다.

실험 개시전(3월 5일)의 GSI는  $1.88 \pm 0.21\%$ 로 모두 미성숙 상태에 있었으며 난모세포들은 잘 발달되어 있는 여포세포로 둘러 쌓여 있었다. 15일 후(3월 20일) 생리식염수만 처리한 대조구에서는 GSI가  $2.13 \pm 0.45\%$ 로 증가하였으며 난모세포들은 모두 전난황형성기에 있었으나 실험개시전과 유의한 차이는 보이지 않았다. EDS를 5ng/g BW, 10ng/g BW 그리고 20ng/g BW로 3회 주사한 실험구에서 GSI가 각각  $1.89 \pm 0.51\%$ ,  $2.34 \pm 0.43\%$  그리고  $2.10 \pm 0.51\%$ 로 무처리 대조구와 차이가 전혀 없었다. 그러나 10ng/g BW를 처리한 실험구에서 7마리중 한 마리가 난황이 시작하는 난황형성전기 단계에 있는 난모세포를 가졌다.

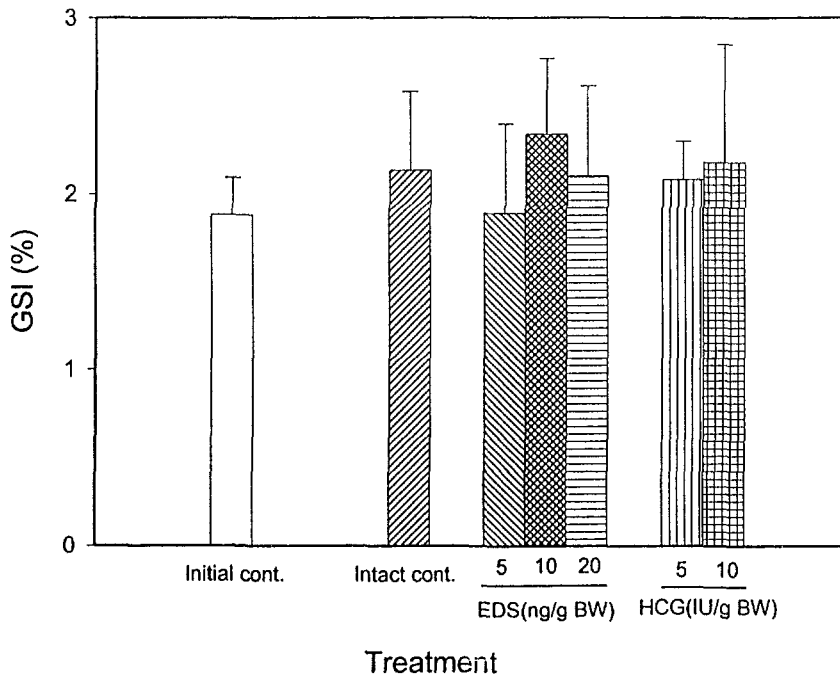


그림 21. Ecdysone (EDS)와 HCG 처리에 의한 대하 암컷 GSI의 변화. 사육실험기간: 3월 5일부터 3월 20일까지  
 Fig. 21. Changes of GSI values on ecdysone(EDS) and HCG injection in female prawn, *P. chinensis* kept at 10 °C and 12L12D condition. Experimental duration : March 5 ~ March 20

HCG를 처리한 실험구들에서도 5 IU/g BW와 10 IU/g BW를 처리한 개체군들의 GSI가 각각  $2.08 \pm 0.22\%$ 와  $2.18 \pm 0.67\%$ 로 무처리 실험구와 전혀 그 차이를 볼 수 없었다. 난소의 조직학적 관찰에서는 10 IU/g BW를 처리한 실험구에서 6마리중 한 마리가 난황형성 중에 있는 난황형성전기 단계의 난모세포들을 가지고 있었다.

본 실험에서 대하에서는 EDS나 HCG가 난황형성을 유도하는 효과는 전혀 찾아볼 수가 없었다. 보리새우에서는 HCG를 5 IU/g BW로 처리하였을 때 난황형성에 도움이 된다는 보고가 있으나(Yano and Chizei, 1990; Jang et al., 1999), 이들 연구에서는 보리새우의 재성숙을 위해 산란후의 모하를 이용하였으며 또한 안병 절제와 병행하여 실험을 하였으며 통계적인 유의성을 검정한 결과는 아니었다. 본 연구에서도 GSI의 평균치에 대한 유의성 검정에서는 유의 차가 전혀 없었지만 조직학적 관찰에서는 그 차이를 다소 관찰할 수 있었다.

또한 곤충류나 갑각류의 탈피호르몬으로 널리 알려진 Ecdysone이 난소 발달과 관련이 있다는 보고는 일부 갑각류와 곤충에서 알려져 있다(Chaix and Reggi, 1982; Hagedorn et al., 1975). 그러나 본 실험에서는 난소 성숙에 유의한 성숙 촉진효과는 볼 수 없었다.

위 실험에서 호르몬제의 투여 실험구에서 일부 개체가 난황형성을 시작한다는 결과는 호르몬제의 투여 양이나 투여시기, 그리고 다른 환경적인 조건 등을 상세하게 나누어 실험한다면 성숙 촉진 효과를 얻을 수 있다는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

수온이 서서히 상승하는 자연수온 조건에서 5-HT, EDS, HCG를 처리하였을 때 성숙 유도 효과를 보기 위한 실험 결과는 그림 22에 나타내었다. 실험 개시전의 대하의 GSI는  $1.90 \pm 0.37\%$ 로 미성숙한 상태이었다. 5-HT를 처리한 실험구의 GSI는  $5.81 \pm 0.90$ 로 대부분 개체들의 난소에서는 난황형성

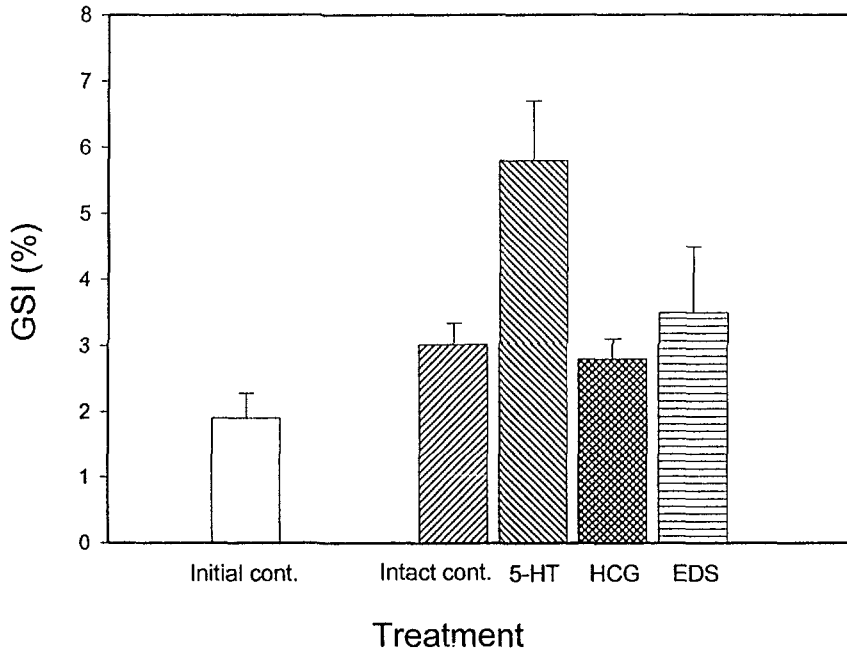


그림 22. 5-hydroxytryptamine (5-HT), HCG 그리고 Ecdysone (EDS)처리에 따른 GSI의 변화.

Fig. 22. Changes of GSI values on 5-hydroxytryptamine (5-HT), HCG and Ecdysone (EDS) injection in female prawn, *P. chinensis* kept at 10°C and 12L12D condition. Experimental duration : March 5 ~ March 20

을 시작하고 있었다. 그러나 EDS (10ng/g)나 HCG (50IU)를 처리한 실험구의 개체들에서는 GSI가 각각  $3.50 \pm 1.05\%$ 와  $2.82 \pm 0.34\%$ 로 GSI의 상승은 있었으나 무처리 대조구와 전혀 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 2차 실험에서도 대하에서는 EDS나 HCG는 성숙유도 효과가 없으며 5-HT가 성숙유도효과가 있음을 알 수 있었다

## 제 4 장 산란 유도

### 제 1 절 서 론

우리 나라 서해안에 서식하는 대하들은 수온이 13℃이하로 하강하는 10월 말에서 12월 사이에 제주도 서쪽 124 °E 부근으로 회유하여 월동한 후, 3월부터 4월에 걸쳐 서해연안으로 이동하여 수온이 15℃로 상승하는 5월에서 6월 사이에 산란한다고 알려져 있다(Liu, 1990). 우리 나라에서 대하 종묘생산은 주로 5월에 이루어지고 있으며 4월에 산란을 위해 북상하는 완숙상태의 대하로부터 산란을 유도하여 수정란을 얻어 종묘생산하고 있다. 산란율을 높이기 위한 산란 유도는 일반적으로 사육수온(16℃~18℃)보다 2~3℃이상으로 수온을 올려주는 수온자극방법을 주로 이용하고 있으며(Rho, 1990), 그 외에 다른 방법들은 사용하지 않고 있다. 산란율은 체포 수역과 시기, 성숙상태와 체포에 의한 stress 등에 따라 다르며, 산란용 수조의 조건에 따라서도 다르게 나타날 수 있다.

본 종에서는 산란율을 높이기 위한 산란 유도실험을 한 연구는 찾아보지 못했지만, 보리새우(*P. japonicus*)에서는 안병절제에 의한 산란 촉진이나 자외선을 사육수조에 조사하여 산란을 유도하는 연구들이 있다(Yano, 1984; Yano and Tanaka, 1984).

산란 후 부화된 대하 치하는 7월 초순까지 평균체장이 30mm정도까지 자라서 3개월간 급속하게 성장하여 10월 초순에 체장이 180mm전후에 이른다(李와 金, 1991). 이러한 급속한 성장은 대하의 성장에 대한 최적 수온이 25℃에서 30℃까지라고 알려져 있어(Okamasao, 1970; Kexing, 1984; Yang, 1990) 여름의 고수온기에 최고 성장을 나타냈기 때문이라고 할 수 있다. 그리고 대하에 치명적으로 피해를 주는 흰반점바이러스에 의한 발병시기가 6



월부터 10월에 걸쳐 일어나지만 8월의 고수온기보다 수온이 상승하는 6월과 7월 그리고 수온이 다시 내려가는 9월과 10월 사이에 발병율이 높기 때문에 9월 이전에 대하를 출하하는 것도 바이러스로부터 피해를 줄일 수 있는 하나의 방법이 될 수 있다.

이러한 조기 종묘생산 체계에 의한 대하의 조기출하를 위해서는 조기 성숙 기술과 아울러 대량의 수정란을 얻을 수 있는 산란유도방법 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 대하의 산란양을 높이고 아울러 종묘생산시기를 1~2개월 정도 앞당김으로써 바이러스로부터의 피해를 줄이고 조기 출하에 의한 생산성 확대를 도모할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 조기 성숙 유도 방법에 따른 효율적인 산란유도 방법을 찾아내고 산란양을 최대로 얻을 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 대하 채집과 수용

산란 유도실험을 위한 대하는 11월과 12월초에 걸쳐 월동을 위해 남하 회유하여가는 자연상태의 대하를 낭장망으로 채집하여 교미전을 가진 암컷만 선택한 후 국립수산진흥원 태안수산시험장에 설치된 콘크리트 수조(2<sup>W</sup> × 4<sup>L</sup> × 3<sup>H</sup>m)에 약 300마리를 수용하였다. 양식산 대하는 태안 소재의 양식업자로부터 대하를 구입하여 같은 방법으로 수용하였다.

실험을 위해 대하들은 자연수온 조건에서 일장조건을 단일(12L12D) 조건으로 조절하여 수용하였으며, 먹이로는 반지락 육편을 하루에 1회 투여하였다. 자연수온이 7°C 이하로 내려갈 때는 보일러를 이용하여 여과 해수 (pH: 7.8 , Salinity: 31‰)를 가온하여 공급하여 수온을 8°C까지 유지하였다. 환수량은

매일 20%정도로 하였다.

## 2. 산란양 및 부화율조사

산란양을 조사하기 위하여 산란 직전의 개체를 500 l의 원형 산란 수조에 개별 수용하여 산란을 유도하였다. 산란수의 조사는 산란이 시작되는 날부터 최종 산란일까지 산란되어진 난의 수를 1 l 비이커를 이용하여 무작위로 채취하여 비이커에 들어 있는 난수를 조사하였고 여기에 총 물량을 곱하여 산출하였다. 이 방법을 5회 반복하여 최고, 최저 수치를 뺀 나머지 수치의 평균을 산출하여 평균 산란수로 나타내었다.

부화율은 각 산란 수조에서 1 l 비이커를 이용하여 부화 종료시기에 무작위로 채취, 부화한 총 nauplius 수를 산란수로 나누어 백분율로 계산하였으며, 이를 5회 반복 조사하여 최고와 최저의 수치를 뺀 나머지 수치의 평균을 산출하여 부화율로 나타내었다.

## 3. 산란유도 실험

### 1) 월동 수온과 안병절제에 따른 산란양과 부화율

월동수온은 8℃, 10℃, 12℃로 나누었으며 일장조건은 12L12D로 하였다. 수온 조절과 일장 조절 등의 사육방법은 제 3절에 설명한 것과 동일한 방법으로 하였다. 월동 기간은 1월 2일부터 2월 7일까지 1개월 월동과 1월 2일부터 3월 9일까지 2개월 월동조건으로 나누어 월동하였으며 월동기간이 끝나는 날부터 하루에 1℃씩 수온을 올려 19℃까지 올린 이후 같은 온도로 사육하면서 난소가 암녹색을 띄고 입상의 형태로 보일 때 따로 준비된 산란 수조로 옮겨 19℃까지 올린 이후부터 산란까지 걸리는 시간(일수)과 산란양 그리고 부화율을 조사하였다.

안병절제에 의한 성숙 유도가 산란양과 부화율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 위의 각 실험군에서 안병 한쪽을 절제하여 난소성숙을 유도한 실험군

을 설정하고 완숙상태에 이른 후 산란을 유도하여 산란양과 부화율을 조사하여 비교하였다.

### 2) 수온과 염분농도에 따른 산란율

산란유도에 대한 수온과 염분농도의 효과를 조사하기 위하여 10℃에서 2개월 동안 월동한 후 19℃까지 수온을 상승시켜 난소가 짙은 녹색의 입상상태로 보이는 완숙한 상태의 모하를 사용하였다. 일장 12L12D의 조건에서 수온 21℃, 24℃, 27℃와 염분농도 15‰, 20‰, 25‰, 30‰, 35‰의 조건을 서로 조합한 15개의 산란수조를 만들어 완숙상태의 모하를 산란 수조에 옮겼을 때 산란율을 조사하였다.

### 3) 수온, 안병절제와 HCG 처리에 의한 산란율

산란유도를 위한 수온자극 방법을 조사하기 위하여 상기한 월동 후 완숙상태의 모하를 21℃와 23℃로 수온을 올려 4일간 산란개체 수를 조사하였다.

상기의 수온자극에 의해서도 산란이 유도되지 않은 개체들에 대하여 안병절제에 의한 산란유도효과를 조사하기 위하여 양쪽 안병을 절제하여 산란여부를 조사하였다.

또한 HCG가 산란유도효과를 보기 위하여 19℃에서 사육중인 모하를 수온자극 없이 HCG를 50IU/g BW가 되도록 두흉부에 microsyringe로 1회 주사하여 산란유도 효과를 조사하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 월동조건과 안병절제에 따른 산란양과 부화율

안병을 한쪽만 절제한 실험구와 안병을 절제하지 않은 실험구로 나누어 1월 2일부터 수온을 10℃와 12℃로 1개월 동안 월동 사육한 후 19℃로 사육수

온을 상승시킨 후 산란수와 부화율을 조사한 결과를 그림 23과 24에 나타내었으며, 산란까지 걸리는 소요일수를 표 6에 나타내었다.

산란은 어떠한 조건이든 주로 22:00와 02:00시 사이로 주로 야간에 일어났으며, 그 중에서 01:00경에 가장 많은 산란을 하였다. 대하는 원형수조의 중층에서 수조의 벽면을 따라서 유영지를 활발히 움직이며 산란을 하였다.

그림 23 에서 나타낸 것과 같이 안병을 절제하지 않은 실험구의 경우에는 10℃, 12℃에서 사육한 후 19℃로 수온을 상승시켜서 사육하였을 경우 산란된 수정란의 수는 각각  $227,413 \pm 105,233$ 개,  $249,850 \pm 13,158$ 개로 나타났다. 그리고 안병을 절제한 실험구에서는 10℃와 12℃에서 각각  $207,980 \pm 41,558$ 개와  $184,853 \pm 43,635$ 개로 나타났다. 이 실험결과에서 보면 각 실험조건에 따른 유의한 차는 거의 찾아볼 수 없었으나, 일반적으로 안병을 절제하여 사육한 경우보다 안병을 절제하지 않고 사육한 경우가 산란양이 비교적 많은 경향을 보여주고 있다.

그리고 19℃로 사육수온을 올린 후 산란까지 걸리는 평균 시간은 안병을 절제한 실험구의 10℃와 12℃에서 각각  $30.7 \pm 5.3$ 일과  $21.0 \pm 8.1$ 일 걸렸으며, 안병을 절제하지 않은 실험구의 10℃와 12℃에서는 각각  $33.7 \pm 4.4$ 일과  $27.5 \pm 5.1$ 일이 걸렸다. 이 결과에서 보면 월동수온이 높은 경우가 성숙하여 산란까지 걸리는 시간이 짧으며, 같은 수온 조건에서도 안병을 절제한 경우가 안병을 절제하지 않은 경우보다 산란까지의 소요시간이 길다는 것을 알 수 있었다.

각 실험조건에서의 부화율을 보면(그림 24) 안병을 절제한 실험구에서는 10℃와 12℃에서 각각  $85.80 \pm 5.19\%$ 와  $89.52 \pm 3.84\%$ 로 나타났고, 안병을 절제하지 않은 실험구에서는 10℃와 12℃에서 각각  $88.75 \pm 1.20\%$ 와  $86.30 \pm 2.42\%$ 로 나타났다. 부화율에서는 안병절제한 실험군이나 절제하지 않은 실험군 간의 유의한 차이나 경향은 찾아보기 힘들었다.

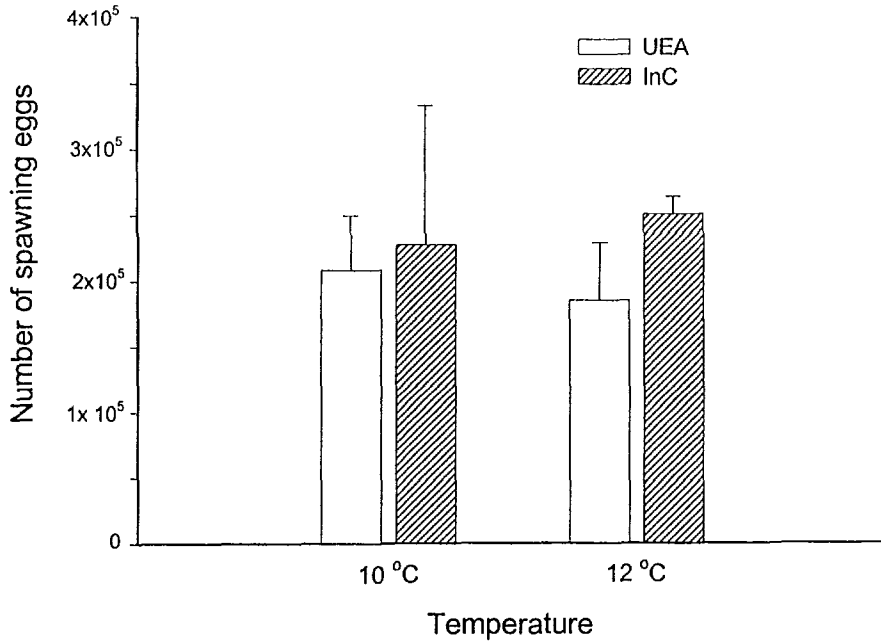


그림 23. 1개월간의 월동 수온조건(10°C와 12°C)에서 산란양에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 2월 7일.

Fig. 23. Comparison of number of spawning eggs in unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, *P. chinensis* kept at 10°C and 12°C during one month (from January 2 to February 7). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group)

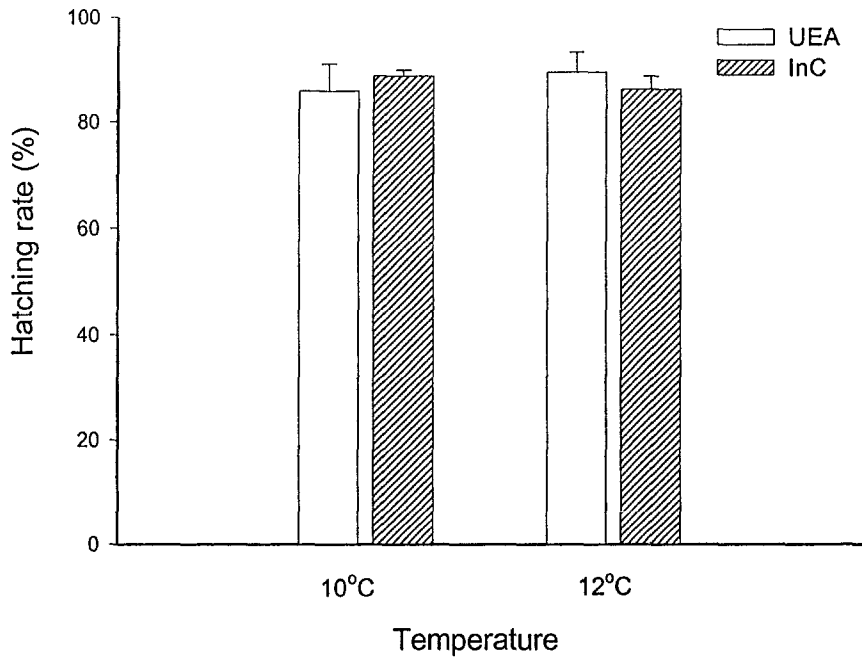


그림 24. 1개월간의 월동 수온조건(10°C와 12°C)에서 대하의 부화율에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 2월 7일.  
 Fig. 24. Hatching rates of unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, *P. chinensis* kept at 10°C and 12°C during one month (from January 2 to February 7). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group)

1월 2일부터 3월 9일까지 약 2개월간 월동사육 기간을 거친 후 수온상승으로 성숙과 산란을 유도한 후 산란양과 부화율을 조사한 결과는 그림 25와 그림 26에 나타내었으며 산란까지의 소요시간(일수)은 표 6에 나타내었다.

그림 25 에서 나타낸 것과 같이 안병을 절제한 실험구의 경우 8℃, 10℃, 12℃에서 2개월동안 사육한 후 19℃로 수온을 상승시켜서 사육하였을 때 산란된 수정란의 수는 각각  $332,220 \pm 67,345$ 개,  $322,800 \pm 29,975$ 개,  $341,779 \pm 74,163$ 개로 나타났다. 그리고 안병을 절제하지 않은 실험구에서는 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 각각  $441,040 \pm 8,7122$ 개,  $447,280 \pm 40,390$ 개 그리고  $314,453 \pm 32,563$ 개로 나타났다.

이들 실험결과에서 8℃와 10℃ 실험구에서는 한쪽 안병을 절제하여 월동한 실험구보다 안병을 절제하지 않고 월동한 실험구에서 산란양이 많았으며 일반적으로 마리당 평균 10만개 이상 차이를 보였다. 그러나 12℃ 실험구에서는 그 차이가 보이지 않았다. 또한 안병을 절제한 실험구에서는 월동수온에 따른 산란양의 차이를 볼 수 없었으나 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구에서는 월동수온이 낮은 8℃와 10℃의 조건에서 산란양이 12℃보다 비교적 많이 나타났다. 이러한 안병을 절제하여 월동한 경우가 그렇지 않은 경우보다 산란양이 적은 결과는 1개월 월동한 실험 결과와 유사하나 1개월 월동시보다 그 차이가 뚜렷하게 나타났다. 이는 안병 X-organ으로부터 생식소 성숙 억제 호르몬이 분비되지 않은 저수온 기간동안 시원생식세포의 분열증식을 할 수 있는 기간이 1개월 월동보다 2개월의 월동이 길기 때문에 더 많은 산란양을 얻을 수 있었던 것으로 생각된다. 따라서 월동기간은 길수록 또한 월동수온은 낮을수록 시원생식세포의 분열증식할 수 있는 기회를 더 많이 주게 되어 산란양은 더 많아질 것으로 추정할 수 있다.

그리고 표 6에 나타낸 바와 같이 2개월 월동 후 19℃로 사육수온을 올린 후 산란까지 걸리는 평균 시간은 안병을 절제한 실험구의 8℃, 10℃ 그리고

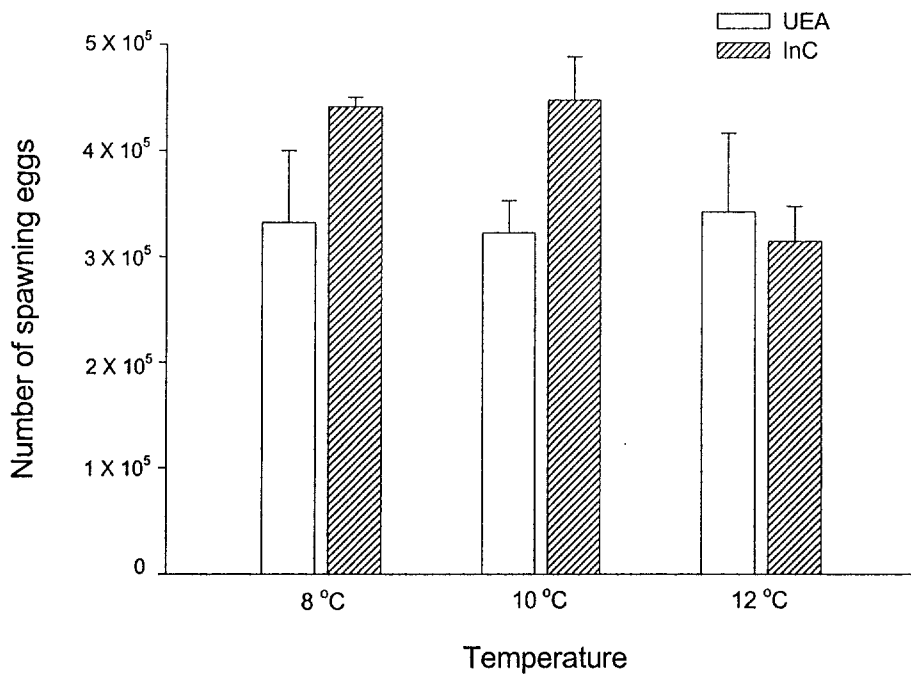


그림 25. 2개월간의 월동 수온조건(8°C, 10°C, 12°C)에서 대하의 산란 양에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 3월 9일.

Fig. 25. Comparison of number of spawning eggs in unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, *P. chinensis* kept at 8°C, 10°C and 12°C during two months (from January 2 to March 9). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group)



12℃에서 각각  $15.5 \pm 0.71$ 일,  $18.3 \pm 4.27$ 일 그리고  $13.3 \pm 4.72$ 일 걸렸으며, 안병을 절제하지 않은 실험구의 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서는 각각  $26.5 \pm 9.19$ 일,  $25.6 \pm 6.5$ 일 그리고  $21.6 \pm 1.2$ 일이 걸렸다.

표 6. 월동조건에 따른 산란양과 산란까지 걸리는 소요일수  
 Table 6. The number of spawning eggs and the time required for spawning in wintering conditons.

Duration of wintering	Treatment	Temperature (°C)	No. of spawning eggs ( $\times 10^3$ )	Time required for spawning (days)
one month (Jan. 2 - Feb. 7)	Unilateral eyestalk ablation	10	$207.9 \pm 41.6$	$30.7 \pm 8.1$
		12	$184.9 \pm 43.6$	$21.0 \pm 5.3$
	Intact	10	$227.4 \pm 105.2$	$33.7 \pm 5.1$
		12	$249.8 \pm 13.1$	$29.5 \pm 4.4$
two months (Jan. 2 - Mar. 9)	Unilateral eyestalk ablation	8	$332.2 \pm 67.3$	$15.5 \pm 0.7$
		10	$322.8 \pm 30.0$	$18.3 \pm 4.3$
		12	$341.8 \pm 74.2$	$13.3 \pm 4.7$
	Intact	8	$441.0 \pm 8.7$	$26.5 \pm 9.2$
		10	$447.3 \pm 40.4$	$25.6 \pm 6.5$
		12	$314.5 \pm 33.6$	$21.6 \pm 1.2$

이 결과에서 보면 월동수온이 높은 경우가 성숙하여 산란까지 걸리는 시간이 짧으며, 같은 수온 조건에서도 안병을 절제한 경우가 안병을 절제하지 않은 경우보다 산란까지의 소요시간이 길다는 것을 알 수 있었다.

한편 2개월간 월동한 각 실험조건에서 얻은 수정란에 대한 부화율을 보면 그림 26에 나타낸바와 같이 안병을 절제한 실험구에서는 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 각각  $93.0 \pm 4.2\%$ ,  $86.2 \pm 8.8\%$  그리고  $90.1 \pm 9.0\%$ 로 나타났으며, 안병을 절제하지 않은 무처리 실험구에서는 8℃, 10℃ 그리고 12℃에서 각각  $90.5 \pm 1.6\%$ ,  $91.2 \pm 5.6\%$  그리고  $87.1 \pm 5.5\%$ 로 나타났다. 부화율에서는 1개월 월동 실험구들에서와 마찬가지로 안병절제한 실험군이나 안병을 절제하지 않은 실험군 간의 유의한 차이나 경향은 찾아보기 힘들었다.

그러나 1개월 월동 후 수정란의 부화율은 약 85%~89%인 반면 2개월 월동 후 수정란의 부화율은 86%~93%로 1개월 월동한 실험구들보다 비교적 높은 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 월동기간에 따라 난질에도 영향을 줄 수 있음을 보여주는 결과라고 생각된다. 부화율을 높이기 위해서는 가장 중요한 요인이 난내에 난황물질이 충분히 축적되어있어야 한다는 것이다. 난황물질은 주로 난황단백질과 지질로 이루어져있으며, 새우류에서 이들 물질은 주로 난외부의 간체장 등에서 만들어져 난내로 축적되어진다고 알려져 있다(Chen, et al., 1999; Han et al., 1994; Quackenbush, 1989). 따라서 난질을 높이기 위해서는 충분한 먹이 섭취로 간체장의 영양상태가 양호하여 충분한 양의 난황물질을 공급할 수 있어야 한다. 부화율을 높이기 위해서는 될 수 있는 한 월동기간을 길게 해주어 간체장에 난형성에 쓰일 수 있는 충분한 양의 영양물질들이 축적될 수 있도록 하는 것이 좋으리라 생각한다.

## 2. 수온과 염분농도에 따른 산란유도효과

수온 자극 조건에 따른 산란율을 조사하기 위하여 10℃에서 2개월동안 월동사육한 후 19℃로 생식소가 성숙하여 완숙상태의 모하를 대상으로 표 7에 나타낸 바와 같이 19℃에서 지속적으로 사육하였을 때와 19℃에서 2℃올려 21℃에 두었을 때 그리고 4℃올려 23℃에 두었을 때의 부화율을 조사하였다.

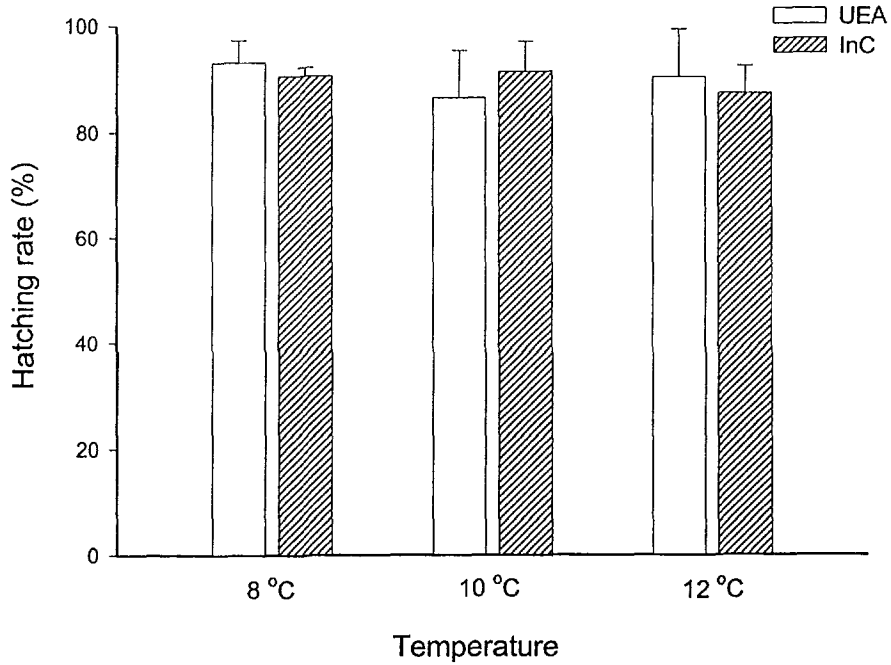


그림 26. 2개월간의 월동 수온조건(8°C, 10°C, 12°C)에서 대하의 부화에 대한 안병절제 효과. 월동기간: 1월 2일부터 3월 9일.

Fig. 26. Hatching rates of unilateral eyestalk ablation and unablation groups of female prawn, *P. chinensis* kept at 8°C, 10°C and 12°C during two months (from January 2 to March 9). UEA: unilateral eyestalk ablation group, InC: Intact control group (unablation group)

표 7. 수온처리에 의한 대하의 산란율

Table 7. Spawning rate of *P. chinensis* reared under different treatment of water temperature.

Treatment	No. of mature prawn	Spawning specimen				Spawning rate (%)
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
19℃	10	0	0	1	3	40.0
19℃→21℃	43	0	24	14	1	90.7
19℃→23℃	22	3	11	2	0	72.7

표 7에서 보는바와 같이 19℃의 완속상태에서 따로 마련된 19℃ 수조에 옮겨 같은 수온을 계속 유지하였을 때는 40%의 산란율을 보였지만 수온을 2℃ 올려 21℃의 수조에 옮겼을 때는 2일째 되는 날에 55.8%에 해당하는 24마리가 산란을 하였으며 4일째되는 날까지 모두 90.7%가 산란을 하였다. 19℃에서 4℃올려 23℃에서 산란을 유도하였을 때는 첫날 13.6%에 해당하는 3마리가 산란하였으며 그 다음날 50%인 11마리가 산란하여 모두 72.7%의 산란율을 보였다.

이러한 실험결과로 볼 때 대하의 산란유도 방법은 수온자극의 범위가 클수록 산란 유도효과는 떨어짐을 알 수 있으며 2℃전후의 온도범위로 수온자극을 주는 것이 가장 바람직하다고 본다.

한편, 산란에 미치는 수온과 염분 농도와의 관계를 보기 위해 수온자극 조건 20℃, 24℃ 그리고 28℃의 조건과 염분농도 15‰에서 40‰까지 6개이 염분농도의 실험구로 나누어 수온과 염분농도를 서로 조합하여 실험한 결과를 표 8에 나타내었다.

표 8. 수온과 염분농도에 따른 대하의 산란율

Table 8. Effects of water temperature and salinity on spawning rate of *P. hinensis*.

Temp.	Salinity (‰)	15	20	25	30	35	40
	20°C	No. of mature female prawn	3	3	3	3	3
Spawning rate(%)		67	100	100	100	67	0
24°C	No. of mature female prawn	3	3	3	3	3	2
	Spawning rate(%)	0	67	67	100	0	0
28°C	No. of mature female prawn	2	2	2	2	2	2
	Spawning rate(%)	0	0	0	0	0	0

표 8에서 보는바와 같이 20°C에서는 염분농도 15‰와 35‰에서는 3마리중 2마리가 산란하여 65%의 산란율을 나타내었지만 염분농도 20‰와 30‰사이에서는 모두 100%의 산란율을 나타내었다. 40‰의 조건에서는 한 마리도 산란한 개체들이 보이지 않았다. 24°C에서는 염분농도가 30‰일때만 100%의 산란율을 나타내었으나 35‰와 40‰에서 그리고 15‰에서는 산란하지 않았다. 그러나 28°C의 조건에서는 염분농도의 어떠한 조건에서도 산란한 개체들이 보이지 않았다.

따라서 대하는 20°C의 조건에서는 산란에 대하여 광염성을 나타내었지만 수온이 높을수록 산란에 적합한 염분농도의 범위가 좁아짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 산란에 대한 환경조건으로는 염분농도보다 수온이 중요하게

작용하고 있음을 보여주며, 산란 유도에 가장 적합한 수온은 20℃이며 염분 농도는 25‰에서 30‰ 사이라고 생각되어진다.

### 3. 안병절제에 의한 산란유도

완숙상태의 모하들에 대하여 동시 산란유도를 위해 안병절제 효과를 실험하여 그 결과를 표 9에 나타내었다.

표 9. 안병절제에 의한 대하의 산란 유도 효과  
Table 9. Effects of eyestalk ablation on induce spawning of *P. chinensis*.

Experiment	First		Second	
	Bilateral ablation	Unilateral ablation	Bilateral ablation	Unilateral ablation
No. of treated prawn	10	10	8	8
Spawned specimen	6	9	6	8
Dead specimen	4	0	2	0
Spawn rate (%)	100	90	100	100

표 9에서 보는 바와 같이 한쪽 안병이든지 양쪽 안병을 절제하면 거의 모든 개체들이 절제 후 2일 이내에 모두 산란을 하여 90~100%의 산란율을 보였다. 양쪽 모두 안병을 절제한 경우에는 100%의 산란율을 보였으나 실험도중 폐사되는 개체들이 1차와 2차 실험에서 10마리중 각각 4마리와 2마리

가 나와 양쪽 안병절제 방법은 바람직하지 않으며 만일 수온 자극에 의해 산란이 유도 되지 않을 때에는 안병절제에 의한 산란 유도 방법도 좋은 방법이라고 생각한다. 안병절제에 의해 산란된 난의 부화율에서도 수온 상승에 의해 산란을 유도한 난의 부화율과 큰 차이는 없었다.

이러한 결과로 수온자극에 의해 산란유도가 되지 않은 개체들에 대해서는 바로 안병을 절제하여 산란을 유도하면 좋은 결과를 얻을 수 있다고 본다. 보리새우(*P. japonicus*)에서는 한쪽 안병을 절제하여도 2배 이상의 산란유도 효과를 얻을 수 있었다고 보고하고 있으나(Yano, 1984), 같은 보리새우과에 속하는 호주에서 왕새우(king prawn)이라고 하는 *P. plebejus*에서는 한쪽 안병을 절제하였을 때는 생식소 성숙 유도효과만 있고 산란 효과는 없었다고 보고하고 있다(Kelemec and Smith, 1980). 그러나 *P. plebejus*에서는 완숙상태가 아닌 모하를 대상으로 실험한 결과이기 때문에 생식소 성숙 상태에 따라 안병절제 효과의 결과가 각기 다르게 나타날 수 있다고 본다.

따라서 이러한 결과들은 안병 X-organ에서는 생식소 성숙 억제 요인만 있는 것이 아니라 산란 억제 요인도 함께 존재한다는 것을 의미한다. 지금까지 갑각류의 생식소 성숙과 관련한 안병 호르몬에 대해서는 대부분의 생식소 억제 요인인 GIH에 대해서만 연구되었으며 산란 억제 요인에 대한 연구 보고는 거의 찾아볼 수가 없었다. 앞으로 산란억제 요인에 대해서도 많은 관심을 가질 필요가 있다고 본다.

#### 4. HCG 투여에 의한 산란유도

어류에서 난황형성이나 최종성숙에 많은 효과를 가지고 있는 HCG가 갑각류에서는 산란에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위해 수온 19℃에서 사육중인 것들 중 난소가 암록색을 띠는 완숙한 상태의 암컷 10마리를 같은 사육수온에서 사육하면서 HCG 50IU/g BW가 되도록 두흉부에 주사하여 산란유도 효

과를 표 10에 나타내었다.

표 10에 나타나있는 바와 같이 무 처리한 개체들 중에서 3일 후에 2마리, 4일 후에 한 마리가 산란하여 30%의 산란율을 보였으나 HCG를 처리한 개체들 중에서는 3일 후에 3마리, 4일째 한 마리가 산란을 하여 4일까지 산란한 개체는 모두 4마리로 40%의 산란율을 나타내었다. 이러한 결과만으로는 산란유발에 HCG의 효과가 있다고 단정하기는 어려우나 그 가능성은 보여주고 있다. 따라서 앞으로 많은 개체들을 대상으로 다양한 실험구를 설정하여 실험하게되면 HCG를 이용하여 산란을 유도할 수 있는 방법이 개발되리라 본다.

표 10. HCG 투여에 의한 대하의 산란유도 효과  
Table 10. Effects of HCG injection on induce spawning of *P. chinensis*.

Treatment	No. of mature prawn	Spawning specimen				Spawning rate (%)
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Control	10	-	-	2	1	30
HCG (50IU/g BW)	10	-	-	3	1	40



여 백

## 제 5 장 바이러스 비감염 건강종묘생산과 양성

### 제 1 절 서 론

서해안의 새우양식은 최근 수년간 크게 증가하여 연간 생산량이 3천톤에 이르는 서해안의 가장 중요한 양식품종의 하나로 정착되어 가고 있지만 질병, 특히 바이러스성 질병에 의한 피해는 아직도 새우양식의 가장 큰 장애요인으로 작용하고 있는 실정이다

흰반점증후군 (WSSD: white spot syndrom disease)으로 알려진 새우바이러스질병은 1992년 중국에서 최초로 발견된 이래, 1993년부터 일본, 대만 등으로 확산된 후 필리핀, 태국, 인도네시아 등의 동남아시아뿐 아니라 인도양까지 확산되어 새우양식에 심각한 피해를 가져와 한때 아시아지역의 새우양식산업은 존폐의 위기에 놓여있기도 하였다. 1999년 파나마, 에쿠아도르, 과테말라 등 중남미의 많은 국가들에서도 본 바이러스가 보고되어 전세계적으로 흰반점바이러스에 안전지대는 없다고 할 수 있다. 국내에는 1993년 충남 지역에서 최초로 보고되었으며, 이것의 원인 바이러스인 WSSV (white spot syndorme virus)의 조직병리학적, 분자생물학적 진단 등에 관한 연구가 수진원을 비롯하여 일본, 대만 등 여러 나라에서 많은 연구가 이루어졌다 (농림부, 1998; Kim et al., 1998; Inouye et al., 1996; Zhan and Wang, 1998).

WSSV의 감염은 어미새우로부터 난을 통해 유생으로 전달되는 수직감염과 (vertical transmission) 주위 환경, 갑각류 등의 중간숙주 등을 통하여 전달되는 수평감염 (horizontal transmission)의 두 경로를 통하여 모두 이루어지는데 바이러스 전염을 예방하기 위해서는 수직감염 경로를 차단하는 것이 보다 근본적인 대책으로 알려져 있다.

이를 위하여 미국에서는 1990년대 초 *Penaeus vannamei*를 대상으로

IHHNV에 감염되지 않은 specific pathogen free (SPF) 종묘를 개발하여 생존율과 양식생산량을 크게 향상시켰지만 (Wyban, 1992), 대하에서는 요오드 등의 소독약제에 의한 세란 방법을 제외하고는 이러한 연구가 시도된 바 없다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 친하의 채집 및 월동사육관리

#### 1) 1차년도 (1998년 12월 21일~1월 31일: 42일간)

1998년 12월 21일에 충남 태안 연안에서 월동장으로 이동하기 위하여 남하 회유하는 개체군을 어선을 이용하여 포획한 후 활어차를 이용하여 서해수산연구소 산하 태안수산종묘시험장으로 운반한 후 40톤 사각콘크리트수조에 수용하였다. 이중 선별된 건강한 새우들은 1999년 4월 10일까지 태안수산종묘시험장 갑각류동 실내 수조에서 월동 및 대량 조기 종묘생산을 위하여 사육 관리되었다.

친하 사육관리는 총 42일간 (98. 12. 21~1. 31) 실시하였으며 월동사육을 위하여 수컷 194마리, 암컷 452마리 (B.W. 60.9g; B.L. 16.7cm)를 선별하여 여과해수가 공급되는 30톤 원형 콘크리트수조 2개에 수용하고, 보일러로 가온하여 수온 10℃ 내외를 유지하였다. 환수량은 30%/day를 유지하고 먹이는 바지락 및 오징어 육편을 1일 1-2회 공급하였다. 매일 아침 잔량의 먹이를 제거하고 수조의 바닥을 청소하면서 사체, 탈피각 등을 조사하여 생존율 및 탈피율 생체변화 등을 측정하였다.

#### 2) 2 차년도 (1999년 2월 1일~3월 2일: 30일간)

#### 성숙유도 사육 및 산란

실험군은 대조구 (control group)와 한쪽 안병을 결찰한 안병절제구 (EA,

eyestalk ablation group)의 2개 group으로 나누어 30톤 원형 콘크리트수조에 각각 130마리씩의 암컷을 수용하였다. 수온은 11.4℃에서 매일 1℃씩 상승시켜 최종 18~19℃를 유지시켰다. 먹이는 바지락, 오징어 절편 및 냉동 갯지렁이를 1일 2회 충분히 급이하였으며 잔량의 먹이는 다음날 아침 수조 청소시 제거하였다. 산란을 확인하기 위하여 매일 수조를 세밀히 관찰하고 비이커에 담은 사육수를 조사하였다. 유생 부화시부터 EP 배합사료를 4시간 간격으로 6회/일 공급하였다. 부화유생 및 부화율 등의 정확한 조사를 위하여 난소가 충분히 발달된 암컷들을 별도의 4톤 사각수조 및 2톤 원형수조에 옮겨 수용하여 산란을 유도하고 산란율, 부화율 등을 정확히 조사하였다.

### 성숙도 조사

생식소의 성숙단계를 조사하기 위하여 실험시작시와 5, 12, 19, 27일째 및 산란직후에 각 실험구별 5개체씩을 선별하여 생식소지수 (GSI, gonadosomatic index)를 조사하였다. GSI는 체중량에 대한 난소중량의 백분율로 나타내었다. 난모세포 발달단계를 조사하기 위하여 GSI를 측정된 난소는 조직절편으로 제작, H-E 염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였으며, 난소의 발달단계는 실험 시작 시와 23일째에 외관상 5단계로 구분하여 비교하였다.

## 2. 자연산 대하의 바이러스 감염율

### 1) 자연산 대하의 수집

#### 동계 남하회유 개체군

1998년 12월 21일 충남 태안 연안 (36° 4' N, 126° 2' E)에서 월동장으로 남하 회유하는 대하 개체군을 포획한 후 친하월동사육을 위하여 태안수산종묘시험장 실내 수조에 수용중인 친하 중 495개체 (암컷 369개체, 수컷 127개체)를 선별하여 바이러스 감염을 조사를 위하여 표본 추출에 사용하였다.

다음해인 1999년 12월 9일 동일한 지역에서 포획하여 태안수산종묘시험장

에 수용한 대하 암컷 845개체 중 444개체를 선별하여 바이러스 감염을 분석에 사용하였다.

### 춘계 산란 개체군

월동을 마치고 산란장으로 이동하는 춘계산란군 대하의 바이러스 감염을 조사를 위하여 4~5월의 4회에 걸쳐 약 500마리의 암컷을 채집하였다. 채집된 모하는 어류수송용 활어차를 이용하여 충남 대산 소재 종묘배양장까지 운송되어 실내에 시설된 50톤 원형수조에 수용하였으며 이중 건강한 암컷만을 선별하여 분석에 이용하였다. 지역별 분석된 암컷 개체수는 2000년 4월 19일 흑산도에서 채집된 98개체, 4월 27일 흑산도산 185개체, 5월 3일 흑산도산 94개체, 5월 11일 영광연안산 106개체의 총 483개체였다.

## 2) genomic DNA 추출 및 PCR

### Genomic DNA 추출 :

각 개체별 복지(pleopod)의 근육조직 약 25mg를 분리하여 1.5ml microtube에 넣고, 180 $\mu$ l의 lysis buffer (10mM EDTA; 30mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% SDS)와 proteinase K sol. (10 mg/mL) 20 $\mu$ l를 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 4시간 digestion 후 200 uL phenol을 넣고 흔든 다음 8,000 rpm에서 1분간 원심분리를 시킨 혼합액의 상층액을 회수하여 new microtube로 옮기고 다시 phenol/choloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), chloroform의 순서로 extraction을 시킨 후 옮겨진 상층액에 20 uL의 3M sodium acetate (pH 5.6)과 2.5 vol의 ethanol을 넣고 가볍게 흔든 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 핵산을 침전시킨다. 상층액을 완전히 버린 다음 70% cold ethanol로 DNA pellet을 세척한 후 microtube의 수분을 완전히 건조시킨 다음 100 uL의 1x TE buffer (pH 8.0)에 용해하여 PCR 반응의 template로 사용할 때까지 냉장보관하였다.

## **Polymerase chain reaction**

PCR 반응에 사용된 primer는 13-20 mer의 3 set (1F/1R, 2F/2R, 3F/3R)로서 이 중 두 set를 이용하여 nested PCR을 수행하였다. PCR reaction solution (1.0 unit Taq polymerase, 250 $\mu$ M dNTP, 10mM Tris-HCl, 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>)에 10 ng/tube의 template DNA와 2.5 pmol의 primer를 첨가하여 총 반응액이 20  $\mu$ l/tube가 되게 하였다.

PCR은 1차 (94 $^{\circ}$ C 5분 pre-reaction, denaturation 94 $^{\circ}$ C  $\times$  30초, annealing 52 $^{\circ}$ C  $\times$  1분, DNA extension 72 $^{\circ}$ C  $\times$  1분간 20-30 cycles), 2차 (94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C  $\times$  30초, 55 $^{\circ}$ C  $\times$  45초, 72 $^{\circ}$ C  $\times$  45초, 30 cycles)로 반응한 산물을 1.2% Agarose gel에서 70~100 volts에서 전기영동 후 UV 하에서 관찰하여 그림 27과 같이 바이러스 유전자 증폭 여부를 확인하였다.

### **3. 건강종묘 생산**

#### **1) 월동 친하를 이용한 건강종묘 생산**

1998년 12월 19일 채집하여 친하 월동사육을 위하여 태안수산종묘시험장의 실내수조에 수용 중인 친하 중 활력이 좋은 개체들을 분리하여 바이러스 비감염 건강모하를 선별에 사용하였다.

#### **바이러스 비감염 모하의 분리**

수조에 수용된 모하는 개체구분을 위하여 각 개체별로 각각의 측면에 일련번호가 기록된 비닐 (5  $\times$  5 mm)을 부착한 후 genomic DNA 추출을 위하여 복지의 일부를 절취하였다. 절취된 복지는 1.5 ml microtube에 넣어서 실험실로 냉동 운반된 후 180 $\mu$ l의 digestion buffer를 넣고 griding pestle에 의해 마쇄한 다음 20 $\mu$ l의 proteinase K (10 mg/ $\mu$ l)를 첨가하여 4시간 incubation 시켰다. 용해된 내용물은 phenol extraction, ethanol precipitation에 의해서

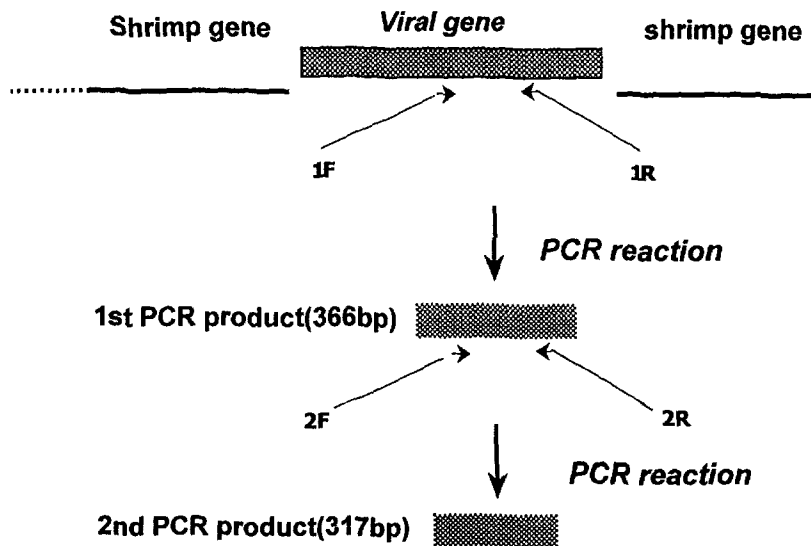


그림 27. PCR 증폭에 의한 흰반점바이러스 감염 새우의 분석  
모식도.

Fig. 27. Identification of WSSV-infected prawn by nested  
PCR amplification.

핵산을 추출한 후 1x TE buffer에 용해하여 PCR template로 사용하였다. PCR reaction에 의해 negative로 판명된 개체들은 염소소독 처리한 별도의 수조로 옮겨져 산란을 위해 성숙유도 되었다.

### 성숙유도 및 산란

별도의 30톤 원형콘크리트 수조에 수용되어 사육중인 바이러스 비감염 친하는 성숙유도를 위하여 99년 2월 1일부터 사육수의 수온을 1℃/일씩 상승시켜 최종 16~18℃를 유지하였으며 사육수의 환수율은 30%/일을 유지하고 오징어, 바지락, 갯지렁이를 1~2회/일씩 충분히 공급하였다. 그밖의 산란, 부화 및 유생사육은 조기종묘생산 실험과 동일하게 수행하였다.

#### 2) 춘계 산란군 모하를 이용한 건강종묘 생산

### 모하의 수집 및 건강모하 분리

춘계 산란군의 바이러스 비감염 건강종묘를 생산하기 위하여 2000년 4~5월에 흑산도 및 영광 연안에서 산란장으로 북상중인 약 500 마리의 모하를 채집하여 충남 대산 및 안면도 소재 3곳의 종묘배양장까지 운송하여 실내에 시설된 50톤 원형수조에 수용하였다. 이들 중 건강한 모하 만을 선별하여 월동모하의 실험시와 동일한 방법으로 개체구분을 하고, 개체별 genomic DNA를 추출, PCR에 의해 negative 개체들만을 별도 분리, 소독된 수조에 수용한 후 종묘생산에 이용하였다.

### 일반종묘 및 건강종묘의 바이러스 감염율 조사

바이러스 비감염 모하에서 생산된 유생 및 일반 모하에서 생산된 유생의 바이러스 감염 여부를 조사하기 위하여 각각 3개 종묘배양장 14개, 11개 수조의 단계별 유생을 채집하여 분석하였다. 각 수조별 50-100 개체의 유생을 mesh를 이용하여 채집한 후 microtube에 넣고 phenol extraction에 의해



genomic DNA를 추출, PCR을 실시하여 일반 종묘와 건강종묘의 바이러스 감염율을 비교하였다.

#### 4. 건강종묘를 이용한 새우양식

##### 종묘의 입식 및 양식

건강종묘는 표 11과 같이 경기 대부도, 충남 대산 소재 3개 양식장 5개 양식호지에 100마리/평의 밀도로 입식하였으며 사육수를 통한 수평감염을 조사하기 위하여 사육수를 소독하여 사용한 양식장과 소독하지 않은 사육수를 사용한 양식장으로 구분하여 조사, 비교하였다.

표 11. 건강종묘를 입식한 양식장 현황

Table 11. Pond size and date stocked with SPF postlarvae.

Pond	Location	Stocking date	Size (m <sup>2</sup> )	No. of larvae (×10 <sup>3</sup> )
L1	Kyeonggi	5.31	40,000	1600
L2	Kyeonggi	5.12	33,000	1000
C	Kyeonggi	5. 23	26,400	800
K1	Chungnam	4.28	6,600	200
K2	Chungnam	5.20	16,500	500

##### 건강종묘 양식장 바이러스 감염율 및 생존율 조사

건강종묘의 바이러스 감염율을 추적하기 위하여 6월부터 월별로 각 양식호지의 바이러스 감염율을 조사하였다. 바이러스 분석 및 성장률 조사를 위

한 표본은 각 호지별 10개체씩 하였으며 바이러스 분석을 위해 채집된 새우는 알콜에 넣어 실험실에 운반 후 개체별 genomic DNA를 추출, PCR에 의해 감염율을 조사하였다. 일반 종묘를 입식한 양식장의 바이러스 감염율을 비교하기 위하여 이와는 별도로 3개 양식장 6개 양식호지를 선정하여 동일한 방법으로 매월 감염율을 조사, 비교하였다. 건강종묘 양식장의 수확시 최종 생존율, 총생산량, 단위생산량을 조사하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 친하의 채집 및 월동사육관리

충남 태안 연안에서 월동장으로 남하회유하는 개체군을 낭장망 어선을 이용하여 채집하여 1998년 12월 21일부터 1999년 1월 31일까지 수컷 194마리, 암컷 452마리를 30톤 원형콘크리트 수조에 수용하고 월동사육을 실시하였다. 총 42일간의 사육기간 동안 사육수의 평균 수온은 9.6℃ (range 8.0~10.8℃) 였으며, 생존율은 76.8% (암컷 79.9%, 수컷 69.6%)였다. 이 기간동안 탈피는 이루어지지 않았다.

인공 성숙유도를 위해 1999년 2월 1일부터 3월 2일까지 30일간 안병 한쪽 절제구 와 무처리 대조구로 나누어 각각 암컷 130마리씩을 30톤 원형콘크리트 수조에 수용하고 먹이와 수온을 조절하면서 사육하였다. 생식소 성숙을 유도하기 위해 그림 29에 나타나바와 같이 서서히 수온을 상승시켜 약 19℃로 유지하였으며 실험 기간동안의 평균 사육수온은 16.2℃ (range 11.4~19.6℃) 이었다.

생존율은 그림 29에 나타낸바와 같이 6일째부터 폐사되는 개체들이 나타나기 시작하여 10일째 암컷은 96.2%, 수컷은 95.0%의 생존율을 나타냈으며

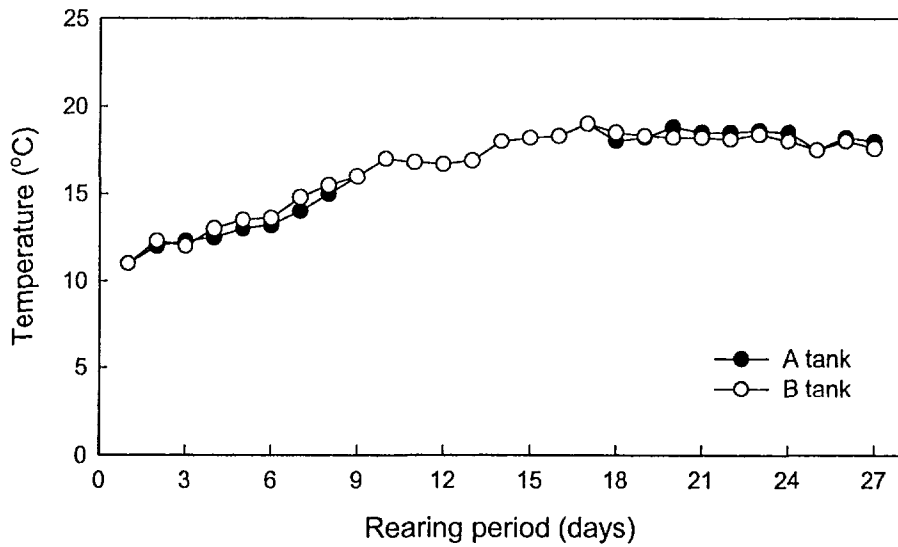


그림 28. 친하의 성숙유도 사육기간동안 사유구의 수온변화.  
 (수온 범위: 11.4 - 19.6°C, 평균 16.5°C)

Fig. 28. Changes of water temperature during the maturation induction. (range : 11.4 - 19.6 °C, mean 16.5°C)

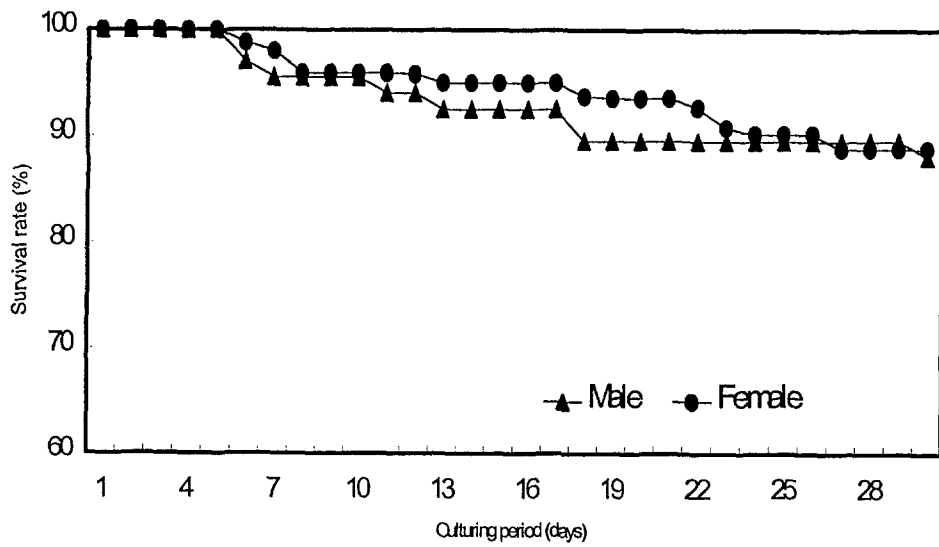


그림 29. 대하 친하의 성숙유도 사육 기간동안 생존율 변화  
 Fig. 29. Changes of survival rate of *P. chinensis* during the maturation induction.

최종 성숙시기인 30일째 생존율은 암컷 88.8%, 수컷 88.1% (평균 88.6%)로서 암수 큰 차이는 보이지 않았다.

성숙유도사육기간 동안 대조구와 안병절제구의 GSI의 변화를 비교하기 위하여 실험 시작부터 총 5회 표본추출을 하여 조사하여 표 12에 나타내었다.

표 12. 친하 성숙유도 사육기간동안의 생체량 및 생식소속도지수(GSI)의 변화.

Table 12. Change of GSI(gonadosomatic index) of *P. chinensis* during maturation induction culture.

Experimental groups	Date	TL(mm)	BW(g)	GW(g)	GSI(%)
Control	Dec. 21, 1998	169.3	57.3	1.3	2.2 (1.7-2.5)
	Feb. 5, 1999	176.5	66.1	2.0	3.1 (2.9-3.3)
	Feb. 12, 1999	165.2	51.1	1.2	2.3 (1.6-3.0)
	Feb. 19, 1999	175.7	65.3	1.6	2.5 (2.2-2.8)
	Feb. 27, 1999	162.1	51.7	1.1	2.0 (1.9-2.1)
Eyestalk ablation	Dec. 21, 1998	169.3	57.3	1.3	2.2 (1.7-2.5)
	Feb. 5, 1999	173.1	66.4	2.0	3.0 (2.8-3.2)
	Feb. 12, 1999	175.0	64.9	2.6	3.9 (3.2-5.2)
	Feb. 19, 1999	172.6	62.7	2.9	4.4 (2.8-6.3)
	Feb. 27, 1999	179.9	73.6	7.4	9.96 (8.0-12.3)

GSI는 모하의 채집 직후인 1998년 12월 21일에 2.2%였다. 성숙유도 사육은 99년 2월 1일에 시작되었으며 대조구는 5일째인 1999년 2월 5일에 3.1%

로 약간 증가 한 이후 계속 감소하여 27일째에는 2.02%로 약간 퇴행하였다.

반면 안병절제구는 1999년 2월 5일 3.0%, 2월 12일 3.9%, 성숙사육 19일  
째인 2월 19일에는 4.44%로서 완만하게 증가하다가 27일째에는 9.96%으로  
급격하게 증가하여 대조구에 비해 약 5배 높은 수치를 보여주어 안병절제가  
대하의 성숙유도에 효과적인 것으로 나타났다.

성숙유도에 의한 난소발달 단계를 비교하기 위하여 실험 23일째 실험구와  
대조구의 암컷들을 외관상 관찰에 근거하여 난소 발달단계를 5단계로 나누어  
그 출현빈도를 표 13와 그림 30에 나타내었다.

표 13. 23일의 성숙유도기간 동안 난소발달단계 빈도  
Table 13. The frequency of ovarian developmental stages based on  
external observation on 23 days-culture

Experimental groups		Ovarian developmental stages					No. of specimens
		I	II	III	IV	V	
Control	No.	40	42	2	1	0	84
	%	47.1	49.4	2.4	1.2	0	
Eyestalk ablation A	No.	2	2	13	9	14	40
	%	5	5	32.5	22.5	35	
Eyestalk ablation B	No.	5	13	13	15	17	63
	%	7.9	20.6	20.6	23.8	27	

- I, ovary transparent with no distinguishable outline
- II, ovary visible as a thin opaque line along the dorsal central axis
- III, ovary visible as a thicker opaque line than the previous stage
- IV, ovary turgid and opaque and outline distinct
- V, ovary turgid, broad and highly opaque, and outline distinct

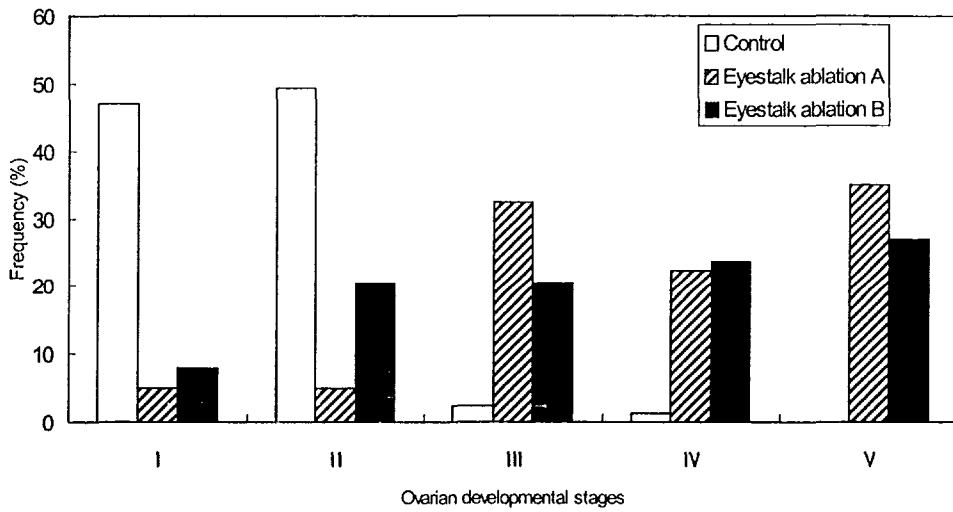


그림 30. 23일 성숙유도 사육기간동안 난소발달단계의 비교.  
안병절제구 A, B는 사육수조 A, B의 data임.

Fig. 30. Comparison of ovarian development stages on 23 days-culture.  
Eyestalk ablation A and B, data from tanks A and B.

23일째 대조구의 난소발달 단계는 stage I 이 47.06%, stage II 49.41%, stage III 2.35%, stage IV 1.18%, stage V 0%로서 stage I, II의 난소가 거의 대부분인 97%를 차지하였다. 안병절제구에서 A와 B의 평균 출현빈도를 보면 stage I 6.80%, stage II 14.56%, stage III 25.24%, stage IV 23.30%, stage V 30.10%로서 stage III 이상의 난소를 가진 암컷들이 78.6%였으며 50% 이상의 암컷들이 성숙난소인 stage IV와 V를 보여주어 대조구와는 큰 차이를 보였다. 그림 30은 난소발달단계의 빈도를 막대그래프로 나타낸 그림으로 대조구와 실험구의 차이가 보다 현저하게 비교된다.

1999년 2월 1일부터 2조의 30톤 수조에서 수온 및 영양조절에 의해 인공 성숙유도된 모하에서 생산된 난수 및 부화율은 표 15에 나타나 있다. 최초의 산란은 성숙유도 사육 20일째인 2월 20일로서 tank A와 tank B에서 약 160만개가 산란되었다. 24일째인 2월 24일 암컷들의 난소발달단계를 조사하면서 stage IV와 V의 성숙난소를 가진 55마리의 암컷들을 2조의 산란용 4톤 FRP 수조로 옮기고 산란수와 부화율을 조사하였다.

산란은 4톤 수조와 30톤 수조 모두에서 3월 17일까지 계속 일어나 총  $9.3 \times 10^6$ 개의 알이 생산되었다.

## 2. 자연산 대하의 바이러스 감염율

### 1) 동계 남하회유 개체군의 바이러스 감염율

1998년 12월 21일에 채집된 대하개체군에서 추출된 genomic DNA를 nested PCR에 의해 WSSV viral DNA를 증폭한 결과 표 14에 나타내었다. 분석된 총 495개체 중 431개체가 PCR positive로 나타나 바이러스 감염율은 87.7%로 매우 높은 비율로 본 바이러스에 감염된 것으로 나타났다. 이중 암컷은 369개체 중 323개체가 PCR positive로서 감염율은 88%였으며 수컷은 127개체 중 108개체가 감염되어 감염율은 85%로서 암수 거의 비슷한 감염율



을 보여주었다.

1999년 12월 9일 동일한 지역에서 채집된 개체군의 암컷을 조사한 결과, 총 444개체 중 294개체가 PCR positive로 나타나 66.2%가 WSSV에 감염된 것으로 조사되었다. 99년도의 감염율은 98년도에 조사된 암컷개체군 감염율 88% 보다 낮게 나타났지만 여전히 높은 감염율을 보였으며 시기, 개체군에 따라서 차이가 있는 것으로 조사되었다.

표 14. 대하 자연산 동계군의 바이러스 감염률  
Table 14. Viral infection rate of winter populations of *P. chinensis*

	Virus infection		Virus free	
	No. of prawns	rate (%)	No. of prawns	rate (%)
Female	342	88	43	12
Male	119	85	18	15

## 2) 춘계 산란 개체군의 바이러스 감염율

2000년도 춘계 산란군 암컷의 바이러스 감염율 조사 결과는 표 15에 나타내었다. 춘계 산란군의 바이러스 감염율은 흑산도 부근에서 채집된 개체들에서는 5.2%~9%이었으며 영관연안에서 채집된 개체군들에서는 4.3%로 나타나 채집 시기와 개체군에 따라서 약간의 차이는 있지만 1998년도와 1999년도 12월에 월동장으로 남하회유하는 개체군의 감염율 이 암수에서 각각 87.7%와 66.2%로 나타나 이와 비교하면 현저하게 낮은 수치이다.

표 15. 춘계산란군 자연산 모하의 바이러스 감염율

Table 15. Viral infection rate of spring populations of *P. chinensis*.

Collection date	Location	No. of analyzed female	No. of infected female	Infection rate (%)
2000. 4. 19	Heuksan Is.	89	8	9
4. 27	Heuksan Is.	174	9	5.2
5. 3	Heuksan Is.	87	5	5.7
5. 11	Youngkwang	92	4	4.3
Total		442	26	6.1

이러한 낮은 감염율은 바이러스 감염 개체들의 일부가 겨울철 동안 월동장에서 폐사하거나 남하 혹은 북상회유 과정에서 폐사했기 때문일 수도 있으며 또한 개체군에 따라 감염율이 차이가 나기 때문일 수도 있다. 1998년도 남하 개체군과 2000년도 춘계 산란개체군을 PCR에 의해 분석된 전기영동 사진은 그림 31과 32에 각각 나타내었다.

### 3. 건강종묘생산

#### 1) 월동 친하를 이용한 건강종묘 생산

PCR에 의해 WSSV에 감염되지 않은 것으로 판명된 61개체의 친하 (암컷 43, 수컷 18)을 실내 수조에서 사육수온 및 영양을 조절하면서 성숙유도시킨

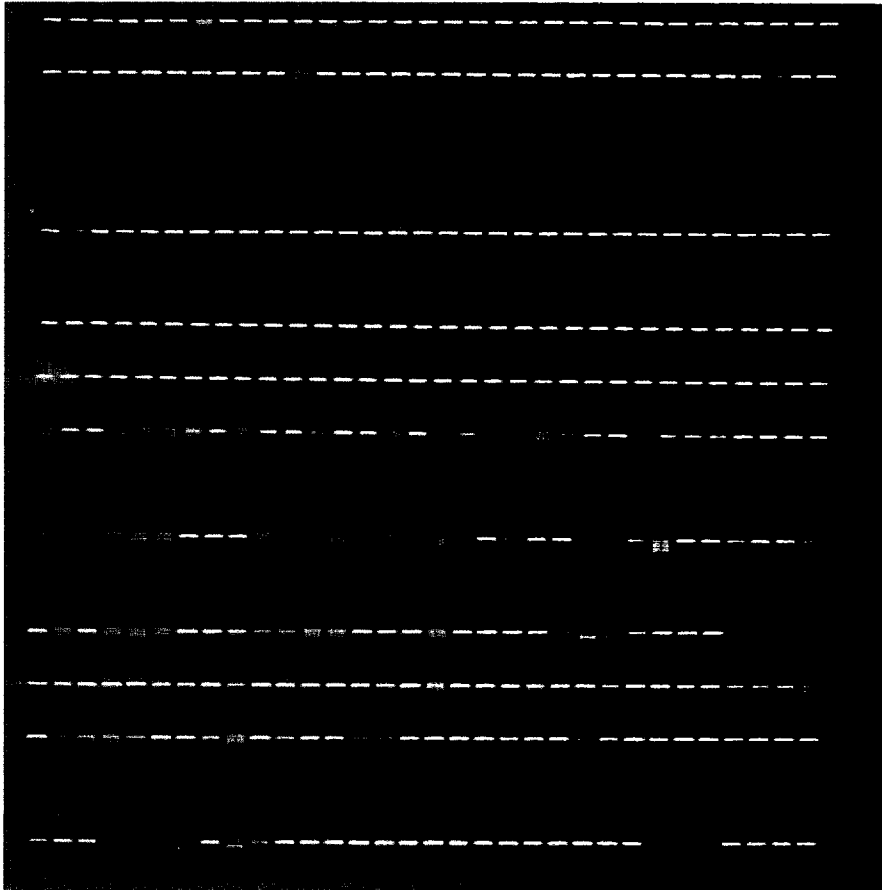


Fig. 31. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product from winter population of *P. chinensis*, 1998.

White bands indicete WSSV- porsitive individuals.

그림 31. 1998년도 겨울 남하개체군 암컷의 PCR 결과의 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 PCR 양성반응 개체들임

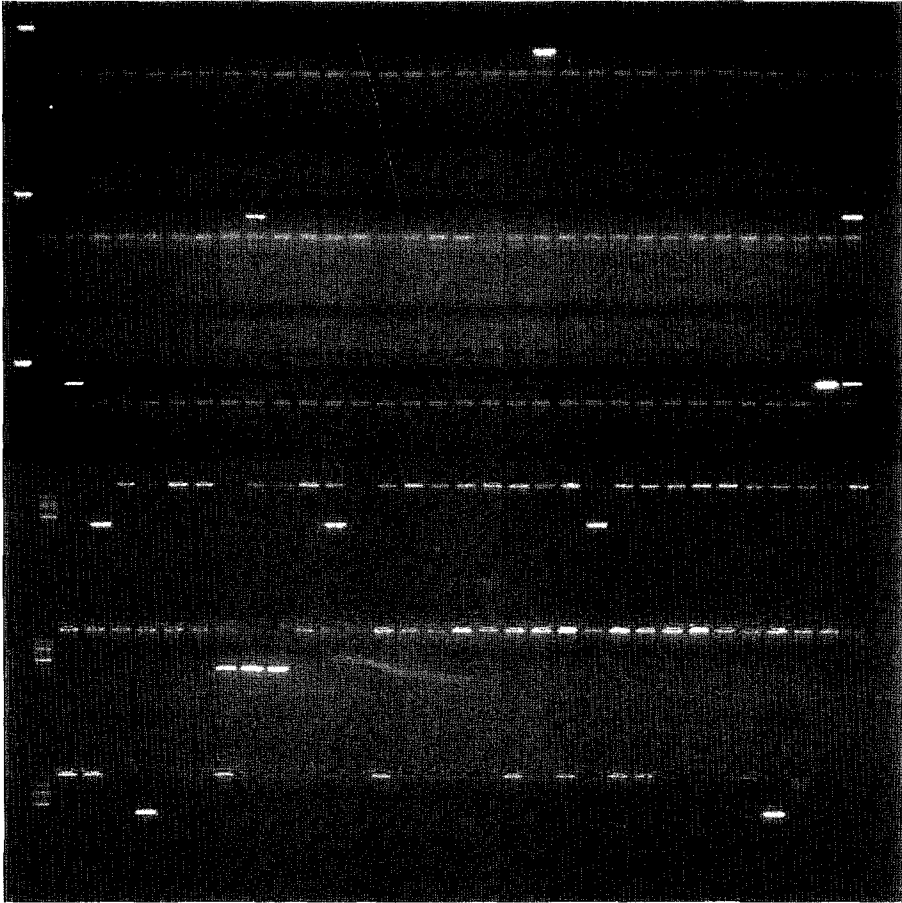


그림 32. 2000년도 춘계 산란개체군 암컷의 PCR 결과의 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 PCR 양성반응 개체들임

Fig. 32. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product from spring population of *P. chinensis*, 2000. .

White bands indicete WSSV-porsitive individuals.

결과는 표 16과 같다.

사육기간은 1월 27일부터 3월 1일까지 34일이었으며, 사육기간동안의 수온은 11.2~18.5℃ (평균 16.1℃)였으나 사육 15일 이후부터는 16℃ 이상을 유지하였다. 수컷과 암컷의 생존율은 각각 88.9%, 39.5%로서 크게 차이가 나지만 실험도중 생식소지수 (GSI) 조사를 위한 암컷의 표본개체 10여 마리를 계산하면 암컷의 생존율은 60% 이상이 되었다.

Table 16. Number of eggs produced from WSSV-free *P. chinensis* broodstock by indoor maturation induction.

표 16. 실내 성숙유도의해 바이러스 비감염 대하에서 생산된 산란량

Date	Days	Temp	No. of male	No. of female	Total No.	Survival (%)	No. of eggs
99. 1. 27	1	11.2	18	43	61	100	-
99. 2. 1	6	11.4	18	40	58	95.1	-
5	10	14.2	18	40	58	95.1	-
10	15	17.0	18	38	56	91.8	-
15	20	18.3	17	38	55	90.1	-
20	25	18.5	16	38	54	88.5	6×10 <sup>9</sup>
24	29	17.6	16	17	33	78.6	6×10 <sup>9</sup>
26	31	17.3	16	17	33	78.6	4×10 <sup>9</sup>
27	32	16.5	16	17	33	78.6	-
28	33	17.6	16	17	33	78.6	3×10 <sup>9</sup>
99. 3. 1	34	17.6	16	17	33	78.6	-
Total			16	17	33		19×10 <sup>9</sup>

최초의 산란은 성숙유도사육 25일째인 1999년 2월 20일로서 30톤 원형수조에서  $6 \times 10^5$ 개가 산란되었으며 그후 29일째  $6 \times 10^5$ 개, 31일째  $4 \times 10^5$ 개, 33일째  $3 \times 10^5$ 개가 산란되어 총 산란수는  $19 \times 10^5$ 개로 조사되었다. 부화 유생은 유생용 PE 사료를 급이하여 사육하였으나 zoea와 mysis기까지 발생한 후 postlarva로는 성장하지 못했다.

그림 33은 일반 모하 및 비감염 모하에서 생산된 유생의 바이러스 감염 검사를 위해 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 전기영동 사진이다. 사진에서 317 bp의 위치에 관찰되는 흰색의 밴드는 바이러스 DNA가 증폭된 것으로서 일반종묘의 전기영동 사진에는 흰색의 밴드가 나타나지만 비감염 모하에서 생산된 유생 (zoea-mysis stages)의 전기영동 사진에서는 모두 negative로 나타나 이들 유생은 WSSV에 비감염된 것으로 확인되었다.

## 2) 준계산란군을 이용한 건강종묘 생산

비감염 건강모하와 일반모하에서 생산된 유생의 바이러스 감염율을 비교, 조사하기 위하여 3곳의 종묘배양장 (K, J, Y hatchery)에서 사육 중인 다양한 발생단계의 유생을 수집하여 PCR에 의해서 바이러스 감염여부를 분석, 비교한 결과를 표 17과 18에 나타내었다.

건강종묘의 경우 조사된 3개 배양장 14개 수조 중 1개 수조(J-11)를 제외하고는 모두 PCR negative로 나타났다. J-11수조의 경우 유생들은 J-7, J-10, J-12를 생산한 어미새우와 동일한 어미새우에서 산란되었기 때문에 수직감염에 의한 것이라기 보다는 부화 후 유생사육관리 과정에서 다른 일반종묘의 수조 등이나 사육수 혹은 기구 등에 의해서 수평적으로 감염된 것으로 추측된다. 일반 모하에서 생산된 유생의 PCR 검사 결과(표.19)에서 보면 조사된 11개 수조 중 81.6%인 9개가 PCR positive로 나타나 일반 모하에서 생산된 새우종묘는 거의 대부분이 바이러스에 노출되어 있는 것으로 조사되었다.

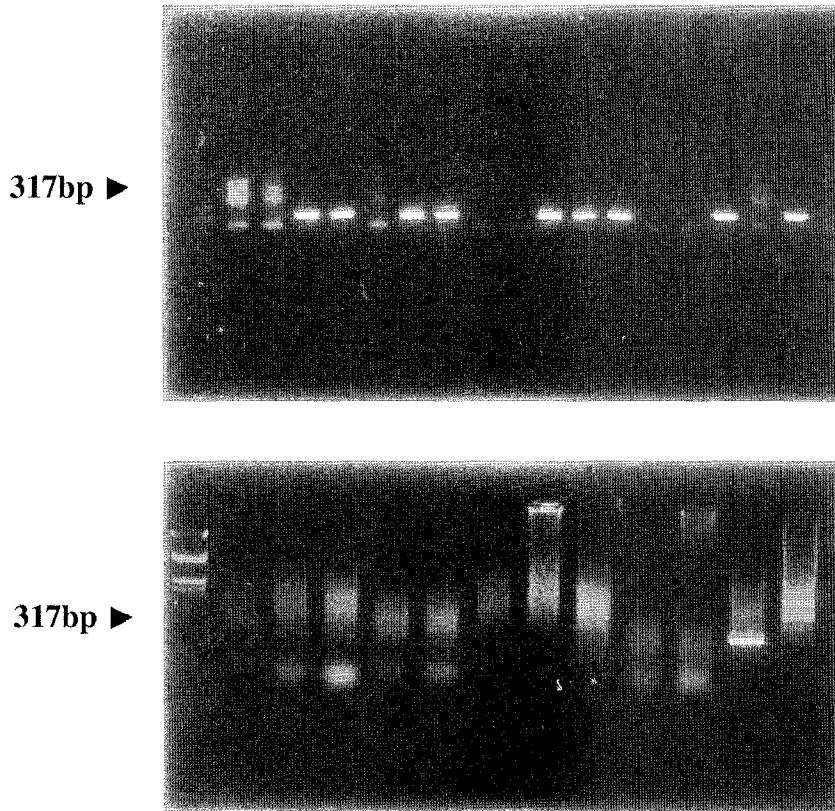


그림 33. 일반 모하 (위) 및 바이러스 비감염 모하 (아래)에서 생산된 유생의 PCR 전기 영동 사진. 흰색의 밴드는 바이러스에 감염된 개체들임

Fig. 33. Agarose gel electrophoresis of nested PCR product with larvae from non-SPF broodstock (above) and broodstock (below).

White bands indicate WSSV-infected individuals.

+ and -: positive and negative controls

표 17. 바이러스 비감염 건강모하에서 생산된 유생의 PCR 분석 결과  
 Table 17. Results of PCR amplification with larvae from SPF broodstock of *P. chinensis*.

Sampling date	Hatchery tanks	Larval stages	No. of larvae (x 10 <sup>4</sup> )	PCR
May 2, 2000	K-A1	PL1	100	-
	K-A2	Mysis 1	180	-
	K-C	PL 8	200	-
May 5	J-11	Nauplius	250	-
	J-12	Zoea	180	-
May 19	K-3	Mysis 2	300	-
	K-4	Mysis 2-3	200	-
	K-8	Mysis 3	200	-
	K-9	Mysis 3	250	-
	J-7	Mysis, PL	150	-
	J-10	Mysis, PL	200	-
	J-11	Mysis	150	+
	J-12	PL	150	-
	Y-H4	Zoea	250	-

바이러스는 nauplius, zoea, mysis와 같은 모든 유생발생단계에서 검출되었으나 바이러스가 초기 유생단계부터 폐사에 영향을 미치는지는 분명하지 않다.



표 18. 일반 모하에서 생산된 유생의 PCR 분석 결과

Table 18. Results of PCR amplification with larvae from non-SPF broodstock of *P. chinensis*.

Sampling date	Hatchery tanks	Larval stages	No. of larvae (x 10 <sup>4</sup> )	PCR
May 2, 2000	K-1	Nauplius	500	+
	K-2	Nauplius	400	-
May 3	J-5	Nauplius	400	+
	J-6	Nauplius	300	-
	J-7	Nauplius	500	+
May 9	L-3	Zoea	400	+
	L-4	Nauplius	500	+
May 19	Y-3	Zoea	400	+
	Y-4	Zoea	300	+
	Y-5	Zoea	500	+
	Y-6	Zoea	400	+

#### 4. 건강종묘를 이용한 새우양식

충남, 경기 소재 5개 새우양식장에 420만 마리의 건강종묘를 방양하고 월별 바이러스 감염율을 조사한 결과를 표 19에 나타내었다. 종묘 방양 직후인 6월에는 전 양식장에서 바이러스가 검출되지 않았으나 7월에는 5개 양식장 중 4곳에서 바이러스가 검출되어 새우양식장들이 수평감염에 노출되어 있는 것으로 나타났다. 월별 감염율은 7월 24%, 8월 26%, 9월 40%였지만 사육수를 소독하여 사용한 2개 양식장 (L1, L2)의 평균 감염율은 7월 5%, 8월 5%, 9월 25%로서 소독하지 않은 나머지 양식장 (C, K1, K2)에 비해 크게

낮아 사육수를 소독하지 않을 경우 사육수를 통하여 수평감염이 심하게 진행됨을 알 수 있었다. 비소독 사육수를 사용한 C 양식장의 경우는 7월 80%, 8월 60%의 감염율을 보인 후 9월에는 바이러스질병이 발병하여 대량폐사로 이어졌다. 사육수를 소독하지 않은 3개 양식장은 7월과 8월의 평균감염율이 각각 36.6%, 40.0%로서 소독사육수 양식장에 비해 상대적으로 높게 나타났으며 소독사육수를 사용한 양식장에 비해 단위생산량 및 생존율이 낮게 나타나 건강종묘를 사용하더라도 사육수를 소독하지 않을 경우 수평감염에 노출되어 있는 것으로 조사되었다.

표 19. 건강종묘 양식장의 월별 바이러스 감염율 (%)

Table 19. Monthly viral infection rate of ponds stocked with SPF larvae.

Ponds	Location	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Sterilization of seawater
L1	Kyeonggi	0	10	0	20	Yes
L2	Kyeonggi	0	0	10	30	Yes
C	Kyeonggi	0	80	60	viral outbreak	No
K1	Chungnam	0	20	10	60	No
K2	Chungnam	0	10	50	50	No
Mean		0	24	26	40	(21.6%)

일반종묘를 입식한 6개 양식장의 감염율은 56.8%로서 건강종묘에 비해 동기간 바이러스 감염율이 2.6배 이상 높았다. 또한 건강종묘를 입식했다고 하

여도 사육수를 소독하지 않을 경우는 항상 소독된 사육수를 사용한 양식장에 비해 감염율이 2배 정도 높게 나타났다. 따라서 종묘가 양식장에 방양된 후 사육수를 통한 수평감염이 심하게 일어나기 때문에 저수지를 준비하여 항상 사육수를 소독하여 사용하거나 폐쇄순환식 양식장을 만들어 바이러스 중간숙주의 유입을 최소화시키도록 해야 할 것이다. 바이러스에 감염된 종묘를 입식할 경우 양식초기부터 바이러스를 보균한 상태에서 출발하기 때문에 발병에 대한 잠재적인 위험성이 상존한다. 이러한 종묘들은 사육환경이 좋지 않게 되면 행동이 둔해지거나 죽게 되는데 이러한 새우들은 즉시 다른 새우들에 의해서 공식을 당하게 된다. 이처럼 공식에 의한 바이러스 감염은 매우 빠른 속도로 진행되어 단기간내에 전 양식장으로 전파되어 대량폐사로 이어질 수 있다.

일반종묘를 입식한 충남, 경기 소재 6개 양식장의 월별 바이러스 감염율을 조사한 결과는 표 20에 나타내었다.

표 20. 일반종묘 양식장의 월별 바이러스 감염율.

Table 20. Monthly viral infection rate of ponds stocked with non-SPF larvae.

Ponds	Location	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Sterilization of seawater
Y1	Kyeonggi	+	60	20	80	No
Y2	Kyeonggi	+	ND	50	viral outbreak	"
S	Chungnam	20	90	90	90	"
K3	Chungnam	10	80	50	70	"
C2	Kyeonggi	ND	70	100	viral outbreak	"
G3	Kyeonggi	+	100	100	Dead	"
Mean		15	80	68.3	80	(56.8%)

감염율은 6월 10~20%, 7월 60~100%, 8월 20~100%, 9월 70~90%로 평균 56.8% 였으며 모든 양식장이 7월 이후 거의 대부분의 새우들이 바이러스에 감염된 상태였다. 특히 7~8월에 100% 감염된 것으로 조사된 3개 양식장은 9월에 대량폐사가 일어났다.

이러한 바이러스 발병이 단지 수직감염에 의해서만 야기되는 것은 아니다. 사육수나 주위 환경에 의한 수평감염에 의해서도 감염은 가속화되어 대량폐사로 이어질 수 있다.

바이러스 비감염 건강종묘를 이용하여 양식하였을 때 생산량을 조사하기 위하여 건강종묘를 입식한 5개 양식장을 대상으로 양성을 하여 그 결과를 표 21에 나타내었다.

표 21. 건강종묘를 입식한 양식장의 생산량 및 생존율  
Table 21. Survival rate and production of ponds stocked with SPF larvae

Pond	Location	Stocking date	Culturing days	B.W. (g)	Total production (kg)	Unit production (kg/m <sup>2</sup> )	Survival (%)	Sterilization of seawater
L1	Kyeonggi	5.31	134	23.5	19,800	0.49	52.7	Yes
L2	Kyeonggi	5.12	112	22.0	9,800	0.30	44.5	Yes
K1	Chung nam	4.28	166	22.5	1,800	0.27	40.0	No
K2	Chung nam	5.20	113	20.0	4,000	0.24	40.0	No

건강종묘를 입식한 5개 양식장 중 사육수를 소독하지 않은 1개 양식장은 바이러스 발병으로 조기수확 하였으며 4개 양식장은 정상적으로 수확하였다.

소독 사육수를 사용한 2개 양식장은 단위면적당 생산량이 0.49, 0.30 kg/m<sup>2</sup>로서 비소독 양식장의 0.27, 0.24 kg/m<sup>2</sup>에 비해 평균 55%가 높았으며 생존율은 평균 48.6%로서 비소독 양식장에 비해 약 21.5% 높았다.

따라서 건강종묘를 사용하더라도 사육수를 소독하지 않을 경우는 수평감염에 의한 생존율과 생산량 저하로 이어지며 또한 바이러스 발병 가능성이 높아져 건강종묘의 효과도 상대적으로 저하된다고 할 수 있다.

## 제 6 장 참고문헌

- Adiyodi, R. (1985). Reproductive and Control. In: The Biology of Crustaceaa, Vol. 9. Bills and L. H. Mantel(eds.), Academic Press, New York, 147-217.
- Adiyody K. G. and Adiyodi R. G. (1970). Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. Biol. Rev., 45, 121-165.
- Aiken, D. E. (1969). Ovarian maturation and egg laying in the crayfish *Orconectes virilis*: Influence of temperature and photoperiod . Can. J. Zool. 47: 931-935.
- Aiken, D.E., and Waddy, S. L., 1975 Temperature increase can cause hyperecdysonism in American lobster(*Homarus americanus*) injected with ecdysterone. Can. Fish. Res. Bull. 32, 1843-1845.
- Aiken, D. E., and S. L. Waddy. (1986). Oocyte maturation and spawning in wild American lobsters(*Homarus americanus*) lack of evidence for significant regulation by photoperiod. Can. j. Fish. Aquat. Sic. 43: 1451-1453.
- Aiekn, D. E., Waddy, S. L., Castell, J. D. and Covey, J. F., 1977. Effect of sex, temperature, diet, and holding condition of growth of intact and eyestalk ablated lobster(*Homarus americanus*). Div. Fish. Oceanogr.(Aust) Circ. No.7, p.13.
- Anilkumar G. and Adiyodi K. G. (1980). Ovarian growth induced by eyestalk ablation during the prebreeding season is not normal in the crab *Paratelphusa hydrodromous*. Int. J. Invert. Reprod., 2: 95-105.

- Anilkumar G. and Adiyodi K. G. (1985). The role of eyestalk hormones in vitellogenesis during season in the crab *Paratelphusa hydrodromous*. Biol. Bull., 169: 689-695.
- Arnstein, D. R. and Beard, T. W. (1975). Induced maturation of the prawn *Penaeus orientalis* Kishinouye in the laboratory by means of eyestalk removal. Aquaculture, 5: 411-412.
- Bliss, D. E., and Boyer, J. R., 1964. Environmental regulation of growth in the decapods crustacean *Gecarcinus lateralis*. Gen. Comp. Endocrinol. 4, 15-41.
- Chen Y. N. et al., (1999). Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Mol. Reprod. Develop. 54: 215-222.
- Cheung T. S. (1969). The environmental and hormonal control of growth and reproduction in the adult female stone crab, *Menippe Mercenaria*. Biol. Bull., 136: 327-346.
- Choi. K. C., and Song Y. K. (1971). Ecological Studies on the *Penaeus orientalis* Kishinouye cultured in a pond filled with water Bull. Korean Fish Soc 4(2): 47-54.
- Dearborn, J. (1967). Food and reproduction of *Glyptonotus antarcticus* (Crustacea: Isopoda) at McMurdo sound, Antarctica. Trans. R. Soc. N. Z. 8, 163-168.
- Fingerman, M., Dominiczak, T., Miyawaki, M., Oguro, C. & Yamamoto, Y. (1967). Neuroendocrine control of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus zlarkii*. *Physiol. Zool.* 40, 23-30.

- Han C. H. (1988). Physiological studies on the reproductive cycle of a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Hann), Ph. D. Thesis, The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.
- Han C. H. and Kim D. J. (1993). Studies on the X-organ of eyestalk and the photoperiod for the control of gonadal maturation in a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). Bull. Korean Fish. Soc., 26(1), 76-90.
- Han C. H., T. Okumura, Y. Suzuki, K. Aida, and I. Hanyu (1994). Immunocytochemical identification of the site of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. Fisher. Sci. 60(2), 149-154.
- Hartnoll, R. G. (1963). The biology of Manx spidercrabs. *Proc. Zool. Soc. London*. 141, 423-496.
- Herp F. V. and Payen G. G. (1991). Crustacean neuroendocrinology : perspectives for the control of reproduction in aquacultural systems. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica, Monograph, 16: 513-539.
- Hill, B. J. (1979). Aspects of the feeding strategy of the predatory crab *Scylla serrata*. Mar. Biol. (Berlin). 55, 209-214.
- Hu Q. (1990). On the cultured of *Penaeus Penicillatus* and *P. Chnesis* in southern China. The culture of cold-tolerant shrimp: proceedings of an Asian-U.S. workshop on shrimp culture, 77-91.
- Hudinaga, M., & J. Kittaka. 1966. Kuruma-ebi no hetai to shiryō (Metamorphosis of the larvae of *Penaeus* and their diet), *Nihon Plankton Kenkyu Renkakukaiho*, 134 : 83-94.



- Hudinaga, M., & J. Kittaka. 1967. The large-scale production of young Kuruma prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Inform. Bull. Plank. Japan*. Commemorative No. for Dr. Matsue's 60th Birthday, 35-46.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima. (1996). The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes *Penaeus* Acute Viremia (PAV). *Fish Pathology*, 31(1): 39-45.
- Kelemen J. and Smith, L. R. (1980). Induced Ovarian Development and Spawning of *Penaeus plebejus* in a Recirculating Laboratory Tank after Uni-lateral Eyestalk Enucleation . *Aquaculture*, 21: 55-62.
- Keller, R. 1965. Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharid stoffwechsels beim Flusskrebs *Cambarur maenas*. -*Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 51: 49-59.
- Kuhl, H. (1966). Der abfluss der Elbe im Jahr 1965 und seine Wirkung auf Salzgehalt, Plankton auf Bewuchsbildung bei Cuxhaven. Ver.öff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven 10, S. 61-70.
- Kulkarni, G. K. and R. Nagabhushanam. (1980). Role of ovary inhibiting hormone from eyestalks of marine panaeid prawns (*Parapenaeopsis hardwickii*) during ovarin development cycle. *Auaculture*, 19, 13-19.
- Kurup, K. N. P. and Adiyodi R. G. (1981). The programming of somatic growth and reproduction in the crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Int. J. Invert. Reprod.*, 3: 27-39.
- Kwon, J. Sang, J. D. and Park, K. Y. (1999). Effects of steroid and eyestalk ablation on the rematuration of spawned kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Bull. Nat´l Fish. Res. Dev. Inst.*, 99~104.

- Lee, C. L. and Fielder, D.R., (1982). Induced spawning in the freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* Holthuis, 1950 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Aquaculture*, 29: 45-52.
- Liao I. C. and Y. H. Chien (1990). Evaluation and comparison of culture practices for *Penaeus japonicus*, *P. penicillatus* and *P. chinensis* in Taiwan. The culture of cold-tolerant shrimp: Proceedings of an Asian-U.S. workshop on shrimp culture, 49-63.
- Marcus, N. H., 1980. Photoperiodic control of diapause in the marine calanoid copepod *Labidocera aestiva*. *Biol. Bull (Woods Hole, Mass.)* 159, 311-318.
- McCarthy, J. F. (1980). Ecdysone metabolism and the interruption of proecdysis in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Biol. Bull.*, 158: 91-102.
- McQueen. D. J., and Steel, C. G. H. (1980). The role of photoperiod and temperature in the initiation of reproduction in the terrestrial isopod *Oniscus asellus* Linnaeus. *Can. J. Zool.* 58: 235-240.
- McWhinnie, and C. J. Mohrheer. 1970. Influence of eyestalk factors, intermolt cycle and season upon <sup>14</sup>C-leucine incorporation into protein in the crayfish *Orconectes virilis*. -*Comparative Biochemistry and Physiology* 34: 415-437.
- Nelson, K., D. Hedgecock, and W. Borgeson. 1983. Photoperiodic and ecdysial control of vitellogenesis in lobsters (*Homarus*) (Decapoda, Nephropidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 940-947.
- Oka, M. (1970). The larval rearing and culture of *P. orientalis*. *Aquaculture (Japan)*, 2:34-40.

- Park J. H., Lee Y. S. and Lee Y. (1998). An infections viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis. Aquat. Organ.*, 34(1): 5-71.
- Quackenbush, L. S. and Herrnkind W. F. (1983). Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus*. *J. Crust. Biol.*, 3: 34-44.
- Rho Y. G.(1990) Present status of fleshy prawn (*Penaeus chinensis*) seed in Korea. The culture of cold-tolerant shrimp: proceedings of an Asian-U.S. workshop on shrimp culture, 29-48.
- Skinner. D. M. 1966. Breakdown and reformation of somatic muscle during the molt cycle of the land crab, *Gecarcinus lateralis*. -*J. Exp. Zool.* 163: 115-124.
- Song Y. K., Lee C. E. and Chol. S. S., (1971). Effects of Feeding and conditions on the Carpace Growth of *Penaeus orientalis*. *Bull. Korean Fish Soc* 4(2): 43-46.
- Soyez D. et al., (1990). Neuropeptides from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus*: Characterization of hyperglycemic peptides *Gen. Comp. Endoclino.* 79, 261-274.
- Steel, C. G. H. 1980. Mechanism of coordination between moulting and reproduction in terrestrial isopod crustacea. *Biol. Bull.* 159: 206-218.
- Steele, V. J., Steele, D. H., and Macpherson, B. R. (1977). The effect of photoperiod on the reproductive cycle of *Gammarus setosus* Dementieva, 1931. *Crustaceana, Suppl.* 4, 58-63.

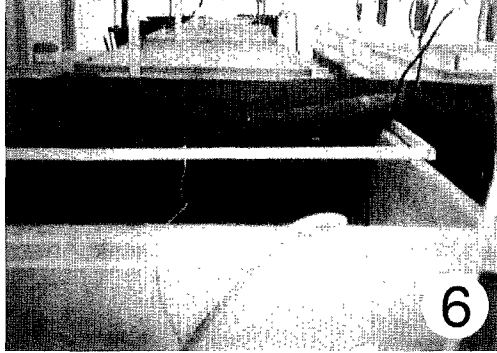
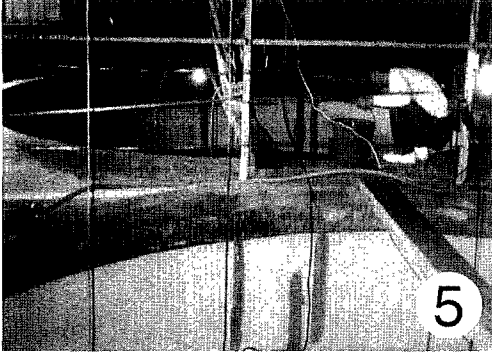
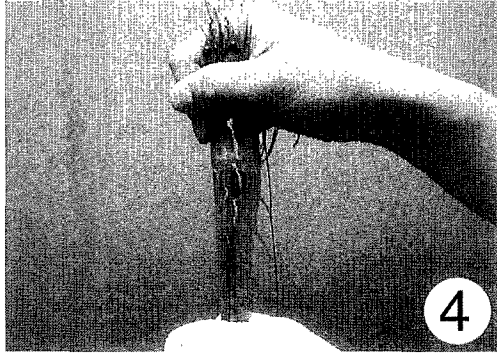
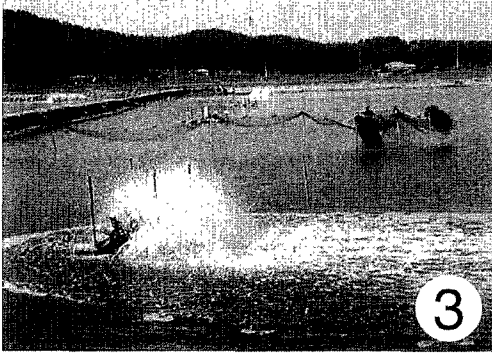
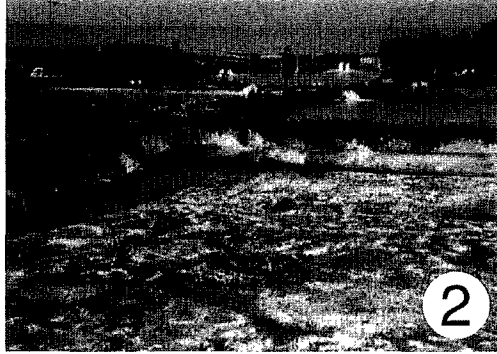
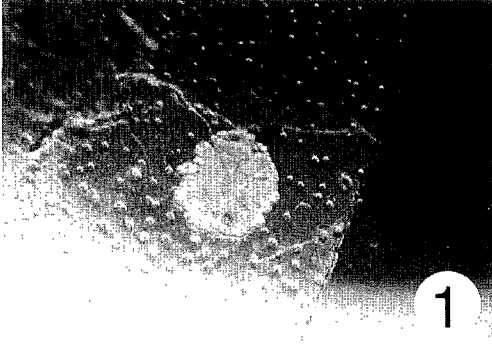
- Telford, M. 1975. Blood glucose in crayfish-III. The sources of glucose and role of eyestalk factor in hyperglycemia of *Cambarus robustus*.- Comparative Biochemistry and Physiology 51: 69-73.
- Wang Kexing 1984. Effects of temperature on growth of chinese penaeid shrimp. J. Trans. Oceanol. Limnol. 4: 42-45.
- Wickins, J.F. 1976. Prawn biology and culture. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 14 :435-507.
- Wolcott, T. T. (1978). Ecological role of ghost crabs *Ocypode quadrata* on an ocean beach: Scavengers or predators? J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 31, 67-82.
- Wyban, J. A. 1992. Selective Breeding of Specific Pathogen-Free (SPF) shrimp for high health and increased growth. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asian and the United States. W. Fulks and K. L Main (eds.) The Oceanic Institute, Hawaii, pp. 257-268.
- Yang W. J., K. Aida, A. Terauchi, H. Sonobe, and H. Nagasawa. (1996). Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Peptides, Vol. 17, No. 2: 197-202.
- Yang C. H. (1990) Effects of some enviromental factors on the growth of the Chinese shrimp *Penaeus Chinesis*. The Culture of Cold-tloerant shrimp: Proceedigs of an Asian-U.S. workshop on shimp culture, The Oceanic Institute. 92-109.
- Yang W. J., K. Aida, H. Nagasawa. (1995). Amino acid sequences of a hyperglycaemic hormone and its related peptides from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 135: 205-212.

- Yano, I. (1984a). Rematuration of spent Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 42: 179-183.
- Yano, I. (1984b). Induction of rapid spawning in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, through unilateral eyestalk ablation. *Aquaculture*, 40: 265-268.
- Yano, I. and Tanaka H. (1984) Effects of ultraviolet irradiated sea water on induction of spawning of Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Bull. Japan. soc. sci. fish* 50: 1621.
- Xu, J. (1983). The use of the multiple spawning habit of prawns(*Penaeus orientalis*) for hatching larva. *J. Zool. China*, 6: 17-20.
- Zhan, W. B. and Y. H. Wang. (1998). White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J. Aquatic Animal Health*. 10 : 405-410.
- Zucker, N. (1976). Behavioral rhythms in the fiddler crab *Uca terpsichores*. In "Biological Rhythms in the marine Environment" (P. J. DeCoursey, sd.), pp. 145-159. Univ. of South Carolina Press, Columbia.
- 김훈수 (1977). 한국동식물 도감 동물편 (새우류). 문교부, pp. 109-114.
- 藤永元作・橘木二都, 1966 : クルマエビの變態と飼料. 日本プランクトン研究会連絡會報, 13.
- 이종화, 김진환 (1991). 새우 양식입문. 동아출판사.
- 차형기 (1997). 서해중부연안에 서식하는 중하와 꽃새우의 생태. 부경대학교 대학원, 박사학위논문. pp 150.

# 사 진

## 사진 I 설명

1. 흰반점바이러스 (WSSV)에 감염된 새우 갑각에 형성된 국화꽃 모양의 백색 반점.
2. 바이러스 발병으로 대량폐사된 새우양식장 전경. 바닥의 흰색은 소독을 위해 살포한 염소계 소독제
3. 서해안에 위치한 바이러스 피해 없는 건강한 새우양식장 전경.
4. 난소의 속도를 판단하기 위하여 난소의 크기와 색깔 등을 조사하고 있다.
5. 태안수산종묘시험장 갑각류동의 원형수조. 대하의 월동사육관리를 위하여 수온 및 광주기가 조절된다.
6. 산란용 FRP 사각수조. 성숙한 모하는 이곳으로 옮겨 산란, 부화시킨다.





## 사진 II 설명

1. 건강종묘 선별을 위해 작업중인 서해수산연구소 연구원들.
2. 개체 구분을 위하여 모하의 갑각 표면에 일련번호를 부착하고 있다.
3. Genomic DNA 추출을 위해서 개체별로 복지의 일부를 절단하는 모습.
4. 바이러스 비감염 모하에서 생산된 건강종묘.
5. 건강종묘 생산 중인 충남 대산 소재 종묘배양장
6. 건강종묘를 방양하기 위하여 양식장으로 운반하는 모습
7. 활어차를 이용하여 종묘를 방양하는 모습
8. 건강종묘를 양성중인 경기도 대부도의 양식장 전경

