

발 간 등 록 번 호
-------------

11-1541000-001488-01
----------------------

홍바리, *Epinephelus fasciatus* 양식산업

최적화 기술개발

(Development of the suitable systems for aquaculture  
of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*)

제주대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “홍마리, *Epinephelus fasciatus* 양식산업 최적화 기술개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2012년 5월 30일

주관연구기관명 : 제주대학교

주관연구책임자 : 이 영 돈

연 구 원 : 박용주, 주해성, 현구연  
김광배, 강성용, 김성훈  
이치훈, 허상우, 강형철  
김병훈, 이승현, 황인준  
최상준, 김슬기

협동연구기관명 : 부경대학교

협동연구책임자 : 백 혜 자

# 요 약 문

## I. 제 목

홍바리, *Epinephelus fasciatus* 양식산업 최적화 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

오늘날 국내 양식산업의 환경은 매우 어려운 실정이다. 국내 양식대상 품종의 경쟁력 우위성과 다양성 미흡이 WTO 체제 출범으로 인한 수산물 수입개방, 일부 품종의 홍수 출하 및 과다 경쟁 등은 어업인들의 소득 불안을 가중시키고 있다. 또한 주변국간의 새로운 해양질서 확립과 연안수역의 환경변화는 수산물 자원량 감소를 초래하여 가까운 미래에 수산물 부족 문제를 야기할 수도 있다. 이에 세계 각국은 수산물 생산성을 극대화하는데 모든 노력을 기울이고 있다. 더구나 21세기는 웰빙시대로 먹거리에 대한 안전성과 기능성의 고급화를 요구하고 있다. 따라서 건강식품으로서 수산물 수요증가는 환경 친화적인 양식산업의 필요성을 강조하고 있다. 즉, 양적 생산 위주의 양식방법에서 보다 환경 친화적이고 건강한 양식생산방법 개발과 표준화된 제품생산을 요구하고 있다. 양식 품종의 다양화, 고급화, 그리고 지역특산화가 국제 경쟁력을 갖춘 고부가가치 양식산업의 실현과 어업인의 소득 증대에 기여할 수 있다.

제주해역은 청정해양환경을 배경으로 국내 어류종의 60%이상 분포하고 있으며, 기후환경 변화에 따라 다양한 아열대성 어류들이 가입하고 있다. 이러한 해양여건을 활용하여 고부가가치 아열대성 해양생물생산의 산업화 실현이 가능한 지역이다. 최근들어 중국과 홍콩은 동중국해 및 열대해역에서 어획된 바리와 어류의 지속적인 소비가 증가하고 있으나 바리와 어류 자원 감소로 수요 증가를 충족시키지 못하고 있다. 제주연안에는 자바리, 능성어, 붉바리 그리고 홍바리 등 바리와 어류가 10여종이상 분포하고 있으며, 중국, 일본, 대만 등 동남아시아에서 기호도가 매우 높은 아열대성 고급어종인 바리와 어류, Epinephelinae의 양식산업화에 대한 국제경쟁력을 충분히 갖춘 지역이다. 그러나 바리와 어류의 양식산업의 활성화를 위해서는 무엇보다 바리와 어류의 최적 성장환경(년중 사육수온을 20℃이상 유지)과 수익이 발생하는 안정적 생산이 가능한 기술 개발 및 소비자의 사회적 의식에 맞는 친환경 양식기술개발이 절실히 필요 하다. 이 연구에서는 제주도 지하해수의 안정적 열원(연중수온 16~18℃)을 이용한 친환경 순환여과사육시스템을 통해 홍바리, *Epinephelus fasciatus*를 중심으로 바리와 어류(자바리, 능성어, 붉바리)의 건강한 종묘사육, 친어관리, 그리고 고품질 수정란 생산방법 등으로 양식산업 최적화 기술 개발에 주력하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 최적화 사육 시스템 구축을 위한 번식 내분비 특성 연구
  - 어미확보 및 사육관리
  - 성 특성 및 번식 내분비 특성
2. 홍바리 성성숙 제어 기술 개발 연구
  - 홍바리 성성숙 유도
  - 성성숙 제어 사육시스템 개발
3. 홍바리 고품질 수정란 생산을 위한 난질 평가
  - 홍바리 난과 정자의 미세구조적 연구
  - 홍바리 난질 평가 후보 인자 탐색
4. 홍바리 고품질 수정란 생산 및 종묘생산성 향상 연구
  - 정자동결보존
  - 수정란 및 종묘 생산
  - 홍바리 자·치어의 성장 및 생존률 향상
  - 빛 파장에 따른 바리과 어류 성장 및 소화활성 특성
  - 최적화 사육 시스템 구축

### Ⅳ. 연구개발결과

1. 최적화 사육 시스템 구축을 위한 번식 내분비 특성 연구

#### 가. 성 특성

- 홍바리는 다른 바리과어류와 마찬가지로 자선성숙형 자웅동체로 암컷은 주로 전장 36~37 cm, 체중 400~900 g 범위에 출현하였고, 수컷은 전장 34~41 cm, 체중 600~1,000 g 범위에서 출현하였다.

#### 나. 번식 내분비 특성

- 홍바리의 성성숙유도/제어 유전인자 탐색
  - 시상하부에 존재하는 Kisspeptin, GPR54, GnRH 유전자를 분리/동정
  - 뇌하수체 및 생식소에서 주로 발현되어지는 GtH (FSH & LH)를 분리/동정
- 홍바리의 성장관련 유전인자 탐색
  - 뇌하수체에서 주로 발현되는 Somatostatin 과 Growth hormone (GH), IGF-1 / 2 분리/동정



## 2. 홍바리 성성숙 제어 기술 개발 연구

### 가. 홍바리 성성숙 유도

- 사육환경조절을 통한 성성숙 유도

- 사육환경조절을 통한 홍바리의 성성숙 유도를 위해 수온 22°C에서 광주기 12L:12D 조건과 13L:11D에서 14L:10D의 광주조건으로 변화시킨 실험구 그리고 9주후 수온 25°C로 상승시킨 실험구로 나누어 실험한 결과, 수온 25°C 광주기 14L:10D 조건에서만 성성숙이 일어났다.

- 성숙 유도를 위한 적정 호르몬 종류와 농도의 *in vitro* 효과 조사

- 평균 난경  $0.41 \pm 0.16$  mm인 난모세포에서는  $17\alpha 20\beta P$  50 ng/ml과 500 ng/ml와 HCG 500 IU의 농도가 성숙유도에 효과적인 것으로 보이며, 평균 난경  $0.50 \pm 0.13$  mm인 난모세포에서는 HCG 50 IU의 농도가 성숙유도에 효과적인 것으로 판단된다.

### 나. 성성숙 제어 사육 시스템 개발

- 홍바리의 성성숙 제어 사육 시스템 개발을 위해 광주조건과 수온이 홍바리 생식소 발달, 혈중 스테로이드 호르몬 변화, 뇌하수체에서  $FSH\beta$ 와  $LH\beta$  mRNA 발현양상 그리고  $KiSS1$ ,  $KiSS2$ ,  $GPR54$ 의 발현을 조사하였다. 실험구는 홍바리 성성숙 유도 결과를 토대로 대조구(자연광주기+자연수온), 처리구 I (14L+자연수온), 처리구 II (14L+25°C)로 나누었다. 실험 종료시 대조구와 처리구 I는 실험시작시 생식소 발달 단계와 동일한 미성숙 단계였다. 그러나 처리구 II는 생식소가 성숙하였고, 난모세포 성숙에 관여하는  $17\alpha 20\beta P$ 의 농도가 유의하게 높았으며, 뇌하수체는 난모세포의 최종성숙 및 배란에 관여하는  $LH\beta$  mRNA 발현이 유의하게 높았다. 또한 성숙한 개체에서  $KiSS1$ 와  $KiSS2$ 의 발현이 높았고, 반대로  $GPR54$ 의 발현은 미성숙 개체에서 높았다. 따라서 홍바리 성성숙 제어 사육 시스템 개발은 광주기 14L처리와 특히 수온 25°C이상을 유지하는 것이 중요하다.

## 3. 홍바리 고품질 수정란 생산을 위한 난질 평가

### 가. 홍바리 난과 정자의 미세구조적 연구

- 홍바리 난과 정자의 미세구조적 특징은 다른 바리과 어류와 상이하며, 난문의 크기와 정자 두부의 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다

### 나. 홍바리 난질 평가 후보 인자 탐색

- 형태적, 생리생화학적 특성에 의한 난질 평가

- 수정 후 12시간, 24시간 이후의 미수정란, 부상란 그리고 침강란의 난경 및 유구경을 조사한 결과, 이들 간의 유의적인 차이는 존재하지 않았다 ( $p > 0.05$ ). 한편 난소액의 pH와

수정율은 높은 정상관관계 ( $R^2=0.568$ )를 보여, pH가 낮을수록 난질이 떨어지는 결과를 보였다.

- 홍바리의 미수정란, 수정란, 과숙란 그리고 침강란에 함유된 지방산 조성비를 조사한 결과, 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 필수지방산인 Linoleic acid (C18:2)와 Linolenic acid (C18:3)이 미수정란과 수정 직 후에는 검출이 되었으나, 시간이 지남에 따라 침강란에서는 검출되지 않았다. 따라서 C18:2과 C18:3이 난질 평가 인자로서의 활용가능성을 제시해줄 수 있다고 생각된다.
- 홍바리의 미수정란, 수정란 그리고 침강란에 함유된  $E_2$ 와 cortisol의 농도를 조사한 결과,  $E_2$ 에서는 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. 하지만 홍바리의 미수정란, 수정란 그리고 침강란에 함유된 cortisol의 농도 변화 조사 결과, 시간이 지날수록 부상란과 침강란 모두에서 cortisol의 농도가 증가하는 추세를 보였고, 부상란에 비해 침강란이 더 높은 경향을 보이는 것으로 조사되었다.

- 유전학적 난질 평가 인자 탐색

- 난황형성에 관여하여 난질과 연관이 있을 것으로 사료되는 Cathepsin D와 Cathepsin L의 부분염기서열 확인과 난황형성 초기의 난, 배란직후 미수정 난, 수정직후 부상란과 침강란 그리고 부화된 자어에서 발현을 측정한 결과, 부상란에서 침강란에 비해 두 유전자 모두 높게 나타났다. 부화자어에서 부화 일수가 지날수록 두 유전자의 발현이 감소하였다. 따라서, Cathepsin D와 Cathepsin L는 홍바리의 초기 발생과정에 있어 난질평가의 유전적 marker로서 가능성이 있다고 판단된다.

다. 우량란이 초기 생존력

- 부화 자어는 부화 후 5~6일까지 생존하였고, 그룹간의 평균 난경, 난황흡수율 및 유구용적 변화에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 모든 실험구에서 매일 자어사망개체를 계수하여 SAI를 조사한 결과, 실험 종료 시점에서 그룹 1과 그룹 2의 SAI값은 각각 4.2와 3.5로 조사되었다. 또한 그룹 1이 일령별 SAI에서 비교적 높게 나타났고, 개구 후부터 SAI값의 차이가 두드러졌으나 그룹 간의 유의적인 차이는 존재하지 않았다 ( $p>0.05$ ). 실험 결과, 두 그룹 모두 비교적 높은 SAI를 나타내어 본 실험에 사용된 홍바리 난 및 자어의 품질이 좋은 것으로 판단된다.

#### 4. 홍바리 고품질 수정란 생산 및 종묘생산성 향상 연구

가. 정자동결보존

- 홍바리 정자동결 보존에 적합한 동해방지제와 희석제의 종류 및 농도를 조사한 결과, 동해방지제 dimethylsulfoxide (DMSO)와 희석액 5.0%와 10.0% glucose를 사용하는 것이 홍바리 정자동결 보존에 적합한 것으로 판단된다.

#### 나. 수정란 및 종묘 생산

- 환경조절을 통해 홍바리를 인위적으로 성숙 유도하고, cannulation 방법으로 난 성숙과 배란 유도가 가능한 400  $\mu\text{m}$  이상 난모세포를 가진 어미를 선별한 후 HCG 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 호르몬 주사 후 24~48시간 경과 후 배란 유도가 가능하였고, 총 5회에 걸쳐 수정란을 생산할 수 있었다.
- 홍바리 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 난경 700~800  $\mu\text{m}$ , 유구경 160~170  $\mu\text{m}$ 이었고, 수정 후 28시간 만에 부화가 시작되었다. 난황은 부화 후 48시간 이내에 흡수되었고, 부화 후 72시간째에 개구되었다.
- 자어의 전장은 부화직후 약 1.2 mm이었으며 1일 경과 후 약 2.4 mm 크기로 급격한 변화를 보였다. 부화 후 7일까지 완만한 성장을 보이다 지느러미 극 발달이 이루어지는 12일째에 5.4 mm, 후기자어로 변태를 거치는 22일째에 10.5 mm 크기로 성장하였다. 부화 후 45일째에 자어에서 치어의 형태로 변하면서 22.4 mm 크기로 성장하였고, 부화 후 60일 이후에는 30.2 mm 크기로 성장하였다.

#### 다. 홍바리 자·치어의 성장 및 생존률 향상

- 부화 후 29일째 위에서 소수의 위선과 유문수가 관찰되었고, 위와 전장부 경계부에 유문괄약근이 형성되어 위와 전장부의 경계가 명확하였다. 부화 후 34일째 인두강 상피층에서 인두치가 관찰되었으며 위선의 수가 점차 증가하였다. 부화 후 44일째 성어와 같은 소화기관의 형태를 갖추었다. 홍바리의 경우 위와 전장부 사이에 위치하여 소화된 영양분이 흡수될 수 있는 면적을 넓혀주는 유문수의 발달시기가 위선의 출현 시기와 같았다. 또한 먹이를 잘게 찢어 소화를 용이하게 해주는 인두치의 분화도 위선 분화 이후 관찰된 경향으로 보아 홍바리의 경우 실질적인 소화작용은 부화 후 약 29일 경에 일어나는 것으로 사료된다.
- 각종 소화효소 분비촉진 및 장 연동운동에 관여하는 주요소화호르몬인 CCK의 경우 부화 후 2일경 발현되기 시작하였으며, 처음으로 외부로부터 먹이를 섭취하는 부화 후 5일경부터 발현량이 급격히 증가하였고, 소화기관들의 기능적인 발달과 부화일수가 증가함에 따라 CCK 발현량이 서서히 감소하다 위선발달이 이루어지는 부화 후 28일경 발현량이 증가하는 경향이 관찰되었다.

#### 라. 빛 파장에 따른 바리과 어류 성장 및 소화활성 특성

- Blue (480 nm), Green (520 nm), Red (590 nm)의 LED 광원을 이용해 빛 파장에 따른 바리과 어류의 성장을 조사한 결과 녹색광 조건에서 가장 높은 성장률이 관찰되었고, 소화관내 점막주름이 더 발달되었으며, 배상세포의 수 또한 더 많이 관찰되었다. 또한, 뇌와 전장부 및 유문수에서 CCK mRNA 발현량이 더 높았다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 양식산업화 직접 활용
  - 연구개발 과정을 통해 개발된 고품질수정란 생산 기술 및 자치어 최적화 사육시스템 등 참여기업에 기술 이전을 통한 산업화 추진
  - 양식 대상종의 다양화를 통한 양식산업의 경쟁력 강화전략
  - 홍바리의 고품질 수정란 생산을 위한 난질평가 인자로서 난소액의 pH, 필수지방산인 linoleic acid (C18:2)와 linolenic acid (C18:3), 그리고 cortisol등이 활용 가능
  
- 연안자원 복원사업에 활용
  - 바다목장화, 바다숲가꾸기 등 연안자원 회복
  
- 인력양성
  - 어류의 성특성과 번식생리 기작을 탐구하여 양식산업 활성화에 기여하는 전문인력 양성

## SUMMARY

1. Study on reproductive endocrinology to development of the suitable systems for aquaculture
  - The blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* are protogynous hermaphroditic fish. Female is distributed 36 to 37 cm total length and 400 to 900 g body weight. Male is distributed 34 to 41 cm total length and 600 to 1,000 g body weight.
  - Study on reproductive endocrinology of blacktip grouper
    - Research of induced sex maturation and control gene  
Isolation and identification of Kisspeptin, GPR 54 and GnRH in hypothalamus  
Isolation and identification of GtH (FSH & LH) in pituitary and gonad
    - Research of growth–relation gene  
Isolation and identification of somatostatin, growth hormone and IGF–1/2
2. Development of sex maturation control technology in blacktip grouper
  - Induction of sex maturation by environmental control
    - This study investigated the involvement of photoperiod and temperature in ovarian development of the blacktip grouper. The photoperiod and water temperature was adjusted to 12L:12D and 22°C, respectively. In the treatment group, every 3 weeks daylight was increased as follows a 13L:11D and 14L:10D, and control group was maintained 12L:12D. After 9 weeks water temperature was increased 25°C both treatment and control group. Sex maturation of blacktip grouper induced only 14L:10D and 25°C treatment group.
  - Investigation for hormonal control of *in vitro* oocyte maturation
    - In group 1 (oocyte diameter of  $0.41 \pm 0.16$  mm), treatment of 50 and 500 ng/ml  $17\alpha 20\beta$ P and 500 IU HCG resulted in a significant increase in GVBD compared with control ( $p < 0.05$ ). In group 2 (oocyte diameter of  $0.50 \pm 0.13$  mm), treatment of 50 IU HCG resulted in a significant increase in GVBD ( $p < 0.05$ ) although treatment of  $17\alpha 20\beta 21$ P and  $17\alpha 20\beta$ P resulted in no significant effect on GVBD compared with control.
  - Development of sex maturation control rearing system
    - To development of sex maturation control rearing system of the female blacktip grouper, this study investigated the effects of photoperiod and water temperature on gonadal activity and FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA expression, plasma concentrations of the sex steroids T, E2,  $17\alpha 20\beta$ P, and KiSS1, KiSS2 and GRP54 expression.

Photoperiod and water temperature in control group was exposed to natural conditions. Photoperiod and water temperature in treatment I was exposed to and natural condition, respectively. In the treatment II, photoperiod was 14h light/10h dark and water temperature was maintained  $25 \pm 0.5^\circ \text{C}$ . At 12 weeks of treatment, gonad of control and treatment I were immature stage. But, gonad of treatment II was mature stage, and plasma  $17\alpha 20\beta\text{P}$  and  $\text{LH}\beta$  mRNA levels in pituitary on treatment II increased significantly in comparison with initial group and the other treatment groups ( $P < 0.05$ ). Also, the expression of  $\text{KiSS1}$  and  $\text{KiSS2}$  mRNA were significantly higher in mature stage than immature stage. However  $\text{GPR54}$  mRNA was high in immature stage. These results suggested that the long photoperiod of 14L:10D and high water temperature of over  $25^\circ\text{C}$  were essential environmental factors for the reproductive activity of the female blacktip grouper.

### 3. Investigation of potential factor for egg quality assessment

- Ultrastructure of egg and spermatozoa of blacktip grouper
  - Ultrastructural characteristics of egg and spermatozoa in blacktip grouper different from those of other grouper and spermatozoal head diameter is a close correlation with egg micropylar diameter.
- Investigation of potential factor for egg quality assessment
  - Morphological, physiological and biochemical factors for egg quality assessment
    - ; In the measurement of egg and oil droplet diameters among unfertilized, floated and sunken eggs, there was no significant difference. However, there was a positive correlation between pH in ovarian fluid and fertilization rate ( $R^2 = 0.568$ ).
    - ; In the fatty acid composition of unfertilized, floated, and sunken eggs, they did not show any difference among egg groups. But essential fatty acid, such as linoleic acid (C18:2) and linolenic acid (C18:3) were not detected in the sunken eggs compared with floated eggs. In unfertilized and fertilized eggs, C18:2 and C18:3 were detected just after fertilization but they were not measured in the sunken eggs as time goes by. These results suggested that C18:2 and C18:3 may be metabolized or absorbed in the sunken eggs. Thus, C18:2 and C18:3 were considered as reasonable egg quality parameters.
    - ; In the hormone levels of unfertilized, floating, and sunken eggs, E2 did not show any difference among egg groups. But cortisol levels had been increased in floating and sunken eggs since fertilization, and cortisol levels in sunken eggs

were higher than those of floated eggs.

- Genetic potential factor for egg quality assessment
  - Considering the function of cathepsins in yolk protein synthesis during vitellogenesis to teleost, the cDNA for cathepsin D and L was isolated from fertilization egg of blacktip grouper. Expression of cathepsin D and L mRNA were also investigated in immature oocyte, fertilization egg (sinking eggs and floating eggs) and embryogenesis. The expression of cathepsin D and L mRNA were higher in floating eggs than sinking eggs. In hatching larvae, expression of cathepsin D and L mRNA was decreased when time passes. Thus, cathepsin D and L were considered as reasonable egg quality parameters.
- Viability of egg and early larvae
  - Newly hatched larvae survived until 5~6 days after hatching, and there was no significant difference in volume change of yolk and oil droplet between groups. SAI were 4.2 and 3.5 in group 1 and 2, respectively. In addition, daily SAI of group 1 was slightly higher than group 2 after mouth opening, but there was no significant difference between groups.

#### 4. Study on high-quality fertilized egg and improved seed production

- Cryopreservation of sperm
  - The survival rate and activity were high using 5% and 10% glucose as the diluent and DMSO as cryoprotectants for *Epinephelus fasciatus* spermatozoa.
- Fertilized egg and seed production
  - Hormone-induced ovulation was attempted in females with an average vitellogenic oocyte diameter of at least 400  $\mu\text{m}$ . Induce of ovulation occurred to following HCG (500 IU/kg BW) injection. Eggs were stripped successfully 24~48 h after the injection.
  - Stripped fertilized eggs of *E. fasciatus* were colorless spheres, 700~800  $\mu\text{m}$  in diameter, with a 160~170  $\mu\text{m}$  oil globule. Hatching began about 28 h after fertilization. Yolk absorption was completed within 48 h and the mouth open about 72 h after hatching.
  - The newly hatched larvae measured 1.2 mm TL. At 2 DAH, the larvae reached 2.4 mm TL. At 12 DAH, the larvae reached 5.4 mm TL and the dorsal fin developed. At 22 DAH, the larvae reached 10.5 mm TL and began metamorphosis to post larvae stage. At 45 DAH, the larvae reached 22.4 mm TL and transferred to juvenile stage. At 60 DAH, the juvenile fish reached 30.2 mm TL and showing features with those of the adult fish.

- Growth of larvae and juvenile and improvement of survival rate
  - At 29 DAH, the number of gastric glands and pyloric ceca were observable. The muscular layer of the posterior stomach was increased in size and formed the pyloric sphincter, which separated the stomach from the anterior intestine. At 34 DAH, the canine-like pharyngeal tooth occurred in the buccopharyngeal cavity and the stomach size and the numbers of gastric glands continually increased. Blacktip grouper larvae developed a well-differentiated digestive system with a functional stomach at about 29 DAH. Weaning of blacktip grouper larvae to formulated feeds was started on 29 DAH at 25 ° C when the functional stomach, pyloric sphincter, and pyloric ceca were formed.
  - CCK mRNA of black grouper larvae were not expressed until 1 DAH. CCK mRNA was first expressed at 2 DAH and was continually expressed until the end of the experiment. CCK expression started at 2 DAH, 2 days prior to the first feeding. This indicates that CCK-producing cells are differentiated and functional in the intestine at 2 DAH.
- Growth and digestive activity of grouper depend wavelengths of light
  - The growth rate of the green light condition was higher than those in the natural, red, and blue light. Fish reared under green light condition had significantly higher numbers of mucus-secreting goblet cells compared to fish reared under the natural, red, and blue light conditions. Histologically, the mucosal folds in the digestive tract of fish raised in the green light condition were more developed and contained more abundant numbers of goblet cells. CCK mRNA levels in the brains of fish raised in the green light condition were significantly higher than those of fish raised in natural, red, and blue light conditions. CCK mRNA expression in the anterior intestine portion and pyloric ceca were both significantly higher in fish of the green light condition than in those of the natural, red, and blue light conditions.





# CONTENTS

Summary .....	8
Contents .....	13
Chapter I. Introduction .....	15
Chapter II. Tendency of technique .....	18
Chapter III. Results .....	21
Section 1. Study on reproductive endocrinology to development of the suitable systems for aquaculture .....	21
Section 2. Development of sex maturation control technology in blacktip grouper .....	39
Section 3. Investigation of potential factor for egg quality assessment .....	50
Section 4. Study on high-quality fertilized egg and improved seed production .....	78
Chapter IV. Goal achieved and Contribution .....	117
Chapter V. Proposal on application .....	118
Chapter VI. Science and technology information .....	121
Chapter VII. Reference .....	122

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	18
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	21
제 1 절 최적화 사육 시스템 구축을 위한 번식 내분비 특성 연구 .....	21
제 2 절 홍بار리 성성숙 제어 기술 개발 연구 .....	39
제 3 절 홍بار리 고품질 수정란 생산을 위한 난질 평가 .....	50
제 4 절 홍بار리 고품질 수정란 생산 및 종묘생산성 향상 연구 .....	78
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	117
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	118
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	121
제 7 장 참고문헌 .....	122

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 필요성

오늘날 국내 양식산업의 환경은 매우 어려운 실정이다. 국내 양식대상 품종의 경쟁력 우위성과 다양성 미흡이 WTO 체제 출범으로 인한 수산물 수입개방, 일부 품종의 홍수 출하 및 과다 경쟁 등은 어업인들의 소득 불안을 가중시키고 있다. 또한 주변국간의 새로운 해양질서 확립과 연안수역의 환경변화는 수산물 자원량 감소를 초래하여 가까운 미래에 수산물 부족 문제를 야기할 수도 있다. 이에 세계 각국은 수산물 생산성을 극대화하는데 모든 노력을 기울이고 있다. 더구나 21세기는 웰빙시대로 먹거리에 대한 안전성과 기능성의 고급화를 요구하고 있다. 따라서 건강식품으로서 수산물 수요증가는 환경 친화적인 양식산업의 필요성을 강조하고 있다. 즉, 양적 생산 위주의 양식방법에서 보다 환경 친화적이고 건강한 양식생산방법 개발과 표준화된 제품생산을 요구하고 있다. 양식 품종의 다양화, 고급화, 그리고 지역특산화가 국제 경쟁력을 갖춘 고부가가치 양식산업의 실현과 어업인의 소득 증대에 기여할 수 있다.

제주해역은 청정해양환경을 배경으로 국내 어류종의 60%이상 분포하고 있으며, 기후환경 변화에 따라 다양한 아열대성 어류들이 가입하고 있다. 이러한 해양여건을 활용하여 고부가가치 아열대성 해양생물생산의 산업화 실현이 가능한 지역이다. 최근들어 중국과 홍콩은 동중국해 및 열대해역에서 어획된 바리와 어류의 지속적인 소비가 증가하고 있으나 바리와 어류 자원 감소로 수요 증가를 충족시키지 못하고 있다. 제주연안에는 자바리, 능성어, 붉바리 그리고 홍바리 등 바리와 어류가 10여종이상 분포하고 있으며, 중국, 일본, 대만 등 동남아시아에서 기호도가 매우 높은 아열대성 고급어종인 바리와 어류, *Epinephelinae*의 양식산업화에 대한 국제경쟁력을 충분히 갖춘 지역이다. 그러나 바리와 어류의 양식산업의 활성화를 위해서는 무엇보다 바리와 어류의 최적 성장환경 (년중 사육수온을 20℃이상 유지)과 수익이 발생하는 안정적 생산이 가능한 기술 개발 및 소비자의 사회적 의식에 맞는 친환경 양식기술개발이 절실히 필요 하다. 이 연구에서는 제주도 지하해수의 안정적 열원(년중수온 16~18℃)을 이용한 친환경 순환여과사육시스템을 통해 홍바리, *Epinephelus fasciatus*를 중심으로 바리와 어류(자바리, 능성어, 붉바리)의 건강한 종묘사육, 친어관리, 그리고 고품질 수정란 생산방법 등으로 양식산업 최적화 기술 개발에 주력하였다.

### 1. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

#### 가. 기술적 측면

- 바리와 어류는 우리나라 뿐만 아니라 일본, 중국 그리고 동남아시아 지역에서도 식용어로서 기호도가 높은 아열대성 어종으로 이들에 대한 번식 특성 탐색과 종묘생산 산업은 국가차

원에서 지속적인 투자를 하고 있음.

- 바리과 어류 해산종은 15속에 159종이 보고되고 있으며, 이들은 대부분 아열대와 열대지방의 암초와 산호초가 발달한 지역에 서식하고 있으며(FAO, 1993), 국내에서는 대부분 제주도와 남해안 일부 연안에 분포하고 있으나 자원이 급격하게 감소하고 있는 실정.
- 홍바리, *E. fasciatus*는 최근 들어 제주연안에서 여름철에 어획되고 있으나 자원량 조사통계에 조차 없는 바리과 어류이나 우리나라 해양환경변화로 새롭게 가입하는 바리과 어류중에 하나임.
- 국내 양어가에서 바리과 어류 양식에 관심이 고조되고 있으나, 바리과 어류의 친어확보와 친어관리의 애로사항 때문에 종묘생산이 어려운 실정.
- 제주대학교 해양과환경연구소에서 2000-2003년 수산특정연구 과제를 통해 바리과 어류인 능성어와 자바리의 인공종묘생산을 위한 번식생물학적 연구가 이루어졌으나 사육환경 문제로 종묘생산 과정에 기형개체 출현과 저성장으로 산업화에 애로사항이 되고 있음.
- 제주도는 지질학적 특성으로 년중 온도변화가 거의 없는(15-18℃) 용암해수(지하해수) 자원을 가지고 있으며, 용암해수를 이용한 건강종묘 생산 및 생산성향상을 위한 최적화 사육 기술개발이 필요함.
- 캐나다, 유럽 등에서는 무지개송어, 유럽산 터봇, 대서양산 가자미류의 일종인 halibut을 대상으로 대량 종묘생산을 위한 성숙 유도기법과 함께 건강한 수정란 생산을 위한 난질을 향상에 주력.
- 난소발달과정 동안의 암컷의 내분비호르몬 상태, 어미의 사육조건과 영양상태, 그리고 이러한 어미들로부터 생산된 수정란의 수정율, 부화율 등을 조사하여 난질에 영향을 미치는 요인들을 분석하고 있음.
- 우리나라의 경우 관심은 많으나 사육조건부터 난질평가까지 체계적인 연구수행을 하는 곳은 거의 없는 실정이고, 난질에 상관없이 인위적인 성숙을 유도하여 수정란을 획득하는 단편적인 보고만 있을 뿐임.
- 어미의 번식 특성을 파악하여 양식현장에서 적용 가능한 난질 평가 기법을 통한 지속적인 건강 수정란 생산 시스템 개발이 필요한 실정임.

#### 나. 경제·산업적 측면

- 수산 양식산업은 인류의 식량자원에서 가장 중요한 요소인 단백질자원을 공급하는 바이오 산업으로 지속가능한 성장잠재력을 보유하는 유망산업임.
- 국내에서 수산물은 국민의 동물성 단백질 공급의 39%를 차지할 정도로 중요한 건강식품으로 국민건강에 기여.
- UN 해양법협약발표(1994)이후 각국의 해양자원 확보를 위한 EEZ 선포와 WTO 출범으로 1997년부터 수산물 시장의 전면 개방됨으로 수산업의 무한경쟁시대임.
- 국내 수산물 총생산량은 1992년에 3,347천톤에서 2004년에는 2,519천톤으로 감소하는

반면, 양식산업에서도 생산량은 2000년 653천톤에서 2004년에는 917천톤으로 증가하는 추세이고, 양식산업 중 어류양식 부분이 생산량은 64천톤(2004년기준)임.

- 국내연안 환경변화로 인한 자원생물의 감소, 어획강도에 따른 남획, 국제어업협정으로 인한 어장상실 등으로 수산물의 생산증대는 어려운 실정임.
- 우리나라 해산어류 양식은 1970년대 개발초기 단계에서 발달하기 시작하여 현재 넙치와 조피볼락 등이 주 양식대상종이 되고 있으며, 일부 돔류도 양식하고 있으나, FTA 등 국제 무역환경이 변화로 각종 외국산 활어 수입이 급증하는 추세임.
- 바리과 어류와 돔류 등 고가의 어류가 수입되고 있으며, 이들 어종은 국내에서 높은 가격으로 판매되고 있는 실정.
- 양어가에서 새로운 양식대상 어종에 대한 욕구에 부응해서, 관련 연구기관에서 지속적인 연구개발이 진행되고 있으나 경제 산업적인 측면에서 아직까지 넙치나 조피볼락의 산업가치 생산성을 넘어서는 어종 개발이 매우 어려운 실정.
- 바리과 어류의 안정적인 양질의 수정란 생산 기술 및 새로운 양성 기술 개발을 통해 상품화가 가능하면 국제 경쟁력이 있을 것으로 판단되며, 수입활어 대체효과가 매우 클 것으로 생각됨.
- 웰빙시대에 즈음하여 먹거리에 대한 안전성과 고급화 요구가 점점 증가하고 있는 추세이므로 제주도 청정 사육조건에서 생산된 바리과 어류(현재 kg당 120,000-150,000원)의 종묘생산은 어업인들의 소득증대에 충분한 경쟁력을 갖추고 있음.
- 남해안 일부 가두리에서 바리과 어류의 축양형태의 양식을 시도하고 있어 제주에서 수정란 시기를 조절하여 조기종묘생산이 가능하게 되면 남해안 지역 양식사업에 파급효과 클 것으로 사료됨.
- 바리과 어류의 친환경양식기술 개발은 기타 어종의 생산성 가치의 비교분석에 따른 경제성 평가와 더불어 연안 바리과 어류의 자원회복 차원에서 매우 중요한 것으로 생각됨.

#### 다. 사회·문화적 측면(공공성 포함)

- 제주도는 2006년 7월부터 국제자유도시화가 되면서 외국인(특히 화교계통)의 관광자원이 증가할 것으로 예상되며, 이들이 선호하는 어류의 양식개발 필요성 증대.
- 바리과 자원은 세계적으로 급격히 감소하는 추세에 있으며 APEC 주관으로 아세안 연안의 바리과 자원회복을 위해 범정부적으로 협력연구를 수행하고 있음.
- 바리과의 친환경적인 양식기술기반이 구축되면 아세안 지역의 바리과 자원회복 기술지원 및 기술교육센터 유치가 가능함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내기술동향

- 바리과 어류(Epinephelinae)는 대부분 아열대와 열대지방에 암초와 산호초가 발달한 지역에 서식하고 있으며(FAO, 1993), 우리나라에서는 남해안과 제주도 연안에 자바리, 능성어, 붉바리, 홍바리, 구실우럭, 도도바리, 닳줄바리 등이 분포(Kim and Lee, 1994).
- 능성어와 붉바리를 대상으로 성현상과 성호르몬 처리에 의한 성전환유도(Lee et al., 1993; Lee et al., 1996; Hwang et al., 1998; Lee et al., 1998; Song et al., 2004)가 이루어지고 있고, HCG처리에 의한 배란유도와 초기 자어의 생태(Kim et al., 1997; Lee et al., 1997; Song et al., 2008)에 관한 연구들이 진행되고 있음.
- 그러나 현재 국내에서의 바리과 어류 양식은 제주도에서 본 연구진이 수산특정연구 과제 등을 통해 국내에서 처음으로 능성어와 자바리 수정란을 생산 및 자바리, 붉바리 등의 종묘생산에 성공하였으나, 종묘생산 및 양성과정에서 많은 문제점 발생하고 있음. 남해안 일부 양어가 에서도 바리과 어류의 수정란 생산과 종묘생산에 많은 관심과 시도를 추진하고 있으나 안정적인 수정란 확보에 애로가 많음.
- 바리과 어류의 양식과정에 발생하는 문제점으로는 보다 고품질의 수정란 생산 방법, 종묘 생산 과정에 발생하는 기형 현상, 그리고 상품화까지 양성을 하는데 소요되는 많은 시간과 경비 문제 해결방안이 필요한 실정임.
- 우리나라에서는 몇몇 해산어류의 친어 사육관리와 실내 성 성숙 유도를 위한 연구를 수행하여 종묘생산을 시도하였으나 난질 저하 문제로 소규모에 그치고 있으며, 동일한 방법을 다음해에 시도해도 계획적인 생산에 애로가 있음.
- 난질 결정인자들로써 그 유효성을 입증하기 위한 국내 연구는 매우 드문 실정으로서 지속적인 연구가 필요.
- 합리적인 친어관리 방법과 번식특성 및 건강한 종묘생산을 위해서는 종 특이적인 번식특성 탐색이 요구됨.



## 제 2절 국외기술동향

- 바리과 어류에 관한 연구는 종 특성상 주로 아열대나 열대해역을 접한 아시아권에서 활발한 연구가 이루어지고 있으며, 바리과 어류에 관한 학문적 연구는 크게 자연산란 특성, 수정란 생산, 성현상 및 응성화 유도에 관한 연구들이 있음.
- 바리과 어류의 성 성숙과 성전환(Quinitio et al., 2001; Okumra, 2001; Ferreira, 1995; Tan and Tan, 1994; Shapiro et al., 1993; Tanaka et al., 1990; Chan and Yeung, 1983) 그리고 산란유도와 초기사육(Glamuzina et al., 1998; Kohno et al., 1993; Kuo et al., 1988; Kitajima et al., 1991)등이 활발하게 진행되고 있음.
- 자연산란 특성에 관한 연구로서 *E. polyphekadion* (Rasem et al., 1997), *E. merra* (Lee et al., 2002)는 산란시기에 달주기(lunar cycle)에 따라 산란리듬을 가지고, *E. suillus* (Toledo et al., 1993)는 연중 산란하는 것으로 보고되고 있으며, *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), 붉바리 (Kim and Park, 1993; Okumura et al., 2002)와 같이 일정기간 동안 산란하는 등 서식장소와 종에 따라 다양.
- 수정란 생산을 위한 바리과 어류 어미관리는 *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), *E. suillus* (Toledo et al., 1993), 붉바리 (Okumura et al., 2002) 등에서 가두리와 실내수조 사육방법으로 수행.
- 그러나 실내수조에서 *E. tauvina* (Hussain and Higuchi, 1980), *E. fuscoguttatus* (Lim et al., 1990), *E. aeneus* (Hassin et al., 1997) 등의 자연산란된 알은 난질의 불균형으



로 수정률과 부화율은 매우 낮아 이런 문제점을 해결하기 위한 방안으로 호르몬을 이용한 인공수정란 생산 방법에 관한 많은 연구들이 진행되고 있음.

- 일본에서는 바리과 어류 중 붉바리를 대상으로 1960년대부터 난 발생과 부화자어의 형태학적 특징에 관한 연구를 시작으로 1990년에 Tanaka 등은 붉바리를 사육하면서 종묘 생산된 붉바리의 성전환 현상과 성 성숙 과정에 관한 연구까지 이루어지고 있으며, 능성어의 경우에 있어서는 자치어의 형태학적 발생 특징에 관한 연구(Kitajima et al., 1991)도 진행됨.
- 동남아시아권에서는 일본, 대만, 중국에서 바리과어류의 종묘생산을 위해 국가차원에서 지속적으로 연구개발에 지원하고 있으며 산학연 공동으로 산업화에 주력하고 있음
- 바리과 어류의 상업적 생산에 관한 연구는 일본 남부지역의 재배어업 센타에서 지역에 적합한 바리과 어류의 종묘생산에 관한 기술개발이 상당히 진행되어 오키나와의 재배어업센타에서는 바리과 어류인 *Plectropomus leopardus*의 종묘생산이 계획적으로 진행되고 있음.
- 아세안권에서는 필리핀, 인도네시아, 말레이시아, 태국 등에서 바리과 어류의 자원회복과 양식 산업화에 연구개발이 활발하게 진행되고 있음.
- 동남아시아의 태국과 인도네시아에서는 *Plectropomus* spp, 와 *Epinephelus coioides*를 대상으로 시험적인 종묘생산이 진행되고 있으며, 영양과 질병에 관한 연구도 진행.
- 중국의 Guangdong의 어업개발센타(GDFDC)와 대만에서도 바리과 어류의 양식이 이루어지고 있으며, 필리핀과 브르네이에서 또한 능성어의 종묘생산에 관한 연구들이 활발히 진행중.
- 미국과 호주에서도 바리과 어류의 성숙과 성전환에 관한 자원생물학적 연구들이 진행되고 있음(Shapiro et al., 1993; Ferreira, 1995).
- 그러나 아직까지 종묘생산의 산업화는 초기단계이며, 친환경 양식시스템을 도입하여 친어관리 및 양성에 관한 연구는 찾아보기 힘들.
- 난질 평가인자로서 ①알의 모양(egg shape), 알의 투명도(egg transparency), 유구의 분포, egg' ability to float or sink, 발생초기의 난할 상태 등의 형태적 인자와, ②배란시 난소액의 pH, 어미의 번식내분비 상태(만약 호르몬 처리를 했다면 호르몬의 종류, 처리농도 등) 등의 생리적 인자 그리고 ③알에 함유된 지방산과 아미노산 조성, glucose-6-phosphatase, adenylate kinase, acid phosphatase의 효소 활성도등의 생화학적 인자(Pavlov and Moksness, 1994; 1996) 등을 평가인자로 보고 있음.
- 건강한 종묘생산에 직접적인 영향을 미치는 난질관리와 평가방법이 몇몇 담수어류와 터봇(Fauvel et al., 1993; Brooks et al.. 1997), 대서양산 대구와 halibut (Evans et al., 1996; Brooks et al.. 1997), 참돔류(Lahnsteiner and Patarnello. 2005) 등을 대상으로 개발되고 있고 아직까지 국외에서도 난질 결정인자들로서 그 유효성을 입증하기위한 연구는 기술개발 단계임.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 최적화 사육 시스템 구축을 위한 번식 내분비 특성 연구

#### 1. 어미확보 및 사육관리

제주도 연안 정치망과 제주도내 어촌계 협조를 통해 제주 연안에서 어획된 홍바리, *Epinephelus fasciatus*를 구입하여 개체별 Tagging 한 후, 참여기업인 탐라수산 어미사육동 (8×10×3 m, 유효수량 160 ton)과 제주대학교 해양과환경연구소 실험 수조에 순차·사육관리 하였다(Fig. 1).

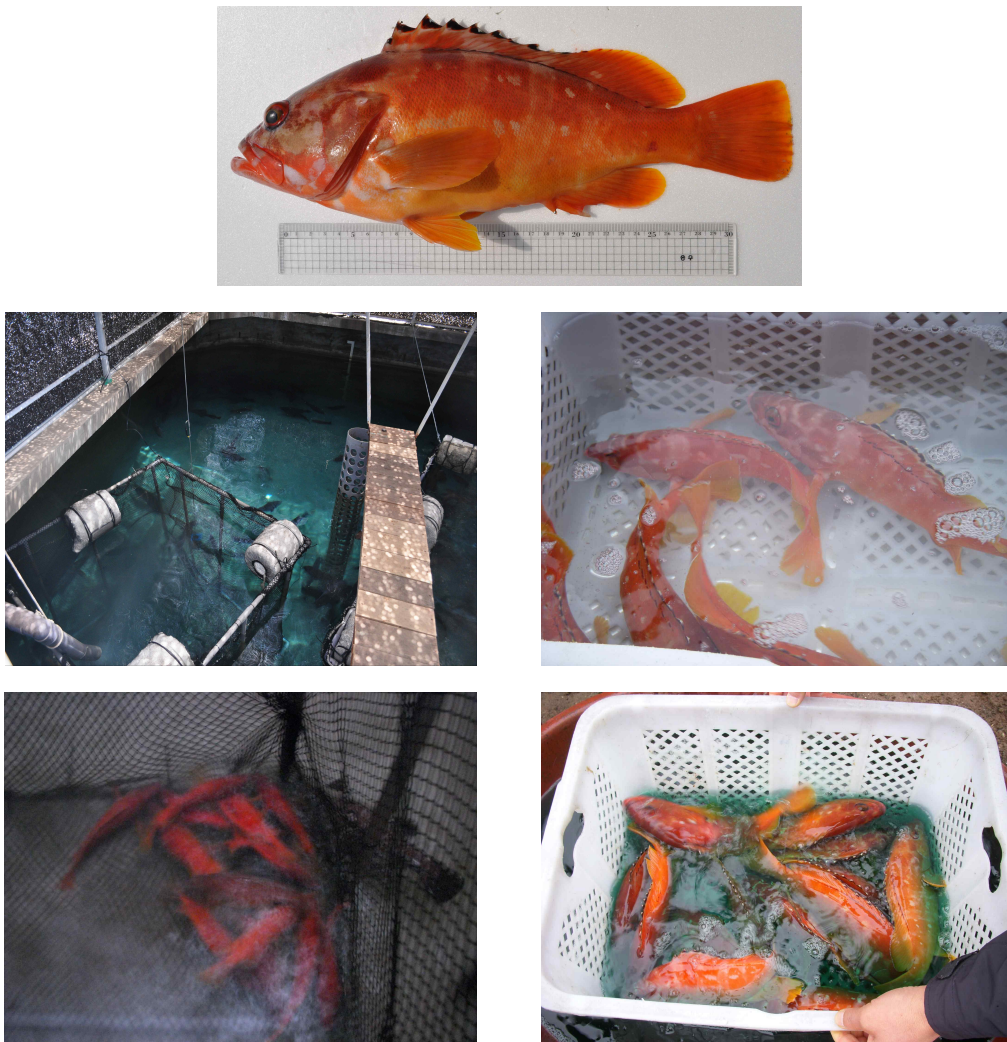


Fig. 1. Broodstock management of the blacktip grouper, *E. fasciatus*.

어획된 홍바리의 전장은 22~47 cm 범위였고, 28.0~30.9 cm 범위에 29.6%로 가장 많이 분포하였고, 31~33 cm 범위에 25.2%가 분포하였다. 그리고 체중은 100~1,190 g 범위

였고, 200~390 g 범위에 41.3%, 400~590 g 범위에 31.7%가 분포하였다 (Fig. 2).

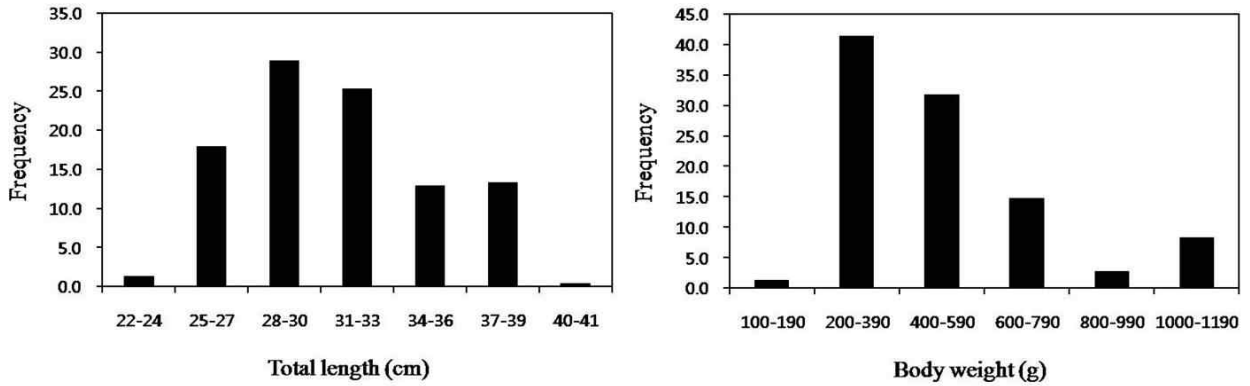


Fig. 2. Frequency in total length and body weight of blacktip grouper, *E. fasciatus*.

## 2. 번식 내분비 특성

### 가. 성 특성

홍바리의 어체 크기에 따른 성 특성을 조사하기 위해 생식소를 어체에서 적출한 후, Bouin's solution에 24시간 고정 하였고, 이후 70 % EtOH로 치환시켜 주었다. 고정된 생식소는 단계별 탈수 과정을 거친 후 파라핀으로 포매하였으며, 절편법에 의해 5~6  $\mu\text{m}$ 의 두께로 조직표본을 만들었다. 조직표본은 Hansen's haematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색을 실시하여 광학현미경하에서 검경하였다.

#### (1) 생식소 구조

홍바리는 다른 바리과 어류와 마찬가지로 자성선속형 자웅동체 어류로 먼저 암컷으로 성숙한 후 수컷으로 발달하는 양상을 보였다. 난소는 결합조직으로 둘러싸여 있고, 결합조직 내에 난소 내강을 이루고 각각의 소낭 선단부에 관상의 구조가 관찰되었다. 난소 내강은 난소소낭들이 일정한 배열로 돌기형으로 구성되어 있었다. 소낭 내에는 어린난모세포와 성장중인 유구기 난모세포들이 관찰되었다(Fig. 3A and 3B). 성전환 개체의 생식소는 소엽내에 퇴행하는 난모세포와 정원세포, 정모세포 무리들이 관찰되었다(Fig. 3C). 수컷의 생식소는 소엽내부에 정원세포, 정모세포, 정세포 무리들이 관찰되었고 기부에 수정관이 관찰되었다(Fig. 3D).

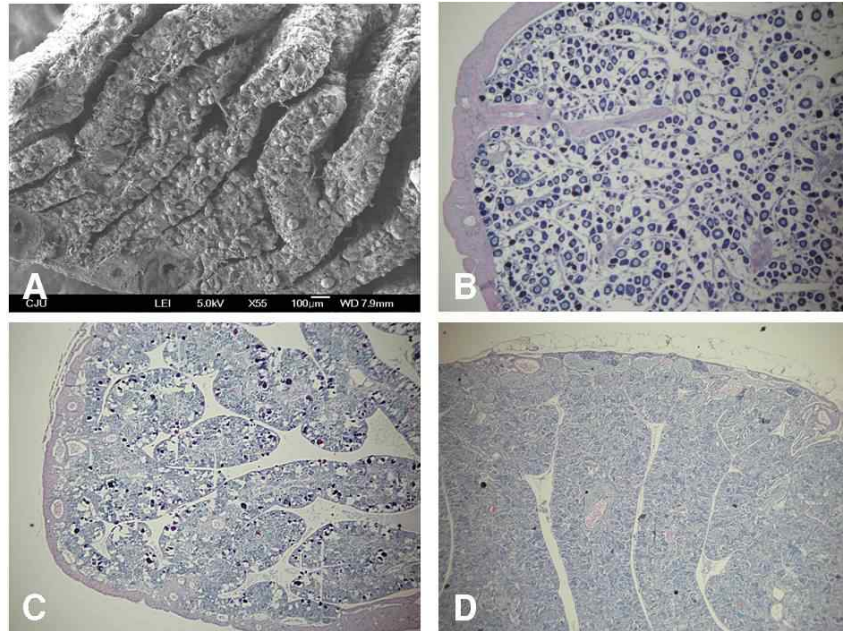


Fig. 3. Structure of gonad of blacktip grouper, *E. fasciatus*. A, scanning electron micrograph of the ovary; B, ovary; C, inter-sex gonad; D, testis.

## (2) 성분포 양상

홍바리 크기별 성 출현 양상을 보면, 암컷은 전장 32~36 cm, 체중 400~900 g 범위에 출현하였고, 수컷은 전장 34~41 cm, 체중 600~1000 g에 나타났다. 간성 개체는 전장 31~35 cm, 체중 500 g 범위에서 관찰되었다 (Fig. 4).

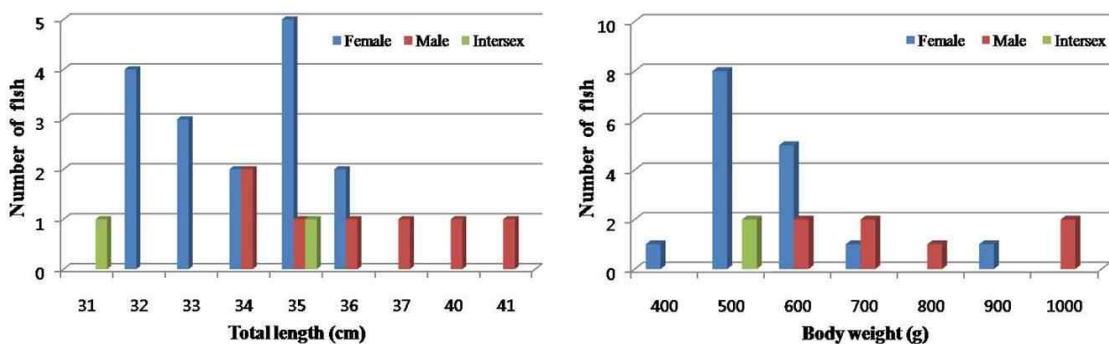


Fig. 4. Sex distribution of blacktip grouper, *E. fasciatus* according to total length and body weight.

암컷의 경우 약 30~70  $\mu\text{m}$  크기의 주변인기 난모세포와 100~120  $\mu\text{m}$  크기의 유구기 난모세포가 혼재하여 발달하고 있었다. 암컷에서 수컷으로 성전환하는 간성개체의 경우 생식소 소엽 내에 약 50  $\mu\text{m}$  크기의 어린난모세포와 정모세포무리들이 혼재되어 관찰되었다. 수컷의 경우 소엽내에 정원세포, 정모세포와 정세포 무리들이 발달하고 있었다(Fig. 5).



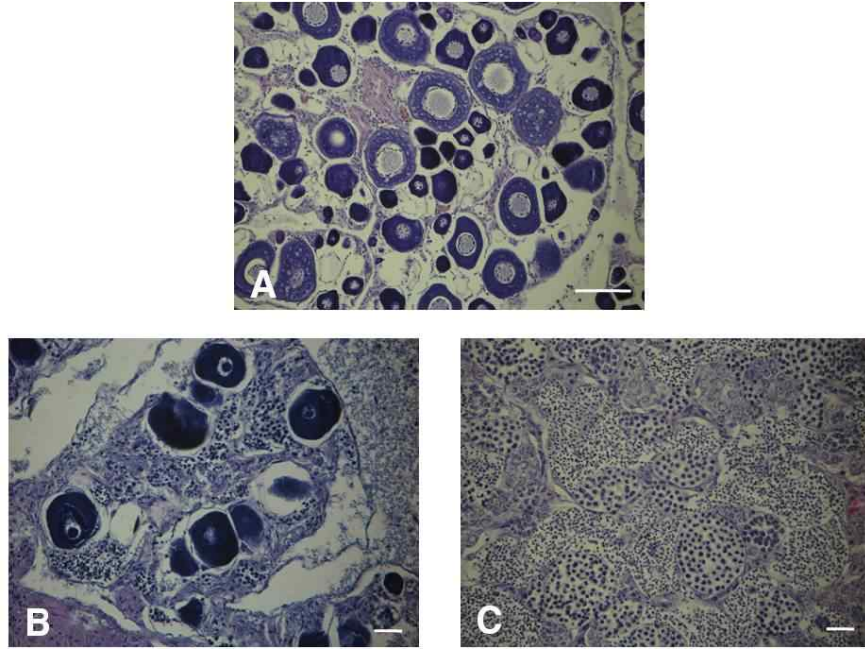


Fig. 5. Photomicrographs of gonad of blacktip grouper, *E. fasciatus*.  
A, female; B, inter-sex; C, male. Scale bars = 100  $\mu$ m.

#### 나. 번식 내분비 특성

##### (1) 성성숙 유도 및 제어 인자 탐색

홍바리의 생식소 발달과 성숙에 관여하는 FSH와 LH의 활성도를 조사하기 위해 FSH와 LH의  $\beta$  subunit cDNA cloning을 실시하여 유전인자를 동정하였다. 또한 각각 유전자의 특정 전사부위를 조사하기 위해 뇌의 중추신경조직들과 주변조직들에서 그 발현 정도를 확인하였다. 실험어는 제주대학교 해양과환경연구소의 순환여과시스템에서 사육 중인 홍바리 성어(약 450 g)로부터 뇌하수체를 적출하여 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA의 분리 및 동정에 사용하였으며, 각각 유전자의 조직별 발현은 홍바리를 2-phenoxyethanol을 이용하여 마취 한 후, 뇌의 중추신경조직인 후엽(telecephalon), 시엽(optic tectum), 시상하부(hypothalamus), 뇌하수체(pituitary)와 주변조직인 간(liver), 신장(kidney), 생식소(gonad) 등을 적출하여 조사하였다.

##### (가) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

홍바리의 각 부위에서 적출한 50-100 mg의 조직들은 1.5 mL tube에 크기별로 300-500  $\mu$ L의 TRI Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 사용한 시약의 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 그 농도를 측정하였고, 흡광도 비율(A260/A280)이 1.7-2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 샘플만을 선택하여 실험에 이용하였다. cDNA 제조는 각 조직에서

추출한 total RNA 1  $\mu$ g을 주형으로 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 역전사 시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT Primer 1  $\mu$ L, PrimeScript™ RT Enzyme mix 1  $\mu$ L 그리고 5×PrimeScript™ Buffer 4  $\mu$ L를 첨가하였고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20  $\mu$ L이 되도록 조절하였다. 37°C에서 15분 간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85°C에서 5초간 가열하여 합성을 중단하였다. 합성된 cDNA는 각 유전자의 cloning 및 mRNA 발현 분석에 사용되었다.

#### (나) FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ cDNA 증폭 및 cloning

생식선자극호르몬 유전자 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit의 부분염기서열 분리를 위한 degenerated primer는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록되어 이미 밝혀진 자바리(*E. bruneus*, Accession number, FSH $\beta$ : EF583919, LH $\beta$ : EF583920)와 Honeycomb grouper (*E. merra*, Accession number, FSH $\beta$ : AB525770, LH $\beta$ : AB525771)의 유전자 정보를 참고로 제작하였다.

FSH $\beta$ 의 증폭용 primer는 FSH $\beta$ F primer (5'-TGGT(A/T)GTCATGGCAGCAGTG-3')와 FSH $\beta$ R primer (5'-A(G/T)ACAGCTGGGT(A/G)TGTCTCC-3')를 사용하였다. LH $\beta$ 의 증폭용 primer는 LH $\beta$ F primer (5'-TCAACCAGAC(A/C)GTGTCTCTG-3')와 LH $\beta$ R primer (5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGA(C/T)G-3')를 사용하였다. PCR 반응은 1  $\mu$ L의 cDNA를 주형으로 Go Taq Green Master Mix (Promega, USA)와 Primer 세트 그리고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 25  $\mu$ L이 되도록 조절하여 94°C에서 2분간 열변성 후 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1분을 35회 반복하여 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel를 이용한 전기영동으로 확인하여 정제하였다. 정제된 각각의 증폭 유전자 산물은 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation하여 plasmid DNA를 만든 후, JM109 competent cell (Takara, Japan)에 형질 전환하였다. LB agar (Sigma, USA) 고체배지를 이용해 37°C에서 12시간 동안 배양된 clone 중 3개를 선택하여 LB broth (Sigma) 액체배지에서 37°C에서 10시간 동안 cell을 대량으로 배양하였다. 그 후 cell로부터 plasmid DNA를 정제하여 유전체 분석기관(Genotech, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 각 유전자의 전염기서열은 SMART RACE cDNA amplication kit (Clontech, USA)를 이용하여 분리하였으며, 5'과 3' cDNA 단편을 위한 종 특이적 primer는 확인된 부분염기서열 정보를 이용하여 합성하였다. 제작된 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit의 5'과 3' cDNA 단편 증폭용 primer set는 다음과 같다:

FSH $\beta$  5'R (5'-AAAGCGCCCGCAGTACGTGTTT-3')

FSH $\beta$  3'R (5'-TGCCATCTGACCAGCATCAGCAT-3')

LH $\beta$  5'R (5'-AGCGCCACAGTGACAGCTCAAA-3')

LH $\beta$  3'R (5'-ACCCGGTGGAAACAACCATCTGC-3')

5'과 3' cDNA 단편의 PCR 반응은 아래와 같이 3 step PCR 프로그램에 의해 수행되었다: (1) 94°C 30초, 72°C 3분을 5회 반복; (2) 94°C 30초, 70°C 30초, 72°C 3분을 5회 반복; (3) 94°C 30초, 68°C 30초, 72°C 3분을 25회 반복. 최종 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel에 전기영동을 실시하여 각 cDNA 단편의 크기를 확인 및 정제과정을 거쳐 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation 및 cloning 하였고 염기서열 분석은 위에 서술한 내용과 동일하게 진행하였다.

#### (다) 구조적 및 계통발생학적 분석

홍바리 뇌하수체로부터 분리된 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA의 핵산 서열은 Open Reading Frame (ORF) Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)를 이용하여 핵산과 결합하는 peptide의 특징과 그 아미노산 서열을 확인하였다. Signal peptide의 구조적인 분석은 SignalP 4.0 server을 이용하여 조사하였다(Nielsen et al., 1997; Dyrlov et al., 2004). 추정되는 N-linked glycosylation site는 NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)에 의해 분석하였다. Multiple alignment와 Phylogenetic analysis에 사용된 모든 어종의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit에 대한 모든 정보는 NCBI의 Genbank로부터 얻었다. 조사된 어류들에 대한 분류를 살펴보면, 철갑상어목(Acipenseriformes), 뱀장어목(Anguilliformes), 색줄멸목(Atheriniformes), 잉어목(Cypriniformes), 농어목(Perciformes), 가자미목(Pleuronectiformes), 연어목(Salmoniformes) 그리고 메기목(Siluriformes) 등이 있다. 중간 계통 유연관계 분석은 Phylip 프로그램을 활용한 neighbor-joining 기법을 이용하였으며 조사된 다양한 종의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열들에 대한 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램을 이용하여 분석하였다. BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 세트의 결과물은 CONSENSE 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Out group은 sea lamprey의 GTH $\beta$ -like protein (GenBank Accession No. AY730276)를 이용하였다(Sower et al., 2006).

#### (라) RT-PCR

홍바리의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체, 간, 신장, 생식소에서 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA의 발현조사는 genomic DNA에 의한 total RNA의 오염을 사전에 차단하기 위하여 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 처리한 후 흡광도 비율이 1.7-2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료만을 선택하여 cDNA를 합성하였다. Cloning에 의해 결정된 홍바리 뇌하수체 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit의 염기서열과 control 유전자로서 분리된 홍바리 18s rRNA의 염기서열로부터 RT-PCR용 primer는 아래와 같이 합성하였다:

rtFSH $\beta$ F (5'-CATCTGACCAGCATCAGCAT-3')  
rtFSHR (5'-TGGATATGTCTCCAGGAAAGC-3')  
rtLH $\beta$ F (5'-AGGTCGGCAGAGTGATGTTC-3')  
rtLH $\beta$ R (5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGATG-3')  
rt18sF (5'-GATCAATTGGAGGGCAAGTC-3')  
rt18sR (5'-CCTCCGACTTTCGTTCTTGA-3')

RT-PCR 반응은 1  $\mu$ L의 cDNA (50 ng total RNA)를 주형으로 Go Taq Green Master mix (Promega)와 primer 세트를 혼합하여 최종 반응량이 25  $\mu$ L가 되도록 조절하여 94°C에서 2분간 열변성 후 94°C 45초, 60°C 45초, 72°C 1분을 총 32회 반복하여 각 유전자의 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 cDNA 산물은 1% agarose gel을 이용해서 100 V에서 35분간 전기영동을 실시하여 그 발현을 확인하였다.

#### (마) 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ cDNA 분리 및 동정

홍바리 뇌하수체로부터 증폭한 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA를 cloning하여 전염기서열을 분석한 결과, FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA 길이는 각각 571 bp와 617 bp이었다. FSH $\beta$  cDNA의 ORF 길이는 360 bp이었으며, 5' untranslated region (UTR)과 3' UTR의 길이는 각각 102 bp와 106 bp이었다. LH $\beta$  cDNA의 ORF 길이는 441 bp이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 30 bp와 143 bp이었다(Fig. 6). 홍바리 FSH $\beta$  subunit 단백질 구조는 SignalP V3.0 프로그램(Nielsen et al., 1997; Dyrlov et al., 2004)을 사용하여 확인해 본 결과, 21 amino acid (aa)의 신호 펩티드(signal peptide)와 99 aa의 성숙 펩티드(mature peptide)가 구성되어 총 120 aa에 코드(code) 되었고, 홍바리 LH $\beta$  subunit은 각각 32 aa의 신호 펩티드와 115 aa의 성숙 펩티드가 합쳐진 총 147 aa에 코드 되어 단백질을 구성하였다. 대부분의 진핵생물의 mRNA등에서 관찰되는 것처럼, 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 의 polyadenylation signal (AATAAA)은 polyadenylation site (poly A tail)의 시작 위치로부터 각각 14와 20 bp 상류 쪽에 위치하였다.



(A)

```

GCTGCTACAGATGTTTACAGAGCAACAGAGAAACAAGACGTGCAACTGAGGTTCCAAGC 60
AACACGGAGCTCTACAGTGTCTGACGTGAGACTCGCGACGATGCGAGCTGGTTGTCATG 120
      M Q L V V M
      -21
CGAGCAGTGTCTGGCACTGGGCGGGCGGGGCGGGTTCCTCCACTGCCATCTGAC 180
A A V L A L A G A G P G C H S D C H L T
      -1 1
AGCATCAGCATCCCTGTGGAGAGCTGCGGCCACACCGAGTACACTACACCCCAATATGT 240
S I S I P V E S C G H T E Y I Y T T I C
      -1
GAAGCAGAGTGTACCAAGGATCCGGTCTACATCGGCCCTGATGACTGGCTGAACAG 300
E G Q C Y H K D P V Y I G P D D W A E Q
AAAGTGTGCAAGGGGACTGGACCTATGAGGTGAAACACTTCCAGGATGTCGAGTGGGC 360
K V C N G D W T Y E V K H F Q G C F V G
GTCACTACCCCTGTGCCAGAACTGCAAGTGCACGGCATGTAACCGAGAAACAGGTAC 420
V T Y F V A R R E C K C T A C N A G N T Y
TGGGGGGGCTTCTGGAGACATATCCAGTGTCTGTGCTTTAAAGAAAACCGTCCGTC 480
C G R F P G D I S S C L S P *
      99
CTACGTGACTTATTAATCTTTATGTACATGACTTGATATTAATAATAAAGGATATCC 540
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

(B)

```

AGCACACTGCTGCGACACTAGAGAAATCATGGCTGTACAGGTGCGCAGAGTGAIGTTC 60
      M A V Q V G R V M F
      -32
CCTTTGATGTTGAGTTTGGTTCTGGGAGCCTCATCTTCCATTTGGTCTCGCTCCTGCA 120
F L M L S L F L G A S S S I W S L A P A
GGGGCTTCCAGCTGGCCCTGCGCACTGATCMAACGACAGTGTCTCTGAGAGGGA 180
A A P Q L P P C Q L I N Q T V S L E K E
      -1 1
GGCTGTCCAAAGTGTCAACCGGTGGAACACCCATCTGCGAGCGTCACTGCAATTACAAG 240
G C P K C H F V E T T I C S G H C I T K
GACCCGTGATCAAGATACGATTTCAGCAATGTGTACCGACATGTGTGACATACCGGAC 300
D F V I K I P F S N V Y Q H V C T Y R D
TTGTACTAAGACATTTGAGCTTCTGACTGTCTCCTGGGCTGGACCGGACTGTCAAC 360
L Y Y K T F E L P D C P P G V D E T V T
TAACCCGCGCTTTGAGCTGTACTGTGGGCGTGTGCCATGGAACATCTGACTGCACC 420
Y F V A L S C H C G R C A M D T S D C T
TTGAGAGCGCTGCGCCCACTTTGATGAATGACATACCTTCTACTACTATCTCAA 480
F E S L Q P N F C M N D I P F Y Y *
      115
GCATAGCAGCATTAATCAATTAAATAAAGTGGGTTTACATTCAGCATCAACTGTTGT 540
TGTGTTCATTCUCCAGTGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 600
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 6. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding the blacktip grouper, *E. fasciatus* FSH $\beta$  (A) and LH $\beta$  (B) subunits. The nucleotide numbers are shown on the right-hand side of sequence, and the amino acid residue number below the amino acid sequence. Amino acids are given as single capital letters below the cDNA sequences. The first amino acid of the putative mature subunit is numbered +1. Amino acids that comprise the predicted signal sequence are underlined with minus numbers. The stop codon indicated by an asterisk. Possible polyadenylation signal (AATAAA) is marked by a black box. GenBank accession numbers: blacktip grouper FSH $\beta$ , JF520407; blacktip grouper LH $\beta$ , JF520408.

홍바리의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열은 이미 NCBI에 등록된 다른 어종의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열들과 비교하였다(Fig. 7). 그 결과 홍바리를 포함한 조사된 모든 종들의 아미노산 서열에서 각각 12개의 cystine이 동일한 위치에 나열되고 있음을 확인하였다. 조사된 다른 어종의 FSH $\beta$  아미노산 서열과는 다르게 홍바리 FSH $\beta$ 는 자바리 FSH $\beta$ 과 함께 N-linked glycosylation site가 존재하지 않았으나, 홍바리 LH $\beta$ 에서는 자바리(*E. bruneus*) LH $\beta$ 를 포함한 조사된 모든 어종의 LH $\beta$  아미노산 서열 중의 N-linked glycosylation site의 위치와 동일하게 존재하였다. 각각의 어류들과의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열의 상동성을 비교해 본 결과, 홍바리 FSH $\beta$ 는 같은 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 참다랑어(*Thunnus thynnus*)와 77%의 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인

철갑상어(*Acipenser* spp.)와 32%의 낮은 상동성을 나타내었다. 홍바리 LH $\beta$ 의 경우는 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 유럽산 농어(*Dicentrarchus labrax*)와 91%의 가장 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인 철갑상어와 45-49%의 낮은 상동성을 나타내었다. 분류체계에서 그 외 다양한 어종들 간의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열들의 상동성 비교는 Table 1에 자세히 나타내었다. 중간 계통유연관계에 관한 분석에서도 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 는 동일한 농어목의 어류들과 가장 가까운 유연관계를 보였다(Fig. 8).



Fig. 7. Alignments of amino acid sequences of the FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits of blacktip grouper, *E. fasciatus* and other actinopterygian species using Clustal W multiple sequence alignment program (Thompson et al., 1994). Twelve conserved cysteines are shaded. The putative N-linked glycosylation sites are boxed. Aa, *Anguilla anguilla* (European eel); Ob, *Odontesthes bonariensis* (Pejerrey); Ci, *Ctenopharyngodon idella* (Grasscarp); Ef, *Epinephelus fasciatus* (Blacktip grouper); Eb, *Epinephelus bruneus* (Longtooth grouper); Tt, *Thunnus thynnus* (Northern bluefin tuna); Po, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder); Om, *Oncorhynchus mykiss* (Rainbow trout); Cg, *Clarias garipeinus* (North African catfish); As, *Acipenser sinensis* (Chinese sturgeon).

Table 1. The homologies of amino acid sequences of blacktip grouper, *E. fasciatus* FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits in comparison with those of FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits from the other fish

	Species	FSH $\beta$ (%)	LH $\beta$ (%)	Source
Teleostei				
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i>	40	52	FSH $\beta$ : AY169722, LH $\beta$ : X61039
	<i>Anguilla japonica</i>	40	52	FSH $\beta$ : AB016169, LH $\beta$ : AY082379
Atheriniformes	<i>Odontesthes bonariensis</i>	66	77	FSH $\beta$ : AY319832, LH $\beta$ : AY319833
Cypriniformes	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	42	52	FSH $\beta$ : EF552359, LH $\beta$ : EF565171
	<i>Danio rerio</i>	40	53	FSH $\beta$ : AY714131, LH $\beta$ : AY714132
Perciformes	<i>Epinephelus fasciatus</i>	–	–	FSH $\beta$ : JF520407, LH $\beta$ : JF520408
	<i>Epinephelus bruneus</i>	97	97	FSH $\beta$ : EF583919, LH $\beta$ : EF583920
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	74	91	FSH $\beta$ : AF543314, LH $\beta$ : AF543315
	<i>Thunnus thynnus</i>	77	90	FSH $\beta$ : EF208026, LH $\beta$ : EF205591
	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	68	87	FSH $\beta$ : AB300390, LH $\beta$ : AB300391
Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i>	71	75	FSH $\beta$ : AF268693, LH $\beta$ : AF268694
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	65	78	FSH $\beta$ : AJ417768, LH $\beta$ : AJ417769
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	35	55	FSH $\beta$ : AB050835, LH $\beta$ : AB050836
	<i>Oncorhynchus keta</i>	35	56	FSH $\beta$ : M27153, LH $\beta$ : M27154
Siluriformes	<i>Clarias gariepinus</i>	42	54	FSH $\beta$ : AF324541, LH $\beta$ : X97761
	<i>Ictalurus punctatus</i>	41	55	FSH $\beta$ : AF112191, LH $\beta$ : AF112192
Chondrostei				
Acipenseriformes	<i>Acipenser sinensis</i>	32	49	FSH $\beta$ : EU523732, LH $\beta$ : EU523733
	<i>Acipenser baerii</i>	32	45	FSH $\beta$ : AJ251658, LH $\beta$ : AJ251656

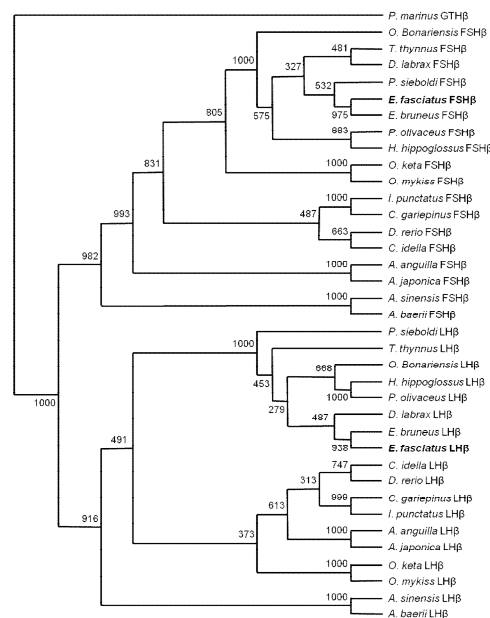


Fig. 8. Phylogenetic analysis of teleost FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits based on amino acid sequence. The *Petromyzon marinus* GTH $\beta$  –like protein was used as an outgroup to root the tree. Analysis was performed using the neighbor–joining method. The values at nodes are bootstrap values estimated by 1000 replications.

(바) 조직별 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  mRNA 발현

홍바리의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체, 간, 신장 및 생식소 조직 등에서 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA는 주로 뇌하수체에서 강하게 발현하였으나, 반면에 중추신경조직 중의 후엽에서는 LH $\beta$  mRNA가 약하게나마 발현하였고 그 이외의 조직들에서는 거의 발현되지 않았다. 또한 RT-PCR 반응과정 중에 genomic DNA에 의한 PCR 증폭 오류는 RT-PCR 반응 시 역전사 효소를 넣지 않은 negative control에서 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  mRNA의 발현을 통해 검정하였다. 그 결과 genomic DNA 증폭이 전혀 없었음을 확인하였다(Fig. 9).

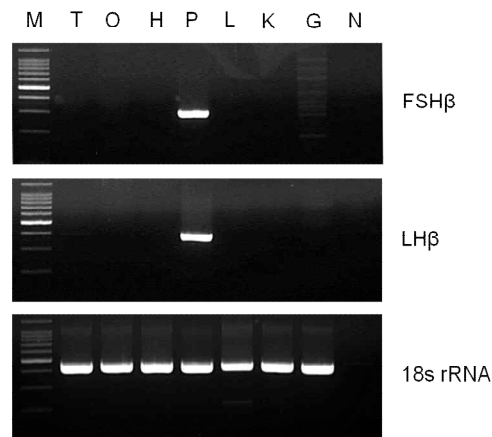


Fig. 9. The tissue specificity of blacktip grouper, *E. fasciatus* FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA expression analyzed by RT-PCR. 100 ng of total RNA each from telecephalon (T), optic tectum (O), hypothalamus (H), pituitary (P), liver (L), kidney (K) and gonad (G, ovary) was subjected to RT-PCR for FSH $\beta$  (32 cycles) and also 18s rRNA (28 cycles) which served as a reference of the loading amount of total RNA for each tissue. PCR products of cDNAs were revealed by 1% agarose gel electrophoresis. N, negative control; M, marker of 100 bp DNA ladder.

(2) 신경내분비 및 성장 인자 탐색

홍바리를 대상으로 신경내분비 및 성장 인자를 탐색하기 위해 GnRH를 비롯한 최근 뇌-뇌하수체-생식소 축에 있어 번식내분비의 gatekeeper 또는 new frontier 라고 불리는 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54를 분리 동정하였고, 또한 성장 등에 관여하는 Somatostatin 그리고 Growth hormone (GH)를 분리 동정하였다. 홍바리에서 시상하부, 뇌하수체, 간, 생식소 등 각각의 조직을 적출하여 Total RNA를 추출하였고, cDNA를 합성하여 각각의 유전자를 증폭시키기 위한 Polymerase chain reaction (PCR) 반응에 사용하였다.

(가) Isolation of cDNA fragments

First strand cDNA는 PrimeScript RT reagent kit (Takara, Otsu, Japan)를 이용하여 500 ng Total RNA와 함께 합성하였고, 각 유전자의 cDNA 단편은 Polymerase chain reaction (PCR) 증폭에 의해 얻을 수 있었다. 이때 사용한 Degenerated oligonucleotide primer는 이미 보고되어진 다른 어종 (zebrafish, salmon, rainbow trout, goldfish.. 등)의 염기서열을 표본으로 하여 상보성이 높은 영역으로부터 Forward / Reverse primers를 디자인하였다(Table 2). 얻어진 PCR 산물은 pGEM-T easy vector system (promega)와 competent cell (JM109, Takara)를 이용해 cloning하였고, 정제되어 얻어진 DNA plasmid는 Sequencing 분석에 사용하였다.

핵산 및 아미노산 염기서열은 BLAST program을 이용해 cloning 성공 유무를 확인하였고, 계통발생학적 분석을 위해 ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)를 이용해 다수의 어종의 유전자들과 비교 분석하였다. 계통발생학적 모식도는 PHYLIP version (Ver 3.63, by J. Felsenstein, University of Washington, Seattle, WA)의 PRODIST와 CONSENSE program를 사용하는 neighbor-joining방법을 통해 구성하였다. 계통발생학적 모식도의 outgroup으로는 zebrafish의 opioid 수용체를 사용하였다. PCR 반응은 template로서 합성된 cDNA을 사용하여 행하였다. 결과물에 대한 상대적 분석을 위해 control 유전자로서 18s rRNA (housekeeping 유전자 중 하나)를 PCR 증폭하여 비교하였다.

Table 2. Oligonucleotide primers used in PCR amplification

Primer	Sequence (from 5' to 3')
GnRH1 forward reverse	GAAGAATGGCTGCAAAGTCC TCKGTGTCRRTTYCCCTGT
Kiss2 forward reverse	SCAGCGTCAACTCAACAARA TCTGGAGAGAGKCGACAYTT
GPR54 forward reverse	SCAGCGTCAACTCAACAARA TCTGGAGAGAGKCGACAYTT
GH forward reverse	SCAGCGTCAACTCAACAARA TCTGGAGAGAGKCGACAYTT
IGF-1 forward reverse	GCGATGTGCTGTATCTCCTG CTCTGTGCCCTTGTCCTT
IGF-2 forward reverse	GATGTCTTCGTCCAGTCGTG CCTCTGCCACACCTCGTATT
FSH forward reverse	TGGTWTGTCATGGCAGCAGTG AKACAGCTGGGTRTGTCTCC
LH forward reverse	TCAACCAGACMGTGTCTCTG CTCGAAGGTGCAGTCAGAYG
18s rRNA forward reverse	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCGACTTTCGTTCTTGA

(나) 홍바리의 Kiss2, GPR54, GnRH1, GH, IGF-1 / 2 cDNA 동정

본 연구에서는 홍바리의 시상하부, 뇌하수체, 간 그리고 생식소 등에서 발현되는 Kiss2, GPR54, GnRH1, GH, IGF-1 / 2, FSH & LH cDNA 단편을 다른 어종에서 보고된(zebrafish, salmon, rainbow trout, goldfish.. 등) 염기서열을 표본으로 하여 상보성이 높은 영역으로부터 Forward / Reverse primers를 디자인한 Degenerated oligonucleotide primer를 사용하여 증폭된 유전자 단편을 얻을 수 있었다.

이들 증폭된 유전자 단편들을 pGEM-T easy vector에 삽입하여 competent cell (JM109, Takara)를 이용해 cloning한 후, 얻어진 plasmid 산물을 Sequencing 분석센터((주) 제노텍)에 의뢰한 결과, Kiss2의 304 bp, GPR54의 613bp, GnRH1의 275 bp, GH의 371 bp, IGF-1 372 bp IGF-2 385 bp의 cDNA 부분염기서열을 밝힐 수가 있었다 (Fig 10, 11, 12, 15, 16, 17). 또한, 각 유전자의 nucleotide에 coding 된 아미노산은 각각 100, 203, 91, 123, 124, 128, 114 그리고 91 개로 확인되었다.

```
3   CTGCCGGAAC TTGACTCTGCACAGAGGACACGTGCAACAGGGTCCATCCTGTCTGCACTG
    L P E L D S A Q R T R A T G S I L S A L
63   AGGAGAAGGAGCACAGGAGAGTTTGTGGCGGAGGATACCAGCCCGTGTGTTGTCCTGAGA
    R R R S T G E F V A E D T S P C L S L R
123  GAGAATGAGGAGCAGCGGCAGCTGCTGTGTAATGACCGCAGGAGTAAATTCAACTTCAAC
    E N E E Q R Q L L C N D R R S K F N F N
183  CCATTTGGCCTCCGCTTTGGCAAAGATAACAACGGCTACATTTACAGGAGAGCCGTGAAA
    P F G L R F G K R Y N G Y I Y R R A V K
243  ACAGCCAGGACAAATAAGTTTTCACCCCTTTTCTCTCTTCTCGCGAGAACTGGAGGTGCCT
    T A R T N K F S P F S L F S R E L E V P
303  AC 304
```

Fig 10. Nucleotide and amino acid sequences of Kiss2 cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*.

```

3   CCTGGATGGATCTTTGGCAACTTCATGTGCAAATTTGTTGCGTTCCTACAGCAGGTGACA
   P G W I F G N F M C K F V A F L Q Q V T
63  GTCCAAGCCACCTGTATCACTCTGACAGCTATGAGTGGGGACCGCTGTTACGTCACGTGC
   V Q A T C I T L T A M S G D R C Y V T V
123 TACCCCTCTGAAATCTCTCCGCCATCGCACCCCGAGAGTAGCCATGATTGTTCAGCATCTGC
   Y F L K S L R H R T F R V A M I V S I C
183 AITTTGATTGGCTCCTTCATCCTGTCCACGCCGATTTTAATGTACCAGCSTATAGAGGAG
   I W I G S F I L S T P I L M Y Q R I E E
243 GGTATTGGTACGGCCCGAGGCACTACTGTCATGGAGAGATTTCCCTCAAAGACACATGAG
   G Y W Y G P R Q Y C M E R F P S K T H E
303 AGGGCTTTTCATCCTCTACCAAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCTCTCCTCACTATCTCA
   R A F I L Y Q F I A A Y L L P V L T I S
363 TTCTGCTACACGCTGATGGTGAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTGGAACTGTTGACAAC
   F C Y T L M V K R V G Q P T V E P V D N
423 AACTATCAGGTCAACTGCTGTCTGAGAGAACTATCAGTATCAGGAGCAAAGTCTCCAAG
   N Y Q V N L L S E R T I S I R S K V S K
483 ATGGTTGGTAAATCGTCTCCTCTTCGCCATCTGCTGGGGTCCCATTGAGATCTTCGTC
   M V V V I V L L F A I C W G P I Q I F V
543 CTCTTCAGTCTTTCTATCCAAACTACCAGCCCAACTACGCCACATACAAGATCAAGACG
   L F Q S F Y P N Y Q P N Y A T Y K I K T
603 TGGGCCAACTG 613
   W A N

```

Fig 11. Nucleotide and amino acid sequences of GPR54 cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*.

```

3   AGAATGGCTGCAAAGTCTTGGCACTGTGTCTGCTGATTGTGGGAGCAGTGTGCCACAG
   R M A A K S L A L C L L I V G A V L P Q
63  GGCCACTGTCAGCACTGGTCATATGGACTGAGCCCGGAGGGAAGAGGGATCTGGACAGC
   G H C Q H W S Y G L S P G G K R D L D S
123 CTCTCAGACACACCAGGCAATATTCCTGAAGGGTTTCCGCATGTGGACACACCCTGCAGT
   L S D T P G N I P E G F P H V D T P C S
183 GTTTTGGTTGTGTGGAGGAGTCACCTTTTGCCAAGATTTACAGAACCAAAGGATTTCTT
   V F G C V E E S P F A K I Y R T K G F L
243 GACAGTGTACCCGACAGGAAAATGGACACAGA 275
   D S V T D R E N G H R

```

Fig 12. Nucleotide and amino acid sequences of seabream I type GnRH cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*. (Accession No. HM030760)

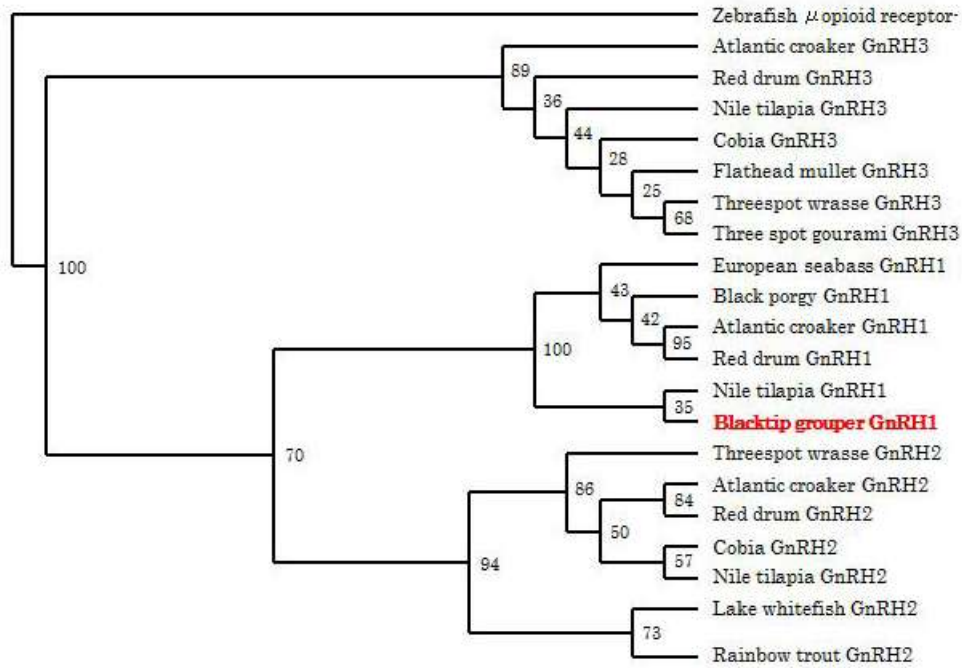


Fig 13. Phylogenetic analysis based on comparison of the seabream I type GnRH (GnRH1) of blacktip grouper, *E. fasciatus*.

홍바리 GnRH1 유전자의 아미노산 서열을 다른 어종의 GnRH isoform들과 비교해보면, Nile tilapia, European seabass 그리고 Atlantic croaker 등의 GnRH1 isoform 그룹에 속해 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이들 종과 아미노산 서열의 상동성에서도 다른 isoform 그룹들에 비해 약 65~72%로 상대적으로 높게 나타났다(Fig 13).

2	CAGCGTCAACTCAACAAGATCTTTCTGCAGGACTTCTGTAACCTCTGATTACATCATCAGC
	Q R Q L N K I F L Q D F C N S D Y I I S
62	CCCATTGACAAGCAGCAGACGCAGCGCAGCTCCGTGTTGAAGCTGTTGTGCGATCTCCTAT
	P I D K H E T Q R S S V L K L L S I S Y
122	CGGTTGGTGGAGTCCTGGGAGTTTCCAGTCGGTCCCTGTCCGGAGGTTCTGCTCCCAGA
	R L V E S W E F P S R S L S G G S A P R
182	AACCAGATTTCTCCCAAAGTCTGAATTGAAAAGTGGGATCCTGCTGCTGATCAGGGCC
	N Q I S P K L S E L K T G I L L L I R A
242	AATCAGGACGGAGCGGAGCTCTCCCTGACAGCTCCGCTCTCCAGTTGGCTCCTTATGGA
	N Q D G A E L F P D S S A L Q L A P Y G
302	AACTATTATCAGAGTCTGGGCGCCGACGAGTCGCTGCGACGAACATATGAATCAC'TAGTG
	N Y Y Q S L G A D E S L R R T Y E S L V
362	AATTCGCGGC 371
	N S R

Fig 14. Nucleotide and amino acid sequences of GH cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*. (Accession No. HM030764)



```

Blacktip grouper      QRQLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLIVESWEFPRSLSGGGSAPR 60
Largemouth bass     QRQLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLIESWEFPRSLSGGGSAPR 60
Nile tilapia        QRQLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLIVESWEFPRSLSGGGSAPR 60
Three spot gourami  QRQLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLIESWEFPRSLSYGGSAQR 60
                    *****:***** *:*:***** *:*:***** *:*:***** *:*:***** *
Blacktip grouper     NQISPKLSE LKTGILLIRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADES LRRTYESLV 120
Largemouth bass     NQISPKLSE LKTGILLIRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGSDES LRRTYELLA 120
Nile tilapia        NQISPKLSE LKTGILLIRANQDEAENYFDTDLQHAPYGNYYQSLGGSDES LRRTYELLA 120
Three spot gourami  YQISPKLSE LMRGIQLLIKANQDGAEMFSDGVVPLAPYGNYYQSLGEDES LRRSYELLA 120
                    *****:***** *:*:***** *:*:***** *:*:***** *:*:***** *
Blacktip grouper     NSR 123
Largemouth bass     CFK 123
Nile tilapia        CFK 123
Three spot gourami  CFK 123
                    :

```

Fig 15. Alignments of amino acid sequences of the GH between blacktip grouper and other fishes.

홍바리 GH 유전자의 아미노산 서열을 largemouth bass, Nile tilapia 그리고 threespot gourami 등의 GH isoform 등 다른 어종과 아미노산 서열의 상동성을 비교해 보면, 약 82~93%로 상대적으로 높게 나타났다(Fig. 15).

```

1  GCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGTGCGTCCCTCACCCCTG
   A M C C I S C S H T L S L L L C V L T L
61  ACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCCTGTGCGGGGCGGAGCTGGTCGACACG
   T P T A T G A G P E T L C G A E L V D T
121 CTGCAGITTTGTGTGTGGAGAGAGAGGCITTTAITTCAGTAAACCAAGGCTATGGCCCC
   L Q F V C G E R G F Y F S K P T G Y G P
181 AATGCACGGCGGTACGTTGTCATTTGGACGAATGCTGCTTCCAAAGCTGTGAGTGCGG
   N A R R S R G I V D E C C F Q S C E L R
241 CGCCTGGAGATGTACTGTGCACCTGCCAAGACTAGCAAGGCTGCTGCTCTGTGCGTGCA
   R L E M Y C A P A K T S K A A R S V R A
301 CAGCGCCACACAGACATGCTGAGAGCACCCCAAGGTTAGTACCAGGCAAGCAAGTGAGC
   Q R H T D M L R A P K V S T A R H K V D
361 AAGGGCACAGAG 372
   K G T E

```

Fig 16. Nucleotide and amino acid sequences of IGF-1 cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*.

```

2  ATGCTCTCGTCCAGTGTGCGCTGCTGTTTGCACCTGGCCCTAACGCTCTACGTTGTGGAA
   M S S S S R A L L F A L A L T L Y V V E
62  ATAGCGTCGGCAGAGACGCTGTGTGGGGAGAGCTGGTGGATGCGCTGACGTTGCTCTGT
   I A S A E T L C G G E L V D A L Q F V C
122 GAAGACAGAGGCTTCTAITTCAGTAGCCCAACAGCAGGGGTAGCAACCGCGCAACCCAG
   E D R G F Y F S R P T S R G S N R R N Q
182 AACCGTGGGATCGTAGAGGAGTGTGTTTCCGTAAGCTGTGACCTCAACCTGCTGGAGCAG
   N R G I V E E C C F R S C D L N L L E Q
242 TACTGTGCCAACC CGCAAGTCCGAAAGGACGCGTGGCCACCTCCTGCGAGGTCATA
   Y C A K P A K S E R D A S A T S L Q V I
302 CCCGTGATGCCCGCTAAACCGGAAGTCCGAGGAGCCGCAATGTGACCGTGAAGTAT
   P V M P A L K P E V P R K P H V T V K Y
362 TCCAAATACGAGGTGTGGCAGAGG 385
   S K Y E V W Q R

```

Fig 17. Nucleotide and amino acid sequences of IGF-2 cDNA partial in blacktip grouper, *E. fasciatus*.

(다) 기관별 홍바리의 성장 관련 유전자의 발현여부

각 기관 조직별로 홍바리의 GH, IGF-1 그리고 IGF-2가 존재하고 있는지를 조사하기 위해 중추신경인 뇌조직을 후엽, 시엽, 소뇌, 시상하부, 뇌하수체 등으로 세분화하였으며(Fig. 18), 중추신경을 제외한 주변조직은 간, 신장, 장, 생식소 등으로 구분하였다. 이들 조직들로부터 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였고, RT-PCR법을 이용해 mRNA 발현 실험을 실시하였다. 각각의 유전자에 사용되는 forward primer와 reverse primer가 detection되는 위치에 따라, 증폭되는 PCR 산물 크기가 약 274~384 bp로 조금씩 다르게 나타났으며, internal control로써는 18s rRNA (증폭크기 약 600 bp)를 사용하였다. 증폭된 모든 DNA는 1% agarose gel과 0.5×TBE buffer를 이용한 전기영동을 통해 확인하였다.

그 결과, 신경내분비와 성장과 관련성 부각되는 GH mRNA에서는 시상하부에서만 집중적으로 발현하였고, IGF-1 mRNA는 시상하부를 중심으로 뇌의 각 조직에 골고루 발현되었고 특히, 주변조직에서는 간과 생식소에서 강한 발현을 나타내었다. IGF-2 mRNA의 강한 발현은 뇌의 소뇌를 중심으로한 중추신경조직에서 나타났으며, 주변조직에 다소 약하지만 발현이 확인되었다(Fig. 18).

홍바리의 초기 성발달(vitellogenin 합성)과 성성숙과 관련이 있는 FSH와 LH mRNA의 발현에 대하여 살펴보면, 두 유전자 모두 뇌하수체에서 가장 강하게 발현되고, 다음으로 시상하부에서, 그리고 그외 신장과 같은 주변조직에서 다소 약하게 나타났다(Fig. 19).

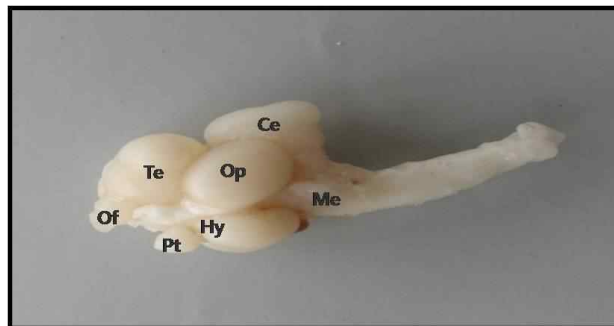


Fig. 18. Separate brain area of blacktip grouper, *E. fasciatus* that used in the tissue specific expression by RT-PCR. Of, olfactory bulbs; Te, telecephalon; Op, optic tectum; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongat-spinal cord; Hy, hypothalamus; Pt, pituitary.

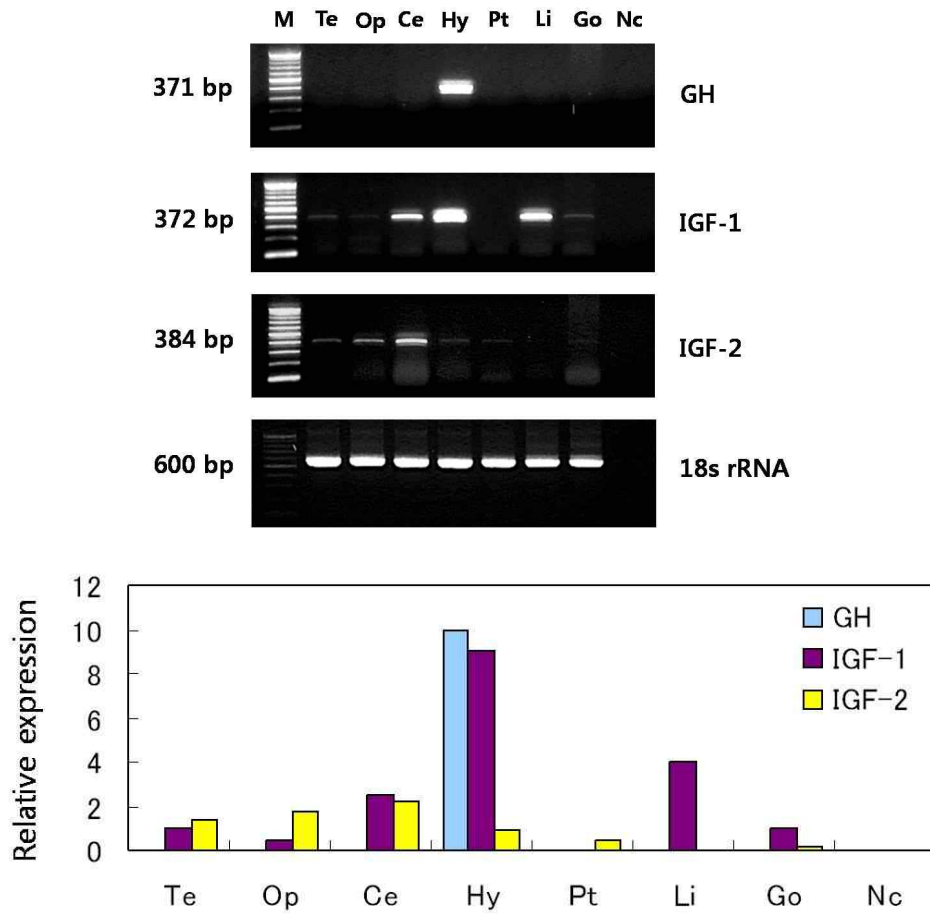


Fig 19. Tissue specific expression of blacktip grouper, *E. fasciatus* GH, IGF-1 and IGF-2 in nerves and peripheral tissue by RT-PCR. Of, olfactory bulbs; Te, telecephalon; Op, optic tectum; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongat-spinal cord; Hy, hypothalamus; Pt, pituitary.

## 제 2절 홍바리 성숙속 제어 기술 개발 연구

### 1. 홍바리 성숙속 유도

#### 가. 환경조절을 통한 성숙속 유도

사육환경 조절을 통한 성숙속을 유도하기 위해 제주대학교 해양과환경연구소 실험수조에 서 순치·사육관리하고 있는 홍바리 어미를 대상으로 12시간 명기 12시간 암기 (12L:12D) 의 광주조건을 지속적으로 유지한 대조구와 13L:11D에서 14L:10D의 광주조건으로 변화시킨 실험구로 나누었고 수온은 22℃를 유지하였다. 이후 수온에 의한 영향을 조사하기 위해 대조구 와 처리구의 수온을 실험 시작 9주후부터 22℃에서 25℃로 상승 시킨 후 유지시켜 주었다 (Fig. 20).

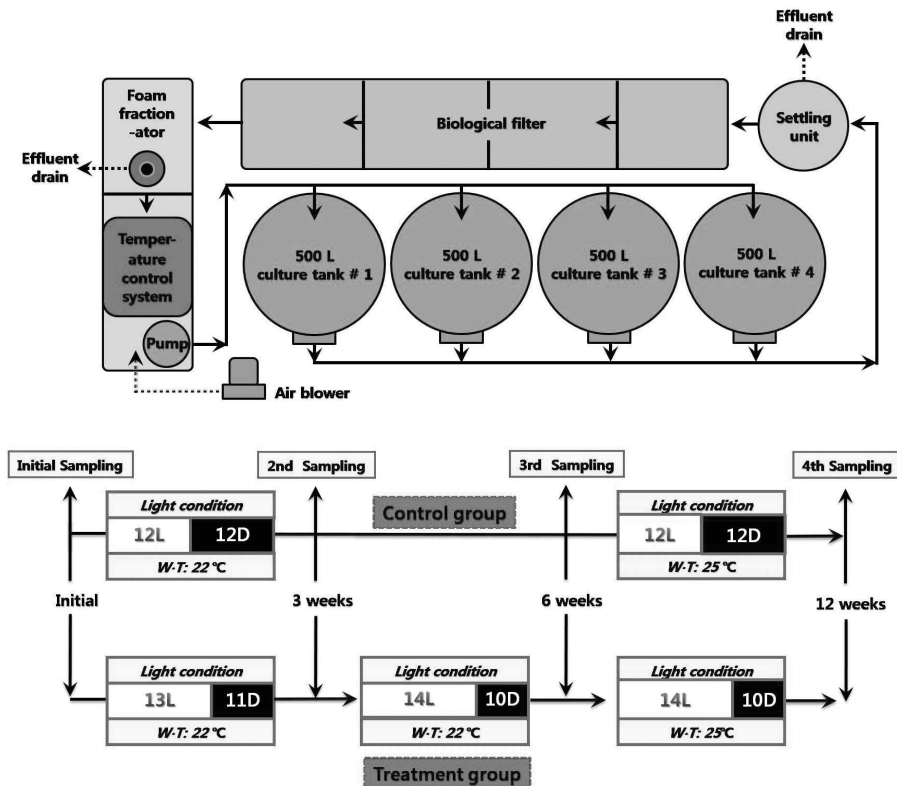


Fig. 20. Recirculating rearing system of schematic diagram and environmental control (photoperiod and water temperature) scheme to sex maturation of blacktip group, *E. fasciatus*.

사육환경 조절에 따른 실험어의 생식소 발달과 성숙 유도 효과를 조사하기 위해 생식소중량지수(GSI, gonadosomatic index)의 변화와 생식소 발달 양상을 조직학적 방법으로 조사하였다. 생식소중량지수는 다음과 같은 방법으로 구하였다.

$$\text{생식소중량지수} = (\text{생식소중량}/\text{어체중량}) \times 100$$

생식소의 성숙상태를 조직학적으로 관찰하기 위하여 생식소를 어체에서 적출한 후, Bouin's solution에 24시간 고정 하였고, 이후 70 % EtOH로 치환시켜 주었다. 고정된 생식소는 단계별 탈수 과정을 거친 후 파라핀으로 포매하였으며, 절편법에 의해 5~6  $\mu\text{m}$ 의 두께로 조직표본을 만들었다. 조직표본은 Hansen's haematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색을 실시하여 광학현미경하에서 검경하였고, 생식소내 난경의 변화는 난소의 절편을 촬영한 후, Motic Image plus 2.0으로 난모세포의 크기를 측정하여 조사하였다.

모든 광주기 조건의 실험어들은 22°C의 수온에서 생식소중량지수가  $0.5 \pm 2.5$ 로 매우 낮게 나타났으며 어린 주변인기 난모세포(난경  $60.9 \pm 3.4 \mu\text{m}$ )가 대부분을 차지하였다. 하지만 수온을 25°C로 상승시킨 후 14L:10D의 실험구의 어류들에서 생식소중량지수가 4.5로 증가하였으며, 난소내 난모세포 분포는 난황주기 난모세포(난경 400  $\mu\text{m}$  이상)가 대부분을 차지하였다. 12L:12D의 광조건인 대조구에서는 25°C로 수온상승 후에도 생식소의 발달이 이루어지지 않았다(Fig. 21, 22).

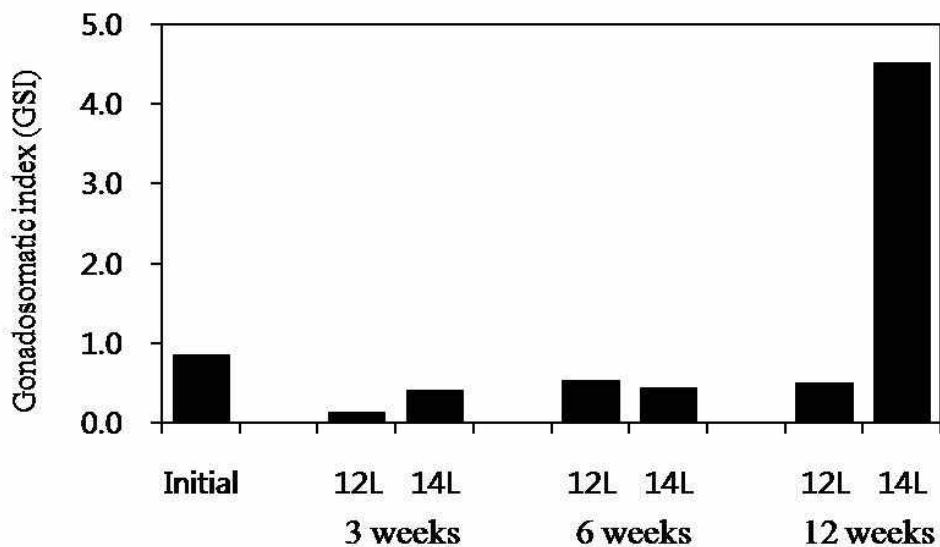


Fig. 21. Gonadosomatic index (GSI) change of female blacktip grouper, *E. fasciatus* in control and treatment group during experimental period.

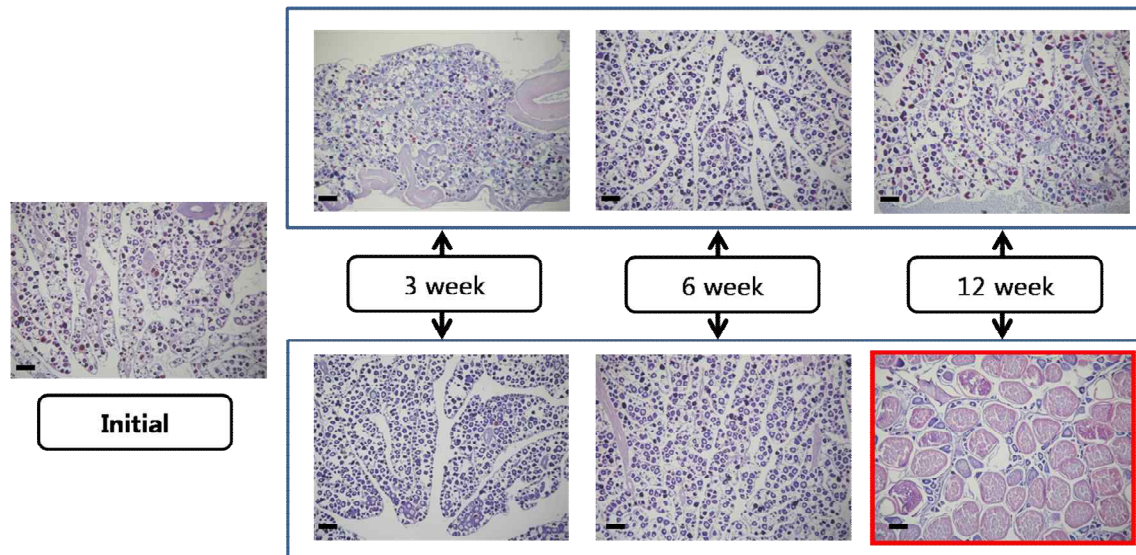


Fig. 22. Ovarian development of female blacktip grouper, *E. fasciatus* during experimental period (Scale bar=400  $\mu\text{m}$ ).

#### 나. 성숙 유도를 위한 적정 호르몬 종류와 농도의 *in vitro* 효과 조사

홍바리의 인위적 성숙유도를 위한 적정 호르몬 종류와 농도를 알아보기 위하여 난황형성이 완료되었다고 생각되는 개체를 선별하여 200–300 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 실리콘 재질의 튜브로 cannulation하였다. 난모세포들은(평균 난경  $0.41 \pm 0.16$  mm와  $0.50 \pm 0.13$  mm) 즉시 balanced salt solution (BSS; 132.96 mM NaCl, 3.09 mM KCl, 0.28 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.98 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3.40 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3.65 mM HEPES)에 옮겨진 후 실험실로 운반되었다. 운반된 난모세포는 무균상태에서 BSS으로 세척하여 가는 핀셋으로 각각의 난모세포로 분리한 후 24 well plates에 well당 Leibovitz's L-15 (L-15) 배양액 (Gibco) 1 ml에 20–30 개의 난모세포를 분주하였다. 배양직전 성숙유도 호르몬으로 알려진  $17\alpha 20\beta\text{P}$ ,  $17\alpha 20\alpha\text{P}$ ,  $17\alpha 20\beta 21\text{P}$  그리고 human chorionic gonadotropin (HCG)를 각각 5, 50, 500 ng/ml (HCG : IU/ml)의 농도로 첨가한 뒤 18°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 난모세포들은 clearing solution (Ethanol:formalin:acetic acid=6:3:1)으로 세포질을 투명화시켜 현미경하에서 핵의 유무를 관찰하였다. 각 well당 배양된 난모세포수에 대한 GVBD(germinal vesicle breakdown)가 일어난 난모세포의 비율을 계산하여 GVBD 유도 효과를 조사하였다(Fig. 23). 실험의 전 과정은 무균상태에서 진행되었으며, BSS와 L-15 배양액의 pH는 7.85, 삼투농도는 370 mOsm/kg로 조절하였다.



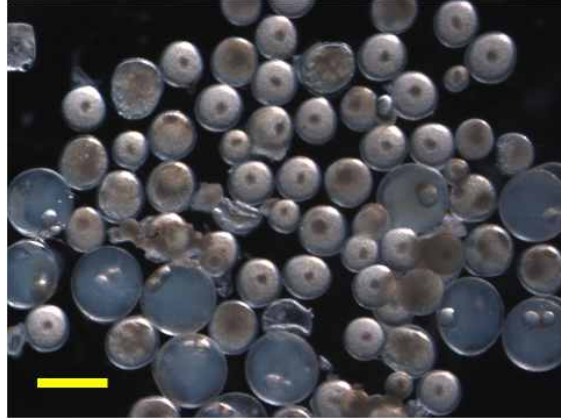


Fig 23. Various size of oocytes in ovary from blacktip grouper, *E. fasciatus* (scale bar=1 mm).

홍바리 난소내 평균난경  $0.41 \pm 0.16$  mm와  $0.50 \pm 0.13$  mm을 대상으로 성숙유도 호르몬으로 알려진  $17\alpha 20\beta P$ ,  $17\alpha 20\beta 21P$ ,  $17\alpha 20\alpha P$  그리고 HCG를 농도별(5, 50, 그리고 500)로 처리한 후 GVBD 유도 효과를 조사한 결과는 Fig. 24, 25과 같다. 평균 난경  $0.41 \pm 0.16$  mm의 경우,  $17\alpha 20\beta P$ 를 50 ng/ml과 500 ng/ml로 처리한 실험구에서 대조구에 비해 GVBD가 유의하게 증가하였다. 즉, 각각  $50.13 \pm 2.52\%$ ,  $51.77 \pm 5.91\%$ 로 나타났으며 HCG 500 IU로 처리한 실험구 역시  $49.59 \pm 5.15\%$ 로 대조구 ( $36.81 \pm 2.89\%$ )에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 24,  $P < 0.05$ ).  $17\alpha 20\beta 21P$ 와  $17\alpha 20\alpha P$ 의 모든 처리구에서는 뚜렷한 GVBD 유도효과를 보이지 않았다. 평균 난경  $0.50 \pm 0.13$  mm인 난모세포에서는 HCG 50 IU 처리구에서만 GVBD가  $55.30 \pm 1.20\%$  로 대조구 ( $32.41 \pm 3.13\%$ )에 비해 유의하게 증가하였다 (Fig. 25,  $P < 0.05$ ). 위의 결과로 보아 홍바리의 성숙유도에는  $17\alpha 20\beta P$  50과 500 ng/ml, 그리고 HCG 500 IU/ml이 효과적인 것으로 보이며, 평균 난경  $0.41 \pm 0.16$  mm이  $0.50 \pm 0.13$  mm보다 성숙유도 호르몬에 민감하게 반응하는 것으로 생각된다.

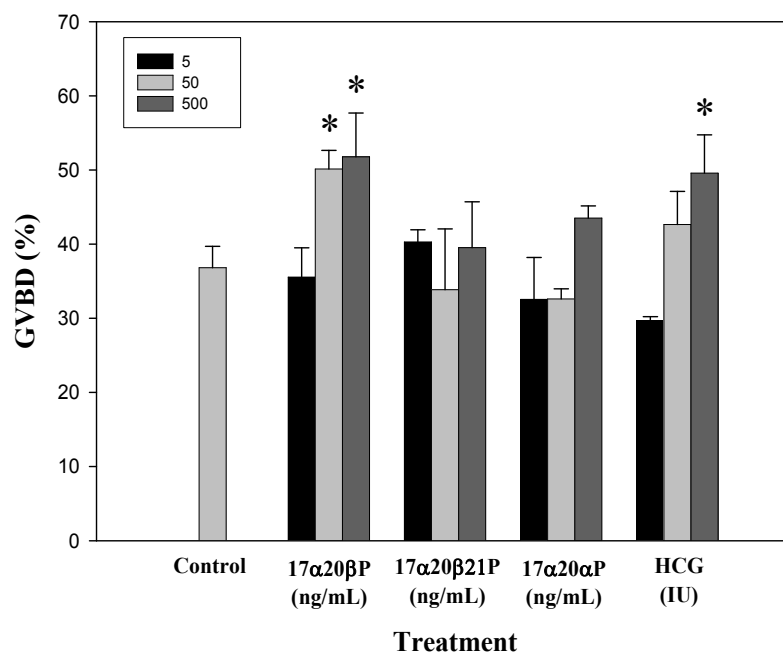


Fig 24. In vitro oocyte ( $0.41 \pm 0.16$  mm) maturation stimulated by various doses of HCG,  $17\alpha20\beta$ P,  $17\alpha20\alpha$ P and  $17\alpha20\beta21$ P.

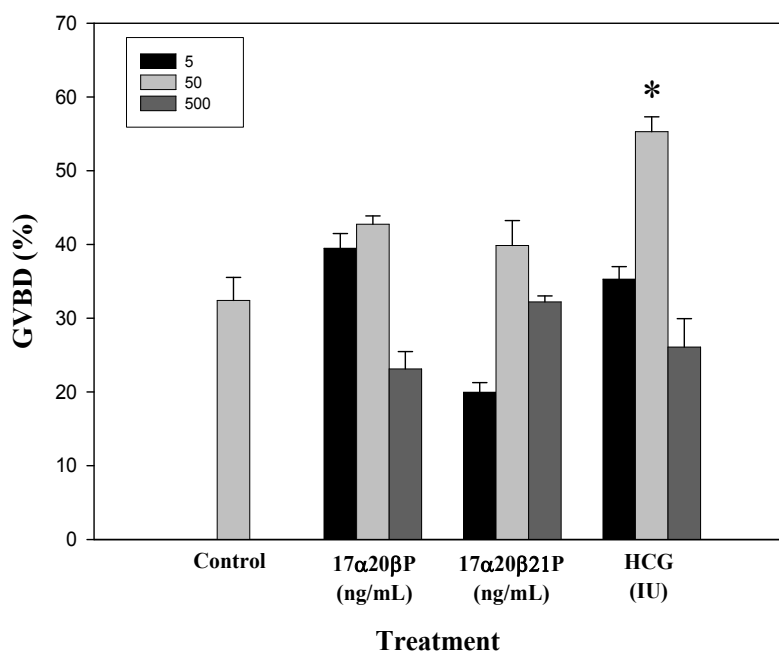


Fig 25. In vitro oocyte ( $0.50 \pm 0.13$  mm) maturation stimulated by various doses of HCG,  $17\alpha20\beta$ P,  $17\alpha20\alpha$ P and  $17\alpha20\beta21$ P.



## 2. 성성숙 제어 사육시스템

최적의 홍바리 어미관리를 통한 안정적인 수정란 생산을 위해 제주도 지하해수의 안정적인 열원(연중수온 16~18℃)을 이용 보일러 시스템을 구축한 순환여과사육시스템에서 홍바리 어미관리 및 성 성숙 유도를 실시하였다. 사육환경 조절은 제주대학교 해양과환경연구소 실험수조에서 사육 관리한 실험결과를 토대로 대조구 (자연광주기+자연수온)와 처리구 I (14L 광주기+자연수온), 처리구 II (14L광주기+25℃수온유지)로 나누었다. 각 실험구별로 12마리씩 수용하였고, 실험기간은 2011년 12월 20일부터 2012년 3월 20까지 12주간 이었다. 사육수조 내 용존산소는 6.0~7.0 mg/L, pH는 8.1~8.3으로 사육에 적절한 범위였다. 환경조절에 따른 실험어의 성성숙 유도와 혈중 스테로이드호르몬의 변화, 생식생리활성인자의 발현을 비교 분석하기 위해 실험종료시 각 실험구별로 무작위로 3마리씩 채집하였다. 성성숙 유도 조사는 생식소중량지수(GSI, gonadosomatic index)의 변화와 생식소를 적출하여 조직학적 방법으로 생식소 발달 양상을 조사하였다. 혈중 스테로이드 호르몬은 방사면역측정법으로 testosterone(T), 17β-estradiol(E2), 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one(17,20β-P)의 변화를 조사하였다. 생리활성인자의 발현 분석은 실험어의 뇌하수체에서 total RNA를 분리하여 real-time PCR로 FSH, LH mRNA의 발현양상을 조사하였다.

### 가. 성 성숙 유도

실험 시작 시 실험어의 생식소중량지수(GSI)는  $0.40 \pm 0.23$ 이었고, 생식소는 난소소엽내 약 30~80 μm 크기의 주변인기 난모세포만 관찰되는 미성숙 단계였다. 처리 12주 후 대조구와 처리구 I의 GSI는 각각  $0.30 \pm 0.22$ ,  $0.50 \pm 0.15$ 이었고, 생식소는 주변인기 난모세포와 유구기 난모세포들이 관찰되었다. 그러나 처리구 II의 GSI는  $3.40 \pm 1.74$ 로 대조구와 처리구 I보다 높은 값을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 또한 처리구 II의 실험어 생식소는 30~40 μm의 어린난모세포들과 150~180 μm의 유구기 난모세포들 그리고 320~400 μm 크기의 성숙 난모세포들이 난소 소엽내에 혼재되어 발달하고 있었다(Fig. 26, 27).

### 나. 혈중 스테로이드호르몬 변화

혈중 스테로이드 호르몬(T, E2, 17α20β-P)의 변화를 확인하기 위하여 미부 동맥에서 혈액을 채혈한 후 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리하였으며, 분석 전 까지 -20℃에서 냉동 보관하였다. 스테로이드 호르몬 추출을 위하여 각 호르몬(T, E2, 17α20β-P)당 혈장 250 μL를 채취한 다음 2 mL의 diethyl ether를 첨가하여 혼합한 후 5~10분간 정체시킨 후 -70℃의 냉동고에서 15분간 결빙 시켜 상층의 유기 용매층(free steroids)만을 시험관에 옮겼다. 완전 건조된 스테로이드 추출물은 1 mL의 0.1% gel-PBS (pH 7.5)에 다시 용해하였다.

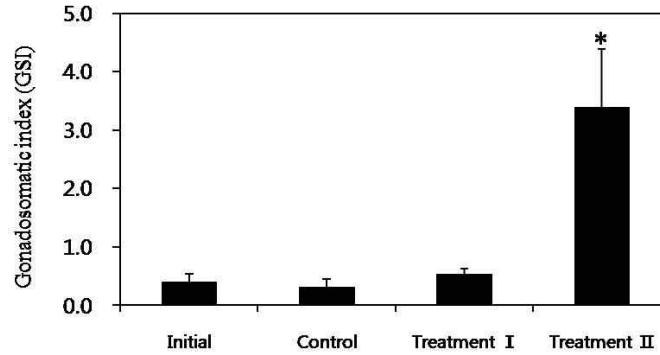


Fig. 26. Gonadosomatic index (GSI) change of female blacktip grouper, *E. fasciatus* in control and treatment group during experimental period. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control and treatment group ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

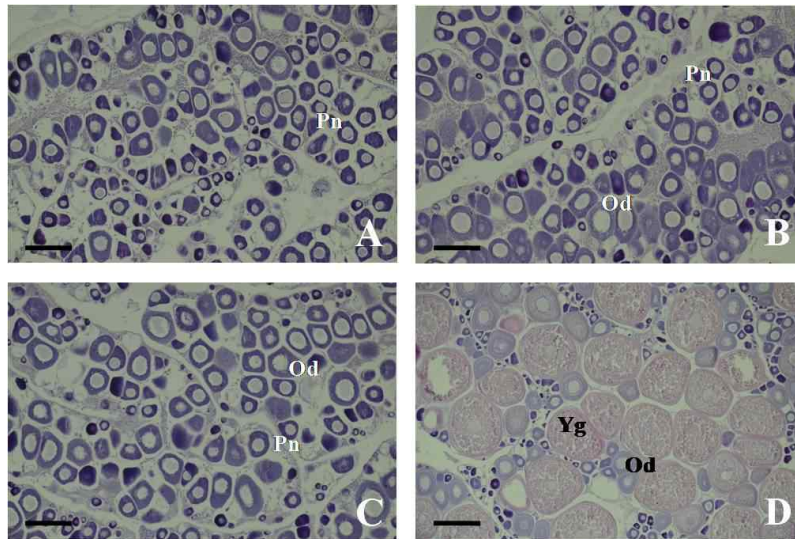


Fig. 27. Photomicrographs of ovarian development in female blacktip grouper, *E. fasciatus*. A, initial group; B, control group; C, treatment I group; D, treatment II group. Od, oil-droplet stage; Pn, peri-nucleolus stage; Yg, yolk globule stage. Scale bar=200  $\mu$ m (A to C) and 400  $\mu$ m (D).

혈중 스테로이드 호르몬(T, E<sub>2</sub>, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -P)의 농도 측정은 Kobayashi et al. (2006)의 방법에 따랐다. 실험에 사용된 항체는 모두 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 얻었다. Standard 호르몬들은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA)와 Sigma Chemical (St. Louis, USA)로부터 구입하였고, 방사표지된 [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-cortisol와 [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였다.

T, E<sub>2</sub> 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -P RIA계에 있어서 최소 검출량은 각각 10 pg/mL, 12.5 pg/mL, 10 pg/mL 이었고, assay 내 (intra-assay)와 assay 간 (inter-assay) 변동계수를

50% 상대결합율에서 조사한 결과, T RIA계에서는 2.3 (n=3)와 12.6%(n=6), E2 RIA계에서는 3.4 (n=3)와 11.5%(n=6),  $17\alpha 20\beta$ -P RIA계에서는 3.2(n=4)와 9.5%(n=8)였다.

실험 시작시 T의 농도는 1.12 ng/ml였고, 실험 종료 시 T의 농도는 control의 경우  $3.44\pm 2.43$  ng/ml, 처리구 I 경우  $5.40\pm 1.31$  ng/ml, 처리구 II의 경우  $2.47\pm 1.07$  ng/ml로 유의한 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ). E2의 농도는 실험 시작시  $1.51\pm 0.25$  ng/ml였고, 12주 후 혈중 E2의 농도는 대조구( $1.06\pm 0.38$  ng/ml), 처리구 I ( $2.04\pm 0.85$  pg/ml), 처리구 II ( $2.34\pm 0.34$  ng/ml) 모두 처리구간에 유의차가 없었다( $p>0.05$ ).  $17\alpha 20\beta$ -P는 실험 시작시 검출되지 않았다. 그러나 12주 후  $17\alpha 20\beta$ -P의 농도는 처리구 II ( $2.65\pm 0.02$  ng/ml)가 대조구( $0.86$  ng/ml)와 처리구 I ( $0.72\pm 0.12$  ng/ml)보다 높은 값을 나타냈다 ( $P<0.05$ ) (Fig. 28).

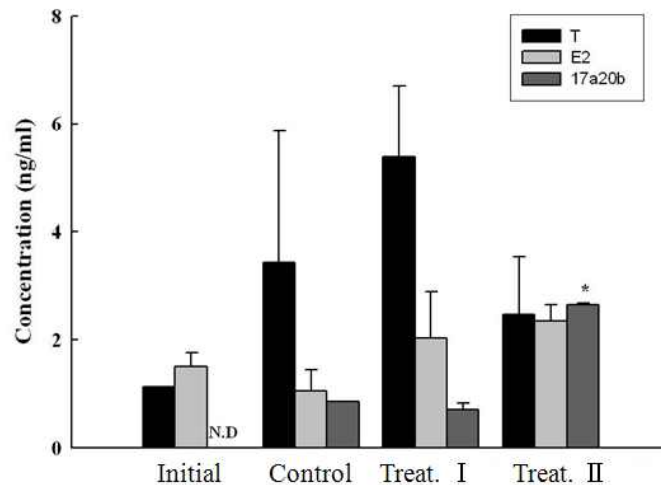


Fig. 28. Changes in plasma levels of testosterone (T),  $17\beta$ -estradiol (E2) and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17,20\beta$ -P) in blacktip grouper, *E. fasciatus* under different treatment conditions. N.D., not detect. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control and treatment groups ( $P<0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

#### 다. 생식생리활성인자의 발현량 비교

##### (1) FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ subunit의 mRNA 발현량 비교

환경조절에 따른 실험구들간의 생식생리인자의 활성을 조사하기 위해 실험어의 뇌하수체를 적출한후 300  $\mu$ l의 TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 사용하여 농도를 측정하였으며, A260/A280 nm의 비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 샘플만을

선택하여 실험에 이용하였다. cDNA 제조는 각 조직의 total RNA 0.5  $\mu\text{g}$ 을 주형으로 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit (Takara, Japan)을 이용하여 역전사시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT Primer 1  $\mu\text{L}$ , PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme mix 1  $\mu\text{L}$  그리고 5 $\times$ PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20  $\mu\text{L}$ 이 되도록 조절하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5초간 가열하여 합성을 중단하였다.

실험구별 생식생리인자의 활성은 생식소자극호르몬 유전자 (FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit)의 mRNA 발현량을 Quantitative Realtime RT-PCR 방법으로 조사하였다. 실험에 사용된 primer는 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  각각의 염기서열을 참고로 하여 특이적 primer를 제작하였으며 (Table 3), quantitative Real-time RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq II kit (Takara)를 사용하였다. cDNA 3  $\mu\text{L}$ 를 template로 하여 SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu\text{L}$ , primer set 1.0  $\mu\text{L}$ , nuclease-free water 8.5  $\mu\text{L}$ 를 각각 첨가하여 총 25  $\mu\text{L}$ 의 volume으로 반응하였다. Quantitative Real-time RT-PCR은 CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하였으며, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 initial denaturation, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5초간 denaturation, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing과 elongation 하였으며 40 cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 3반복으로 수행되었으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량 하였다.

Table 3. Primer sets used of quantitative Real-time RT-PCR of FSH $\beta$ , LH $\beta$  and 18s rRNA in blacktip grouper, *E. fasciatus*

Primers	Sequence (5'-3')	Note
FSH $\beta$ F	TGGT(A/T)GTCATGGCAGCAGTG	forward primer
FSH $\beta$ R	A(G/T)ACAGCTGGGT(A/G)TGTCTCC	reverse primer
LH $\beta$ F	TCAACCAGAC(A/C)GTGTCTCTG	forward primer
LH $\beta$ R	CTCGAAGGTGCAGTCAGA(C/T)G	reverse primer
18s rRNA F	AAACGGCTACCACATCCAAG	forward primer
18s rRNA R	GGCCTCGAAAGAGTCCTGTA	reverse primer

FSH $\beta$  mRNA 발현량은 실험시작과 실험 종료 후 모든 처리구간에 유의한 차이는 없었다( $P>0.05$ ). 그러나 LH $\beta$  mRNA 발현량은 처리구 II가 대조구와 처리구 I에 비해 유의적인 높은 경향을 보였다( $P<0.05$ ) (Fig. 29).

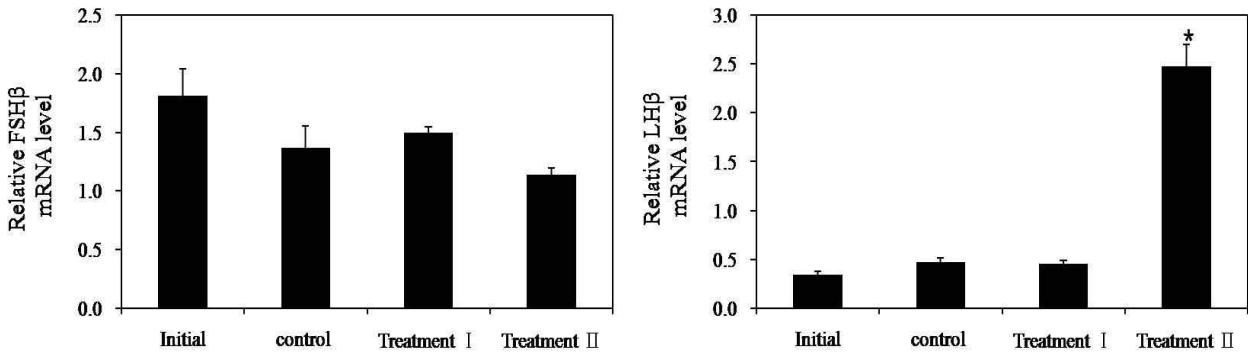


Fig. 29. FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA levels in the pituitary of female blacktip grouper, *E. fasciatus* under different treatment conditions. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control and treatment groups ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

(2) 성숙단계에 따른 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA 발현

뇌-뇌하수체-생식소의 축에 의한 번식내분비의 조절은 지난 10년간 어류를 포함한 여러 척추동물의 번식생물학연구에 가장 핵심이 되는 내용이었으나 최근 KiSS1과 그의 수용체인 G protein-coupled receptor 54 (GPR54)의 발견으로 새로운 번식내분비계의 축이 구성되어지고 있다. Kisspeptin에 의한 번식생리조절 연구는 대부분 포유류를 중심으로 이루어졌으며, 어류에서는 성숙단계에 따른 Kisspeptin과 다른 번식내분비 호르몬들과의 관계 연구가 미미한 실정이다. 이 연구는 홍바리의 성숙 상태에 따른 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54의 발현 양상을 Quantitative Realtime RT-PCR 방법으로 조사하였다.

성숙단계에 따른 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 발현을 quantitative Real-time RT-PCR을 이용하여 확인하였다. KiSS1 mRNA의 발현은, 성숙 상태에서가 미성숙 상태에 비해 유의적 차이를 보이며 높았으며 KiSS2 mRNA 역시 성숙 상태에서가 미성숙 상태에 비해 유의적 차이를 보이며 높았다( $P < 0.05$ ). GPR54 mRNA의 경우 KiSS1, KiSS2 mRNA와 반대로 미성숙 상태에서가 성숙 상태에 비해 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ) (Fig. 30).

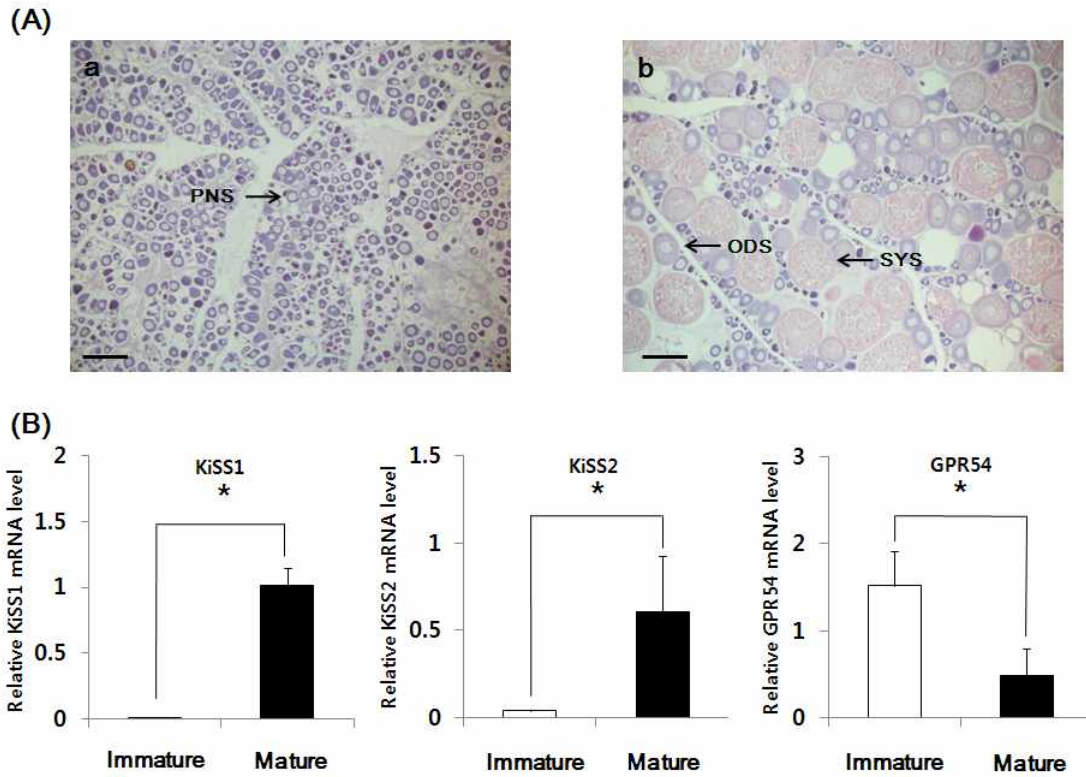


Fig. 30. The representative (A) micrographs of ovarian stages and the (B) relative expression level of KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA in brain between the immature and mature female blacktip groupers, *E. fasciatus*. (a) Immature stage; (b) mature stage. PNS, peri-nucleolus stage; ODS, oil-droplet stage; SYS, secondary yolk stage. Scale bars correspond to 400  $\mu\text{m}$ . Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. Asterisks indicated significant differences at  $P < 0.05$ .

## 제 3절 홍바리 고품질 수정란 생산을 위한 난질 평가

### 1. 홍바리 난과 정자의 미세구조적 연구

홍바리의 고품질 수정란 생산 및 난질 평가를 위한 기초 자료로서 인위적인 환경조절에 의한 어류의 성 성숙 시기의 난모세포 발달 양상 및 정장의 형태를 주사형전자현미경(SEM)과 투과형전자현미경(TEM)을 이용하여 조사하였다.

#### 가. 난의 미세구조

난자는 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 사육중인 홍바리 어미(전장: 26-37cm, 체중: 298-778 g)로부터 복부압박 방법으로 암컷에서는 배란된 성숙란을 적출하였고, 수컷에서는 정액을 채취하였다. 수정란을 얻기 위한 수정은 200 ml 비이커에 배란된 성숙란을 넣고 수컷의 정액과 혼합하여 습식법으로 인공수정 하였고, 이후 수정란은 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 여과해수에 수용하여 배반형성이 시작되는 수정란을 선별하였다. 선별된 수정란은 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간 전고정한 후 0.1M sorensen's phosphate buffer 용액(pH 7.4)에 3회 수세 및 2% osmium tetroxide 용액에 2시간 후고정하여 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 시료는 ethanol 농도 상승순으로 탈수하고 isoamyl acetate로 치환한 후 critical point dryer로 건조시켜 platinum으로 도금하여 장방출 주사형 전자현미경(JSM-6700F, JEOL)으로 인공수정 전·후 난문의 미세구조를 관찰하였다.

홍바리 미수정란의 난문은 동물극에 1개가 존재하였다(Fig. 31A). 난문(직경  $6.6 \pm 0.41 \mu\text{m}$ )은 원통형의 분화구형태(Fig. 31B)로 vestibule과 canal로 구성되었고, vestibular ridge의 구조는 시계방향으로 6-7개의 나선형 고리구조로 관찰되었다(Fig. 31C). 난문은 vestibule와 canal로 구분되며, 이들의 미세구조적 형태에 따라 난문은 Type I, Type II, Type III 그리고 Type IV 등 4가지 유형(Riehl & Kock, 1989)과 원통형과 원추형 그리고 깔때기형 등의 3가지 유형으로 구분된다(Mikodina, 1987). 홍바리 난문의 형태는 주사형 전자현미경 관찰 결과 vestibule과 canal의 형태학적인 특징에 따라 Type I의 원통형으로 구분되었다. 홍바리 난문의 vestibule 구조는 시계방향으로 6-7개의 나선형 고리구조가 관찰되어 바리과 어종간에 상이하였다. 홍바리 미수정란의 난문 주변부에는 크기가 다른  $0.15-0.55 \mu\text{m}$ 의 pore들이 동심원상으로 혼재되어 개구된 형태로 관찰되었고, pore들은 230-270개가 존재하였다(Fig. 31B). Pore 내부에는 어류 아가미의 filament와 유사한 돌기가 방사상으로 분포하였고(Fig. 31D), 전 난막 표면에 존재하는 pore의 가장자리와 주변부에는 고리형과 불규칙한 돌기형 nodule이 관찰되었다(Fig. 31E). 수정 후 난문의 vestibular ridge가 활성화 되어 뚜렷한 형태를 보였고(Fig. 32A), 부풀어 용기가 되면서(Fig. 32B), 돔(dome)형의 수정구

(fertilization cone)로 분화 형성되었다(Fig. 32C). 난문 주변부와 난막 표면에 존재하는 pore들이 닫히는 현상을 관찰할 수 있었으나 nodule들은 관찰할 수 없었다(Fig. 32D). 홍바리 미수정란의 난막표면 nodule의 형태는 종특이성을 갖으며, 난문 주변부 동심원상으로 혼재하는 크기(0.15-0.55  $\mu\text{m}$ )가 다양한 pore의 개수는 자바리 200-250개, 능성어 280-320개, 붉바리 180-220개이나 홍바리 경우 230-270개로 종간에 차이가 있었다. Pore의 기능은 수정과 난발생 과정에 해수와 난이 접촉면을 넓혀 영양염류 유입과 기체교환 그리고 삼투조절의 기능을 수행하는 것으로 추정되나 이에 대한 생리학적 및 미세구조적인 연구가 필요하다고 생각된다.



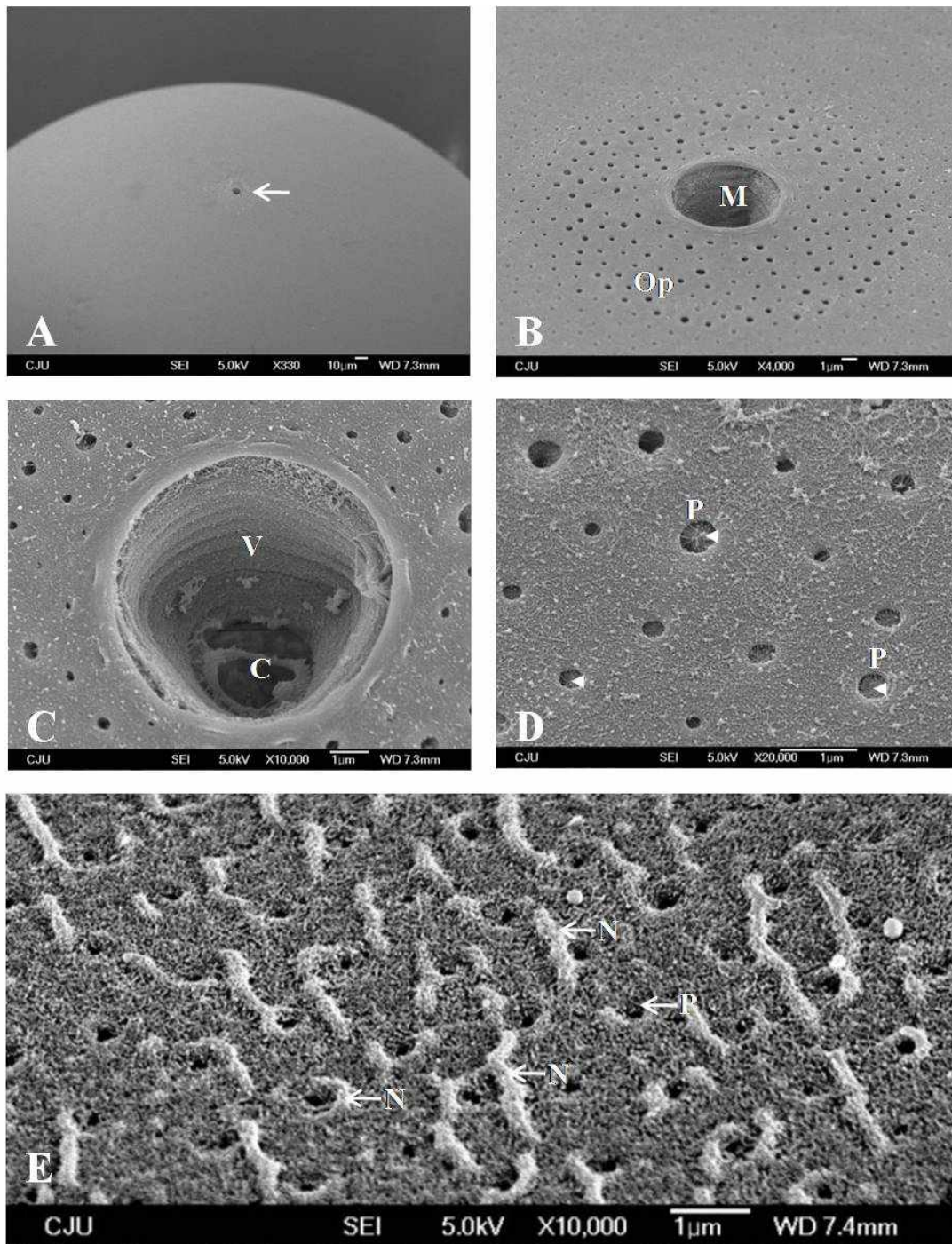


Fig 31. A scanning electron micrograph of the unfertilized egg. A, micropyle (arrow) in the animal pole; B, the opening pores (Op) distributing only around the unfertilized egg micropyle (M); C, the micropyles consisted of vestibule (V) and canal (C). The vestibule presented a clockwise 6–7 spiral arrangement; D, the various pores (P) in the unfertilized egg. Note gill filament–shape projection structure (arrowheads); E the chorionic surface showing pores (P) and nodules (N) in the unfertilized egg.

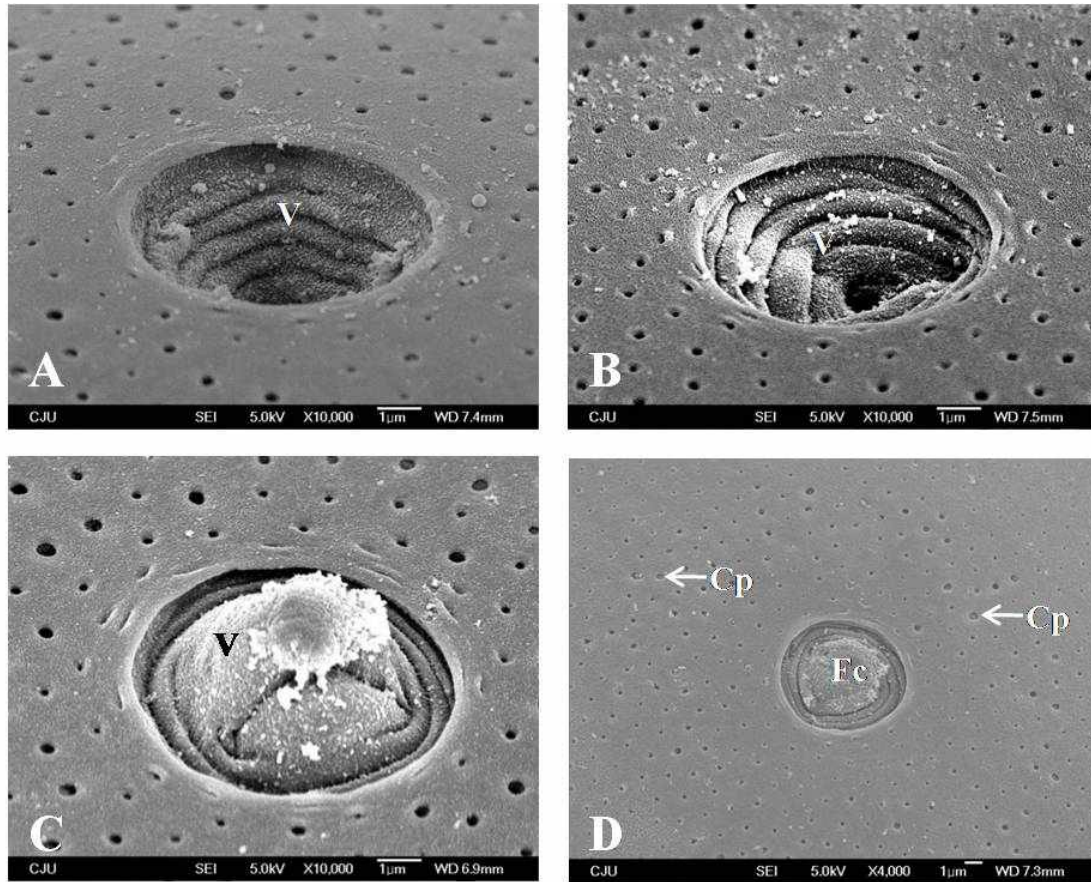


Fig. 32. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule. A, the micropylar vestibule (V) appeared as a thickened structure by activation; B, the micropylar vestibule exhibited swollen structure; C, micropylar vestibule (V) showing dome-shaped structure; D, the closed pores (Cp) distributed around the fertilization cone (Fc) of the fertilized egg.

#### 나. 정자의 미세구조

이 연구에 사용한 재료는 순환여과식 수조에서 사육중인 성숙한 어미(전장,  $39.6 \pm 1.5$  cm, 체중,  $1.06 \pm 0.94$  kg)를 복부압박과 cannulation 방법으로 정소를 적출하였다. 주사형 및 투과형 전자현미경 관찰을 위한 시료는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 완충용액인 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde에 4°C에서 2시간 전고정 하였으며, 2% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) 고정액으로 4°C에서 1시간 후고정하였다. 시료는 ethanol 농도 상승순으로 탈수한 후 propylene oxide로 치환하여 epon-araldite 812 mixture에 포매하였다. 포매시료는 LKB ultramicrotome으로 70~80 nm 두께로 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 70 KV 하에서 투과형(JEM 100CX-2) 전자현미경으로 관찰하였다. 주사형 전자현미경 관찰을 위한 시료는 critical-point로 건조한 후 platinum으로 도금하여 주사형 (JSM-6700F, JEOL) 전자현미경으로 검경하였으며, 측정치는 SEM과 TEM각

각 평균과 표준편차를 구하였다.

홍바리 정자는 주사형 현미경으로 관찰한 결과 구형의 두부(직경  $3.27 \pm 0.53 \mu\text{m}$ ), cytoplasmic sleeve와 고리형 빈공간인 cytoplasmic canal의 입구 등을 포함한 중편부 그리고 1개의 편모에 lateral fins을 갖는 미부 등으로 구분되었다(Fig. 33A, B). 투과형 전자현미경 관찰한 결과 홍바리 정자의 핵(직경  $2.15 \pm 0.25 \mu\text{m}$ )은 구형이며, 이중막인 핵막을 갖고 있었다. 핵질은 전자밀도가 높은 이질 염색질이 과립상으로 조밀하게 분포하였고, 침체구조물은 존재하지 않으나 두부 세포질에는 막성의 vesicles이 관찰되었다(Fig. 33C). 홍바리 정자의 핵은 centriolar complex에서 기원하는 osmophilic filament로 centriolar complex와 서로 연결되어 있고, 또한 편모와 핵은 수직 (Fig. 33D) 또는 평행 (Fig. 33E)으로 놓여 있으며, 이 부위에는 핵막이 함몰되어 핵강 (nuclear fossa)을 관찰할 수 있었다. 홍바리 정자의 핵 후방부 편모 선단부에는 proximal centriole과 distal centriole이 osmophilic filament로 연결되어 서로 수직으로 놓여 있다. 또한 distal centriole 하단부에는 osmophilic basal plate가 1개의 면 형태로 관찰되며 편모와 연결된다 (Fig. 34A). 홍바리 정자의 proximal centriole과 distal centriole의 횡단면 미세구조는 9개의 osmophilic spoke을 갖는 수레바퀴 형태로 각각 “9+0”의 미세소관 축사구조이다 (Fig. 34B, C). 홍바리 정자의 중편부는 cytoplasmic canal을 중심으로 편모와 구형의 8~9개 미토콘드리아 (직경  $0.74 \pm 0.09 \mu\text{m}$ )를 갖는다 (Fig. 34C, D). 홍바리 정자의 중편부 횡단면과 종단면의 관찰 결과 편모를 중심으로 cytoplasmic sleeve 원형질막 사이에 길이가  $0.91 \pm 0.27 \mu\text{m}$ 이며 너비가  $0.36 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 인 좌우에 2개의 빈공간인 cytoplasmic canal 모양의 구조를 갖는다 (Fig. 34E). 홍바리 정자의 necklace는 편모 선단부 cytoplasmic canal과 접하는 편모 원형질막에 전자밀도가 높은 7~8개의 구형 입자 형태로 존재하였다 (Fig. 34F). 홍바리 정자의 편모는 어류에서 일반적으로 관찰할 수 있는 1개의 편모를 갖는 uniflagellate 정자이며, 편모축사의 미세구조는 1쌍의 중심 미세소관과 이를 둘러싸는 9쌍의 주변 미세소관으로 구성된 전형적인 “9+2”의 축사구조이었다 (Fig. 34G). 홍바리 정자 편모에는 크기와 모양이 다양한 lateral fin이 존재하며, lateral fin 내부에는 전형적인 “9+2”의 축사구조와 막성의 vesicle 등이 관찰된다(Fig. 34H).



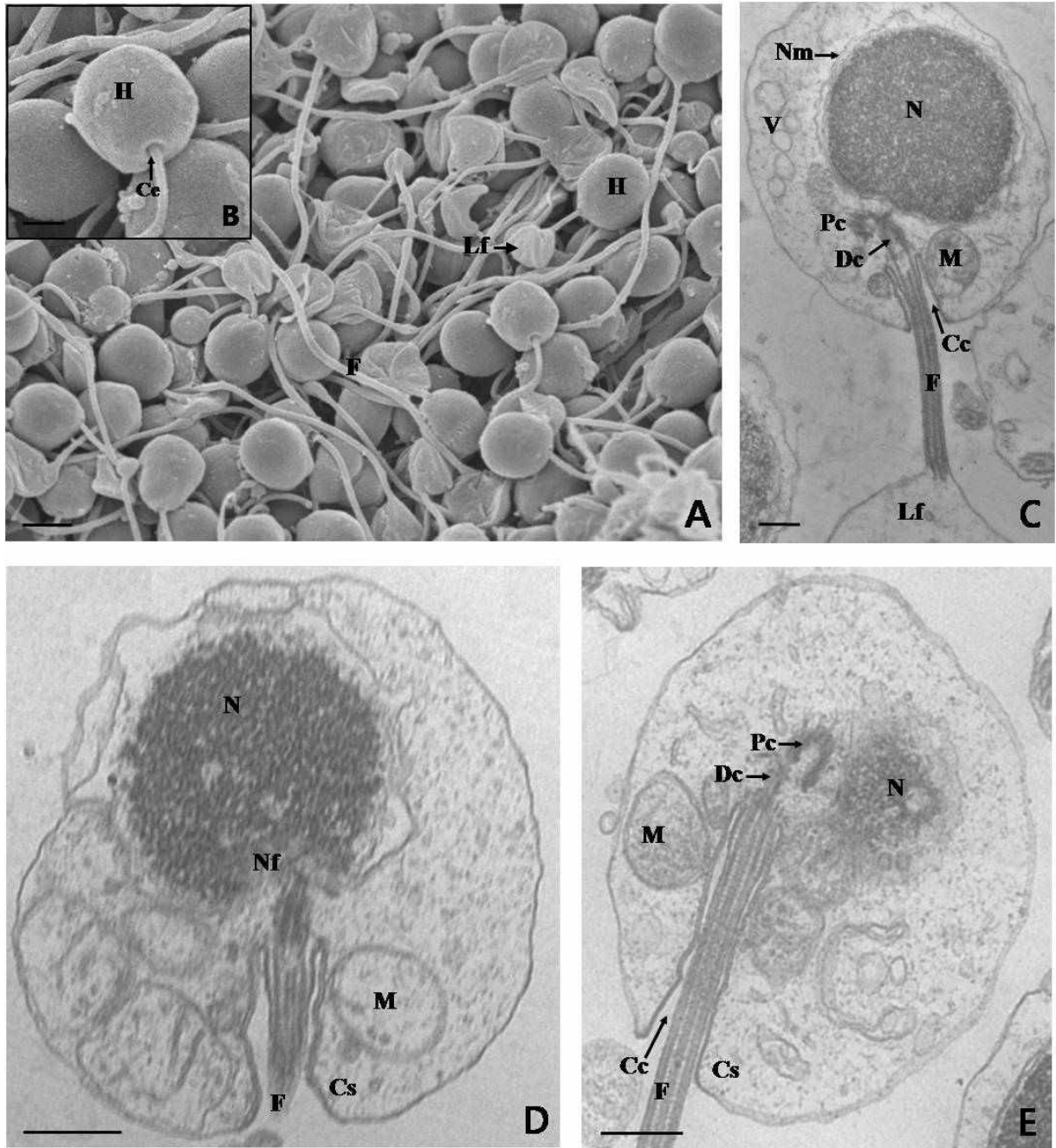


Fig. 33. A scanning electron and transmission electron micrographs of blacktip grouper, *E. fasciatus* spermatozoa. A and B, scanning electron micrographs of spermatozoa. Scale bar=2.0  $\mu\text{m}$ . C, transmission electron micrographs of spermatozoon. Scale bar=1.0  $\mu\text{m}$ ; D, the nucleus lies perpendicular to the flagellar axis. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; E, the nucleus lies parallel to the flagellar axis. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ . Cc, cytoplasmic canal; Dc, distal centriole; H, head; F, flagellum. Lf, lateral fin; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Pc, proximal centriole; V, vesicle.

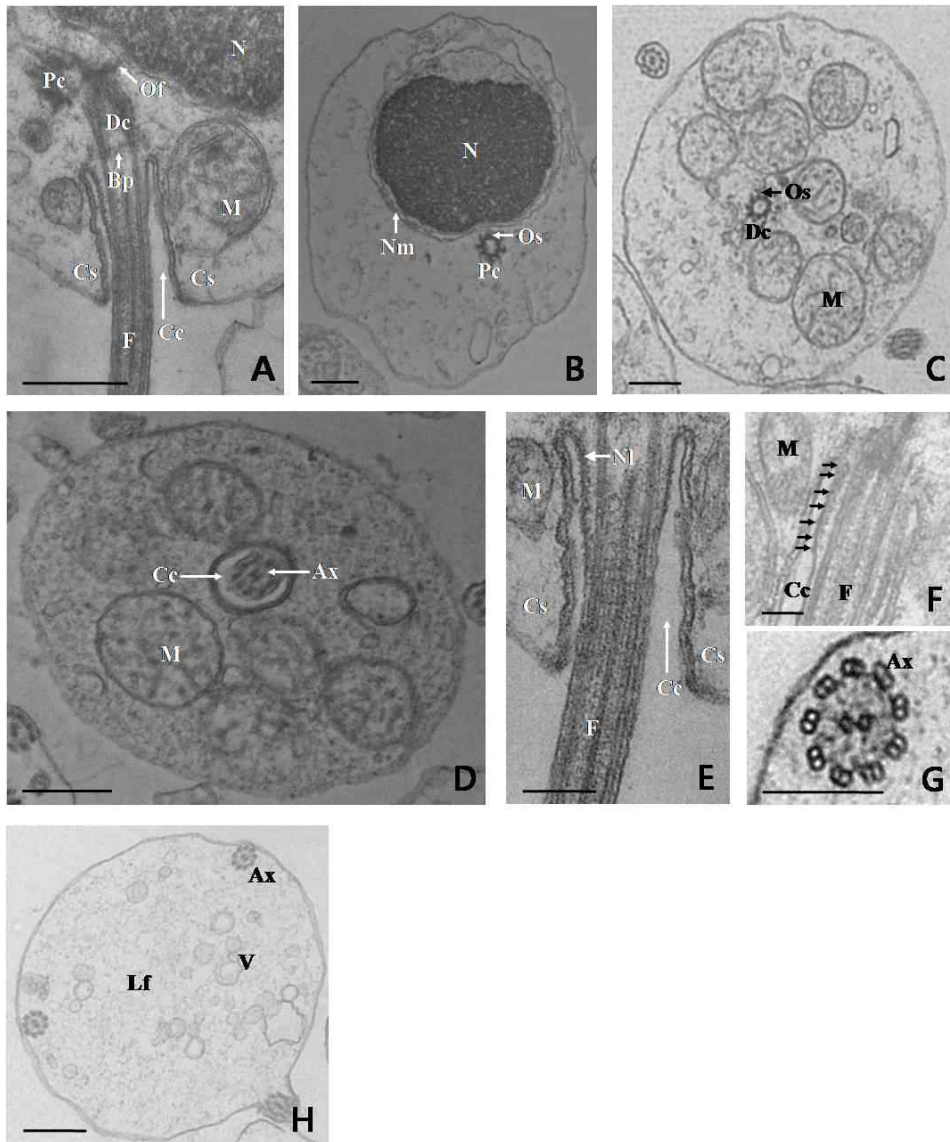


Fig. 34. A transmission electron micrographs of blacktip grouper, *E. fasciatus* spermatozoon. A, the longitudinal section; B, proximal centriole (Pc) showing nine osmophilic spoke (Os) of wagon wheel type. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; C, proximal centriole (Pc) showing nine osmophilic spoke (Os) of wagon wheel type. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; D, cross section of midpiece. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; E, cytoplasmic canal (Cc). Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; F, necklace particles (arrows). Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; G, axoneme (Ax) of spermatozoa flagellum. Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; H, lateral fin (Lf) of spermatozoa flagellum. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ . Ax, axoneme; Bp, basal plate; Cc, cytoplasmic canal; Ce, cytoplasmic canal entrance; Cs, cytoplasmic sleeve; Dc, distal centriole; F, flagellum; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Nl, necklace; Of, osmophilic filament; Pc, proximal centriole; V, vesicle.

## 2. 홍바리 난질 평가 후보 인자 탐색

가. 형태적, 생리생화학적 특성에 의한 난질 평가

### (1) 난경, 유구의 크기 및 난소액의 pH 조사

난질 평가를 위해 사용된 실험어는 수온 25℃와 광주기14L/10D 하에서 사육된 개체들이다(♀ TL: 32.4±1.3 cm, BW: 524.0±65.0 g, n=7; ♂ TL: 41 cm, BW: 1120.0 g, n=1, mean±SE). 이들은 성숙유도를 위해 HCG 500 IU/kg 농도로 근육주사한 후 복부압박법으로 배란 유도되었다. 배란된 난들은 즉시 pH meter를 이용하여 개체별로 pH를 측정 한 후, 습식법을 이용하여 인공 수정을 실시하였다. 난질의 상태는 미수정, 수정 직후, 그리고 수정 후 12시간과 24시간으로 구분하여 관찰하였으며, 수정 후 12와 24시간의 경우 부상란과 침강란으로 다시 구분하여 관찰하였다. 난들은 각 그룹별로 30~50립씩 무작위로 샘플하여 이미지 촬영 장치가 장착된 도립현미경으로 촬영 한 후, Motic image-plus 2.0 (Motic Instruments Inc., China) 프로그램을 이용하여 0.1 um 단위까지 측정하였다. 또한 수정 후 12시간과 24시간이 지난 침강란 중 유구의 형태를 분간하기 어려운 것은 측정에서 제외시켰다. 난소액 pH에 따른 부상율과 수정율의 상관관계를 알아보기 위하여 부상율과 수정율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{부상율}(\%) = 100 \times \text{총 부상란 량}(ml) / \text{총 배란 량}$$

$$\text{수정율}(\%) = 100 \times \text{총 수정된 개수} / \text{총 관측 수정란 개수}$$

부상율은 수정된 알을 1,000 ml의 매스실린더에 해수와 함께 넣은 후 부상란과 침강란의 양을 측정하였다. 수정율은 각 개체에서 생산된 그룹 당 약 100개의 알을 대상으로 도립현미경 하에서 조사하였으며, 상실기 초기 단계까지 발생한 알을 수정란으로 판단하였다.

### (2) 형태적 특성 평가

홍바리의 난은 무색투명한 구형의 분리부성란이며, 배란직후의 미수정난 난경은 764.3±7.5 um, 유구경은 171.5±1.3 um로 조사되었고, 유구는 중앙에 위치해 있었다. 수정 후 12시간이 경과 했을 때, 두부 분화 및 안포 형성이 관찰 되었으며 그때의 부상란과 침강란의 난경은 각각 747.1±3.0, 743.9±2.3 um이었고, 유구경은 각각 163.1±2.0, 157.6±2.7 um로 조사되었다 (Fig. 35, 36). 수정 후 24시간이 경과하면서 일부 배체의 움직임과 심장박동이 관찰되었고 부상란과 침강란의 난경은 각각 758.6±2.7, 737.3±3.0 um이었으며, 유구경은 157.9±3.2 um로 조사되어 이들 집단 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (p>0.05). Gimenez et al. (2006)은 알의 형태적 특징은 저급 난질을 확인하는 대략적인 선별 도구로 사용할 수 있지만 이것은 자연산란, 수정된 경우에는 사용할 수 없다고 하였다. 또한 같은 수조 환경에서 사육된 친어 들에서 생산된 난들로부터 형태적 특징을 구분 짓는 것은 어렵다고 하였다. 이러한 관점에서

볼 때, 본 연구에서는 부상율과 수정율이 각각 73 %와 84.9 %로 높게 나타나 형태적 유의차를 발견할 수 없었던 것으로 판단된다. 한편 Deniz et al. (2011)는 친어의 성숙유도 방법에 따라 배발생 단계별로 난경, 유구경과 같은 형태적 인자가 달라진다고 하였다. 따라서 인위적 성숙유도 방법으로 고품질 난을 얻고자 한다면 형태적 인자는 반드시 조사되어야 할 것으로 생각된다.

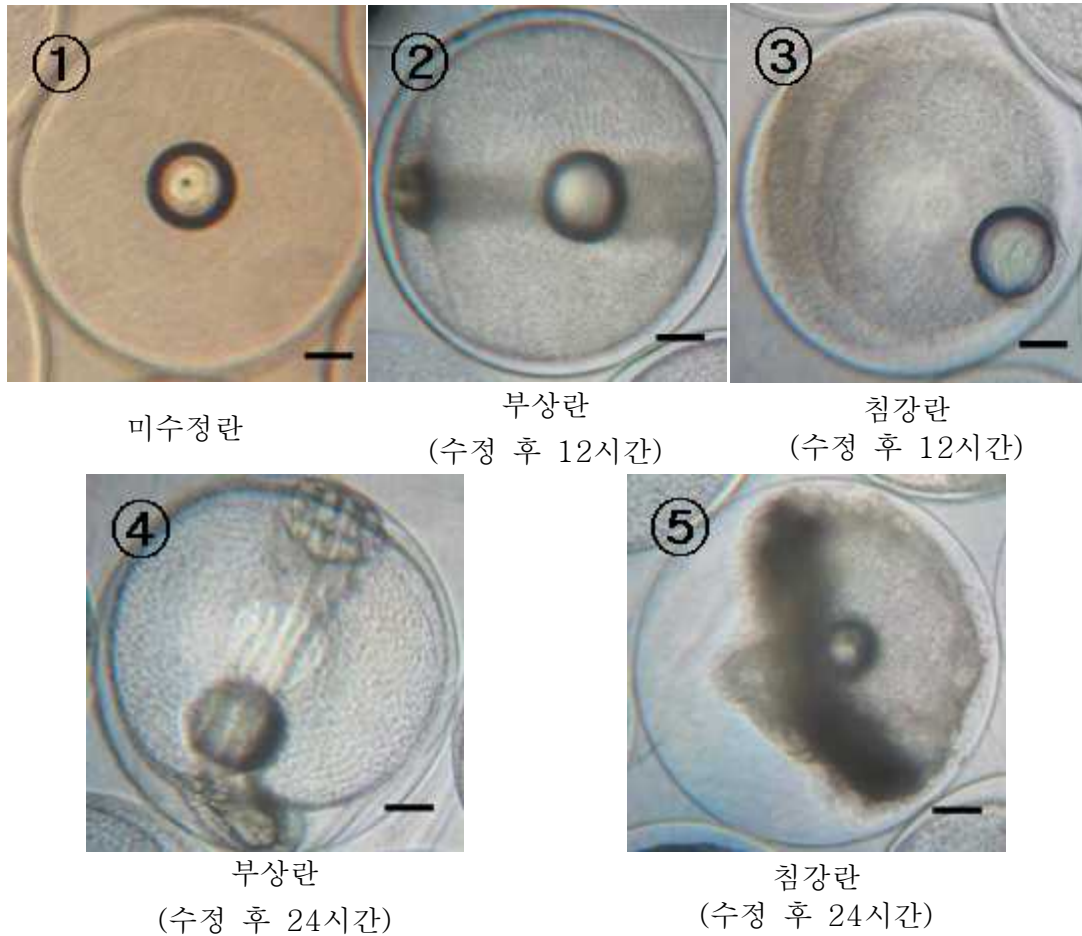


Fig 35. External structures of unfertilized eggs, fertilized eggs, floating eggs of 12 and 24 HAF, sunken eggs of 12 and 24 HAF from blacktip grouper, *E. fasciatus* (scale bar=100 um).

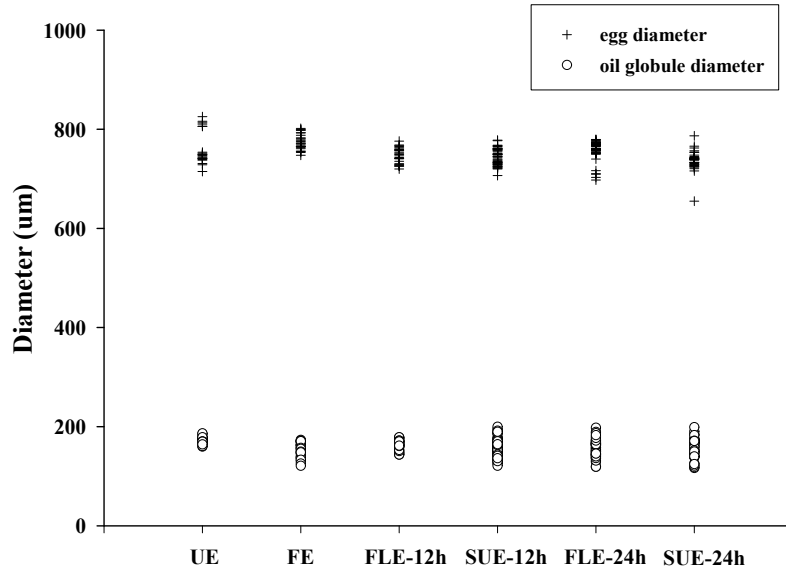


Fig 36. Distribution of egg and oil globule diameters in unfertilized eggs, fertilized eggs, floating eggs of 12 and 24 HAF, sunken eggs of 12 and 24 HAF from blacktip grouper. UE: Unfertilized eggs, FE: Fertilized eggs, FLE: Floating eggs, SUE: sunken eggs.

### (3) 난의 지방산 조성 분석

수온과 광주기 조절로 성숙유도된 홍바리(1차 실험 = ♀ TL:  $35.5 \pm 2.0$  cm, BW:  $643.0 \pm 63.0$  g, n=2; ♂ TL: 41.0 cm, BW: 953.0 g, n=1; 2차 실험 = ♀ TL:  $29.7 \pm 1.2$  cm, BW:  $461.8 \pm 55.8$  g, n=5; ♂ TL: 36.0 cm, BW: 696.0 g, n=1; 3차 실험 = ♀ TL:  $35.5 \pm 2.0$  cm, BW:  $643.0 \pm 63.0$  g, n=2, ♂ TL:  $39.8 \pm 1.3$  cm, BW:  $1115.0 \pm 5.0$  g, n=2, mean  $\pm$  SE)를 대상으로 HCG 500 IU/kg을 근육주사 후 복부 압박으로 난과 정자를 얻었다. 인공수정(습식법) 후, 난의 상태에 따라 1차 실험에서는 수정란, 미수정란, 과숙란 (over-ripened eggs)으로, 2차 실험에서는 수정란, 미수정란, 침강란 (sunken eggs), 3차 실험에서는 미수정란, 수정 후 12시간과 24시간 이후의 부상란과 침강란으로 나누어 각각의 지방산 조성을 분석하였다.

홍바리의 혈장 조건에 맞추어 미리 준비한 BSS (pH: 7.69, 삼투압농도: 360 mOsm/kg)에 알을 풀어 1,000개씩 무작위로 샘플한 후 4배량의 chloroform : methanol 혼합용매 (2:1, v/v)를 첨가하여 homogenizer로 2분간 교반한 후 여과하였다. 여과액의 지질은 플라스크에 넣어 evaporator로 용매 제거후 추출되었다. 추출된 지질은 14% BF<sub>3</sub>-methanol (Sigma Chemical Co., USA) 2 mL를 첨가하고 30분간 100°C에서 가열시킨 다음, 석유 ether로 추출하여 지방산 분석용 시료로 사용하였다 (Fig. 37). GC 분석조건은 fused silica capillary column이 장착된 gas chromatography로 carrier gas는 헬륨 (helium, 99.9%)을 사용하였



다. Injector와 detector (FID) 온도는 250°C로 설정하였고, oven 온도는 100°C로 설정하였다. 각 지방산은 동일조건에서 표준지방산 methyl ester mixture (Sigma Chemical Co., USA)와 retention time을 비교하여 동정하였으며 함량은 각 peak의 면적을 상대 백분율로 나타내었다.

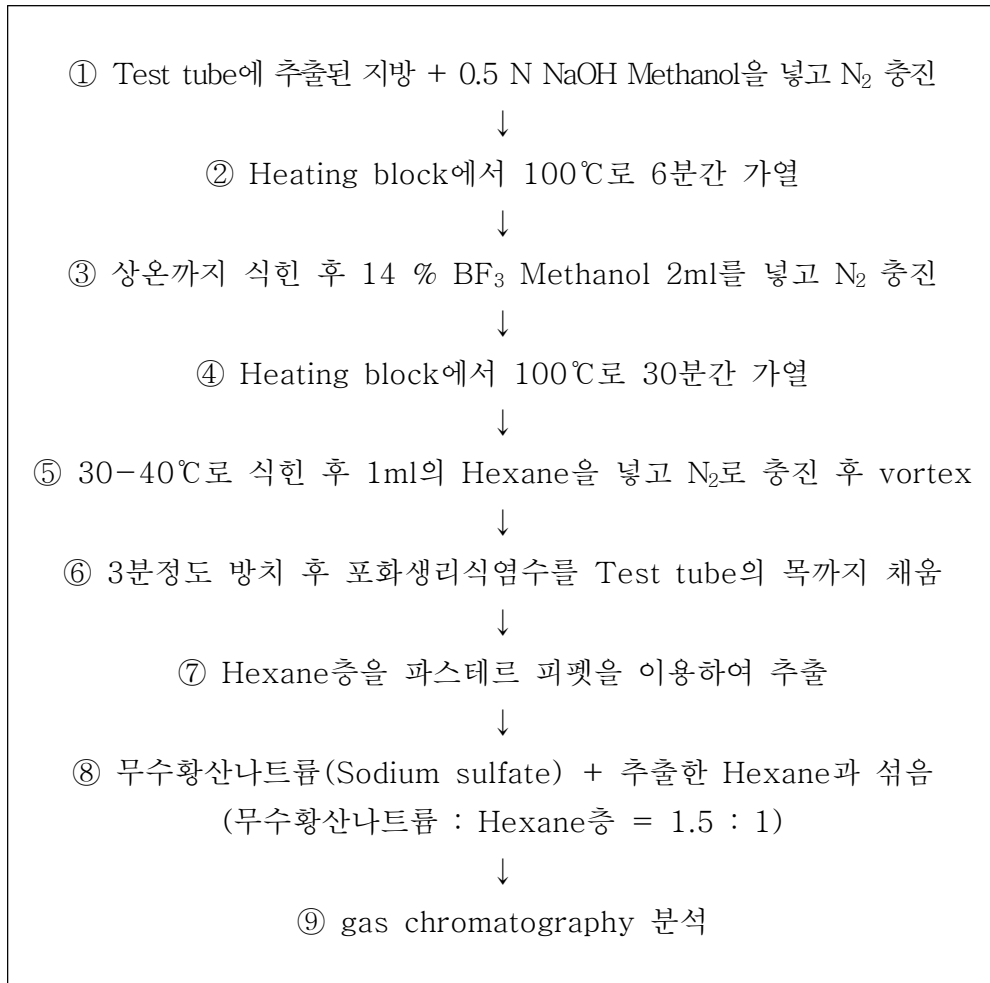


Fig 37. Procedure of methylation for fatty acid analysis in blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs.

1차 실험에서는 미수정란, 수정란 그리고 과숙란으로 구분하여 지방산 조성을 분석하였다 (Table 4). 포화지방산 (saturated fatty acids, SFA)의 비율은 수정란이  $41.68 \pm 0.04\%$ 로 미수정란과 과숙란(각각  $34.04 \pm 0.12$ ,  $34.21 \pm 0.01\%$ )에 비해 높게 나타났으며, 이 중 palmitic acid (C16:0)과 Stearic acid (C18:0)이 미수정란과 과숙란에 비해 현저히 높았다. 또한 Arachidic acid (C20:0)의 경우, 수정란에서는 미량 검출 되었으나 ( $0.23\%$ ) 미수정란과 과숙란에서는 검출되지 않았다. 단일불포화지방산 (monounsaturated fatty acids, MUFA)의 비율은 수정란, 미수정란 그리고 과숙란에서 각각  $28.87 \pm 0.09$ ,  $34.81 \pm 0.11$  그리고  $33.28 \pm 0.01\%$ 로 나타나 수정란이 미수정란, 과숙란과 비교하여 낮게 나타났다. 이 중 수정란에 특이적으로 검출 된 것은 Myristoleic acid (C14:1)로서  $0.19\%$ 로 조사되었고, 과숙란에서는 Heptadecenoic acid (C17:1)가  $0.33 \pm 0.01\%$ 로 조사되었다. 또한 수정란에서 MUFA의 주요 구성 성분인 oleic acid (C18:1)이 상대적으로 낮게 나타나 전체적인 MUFA의 함유량이 낮은 것으로 조사되었다. 다불포화지방산 (polyunsaturated fatty acids, PUFA)의 조성비는 수정란, 미수정란 그리고 과숙란에서 큰 차이는 없었으나 수정란의 n-6계열 PUFA가 가장 높았고 ( $4.21 \pm 0.03\%$ ), n-3계열 PUFA는 가장 낮게 ( $25.24 \pm 0.02\%$ ) 조사되었으며 미수정란, 수정란 그리고 과숙란의 n-3/n-6 PUFA 비율은 각각  $8.89 \pm 0.20$ ,  $5.99 \pm 0.03$  그리고  $8.48 \pm 0.07\%$ 이었으며, DHA/EPA 비율은 각각  $2.41 \pm 0.02$ ,  $2.20 \pm 0.01$  그리고  $2.18\%$ 로 나타났다(Fig. 38).

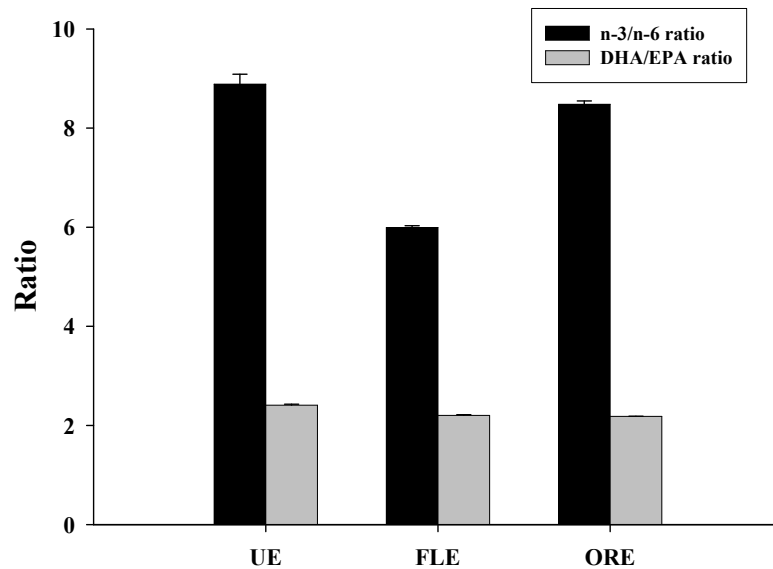


Fig 38. n-3/n-6 ratio and DHA/EPA ratio of unfertilized, fertilized and over-ripened eggs from blacktip grouper, *E. fasciatus* (1st. experiment).

Table 4. Fatty acid composition of total lipid of eggs, with unfertilized, fertilized and over-ripened eggs from blacktip grouper, *E. fasciatus*. (1st. experiment, mean±SE). N.D = not detected

Fatty acids (%)	1st. experiment		
	Unfertilized eggs	Fertilized eggs	Over-ripened eggs
C14:0	3.84	3.13	3.34±0.01
C15:0	0.45±0.01	0.38	0.42
C16:0	21.71±0.21	25.85±0.05	20.61±0.02
C17:0	N.D	0.29	0.44
C18:0	6.84±0.05	10.57	7.85±0.05
C20:0	N.D	0.23	N.D
C22:0	1.19±0.04	0.85	10.9±0.02
C23:0	N.D	0.39	0.46±0.01
<b>Σ SFA</b>	34.04±0.12	41.68±0.04	34.21±0.01
C14:1	N.D	0.19	N.D
C15:1	0.29	0.40	0.37±0.01
C16:1	9.03±0.1	7.18	8.03±0.02
C17:1	N.D	N.D	0.33±0.01
C18:1	18.4±0.08	15.38±0.05	18.11±0.01
C20:1	4.39±0.22	3.40±0.06	3.66±0.03
C24:1	2.7±0.08	2.33±0.02	2.79±0.03
<b>Σ MUFA</b>	34.81±0.11	28.87±0.09	33.28±0.01
C18:2(n-6)	1.62±0.04	2.66±0.03	1.49±0.02
C18:3(n-6)	0.68±0.02	0.57	0.62
C20:4(n-6)	0.86±0.08	0.79	0.97±0.01
C22:2(n-6)	N.D	N.D	0.36
C18:3(n-3)	0.91±0.02	0.78	1.03
C20:3(n-3)	1.77	1.59±0.01	1.88±0.02
C20:5(n-3)	7.43±0.04	7.14±0.02	8.22±0.03
C22:6(n-3)	17.89±0.07	15.73±0.05	17.95±0.04
<b>Σ PUFA</b>	31.16±0.01	29.45±0.05	32.51±0.03

2차 실험에서는 미수정란, 수정 직 후의 부상란과 침강란의 지방산 조성을 분석하였다 (Table 5). SFA의 비율은 침강란이  $40.50 \pm 0.20\%$ 로 미수정란과 부상란 (각각  $38.39 \pm 0.03$ ,  $38.39 \pm 0.03\%$ )에 비해 높게 나타났다. MUFA의 비율은 미수정란, 부상란 그리고 침강란에서 각각  $35.48 \pm 0.03$ ,  $35.09 \pm 0.10$  그리고  $37.18 \pm 0.10\%$ 로 나타나 침강란이 미수정란, 부상란과 비교하여 높게 나타났다. 이 중 침강란에서는 MUFA중 C18:1의 비율이 가장 높게 나타났으며 ( $26.46 \pm 0.02\%$ ), Nervonic acid (C24:1)는 미수정란 ( $2.11 \pm 0.01\%$ )이 부상란, 침강란 (각각  $1.66 \pm 0.01$ ,  $1.01\%$ )에 비해 높게 나타났다. PUFA의 조성비는 미수정란, 부상란 그리고 침강란에서 각각  $26.02 \pm 0.10$ ,  $24.30 \pm 0.01$  그리고  $22.31 \pm 0.09\%$ 로 나타나 침강란에서 가장 낮은 비율로 조사되었다. 또한 각각의 n-3/n-6 PUFA 비율은 3.68,  $5.47 \pm 0.03$  그리고  $4.52 \pm 0.05\%$ 이었으며, DHA/EPA 비율은 각각  $1.51 \pm 0.01$ ,  $1.64 \pm 0.01$  그리고  $1.59 \pm 0.04\%$ 로 나타났다 (Fig. 39).

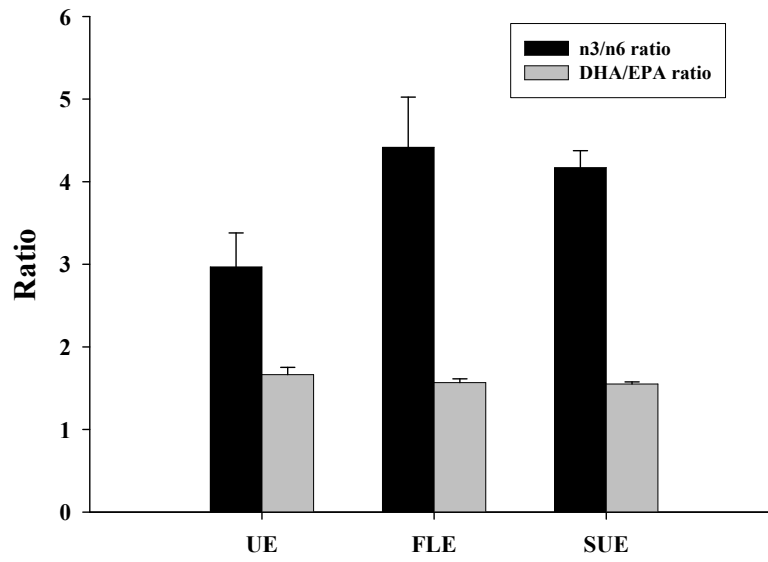


Fig 39. n-3/n-6 ratio and DHA/EPA ratio of unfertilized, floating and sunken eggs from blacktip grouper, *E. fasciatus* (2nd. experiment). UE: unfertilized eggs, FLE: floating eggs after fertilized, SUE: sunken eggs after fertilized.

Table 5. Fatty acid composition of total lipid of eggs, with unfertilized, floating and sunken eggs from blacktip grouper, *E. fasciatus*. (2nd. experiment, mean±SE). N.D = not detected

Fatty acids (%)	2nd. experiment		
	Unfertilized eggs	Fertilized eggs	Sunken eggs
C14:0	3.93±0.01	3.60±0.01	3.41
C15:0	0.39	0.43	0.39
C16:0	24.65±0.07	25.70±0.04	25.91±0.08
C17:0	N.D	N.D	N.D
C18:0	8.52±0.03	9.57±0.05	9.90±0.11
C20:0	N.D	N.D	N.D
C22:0	0.91	0.91	0.89±0.01
C23:0	N.D	N.D	N.D
<b>Σ SFA</b>	38.39±0.03	38.39±0.03	40.50±0.20
C14:1	N.D	N.D	N.D
C15:1	0.31	0.31	0.33
C16:1	9.37±0.03	9.37±0.03	8.48±0.08
C17:1	N.D	N.D	N.D
C18:1	22.35±0.06	23.33±0.06	26.46±0.02
C20:1	0.95	0.93	0.90
C24:1	2.11±0.01	1.66±0.01	1.01
<b>Σ MUFA</b>	35.09±0.10	35.48±0.03	37.18±0.10
C18:2(n-6)	4.54±0.03	2.76±0.02	2.89±0.02
C18:3(n-6)	0.61±0.01	0.60	0.66
C20:4(n-6)	0.40	0.40±0.01	0.49±0.01
C22:2(n-6)	N.D	N.D	N.D
C18:3(n-3)	0.86	0.91±0.01	0.96
C20:3(n-3)	0.31	0.30	0.38±0.01
C20:5(n-3)	7.68	7.31±0.05	6.54±0.13
C22:6(n-3)	11.61±0.09	12.03±0.02	10.40±0.03
<b>Σ PUFA</b>	26.02±0.10	24.30±0.01	22.31±0.09

3차 실험에서는 미수정란, 수정 직후의 침강란과 12, 24시간 후의 부상란 및 침강란으로 나누어 조사하였다(Table 6). SFA의 비율을 살펴보면 침강란에서 58.39±1.05%의 비율로 가장 낮은 비율을 보였으며, MUFA와 PUFA에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, DHA/EPA의 비율 또한 1.75~2.19의 범위로 조사되어 1, 2차와 비슷한 결과 값을 보였다. 특이할만한 점은 Linoleic acid (C18:2)와 Linolenic acid (C18:3)과 같은 필수지방산이 수정 후 12, 24시간의 침강란에서 검출이 되지 않았다. 1, 2 그리고 3차의 지방산 조성비 분석 결과, 모든 난의 SFA에서는 공통적으로 C16:0이 가장 높은 비율을 차지하였고, MUFA에서는 C18:1이 가장 높은 비율을 차지하였다. 또한 PUFA에서는 docosahexaenoic acid (C22:6, DHA)가 가장 높은 비율을 차지하였다.

Table 6. Fatty acid composition in unfertilized, sunken eggs after fertilized, floating and sunken eggs of 12 HAF, floating and sunken eggs of 24 HAF from blacktip grouper, *E. fasciatus*. (3rd. experiment, mean±SE). N.D = not detected

Fatty acids (%)	3rd. experiment					
	Unfertilized eggs	Sunken eggs	Floating eggs-12h	Sunken eggs-12h	Floating eggs-24h	Sunken eggs-24h
C14:0	5.21±1.00	5.71±0.45	5.03	4.40	4.56	4.97
C15:0	0.88±0.04	0.95±0.07	0.72	0.75	0.76	0.71
C16:0	37.65±2.25	37.46±0.28	37.88	36.77	38.39	38.03
C17:0	0.90±0.22	0.89±0.01	0.73	0.70	0.71	0.66
C18:0	14.40±1.27	12.30±0.62	14.00	15.90	14.60	14.14
C20:0	0.19±0.03	0.20±0.01	0.29	0.34	0.37	0.42
C23:0	2.21±0.75	1.67±0.84	2.08	2.01	2.34	1.77
<b>Σ SFA</b>	<b>61.52±0.85</b>	<b>58.39±1.05</b>	<b>60.73</b>	<b>60.87</b>	<b>61.73</b>	<b>60.70</b>
C16:1	3.47±0.56	3.92±0.08	4.09	3.97	3.60	3.95
C18:1	5.41±0.33	5.81±0.07	5.51	6.10	4.96	6.11
C20:1	0.71±0.10	0.85±0.01	0.66	N.D	0.59	N.D
<b>Σ MUFA</b>	<b>9.59±0.98</b>	<b>10.85±0.16</b>	<b>10.26</b>	<b>10.07</b>	<b>9.15</b>	<b>10.06</b>
C18:2(n-6)	0.73±0.03	0.78±0.02	0.86	N.D	1.25	N.D
C18:3(n-3)	0.39	0.51±0.02	0.40	N.D	0.37	N.D
C20:5(n-3)	9.56±0.54	9.28±0.35	9.62	10.58	10.01	9.95
C22:6(n-3)	18.19±1.79	19.60	18.12	18.49	17.50	19.29
<b>Σ PUFA</b>	<b>28.91±1.82</b>	<b>30.16±0.35</b>	<b>29.00</b>	<b>29.07</b>	<b>29.13</b>	<b>29.24</b>

필수 지방산에 속하는 n-3 HUFA (high unsaturated fatty acid)인 DHA와 eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA)는 초기 자어 발달에 중요한 역할을 한다. 많은 연구자들은 어미에 n-3 HUFA나 arachidonic acid (C20:4, AA), 그리고 vitamin A, C, E 계열의 강화를 통해 난질을 향상시킬 수 있을 것으로 추측하고 있다. 또한 모체에서 전달된 필수지방산 및 vitamin은 수정란 및 초기자어의 발달 과정 중에 뇌와 같은 주요기관의 발달, 세포의 지질이중층 형성 등을 통해 소비되어 부화 후 외부 먹이 섭취 시까지 시간이 지남에 따라 감소된다. 특히 필수지방산에서 DHA는 생리학적 균형을 위한 효소작용에서 EPA보다 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다 (Bell et al., 1985; Koven et al., 1993; Watanabe, 1993). 따라서 이들의 비율 (DHA/EPA 혹은 EPA/DHA, n-3/n-6 PUFA 등)을 조사하여 난질평가 항목으로 제시하기도 한다. 그러나 Ismael et al. (2011)의 보고에 의하면 flatfish 류인 *Scophthalmus rhombus*를 대상으로 EPA/DHA 비율이 높은 그룹과 낮은 그룹의 친어에서 생산된 난의 EPA/DHA 비율을 분석한 결과, 난의 생존율에 상관없이 두 그룹 간에 차이는 없는 것으로 조사되었는데, 이는 난질이 각 어미개체별로 영향을 받는 것으로 추측하였다. 본 연구결과의 DHA/EPA의 비율을 EPA / DHA의 비율로 역으로 환산하여 다른 연구 결과와 비교해 보았다. 1차 실험에서는 0.42~0.46의 범위였고, 2차 실험에서는 미수정란에서 0.55~0.60, 수정란에서 0.61~0.67 그리고 침강란에서는 0.63~0.66의 범위였으며, 3차 실험에서는 0.47~0.57의 범위로 나타났는데, 이는 Ismael et al. (2011)이 보고한

*Scophthalmus rhombus* (0.43), Vazquez et al. (1994)가 보고한 Senegal sole (0.26) 그리고 Corcobado-Onate et al. (1993)이 보고한 turbot (0.25~0.44)과 비교하였을 때 높은 비율을 나타내어 다른 어종에 비해 상대적으로 EPA의 비율이 높은 것으로 조사되었다.

본 연구 결과에서 PUFA 중 n-3 : n-6의 비는 1차 실험의 미수정란, 부상란 그리고 과숙란에서 각각 8.88, 5.99 그리고 8.48로 조사되어, 부상란이 상대적으로 낮은 비율을 나타내었다. 하지만, 2차 실험에서는 수정란이 4.42로 가장 높았고, 그다음이 침강란으로 4.17, 그리고 미수정란에서 3.02로 가장 낮은 비율을 보였다. 3차 실험에서는 수정 후 시간이 경과함에 따른 부상란과 침강란의 지방산 조성비를 비교하였다. 수정 후 12시간, 24시간 후의 침강란에서 필수지방산인 C18:2, C18:3이 검출되지 않았는데, 이러한 지방산은 주로 canola나 linseed oil에 많이 함유된 것으로서 동물은 합성을 하지 못하는 것으로 알려져 있다. 특히 고가의 fish oil과 비교하여 비교적 이를 대체할 수 있는 비교적 저가의 canola나 linseed oil을 공급한 연구들을 살펴보면 자어의 성장이나 사료 효율은 서로 유의차가 없는 것으로 나타나 일부 해산어종에서는 fish oil을 대신하여 이용하기도 한다. 또한 이들은 해산어에 필수적인 DHA, EPA의 전구물질로 잘 알려져 있는 중요한 필수지방산이다.

본 결과에서는 C18:2, C18:3이 미수정란과 수정 직 후에는 검출이 되었지만, 시간이 지남에 따라 침강란에서는 검출이 되지 않았다. 이는 C18:2과 C18:3이 난질 평가 인자로서의 활용가능성을 제시해줄 수 있다고 생각된다.

(4) 난의 cortisol 및 E<sub>2</sub> 농도 분석

분석을 위한 샘플은 1차 실험에서 개체별 미수정란, 수정 후 부상란, 그리고 수정 후 침강란으로 구분하였고, 2차 실험에서는 미수정란, 수정 후 12시간과 24시간 이후의 부상란과 침강란으로 나누어 각각의 cortisol 및 E<sub>2</sub>를 분석 하였다. 난 샘플은 채집 즉시 BSS (pH: 7.69, 삼투압농도: 360 mOsm/kg)에 넣어 분석시까지 deep-freazer에 보관하였다. 분석용 시료는 각각 100개씩 계수하여 분쇄 한 후, 지질을 추출하여 cortisol 및 E<sub>2</sub>를 방사면역측정법 (Radioimmunoassay: RIA)으로 측정하였다(Fig. 40).

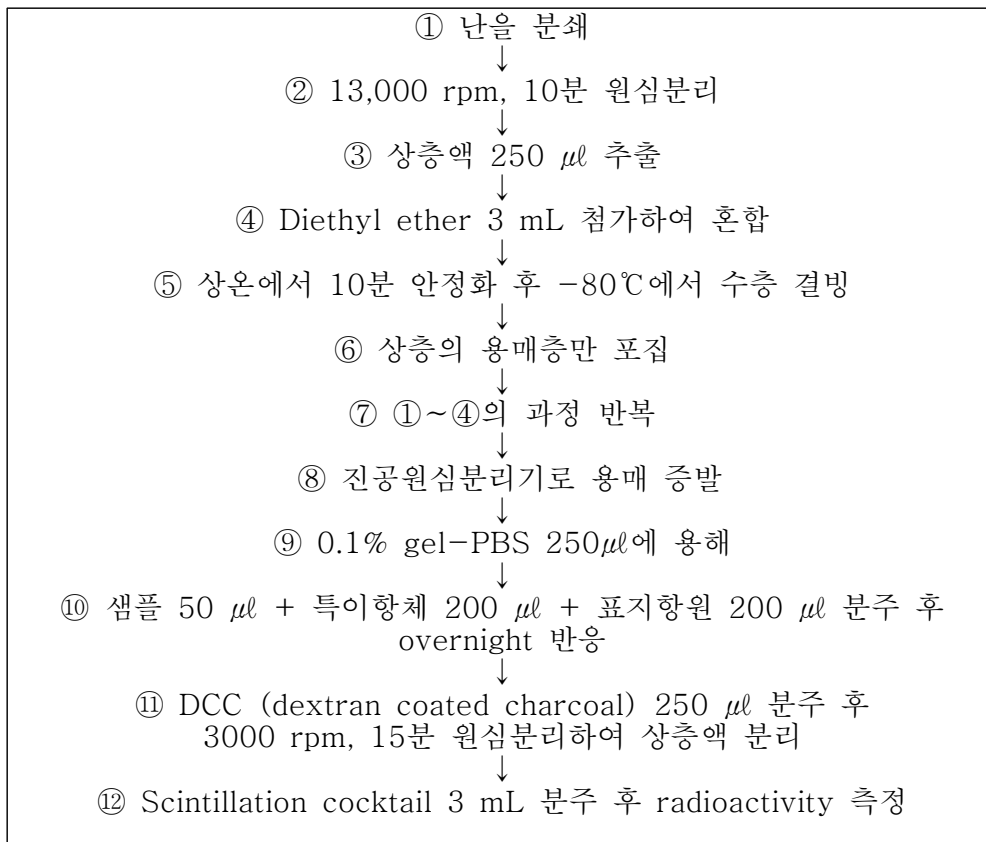


Fig 40. Procedure of analysis in egg steroid hormone levels from blacktip grouper, *E. fasciatus*.

스테로이드 추출을 위하여 500 μl의 NaCl과 80% 에탄올 1-2 ml를 난과 함께 첨가하여 분쇄한 후, 원심분리 (4℃, 3200 rpm, 15min)를 한 후, 상층액을 수거하여 다시 80% 에탄올 1-2 ml를 첨가하여 재차 원심분리 (4℃, 3200 rpm, 15min)를 하여 상층액을 수거하고 evaporation하였다. 그 후 500 μl의 물을 첨가하여 잘 섞은 후 ethylacetate:cyclohexane (1:1, v:v)의 혼합액을 1-1.5 ml를 첨가하여 -70℃에서 수층을 결빙시키고, 상층액만 수거하는 과정을 2회 반복하여 용매 증발 후 filtering된 에탄올 200 μl을 첨가하여 호르몬 측정 시까지 냉동 보관하였다. 난의 cortisol과 E<sub>2</sub>의 농도 측정은 Kobayashi et al. (2006)의 방법에 따랐다. 실험에 사용된 항체는 모두 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 얻었



다. Standard 호르몬들은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA)와 Sigma Chemical (St. Lousi, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사표지된  $[1,2,6,7-^3\text{H}]-\text{cortisol}$ 와  $[2,4,6,7-^3\text{H}]-\text{E}_2$ 은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였다.

홍بار리 친어로부터 수온과 광주기 조절을 통해 획득한 난을 대상으로 난의 상태(미수정란, 수정란, 부상란, 침강란)에 따라 cortisol과 estradiol- $17\beta$  ( $\text{E}_2$ )의 농도를 측정하였다. 1차 실험에서 미수정란, 수정 후의 부상란과 침강란을 대상으로  $\text{E}_2$  및 cortisol 농도를 조사한 결과는 Fig. 41과 같다. 미수정란, 부상란 그리고 침강란의  $\text{E}_2$  농도는 각각  $3.5 \pm 2.21$ ,  $3.54 \pm 0.97$  그리고  $1.23 \pm 0.30$  pg/egg (mean  $\pm$  SE)로 나타나 침강란에서 상대적으로 낮은 값을 보였다. Cortisol 농도는 각각  $11.34 \pm 4.50$ ,  $10.17 \pm 1.48$  그리고  $13.16 \pm 4.73$  pg/egg (mean  $\pm$  SE)로 나타났으나 세 그룹간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

2차 실험에서는 미수정란, 부상란, 침강란 그리고 수정 후 12시간과 24시간때의 부상란과 침강란으로 구분하여  $\text{E}_2$ 와 cortisol의 농도를 조사하였다(Fig. 42). 미수정란, 부상란 그리고 침강란의  $\text{E}_2$  농도는 각각  $15.82 \pm 1.71$ ,  $5.93 \pm 3.24$  그리고  $14.50 \pm 3.29$  pg/egg (mean  $\pm$  SE)로 나타나 부상란에서 낮은 농도를 보였다. Cortisol 농도는 각각 4.27,  $11.11 \pm 3.41$  그리고 4.41 pg/egg로 나타나 부상란이 상대적으로 높은 농도를 보였다. 수정 후 12시간과 24시간째 부상란과 침강란에 함유된  $\text{E}_2$  농도를 조사한 결과, 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만 수정 후 12시간의 부상란, 침강란 그리고 수정 후 24시간 이후의 부상란, 침강란의 cortisol 농도는 각각  $4.06 \pm 1.01$ ,  $7.45 \pm 0.24$  pg/egg 와  $9.87 \pm 8.24$ ,  $13.94 \pm 6.52$  pg/egg로 나타나 시간이 지날수록 부상란과 침강란 모두에서 cortisol 농도가 증가하는 경향을 보였고, 부상란에 비해 침강란이 더 높은 값을 보이는 것으로 나타났다.

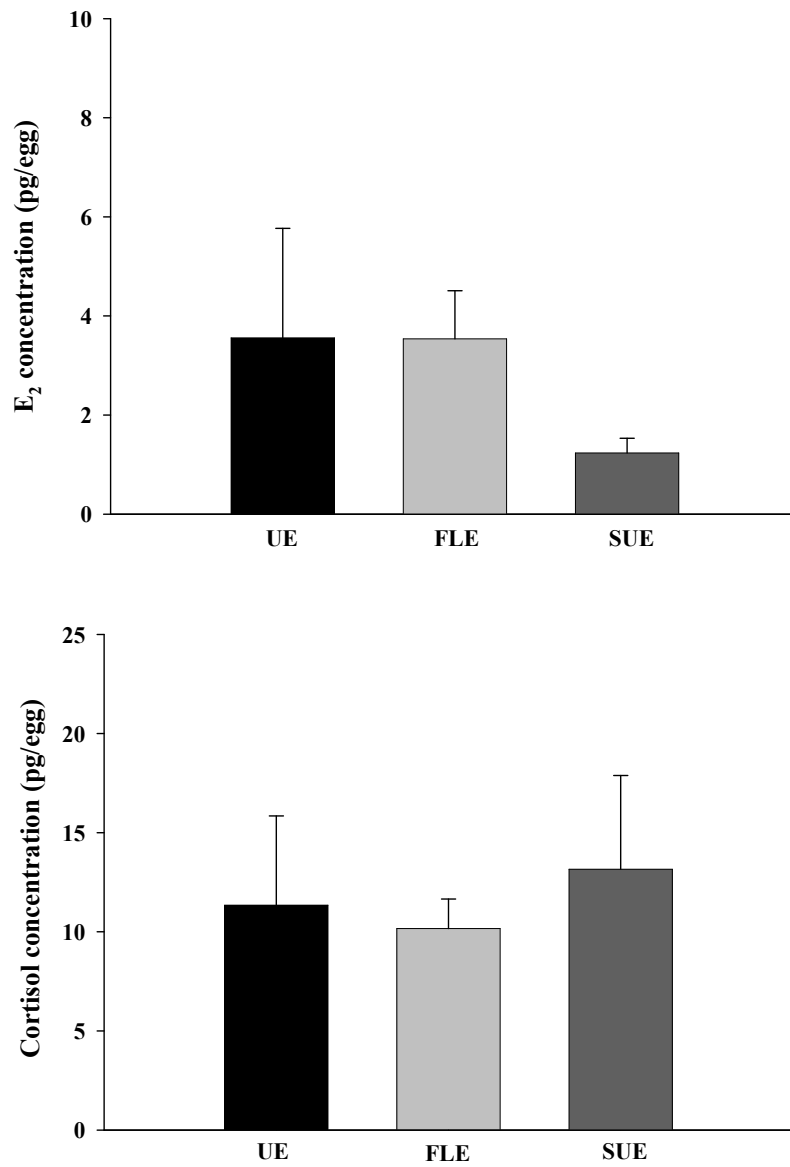


Fig 41. E<sub>2</sub> and cortisol concentration in unfertilized, fertilized and sunken eggs from blacktip grouper, *E. fasciatus* (1st. experiment). UE: unfertilized eggs, FLE: fertilized eggs, SUE: sunken eggs.

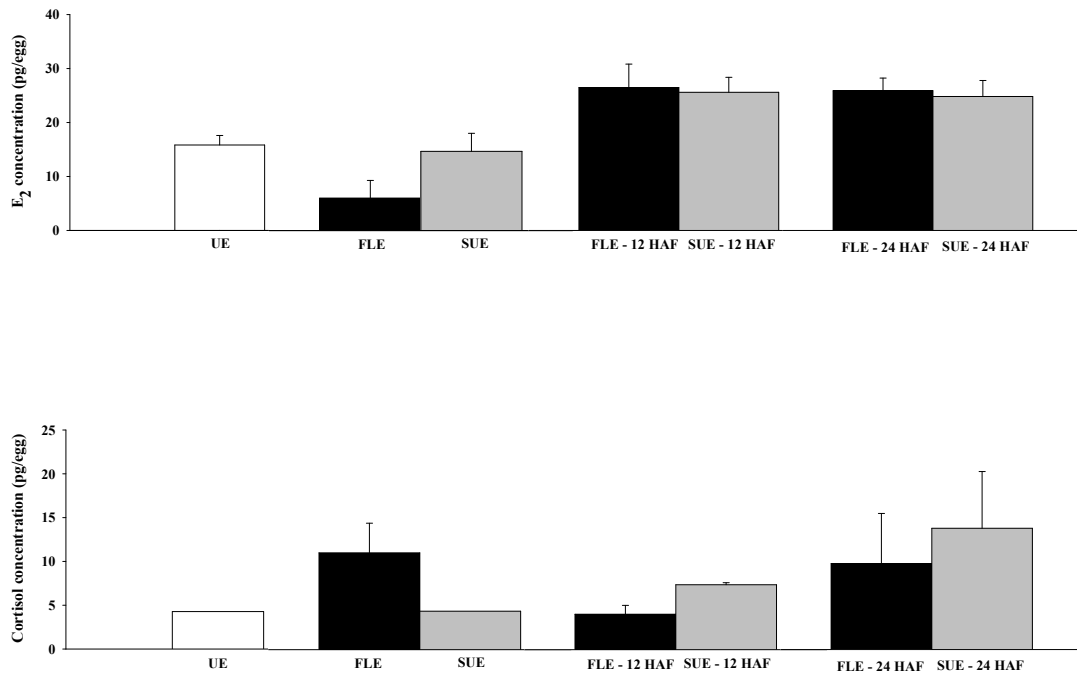


Fig 42. Changes of E<sub>2</sub> and cortisol concentration in unfertilized, floating, sunken, floating and sunken eggs of 12 HAF, floating and sunken eggs of 24 HAF from blacktip grouper, *E. fasciatus* (2nd. experiment). FLE-12h: floated eggs of 12 hours after fertilized, SUE-12h: sunken eggs of 12 hours after fertilized, FLE-24h: floated eggs of 24 hours after fertilized, SUE-24h: sunken eggs of 24 hours after fertilized.

수정 전의 난에 축적된 E<sub>2</sub>는 수정 후의 난발생 과정을 원활하게 진행시킬 수 있다고 하였다 (Brooks et al., 1995). 어미로부터 유래된 스테로이드 호르몬의 일부는 난으로 전달되어 자어의 초기발달에 관여하기 때문에 난질에도 영향을 미치는 것으로 몇몇 연구자들이 추측하고 있다. 또한 어미 유래의 스테로이드 호르몬은 초기자어 시기에 급격히 감소하여 외부 먹이를 섭취할 시기나 호르몬 기능을 나타내면서 다시 증가한다고 보고하고 있다(Tanaka et al., 1995; Stratholt et al., 1997; Tagawa et al., 2000). 스테로이드 호르몬인 E<sub>2</sub>와 cortisol은 어류의 생식연주기와도 관련이 있으며, 수정란과 발생배를 거쳐 부화자어에서도 측정된다고 알려져 있다(Rothbard et al., 1987; Feist et al., 1990; de Jesus and Hirano 1992; Iwamatsu et al., 2005, 2006). 본 연구에서 E<sub>2</sub>의 농도는 난의 상태에 따라 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. 난의 cortisol 농도는 수정 이후 부화시기까지 급격히 감소하며, 부화 후 서서히 증가한다고 알려져 있다. 무지개송어에서 배란시기에 cortisol 양의 90%정도가 “water hardening”이 일어나면서 소실된다고 보고되어 있다 (Brooks et al., 1995). 시간에 따른 cortisol 농도를 측정한 2차 실험 결과, 수정 직 후 부상란에서  $11.11 \pm 3.41$  pg/egg로 비교

적 높은 값을 보였으나 12시간이 경과한 후, 부상란과 침강란의 cortisol 농도는 각각  $4.06 \pm 1.01$ ,  $7.45 \pm 0.24$  pg/egg로 나타나 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다. 수정 후 24시간째 즉, 부화 시기에 가까워지면서 부상란과 침강란 모두에서 cortisol이 증가하는 경향을 보였다. Hwang et al. (1992)은 무지개송어, 틸라피아, 은어, 밀크피쉬 그리고 yellowfin bream (감성돔의 일종)을 대상으로 수정란부터 부화 이후의 cortisol 농도를 측정 한 결과, 모든 어종에서 부화 전까지 감소하다가 부화 직전부터 증가하는 것으로 보고하였다. 그러나 증가하기 시작하는 시점은 어종마다 차이를 보였는데, 이는 cortisol의 역할 시점이 각 기 다른 것으로 추측하고 있다. De Jesus et al. (1990)은 넙치 자어를 대상으로 한 연구에서, 수정란에서부터 축적된 cortisol이 thyroid hormone을 활성화시키며 이로 인해 자어의 생존율과 성장이 촉진되었다고 하였지만, 현재까지 난 내의 cortisol 농도가 어떤 역할을 하는지는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 또한 난 내의 성 스테로이드 호르몬 역시 cortisol과 유사하게 수정 후 부화시기까지 감소하는 것으로 알려져 있다 (Feist et al., 1990).

본 연구 결과, 홍바리의 미수정란, 수정란 그리고 침강란에 함유된  $E_2$  농도 변화는 뚜렷한 경향을 보이지 않아, 난질평가 인자로 제시하기에는 어려울 것으로 생각되어 더 많은 보충 실험이 필요한 것으로 생각된다. 그러나 2차 조사에서 보인 부상란과 침강란의 cortisol 변화량을 살펴보면, 부상란에서는 수정 직후부터 수정 후 12시간 후 사이에 급격한 감소를 보인 반면 침강란은 별다른 변화를 보이지 않았다. 이와 같은 결과로 볼때 홍바리 난에 함유된 cortisol 농도는 초기 난발생 과정 중에 활용 가능한 난질평가 인자라고 생각된다.

#### 나. 유전학적 난질인자 탐색

난 구성물질 중 난질을 결정하는 가장 중요한 물질은 난황단백질이며, 난황단백질의 전구체인 vitellogenin (VTG)은 난모세포의 VTG receptor를 통해 난모세포로 전달되며 lipovitellin과 phosphoproteins으로 나뉘어 난의 발생과 배 발달의 영양원으로 이용된다. Cathepsin은 lysosomal endoproteases로 VTG가 단백질가수분해를 통해 난황단백질로 전환 되는 과정에 영향을 미친다고 보고되고 있다(Busson-Mabillot, 1982, 1984; Hart et al., 1987; Yamashita and Konagaya 1991; Carnevali et al., 1993; Sire et al., 1994). 따라서 난황형성에 관여하여 난질과 연관이 있을 것으로 사료되는 Cathepsin D와 Cathepsin L의 부분염기서열 확인과 난황형성 초기의 난, 배란직후 미수정 난, 수정직후 부상란과 침강란 그리고 부화된 자어에서 발현을 측정하여 난질평가 요인으로서의 가능성을 탐색하였다.

##### (1) Cathepsin D와 Cathepsin L의 부분염기서열 cloning

Cathepsin D의 partial cloning을 위해 orange-spotted grouper *Epinephelus merra* (accessionnumber, GU988627), mi-iuy croaker *Miichthys miuy* (accessionnumber, HM628578), barramundi perch *Lates calcarifer* (accession number, EU143237) 그리고

barred knifejaw *Oplegnathus fasciatus* (accession number, AB597935)에서 보고된 염기서열을 참고로 degenerate primer를 제작하였으며, Cathepsin L의 partial cloning을 위해 gilthead seabream *Sparus aurata* (accession number, DQ875329)과 tongue sole *Cynoglossus semilaevis* (accession number, JF772216)에서 보고된 염기서열을 참고로 degenerate primer를 제작하였다(Table 7).

Table 7. Primer sets used for the cloning and qRT-PCR of CTSD and CTSL

Primer	Sequence	Note
CTSD F CTSD R	CSACTCCAGAAMYCCTGAAG ATGAAGCRGCTCAGACARAT	Forward and reverse primers set for CTSD partial cloning
CTSL F CTSL R	AAAGAGGARGGCTGGAGRAG CYTGTCCCTSRAAGCCRTAA	Forward and reverse primers set for CTSL partial cloning
qRT-CTSD F qRT-CTSD R	TTCACTGCTCCATGTTTCGAC AGCGAAGTCAGTGCCATTCT	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of CTSD
qRT-CTSL F qRT-CTSL R	AACAGGGTCCATCCTGTCTG CGCTGCTCCTCATTCTCTCT	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of CTSL

홍바리의 생식소 조직을 이용해 제작한 cDNA를 주형으로, Cathepsin D와 Cathepsin L mRNA의 부분 염기서열을 조사한 결과 각각 1123 bp, 751 bp를 확인하였다(Fig. 43).

```
(A) Cathepsin D mRNA partial sequence 1123 bp
CCCATTCCAGAAATCCTGAAGAACTACCTTGACGCCCAAGTATTACAGGGGAGATCGGCC 60
GTGGGACTCCTCTTCAGCCCTTCACCGTGGTGTTCACACGGGCTCCTCCACCTGTG 120
GGTGCCCTCCGTTCACTGCTCCATGTTTCGACATCGCCTGTGGCTTCACCAACAGTATAA 180
CTCCGCCAAGTCCAGCTCCTACGTGAAGAAATGGCACTGACTTCGCTATCCAGTATGGAG 240
TGGCAGTTGTTCGGGCTACCTCAGTCAGGACACATGCACAATTGGAGACATATCTGTGGA 300
GAAGCAGCTTTTCGGTGAAGCCATCAAGCAGCCCGGGCTGACCTTTATCGCAGCCAAAGTT 360
TGATGGGATCCTCGGCATGGCGTACCCTCGCATCTCCGTGGACGGGGTGGCTCCGGTCTT 420
TGACAAACATCATGGACCAGAAGAAGGTTGAAAGTAACTCTCTCCTTCTACCTGACACAG 480
AAACCCCGGACTGAGCCCGGGTGGCTGATTTCTGGGAGAACTGACCCCAAACTACTA 540
CAGCGGGGAGTTCAACTACATGAACATCACCCGGCAGGCTACTGGCAGATCCACATGGA 600
CGGATGGCCGTTGGCAGCACTCTGAGCCTGTGTAAGGAAGGCTGTGAGCCATCGTGA 660
CACCGGAGCTCTCTGATCACTGGCCCTGCCACAGAGGTCAAGGCCCTGCAGAAAGCCAT 720
CGGAGCCATGCCACTGATGCAGGGAGAGTACATGGTGAACGTGACAAAATTCATCGCT 780
GCCCGTCACTAGCTTACGTTGGGAGGAAAGACCTACACTCTGACTGGAGACGATACAT 840
CCTGAAGGTGAGCAGCGGGGAAAGACCATGTGTCTGAGCGGCTTATGGCCCTGGACAT 900
CCCCCTCCCGCGGGCCCTGTGGATTCTGGGAGATGTATTGATGGCCAGTACTACAC 960
CGTGTGTTGATCGGGACAACAACAGAGTGGGCTTTGCCAAGTCCAAAGTGAACACACGTT 1020
AAGTGCAAGCTAARACATCAAGTTTTGGGAGACAAAATCTGAGGTGCACATGTTTTCTG 1080
TTGCTTGCAATCAGACAGTATTAGCAATAGAGTTGTGTAG 1123

(B) Cathepsin L mRNA partial sequence 751 bp
AAAGAGGAAGGCTGGAGGAGTGGTGGGAGAAGAACCTGAAGAAAATCGAGCTGCAC 60
AACCTGGAGCACTCCATGGGCACACACTCCTACCGCCCTGGGCATGAACCACTTTGGAGAC 120
ATGACTCACGAGGAGTTCAGGCACTCATGAACGGCTACAGGCGCAAGCAGAGAGGAAA 180
CCCAGGGATCCCTGTCTGGAGCCCAACTCCTGGAGGCCCAAAATCTGTGACTGG 240
AGGGACGAAGGCTACCTCACCCCGTCAAGGATCAGGGTCAAGTGTGGCTCTTGTGGGCC 300
TTCAGCACTACCGGAGCTCTGGAGGCTCAGCACTTCAAGAAACCGGCATACTGTGTGCG 360
CTGAGCGAGCAGAACTGTGGGCTGCTCCAGACTGAGGGCAACGAGGGCTGCACCGGT 420
GGTCTGATGGACCAGGCCCTCCAGTACGTCGAGGACACCAATGGCCTGGACTGTGAGGAC 480
TCTTACCCCTACCTGGGACGGACGACCCAGCCGCTGACACTAGCACCACATACAACCTCT 540
GTCAACGACACTGGATTCTGTCGACATCCCAAGTGTGTAAGGAGCGCGCTGTGATGAGGCT 600
GTGGCCCGGTGGGACCCGTTTCAGTCCGATCGACGCGGCGCATGAGTCTTTCGAGTTT 660
TACCAATCAGGAATCTACTATGAGAAGGAATGCAGCAGCGAGGAGCTGGACCCAGGCGTG 720
CTGGTCTGGTTACGGCTTTCAGGGACAAG 751
```

Fig. 43. Cathepsin D and Cathepsin L mRNA partial sequencing of blacktip grouper, *E. fasciatus*.

(2) Cathepsin D와 Cathepsin L의 발현양 측정

난황형성 초기의 난, 배란직후 미수정 난, 수정직후 부상난과 침강난 그리고 부화된 자어를 샘플링하여 total RNA분리 및 cDNA합성하였다. 각각의 샘플에서 Cathepsin D와 Cathepsin L의 발현양 측정은 quantitative Real-time RT-PCR을 이용하였다. 각 샘플은 2 반복 이상 측정하였으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량을 하였다. 측정 값의 통계처리는 SPSS version 12.0을 이용하였으며, ANOVA-test를 실시하여 Duncans's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

난황형성 초기난, 미수정난, 수정난(부상난, 침강난)과 부화후 1일에서 3일까지의 자어에서 Cathepsin D와 Cathepsin L mRNA의 발현양을 측정하였다. 난에서 Cathepsin D mRNA의 발현은 난황형성 초기난에서 매우 낮은 발현이 나타났으며 미수정난과 수정 후 부상난에서 유사하게 높은 발현이 나타났다. 하지만 침강난에서는 미수정난과 부상난에 비해 낮은 발현이 나타났다(Fig. 44A, a). 부화자어에서의 Cathepsin D mRNA의 발현은 부화 후 1일부터 3일까지 점점 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 44A, b). 난에서 Cathepsin L mRNA의 발현은 난황형성 초기난에서 매우 낮은 발현이 나타났으며 미수정 난에서 높은 발현이 나타났다. 수정후 부상난과 침강난에서는 미수정난에 비해 낮은 발현이 나타났으며 부상난에서가 좀 더 높은 발현이 나타났다(Fig. 44B, a). 부화자어에서의 Cathepsin L mRNA의 발현은 부화 후 1일째 높았으며 2일과 3일째에 유사하게 낮게 나타났다(Fig. 44B, b).

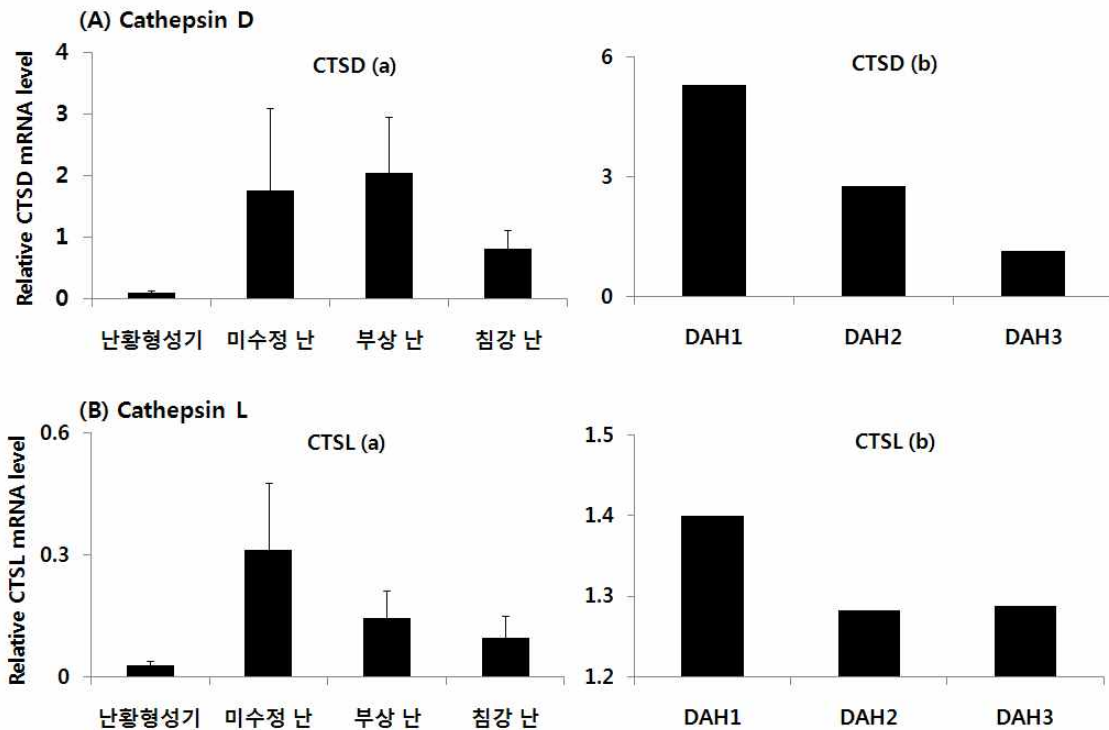


Fig. 44. CTSD mRNA (A)와 CTSL mRNA expression of blacktip grouper, *E. fasciatus*.

Cathepsin D와 Cathepsin L은 미수정란과 수정 후 부상란에서 높게 나타난 반면 난황형성기 난과 침강란에서는 상대적으로 낮게 나타나 두 유전자의 유사한 발현 양상이 나타났다. 이와 유사한 결과는 seabream(Carnevali et al., 1999), Perch(Kestemont et al., 1999), Rainbow trout(Kwon et al., 2001)에서 보고된바 있다. 홍바리와 같은 수정 후 난이 부상되는 부상란의 성질을 갖는 Seabream의 수정란에서 침강란의 Cathepsin D의 발현이 부상란에 비해 높게 발현되었고, 이는 침강란은 난질이 저하되어 폐사되어가는 과정이라 에너지소비를 하지 않아 나타난 결과라 고찰하였다. 하지만 홍바리에서는 반대로 부상란에서가 침강란에 비해 두 유전자 모두 높게 나타났다. 홍바리 침강란에서의 낮은 발현은 수정 후 침강 되는 침강란들은 배란초기부터 난황물질이 충분하지 않거나 다른 이유로 정상적인 발생이 진행될 수 없는 생존가능성이 낮은 난이었기 때문에 Cathepsin D와 Cathepsin L의 유전자 발현이 낮게 나타난 것이라 사료된다. Cathepsin D와 Cathepsin L은 난황물질의 축적과 소비와 영향이 있으며, 부화자어에서 부화 일수가 지날수록 두 유전자의 발현이 감소하는 이유도 점차 난황물질을 흡수하고 소비하였기 때문이라 생각된다. 따라서, Cathepsin D와 Cathepsin L은 홍바리의 초기 발생과정에 있어 난질평가의 유전적 marker로서 가능성이 있다고 생각된다.

#### 다. 우량란의 초기 생존력

인공 배란 유도된 홍바리의 수정란 중 수정율과 부상율이 우수한 2개체(부화율 98% 개체: TL 27cm, BW 319g, /부화율 90% 개체: TL 33cm, BW 599 g)를 대상으로 자어 활력도 (survival activity index, SAI)를 조사하였다. Shields et al. (1997)의 방법에 따라 24-well plate (Nunc A/S, Denmark)에 UV로 살균된 해수를 1 ml씩 채운 후, 수정란을 1개씩 pasteur pipette으로 옮겼다. 이 후, 항온실 (25±0.5℃)에서 외부 먹이를 전혀 공급하지 않은 상태에서 하루 2회(09:00, 21:00)씩 폐사 개체를 계수하였다. 부화 직 후부터 매일 난황 및 유구 용적 변화를 조사하였고, 실험은 3반복으로 진행되었으며 다음의 식으로 SAI, 난황 용적, 유구 용적을 구하였다.

$$SAI = \sum_{i=1}^k (N - h_i) \times i / N$$

N, 시험개시 시 자어 수

H<sub>i</sub>, i번째 까지의 누적사망 자어 수

K, 자어가 모두 사망한 때까지의 일 수

(Shimma and Tsujigado, 1981)

$$Yolk\ volume = \pi/6 \times lh^2$$

l, 난황 장경; h, 난황 단경

$$\text{Oil globule} = \pi/6 \times d^3$$

d, 유구경

(Blaxter and Hempel, 1963)

실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS 통계 패키지 (Ver. 17.0)를 이용하여 one-way ANOVA test로 평균간의 유의성 ( $p < 0.05$ ) 검증을 실시하였고, 난소액 pH와 수정율, 부상율과의 관계는 단순회귀분석 (Simple Regression Analysis)을 통해 서로 간의 상관관계를 조사하였다 ( $p < 0.05$ ).

부화 자어는 부화 후 5~6일까지 생존하였고(Fig. 45), 그룹 간의 평균 난경, 난황흡수율 및 유구 용적변화에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 부화 후 2~3일까지 급속도로 난황과 유구의 흡수가 진행되어(Fig. 46, 47), 이 시기에 대부분의 난황이 흡수된 것으로 관찰되었으며, 부화 4일차에 입이 열리고 가슴지느러미가 발달하였다(Fig. 48). 모든 실험구에서 매일 자어사망개체를 계수하여 SAI를 조사한 결과, 실험 종료 시점에서 그룹 1과 그룹 2의 SAI값은 각각 4.2와 3.5로 조사되었다(Fig. 49). 또한 그룹 1이 일령별 SAI에서 비교적 높게 나타났고, 개구 후부터 SAI값의 차이가 두드러졌으나 통계적인 유의차는 존재하지 않았다 ( $p > 0.05$ ).

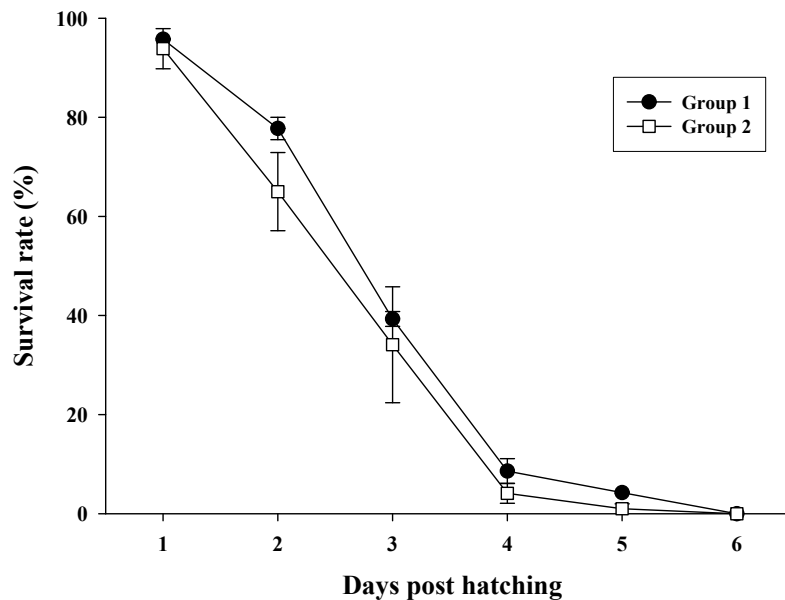


Fig 45. Changes of survival rate in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae after hatching.



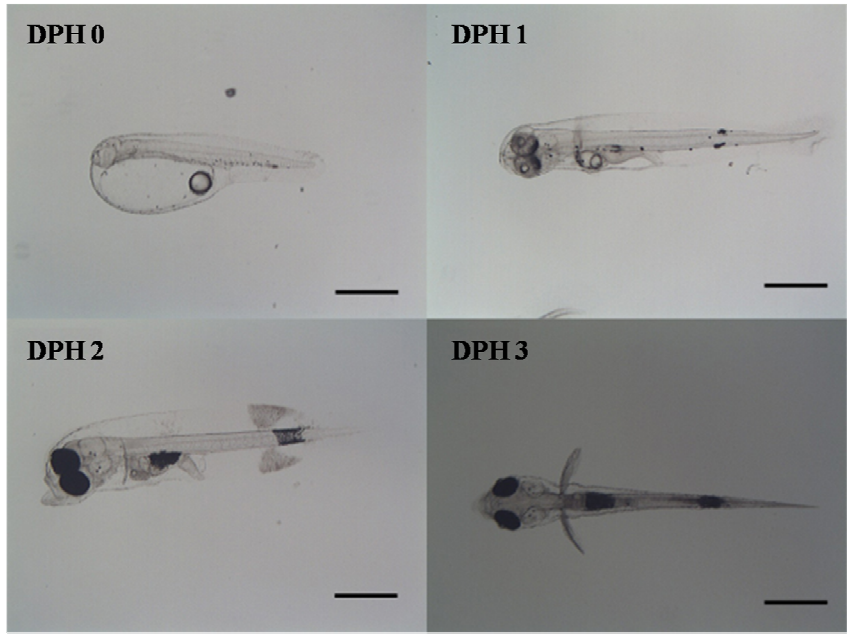


Fig 46. Early development of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae on starved condition. DPH: days post hatching. scale bar=500 um.

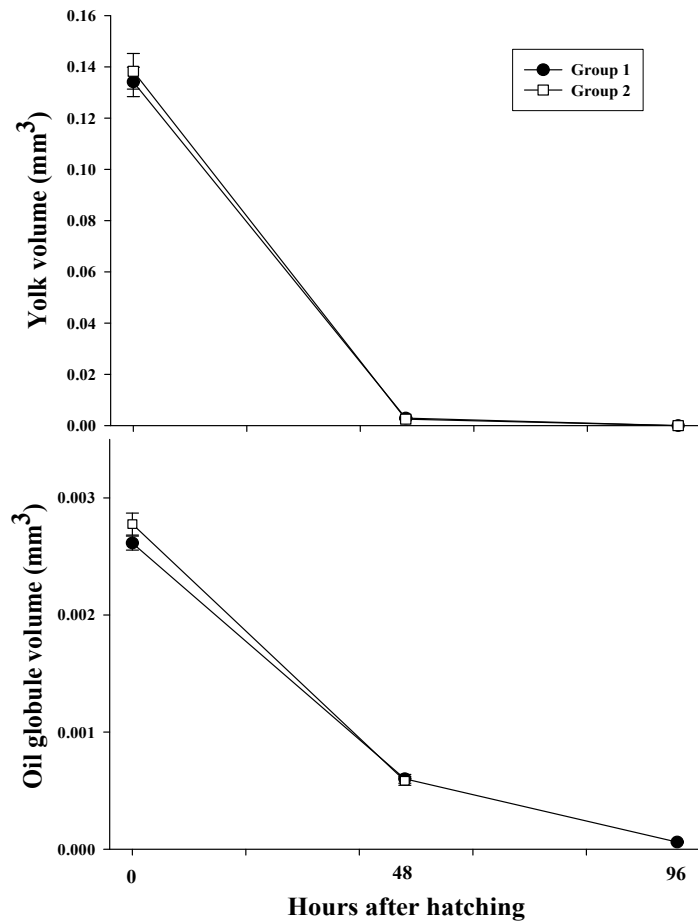


Fig 47. Changes of yolk and oil globule volume in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae after hatching.

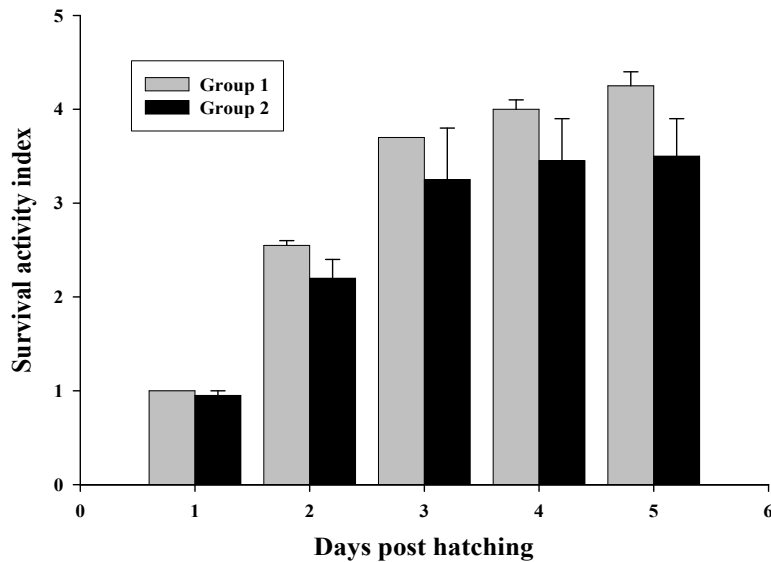


Fig 48. Sum of daily SAI in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae on starved condition.

해산어류의 초기 생존율은 자체 난황으로부터의 영양섭취가 완료된 후 외부 영양섭취로 이행하는 단계에서 첫 먹이 섭취의 성공 여부에 의해 크게 좌우된다 (Strussmann and Takashima, 1990). 이러한 초기 생존율의 차이는 같은 종 내에서도 나타나는데, 이는 난질에 영향을 크게 미치는 어미의 상태 (연령, 영양상태 등)에 의해 좌우된다. 특히 난황이 큰 자어는 난황이 작은 자어와 비교해 볼 때, 체조직과 난황에 많은 양의 에너지를 보유할 수 있기 때문에 point of no return (PNR)에 도달하기 전까지 먹이를 섭취할 수 있는 시간적 여유가 많은 것으로 알려져 있다 (Bagarianao, 1986). 따라서 초기생존력의 산정은 난 및 자어의 품질 평가 기준으로 주로 이용되고 있다.

*Pseudocaranx dentex*의 경우, 정상수온 범위 내에서 SAI값이 6이상이면 자어 사육 시 생존율이 비교적 높다고 하였고 (Mushiake et al., 1993), Lee et al. (1997)도 붉바리를 대상으로 SAI를 평가한 결과, 1.8~9.6의 범위로 조사되었으며 이는 어미 유래에 의한 차이가 SAI에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 한편 Furuita et al. (2003)는 SAI는 어미의 영양상태, 특히 EPA의 양에 의해 영향을 받는다고 하였는데, 본 실험에 이용된 두 그룹 모두 높은 EPA 함유량을 보여 비교적 높은 자어활력도를 보인 것으로 추측한다. 본 실험의 결과는 부상율과 수정율이 좋은 두 그룹의 수정란을 대상으로 실시하여 그룹간의 유의한 차이는 보이지 않았으나, 이전의 다른 유사한 결과와 비교하여 볼 때 비교적 높은 SAI를 나타내어 본 실험에 사용된 홍바리 난 및 자어의 품질이 좋은 것으로 판단된다.

## 제 4절 홍바리 고품질 수정란 생산 및 종묘생산성 향상 연구

### 1. 정자동결보존

정자 동결보존 실험은 실내수조에서 자연적 성 전환된 홍바리의 정액을 채취하여 실시하였다. 정액 채취는 배정이 확인된 홍바리를 대상으로 HCG (Human chorionic gonadotropin, Calbiochem Co., USA) 500 IU/kg BW로 등지느러미 제 1극 아래 부분 근육에 주사 후 24~48 시간째에 복부를 압박하여 채정하였다. 정액은 1.5 ml 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box (2~4℃)에 보관하였다.

홍바리 정자 동결보존을 하기 위한 정자 동결보존에 적합한 희석액(diluent)과 동해방지제(cryoprotectant)를 탐색하기 위하여 2가지 희석액과 2가지 동해방지제를 사용하였다. 희석액은 glucose와 marine fish ringer solution (MFRS)을 사용하였으며, 동해방지제는 dimethylsulfoxide (DMSO)와 Test Yolk Buffer (TYB, Irvine Scientific)를 사용하였다 (Table 8). 정액과 희석액의 삼투압 농도와 pH는 각각 삼투압 측정기 (The Advanced™ Osmometer)와 pH 측정기 (Mettler Toledo)를 이용하여 조사하였다.

Table 8. Constituents of the diluents tested for cryopreservation of blacktip grouper, *E. fasciatus* sperm

Diluents	Constituent
2.5% glucose	Glucose, 2.5 g/100 ml DW <sup>1)</sup>
5.0% glucose	Glucose, 5.0 g/100 ml DW
10.0% glucose	Glucose, 10g/100 ml DW
MFRS <sup>2)</sup> (g/L DW)	CaCl <sub>2</sub> , 0.346; KCl, 0.597; MgCl <sub>2</sub> , 0.017; NaCl, 13.5; NaHCO <sub>3</sub> , 0.025

<sup>1)</sup>DW, distilled water; <sup>2)</sup>MFRS (marine fish ringer solution), Chang et al., 1999.

가. 혈장과 희석액의 물리적 특성

홍바리 혈장의 pH는 7.69, 삼투압 농도는 360 mOsm/kg이었다. 그리고 동결보존에 사용한 2.5% glucose, 5.0% glucose, 10.0% glucose와 MFRS의 pH는 각각 6.40, 6.81, 7.39, 7.55이었고, 삼투압 농도는 145, 288, 585, 483 mOsm/kg이었다(Table 9).

Table 9. Osmolarity and pH of seminal plasma of blacktip grouper, *E. fasciatus* and diluents used for cryopreservation

		Osmolality (mOsm/kg)	pH
Fish	Plasma	360	7.69
Diluents	2.5% glucose	145	5.06
	5.0% glucose	288	4.73
	10.0% glucose	585	4.76
	MFRS <sup>1)</sup>	438	7.11

<sup>1)</sup>MFRS, marine fish ringer solution.

나. 해동정자의 운동성 평가

정자동결보존 과정에서 동해피해 방지를 위한 각각의 희석액과 동해방지제 종류의 혼합비율은 Song (2004) 등의 방법을 응용하여 설정하였다(Table 10). 모든 실험구의 평형시간은 1분 이내로 하였고 정자 냉동에는 0.5 ml 용량의 정자보존용 straw를 이용하였다. 각 실험에서 정자가 주입된 0.5 ml 정자보존용 straw를 액체질소 증기(-76℃)로 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다. 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 7일간 저장한 후 30.0±0.5℃의 항온수조를 이용하여 10초 이내에 해동시켰다.

Table 10. Diluents, cryoprotectant and fresh semen mixture rate for sperm cryopreservation of blacktip grouper, *E. fasciatus*

Experimental group	Diluent		Cryoprotectant <sup>1)</sup>	Sperm	Mixture rate
	ingredient	concentration			
GDS I		2.5%			
GDS II	glucose	5.0%	DMSO	fresh semen	0.60:0.05:0.35
GDS III		10.0%			
MTS	MFRS		TYB	fresh semen	0.25:0.5:0.25

1) TYB: test yolk buffer; DMSO: dimethylsulfoxide

동결보존 후 해동된 정자의 운동성 평가는 각 실험구별 정자를 해동 후 자연해수와 1:9의 비율로 희석한 후 Integrated Semen Analysis System (ISAS)를 이용하여 운동성을 7~10회 측정하여 평균을 구하였다. ISAS 프로그램을 이용한 동결정자 운동성 평가는 정자 운동성에 따라 A그룹부터 D그룹까지 4단계로 나누어 평가하였다(Table 11). 그리고 동결정자의 해동 후 운동성 비교는 각 실험구의 A그룹 정자의 직선경로속도(VSL, straight line velocity), 평균경로속도(VAP, average-path velocity), 곡선경로속도(VCL, curvilinear velocity), 곡선경로 선형도(LIN, linearity) 그리고 선형운동도(STR, straightness)를 조사하였다(Fig. 49).

해동 후 시간 경과에 따른 정자운동성 평가는 신선정자와 동결정자 실험구를 대상으로 시간 경과에 따른 운동성을 조사하였다.

Table 11. Criteria index used to evaluate sperm motility

Class	Sperm motility
A	Forward movement rapidly
B	Forward movement slowly
C	Vibrating movement moderately
D	Immobile sperm

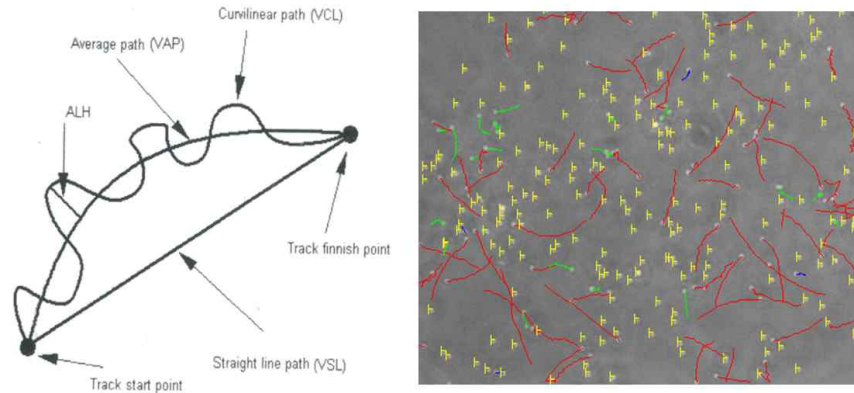


Fig. 49. Diagram and illustration used to evaluate sperm motility.

#### 다. 신선정자의 운동성

신선정자의 운동성 조사결과 실험 시작시 수정에 참여하는 것으로 생각되는 A class와 B class 정자 비율은 각각 51.8%와 5.8% 이었다. 이후 10분 경과 시 A class와 B class 정자 비율이 각각 53.6%와 11.2%로 가장 활발한 운동성을 보였다. 이후 점차 운동성이 감소하기 시작하여 1시간 30분 경과 후 운동성은 A class와 B class 정자 비율이 각각 8.3%와 4.2%로 가장 낮은 운동성을 나타내었다(Table 12).

곡선경로속도(VCL) 조사결과 시작시 65.2  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 64.6  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 59.9  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 직선 경로속도(VSL) 조사결과 시작시 21.4  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 30.0  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 14.2  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 평균경로속도(VAP) 조사결과 시작시 36.8  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 44.9  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 29.7  $\mu\text{m/s}$ 이었다(Fig. 50, Table 13).

신선정자의 곡선경로 선형도(LIN) 조사결과 시작시 32.9 %이었으며, 10분 경과 시 46.5%로 가장 높은 값을 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 23.7%이었다. 선형운동도(STR, straightness) 조사 결과 시작시 58.2 %이었으며, 10분 경과 시 66.9%로 가장 높은 값을 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 47.9%이었다(Fig. 51, Table 13)

Table 12. Change of fresh sperm motility in different groups according to the time course

	Initial	10 min	30 min	1 hour	1 hour 30 min	2 hour
Rapid progressive (A class)	51.8%	53.6%	21.7%	20.8%	8.3%	13.8%
Slow progressive (B class)	5.8%	11.2%	11.2%	11.4%	4.2%	3.6%
No progressive (C class)	0.9%	2.0%	5.1%	1.8%	1.6%	1.2%
Immobile (D class)	41.6%	33.3%	62.1%	66.0%	85.9%	81.4%

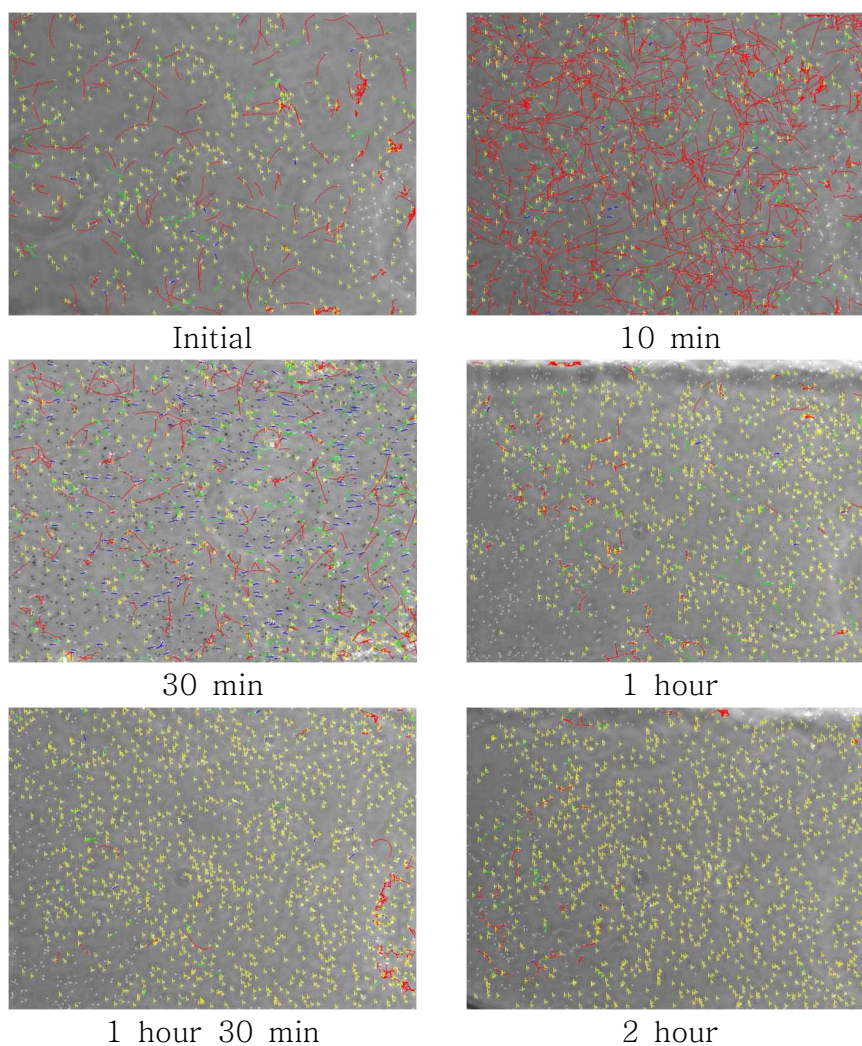


Fig. 50. Change in fresh sperm motility of blacktip grouper, *E. fasciatus* according to the time course.

Table 13. Fresh sperm motility according to the time course

	Initial	10 min	30 min	1 hour	1 hour 30 min	2 hour
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	65.2	64.6	55.9	59.5	56.7	59.9
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21.4	30.0	23.9	18.4	17.4	14.2
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	36.8	44.9	36.9	33.7	32.1	29.7
LIN (%)	32.9	46.5	42.8	30.9	30.6	23.7
STR (%)	58.2	66.9	64.9	54.6	54.2	47.9

라. 냉동정자의 해동 후 운동성

냉동정자의 해동 후 운동성 조사결과 GDS II와 GDS III 실험구에서 가장 양호하였다. GDS II와 GDS III 실험구의 해동 후 운동성을 조사한 결과 각각 A class 정자 비율은 각각 56.8%와 50.6% 이었다. 그리고 MDS와 MTS 실험구의 정자 운동성은 각각 29.1%와 25.0%이었다. GDS I의 정자 운동성은 각각 11.6%로 가장 낮았다(Table 14).

대부분 냉동정자의 해동 후 운동성 지속 시간은 30분 이내였으며, 실험구 중 가장 오랫동안 생존한 실험구는 GDS III 실험구 이었다. 신선정자의 운동성 지속시간은 2시간 이상 생존하였다.

Table 14. Change of thawed sperm motility in different groups

	GDS I	GDS II	GDS III	MDS	MTS
Rapid progressive (A class)	11.6%	56.8%	50.6%	29.1%	25.0%
Slow progressive (B class)	0.0%	1.5%	14.5%	5.1%	11.8%
No progressive (C class)	15.3%	0.3%	1.9%	2.4%	2.2%
Immobile (D class)	73.0%	41.4%	33.0%	63.4%	61.0%

마. 냉동정자의 해동 후 시간 경과에 따른 운동성

냉동정자의 해동 후 시간경과에 따른 운동성은 가장 양호한 실험결과를 나타낸 GDS III 실험구를 대상으로 조사하였다.



GDS III 실험구의 시작시 수정에 참여하는 것으로 생각되는 A class와 B class 정자 비율은 각각 45.4%와 17.2% 이었다. 이후 30분 경과 시 A class와 B class 정자 비율이 각각 50.6%와 14.5%로 가장 활발한 운동성을 보였다. 이후 점차 운동성이 감소하기 시작하여 1시간 경과 후 운동성은 A class와 B class 정자 비율이 각각 14.1%와 5.9%로 가장 낮은 운동성을 보였다(Table 15).

GDS III 실험구의 해동 후 정자 운동성 조사 결과 곡선경로속도(VCL) 조사결과 시작시 55.2  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 1시간 경과 시 64.6  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 직선경로속도(VSL) 조사결과 시작시 31.6  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 1시간 경과 시 18.5  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 평균경로속도(VAP) 조사결과 시작시 43.5  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 1시간 경과 시 34.6  $\mu\text{m/s}$ 이었다(Fig. 51, Table 16).

GDS III 실험구의 해동 후 정자 운동성 조사 결과 곡선경로 선형도(LIN) 조사결과 시작시 57.2 %이었으며, 10분 경과 시 43.7%로 낮아지기 시작하였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 1시간 경과 시 28.6%이었다. 선형운동도(STR, straightness) 조사 결과 시작시 72.5 %이었으며, 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 53.3%이었다(Fig. 51, Table 16).

Table 15. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course

	Initial	30 min	1 hour
Rapid progressive (A class)	45.4%	50.6%	14.1%
Slow progressive (B class)	17.2%	14.5%	5.9%
No progressive (C class)	2.8%	1.9%	2.6%
Immobile (D class)	34.6%	33.0%	77.4%

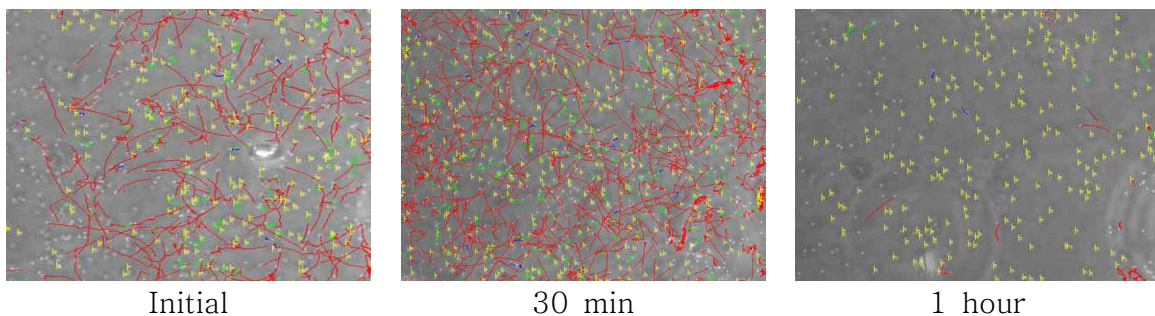


Fig. 51. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course.

Table 16. Thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course

	Initial	30 min	1 hour
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	55.2	57.8	64.6
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	31.6	25.3	18.5
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	43.5	39.2	34.6
LIN (%)	57.2	43.7	28.6
STR (%)	72.5	64.4	53.3

## 2. 수정란 및 종묘 생산

### 가. 수정란 생산

환경조절을 통한 홍바리 성숙 유도 결과를 토대로 순환여과 사육시스템의 원형 사육수조(4.5×1.2 m, 유효수량 20 ton)에 순치·사육관리 하고 홍바리를 대상으로 cannulation 방법을 이용하여 성숙 단계를 조사하였다. 실험어는 200~300 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 외부 생식공의 발달 정도에 따라 실험어를 선택하여 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm 인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 하였다. 난 성숙과 배란 유도를 하기 위해 400  $\mu\text{m}$  이상 난모세포를 가진 어미를 선별하였다(Fig. 52).



Fig. 52. Examination of sexual development in blacktip grouper, *E. fasciatus* using cannulation method.

Cannulation 방법을 이용하여 선별된 성숙유도가 가능한 암컷을 대상으로 태반성 성선자극 호르몬(HCG, Sigma Co., USA)을 사용하여 난 성숙 및 배란 유무를 조사 하였다. HCG는 생리식염수에 용해 후 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 호르몬 주사 후 24-48시간 경과 후 배란을 유도하였다(Fig. 53).



Fig. 53. Serial view images of artificial fertilization and fertilized egg.

(1) 1차 수정란 생산 실험 (2011년 3월)

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 7마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 7마리 개체 중 6마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 187 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 137 mL이었다(Table 17).

Table 17. Artificial stripping of blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs after HCG hormone injection (1st experiment)

Fish	Total length (cm)	Body weight (g)	Ovulated egg (mL)	Floating egg (mL)
1	27	305	25	23
2	27	328	25	5
3	33	555	50	40
4	31	435	25	22
5	33	568	12	2
6	30.5	518	50	45
7	26.5	277	—	—

(2) 2차 수정란 생산 실험 (2011년 5월)

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 11마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 11마리 개체 중 5마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 180 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 42 mL이었다(Table 18).

Table 18. Artificial stripping of blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs after HCG hormone injection (2nd experiment)

Fish	Total length (cm)	Body weight (g)	Ovulated egg (mL)	Floating egg (mL)
1	27	367	-	-
2	27	352	-	-
3	33	538	-	-
4	31	462	40	15
5	30.5	593	40	20
6	26.5	328	30	5
7	30.5	437	40	1
8	31.5	506	30	1
9	30.5	444	-	-
10	30.0	405	-	-
11	34.5	522	-	-

(3) 3차 수정란 생산 실험 (2011년 8월)

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 6마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 6마리 개체 중 2마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 40 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 38 mL이었다(Table 19).

Table 19. Artificial stripping of blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs after HCG hormone injection (3rd experiment)

Fish	Total length (cm)	Body weight (g)	Ovulated egg (mL)	Floating egg (mL)
1	27	386	20	19
2	33	565	20	19
3	31	482	-	-
4	30.5	685	-	-
5	26.5	362	-	-
6	30.5	437	-	-

(4) 4차 수정란 생산 실험 (2012년 2월)

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 12마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 12마리 개체 중 8마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 122 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 95 mL이었다(Table 20).

Table 20. Artificial stripping of blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs after HCG hormone injection (4th experiment)

Fish	Total length (cm)	Body weight (g)	Ovulated egg (mL)	Floating egg (mL)
1	32.4	515	50	49
2	30.5	547	—	—
3	28.4	554	5	3
4	29.3	561	7	—
5	32.3	594	10	7
6	30.2	612	10	6
7	31.5	618	20	18
8	33.7	645	—	—
9	34.8	647	5	3
10	32.5	648	—	—
11	35.5	782	—	—
12	37.5	885	15	9

(5) 5차 수정란 생산 실험 (2012년 3월)

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 10마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU hCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 10마리 개체 중 7마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 100 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 50 mL이었다(Table 21).

Table 21. Artificial stripping of blacktip grouper, *E. fasciatus* eggs after HCG hormone injection (5th experiment)

Fish	Total length (cm)	Body weight (g)	Ovulated egg (mL)	Floating egg (mL)
1	31.4	595	20	15
2	31.5	625	—	—
3	30.4	627	14	4
4	35.3	635	18	9
5	34.8	647	—	—
6	32.5	649	10	6
7	34.5	705	21	13
8	35.7	741	—	—
9	34.8	786	17	3
10	37.5	827	—	—

## 나. 자·치어 사육 및 성장

### (1) 홍바리 초기 난발생

성숙된 홍바리 암컷을 이용하여 인공 채란된 알과 수컷에서 채취한 정자를 이용 습식법으로 수정 후 시간경과에 따른 발생과정을 관찰하였다. 실험은 항온실 ( $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ )에서 실시하였으며, 광학현미경(Zeiss, Germany)과 profile projector (Mitutoyco C., Japan)를 이용하여 관찰하였다. 수정 후 발생 속도는 2세포기, 4세포기, 8세포기, 16세포기, 상실기, 포배기, 낭배기, Kuffer's vesicle 출현 및 배체형성, 부화까지 각 발생단계가 50% 이루어졌을 때를 기준으로 하였다.

홍바리 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 난경  $700\sim 800\ \mu\text{m}$ , 유구경  $160\sim 170\ \mu\text{m}$ 이었고(Fig. 54A), 수정 후 1시간 경과하여 배반이 동·식물극을 축으로 제 1난할이 시작되어 2세포기에 이르렀다(Fig. 54B). 수정 후 1시간 30분 경과하여 4세포기(Fig. 54C), 수정 후 1시간 50분 경과하여 8세포기(Fig. 54D), 수정 후 2시간 10분 경과하여 16세포기(Fig. 54E)로 발달하였다. 난할이 계속 진행됨에 따라 할구의 크기가 점점 작아져 3시간 후에 상실기(Fig. 54F), 7시간 후에 포배기(Fig. 54G)에 이르면서 배반엽이 융기되었다. 그 후 점차 배반엽이 넓어지면서 난황을 덮기 시작하였다. 수정 후 11시간 경과했을 때 배반은 점차 난황을 덮어쓰우면서 배환이 형성되는 낭배기(Fig. 54H)에 이르렀고, 14시간 후 원구가 함입되면서 배순이 형성되었다(Fig. 54I). 수정 후 16시간이 지나면서 두부 분화와 안포가 형성되었다. 이때 근절의 수는 4~5개였고, Kuffer's vesicle이 배체의 뒤쪽 부분에 출현하였다(Fig. 54J). 수정 후 20시간 경과하였을 때 안구와 이포가 형성되었고, 근절수가 19~20개로 증가하였다(Fig. 54K). 수정 후 24시간이 경과하였을 때 배체의 움직임이 시작되면서 심장박동이 관찰되었고 부화는 수정 후 28시간 만에 시작되었다(Fig. 54L).

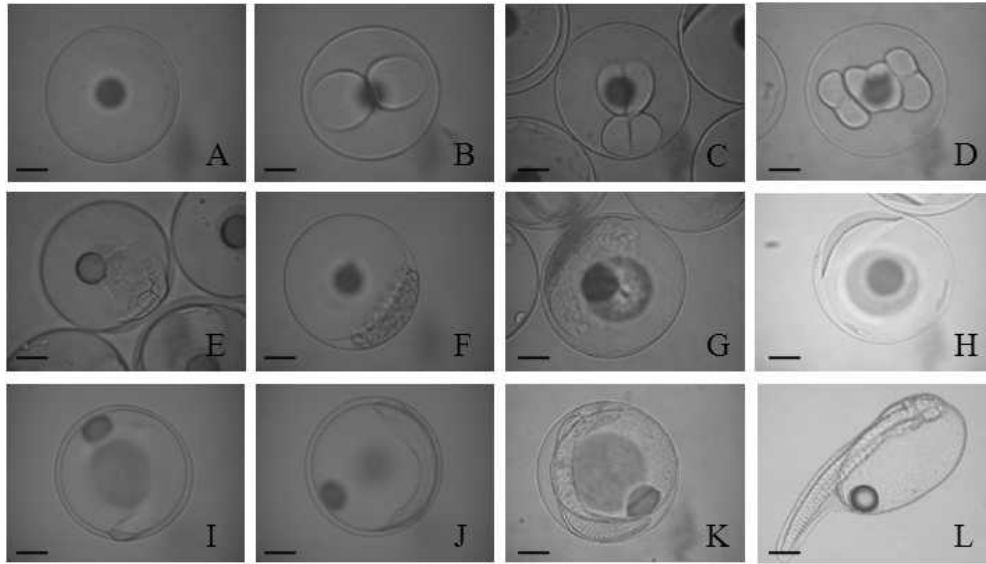


Fig. 54. Embryonic development of blacktip grouper, *E. fasciatus*. A, fertilized egg; B, 2-cell stage; C, 4-cell stage; D, 8-cell stage; E, 16-cell stage; F, morula stage; G, blastula stage; H, gastrula stage; I, early embryo stage; J, myotomes formation stage; K, lens and ear vesicle formation stage; L, hatched larval. Scale bar=150  $\mu\text{m}$  (A to K), 800  $\mu\text{m}$  (L).

## (2) 홍바리 부화자어의 발달

부화된 자어를 대상으로 난황·유구 흡수율과 개구시간 그리고 행동변화를 조사하였다.

홍바리 부화자어의 난황·유구 흡수율 및 개구시간 조사는 항온실에서 20 L 아크릴 수조에 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하여 200~500개의 수정란을 수용한 뒤 부화 직후의 자어로부터 실시하였다. 난황 및 유구의 측정은 부화 직후로부터 24시간 간격으로 5~10 마리를 표본 추출하여 2-phenoxyethanol에 마취시킨 다음 광학현미경과 profile projector하에서 측정하였다(Fig. 55). 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 아래의 식으로 계산하였다.

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

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

자어의 개구시간 조사는 난황·유구 흡수율 조사 방법과 동일한 조건에서 조사하였으며, 자어의 80%가 개구된 시점을 기준으로 하였다. 수온  $25^\circ\text{C}$ 조건에서 홍바리 자어의 부화일수에 따른 난황·유구 흡수율 변화는 Fig. 55와 같다. 난황 흡수율의 경우, 부화 직후 난황 용적 비율이  $0.040 \pm 0.006 \text{ mm}^3$  (100%)에서 부화 후 24시간에 47.5%, 부화 후 48시간에 15.8%로 대부분의 난황이 부화 후 48시간 이내에 흡수되었다. 유구 흡수율의 경우, 부화 직후 유구 용적 비율이  $0.001 \pm 0.0002 \text{ mm}^3$  (100%)에서 부화 후 24시간에 50%, 부화 후 48시간에 30%로 난황 흡수에 비해 다소 느리게 흡수되는 경향을 보였다. 부화 후 개구까지 걸린 시간은 난황흡수가 거의 완료된 부화 후 72시간째에 대부분 이루어졌다(Fig. 56).

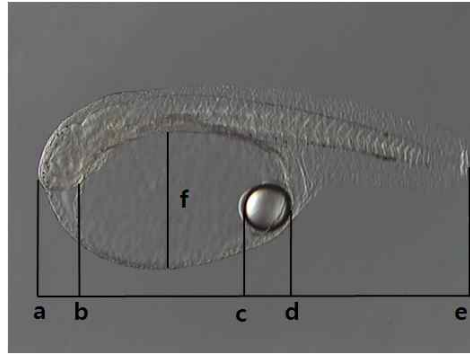


Fig. 55. Measurement of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. a-e, total length; b-d, major axis of yolk; c-d, diameter of oil globule; f, minor axis of yolk.

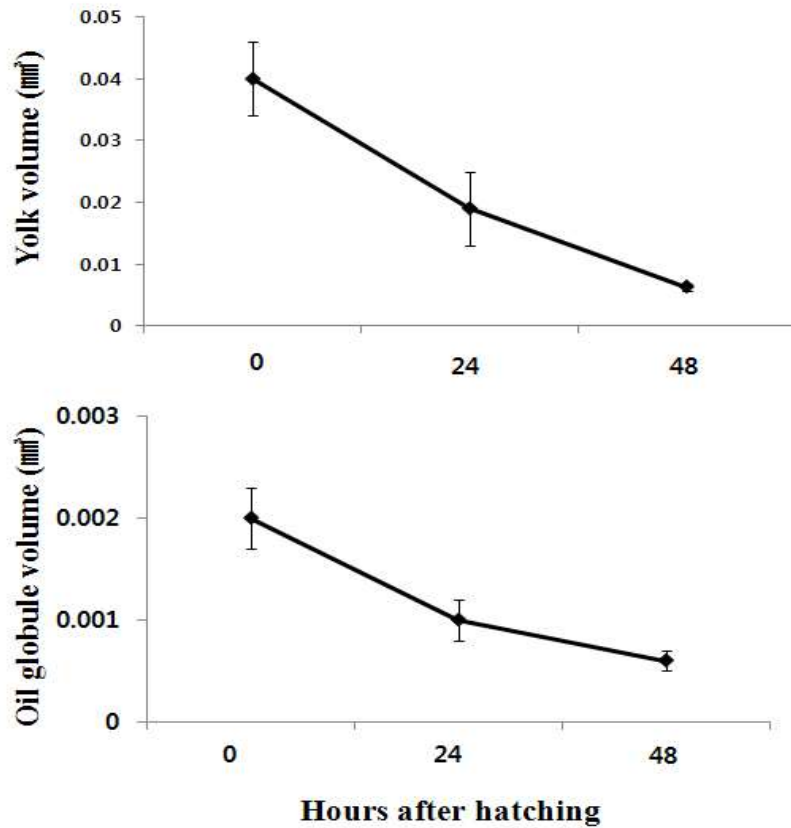


Fig. 56. Absorptions of the yolk and oil globule volume in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae according to the time course. Vertical bars indicate standard error of means.

### (3) 홍바리 자·치어의 형태 발달과 성장

부화일수에 따른 자어의 성장변화를 조사하기 위해 실내 원형수조(0.75×0.75 m, 유효수량 250 L)에서 수온 25±1℃를 유지하여 10,000~20,000개의 수정란을 수용한 뒤 부화된 자어를 정기적으로 채집하여 조사하였다(Fig. 57). 자어의 먹이로는 Rotifer, *Brachionus* sp.



를 25개체/mL 밀도로 공급하였으며, 사육수조내 Rotifer의 먹이와 수질안정을 위해 시판용 *Nannochloropsis* 와 시판용 *Pavlova*를 각각  $3 \times 10^5$  cell/mL과  $2 \times 10^5$  cell/mL 농도로 매일 2회 첨가하였다. 알테미아 유생의 공급은 부화 후 22일 후부터 시판용 영양강화제를 이용하여 영양강화 시킨 개체를 1~2개체/mL의 밀도로 공급하였으며, 부화 후 25일 후부터 250  $\mu$ m 이하의 어류요 초기 미립자사료를 로티퍼, 알테미아와 함께 공급하였다(Fig. 58). 사육수의 용존산소 유지를 위해 산소발생기를 설치하여 사육기간중 용존산소의 농도를 10 mg/mL 이상을 유지하였으며, 부화 후 20일까지 지수식을 유지하다 20일 이후 1일 1회전의 환수를 시작하여 점차 환수량을 늘려주었다.

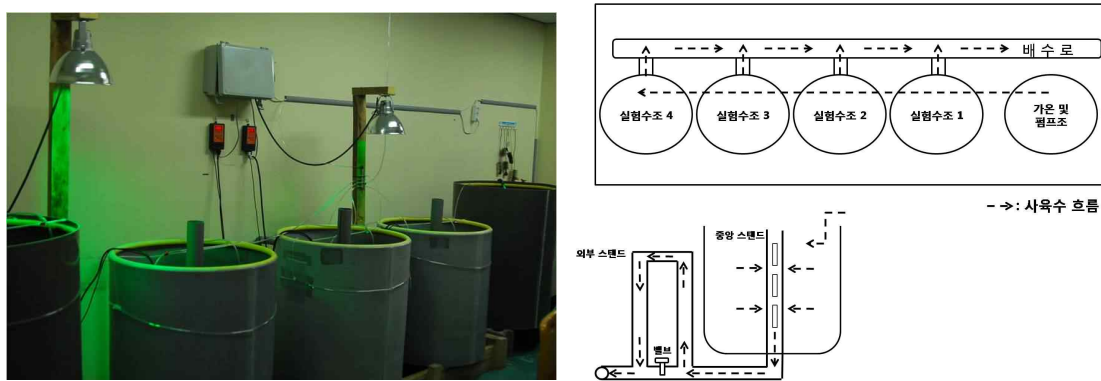


Fig. 57. Schematic diagram of rearing system of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae.

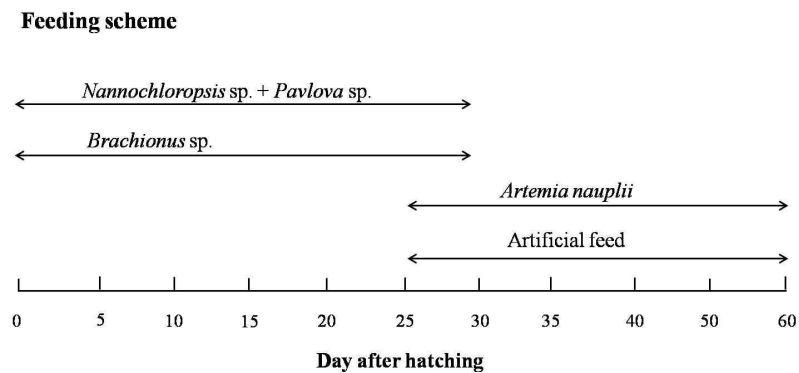


Fig. 58. Feeding scheme during the larval rearing of blacktip grouper, *E. fasciatus*.

부화 후 0~1일 : 몸의 대부분을 난황이 차지하고 있으며, 유구는 항문과 인접하여 난황의 끝 부분에 위치하였다. 항문은 난황에서 약간 떨어져 있으며 가늘고 일직선의 형태를 나타냈다. 대부분의 부화자어들은 수표면 또는 상층에 머물러 순간적인 움직임을 보이며 큰 활동성을 나타내진 않았다(Fig. 59A).

부화 후 3~6일 : 난황과 유구가 완전 흡수되었으며, 입이 개구되고 항문이 열렸다. 안구에 흑

색소포가 침적되어 안구의 형태가 확인되었으며, 위의 상단부에 흑색소포가 나타나기 시작하여 복부전체로 확산되었다. 꼬리지느러미 부분 몸통과 막지느러미에 흑색소포가 상·하 대칭으로 나타났다(Fig. 59B, C).

부화 후 9~12일 : 등지느러미 제 2극과 가슴지느러미 극이 돌출되어 나타났다. 꼬리지느러미 부분의 흑색소포는 더욱 선명하게 짙어졌으며 막지느러미의 상부에 작은 흑색소포가 나타났다(Fig. 59D).

부화 후 22일 : 후기자어로 시기로 진입하여 등과 꼬리지느러미의 기초적인 줄기가 발달하였다(Fig. 59E).

부화 후 45일 : 지느러미 분화가 완료되고, 체색이 형성되어 변태 단계를 끝내고, 자어에서 치어의 형태로 변하였다 (Fig. 59F).

부화 후 60일 후: 성체의 모습과 동일한 형태를 나타냈다(Fig. 59G).

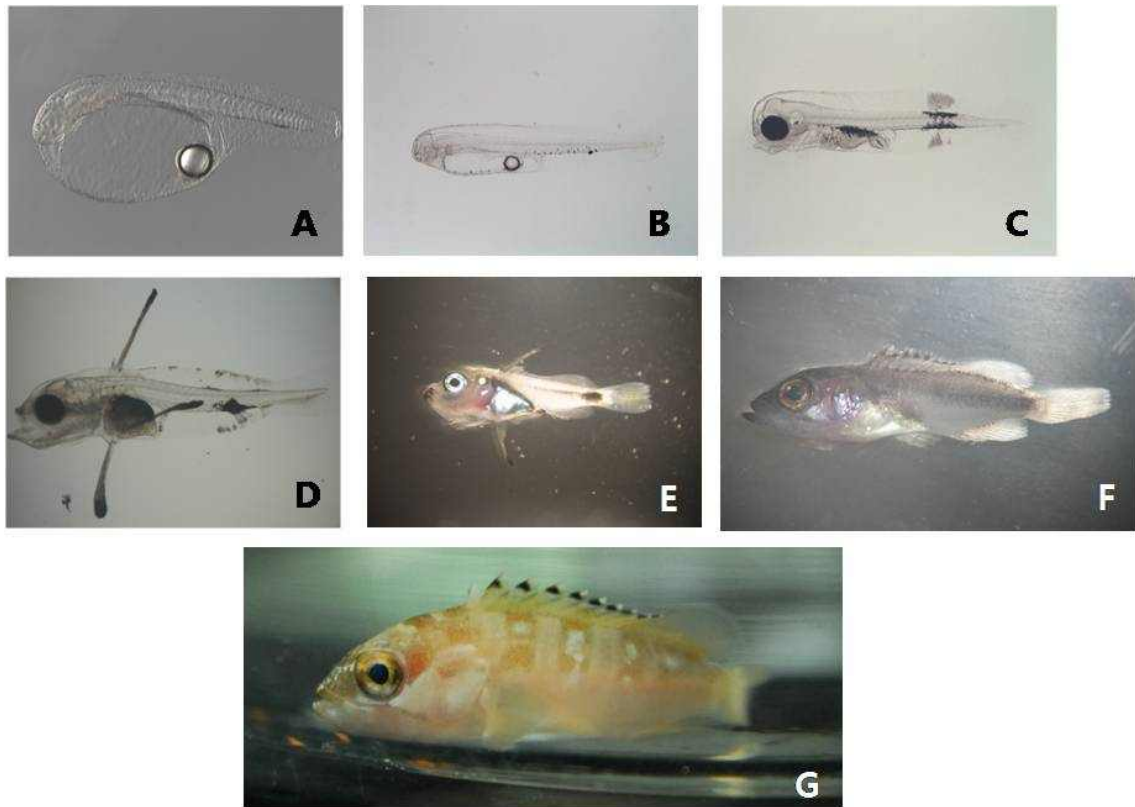


Fig. 59. External development and growth of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. A, newly hatched larvae 1.5 mm TL; B, 1DAH larvae 2.4 mm TL; C, 3DAH larvae 2.7 mm TL; D, 12DAH larvae 5.4 mm TL; E, 22DAH larvae 10.0 mm TL; F, 45DAH larvae 22.4 mm TL; G, 60DAH larvae 30.2 mm TL.

홍바리 자어는 난황이 흡수가 완료되는 시점에서 머리를 바닥으로 향하여 정지상태로 수조내에 끌고루 분포하다 부화 후 7일이 경과되며 정상적인 유영을 나타냈다. 자어의 먹이 섭

식은 부화 후 5일째에 현미경하에서 육안으로 처음 관찰이 되었으며, 시간이 경과할수록 소화관 쪽 흑색소포의 침적이 넓어져 육안으로 먹이섭식의 확인이 어려웠다.

자어의 전장은 부화직후 약 1.2 mm 이었으며 1일 경과 후 약 2.4 mm 크기로 급격한 변화를 보였다. 부화 후 7일까지 완만한 성장을 보이다 지느러미 극 발달이 이루어지는 12일째에 5.4 mm, 후기자어로 변태를 거치는 22일째에 10.5 mm 크기로 성장하였다. 부화 후 45일째에 자어에서 치어의 형태로 변하면서 22.4 mm 크기로 성장하였고, 부화 후 60일 이후에는 30.2 mm 크기로 성장하였다(Fig. 60).

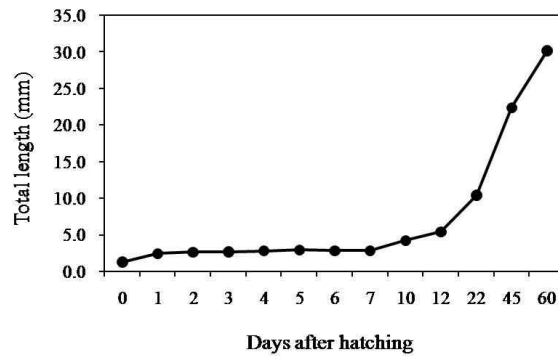


Fig. 60. Change of total length of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae by days after hatching.

### 3. 홍바리 자·치어의 성장 및 생존률 향상

#### 가. 홍바리 자·치어의 성장에 따른 소화관 형태 발달

##### (1) 홍바리 자·치어의 소화기관 외부형태 발달

부화일수별(DAH: Days After Hatching) 소화기관의 발달양상을 조사하기 위해 사육중인 홍바리 자·치어를 부화직후 (0 DAH)부터 부화 후 10일(15 DAH)까지는 매일, 부화 후 11일 (15 DAH)부터 부화 후 44일 (44DAH)까지는 2~3일 간격으로 7 마리씩 샘플링 하였다. 홍바리 자·치어 소화기관의 외부형태 발달은 현미경 (Carl Zeiss, HBO50)하에서 육안으로 관찰하였다.

홍바리 자·치어 소화관의 외부형태 발달은 현미경하에서 육안으로 관찰 가능한 부화 7일째까지 실시하였다. 부화 직후 (0 DAH) 입과 항문은 열리지 않았으며 큰 난황을 가지고 있었다. 부화 직후 소화관의 경우 직선상으로 가늘고 긴 내강이 관찰되었으며 항문과 연결되어 있었다(Fig. 61A). 부화 후 2일째 (2 DAH) 방광과 요도가 분화하였으며, 소화관의 직경이 확장되고 항문이 관찰되었다(Fig. 61B). 부화 후 3일째 (3 DAH) 소화관의 직경은 더욱 확장되었으며 식도, 장, 직장의 분화는 뚜렷하지 않았다. 부화 후 4일째 (4 DAH) 개구되었으며

소화관 내강의 직경이 확장되었다. 소화관의 경우 장의 뒷부분에 괄약근이 형성되어 후장부와 직장의 경계가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 61C). 부화 후 7일째 (7 DAH) 난황은 거의 흡수되었으며, 장이 꼬이기 시작하였다. 그리고 소화관내 섭식한 먹이가 관찰되었다(Fig. 61D). 부화 후 7일째(7 DAH) 처음으로 배변활동이 관찰되었으며 복측과 장측에 많은 흑색소포가 분포하였다(Fig. 61E, F).

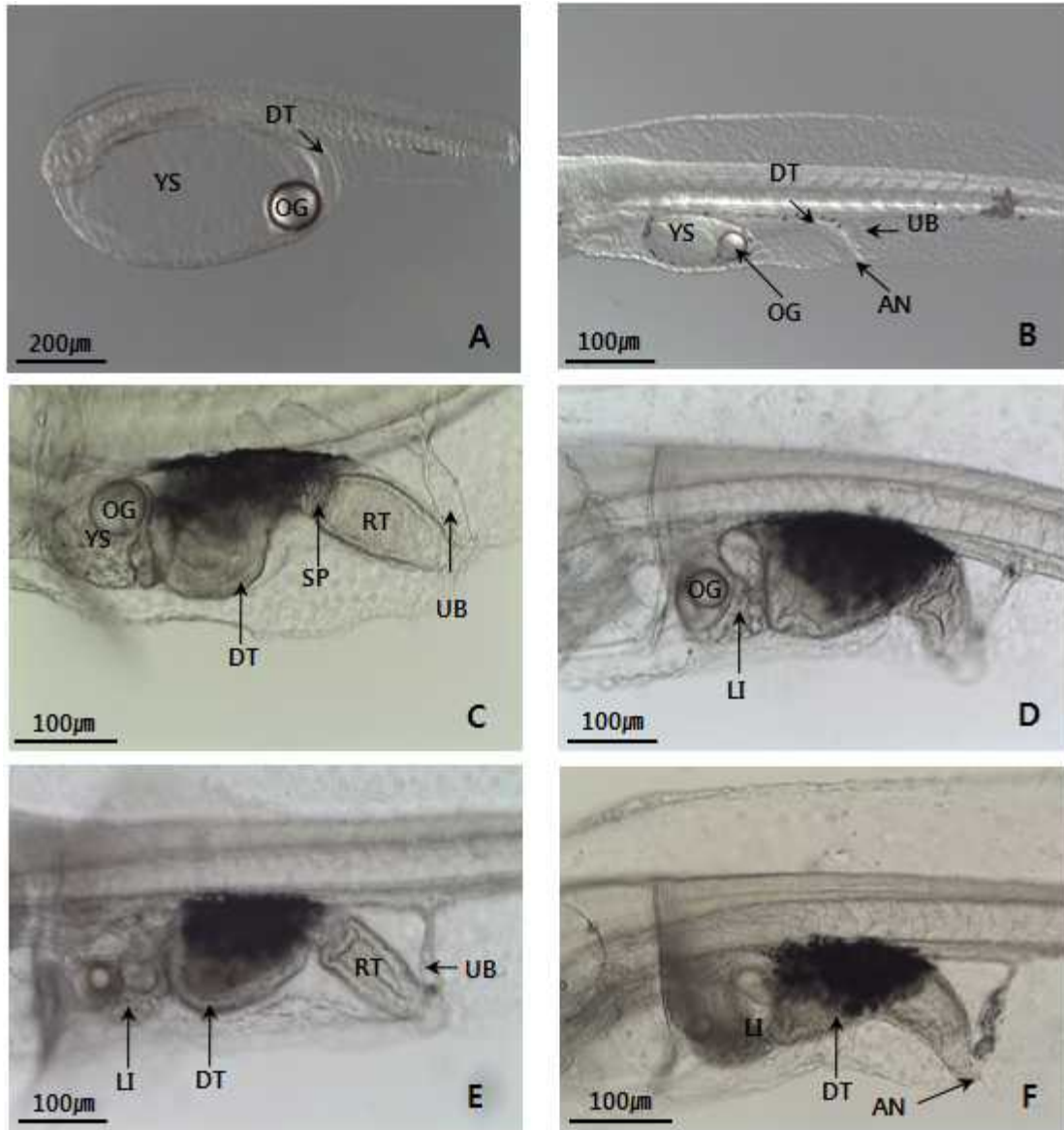


Fig. 61. Morphological observations of the digestive system during the development of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. A, general view of the newly hatched larvae on 0 DAH; B, posterior region of the incipient intestine of newly hatched larvae on 2 DAH; C, posterior region of the incipient intestine of newly hatched larvae on 4 DAH; D, incipient intestine on 7 DAH; E, incipient intestine on 7 DAH; F, incipient intestine on 7 DAH. AN, anus; DT, digestive tract; E, eye; GL, gut lumen; IN, intestine; IV, intestinal valve; LI, liver; OG, oil globule; RT, rectum; UB, urine bladder; UD, urine duct; YS, yolk sac.

## (2) 홍바리 자·치어의 소화기관 발달양상

홍바리 자·치어 소화기관의 발달 및 발달특성을 조직학적 방법으로 조사하기 위해 샘플링된 자·치어를 Bouin's solution에 24시간 고정한 후 흐르는 물에 24시간 수세하였다. 70% Ethanol에서 24시간 고정 후 80% Ethanol에서 1시간 90% Ethanol에서 1시간, 95% Ethanol에서 1시간, 100% Ethanol에서 1시간씩 단계적으로 탈수시킨 후 파라핀으로 포매하였다. 포매된 부화일수별 조직들을 5 $\mu$ m 두께의 sagittal section으로 연속절편을 제작하였다. 조직염색 방법으로는 일반적인 소화기관 발달양상 관찰을 위해 Hansen's Haematoxylin과 0.5% Eosin (H-E)으로 비교염색하여 관찰하였으며, 점액물질을 분비하는 배상세포의 관찰을 위해 Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS)염색을 실시하여 광학현미경(Carl Zeiss, HBO50)하에서 관찰하여 홍바리의 소화기관 발달 양상을 조사하였다.

부화 후 4일째 (4DAH) 복측과 난황사이에 간조직과 일부 체조직이 관찰되었으며 직장부의 점막주름이 형성되었다. 간에서는 담관과 소수의 지방구가 관찰되었다(Fig. 62A). 부화 후 7일째 (7DAH) 중장부와 후장부의 경계가 뚜렷이 관찰되었으며, 후장부에서 AB-PAS 양성 반응을 나타내는 소수의 배상세포가 관찰되었다(Fig. 62B). 부화 후 9일째 (9DAH) 직장부 점막주름 상피층에 AB-PAS 양성반응을 나타내는 소수의 배상세포가 관찰되었으며 대부분의 난황과 유구가 흡수되었다(Fig. 62C). 소화관 주변에 산재되어 있는 체조직이 관찰되었으며 직장부 점막주름의 발달이 뚜렷이 관찰되었다. 부화 후 15일째 (15DAH) 전장부 점막주름 상피층에 AB-PAS 양성반응을 나타내는 배상세포가 관찰되었으며, 부화일수가 증가함에 따라 배상세포의 수가 증가하였다(Fig. 62D). 부화 후 24일째 (24DAH) 식도와 전장부 사이에서 위의 발달이 관찰되었지만 위선은 관찰되지 않았다. 중장부의 점막주름의 상피층에서 AB-PAS 양성반응을 나타내는 배상세포들 관찰되었다(Fig. 62E). 부화 후 29일째 (29DAH) 위에서 소수의 위선과 유문수가 관찰되었다(Fig. 62F). 위와 전장부 경계부에 유문괄약근이 형성되어 위와 전장부의 경계가 명확하였다(Fig. 62G). 부화 후 34일째 (34DAH) 인두강 상피층에서 인두치가 관찰되었으며, 위선의 수가 점차 증가하였다(Fig. 62H). 초기 소화생태조사 종료시점인 부화 후 44일째 (44DAH)는 성어와 같은 소화기관의 형태를 갖추었다. 홍바리의 경우 위산을 분비하여 실질적인 소화 기능을 수행하는 위에서의 위선 발달이 상대적으로 다른 어종에 비해 늦은 경향을 나타내었다. 그리고 위와 전장부 사이에 위치하여 소화된 영양분이 흡수될 수 있는 면적을 넓혀주는 유문수의 발달시기도 위선의 출현 시기와 같았다. 또한 먹이를 잘게 찢어 소화를 용이하게 해주는 인두치의 분화도 위선 분화 이후 관찰된 경향으로 보아 홍바리의 경우 실질적인 소화작용은 부화 후 약 29일 경에 일어나는 것으로 사료된다.



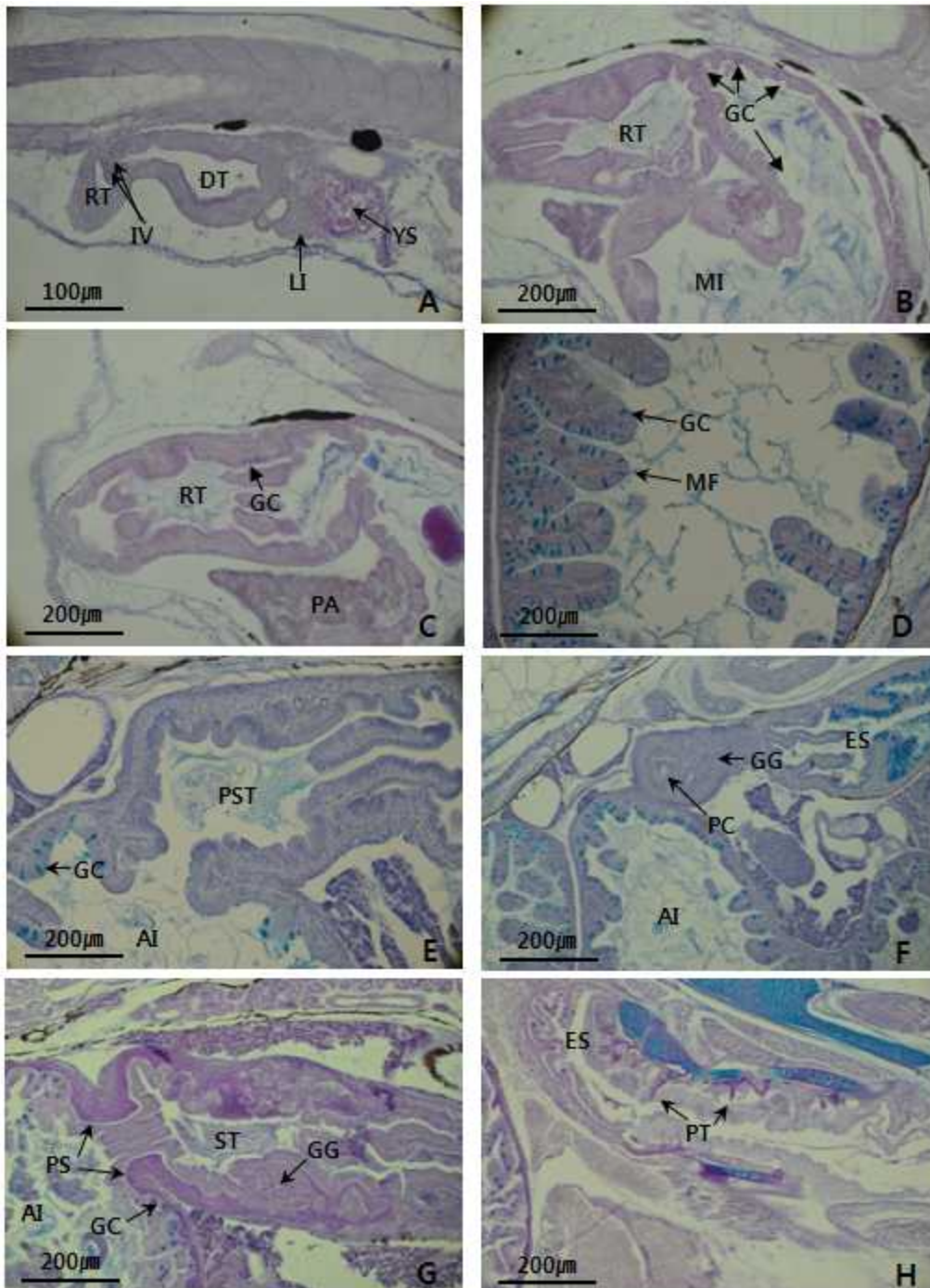


Fig. 62. Sagittal section of the digestive system during the development of blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. (A) Larvae of 4 DAH, (B) Larvae of 7 DAH, (C) Larvae of 9 DAH, (D) Larvae of 15 DAH, (E) Larvae of 10 DAH, (F) Larvae of 24 DAH, (G) Larvae of 29 DAH, (H) Larvae of 34 DAH. Abbreviations: AI, anterior intestine portion; DT, digestive tract; ES, esophagus; GC, goblet cell; GG, gastric gland; IV, intestinal valve; LI, liver; MF, mucosal fold; PA, pancreas; PC, pyloric ceca; PS, pyloric sphincter; PST, presumptive stomach; PT, pharyngeal teeth; RT, rectum; ST, stomach; YS, yolk sac.

(4) 등지느러미와 배지느러미 극 발달

등지느러미 제 2극과 배지느러미 극의 출현은 부화 후 10일부터 출현하였다. 등지느러미 제 2극은 부화 후 10일째에  $616.6 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 에서 부화 후 30일에 최대  $2063.1 \pm 295.6 \mu\text{m}$ 까지 성장하였다. 배지느러미 극의 길이는 부화 후 10일째에  $676.7 \pm 19.3 \mu\text{m}$ 에서 부화 후 30일에 최대  $1648.7 \pm 292.0 \mu\text{m}$ 까지 성장하였다(Fig. 63).

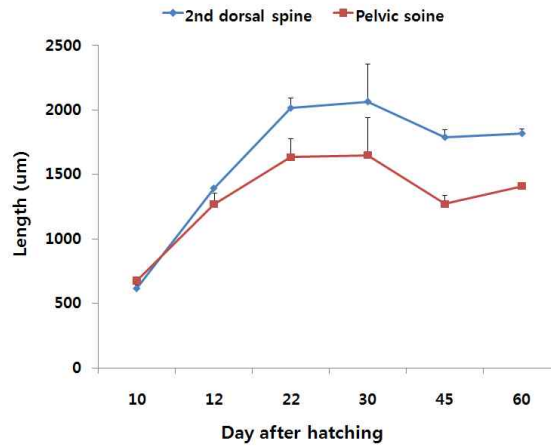


Fig. 63. Growth of the second dorsal spine and the pelvic spine by day after hatching in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. Vertical bars denote standard errors of means.

(5) 부화자어 입 크기 변화

부화 후 첫 개구시 자어의 상악장과 하악장 길이는 각각  $80.1 \pm 8.3 \mu\text{m}$ 과  $87.5 \pm 7.5 \mu\text{m}$ 였으며, 부화 후 7일째 상악장  $176.2 \pm 6.7 \mu\text{m}$ 와 하악장  $200.4 \pm 15.2 \mu\text{m}$ 로 두배의 길이 성장을 하였다. 이후 급격히 증가하여 부화 후 12일째 상악장  $333.5 \pm 11.11 \mu\text{m}$ 와 하악장  $555.1 \pm 34.1 \mu\text{m}$ 에서 60일째 상악장  $2816.5 \pm 110.2 \mu\text{m}$ 와 하악장  $3101 \pm 99.4 \mu\text{m}$ 에 이르렀다 (Fig. 64).

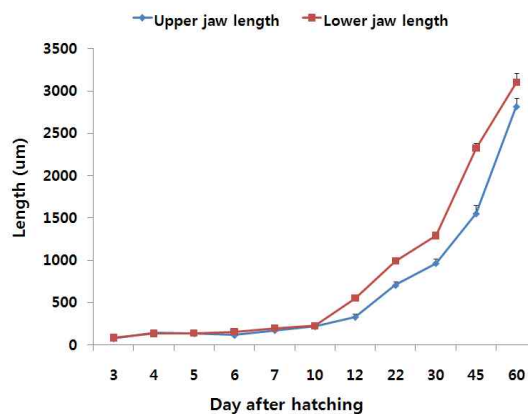


Fig. 64. Changes of the upper jaw length and lower jaw length by day after hatching in blacktip grouper, *E. fasciatus* larvae. Vertical bars denote standard errors of means.

나. 홍바리 자·치어의 성장에 따른 소화생리 특성

(1) 홍바리 부화일수별 콜레시스토키닌 (Cholecystokinin, CCK) 발현양상 분석

각종 주요소화효소 활성화에 관여하는 CCK의 부화일수별 발현량 측정을 위해 부화일수별 홍바리 부화자어를 total RNA 추출 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고, 추출 시 조직 100mg 당 1ml의 RNAiso Reagent (Takara, Kyoto, Japan)를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 시료는 5분간 상온에서 방취한 후 0.3ml의 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후 12,000g 로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 새로운 튜브로 옮긴 다음 동량의 이소프로판올을 첨가하여 12,000g로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 RNA는 75% EtOH로 수세한 후 EtOH을 완전히 제거하여 DEPC-DW에 용해하였다. 용해된 RNA는 Nano Vue (GE Healthcare, UK)를 이용하여 A260/A280의 비를 이용하여 순도를 측정하였다. Total RNA의 변성을 막기 위해 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA)  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 처리하여 분석전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

부화일수별 CCK의 발현양상을 알아보기 위하여 Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR premix Ex<sup>TM</sup> TaqII kit (Takara, Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 홍바리 고유의 CCK 염기서열을 참고로 특이적 프라이머를 제작하여 실험에 사용하였다. 반응액은  $2\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로  $7\mu\text{l}$ 의 SYBR premix Ex<sup>TM</sup> TaqII와  $1.0\mu\text{l}$ 의 프라이머 세트, 마지막으로  $4\mu\text{l}$  nuclease-free water를 혼합하여 반응하였다. Real-time quantitative RT-PCR 분석은 CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA) 이용하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 initial denaturation을 실시하였으며,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 초간 denaturation,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing 과 elongation 하여 40cycle로 반응하였다. 모든 분석 시료는 3반복으로 측정하였으며 18S rRNA를 이용하여 상대정량을 실시하였다.

각종 소화효소 분비촉진 및 장 연동운동에 관여하는 주요소화호르몬인 CCK의 경우 부화 후 2일경 (2 DAH)부터 발현되기 시작하였으며, 처음으로 외부로부터 먹이를 섭이하는 부화 후 5일경 (5 DAH)부터 발현량이 급격히 증가하였다. 소화기관들의 기능적인 발달과 부화일수가 증가함에 따라 CCK 발현량이 서서히 감소하다 위선발달이 이루어지는 부화 후 28일경 (28 DAH) 발현량이 증가하는 경향이 관찰되었다 (Fig. 65).



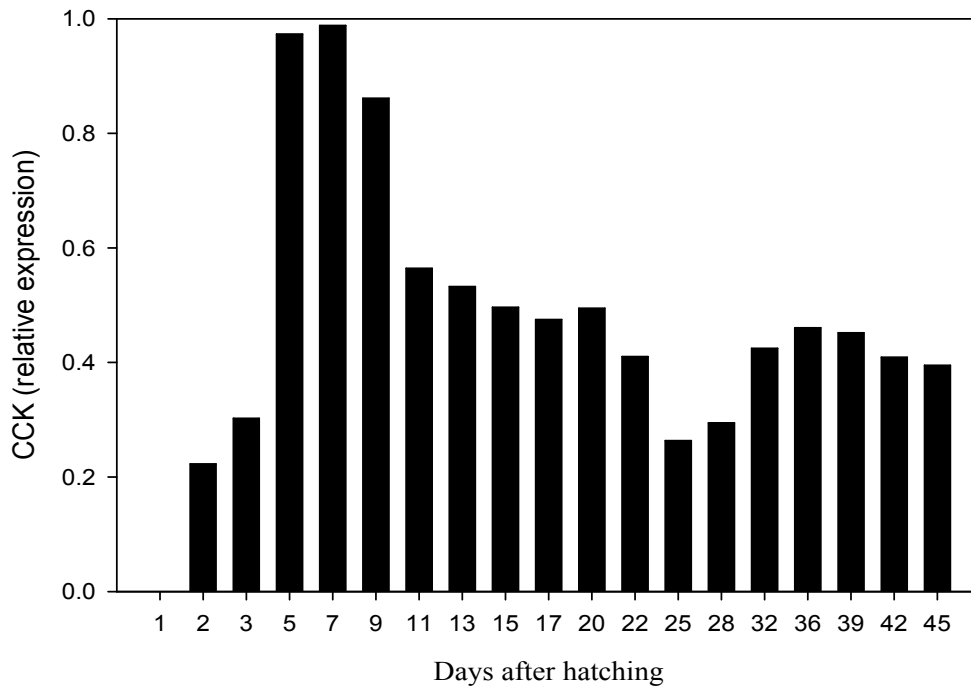


Fig. 65. CCK mRNA levels measured with quantitative real-time RT-PCR assay in the blacktip grouper, *E. fasciatus* from hatching to 45 days after hatching.

## (2) 홍바리 콜레시스토키닌 분비세포 특성

홍바리의 콜레시스토키닌 분비세포 (CCK-producing cell) 특성과 분포양상을 조사하기 위해 식도에서 항문에 이르는 홍바리 소화관을 적출한 뒤 Bouin's solution에 24시간 고정하였고 소화관을 식도 (esophagus), 위 (stomach), 전장부 (anterior intestine portion), 중장부 (mid intestine portion), 후장부 (posterior intestine portion), 직장 (rectum), 유문수 (pyloric caeca)로 나누어 상법인 파라핀 절편법에 의해 5  $\mu$ m 두께로 절편하였다. 콜레시스토키닌 분비세포 관찰을 위해 primary CCK antiserum을 1:1000 농도로 희석하여 1차항체로 이용하였으며, 면역염색 방법인 avidin-biotin complex (ABC method)을 이용하여 분석하였다. 제작된 조직절편을 PBS에 수세하여 콜레시스토키닌 1차항체를 4°C에서 22시간동안 처리하고 2차항체를 처리한 뒤 최종적으로 ABC 기질용액을 처리하여 DAB발색제를 이용하여 염색을 실시하였다. 소화관 조직절편 제작시 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드를 이용하여 조직탈락 및 다른 단백질에 의한 비특이적 교차반응을 차단시켰으며 면역염색 완료 후 각 부위별 출현하는 콜레시스토키닌 분비세포를 광학현미경 (HBO 50, Carl Zeiss)하에서 관찰 후 계수하였다.

홍바리 소화관에 나타나는 콜레시스토키닌 분비세포의 분포양상과 수를 조사한 결과는

Table 22, Fig. 66과 같다. 홍바리의 콜레시스토키닌 분비세포는 전장부와 유문수에서 가장 많은 분포양상을 나타냈으며 직장부로 갈수록 수가 적어지는 특징이 관찰되었다.

Table 22. Numbers of CCK-producing cells and goblet cells in different digestive tract regions of the blacktip grouper, *E. fasciatus*

	Numbers/tissue section	
	CCK-producing cells (mean±S.E.)	Goblet cells (mean±S.E.)
Esophagus	N · D	2078±105
Stomach	N · D	N · D
Anterior intestine portion	12±1	1237±86
Mid intestine portion	8±1	1056±91
Posterior intestine portion	5±2	859±67
Rectum	5±1	719±78
Pyloric ceca	12±2	214±24

“N · D” indicates not detected.

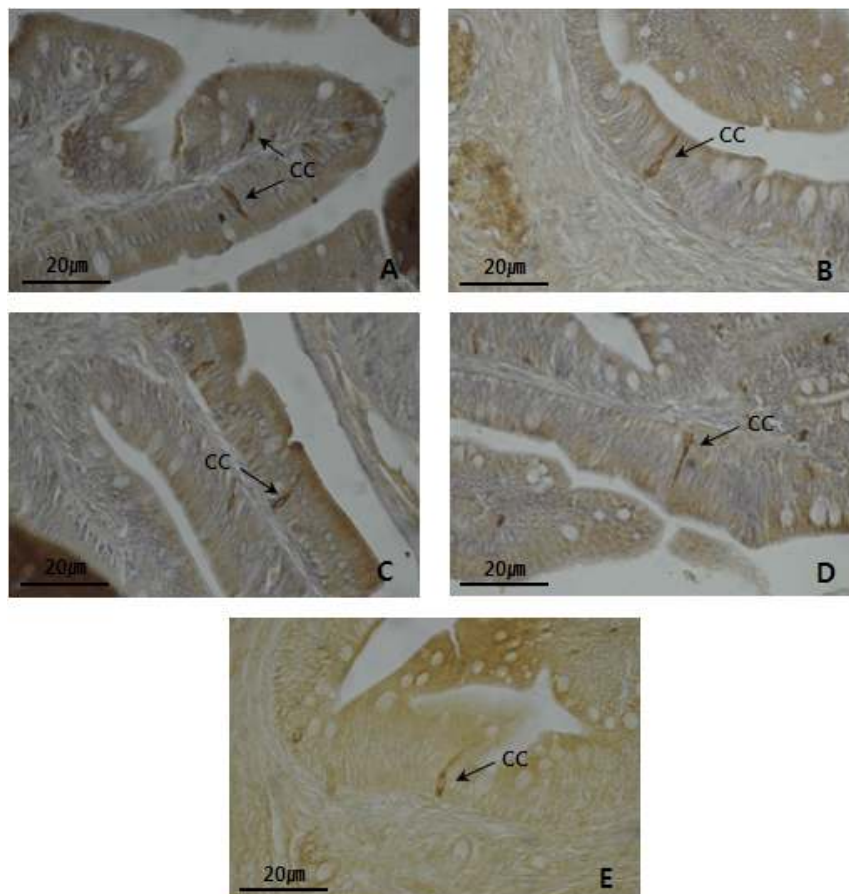


Fig. 66. Photomicrographs of CCK-producing cells in the digestive tract of the blacktip grouper, *E. fasciatus*. A, anterior intestine portion; B, mid intestine portion; C, posterior intestine portion; D, rectum; E, pyloric ceca. CC, CCK-producing cell.

홍바리 소화관내 콜레시스토키닌 분비세포는 식도와 위에서는 관찰되지 않았으며, 전장부 ( $12 \pm 1$ ), 중장부 ( $8 \pm 1$ ), 후장부 ( $5 \pm 2$ ), 직장 ( $5 \pm 1$ ) 및 유문수 ( $12 \pm 2$ )에서 관찰되었다(Table 22, Fig. 67). 홍바리의 콜레시스토키닌 분비세포는 소화관 점막주름 상피층에 산재되어 분포하였으며 세포의 첨두 끝부분이 장의 내강을 향해있는 가늘고 긴 형태의 일반적인 콜레시스토키닌 분비세포의 형태를 갖추었다.

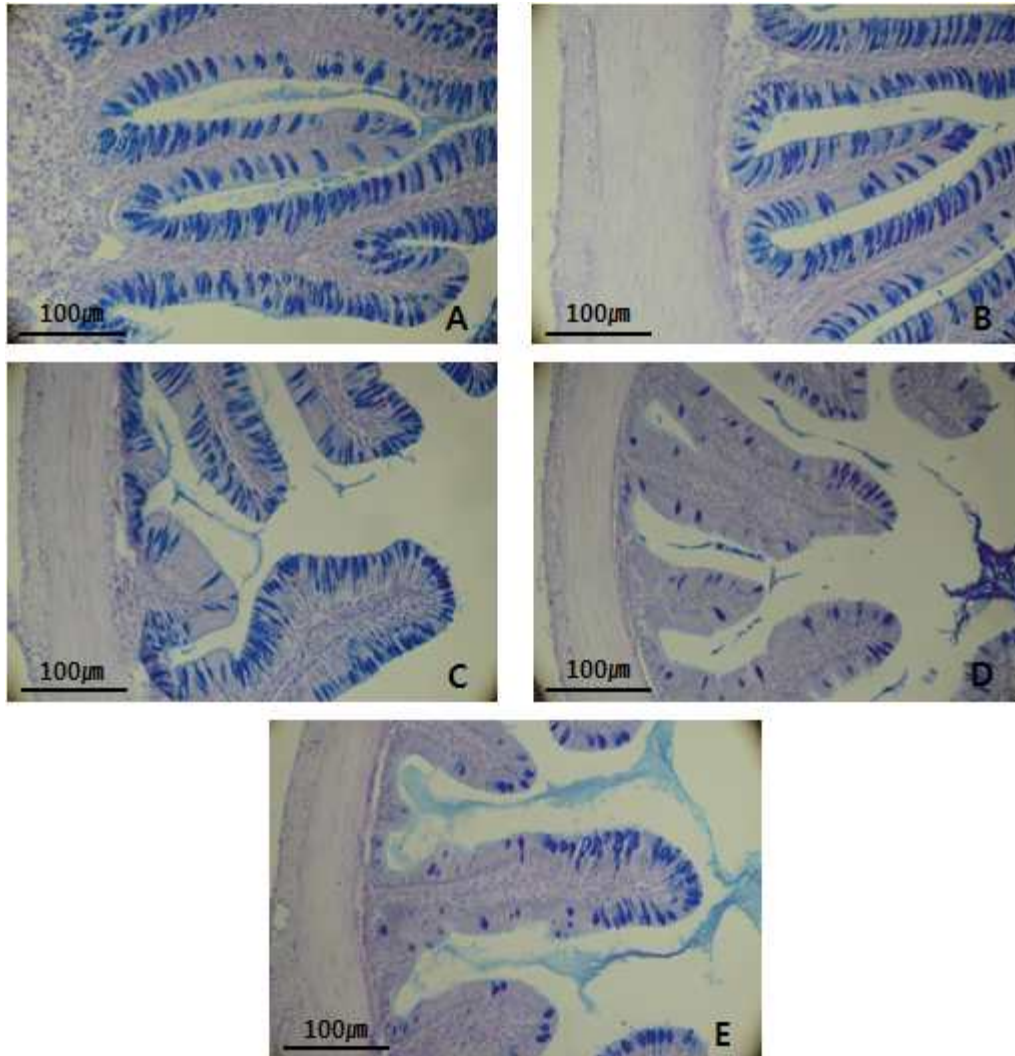


Fig. 67. Photomicrographs of goblet cells in the digestive tract of the blacktip grouper, *E. fasciatus*. A, anterior intestine portion; B, mid intestine portion; C, posterior intestine portion; D, rectum; E: pyloric ceca.

#### 4. 빛 파장에 따른 바리과 어류 성장 및 소화활성 특성

##### 가. 사육환경조성

빛 파장에 따른 바리과 어류인 자바리의 성장 및 소화활성 특성을 조사하기 위하여, 초기 체중  $349.2 \pm 38.4$  g 및 전장(TL)  $28.8 \pm 0.2$  cm 인 36마리의 자바리에 대해 자연광, 녹

색광, 파랑색광, 적색광 조건에서 사육하였다(Fig. 68). 실험어인 자바리들은 마이크로-태그 (Trovan Electronic Identification System, USA)를 등근육에 삽입시켜 표지하였고, 실험에 앞서 2주간 각각의 사육환경에 순치하였다. 각각의 광조건 실험구에 9마리씩의 자바리를 임의로 각각의 사육수조(fiberglass reinforced plastic; 길이 × 높이 × 폭, 150 × 150 × 150 cm)에서 12주간 사육하였다. 배경 빛에 의한 영향을 막기 위하여, 각각의 사육수조의 내부를 백색으로 처리하였다. Blue (480 nm), Green (520 nm), Red (590 nm)의 고효율, 친환경, 장수명의 장점을 가진 LED (Light Emitting Diode, 125W; Savner, Korea) 광원을 이용해서로 상이한 빛 파장 조건하에 12주간 사육실험을 수행하였다. 각각의 빛 파장별 광량 (light intensity)은 디지털 조도계 (DX-200, Taiwan)를 사용하여 수표면과 수중 50cm에서 측정 한 뒤 광원의 높이를 조절하여 각각 150 lx; 15.2 ± 0.1 ft-cd와 77.3 lx; 7.3 ± 0.2 ft-cd로 동일한 조건으로 맞추어 주었다(Fig. 68). 각각의 빛 파장별 광시간(photoperiod)의 경우 디지털타이머를 이용하여 자연광 조건과 동일하게 맞추어 주었으며, 사육실험에 사용한 자바리 먹이로는 일반 EP(extruded pellet; Le Gouessant, France)사료를 체중의 5-7% 로 조절하여 동일한 양을 1일 1회 공급하였다.

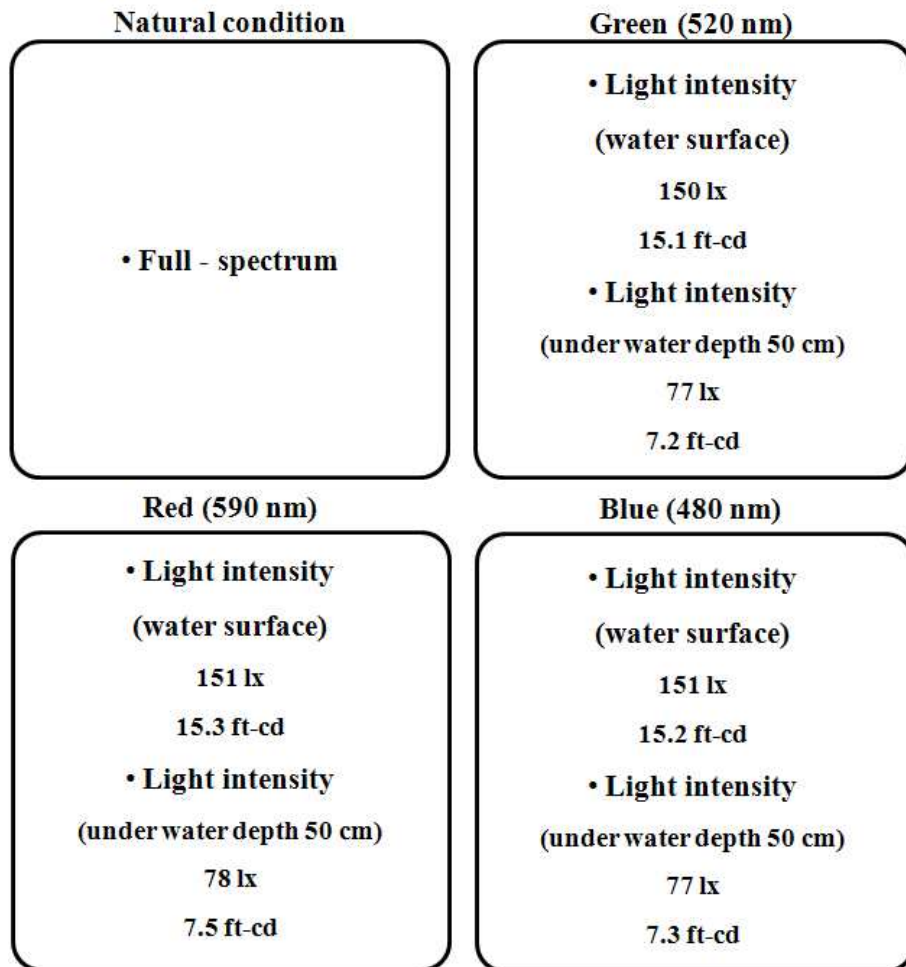


Fig. 68. The lighting layout in each experimental rearing tank to generate different light spectra condition.

나. 빛 파장에 따른 바리과 어류의 성장

각각의 빛 파장별 사육조건하에서 사육중인 자바리의 등근육에 ID chip (Trovan Electronic Identification System, USA)을 삽입하여 3주 단위로 개체별 성장률을 측정하였다. 빛의 파장에 따른 자바리의 성장률의 경우 빛 파장에 따라 유의적인 차이가 관찰되었다 (Fig. 69). 가장 높은 성장률은 녹색광 조건에서 관찰되었다. 녹색광 조건의 자바리 성장률은 자연광, 적색광, 및 파랑색광의 조건보다 유의적으로 높았다. 이러한 차이는 실험종료 3주전에 더 두드러졌다. 적색광 조건의 자바리 성장률의 경우 녹색광 및 자연광 조건의 자바리 보다 낮았지만, 실험이 진행될수록 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 자연광 및 파랑색광 조건에서 사육한 자바리의 성장률은 실험종료 3주전부터 급격하게 감소하였다. 반면, 전장의 경우 모든 실험구에서 유사한 경향을 나타냈으며, 유의적인 차이가 없었다.

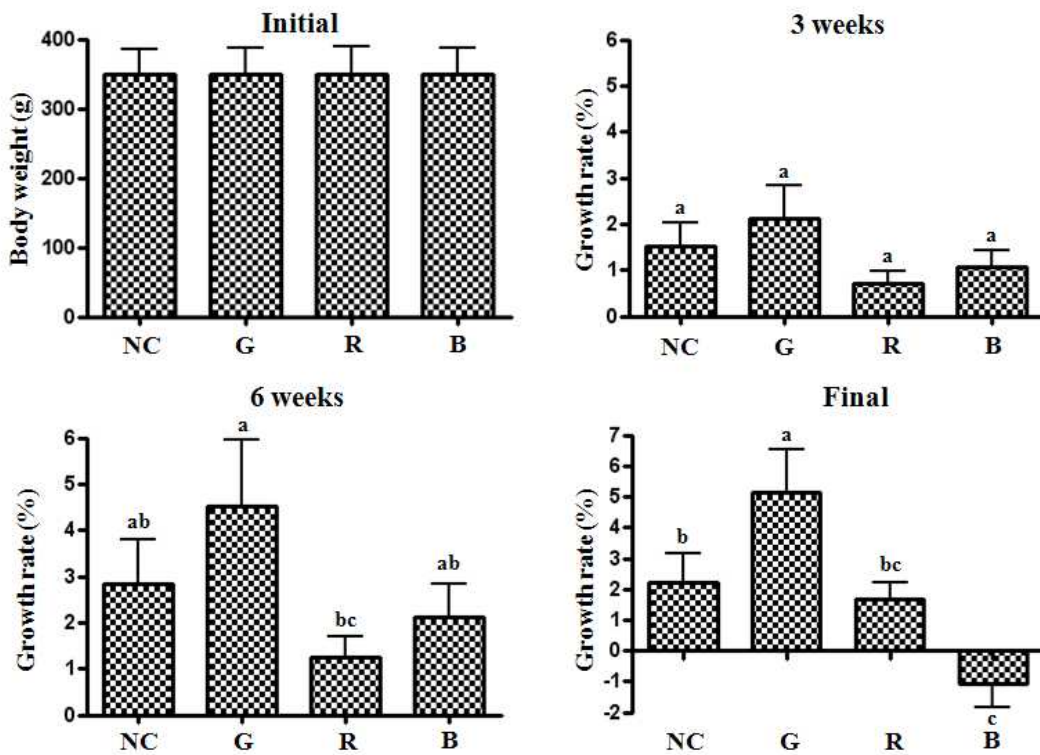


Fig. 69. Initial body weight (g) and growth rate (%) of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks. Abbreviation: B, blue light condition; G, green light condition; NC, natural condition; R, red light condition. Different superscript on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

다. 빛 파장에 따른 소화관 부위별 배상세포 활성화

소화활성에 관여하는 배상세포의 활성을 알아보기 위해 적출된 소화관을 Bouin's solution 에 24시간 고정하였고 소화관을 전장부 (anterior intestine portion), 중장부 (mid intestine portion), 후장부 (posterior intestine portion), 직장 (rectum), 유문수 (pyloric ceca)로 나누어 상법인 파라핀 절편법에 의해 5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하였다. 조직 절편을 Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS) 염색 후 각 부위별 출현하는 배상세포의 수를 광학 현미경 (HBO 50, Carl Zeiss)하에서 계수하였다.

서로 다른 빛 파장 사이에서 배상세포의 상대적인 빈도 차이를 나타냈다(Table 23). 녹색 광 조건에서 사육한 자바리 소화관에서 자연광, 적색광 및 파랑색광 조건에서 사육한 자바리와 비교하여 유의적으로 많은 수의 배상세포가 관찰되었다. 조직학적으로, 녹색광 조건의 자바리 소화관내 점막주름은 더 발달되었으며, 더 많은 수의 배상세포가 관찰되었다(Fig. 70). 녹색광 조건의 자바리 소화관내 배상세포들이 전장부( $2332 \pm 242$ ), 중장부( $1958 \pm 190$ ), 후장부( $2078 \pm 105$ ), 직장부( $2337 \pm 182$ ) 및 유문수(pyloric ceca)( $661 \pm 40$ )에서 관찰되었다 (Table 23, Fig. 71). 자연광 조건의 자바리 소화관내 배상세포는 전장부( $1312 \pm 175$ ), 중장부( $888 \pm 81$ ), 후장부( $1015 \pm 48$ ), 직장( $1311 \pm 125$ ), 및 유문수( $237 \pm 31$ )에서 관찰되었다 (Table 24, Fig. 72). 적색광 조건의 자바리 소화관내 배상세포는 전장부( $1608 \pm 96$ ), 중장부( $1233 \pm 83$ ), 후장부( $1193 \pm 60$ ), 직장( $1217 \pm 110$ ), 및 유문수( $250 \pm 45$ )에서 관찰되었다 (Table 23, Fig. 73). 파랑색광 조건의 자바리 소화관내 배상세포는 전장부( $1248 \pm 105$ ), 중장부( $809 \pm 86$ ), 후장부( $992 \pm 67$ ), 직장( $1197 \pm 180$ ), 및 유문수( $197 \pm 27$ )에서 관찰되었다 (Table 23, Fig. 74).

Table 23. Number of mucus-secreting goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks

Region	Number of goblet cells/Tissue section			
	Natural condition (mean $\pm$ S.E.)	Green (mean $\pm$ S.E.)	Red (mean $\pm$ S.E.)	Blue (mean $\pm$ S.E.)
Anterior intestine	$1312 \pm 175$ <sup>b</sup>	$2332 \pm 242$ <sup>a</sup>	$1608 \pm 96$ <sup>b</sup>	$1248 \pm 105$ <sup>b</sup>
Mid intestine	$888 \pm 81$ <sup>b</sup>	$1958 \pm 190$ <sup>a</sup>	$1233 \pm 83$ <sup>b</sup>	$809 \pm 86$ <sup>b</sup>
Posterior intestine	$1015 \pm 48$ <sup>b</sup>	$2078 \pm 105$ <sup>a</sup>	$1193 \pm 60$ <sup>b</sup>	$992 \pm 67$ <sup>b</sup>
Rectum	$1311 \pm 125$ <sup>b</sup>	$2337 \pm 182$ <sup>a</sup>	$1217 \pm 110$ <sup>b</sup>	$1197 \pm 180$ <sup>b</sup>
Pyloric ceca	$237 \pm 31$ <sup>b</sup>	$661 \pm 40$ <sup>a</sup>	$250 \pm 45$ <sup>b</sup>	$197 \pm 27$ <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E. in same column superscripted with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



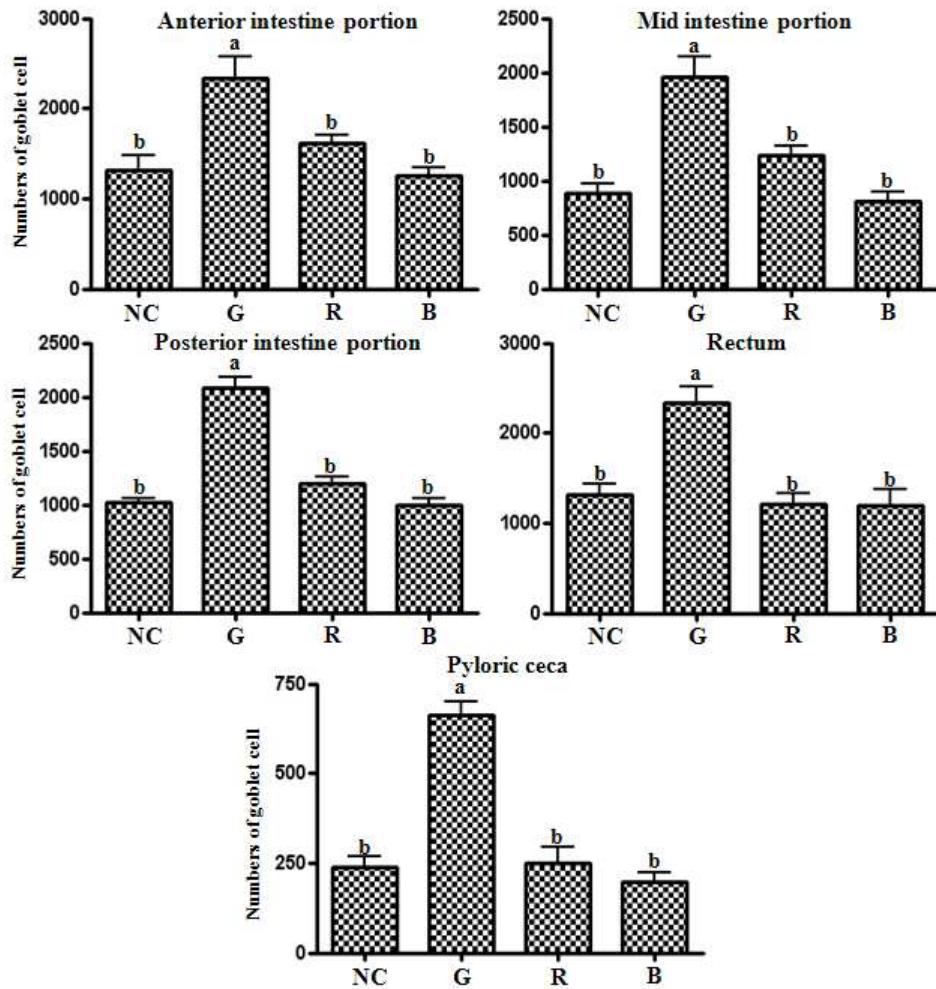


Fig. 70. Changes of mucus-secreting goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks. Abbreviation: B, blue light condition; G, green light condition; NC, natural condition; R, red light condition. Different superscript on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

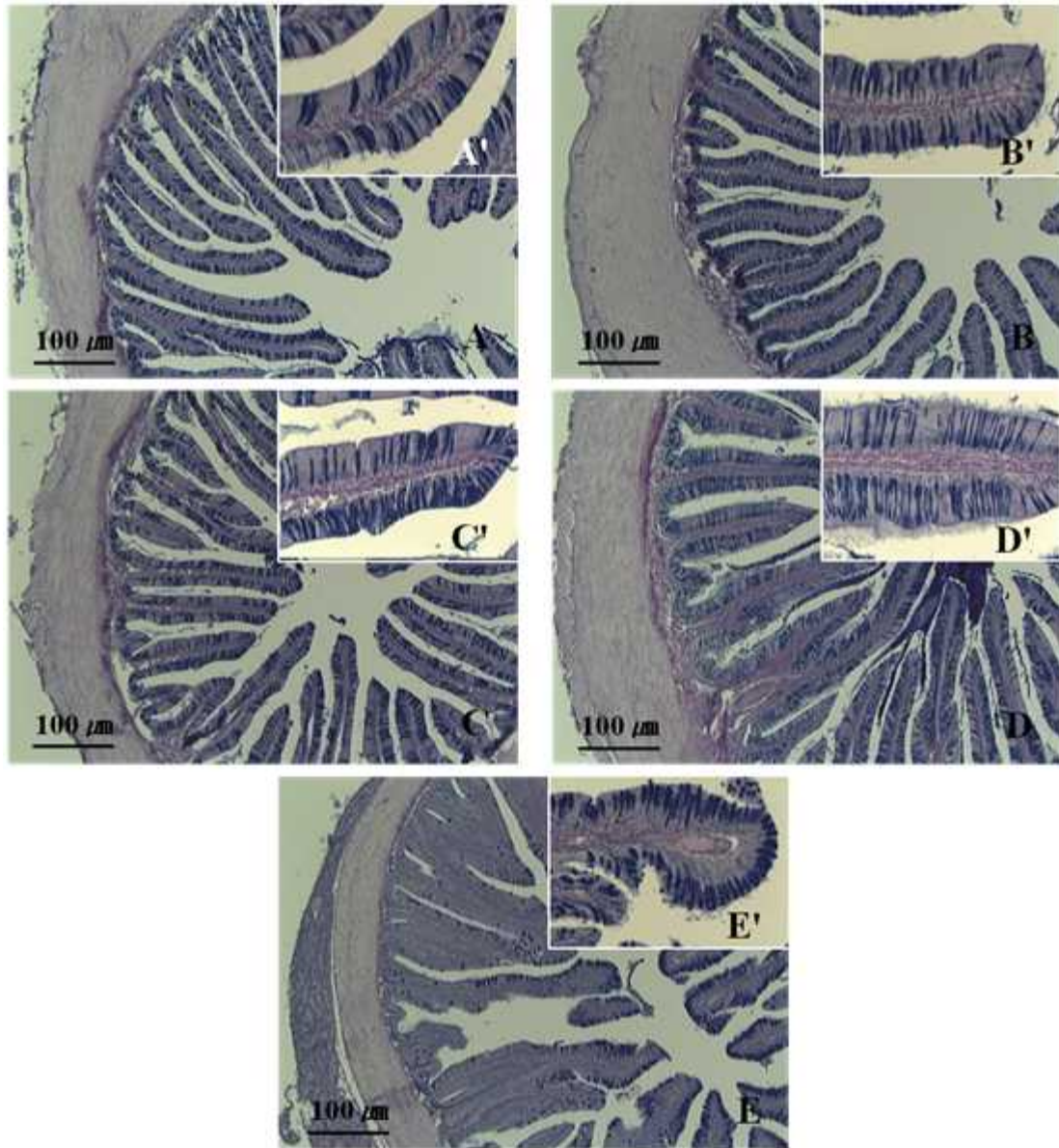


Fig. 71. Photomicrographs of goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under green light condition. A, esophagus; B, anterior intestine portion; C, Mid intestine portion; D, posterior intestine portion; E, pyloric ceca. Magnified goblet cells in (A–E) were shown in (A'–E').



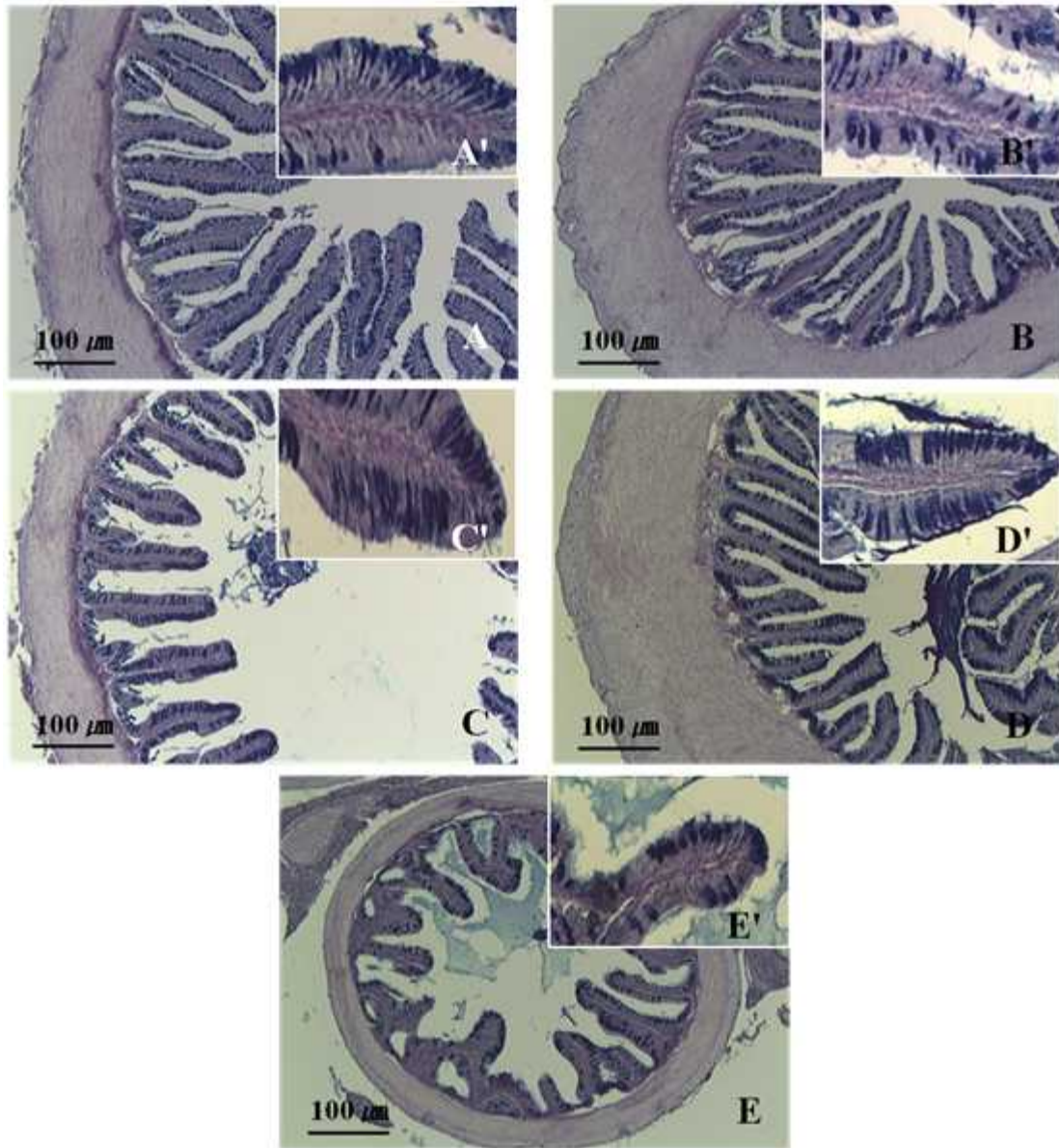


Fig. 72. Photomicrographs of goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under natural condition. A, esophagus; B, anterior intestine portion; C, Mid intestine portion; D, posterior intestine portion; E, pyloric ceca. Magnified goblet cells in (A-E) were shown in (A'-E').

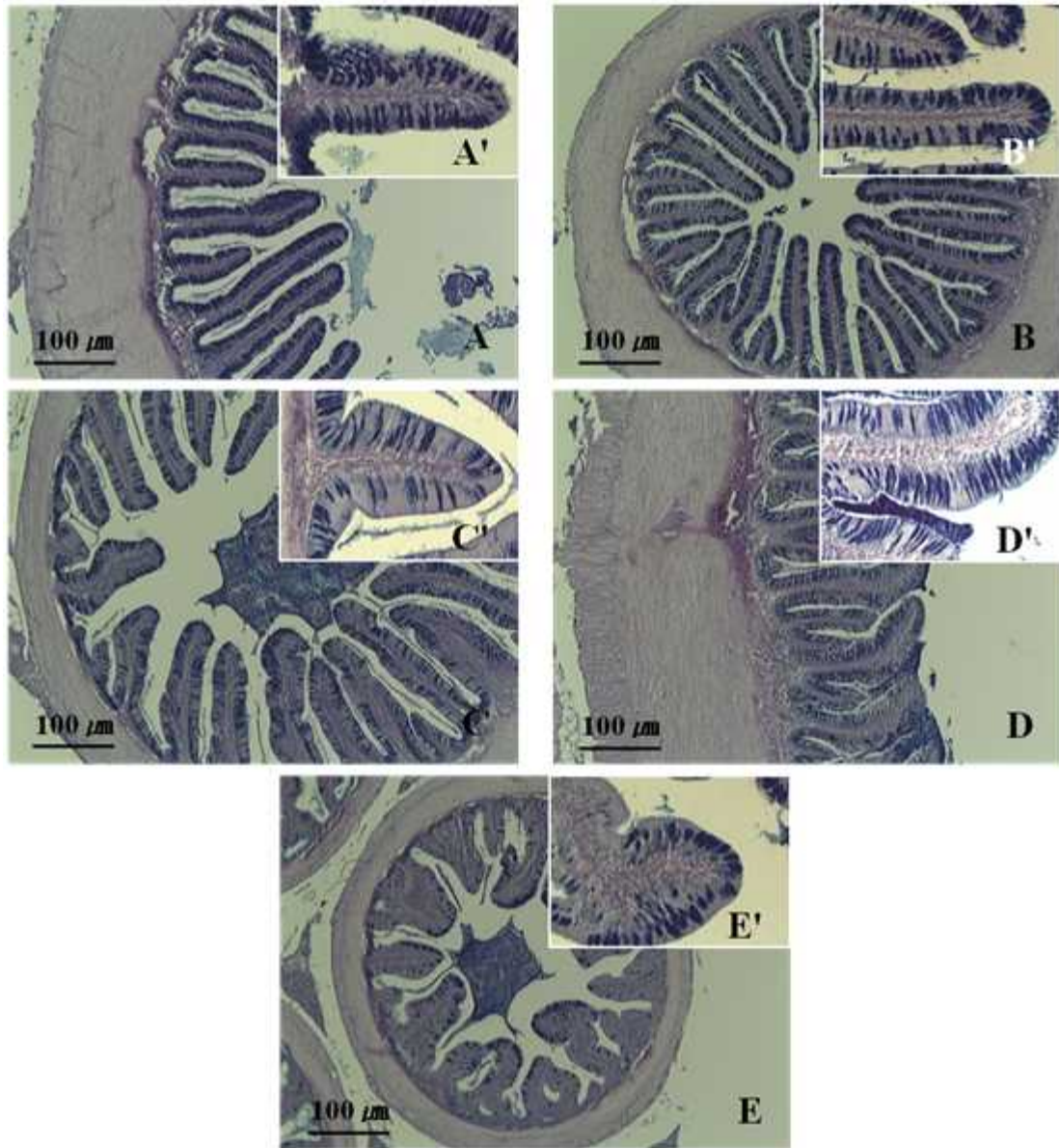


Fig. 73. Photomicrographs of goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under red light condition. A, esophagus; B, anterior intestine portion; C, Mid intestine portion; D, posterior intestine portion; E, pyloric ceca. Magnified goblet cells in (A-E) were shown in (A'-E').



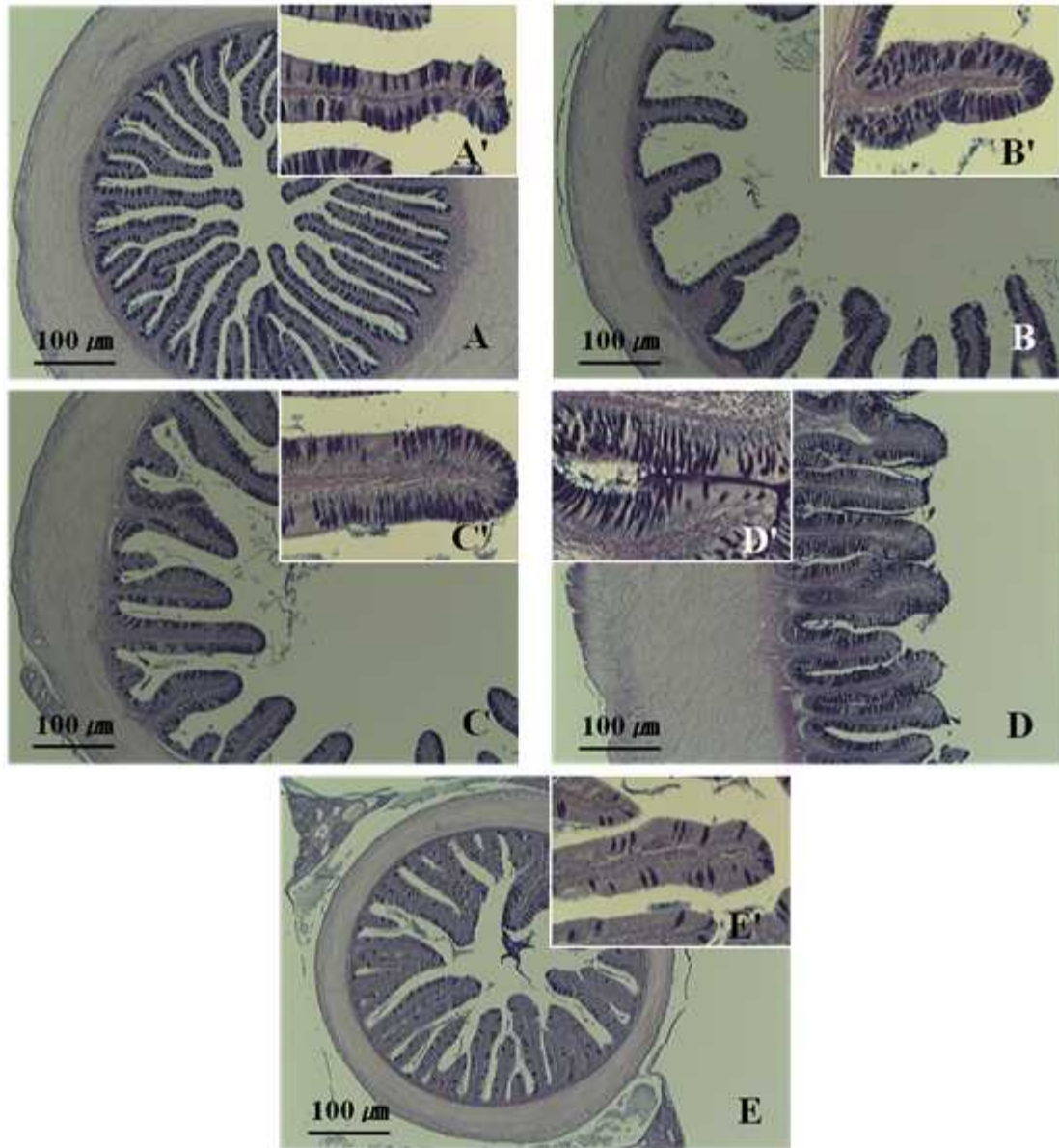


Fig. 74. Photomicrographs of goblet cells in the digestive tract of longtooth grouper reared under blue light condition. A, esophagus; B, anterior intestine portion; C, Mid intestine portion; D, posterior intestine portion; E, pyloric ceca. Magnified goblet cells in (A-E) were shown in (A'-E').

#### 라. 빛 파장에 따른 소화관 부위별 CCK mRNA 발현양상

각종 주요소화효소 활성화에 관여하는 CCK의 발현량 측정을 위해 적출한 뇌와 소화관 (전장부, 유문수)을 total RNA 추출 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고, 추출 시 조직 100mg 당 1ml의 RNAiso Reagent (Takara, Kyoto, Japan)를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 시료는 5분간 상온에서 방치한 후 0.3ml의 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후 12,000g 로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 새로운 튜브로 옮긴 다음 동량의 이소프로판올을 첨가하여 12,000g로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 RNA는 75% EtOH로 수세한 후 EtOH을 완전히 제거하여 DEPC-DW에 용해하였다. 용해된 RNA는 Nano Vue (GE Healthcare, UK)를 이용하여 A260/A280의 비를 이용하여 순도를 측정하였다. Total RNA의 변성을 막기 위해 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA)  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 처리하여 분석전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

CCK의 활성을 알아보기 위하여 Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR premix Ex<sup>TM</sup> TaqII kit (Takara, Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 자바리 고유의 CCK 염기서열을 참고로 특이적 프라이머를 제작하여 실험에 사용하였다. 반응액은  $2\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로  $7\mu\text{l}$ 의 SYBR premix Ex<sup>TM</sup> TaqII와  $1.0\mu\text{l}$ 의 프라이머 세트, 마지막으로  $4\mu\text{l}$  nuclease-free water를 혼합하여 반응하였다. Real-time quantitative RT-PCR 분석은 CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA) 이용하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 initial denaturation을 실시하였으며,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 초간 denaturation,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing 과 elongation 하여 40cycle로 반응하였다. 모든 분석 시료는 3반복으로 측정하였으며 18S rRNA를 이용하여 상대정량을 실시하였다.

뇌, 전장부, 및 유문수에서 서로 다른 빛 파장에서의 CCK mRNA 발현을 측정하였다. 뇌, 전장부, 및 유문수에서 CCK mRNA 발현에 유의적인 차이가 있었다. 녹색광조건의 자바리 뇌에서 CCK mRNA 발현량이 자연광, 적색광 및 파랑색광 조건에서 사육한 자바리에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 75). 전장부 및 유문수의 경우 녹색광 조건에서의 자바리 CCK mRNA 발현량이 자연광, 적색광 및 파랑색광 조건에서 사육한 자바리에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 76, 77).

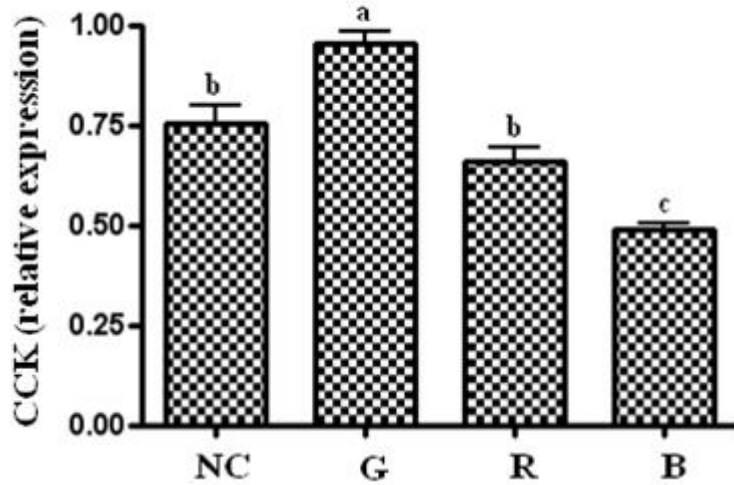


Fig. 75. CCK mRNA expression in the brain of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks. Abbreviation: B, blue light condition; G, green light condition; NC, natural condition; R, red light condition. Different superscript on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

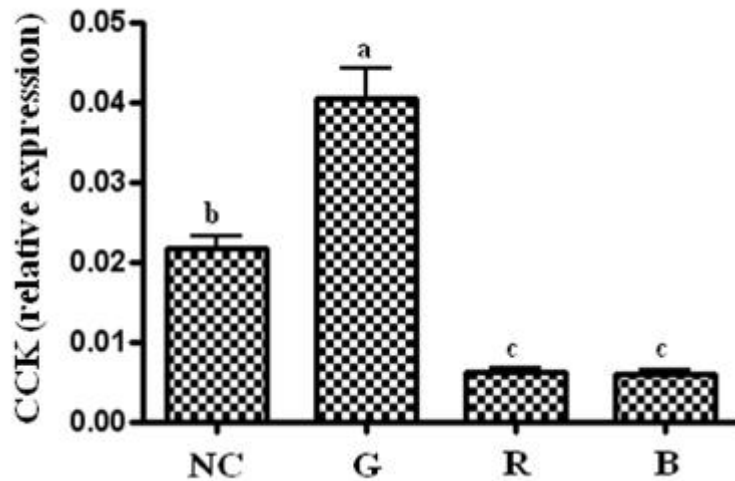


Fig. 76. CCK mRNA expression in the anterior intestine portion of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks. Abbreviation: B, blue light condition; G, green light condition; NC, natural condition; R, red light condition. Different superscript on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

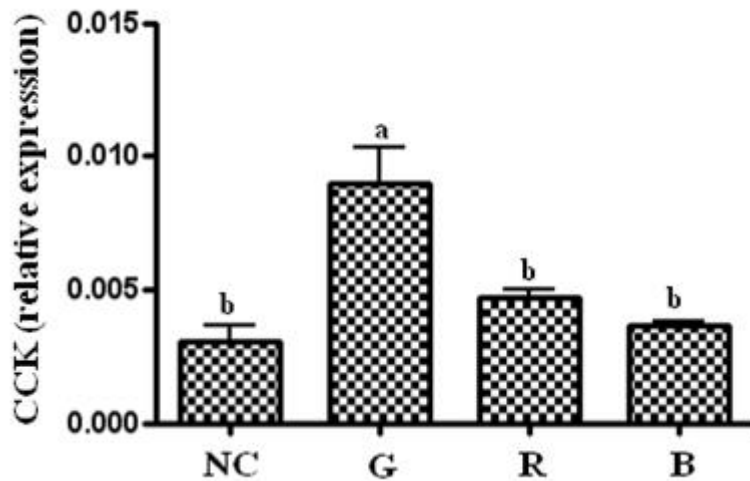


Fig. 77. CCK mRNA expression in the pyloric caeca of longtooth grouper reared under different light spectra for 12 weeks. Abbreviation: B, blue light condition; G, green light condition; NC, natural condition; R, red light condition. Different superscript on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3. 사육시스템에 따른 사육어의 성장

바리과 어류의 양식산업의 활성화를 위해서는 무엇보다 바리과 어류가 잘 성장 할 수 있고, 수익이 발생하는 안정적 생산이 가능한 기술 개발 및 소비자의 사회적 의식에 맞는 친환경적인 사육시스템의 최적화 기술개발이 절실히 필요 하다. 특히 바리과 어류 중 자바리 종묘를 자연조건(수온 12~28℃)에서 사육결과 3년 경과한 현재 최대 성장한 개체는 약 500~600 g 내외이고, 수온 20℃이상 되는 여름철에만 주로 성장하며, 저수온기(16℃이하)에는 성장률이 낮기 때문에 현재 유수식 양성사육 시스템으로는 바리과 어류의 상품화(1 kg)까지 많은 시간이 소요된다. 따라서 바리과 어류의 성장 적수온인 년중 사육수온을 20℃이상 유지시키는데 적합한 순환여과사육시스템으로 바리과 어류의 양성 및 어미관리에 이용하였다(Fig. 78).

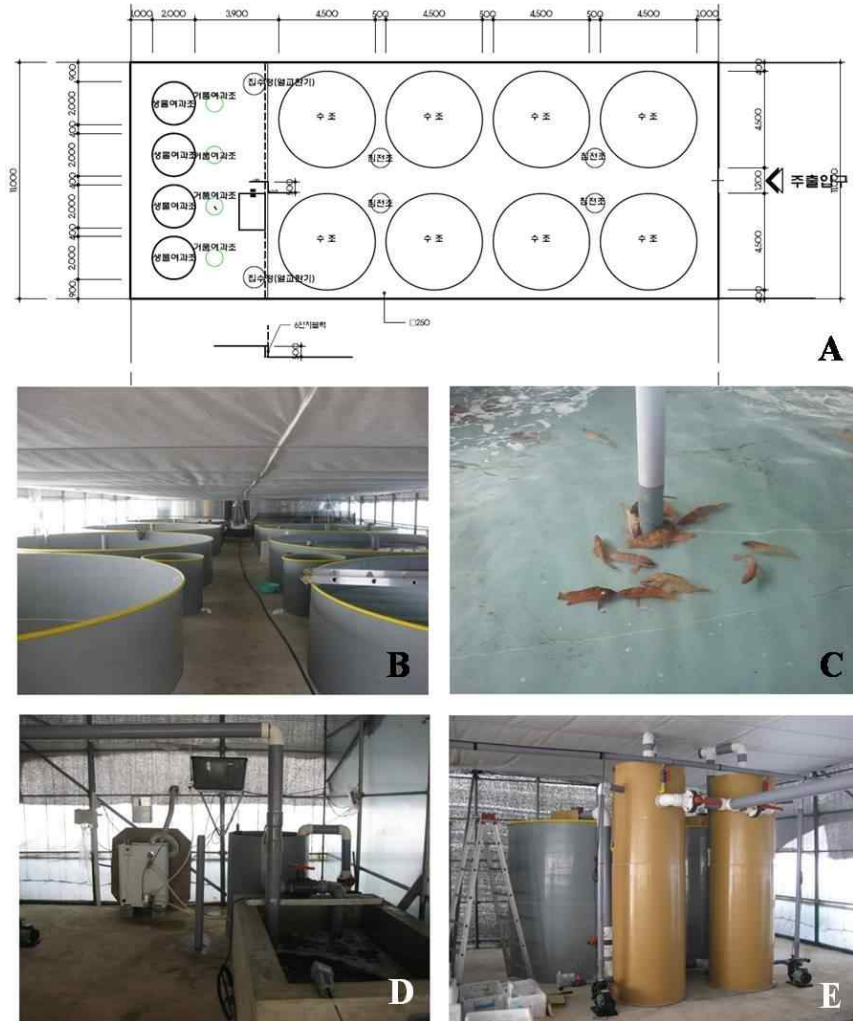


Fig. 78. Recirculating aquaculture system using heat of under ground sea water. A, schematic diagram of recirculating aquaculture system; B and C, fish culture tank; D, heat exchange tank, E, skimmer and biological filtration tank.

바리과 어류의 치어 사육관리를 통해 지하해수 열이용 순환여과의 사육시스템 효과를 조사하기 위해 자연수온으로 사육한 대조구와 수온 조절한 처리구로 나누어 실험하였다. 대조구는 붉바리 치어(전장  $22.8 \pm 0.19$  cm, 체중  $180 \pm 4.7$  g) 73마리를 유수식 수조에 수용하여 사육관리 하였으며, 처리구는 붉바리 치어(전장  $22.7 \pm 0.2$  cm, 체중  $181 \pm 4.7$  g) 73마리를 수온조절(수온  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  유지)한 순환여과사육수조에 수용하여 사육관리 하였다. 사육수조는 FRP원형수조(지름  $4\text{ m} \times 1.2\text{ m}$ ) 2개를 이용하였으며, 대조구의 경우 유수식 방법으로 지하해수를 이용해 실험 기간중 수온이  $16 \sim 17^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며, 처리구의 경우 지하해수 열이용 보일러 순환여과 사육시스템 방법을 이용해 실험 기간중 수온을 약  $25^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 각 실험구당 홍바리 치어 73마리를 수용하였으며, 일반 배합사료(extruded pellet, EP)를 1일 2회 반복급이 하였다. 실험 기간중 각 실험구의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO)를 매일 측정하였으며, DO

의 측정은 DO meter (YSI-85)를 사용하였다. 실험어의 측정은 시작시와 시작 후 4주째에 전장과 체중을 전수 측정하였으며, 측정 전날 오후 및 당일 날은 절식 하였다. 체중은 전자저울로 1.0 g까지 측정하였으며, 전장은 자체 제작한 측정판으로 1 mm까지 측정하였다. 측정후에는 실험어를 Oxytetracycline 100 ppm으로 1시간 약욕하였다.

실험기간 중 각 실험구별 평균수온과 DO 변화를 조사한결과, 대조구인 유수식수조의 경우 평균 수온은 16.3℃ 이었으며, DO는 8.6-11.5 mg/l 범위 내외였다. 실험구인 순환여과수조의 경우 평균 수온은 24.8℃ 이었으며, DO는 6.3-7.15 mg/l 범위 내외였다.

실험 시작시 전장은 대조구의 경우  $22.8 \pm 0.2$  cm이었으며, 처리구의 경우  $22.7 \pm 0.2$  cm 이었다. 4주후 측정시 대조구의 경우  $22.8 \pm 1.9$  cm이었고, 처리구의 경우  $23.3 \pm 1.9$  cm으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 8주와 12후 대조구  $22.8 \pm 1.8$  cm,  $23.2 \pm 2.0$ , 처리구  $24.1 \pm 1.8$  cm,  $25.1 \pm 1.8$ 로, 대조구에 비해 처리구가 높은 성장 효과를 보였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 79). 실험 시작시 체중은 대조구의 경우  $180.8 \pm 4.7$  g이었으며, 처리구의 경우  $181.9 \pm 4.7$  g으로 유의한 차이가 없었으나, 4주후 대조구의 경우  $189.4 \pm 5.4$  g, 처리구의 경우  $217.9 \pm 5.4$  g, 8주후 대조구  $201.7 \pm 5.1$  g, 처리구  $264.9 \pm 6.1$  g, 8주후 대조구  $210.9 \pm 5.3$  g, 처리구  $306.1 \pm 7.6$  g으로 대조구에 비해 높은 성장을 보였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 80).



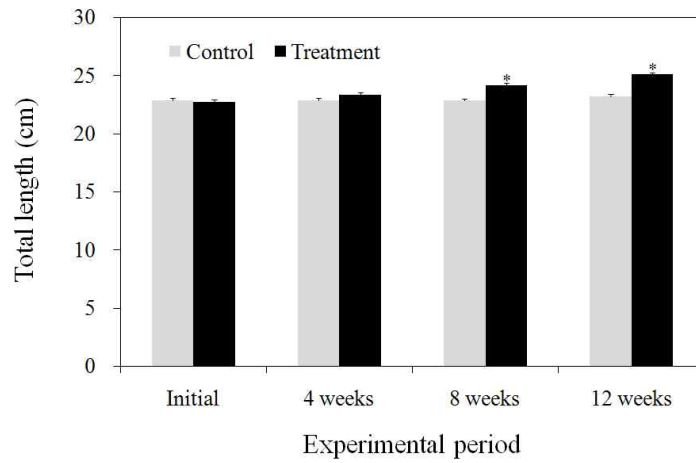


Fig. 79. Change of total length in control and treatment group. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E

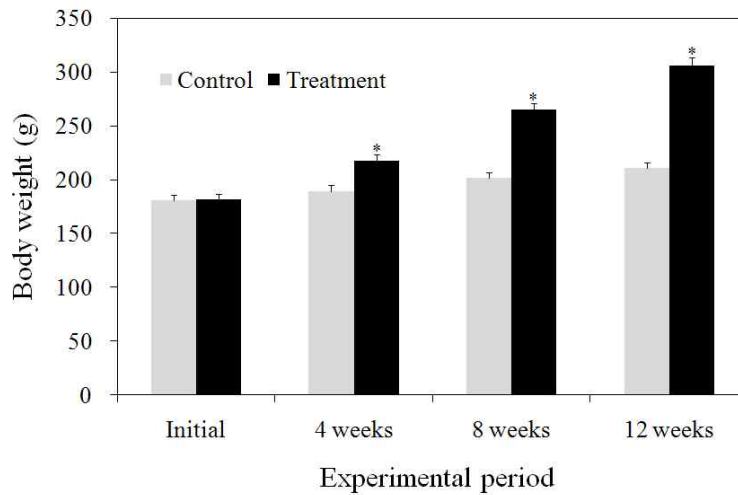


Fig. 80. Change of body weight in control and treatment group. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차 년도	2009	■ 홍바리 번식특성	20 %	· 성 특성 및 성숙시기 조사 · 번식생리 특성 조사	100
		■ 어미확보 성숙도 탐색	30 %	· 어미확보 및 성장과 성숙도 탐색	100
		■ 최적화 사육시스템 구축	30 %	· 최적화 사육시스템 구축 및 운영	100
		■ 배우자 성숙 유도를 위한 번식 호르몬 효과조사	20 %	· 번식호르몬의 효과 조사 · 실내 성숙 유도를 위한 호르몬 조사	100
2차 년도	2010	■ 배우자 성숙 유도 및 수정란 생산	40 %	· 호르몬을 이용한 배란유도 기술 개발 및 수정란 생산 · 정자동결 보존기술 개발	100
		■ 고품질 수정란 생산 시스템 개발	30 %	· 난질 평가 인자 탐색 및 사육 환경에 따른 난질 분석 · 형태적, 생리적, 생화학적 난질 평가 인자 탐색	100
		■ 자·치어 사육 및 성장발달 특성	30 %	· 기형 현상 분석 및 저감방안 검토 · 초기 발생 및 자·치어 행동, 기관분화	100
3차 년도	2011	■ 고품질 수정란 생산을 위한 난질 평가 방법 개발	30 %	· 고품질 수정란의 대량 생산 · 성 성숙 유도 생리 특성 인자 및 난질 평가 시스템	100
		■ 종묘 생산성 향상 사육시스템	40 %	· 자·치어 성장 및 생존율 향상 · 안정적 양성기술 개발	100
		■ 사육환경에 따른 종묘 건강도 분석	30 %	· 기형을 저감 종묘사육 환경 제어	100
최종 평가	2012	■ 번식 특성 및 자·치어 발달	30 %	· 어미확보 · 번식 특성 규명 및 자·치어 발달 향상	100
		■ 친환경 시스템을 이용한 사육 기술 개발	30 %	· 바리과 어류 사육 최적화 기술 개발	100
		■ 고품질 수정란 생산 및 안정적 생산기술 개발	40 %	· 안정적 바리과 어류 생산 기술 개발	100

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1. 연구개발 성과

- 홍바리 성성숙 제어 기술개발
  - 홍바리 번식생리 기작 규명을 통한 인위적 성성숙 제어 매뉴얼 개발
  - 환경조절을 통한 홍바리 성성숙 유도
  - 홍바리 성성숙 유도 기술 개발을 통한 연중 수정란 생산 기술기반 마련
  
- 홍바리 건강수정란 생산
  - 건강수정란 생산을 위한 난질 평가 후보인자 탐색
  - 건강수정란 생산을 위한 난질 평가 기법 확립
  
- 종묘생산성 향상 사육시스템 개발
  - 자치어의 소화관 발달 및 소화생리 특성 탐색으로 초기 대량폐사 감소 방안 마련
  - 사육광조건(과장별) 자치어의 성장률과 소화생리 특성 조사로 안정적인 양성기술 개발
  
- 최적화 사양관리 시스템 구축
  - 바리과 양식산업화의 선결문제인 친환경적인 사양관리시스템의 최적화 기술개발
  - 사양관리환경요소 및 개체별 체계적 사육관리 시스템 확립

## 2. 성과활용 계획

### 가. 실용화·산업화 계획

- 연중 건강 수정란 생산 기술개발
  - 사육환경 조절을 통한 사계절 연중 건강 수정란 생산이 가능한 기술 개발이 필요
  - 안정적인 건강 수정란 생산을 위한 사양관리 기술개발
  - 어미의 건강 및 질적 향상을 위한 방안 모색
  - 건강 수정란 우점 유전인자 판별 기술 개발
  
- 최적 사양관리 시스템 개발
  - 양질이 수정란을 생산 및 어미의 산란량 증가 방안 탐색
  - 초기 자어 사육에 필요한 먹이생물의 고밀도 생산 방법 탐색
  - 고성장 및 면역력 강화를 위한 최적 사육시스템 구축
  - 사육환경 조절을 통한 이형 발생 억제 기술 개발

나. 교육·지도 및 기술 확산 계획

■ 산학연 네트워크 구축

- 연구원들의 지속적인 현장 방문을 통해 현장에서 일어나는 문제 해결방법 모색 및 지도
- 산학연 네트워크를 통한 상호정보교류 및 해양생물자원산업분야의 공통 애로기술 개발
- 연구결과의 기업지원 실용화를 위한 매뉴얼 제작

다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획

■ 논문

국내전문학술지: 5건 게재

- 게재논문 1

홍바리, *Epinephelus fasciatus*의 인공수정 전·후 난문의 미세구조적 변화. 한국현미경학회. 41(2), 123~128. 2011

- 게재논문 2

홍바리(*Epinephelus fasciatus*) FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit의 분리 및 동정. 한국수산과학회지. 45(1), 17~24. 2012

- 게재논문 3

Effects of Steroid Hormones on In Vitro GVBD and Oocytes Steroidogenesis in Blacktip Grouper, *Epinephelus fasciatus*. Dev. Reprod. 16(1), 39~45. 2012

- 게재논문 4

홍바리, *Epinephelus fasciatus* 정자의 미세구조. 한국전자현미경학회. 42(2), 61~66. 2012

- 게재논문 5

홍바리, *Epinephelus fasciatus* KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA 발현양상. 한국발생생물학회. 16(2), 121~128. 2012

국외전문학술지: 3건 투고 중

- 심사중 논문 1

투고학회지: World Aquaculture Society

제 목: Development of the digestive system of the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*

- 심사중 논문 2

투고학회지: Tissue and Cell

제 목: Characterization of cholecystokinin-producing cells and mucus-secreting goblet cells in the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*

- 투고예정 논문 3

투고학회지: General and Comparative Endocrinology

제 목: Sex maturation factors with photoperiod and water temperature in the female blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*

- 고품질 수정란 생산 및 국내에 서식하는 바리과 어류의 성특성 및 난질 향상에 관한 연구를 추진하여 국내외 학술지 등에 게재할 계획
- 바리과 어류의 양식산업화 관련 연구 성과 특히 출원할 계획임

라. 추가연구 및 타연구 활용 계획

- 바리과 어류의 양식산업화 분야에 활용
  - 바리과 어류의 성성숙 제어
  - 바리과 어류의 건강 수정란 생산
  - 바리과 어류의 종묘생산

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 어류의 성성숙 제어 및 번식 내분비 기작

뇌-뇌하수체-생식소의 축에 의한 번식내분비의 조절은 지난 10년간 어류를 포함한 여러 척추동물의 번식생물학연구에 가장 핵심이 되는 내용이었으나 최근 KiSS1과 그의 수용체인 G protein-coupled receptor 54 (GPR54)의 발견으로 새로운 번식내분비계의 축이 구성되어지고 있다.

GPR54의 경우 어류에서 많은 연구가 수행되고 있으며, cichlid fish *Haplochromisburtoni*, cobia *Rachycentroncanadum*, flathead mullet *Mugilcephalus*, zebrafish *Danio rerio*, fathed minnow *Pimephalespromelas* 그리고 senegalese sole *Soleasenegalensis* 등에서 분리·동정되어 어류의 성 성숙과 puberty의 관계를 중심으로 다양한 연구가 수행되고 있다(Parhar et al., 2004; Mohamed et al., 2007; Nocillado et al., 2007; van Aerle et al., 2007; Filby et al., 2008; Mechaly et al., 2009).

### 2. 건강수정란 생산을 위한 난질평가 방법

난질을 평가하고 관리하기 위한 연구는 친어에서 생산된 난의 형태적, 생리생화학적 인자를 탐색하여 비교, 분석하는 것이 일반적이다. 이전의 연구에서는 상업적 어종의 난질 평가를 위해 난경과 유구의 크기, 수정 후 초기 난할 단계에서의 형태적 특징 (Kj ørsvik et al., 2003; Thorsen et al., 2003; Gimenez et al., 2006; Hansen and Puvanendran. 2010; Deniz et al., 2011), 그리고 난소액의 pH와 같은 형태적, 물리화학적 방법 (Aegerter and Jalabert, 2004).을 제시하였으며 생리생화학적 평가 기준으로는 난의 효소 활성화도 (Aegerter and Jalabert, 2004; Gimenez et al., 2006), 아미노산 및 지방산 함유량 (Vazquez et al., 1994; Tomas et al., 2005; Ismael et al., 2011) 그리고 thyroid hormones ( $T_3$ ,  $T_4$ ), sex hormones (estradiol, testosterone) 그리고 cortisol (de Jesus et al., 1991; Hwang et al., 1992; Auperin and Geslin. 2008; Simontacchi et al., 2009)과 같은 스테로이드 계열 호르몬의 함유량을 난질 평가 인자로 보고하고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

- Bagarinao T, 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. *Mar. Biol.*, 91:449-459.
- Bell MV, Henderson RJ, Sargent JR. 1985. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81:193-198.
- Blaxter JHS, Hempel G. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea karengus* L.). *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 28:211-244.
- Brooks S, Pottinger TG, Tyler CR, Sumpter J. 1995. Does cortisol influence egg quality in the rainbow trout *Oncorhynchus keta*. In Goetz, F. W. and Thomas, P., eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin, Texas, USA: Fish Symposium '95, Austin, p. 180.
- Brooks S, Tyler CR, Sumpter JP. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(4):387-416.
- Busson-Mabillot S. 1982. Differentiation of a lysosomal compartment in trout oocyte before vitellogenin uptake. Its role during yolk formation. *Biol. Cell*, 45:154.
- Busson-Mabillot S. 1984. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the trout. *Biol. Cell*, 51:53-66.
- Carnevali O, Moscony G, Roncarate A, Belvedere P, Limatola E, Polzonetti-Megni AM. 1993. Yolk protein changes during oocyte growth in European seabass *Dicentrarchus labrax*. *J. Appl. Ichthyol.*, 9:175-194.
- Carnevali O, Centonze F, Brooks I, Marota S, Sumpter JP. 1999. Molecular Cloning and Expression of Ovarian Cathepsin D in Seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.*, 61:785-791.
- Chan STH, Yeung WSB. 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. *Fish physiology*, 6:171-222.
- Corcobado-Onate F, Coa A, Arnaiz R, Rua N, Olmedo F. 1993. Peso, talla y composicio.n en acidos grasos de huevos de Rodaballo (*Psetta maxima* (Linneo,1758))Relacion con la calidad de puesta y ciclo ovulatorio. In: *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*, (ed. by A. Cervino & A. Guerra) pp. 43-48. Illa de Arousa (Vilanova de Arousa), Spain (in Spanish).
- de Jesus EG, Hirano T, Inui Y, 1990. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese

- flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol., 82:369–376.
- de Jesus EG, Hirano T, 1992. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol., 85:55–61.
- Deniz CH, Okan K, Cijeyt S, Sukru Y, Gokhan A, Korkut AY, Sahin S, Kursat F, 2011. Effect of Some Morphometric Characteristics on Egg Quality in Common Dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences., 11:425–437.
- Evans RP, Parrisha CC, Brown JA, Davisb PJ. 1996. Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture, 139:139–149.
- FAO, 1993. FAO species catalogue Vol. 16. Groupers of the world. 1–10. FAO Rome
- Fauvel C, Omnusb a, Suquetb MH, Normantb Y. 1993. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. Aquaculture, 117:107–113.
- Feist G, Schreck CB, Fitzpatrick MS, Redding JM. 1990. Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. Gen. Comp. Endocrinol., 80:299–313.
- Ferreira BP. 1995. Reproduction of the common coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae: Epinephelinae) from the central and northern Great Barrier Reef, Australia. Bull Mar Sci., 56(2):653–669.
- Furuita H, Yamamoto T, Shima T, Suzuki N, Takeuchi T, 2003. Effect of arachidonic acid level in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 220:725–735.
- Gimenez G, Estevez A, Lahnsteiner F, Zecevic B, Bell, JG, Henderson RJ, Pieera, J. A., Senchez-Prado, J. A., 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture, 260:232–243.
- Glamuzina B, Skaramuca B, Glavic N, Kozvul V, Dulcic J, Kraljevic M. 1998. Egg and early larval development of laboratory reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Scientia Marina, 62(4):373–378
- Hart NH, Wolenski JS. Donovan MJ. 1987. Ultrastructural localization of lysosomal enzymes in the egg cortex of *Brachydanio*. J. Exp. Zool., 244:17–32.
- Hassin SD, de Monbrison, Hanin Y, Elizur A, Zohar Y, Popper DM. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. Aquaculture, 156:305–316.



- Hussain NA, Higuchi M. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) Aquaculture, 19:339–350.
- Hwang PP, Wu SM, Lin JH, Wu LS, 1992. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. Gen. Comp. Endocrinol., 86:189–196.
- Hwang SI, Lee YD, Song CB, Rho S. 1998. Gonadal development and the effect of 17  $\alpha$ -methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. Aquaculture, 11:173–182.
- Ismael HC, Marcelino H, Daniel Q, Ana R, Jose IN, Antonio L, Eduardo A. 2011. Total lipid and fatty acid composition of brill eggs *Scophthalmus rhombus* L. relationship between lipid composition and egg quality. Aquacult. Res., 42:1011–1025.
- Iwamatsu T, Kobayashi H, Hamaguchi S, Sagegami R, Shuo T. 2005. Estradiol-17 $\beta$  content in developing eggs and induced sex reversal of the medaka (*Oryzias latipes*). J Exp Zool., A 303:161-167.
- Iwamatsu T, Kobayashi H, Sagegami R, Shuo T. 2006. Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). Gen Comp Endocrinol., 145:67-74.
- Kestemont P, Cooremans J, Abi-Ayad A, M'elard C. 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period. Fish Physiol. Biochem., 21:59–6.
- Kim IS, Lee WO. 1994. Fish fauna from Cheju Island, Korea. The study group of Korea Fish Fauna Dept. Biol., Chonbuk Nat. Univ., 1~51.
- Kim BH, Kim KM, Lee YD, Song CB, Rho S. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. I. The effect of HCG on ovulation induction. J. Aquacult., 10(1):55–61. (in Korean)
- Kitajima C, Takaya M, Tsukashima Y, Arakawa T, 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. Jap. J. Ichthyol., 38:47–55. (in Japanese)
- Kobayashi N, Iwakami K, Kotoshiba S, Niwa T, Kato Y, Mano N, Goto J. 2006. Immunoenzymometric Assay for a Small Molecule, 11-Deoxycortisol, with Attomole-Range Sensitivity Employing an scFv-Enzyme Fusion Protein and Anti-Idiotypic Antibodies. Anal. Chem., 78:2244–2253.
- Kohno H, Diani S, Supriatna A. 1993. Morphological development of larval and juvenile grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. Japan, J. Ichthyol., 40(3):307–316.
- Koven WM, Tandler A, Sklan D, Kissil GW. 1993. The association of

- ecoisapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture*, 116:71-82.
- Kuo CM, Ting YY, Yeh SL. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74:113-126.
- Kwon JY, Francisco P, Clive R, Charles RT. 2001. Molecular Characterization of Putative Yolk Processing Enzymes and Their Expression During Oogenesis and Embryogenesis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.*, 65:1701-1709.
- Lahnsteiner F, Patarnello P. 2005. The shape of the lipid vesicle is a potential marker for egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, and in the sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. *Aquaculture*, 246:423-435.
- Lee CK, Hur SB, Park S, Kim BG, 1997. Qualities of spawned eggs during the spawning period in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J. Aquacult.*, 10(4):463-472.
- Lee CK, Hur SB. 1997. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J. Aquaculture*, 10(4):473-483. (in Korean)
- Lee CK, Hur SB, Ko TS, Park S. 1998. Maturation, sex ratio and sex-reversal of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J. Aquacult.*, 11(4):573-580. (in Korean)
- Lee YD, Go HB, Kin HB, Park IS, Lee JJ. 1993. Sex reversal of protogynous hermaphrodite fish. *Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ.*, 17: 115-127.
- Lee YD, Kim HB, Song CB, Rho S, Lee JJ. 1996. Hormonal induction of sex reversal in serranid fish, *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Aquacult.*, 9(1):19-23.
- Lee YD, Park SH, Takemura A, Takano K. 2002. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycles in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawan waters. *Fisheries Science*, 68(4):872-877.
- Lim LC, Chao TM, Khoo LT. 1990. Observation on the breeding of brown marbled grouper *Epinephelus fusocuttatus*(Forsk.). *Singapore Journal of Primary Industry*, 18:66-84.
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. 2009. Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) Generated by Alternative splicing in a Modern Teleost, the senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Biol. Reprod.*, 80:60-69.
- Mikodina EV. 1987. Surface structure of the egg of teleostean fishes. *Voprosy*

*Ikhtiologii*, 1:106–113.

- Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA. 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J. Molecular Endocrinology*, 38:235–244.
- Mushiake K, Sekiya S, 1993. A trial of evaluation of activity in stripped jack, *Pseudocaranx dentex* larval. *Suisan Zoshoku*, 41:155–160 (in Japanese with English abstract).
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A. 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54) gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology*, 150:278–287.
- Okumura S, Okamoto K, Oonori R, Nakazono A. 2001. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture*, 206:165–173.
- Okumura S, Okamoto K, Oonori R, Nakazono A. 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture*, 206:165–173.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel g proteincoupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 145:3613–3618.
- Pavlov DA, Moksness E. 1994. Production and quality of eggs obtained from wolffish (*Anarhichas lupus* L.) reared in captivity. *Aquaculture*, 122: 295–312.
- Pavlov DA, Moksness E. 1996. Management by life cycle of wolffish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold water aquaculture: a technical paper. *Aquacult. Res.*, 27:865–883.
- Quinitio GF, Tan-Fermin JD, Nagai A. 2001. Possible application of mibolerone for induced sex inversion of grouper *Epinephelus coioides* *Aquaculture*, 67:232–237.
- Rasem BM, James CM, Al-Thobaiti SA, Carlos MH. 1997. Spawning of the Camouflage Grouper *Epinephelus polyphekadion* (Bleeker) in the Herpasaline Waters of Saudi Arabia., 9(4):251–259.
- Riehl R, Kock KH. 1989. The surface structure of Antarctic fish eggs and its use in identifying fish eggs from the Southern Ocean. *Polar Biology*, 9:197–203.
- Rothbard S, Moav B, Yaron Z. 1987. Changes in steroid concentrations during sexual ontogenesis in tilapia. *Aquaculture*, 61:59–64.

- Shapiro, Douglas Y, Sadovy, Yvonne; McGehee, Angela M. 1993. Periodicity of Sex Change and Reproduction in the Red Hind, *Epinephelus Guttatus*, a Protogynous Grouper Aquaculture, 53(3):1151–1162(12).
- Sire MF, Babin PJ, Vernier JM. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. J. Exp. Zool., 269:69-83.
- Song, YB. 2004. Induction of sexual maturation and early development of the seven band grouper, *Epinephelus septemfascitus*. Ph. D. thesis, Cheju Nat'l Univ., jeju Korea, 120 pp. (in Korean)
- Song YB, Baek HJ, Kim HB, Soyano K, Kim SJ, Lee YD. 2008. Induction of Maturation and Ovulation with HCG Treatment in the Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus*. J. Aquaculture, 21(2):96–101. (in Korean)
- Stratholt ML, Donaldson EM, Liley NR. 1997. Stress induced elevation of plasma cortisol in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), is reflected in egg cortisol content, but does not appear to affect early development. Aquaculture, 158:141-153.
- Strussmann CA, Takashima F. 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). J. Fish Biol., 36:59–65.
- Tagawa M, Suzuki K, Specker JL. 2000. Incorporation and metabolism of cortisol in oocytes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J. Exp. Zool., 287:485-92.
- Tanaka H, Hirose K, Nogami K, Hattori K, Ishibashi H, 1990. Sexual maturation and sex reversal in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 17:1–15.
- Tanaka M, Tanangonan JB, Tagawa M, de Jesus EG, Nishida H, Isaka M, Kimura R, Hirano T. 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. Aquaculture, 135:111-26.
- Toledo JD, Nagai A, Javellana D. 1993. Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. Aquaculture, 115:361–367.
- van Aerle R, Kille P, Lange A, Tyler CR. 2007. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. Peptides, 29:57–64.
- Vazquez R, Gonzalez S, Rodriguez A. & Mourente G. 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding

- larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture*, 119:273–286.
- Watanabe T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. of World Aquacult. Soc.*, 24:495-501.
- Yamashita M. Konagaya S. 1991. Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J. Biochem.*, 110:762-766.