

박사학위논문

Maroon Clownfish, *Premnas biaculeatus*의

번식생물학적 연구

제주대학교 대학원

수산생물학과



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

김종수

2006년 6월


Maroon Clownfish, *Premnas biaculeatus*의
번식생물학적 연구

지도교수 노 섬

김 종 수

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월

 제주대학교 중앙도서관
김종수의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장 홍 성 윤 ①

위 원 이 정 의 ①

위 원 이 영 돈 ①

위 원 허 문 수 ①

위 원 노 섬 ①

제주대학교 대학원

2006년 6월

**Reproductive Biology of the Maroon
Clownfish, *Premnas biaculeatus***

Jong-Su Kim

(Supervised by Prof. Sum Rho)



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

**DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

June 2006

목 차

ABSTRACT	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 산란, 부화 및 자치어 사육	4
1) 짝짓기 및 산란행동	4
2) 수정란 관리	6
3) 난 발생	6
4) 자치어 사육	6
5) 체색 기형	8
2. 인공 종묘생산	9
1) 자치어의 사육 적정 염분	9
2) 자치어의 전장과 입 크기 변화	9
3) 적정 <i>Artemia</i> nauplii 섭취량	10
4) 먹이 공급 방법 및 식물플랑크톤 첨가에 따른 초기 성장과 생존 · 10	
(1) 먹이 공급 방법에 따른 초기 성장 및 생존	10
(2) 식물플랑크톤 첨가와 자치어의 사육밀도에 따른 초기 성장 및 생존	11
3. 자치어 사육과정 중의 병원성 미생물 확인	13
1) 병원성 균주 분리	13
2) 분리균주의 생화학적 특성 분석	13
3) 분리균주의 분자생물학적 동정	13
(1) DNA의 분리	13

(2) PCR 수행 및 염기서열 분석	14
(3) 분리균주의 분자유전학적 동정	14
4) 약제감수성 시험	14
4. 골학적 특징	16
5. 통계 분석	17

III. 결과

1. 산란, 부화 및 자치어 사육	18
1) 짝짓기 및 산란행동	18
2) 수정란 관리	24
3) 난 발생	29
4) 자치어의 외부형태발달	34
5) 자치어의 행동	40
6) 체색기형	42
2. 인공종묘생산	44
1) 자어의 적정 염분	44
(1) 먹이공급 실험군	44
(2) 먹이 미공급 실험군	46
2) 입 크기 변화	46
3) <i>Artemia</i> nauplii의 섭취량	49
4) 먹이 공급 방법과 식물 플랑크톤 첨가에 따른 초기 성장 및 생존	49
(1) 먹이 공급 방법에 따른 초기 성장 및 생존	49
(2) 식물 플랑크톤 첨가 및 자치어 사육 밀도에 따른 초기 성장	55
(3) 식물 플랑크톤 첨가 및 자치어 사육밀도에 따른 초기 생존	62
3. 자치어 사육과정 중의 병원성 미생물 확인	66
1) 분리균주의 생화학적 특성	66
2) <i>Vibrio ponticus</i> 균의 분자생물학적 동정	66

3) <i>Vibrio ponticus</i> 균의 항생제 감수성	66
4. 골격계의 기재 및 <i>Premnas</i> 속의 골학적 특징	74
1) 골격계의 기재	74
(1) 두개골(Neurocranium)	74
(2) 안와골(Circumorbital bones)	77
(3) 악골(Jaws)	77
(4) 현수골(Suspensorium)과 새개골(Opercular apparatus)	80
(5) 설궁(Hyoid arch)	82
(6) 새궁(Branchial arch)	84
(7) 견대(Pectoral girdle)	87
(8) 요대(Pelvic girdle)	89
(9) 미골격(Caudal skeleton)	91
(10) 중축골격(Axial skeleton) 및 수직지느러미 지지골격(median fin supports)	91
2) 골학적 특징	95
(1) 누골 후하연의 가지	95
(2) 제 1안하골의 가지	95
(3) 주새개골, 하새개골 및 간새개골의 가지	95
 IV. 고찰	 98
 V. 요약	 115
 VI. 참고문헌	 117

ABSTRACT

Reproductive biology of maroon clownfish, *Premnas biaculeatus* was studied in terms of spawning, hatching, rearing of larvae, identification of a pathogenic *Vibrio* and skeletal characters of the fish.

Courtship, spawning behaviors, egg development and rearing of the larvae were documented. The larval development were described with illustrative figures. The gravid female spawned during 15:00-20:00. The male mainly took care of the eggs supplying oxygen by water currents using their pectoral fins, anal fin and mouth. The fertilized eggs were separative-adhesive and oval in shape, and 1.99 ± 0.03 mm in longer diameter and 0.88 ± 0.03 mm in shorter diameter. The fertilized eggs were deep orange color. Cleavage occurred from 30 min. after fertilization, and the egg reached 2 cells stage after 1 hr. 10 min. after fertilization under $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The embryo was formed after 23 hr. 40 min. after fertilization. Hatching began between 120 ± 2 hr. and 150 ± 12 hr. after fertilization in the incubator under $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Total length (TL) of the newly hatched larvae was 3.22 mm with mouth and anus opened. Ten days after hatching, mean TL of the larvae were 6.21 mm with 28 dorsal fin rays, 17 anal fin rays and 28 caudal fin rays. Nineteen days after hatching, mean TL of the larvae were 9.34 mm. At this stage the larva had three white bands on the body, and they began to feed on commercial diet.

Compared to other commercial species the larvae of clownfish have a larger mouth. The earlier *Artemia* nauplii was supplied, the better the growth rate of the larvae. The larvae of maroon clownfish was able to feed on *Artemia*

nauplii from the 4th days after hatching. Growth rate of the larva was better in the green water (including *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*) under the identical feeding scheme.

A bacterium isolated from maroon clownfish was identified by 16S rDNA sequence analysis, and its antibiotic sensitivity was measured. The bacterium was identified as *Vibrio ponticus* KJS1, and it was sensitive to oxolinic acid, flumequine, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, pefloxacin, doxycycline hydrochloride.

To clarify the osteological characteristics of the genus *Premnas*, the whole osteological systems were described with illustrative figures. The genus of *Premnas* has a distinct spine both on lacrimal and on the first infraorbital bones, compared to the genus *Amphiprion*.



I. 서 론

흰동가리류(anemonefish 또는 clownfish)는 damselfish와 함께 자리돔과(Pomacentridae)에 속하는 어류로 이 과에는 전 세계적으로 325종이 알려져 있으며 주로 인도-서태평양연안 열대와 아열대 해역에 서식하고 있다. 흰동가리류에는 *Amphiprion*속에 27종, *Premnas*속에 *P. biaculeatus* 1종이 있으며(Fautin and Allen, 1992), 우리나라에는 흰동가리, *A. clarkii* 1종이 제주도 연안에 서식하고 있다(Yu and Lee, 1995).

Maroon clownfish, *P. biaculeatus*는 주로 Indo-Malay 군도부터 북부 Queensland 지역에 분포하고 있으며(Fautin and Allen, 1992), 하얀 가로 줄무늬 maroon clownfish와 노란 가로 줄무늬 maroon clownfish 2개의 계통이 있다(Wilkerson, 1998).

Maroon clownfish 암컷은 전장 최대 160 mm까지 성장하고 수컷은 전장 100 mm 정도로 암컷의 절반 크기로서 밝은 색을 띠는 것이 특징이다(Fautin and Allen, 1992; Wilkerson, 1998). 이 종도 다른 clownfish들과 마찬가지로 연중 산란하고 알은 침성부착란이며 말미잘 근처의 암반 등 단단한 기질에 산란한다. 그리고 수컷과 암컷은 산란된 알이 부화할 때까지 보호하는 습성이 있다(Hoff, 1996; Wilkerson, 1998).

흰동가리류의 초기생활사 및 산란습성, 자치어 사육에 관한 연구로는 *A. xanthurus*의 영역 습성에 대한 연구(Moyer and Sawyers, 1972)를 비롯하여, 흰동가리와 saddleback clownfish, *A. polymnus*의 산란습성에 대한 연구가 있다(Moyer and Bell, 1976; Moyer and Steene, 1978). 우리나라에서는 saddleback clownfish의 산란과 난 발생 및 자치어 사육에 대한 연구가 이루어 졌다(Yoon *et al.*, 2005).

해산어 종묘생산 시 자치어의 생존율을 높이기 위해서는 먹이생물이 효과적으로 공급되어야 한다. 흰동가리류는 부화 직 후 입이 열리기 때문에 먹이를 부화 즉시 공급해 주어야 하고 초기 먹이 생물 급이는 로티퍼와 *Artemia* nauplii가 주로 이용된다(Suzuki and Takamatsu, 1989; Hoff, 1996; Wilkerson, 1998). Maroon clownfish의 경우 시각 발달이 늦어 부화 후 3일까지는 먹이에 대한 포식능력이 약하기 때문에 먹이 밀도를 높여 주어야 하고, 부화 후 3일부터 10일 사이에는 시각이 발달하여 이때 포식 성공률이 100%가 된다(Job and Bellwood, 1996; Wilkerson, 1998). 또한 green water의 효과는 종묘생산 초기에 미세조류를 첨가해 주었을 때 양호한 성장과 생존율을 보이므로(Bromley and Howell, 1983), 수질안정과 사육수조 내 로티퍼의 영양강화 효과를 기대할 수 있다(Reitan *et al.*, 1993). 이 연구에서는 *Artemia* nauplii, *Tigriopus japonicus* 및 인공배합사료 공급 시기를 다르게 하여 maroon clownfish 자치어의 성장 및 생존율 차이를 비교하였고, *Isochrysis galbana*와 *Nannochloropsis oculata* (농도 각각 5×10^5 cells/mL)를 maroon clownfish 사육조에 첨가하였을 때의 효과를 조사하였다.

흰동가리류에 피해를 입히는 질병 중 외부기생충성 질병은 *Brooklynella hostilis*가 원인인 Brooklynella병과 *Amyloodinium ocellatum*이 원인인 Amyloodinium병 등이 있고, 바이러스성 질병으로는 특히 ocellaris clownfish, *A. ocellaris*와 maroon clownfish의 Viral Erythrocytic Necrosis 등이 있다(Wilkerson, 1998). 그리고 세균성 질병으로는 *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. 등이 보고되고 있다(Hoff, 1996).

흰동가리류의 질병에 대한 연구로는 tomato clownfish, *A. frenatus*에 감염되는 기생충인 *Amyloodinium ocellatum*의 면역반응과 백신 개발에 대한 연구(Cobb, 1997; Cobb *et al.*, 1998)와 tomato clownfish에 감염되는 Cladosporiosis 증에 대한 연구가 있다(Silphaduang *et al.*, 2000).

*Vibrio*속 세균은 기회 감염성 세균으로 해수 어류의 정상 세균 총을 이루기도 하지만 때로는 질병의 원인체로서 수산생물의 폐사를 유발한다(Kang, 2003). 국내와 일본에서 종묘생산 시 발생하는 세균성 질병에 대한 연구로 넓치, *Paralichthys olivaceus* 자치어의 장관백탁증(bacterial white enteritis)에 대한 연구가 있다(Masumura *et al.*, 1989; Moon *et al.*, 2004). 이 연구는 maroon clownfish 종묘생산 중에 발생하여 대량폐사의 원인으로 추정되는 *Vibrio*속 세균을 동정하였다.

Maroon clownfish는 흰동가리류 중에 유일하게 *Premnas*속을 구성하는 1종으로 체색이 적갈색이고 머리와 배, 꼬리에 각각 흰색이나 노란색 가로띠를 가지고 있으며 특징적으로 누골 및 안하골에 큰 가시를 가지고 있다(Fautin and Allen, 1992). 그리고 자연에서 이 종과 공생하는 말미잘은 *Entacmaea quadricolor*종이 유일하다(Tulloch, 1998). 우리나라에서 자리돔과 어류의 골격에 대한 연구로는 자리돔속 어류에 대한 골격비교(Kim and Kim, 1997)가 이루어졌으나 흰동가리류에 대한 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

이 연구는 maroon clownfish의 안정적인 종묘생산 기술개발을 목적으로 자체 개발한 순환여과시스템에서 사육하면서 짝짓기를 통한 자연산란과 이에 따른 난 발생 및 초기생활사를 구명하였다. 종묘생산을 위한 먹이계열, green water 효과 실험 및 종묘생산 초기에 대량감모의 원인으로 판단되는 *Vibrio*속 세균 동정을 통해 세균성 질병 방제 대책을 수립함으로써 안정적인 종묘생산 기술 기반을 마련하고, 골학적 특징을 조사하여 유연속인 *Amphiprion*속 대표종과의 골격계 특징을 검토하여 종묘생산 시 기형의 원인 등을 밝히고자 수행 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 산란, 부화 및 자치어 사육

2001년 6월에 인도네시아에서 구입한 암컷(전장 7.3 cm)과 수컷(전장 4.2 cm) 1쌍을 순환여과 사육시스템(90×30×45 cm, Fig. 1)으로 사육하여 산란시켰다. 산란된 수정란의 인공부화 및 자치어를 사육, 양성하여 실험용 어미로 확보하였다.

사육수온은 히터를 사용하여 연중 $26.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고 광주기는 형광등과 차광막을 이용하여 14.0L:10.0D로 조정하였다. 사육수는 분당 2.4 L를 순환시켜 주었다. 먹이는 인공배합사료(천하제일사료)와 냉동어란을 이용하여 매일 3회(10시, 14시, 18시)에 걸쳐 섭식 행동이 멈출 때 까지 충분히 공급하였다.

1) 짝짓기 및 산란행동

짝짓기 과정을 관찰하기 위하여 인공 종묘생산 된 전장 5 cm내외의 개체를 2마리씩 사각 유리수조(60×45×30 cm)에 수용하였다.

어미 사육수조 내에 산란상으로 타일(15×15 cm)을 유리면에 45° 각으로 세워 놓았고, 화분(상단 지름 10 cm, 하단 지름 8 cm, 높이 25 cm)은 뒤집어서 넣었다. 짝짓기 및 산란행동은 비디오카메라(Sony, DCR-TRV 900)와 디지털카메라(Nikon, Coolpix 5700)를 이용하여 관찰하였다.

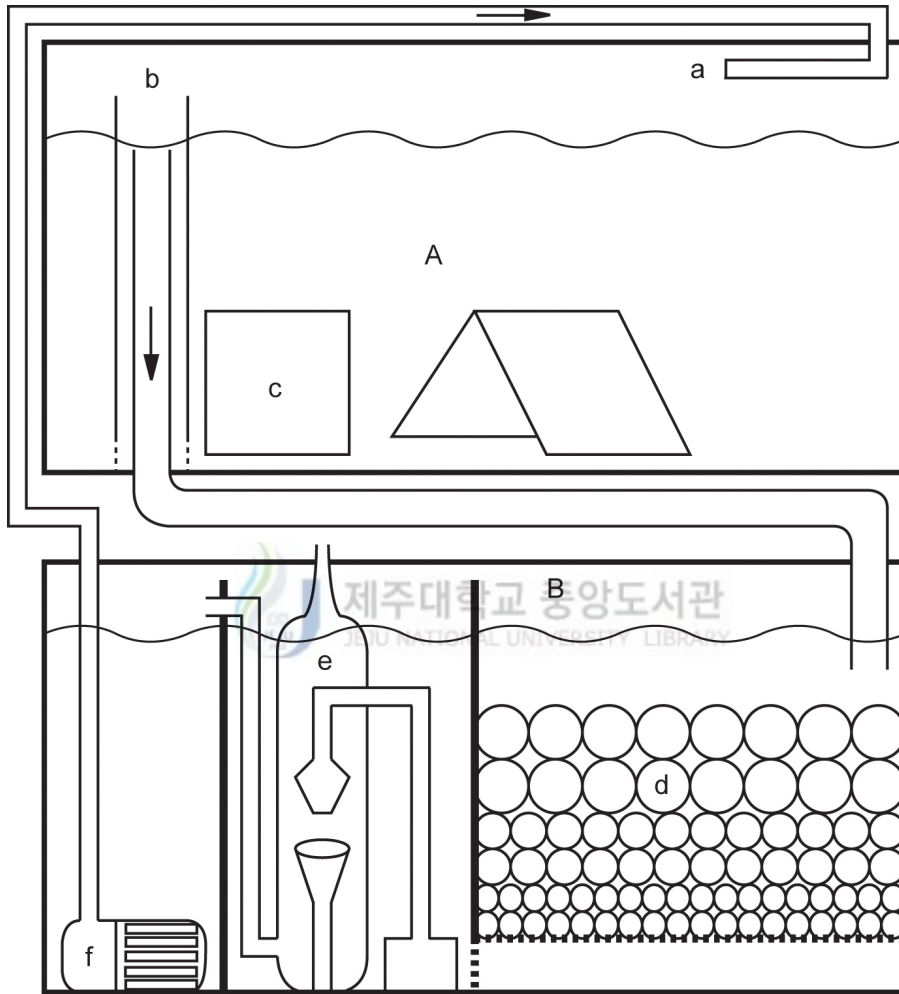


Fig. 1. Schematic diagram of the recirculating culture system. A, rearing tank; B, filter tank; a, inflow; b, outflow; c, nest; d, sand filter; e, protein skimer; f, pump.

2) 수정란 관리

산란이 완료된 수정란은 부화 시 까지 어미에게 알을 직접 관리시키는 방법과 알을 분리시켜 부화시키는 방법을 비교하였다.

부화는 산란기질에 부착된 수정란을 어미수조에서 분리하여 포르말린 250 ppm에 1분 동안 소독한 후 aeration 시키면서 부화시키는 Hoff (1996)의 방법과 자체 개발한 부화기를 이용하였다(Fig. 2). 부화 시 까지 수온과 염분은 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 와 32.0 psu이었고 광주기는 14.0L:10.0D로 조절하였다.

3) 난 발생

수정란 발생과정은 수온 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 산란 직후 유리관(내경 5 mm)을 이용하여 30개의 수정란을 부착기질에서 떼어낸 후 1 L 비이커에 수용하고 aeration 시키면서 해부현미경(Nikon, SM2-U)과 광학현미경(Olympus, BHS W/AU)을 이용하여 시간 경과에 따른 발생과정을 관찰하였다.

4) 자치어 사육

부화 자치어는 사육수조 위에 백색 형광등을 설치하여 광주기를 15.5L:8.5D로 조절시킨 12 L 아크릴 원형수조에 수용하여 사육하였다. 사육 수온은 히터를 이용하여 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 내외로 유지하였으며 사육수는 매일 1/3-1/4 정도 교환하였다. 먹이는 난황이 흡수되는 것을 확인하고 부화 직후에 공급하였다. 최초먹이는 농축 *I. galbana*, *N. oculata*, *Tetraselmis suecica*를 3:3:4로 혼합한 배양액으로 영양 강화한 로티퍼, *Brachionus rotundiformis*를 10개체/mL 공급하였고, 2-3시간 마다 보충하여 적정 밀도를 유지시켰다. 부화자치어의 성장에 따라 로티퍼의 영양강화와 동일한 방법으로 혼합한 배양액으로 영양 강화한 *Artemia nauplii*, *T. japonicus*, 및 해산 자어용 미립자 배합사료(200-400 μm , Otohime Co.)를 공급하였다. 부화 자치어의 형태 발달

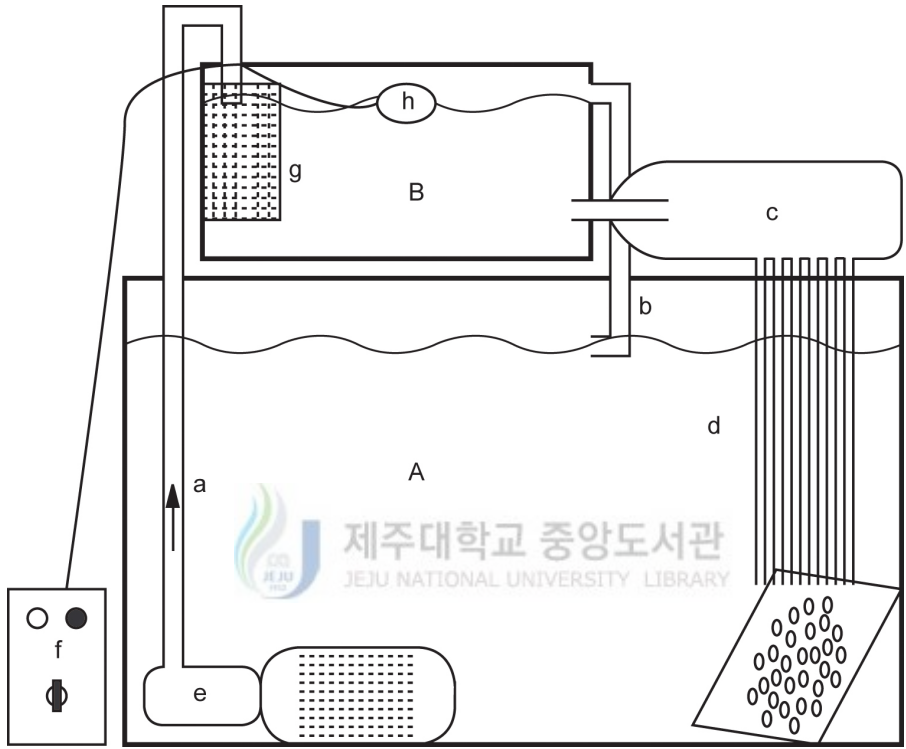


Fig. 2. Schematic diagram of incubator for the hatching of *Premnas biaculeatus* fertilized eggs. A, hatching tank; B, header tank; a, outflow; b, inflow; c, dispenser; d, dispenser hoses; e, circulation pump; f, auto control box; g, filter; h, regulator of water level.

과정은 Tricaine methanesulfonate (MS 222)를 사용하여 마취시킨 후 해부 현미경(Nikon, SM2-U)과 광학현미경(Olympus, BH-2)을 이용하여 관찰하였다. 자치어의 크기는 만능투영기(Mitutoyo, PJ-H 3000F)를 이용하여 0.01 mm 까지 측정하였다.

5) 체색 기형

부화 치어의 체색 기형 조사는 산란 회수별로 수거한 수정란에서 부화한 개체들 중, 각 회수별로 가로며 형태가 완전하지 못한 개체를 대상으로 조사하였다.



2. 인공 종묘생산

1) 자치어의 사육 적정 염분

종묘생산 과정 중의 적정 염분을 알아보기 위하여 부화 직후부터 로티퍼와 *Artemia* nauplii를 공급한 실험구와 먹이를 공급하지 않은 실험구로 나누어 조사하였다. 부화 자어를 $26.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건에서 염분 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 및 33.0 psu의 5개 실험구(3반복)에 먹이 공급 실험구는 각 실험구당 25마리씩 수용하였고, 먹이를 공급하지 않은 실험구는 15마리씩 수용하였다. 수질 환경을 유지하기 위하여 동일 염분으로 제조된 사육수를 매일 1/2 정도 교환하여 주었다. 생존율은 수조 저면에 사망한 개체를 사이폰으로 수거한 후 계수하여 구하였고 8일간 실험을 진행하였다.

2) 자치어의 전장과 입 크기 변화

부화 후 성장에 따른 적정 크기 먹이를 선택하기 위하여 전장변화와 입 크기와의 관계를 조사하였다. 20 L 사각 유리수조(40×30×25 cm)에 부화 자어를 수용하여 부화 직후부터 영양강화된 로티퍼를 공급하였다. 부화 후 4일째에는 영양강화된 *Artemia* nauplii를 공급하였으며, 부화 후 7일째와 8일째에는 *T. japonicus*를 추가로 공급하였다. 시험기간 중의 수온은 $26.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지시켜 주었다.

자치어의 입 크기(d)변화는 상악장 크기(upper jaw length, UJL)를 기준으로 설정한 Shirota (1970)의 방법에 따라 $d = \sqrt{2} \times \text{UJL}$ 식으로 구하였다. 자어의 상악장 및 전장은 부화 후 4일까지는 매일 10마리씩 채집하여 측정하였고, 그 후 부터는 2일 간격으로 채집하여 부화 후 8일까지 조사하였다.

자치어 크기는 매일 채집하여 MS 222를 이용하여 마취시킨 후 만능투영기(Mitutoyo, PJ-H 3000F)를 이용하여 0.01 mm 까지 측정하였다.

3) 적정 *Artemia* nauplii 섭취량

적정 *Artemia* nauplii의 공급량을 조사하기 위하여 부화 후 8일부터 18일째 치어를 대상으로 2일 간격으로 섭취량을 조사하였다. 실험은 2 L 비이커에 치어를 수용한 후 5분 동안 치어의 활력을 관찰하여 스트레스에 의해 이상 유영을 보인 치어는 다른 실험어로 대체하였다. *Artemia* nauplii는 각각 부화 후 8일째와 10일째에는 100, 200, 300개체를 공급하였고, 부화 후 12일째와 14일째에는 500, 1,000, 1,500개체씩을 공급하였으며, 부화 후 16일째와 18일째에는 1,000, 1,500, 2,000개체씩 공급하였다. 각 실험구는 12시간 후에 실험어를 분리한 다음 수조 내에 남아있는 *Artemia* nauplii를 계수하여 치어 1마리당 평균 섭취량을 구하였다.

4) 먹이 공급 방법과 식물 플랑크톤 첨가에 따른 초기 성장과 생존

먹이 공급 방법과 식물 플랑크톤 첨가 방법(green water 조성 방법) 및 수용한 자치어의 밀도를 달리하는 실험조건에서 maroon clownfish 자치어의 성장과 생존율을 비교하였다.

실험기간 중 폐사어는 즉시 회수하였고, 어체 크기는 만능투영기(Mitopoyo, PD-3000)와 디지털 카메라(Nikon, Coolpix 5700)로 촬영한 후 image scope 2.3 (Image Line, Inc.)으로 10 μ m까지 매일 22시에 사육수 교환 시 측정하였다.

(1) 먹이 공급 방법에 따른 초기 성장 및 생존

Artemia nauplii 공급 시점에 따른 성장 및 생존율 조사 실험은 10 L 사육수량의 유리 사각수조에 부화 자어를 각각 30마리씩 수용하였다. 사육수는 지수상태를 유지하면서 aeration을 시켜주었으며, 히터를 이용하여 수온 $26.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 매일 20시에 사육수의 1/2 정도를 교환하고 수조 내에 남은 먹이생물은 전량 회수하였다.

부화 후 4일째의 자어를 3가지 먹이 공급 방법에 따라 비교 실험하였다. 실험 A는 부화 후 4일째부터 *Artemia nauplii*를 공급하기 시작하여, 9일째에는 *T. japonicus*, 15일째부터 배합사료를 공급하였다. 실험 B와 C에서는 실험 A와 비교하여 *Artemia nauplii*와 *T. japonicus* 그리고 배합사료의 최초 먹이 공급 시기가 각각 1일(B), 2일(C)씩 늦어지는 조건하에서 실시하였다. 그리고 실험 A, B, C 모두 기초먹이로서 로티퍼를 부화 일령 0일째부터 15일째까지 동일하게 공급하였다(Fig. 3).

실험에 이용된 동물먹이생물은 모두 *I. galbana* + *N. oculata* + *T. suecica* (4:3:3)로 영양강화한 후 공급하였다. 먹이생물의 공급량은 실험구 A, B, C 모두 동일하게 로티퍼는 20개체/mL, *Artemia nauplii*는 5개체/mL, *T. japonicus*는 1개체/10 mL가 유지되도록 공급하였다.

(2) 식물플랑크톤 첨가와 자치어의 사육 밀도에 따른 초기 성장 및 생존

사육수량 6 L의 polycarbonate 원형수조를 이용하여 green water 조성용으로 첨가한 식물플랑크톤의 종류(*N. oculata*와 *I. galbana*)와 수용한 자치어의 밀도에 따른 성장 및 생존율을 조사하였다. 최초 자어 사육 밀도는 3 fish/L, 6 fish/L, 9 fish/L로 실험구를 설정하였다. 사육수온은 히터를 이용하여 $26.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지시켜 주었고, 염분은 32.4 ± 0.6 psu를 유지시켜 주었으며, 40 W 형광등을 실험수조 위에 설치하여 광주기를 15.0L:9.0D로 조정하였다.

실험구는 green water로서 *N. oculata* 5×10^5 cells/mL, *I. galbana* 5×10^5 cells/mL 2개 사육수조를 만들어서 자치어를 사육하였고, 대조구는 일반 여과해수를 이용하여 사육하였다.

각 실험구의 먹이는 농축 클로렐라와 *I. galbana*로 영양강화한 로티퍼를 부화 후 4일까지 단독으로 20개체/mL가 되게 공급하였고, 5일째부터는 농축 클로렐라와 *I. galbana*로 영양강화한 *Artemia nauplii*를 혼합 공급하였다. 물의 환수는 green water구는 3일에 한 번씩 저면 청소만 해 주었고, 대조구는 매일 22시 30분에 저면 청소와 함께 사육수의 1/4 정도를 교환하여 주었다.

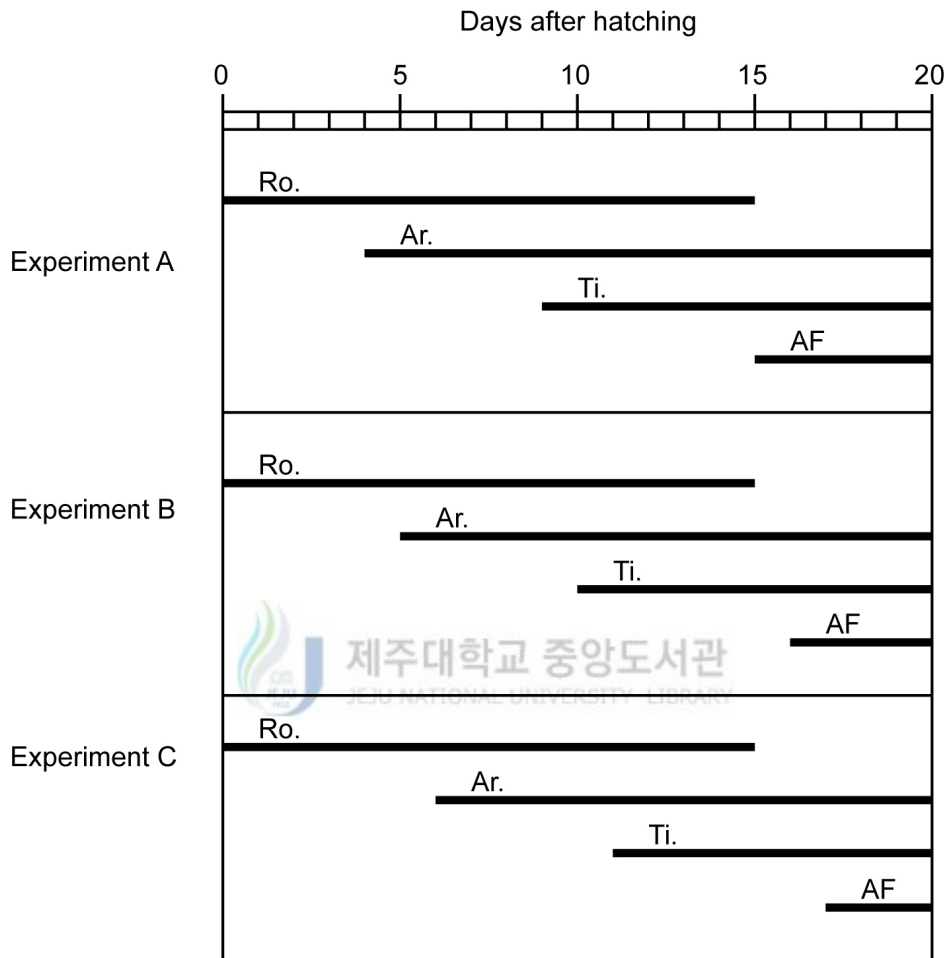


Fig. 3. The regime of feeding trial on newly-hatched *Premnas biaculeatus* for 20 days after hatching. AF, Artificial food; Ar., *Artemia nauplii*; Ro., *Brachionus rotundiformis*; Ti., *Tigriopus japonicus*.

3. 자치어 사육과정 중의 병원성 미생물 확인

1) 병원성 균주 분리

12 L 아크릴 원형수조에 부화 자어를 수용하여 사육수온 $27.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 조건에서 사육하면서 부화 후 3-7일이 경과한 자어 중 먹이 섭취를 하지 못하여 힘없이 유평하는 개체를 채집하여 실험에 사용하였다. 사육수는 매일 1/3-1/4 정도 교환하여 주면서 사육 하였다. 채집된 시료는 70% 에탄올로 외부를 소독한 후 무균적으로 마쇄하여 Brain Heart Infusion Agar (BHIA; BD, USA), Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS Agar; BD, USA), 혈액한천배지(Komed, Korea)에 도말한 후 BHIA 및 TCBS Agar는 $27.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 동안 배양하였고, 혈액한천배지는 37°C , 5% CO_2 공급조건에서 20 ± 2 시간 동안 배양하였다. 배양 후 각각의 시료로부터 성상이 동일한 균주를 선별 분리하였다. 감염 개체에서 특이적인 병원성 기생충 및 바이러스는 확인하지 못하였다.

2) 분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성은 Biolog Co. (USA)의 GN2 Plate를 이용하여 실험하였으며 분석은 MicroLogTM system (Release 4.02) 프로그램을 이용하였다.

3) 분리균주의 분자생물학적 동정

(1) DNA의 분리

순수 분리된 균주를 1.5% 염화나트륨이 첨가된 Brain Heart Infusion Broth (BHIB; Difco, USA)에 접종하여 $30.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 에서 16-24시간 배양시킨 후, 10분간 원심분리(4°C , $10,000\times\text{g}$)하여 균체를 수확하고 Bioneer사의 DNA kit를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하였다.

(2) PCR 수행 및 염기서열 분석

분리된 균주의 16S rRNA 유전자 절편을 증폭하기 위해 20 μ l PCR premix (Bioneer Co., Korea)를 사용하였다. 27f 및 1522r primer를 이용하여 95°C에서 5분간 변성 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72°C에서 10분간 확장하였다(Table 1).

1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 약 1.5 kbp 정도의 DNA 증폭 산물을 확인하고 gel extraction kit (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 증폭 산물을 회수한 후 direct sequencing을 실시하였다.

(3) 분리균주의 분자유전학적 동정

16S rRNA 유전자분석을 통한 분리균주의 동정은 밝혀진 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Blast Search 및 Clustal W 프로그램을 이용하여 동정하였다.



4) 약제감수성 시험

분리·동정된 균주의 항생제 감수성시험은 Mueller Hinton II Agar (BD, USA)를 이용하여 disc 확산법으로 측정하였다. 감수성 시험에 사용된 항생제는 Oxoid사의 Oxolinic acid, Erythromycin, Ampicillin, Cephalothin, Flumequine, Doxycycline hydrochloride, Oxacillin, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Nalidixic acid, Spiramycin, Pefloxacin, Oxytetracycline 등 총 14개 제품을 사용하였다.

Table 1. PCR primers used for 16S rDNA amplification

Primer name	Sequence
27f	5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCA - 3'
1522r	5' -AAGGAGGTGATCCARCCGCA - 3'



4. 골학적 특징

실험에 사용된 표본은 제주대학교 해양과학대학 해양과학부 어류양식학 실험실에서 종묘생산 한 4개체와 국내 관상어 수입상을 통해 구입한 인도네시아 산 1개체를 이용하였다. Kawamura and Hosoya (1991)의 방법에 따라 골격계를 이중염색하거나, Alizarin Red S로 경골을 염색하여, 해부 현미경(Zeiss Stemi 2000-C, Olympus SZH10)하에서 해부, 관찰하였으며, camera lucida를 이용하여 각 골격계를 도해하였다. 각 골격의 영명은 Johnson *et al.*, (1996)을, 국명은 Kim (1978)을 따랐다.

이 연구에 이용된 골격표본은 제주대학교 해양과환경연구소(Marine and Environmental Research Institute, MRIC, Korea)에 등록, 보관하였다.

관찰표본. *P. biaculeatus* (n=5): MRIC 2477, 표준체장 37.8 mm, MRIC 2488, 표준체장 40.4 mm, MRIC 2489, 표준체장 39.2 mm; MRIC, 2827, 표준체장 46.1 mm, Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, February, 2005; MRIC 2857, 표준체장 42.5 mm, February, 2006, Indonesia.

비교표본. *A. clarkii* (n=2): MRIC 2845, 표준체장 39.8 mm, MRIC 2846, 표준체장 41.1 mm, Indonesia, November, 2005. *A. melanopus* (n=4): MRIC 2810, 표준체장 58.2 mm, MRIC 2811, 표준체장 37.5 mm, MRIC 2812, 표준체장 60.3 mm, MRIC 2813, 표준체장 53.6 mm, Indonesia, November, 2005. *A. ocellaris* (n=3): MRIC 2449, 표준체장 16.7 mm, MRIC 2450, 표준체장 17.7 mm, August, 2005; MRIC 2860, 표준체장 40.6 mm, Indonesia, February, 2006. *A. polymnus* (n=3): MRIC 2814, 표준체장

55.9 mm, MRIC 2815, 표준체장 54.9 mm, Indonesia, November, 2005;
MRIC 2858, 표준체장 69.5 mm, Indonesia, January, 2006. *A. periderarion* (n=1):
MRIC 2859, 표준체장 72.6 mm, Indonesia, February, 2006. *A. frenatus* (n=1):
MRIC 2861, 표준체장 46.6 mm, Indonesia, February, 2006.

5. 통계분석

실험 결과는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균과의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.



III. 결 과

1. 산란, 부화 및 자치어 사육

1) 짝짓기 및 산란행동

전장 5 cm 이상 된 개체를 짝짓기 하기 위하여 2마리씩 수조에 수용한 결과 크기가 비슷한 개체들은 서로 머리를 맞대고 심한 몸싸움을 하였으며 상처를 입고 폐사하는 개체도 관찰되었다(Fig. 4).

그러나 크기가 1/2 정도 차이가 나는 개체를 동시 수용한 결과 작은 개체가 일방적으로 도망치는 행동을 보여 심한 몸싸움은 일어나지 않았다. 이후 작은 개체가 순종하게 되면 짝짓기는 순조롭게 이루어져 수용 후 15일 정도 지나면서 짝을 이루어 산란상에 머무르게 된다(Fig. 5).

산란시기가 가까워지자 암컷과 수컷 모두 산란상 근처에 붙어 있는 구조류와 이물질을 입과 가슴지느러미 및 꼬리지느러미를 이용하여 청소하는 행동과 산란상을 입으로 물고 위치를 이동시키는 행동을 하였다. 산란 행동은 암컷이 먼저 산란상에 복부를 붙여 일직선으로 약 20여개의 알을 부착시키면, 주위를 맴돌던 수컷이 같은 방법으로 방정하여 수정시켰다(Fig. 6).

수정된 알은 부화될 때 까지 어미들이 번갈아 가면서 가슴지느러미와 꼬리지느러미를 이용하여 수류를 일으켜 알에 붙어 있는 이물질을 제거하는 행동을 보였다. 그리고 입으로는 백탁된 미수정란과 조밀하게 부착된 알을 흡아주는 행동도 관찰되었다. 산란 후 암컷과 수컷 모두 산란상 주위에서 수정란을 보호하기 위하여 수컷은 수정란 가까이 붙어서 관리하였으며, 암컷은 산란상 주위를 순찰하며 외부에서 근접하는 어류나 사람을 경계하는 행동을 보였다.

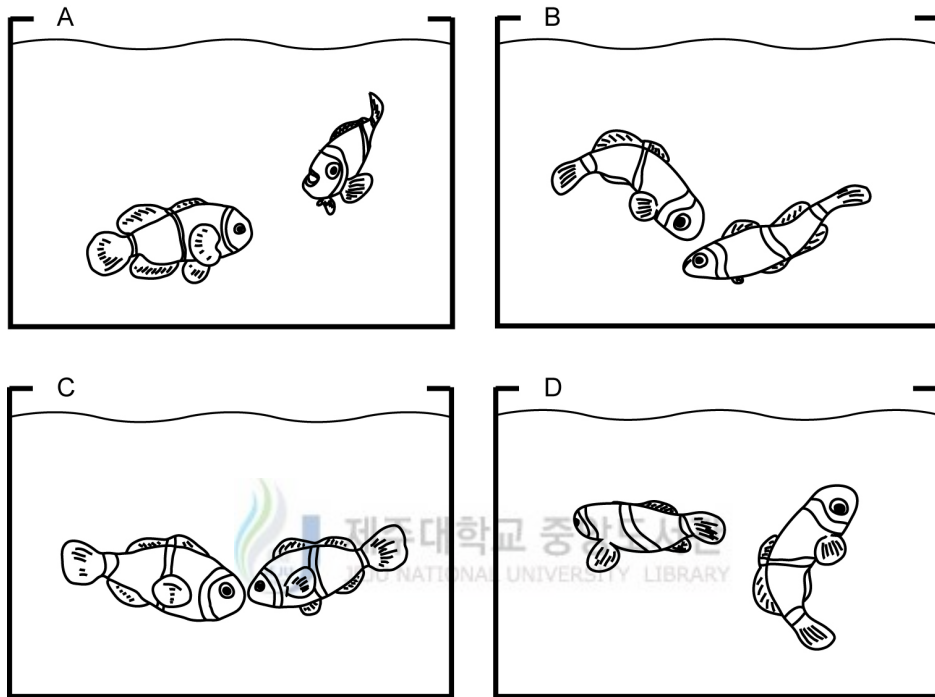


Fig. 4. Mating behavior of *Premnas biaculeatus* stocked same-size breeder. A, accommodation; B, approaching; C, attacking; D, mating failed.

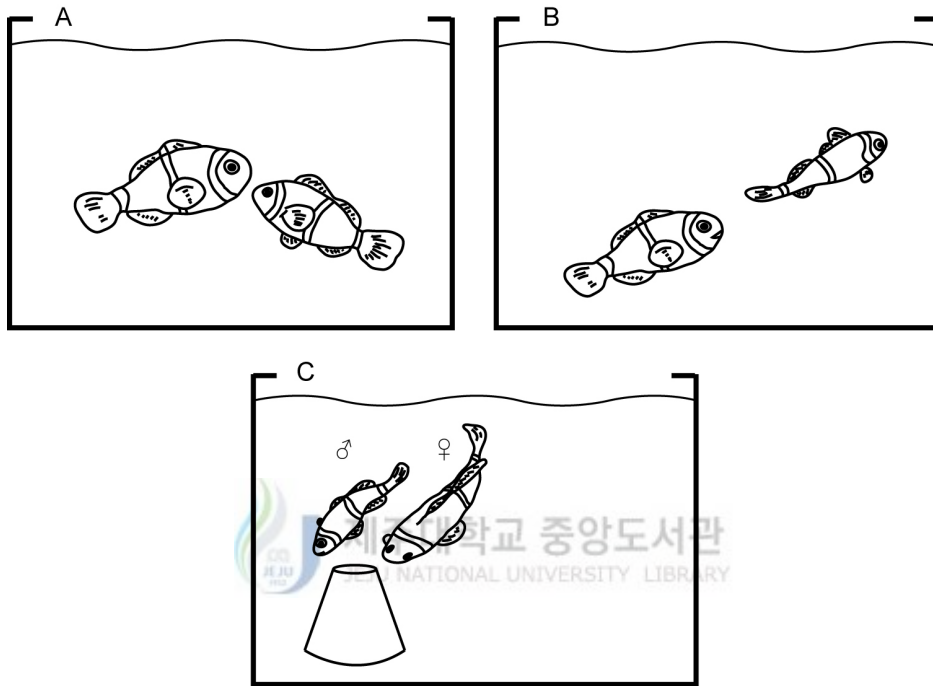


Fig. 5. Mating behavior of *Premnas biaculeatus* stocked different-size breeder. A, accommodation; B, attacking and chasing; C, mating succeeded.

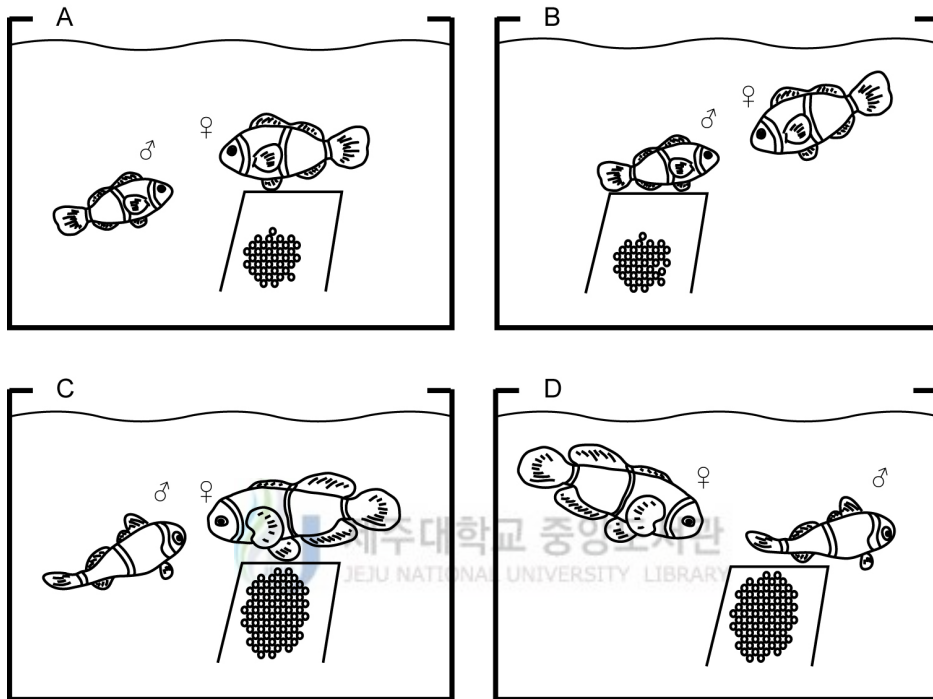


Fig. 6. Spawning and fertilization behavior of *Premnas biaculeatus*. A, first spawning; B, first fertilization; C-D, repetition of spawning and fertilization with several minutes interval.

떡이를 먹을 때도 암컷은 떡이를 먹기 위해 산란상을 떠나는 경우가 많은 반면 수컷은 떡이를 먹은 후 바로 산란상으로 돌아와 수정란을 보호하는 행동을 보였다(Fig. 7).



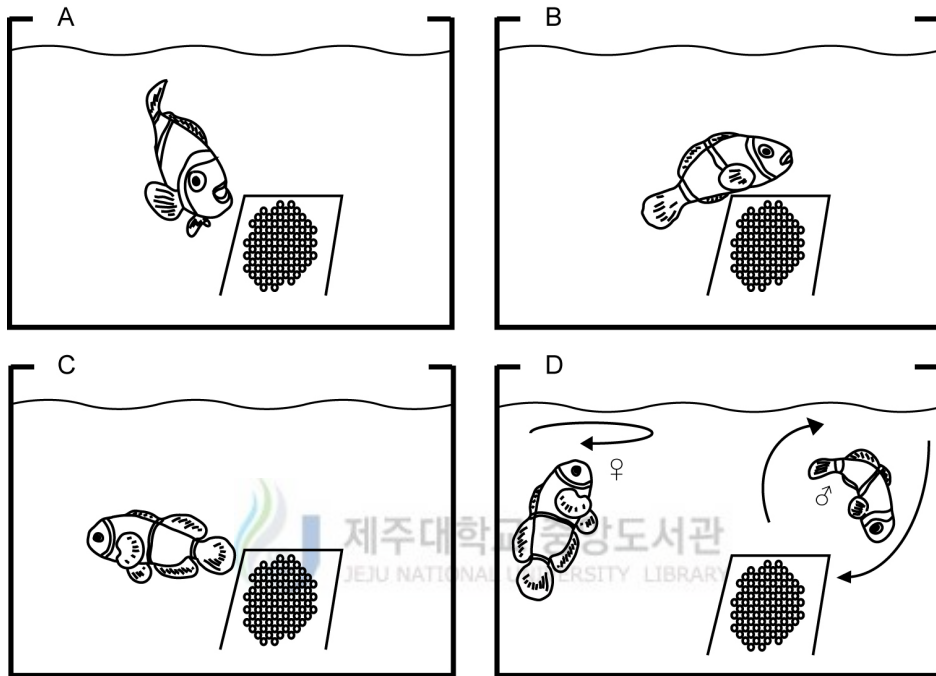


Fig. 7. Nest care behavior of *Premnas biaculeatus*. A, take out dead eggs with mouth; B, water circulation with pectoral fins; C, water circulation with a caudal fin; D, nest care by male mainly.

2) 수정란 관리

암수 1쌍에서 관찰된 산란은 2004년 2월 22일부터 2004년 8월 10일까지 8회에 걸쳐 일어났고 15시에서 20시 사이에 산란하였다. 최초 산란량은 583개에서 2-5회째에는 861-1,288개 범위였고 6-8회째에는 2,371-2,694개 범위로 산란횟수가 늘어날수록 산란량이 증가하는 경향을 보였다(Table 2). 산란간격은 1회 산란 후 52일이 지나서 2회째 산란이 이루어졌고, 3회에서 8회까지는 12일에서 21일로 줄어들었다.

산란상을 어미로부터 분리하지 않은 첫 번째와 두 번째 산란 후 일별 수정란 개수 변화를 보면, 1회째 산란 때에는 583개였던 수정란이 산란 후 하루가 경과해서는 471개로 큰 변화를 보이지 않다가 산란 후 2일째부터는 감도가 심하게 일어나서 수정란 2개가 남았고 산란 후 3일이 지나서는 한 개도 남지 않았다. 2회째 산란 때에도 수정란 861개 중 산란 후 하루가 경과해서는 798개로 큰 변화를 보이지 않다가 산란 후 3일째에는 362개로 줄어든 후 산란 후 4일째에는 32개로 급격한 감도가 일어났다. 이와 같이 산란상을 어미로부터 분리해 내지 않을 경우에는 어미의 피식으로 수정란 수가 현저히 줄어드는 경향을 보였는데 산란 후 4일째 까지 71.2-100% 감도되었다(Table 3).

어미에 의한 수정란 피식 현상을 방지하기 위하여 3회와 4회째 산란된 수정란을 관리할 때는 aeration법으로 부화시켰고, 5회부터 8회째 산란된 수정란은 자체개발한 부화기(유수식법)를 이용하여 부화시켰다. 3회째 산란된 수정란은 산란 후 4일이 경과하여 어미로부터 산란상을 분리하였는데 4일째 남은 수정란은 69.6%였고, 5일째에는 35.0%로 감소하였으며, 부화율은 29.1%였다. 4회째 산란된 수정란은 산란 후 5일이 경과하여 어미로부터 산란상을 분리하였는데 5일째 남은 수정란은 39.2%였고 부화율은 34.0%였다. 5회부터 8회째 산란 때에는 산란 후 5일이 경과된 후 어미로부터 산란상을 분리하였는데 5일째 남은 수정란은 각각 55.3%, 12.1%, 16.7%, 7.0%였다. 그리고

Table 2. Spawning interval and egg numbers of *Premnas biaculeatus*

Spawning times	Date	Interval of spawning	Number of eggs
1st	2004. 2. 22.	-	583
2nd	2004. 4. 14.	52 days	861
3rd	2004. 5. 17.	33 days	938
4th	2004. 5. 29.	12 days	1,071
5th	2004. 6. 16.	18 days	1,288
6th	2004. 7. 7.	21 days	2,475
7th	2004. 7. 25.	18 days	2,694
8th	2004. 8. 9.	16 days	2,371

Table 3. *Premnas biaculeatus*. Comparison of egg survival and hatching by different incubation conditions

(Unit: Number of eggs)

Tank	Incubation condition	Spawning times	Spawning	Spawned	Days after spawning					Hatching
					1-day elapsed	2-day elapsed	3-day elapsed	4-day elapsed	5-day elapsed	
Combination tank	Taking care	1st	583	471	2	0	0	0	0	0
	by breeder	2nd	861	798	548	362	248	0	0	0
	Aeration	3rd	938	894	806	728	653	328	273	
		4th	1,071	1,006	914	838	746	420	364	
Incubation tank	Water circulation	5th	1,288	1,215	1,207	1,087	924	712	648	
		6th	2,028	1,764	1,239	843	505	246	213	
		7th	2,012	1,861	1,453	957	645	335	302	
		8th	1,829	1,629	1,324	739	349	128	104	

부화율은 각각 50.3%, 10.5%, 15.0%, 5.7%였다. 3회 산란부터 5회째 산란된 수정란 관리 방법을 비교한 결과, 산란 후 4일째에 산란상을 어미로부터 분리 하는 것보다는 5일째 분리하는 것이 상대적으로 더 좋은 부화율을 보였고, aeration을 이용한 부화기를 사용하는 것 보다 자체개발한 유수식 부화기를 이용한 경우에 더 높은 부화율을 보였다. 하지만 6회 산란부터 8회째 산란 까지는 산란량이 각각 2,028개, 2,012개, 1,829개로 많았으나 초기 감도가 많이 일어나서 부화율은 각각 10.5%, 15.0%, 5.7%로 저조하게 나타났다(Table 3).

산란 직후 수정란은 진한 주황색이었다가 산란 후 2-3일이 지나면 흑색을 띠기 시작한다. 부화 후 4일째에는 검붉은 색으로 변하고, 5일째에는 알이 투명해지고 눈이 은빛으로 반짝거리는 것이 확인되었다. 또한 난 발생과정 중 폐사되는 수정란의 어미에 의한 제거와 피식으로 알 수가 감소하는 현상이 관찰되었다(Fig. 8).



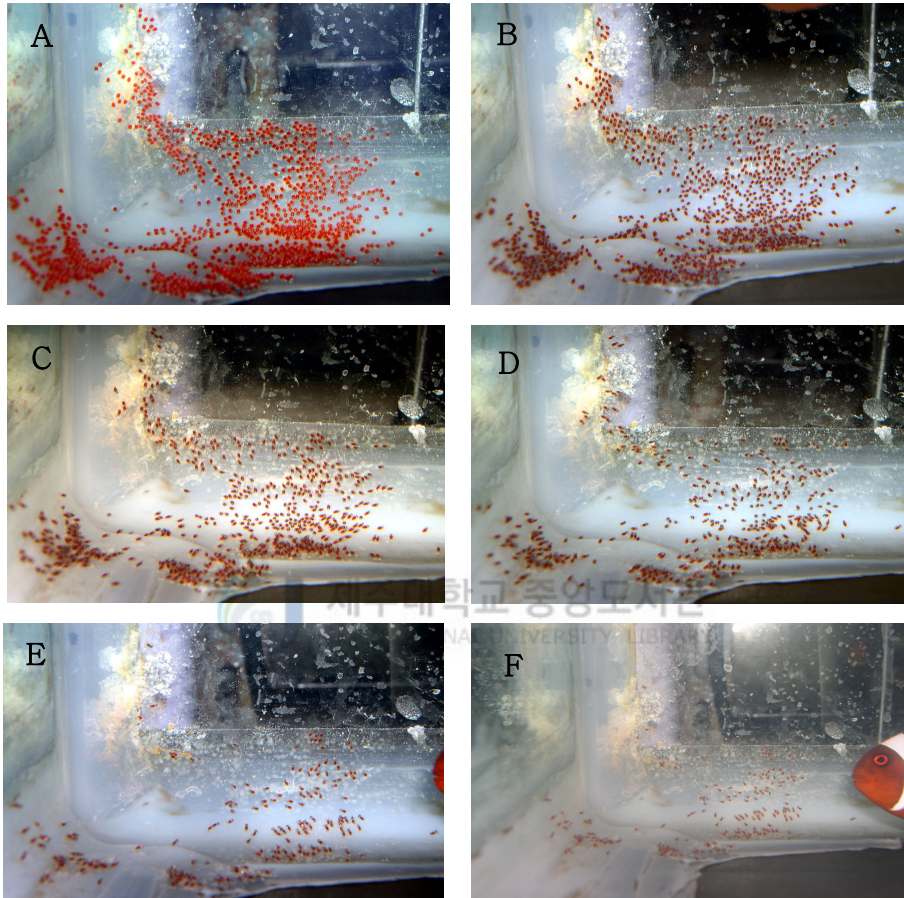


Fig. 8. Reduction of egg number after spawning in brood fish stocking tank.
A, 1-day after spawning; B, 2-days after spawning; C, 3-days after spawning; D, 4-days after spawning; E, 5-days after spawning; F, 6-days after spawning.

3) 난 발생

수정란은 타원형으로 장경 1.95-2.01 mm (평균 1.99±0.03 mm, n=30), 단경 0.83-0.91 mm (평균 0.88±0.03 mm, n=30)로 많은 유구를 가지고 있었으며, 알 색깔은 진홍색이고 장축의 끝에 있는 부착사로 산란상에 부착하는 분리 침성부착란이었다.

수온 27.0±0.5℃에서 발생단계별 소요시간(Table 4)과 분화 형태를 보면 수정 후 40분이 지나서 배반이 형성되었고(Fig. 9A), 수정 후 1시간 10분이 경과한 후에 최초의 난할이 시작되어 2세포기가 되었다(Fig. 9B). 제2난할은 수정 후 1시간 50분 후에 일어나 4세포기가 되었고(Fig. 9C), 수정 후 2시간 20분 후에 8세포기가 되었다(Fig. 9D). 난할이 계속 진행되어 16세포기(Fig. 9E), 32세포기(Fig. 9F), 64세포기(Fig. 9G)는 수정 후 각각 3시간, 3시간 20분, 3시간 50분 후에 관찰되었으며 수정 후 4시간 50분 만에 상실기(Fig. 9H)에 도달하였다.

수정 후 6시간 40분이 지나서 포배기에 도달하였다(Fig. 9I). 수정 후 10시간 20분이 지나서 낭배기에 도달하고 배반엽이 나타났다(Fig. 9J). 수정 후 12시간 40분이 지나서는 배반이 난황의 1/3 정도를 덮었다(Fig. 9K). 수정 후 17시간 40분이 경과한 후 배반이 난황의 5/6 정도를 덮었고 이 시기에 배체가 출현하였다(Fig. 9L).

수정 후 20시간 20분이 지나서 안포가 형성되고 근절이 7-8개 나타났다(Fig. 9M). 수정 후 32시간 20분이 경과해서 안포 내에 렌즈가 형성되고 난황 위에는 다수의 흑색소포가 출현하였다(Fig. 9N). 수정 후 36시간 40분이 지나서 이포가 출현하였고 이때 꼬리가 난황에서 분리되었으며 흑색소포는 난황뿐만 아니라 근절 위에도 발견되었다. 이때 근절수는 20개였다(Fig. 9O).

수정 후 41시간 50분이 지나서 심장박동이 확인되었고 꼬리가 움직이는 것이 관찰되었다(Fig. 9P). 심장 박동 수는 1분에 160회-180회 정도였다.

Table 4. The egg development of *Premnas biaculeatus* (water temperature, 27.0±0.5°C)

Developmental stages	Time after fertilization
Formation of blastodisc	40 min.
2 cell	1 hr. 10 min.
4 cell	1 hr. 50 min.
8 cell	2 hr. 20 min.
16 cell	3 hr.
32 cell	3 hr. 20 min.
64 cell	3 hr. 50 min.
Morula	4 hr. 50 min.
Blastula	6 hr. 40 min.
Gastrula	10 hr. 20 min.
Blastodisc covering of the yolk 1/3	12 hr. 40 min.
Embryo formation	17 hr. 40 min.
Formation of optic vesicles	20 hr. 20 min.
Formation of eye lens and melanophores appeared on embryo	32 hr. 20 min.
Formation of auditory vesicles	36 hr. 40 min.
Heart beats	41 hr. 50 min.
Appearance of melanophores in eyes	62 hr. 30 min.
Hatching began	120-150 hr.

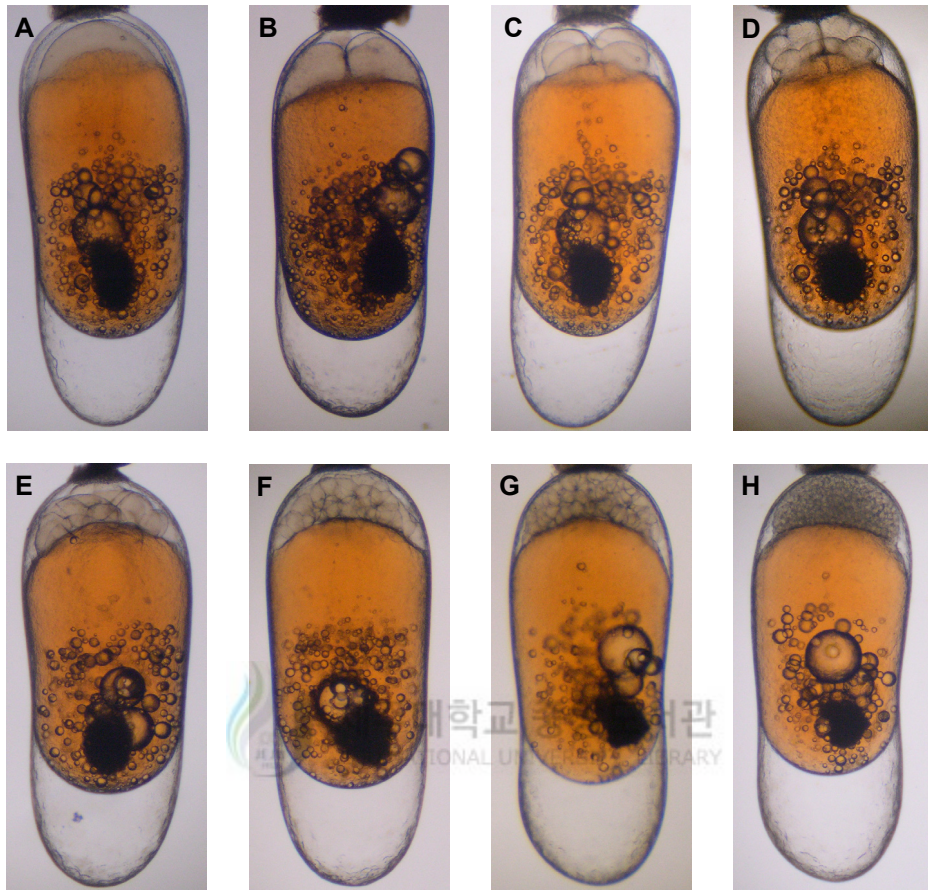


Fig. 9. The egg development of *Premnas biaculeatus*. A, Blastodisc formation; B, 2 cell stage; C, 4 cell stage; D, 8 cell stage; E, 16 cell stage; F, 32 cell stage; G, 64 cell stage; H, Morula stage; I, Blastula stage; J, Gastrula stage; K, Blastodisc covering of the yolk 1/3; L, Embryo formation; M, Optic vesicles present; N, Formation of eye lens and melanophores appeared on embryo; O, Formation of auditory vesicles; P, Heart beats; Q, Appearance of melanophores in eyes; R, Hatching began. Scale bar=1 mm.

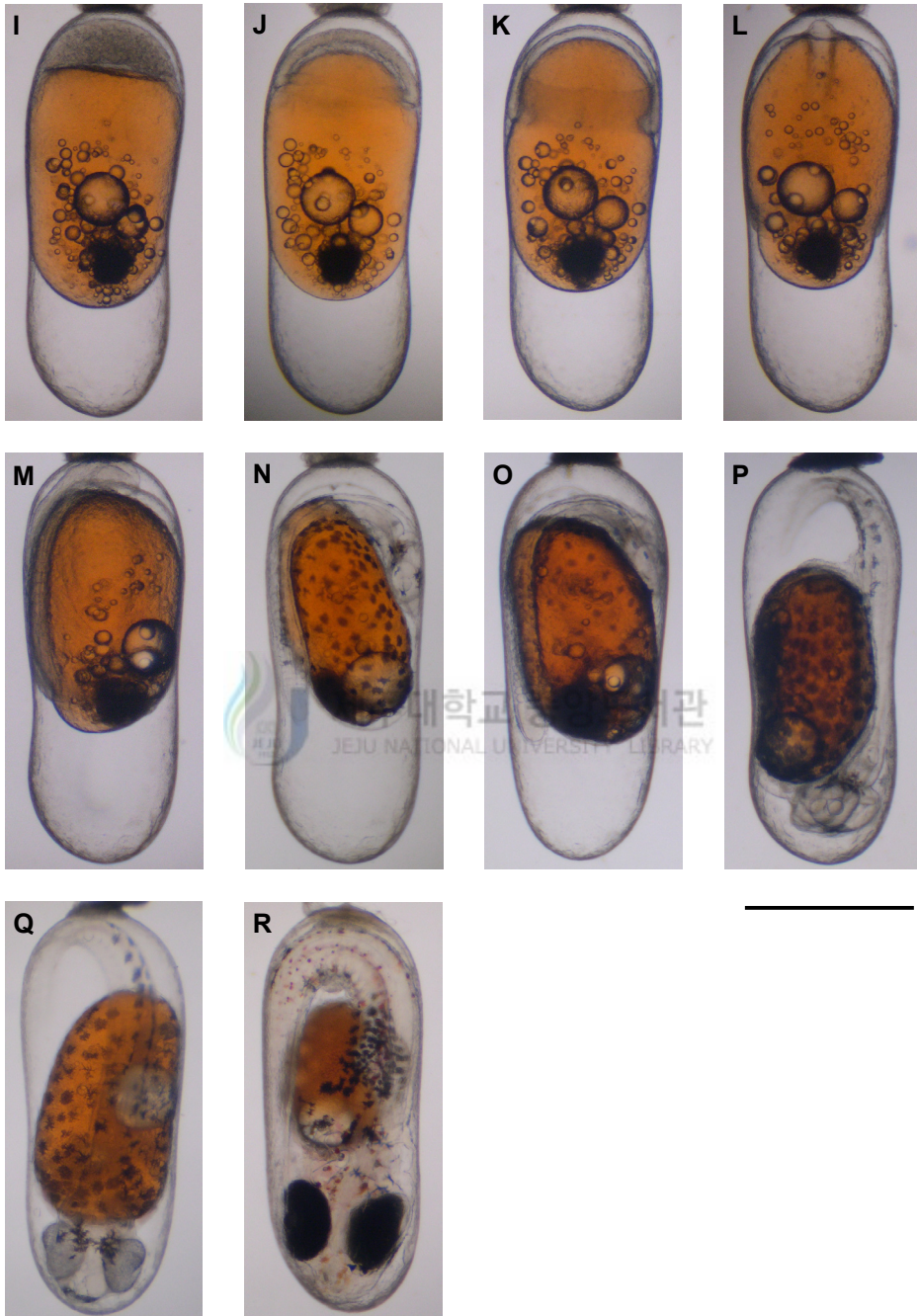


Fig. 9. Continued.

수정 후 62시간 30분이 지나서 배체가 난태의 4/5 정도를 들고 난황 주변에 혈액의 움직임이 관찰되었으며 안구 앞부분과 배체에 흑색소포의 수가 증가하였다(Fig. 9Q). 부화 직전인 수정 후 125시간이 지나서는 배체가 난태를 완전히 덮었으며 안구는 완전히 흑화 되었고 외견상 은빛으로 빛났다. 이때 입은 열려 있었다(Fig. 9R). 부화기에서의 부화는 보통 수정 120시간부터 150시간 사이에 거의 대부분 이루어졌다.



4) 자치어의 외부형태발달

부화 직후의 자어는 전장 3.10-3.44 mm (평균 3.22±0.07 mm, n=10)로 타원형의 적갈색 난황(평균 장경 0.58±0.08 mm, 평균 단경 0.46±0.04 mm, n=10)을 가지고 있었다. 난황 안에는 0.27 mm의 대형유구 1개와 소형유구 10여개가 존재하였다. 근질수는 9+17=26개이고 머리와 난황 위 그리고 체측에 흑색소포가 산재해 있었다. 입과 항문은 열려 있었으며 항문은 몸의 중앙보다 앞쪽에 위치하고 있었다. 머리 앞쪽을 제외하고는 몸 전체에 딱지느러미가 발달되어 있고 난황이 많이 남아 있었다(Fig. 10A).

부화 후 2일째 자어는 전장 3.92-4.29 mm (평균 4.07±0.24 mm, n=10)로 성장하였으며 난황이 많이 흡수되어 평균 장경 0.35±0.07 mm, 평균 단경 0.26±0.05 mm이었고 유구는 대형유구 1개만 남았다(Fig. 10B).

부화 후 3일째 자어는 전장 4.14-4.48 mm (평균 4.18±0.26 mm, n=10)로 성장하였으며 난황은 거의 흡수되었다. 머리 부분과 척추 부분에 흑색소포가 나뭇가지 모양으로 증가하였다(Fig. 10C).

부화 후 4일째 자어는 전장 4.09-4.62 mm (평균 4.24±0.29 mm, n=10)로 성장하였다. 장에 로티퍼가 다량 섭식되어 있는 것이 관찰되었으며 꼬리 지느러미에 기조 6개가 있는 것이 관찰되었다. 머리 부분과 척추를 따라 흑색소포가 더욱 증가하여 넓게 퍼져 있었다(Fig. 10D).

부화 후 5일째 자어는 전장 4.15-4.64 mm (평균 4.36±0.46 mm, n=10)로 성장하였고, 부화 후 7일째에는 전장 4.59-5.86 mm (평균 5.09±0.49 mm, n=10)로 성장하였다. 부화 후 10일째 치어는 전장 5.64-6.89 mm (평균 6.21±0.69 mm, n=10)로 성장하였다. 기조수는 등지느러미에 28개, 뒷지느러미에 17개가 출현하여 이 종 고유의 수에 달함으로 이때부터 초기 치어기에 도달한 것으로 판단하였다(Fig. 10E).

부화 후 12일째 치어는 전장 6.24-7.63 mm (평균 6.94±0.76 mm, n=10)로

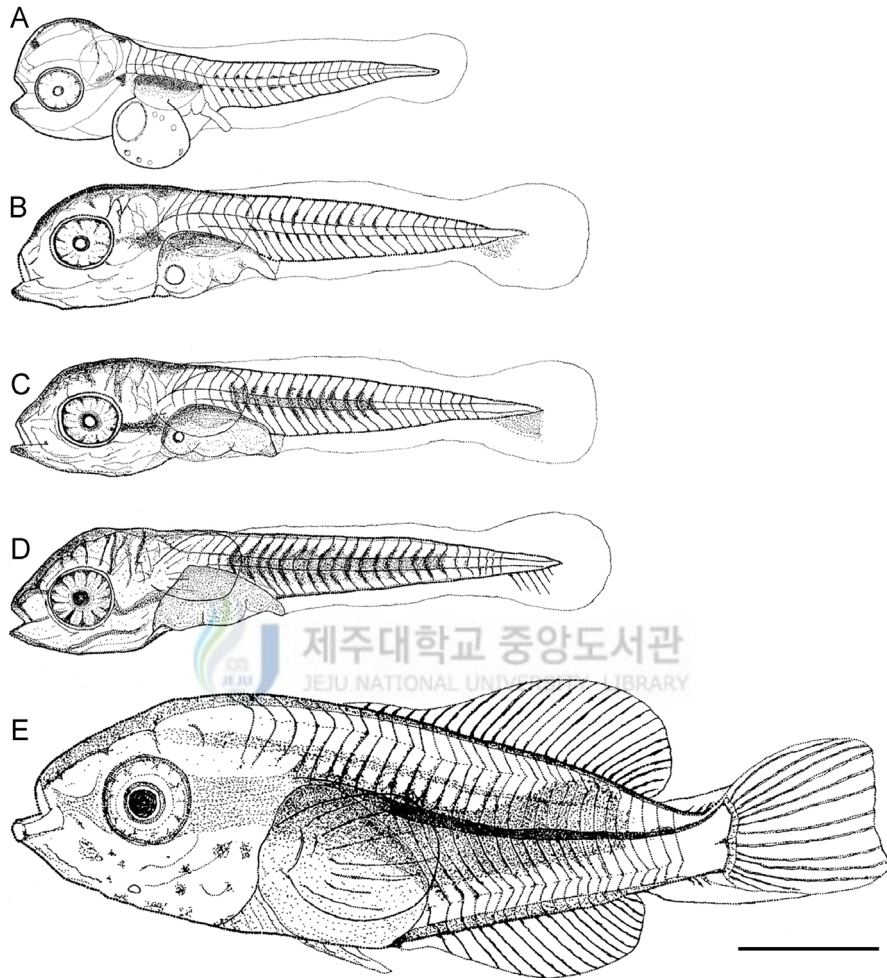


Fig. 10. The larvae and juveniles of *Premnas biaculeatus*. A, Newly hatched larva, 3.22 mm TL; B, 2-days larva, 4.07 mm TL; C, 3-days larva, 4.18 mm TL; D, 4-days larva, 4.24 mm TL; E, 10-days juvenile, 6.21 mm TL. Scale bar=1 mm.

성장하였다. 머리 부분에 백색 가로띠가 출현하고 12시간 정도 경과하여 몸 중앙부위에 두 번째 백색 가로띠가 형성되었다. 체색은 흑색소포가 줄어들고 적색소포가 증가하면서 옅은 오렌지색이 되었다. 부화 후 15일째 치어는 전장 7.44-9.01 mm (평균 8.06±0.89 mm, n=10)로 성장하였다. 이 시기에 대부분의 치어 꼬리자루 부분에 세 번째 백색 가로띠가 출현하였으며 머리와 등, 가슴, 뒷지느러미에는 적색소포가 증가하여 짙은 오렌지색으로 보였다.

부화 후 19일째 치어는 전장 8.32-10.98 mm (평균 9.34±1.11 mm, n=10)로 성장하였고 3개의 백색 가로띠는 더욱 선명해 졌으며(Fig. 11), 배합사료(입자 크기 200-400 μ m)를 섭식하기 시작하였다. 부화 후 27일 된 치어는 전장 10.16-15.49 mm (평균 12.41±1.67 mm, n=10)로 성장하였고 등지느러미와 배지느러미에 흑색점이 선명하게 생겼다. 부화 후 45일째 치어는 전장 13.64-19.37 mm (평균 15.61±2.09 mm, n=10)로 성장하였다. 부화 후 50일째가 되어도 3개의 백색 가로띠 중 가로띠가 완전하지 못한 개체들이 관찰되었다(Fig. 12).

부화 자치어의 성장 패턴을 보면 부화 직후 전장 3.10-3.44 mm (평균 3.22±0.07 mm)의 자어가 난황이 흡수되면서 최초의 먹이 섭식이 가능한 부화 후 2일째에는 전장 3.92-4.29 mm (평균 4.07±0.24 mm)로 자랐다. *Artemia nauplii* 섭식은 부화 후 4일째 전장 4.09-4.62 mm (평균 4.24±0.29 mm)로 자랐을 때부터 가능하였고, 부화 후 10일째 전장 5.64-6.89 mm (평균 6.21±0.69 mm)로 성장하였을 때 초기 치어기 형태를 갖추었다. 부화 후 19일째 전장 8.32-10.98 mm (평균 9.34±1.11 mm)로 급격한 성장 패턴을 보여주었으며, 부화 후 45일째 전장 13.64-19.37 mm (평균 15.61±2.09 mm)로 성장하였다(Fig. 13).



Fig. 11. Nineteen days old *Premnas biaculeatus* juvenile with three white perpendicular bands (total length: 9.34 mm).

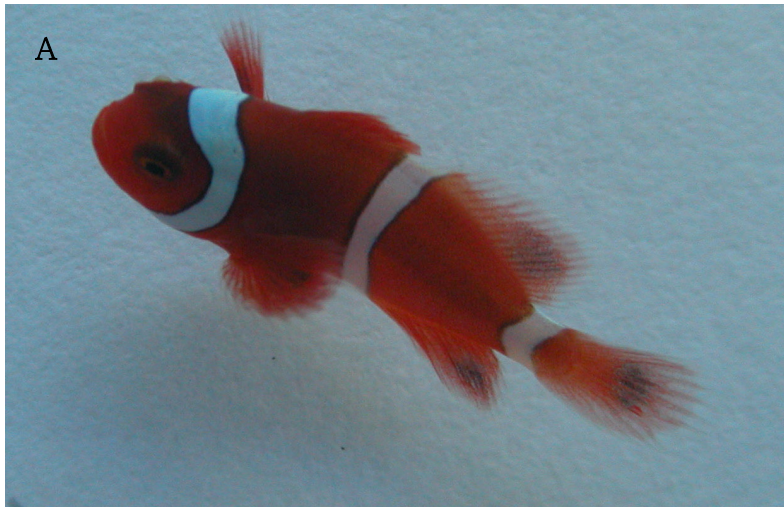


Fig. 12. Comparison of coloration of 50 days old *Premnas biaculeatus* juveniles. A, normal bands; B, abnormal bands.

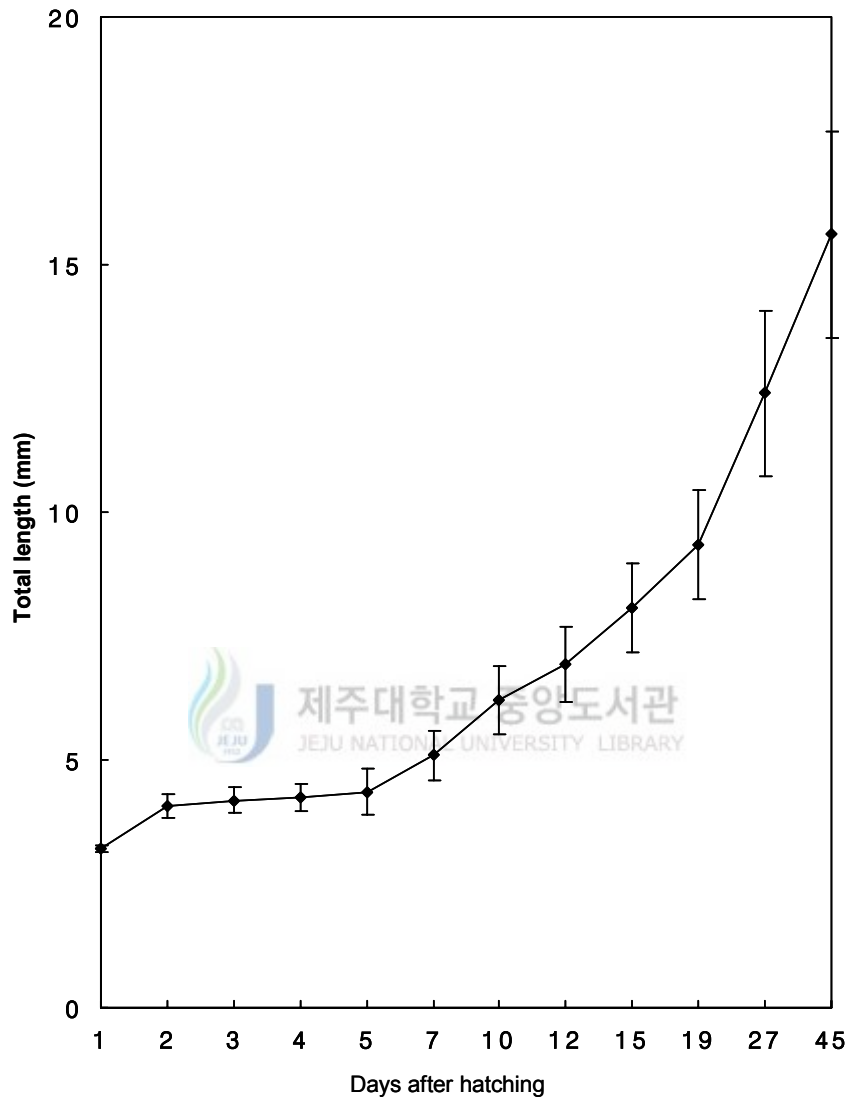


Fig. 13. Growth in total length of *Premnas biaculeatus* larvae for 45 days after hatching.

5) 자치어의 행동

부화 직후 자어는 난황을 가지고 있는 개체와 난황을 대부분 흡수한 개체가 출현 하였으며, 난황을 가지고 있는 개체는 정상적인 유영을 하지 못하였다. 난황을 가지고 있는 개체는 수조바닥을 기어 다니듯이 움직였으며 가끔 수면을 향하여 순간적으로 부상했다가 다시 수조바닥에 가라앉는 수직운동을 하였다. 그러나 난황이 거의 흡수된 상태로 부화된 개체는 정상적인 유영을 하였으며 빛에 대하여 강한 정 주광성을 보여주었다.

부화 후 2일째 자어는 수조의 중층을 자유롭게 유영하였으며 로티퍼를 섭식하는 것이 확인되었다. 부화 후 3일째 자어는 장의 움직임이 확인되었고 항문에서 배설물이 배출되는 것이 관찰되었다.

부화 후 12일째 치어는 떼를 지어 수조 저면 구석에 무리를 짓기 시작하였고, 먹이를 먹을 때를 제외하고는 이 상태를 계속 유지하였다. 수조내의 전체 치어가 한 무리를 이루었으며 종종 10마리 정도가 작은 무리를 이루어 별도의 행동을 보일 때도 있지만 얼마지 않아 다시 본 무리에 합세하였다. 일령이 12일 정도 차이가 나고 전장이 3-4 mm가 더 큰 치어를 무리 중에 넣고 관찰한 결과 가장 가까운 개체부터 공격을 시작하다가 결국 여러 마리가 집단 공격을 해서 자신들의 집단에 합류하는 것을 저지하는 행동을 보였다(Fig. 14).

부화 후 15일째 치어는 수조 저면에서 수표면 쪽으로 무리를 지어 수직 유영을 하기도 하고 일부는 전체 무리에서 이탈하여 20-30 마리가 무리를 지어 수표면 근처에서 유영하였다. 부화 후 27일 된 치어는 바닥에 거의 내려가지 않고 수조 전체를 유영하며 조금씩 대열을 이탈하여 독자적인 행동을 하는 개체가 많이 생겼다.

부화 후 45일째 치어는 수조 전체에서 유영하였으며 이때부터 유영하다가 마주치면 두 마리가 서로 머리를 맞대고 싸우는 개체들이 생겨났다.

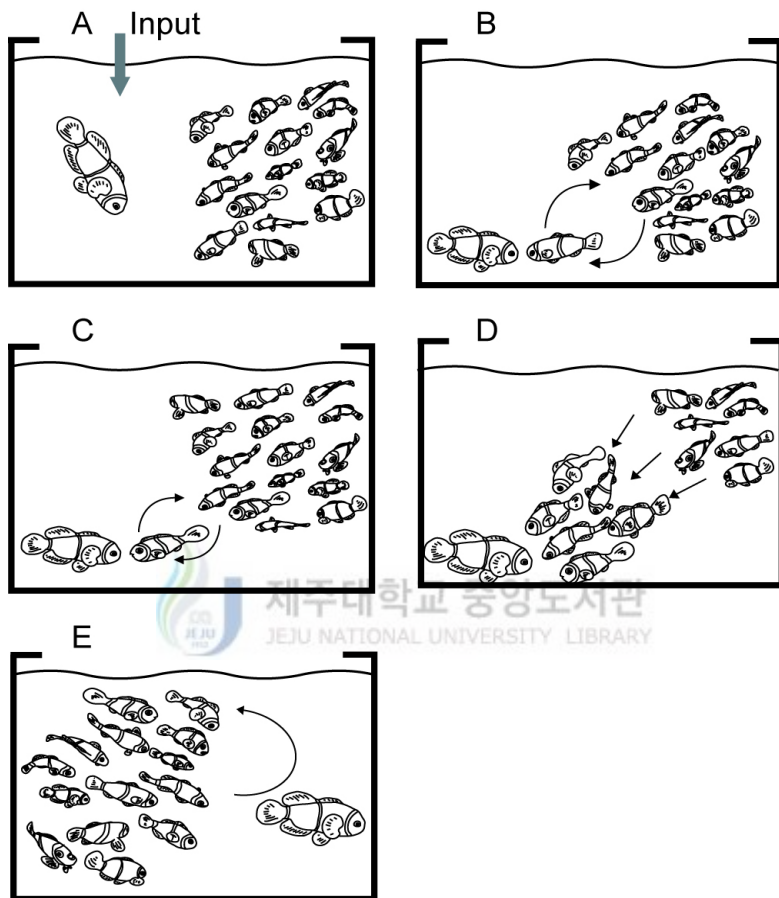


Fig. 14. Serial diagrams showing territory protecting behavior of *Premnas biaculeatus*. A, input of bigger fish; B and C, protecting by single smaller fish; D, expel by several fish; E. protecting by group.

6) 체색 기형

4회째부터 6회째까지의 정상개체 출현비율은 각각 65.4%, 66.3%, 67.9% 이었고, 양쪽 모두 기형인 개체가 각각 22.3%, 20.4%, 21.4%였으며 한 쪽만 기형인 개체는 각각 12.3%, 13.3%, 10.7%였다. 결과적으로 4회째부터 6회째까지는 정상개체가 67% 정도 차지했고, 양쪽 모두 기형인 개체는 21%, 한 쪽만 기형인 개체는 12% 정도를 차지했다. 그러나 7회째 부화된 치어의 정상개체 출현비율은 57.0%, 양쪽 모두 기형인 개체가 20.0%, 한 쪽만 기형인 개체가 23.0%였다(Table 5).



Table 5. Comparison of normal and abnormal coloration forming three white bands by different spawning of *Premnas biaculeatus*

Spawning times	Normal band formation (%)	Abnormal band formation of one side (%)	Abnormal band formation of both sides (%)
4th	65.4	12.3	22.3
5th	66.3	13.3	20.4
6th	67.9	10.7	21.4
7th	57.0	23.0	20.0

2. 인공 종묘생산

1) 자어의 적정 염분

(1) 떡이공급 실험군

부화 후 2일이 경과한 후 염분 15.0 psu와 20.0 psu 실험구에서는 생존율이 각각 61.3%와 72.0%를 나타냈고, 염분 25.0-33.0 psu 실험구에서는 84.0-92.0%의 생존율을 보였다. 부화 후 4일이 경과한 후에는 염분 15.0 psu와 20.0 psu 실험구에서 44.0%와 54.7% 생존율을 보였고, 25.0-33.0 psu 실험구에서는 69.3-73.3%의 생존율을 보였다. 부화 후 6일이 경과한 후에는 염분 15.0 psu와 20.0 psu 실험구에서 28.0%와 42.7%의 생존율을 보였고, 염분 25.0-33.0 psu 실험구에서는 52.0-58.7%의 생존율을 보였다. 염분 15.0 psu에서는 부화 후 4일이 경과하여 생존율이 50% 이하로 떨어졌고, 염분 20.0 psu에서는 부화 후 5일, 염분 25.0, 30.0, 33.0 psu에서는 부화 후 7일이 경과된 후 생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 실험 종료일인 부화 후 8일이 경과된 후 생존율을 보면 염분 15.0 psu와 20.0 psu 실험구는 14.7%, 25.3%를 나타냈고, 염분이 25.0, 30.0, 33.0 psu 실험구는 41.3%, 42.7%, 40.0%를 나타내어 염분 15.0 psu인 실험구의 생존율이 상대적으로 가장 낮았고, 염분 30.0 psu인 실험구의 생존율이 상대적으로 가장 높게 나타났다. 즉, 염분 15.0 psu와 20.0 psu에서의 생존율은 염분 25.0-33.0 psu보다 상대적으로 낮았고, 염분 25.0-33.0 psu 범위에서는 비슷한 생존율을 보였다(Fig. 15).

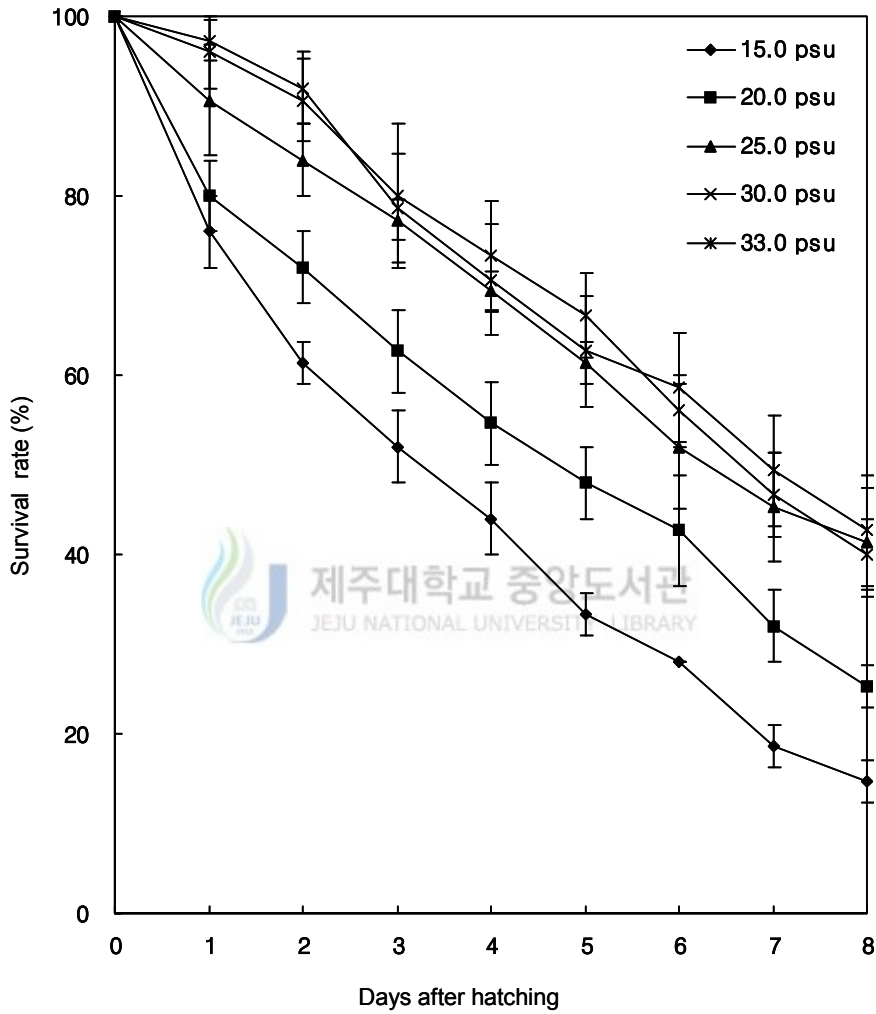


Fig. 15. Comparison of survival rates of newly-hatched *Premnas biaculeatus* larvae fed with live foods by different salinity conditions.

(2) 먹이 미공급 실험군

부화 후 2일째 염분 15.0 psu와 20.0 psu에서의 생존율은 각각 53.3%와 55.6%였고, 25.0, 30.0, 33.0 psu에서는 각각 71.1%, 77.8%, 84.4%였다. 부화 후 4일째 염분 15.0 psu, 20.0 psu에서 생존율은 6.7%, 13.3%였고, 염분 25.0, 30.0, 33.0 psu에서 생존율은 40.0%, 55.6%, 57.8%를 보여 20.0 psu 이하에서 급격히 낮아졌다. 부화 후 6일째에는 15.0 psu와 20.0 psu에서 전량 폐사한 반면, 25.0, 30.0, 33.0 psu에서는 생존율이 각각 11.1%, 17.8%, 20.0%였다. 생존율이 50% 이하로 낮아지는 기간은 염분 15.0 psu와 20.0 psu에서는 부화 후 3일째, 25.0 psu에서는 부화 후 4일째, 30.0 psu와 33.0 psu에서는 부화 후 5일째였다. 무급이 상태에서 전량 폐사에 이르는 기간은 염분 15.0 psu에서는 부화 후 5일째, 20.0 psu에서는 부화 후 6일째였고, 25.0-33.0 psu에서는 부화 후 8일째였다(Fig. 16).



2) 입 크기 변화

부화 직후 자어의 전장은 3.22 ± 0.25 mm, 입 크기(d)는 0.38 mm 이었다. 부화 후 4일이 경과하였을 때 자어의 전장은 4.22 ± 0.66 mm, 입 크기는 0.46 mm로 커졌다. 부화 후 8일이 경과하여 실험을 종료할 때는 자어 전장 6.17 ± 1.08 mm에 입 크기는 0.73 mm로 커졌다. 부화 직후 0.75d와 0.5d는 각각 0.29 mm와 0.19 mm 이었고, 부화 후 4일이 경과하였을 때는 0.34 mm와 0.23 mm 이었다. 그리고 부화 후 8일이 경과 하였을 때 0.75d와 0.5d는 각각 0.55 mm와 0.37 mm 이었다. 부화 후 4일이 경과한 후 *Artemia nauplii*를 공급한 후 부터는 입 크기가 점차 커졌다(Table 6).

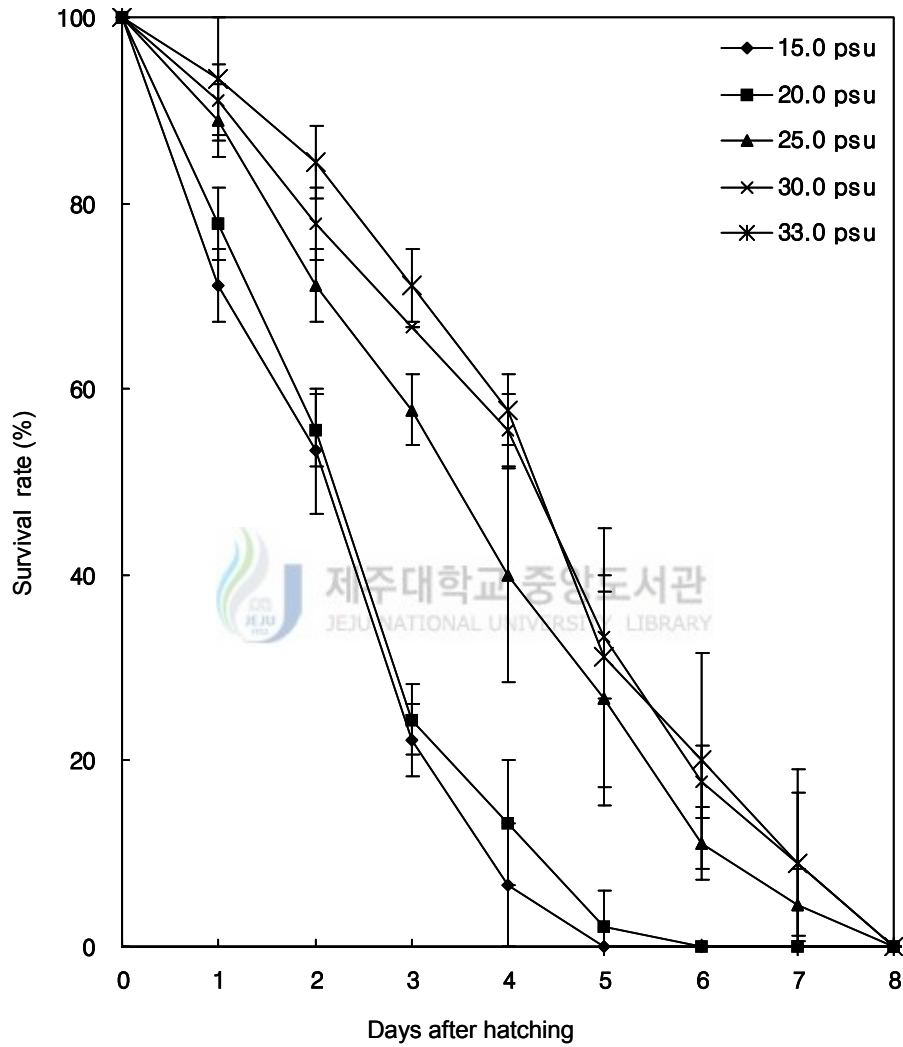


Fig. 16. Comparison of survival rates of newly-hatched *Premnas biaculeatus* larvae starved by different salinity conditions.

Table 6. Mouth size of *Premnas biaculeatus* larvae by growth in total length

Day after hatching	Total length (mm)	Upper jaw length (mm)	Mouth length (mm)	
			d ¹⁾	0.75d
1	3.22±0.25	0.27±0.03	0.38	0.29
2	3.85±0.30	0.29±0.03	0.40	0.30
3	4.16±0.41	0.30±0.05	0.43	0.32
4	4.22±0.66	0.32±0.07	0.46	0.34
6	5.14±0.90	0.40±0.10	0.56	0.42
8	6.17±1.08	0.52±0.11	0.73	0.55

¹⁾ $\sqrt{2}$ × upper jaw length.

3) *Artemia* nauplii의 섭식량

부화 후 8일부터 18일까지 치어의 먹이 공급량별 *Artemia* nauplii의 평균 섭식량은 부화 후 8일째(평균 전장 5.24 ± 0.53 mm)와 10일째(평균 전장 6.27 ± 0.74 mm) 치어 1마리가 12시간 동안 섭식한 *Artemia* nauplii수는 100개체 수용구인 경우 각각 23.8 ± 1.0 개체와 45.2 ± 3.0 개체였고, 200개체 수용구는 28.2 ± 2.0 개체와 65.3 ± 3.8 개체였다. 그리고 300개체 수용구는 33.5 ± 2.8 개체와 75.5 ± 4.3 개체였다. 부화 12일째부터 섭식량이 증가하여 부화 12일째(평균 전장 7.12 ± 0.83 mm)와 14일째(평균 전장 8.15 ± 0.96 mm) 치어의 섭식량은 500개체 수용구에서 159.3 ± 16.4 개체와 233.3 ± 20.9 개체였고, 1,000개체 수용구는 290.2 ± 25.1 개체와 354.2 ± 27.8 개체였다. 그리고 1,500개체 수용구는 307.8 ± 33.4 개체와 445.2 ± 43.7 개체였다. 부화 16일째(평균 전장 9.24 ± 1.23 mm)와 18일째(평균 전장 10.32 ± 1.58 mm) 치어의 섭식량은 1,000개체 수용구에서 420.0 ± 39.8 개체와 459.5 ± 31.1 개체였고, 1,500개체 수용구에서 475.3 ± 44.1 개체와 610.7 ± 35.4 개체였다. 그리고 2,000개체 수용구에서는 521.2 ± 52.7 개체와 673.2 ± 47.8 개체였다(Fig. 17).

4) 먹이 공급 방법과 식물 플랑크톤 첨가에 따른 초기 성장 및 생존

(1) 먹이 공급 방법에 따른 초기 성장 및 생존

먹이 공급 방법에 따른 자치어의 성장은 *Artemia* nauplii, *T. japonicus*와 배합사료의 공급 시기가 가장 빠른 A 실험구가 부화 17일째 전장 9.97 ± 0.8 mm로 성장이 가장 좋게 나타났고, A 실험구보다 1일 늦은 B 실험구는 전장 9.11 ± 0.67 mm로 나타났다. 그리고 공급 시기가 가장 늦은 C 실험구는 전장 8.79 ± 0.66 mm로 성장이 가장 저조하게 나타났다($P < 0.05$, Table 7). 먹이 공급 방법에 따른 성장은 부화 8일째부터 실험 종료 시점인 부화 17일째 까지 A 실험구와 B, C 실험구 사이에서 유의차가 있었다($P < 0.05$, Table 7).

실험 기간 중 먹이 공급 방법에 따른 성장 변화를 살펴보면 실험개시

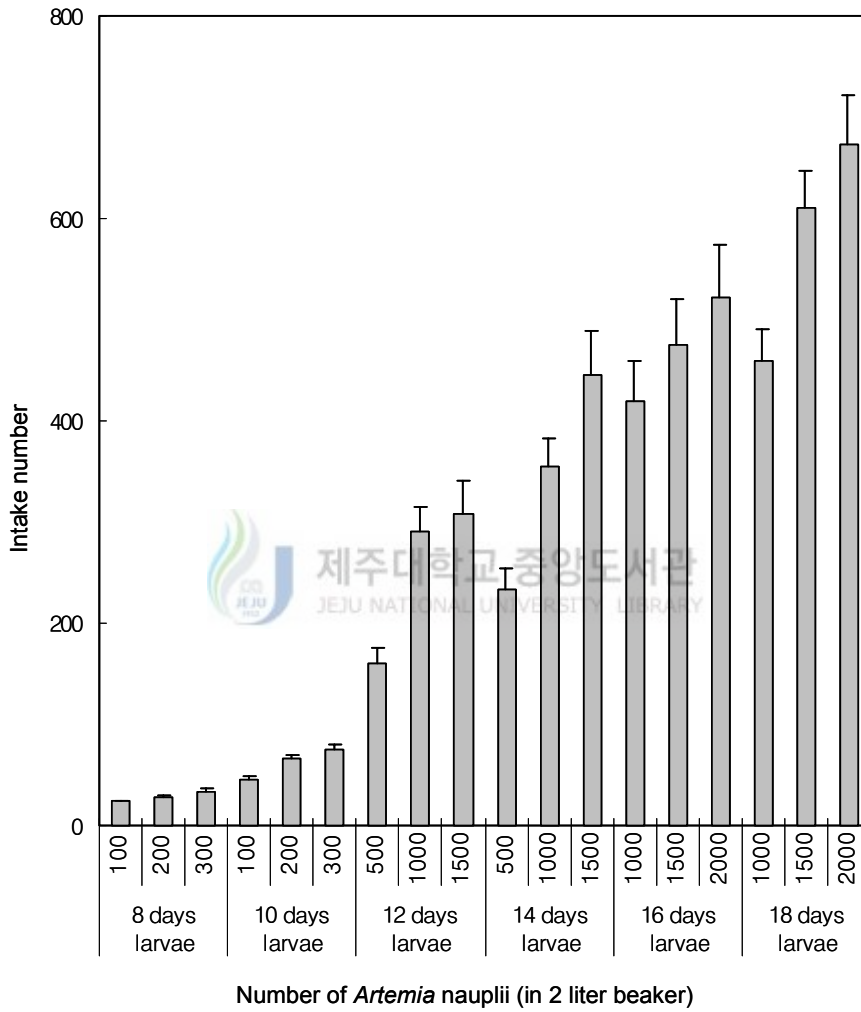


Fig. 17. Intake number of *Artemia* nauplii by *Premnas biaculeatus* larvae in three different feeding conditions.

Table 7. Comparison of growth of *Premnas biaculeatus* larvae reared different feeding regimes

(Unit: mm)

Feeding regime	Days after hatching				
	5	8	11	14	17
A	5.26±0.35 ^a	6.32±0.54 ^a	7.49±0.58 ^a	8.71±0.5 ^a	9.97±0.8 ^a
B	5.19±0.35 ^a	6.0±0.48 ^b	6.92±0.48 ^b	7.95±0.57 ^b	9.11±0.67 ^b
C	5.22±0.31 ^a	5.81±0.33 ^b	6.71±0.46 ^b	7.69±0.57 ^b	8.79±0.66 ^b

A, Feeding with *Artemia* nauplii, *Tigriopus* sp., and artificial feed were started at 4, 9, and 15 days after hatching, respectively; B and C, Feeding regimes were delayed one and two days comparing A feeding trial.

3일째인 부화 8일째부터 A실험구의 성장이 다른 실험구와 비교하여 빨랐다. 그리고 이러한 성장 패턴은 부화 일령 17일째 까지 이어졌다($P < 0.05$, Fig. 18).

각 실험구별 생존율을 보면 실험 개시 6일째인 부화 11일째 A, B 실험구는 각각 53%, 51%로 50% 내외의 생존율을 보였으나 C 실험구는 43%로 많은 차이를 보였다. 실험이 종료된 부화 17일째 실험구별 생존율은 A 실험구 36%, B 실험구 34%, C 실험구 29%를 나타냈다. 생존율은 C 실험구에 비하여 A, B 실험구가 상대적으로 높게 나타났다(Fig. 19).



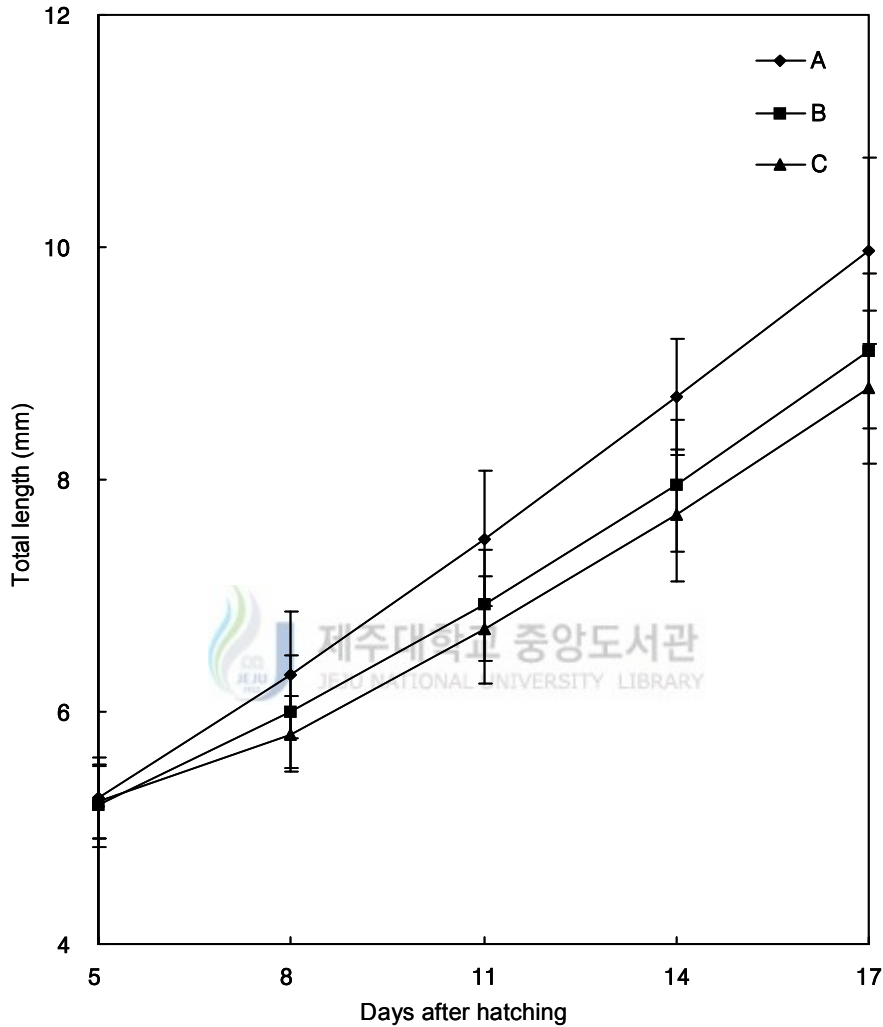


Fig. 18. Comparison of growth of *Premnas biaculeatus* larvae reared different feeding regimes. A, Feeding of *Artemia* nauplii, *Tigriopus japonicus*, and artificial feed were started at 4, 9, and 15 days after hatching, respectively.; B and C, Feeding regimes were delayed one and two days comparing A feeding trial.

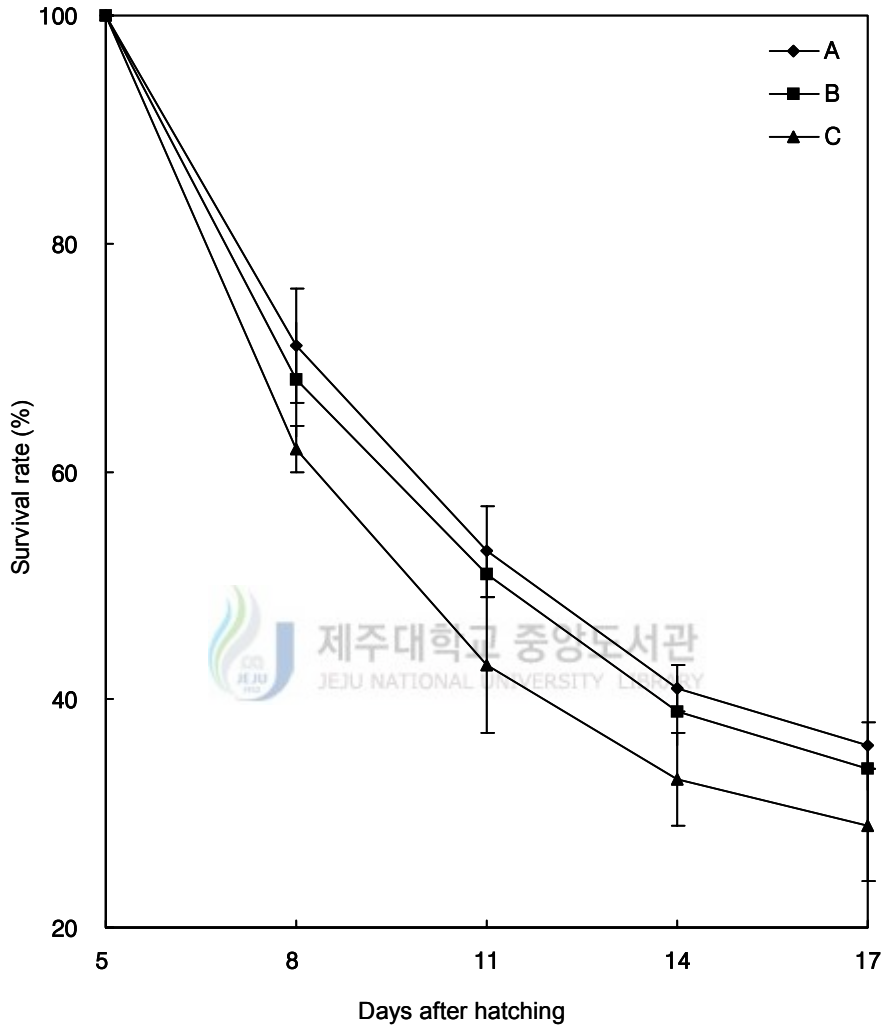


Fig. 19. Comparison of survival rates of *Premnas biaculeatus* larvae fed different feeding regimes. Feeding regimes of A, B, and C are referred to Fig. 18.

(2) 식물 플랑크톤 첨가 및 자치어 사육 밀도에 따른 초기 성장

사육수조에 첨가한 식물플랑크톤의 종류 및 밀도에 따른 성장을 비교하면 최초 자어 사육밀도가 3 fish/L인 경우 식물플랑크톤을 사육조에 첨가하지 않은 대조구와 *I. galbana*, *N. oculata*를 사육조에 첨가한 실험구는 실험 종료 시 전장이 각각 6.76 ± 0.55 mm, 7.63 ± 0.50 mm, 7.33 ± 0.43 mm로 성장하여 대조구와 실험구 사이에서는 유의차가 있었으나($P < 0.05$), 식물플랑크톤을 첨가한 실험구 사이에서는 유의차가 없었다($P > 0.05$, Table 8). 그리고 최초 자어 사육밀도가 6 fish/L인 경우 대조구와 *I. galbana*, *N. oculata* 첨가 실험구는 실험 종료 시 전장이 각각 6.63 ± 0.46 mm, 7.46 ± 0.48 mm, 7.23 ± 0.36 mm로 성장하였고, 사육밀도가 9 fish/L인 경우에는 전장이 각각 6.53 ± 0.42 mm, 7.29 ± 0.45 mm, 7.12 ± 0.48 mm로 성장하였다. 최초 자어 사육밀도 6 fish/L, 9 fish/L인 경우도 최초 자어 사육밀도 3 fish/L일 때와 마찬가지로 성장에서 대조구와 실험구 사이에 유의차가 있었으나($P < 0.05$), 식물플랑크톤을 첨가한 실험구 사이에서는 유의차가 없었다($P > 0.05$, Tables 9, 10). 이러한 경향은 부화 후 5일이 경과 한 후부터 7일, 9일, 11일까지 비슷하였다. 다만 사육밀도가 6 fish/L일 때 부화 5일째에는 대조구와 *I. galbana*를 첨가한 실험구에서 유의차가 있었으나($P < 0.05$), 대조구와 *N. oculata*를 첨가한 실험구 사이에서는 유의차가 없었다($P > 0.05$). 그리고 사육밀도가 9 fish/L일 때 부화 7일째에는 대조구와 *I. galbana* 및 *N. oculata*를 첨가한 실험구 사이에서 모두 유의차가 있었다($P < 0.05$).

이와 같이 첨가한 식물플랑크톤에 따른 자어의 성장 차이는 사육 밀도와 관계 없이 *I. galbana*나 *N. oculata*를 첨가한 실험구가 식물플랑크톤을 첨가하지 않은 대조구에 비교하여 성장이 빠르게 나타났다(Tables 8, 9, 10, Fig. 20).

자치어 사육 밀도별 성장 차이를 비교하면 식물플랑크톤을 첨가하지 않은 대조구인 경우 3 fish/L와 6 fish/L, 9 fish/L에서 각각 전장이 6.76 ± 0.55 mm,

Table 8. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 3 fish/L)

Treatment	Days after hatching					(Unit: mm)
	3	5	7	9	11	
Control	4.21±0.11 ^a	4.34±0.20 ^b	5.07±0.22 ^b	6.09±0.32 ^b	6.76±0.55 ^b	
<i>Isochrysis galbana</i>	4.18±0.12 ^a	4.63±0.22 ^a	5.99±0.34 ^a	6.73±0.52 ^a	7.63±0.50 ^a	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.19±0.13 ^a	4.56±0.23 ^a	5.79±0.24 ^a	6.57±0.39 ^a	7.33±0.43 ^a	

Table 9. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 6 fish/L)

Treatment	Days after hatching					(Unit: mm)
	3	5	7	9	11	
Control	4.19±0.18 ^a	4.30±0.17 ^b	5.03±0.28 ^b	6.03±0.25 ^b	6.63±0.46 ^b	
<i>Isochrysis galbana</i>	4.17±0.15 ^a	4.54±0.26 ^a	5.90±0.30 ^a	6.60±0.46 ^a	7.46±0.48 ^a	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.18±0.16 ^a	4.48±0.29 ^{ab}	5.74±0.37 ^a	6.42±0.33 ^a	7.23±0.36 ^a	

Table 10. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 9 fish/L)

(Unit: mm)

Treatment	Days after hatching				
	3	5	7	9	11
Control	4.20±0.14 ^a	4.25±0.15 ^a	4.98±0.26 ^c	5.95±0.30 ^b	6.53±0.42 ^b
<i>Isochrysis galbana</i>	4.21±0.19 ^a	4.41±0.30 ^a	5.77±0.31 ^a	6.47±0.42 ^a	7.29±0.45 ^a
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.17±0.21 ^a	4.35±0.26 ^a	5.50±0.28 ^b	6.33±0.29 ^a	7.12±0.48 ^a

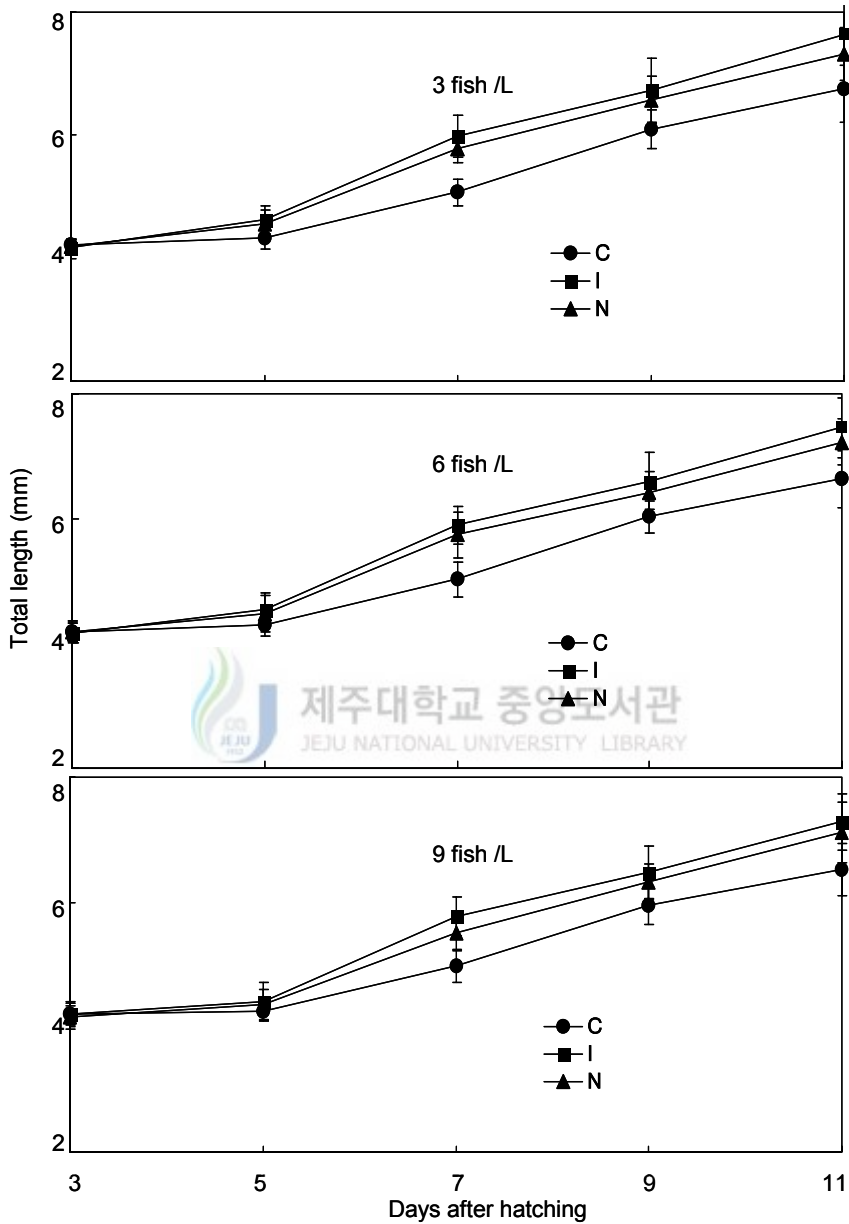


Fig. 20. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to growth rates *Premnas biaculeatus* larvae. C, general sea water; I, green water added by *Isochrysis galbana*; N, green water added by *Nannochloropsis oculata*.

6.63±0.46 mm, 6.53±0.42 mm로 나타났다. *I. galbana*를 사육수조에 첨가한 실험구에서는 각각 전장이 7.63±0.50 mm, 7.46±0.48 mm, 7.29±0.45 mm로 나타났고, *N. oculata*를 첨가한 실험구에서는 각각 전장이 7.33±0.43 mm, 7.23±0.36 mm, 7.12±0.48 mm로 나타났으며 유의차는 없었다($P>0.05$, Fig. 21).



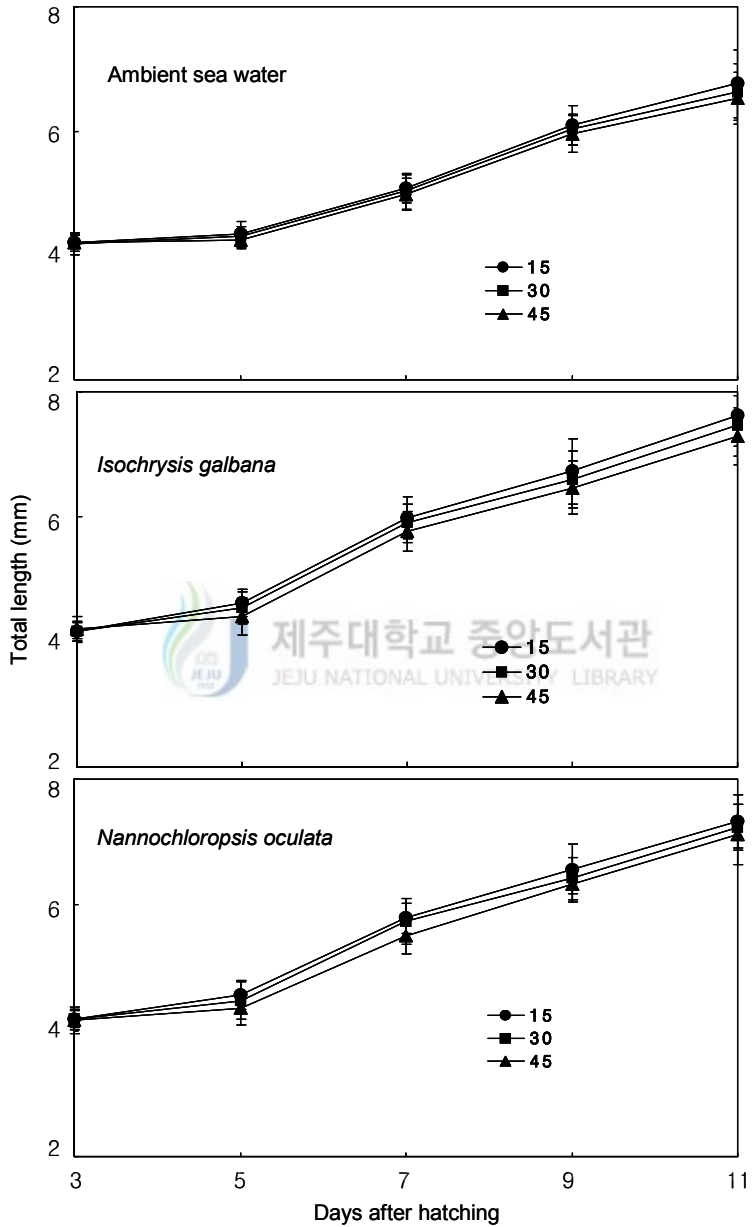


Fig. 21. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to growth rates *Premnas biaculeatus* larvae. 15, 15 fish/5 L; 30, 30 fish/5 L; 45, 45 fish/5 L.

(3) 식물 플랑크톤 첨가 및 자치어 사육 밀도에 따른 초기생존

사육수조에 첨가한 식물 플랑크톤의 종류 및 밀도에 따른 생존율 변화를 보면 최초 자어 사육밀도가 3 fish/L인 경우에 식물 플랑크톤을 사육수조에 첨가하지 않은 대조구와 *I. galbana*와 *N. oculata*를 사육수조에 첨가한 실험구의 실험 종료 시 생존율이 각각 42.2%, 62.2%, 55.6%로 나타났다. 자어 사육밀도가 6 fish/L인 경우에는 각각 36.7%, 54.4%, 50.0%, 사육밀도가 9 fish/L인 경우에는 각각 34.1%, 54.1%, 48.2%의 생존율을 보였다(Table 11). 이처럼 첨가한 식물 플랑크톤 종류에 따른 생존율은 사육밀도와 관계없이 *I. galbana*를 첨가한 실험구에서 상대적으로 높게 나타났고 식물 플랑크톤을 첨가하지 않은 대조구에서 상대적으로 낮게 나타나 자어의 성장 비교 결과와 유사하였다(Fig. 22). 밀도별 생존율 차이는 밀도가 낮은 실험구에서 상대적으로 생존율이 높게 나타났다(Fig. 23).

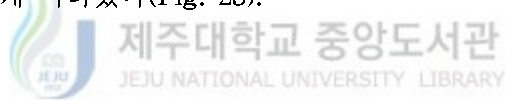


Table 11. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to survival rates of *Premnas biaculeatus* larvae

Trial	Fish/L	Days after hatching									
		Survival rates (%)	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Control	3	100	88.9	80.0	71.1	62.2	60.0	51.1	44.5	40.0	
	6	100	81.1	75.6	64.4	58.9	52.2	46.7	42.2	36.7	
	9	100	83.0	73.3	63.7	54.1	48.9	43.7	39.3	34.1	
<i>Isochrysis galbana</i>	3	100	93.3	91.1	84.5	82.2	75.6	73.3	66.7	62.2	
	6	100	97.8	95.6	90.0	85.6	77.8	72.2	65.6	54.5	
	9	100	90.4	85.2	81.5	77.0	71.9	65.9	60.0	54.1	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3	100	95.6	88.9	84.4	75.6	68.9	64.4	60.0	55.6	
	6	100	85.6	83.3	78.9	73.3	67.8	63.3	56.7	50.0	
	9	100	94.1	91.1	85.9	80.7	76.3	70.4	56.3	48.2	

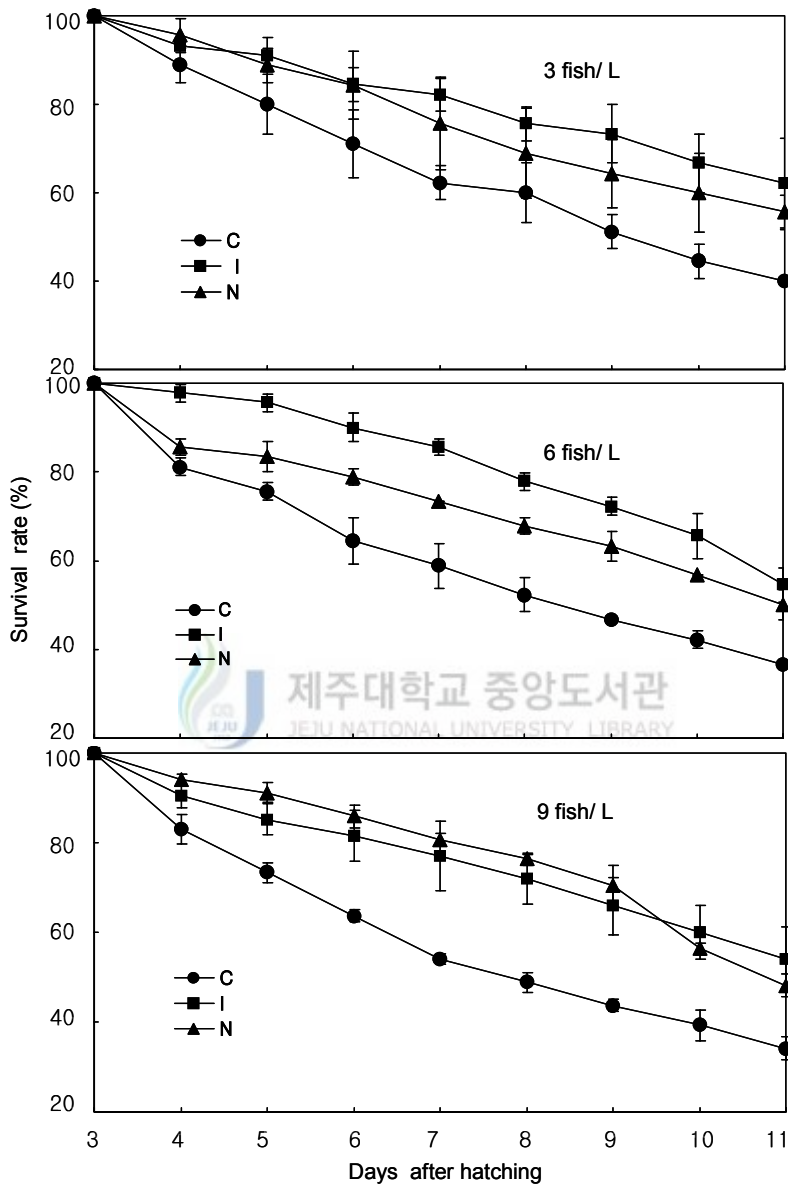


Fig. 22. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to survival rates *Premnas biaculeatus* larvae. C, general sea water; I, green water added by *Isochrysis galbana*; N, green water added by *Nannochloropsis oculata*.

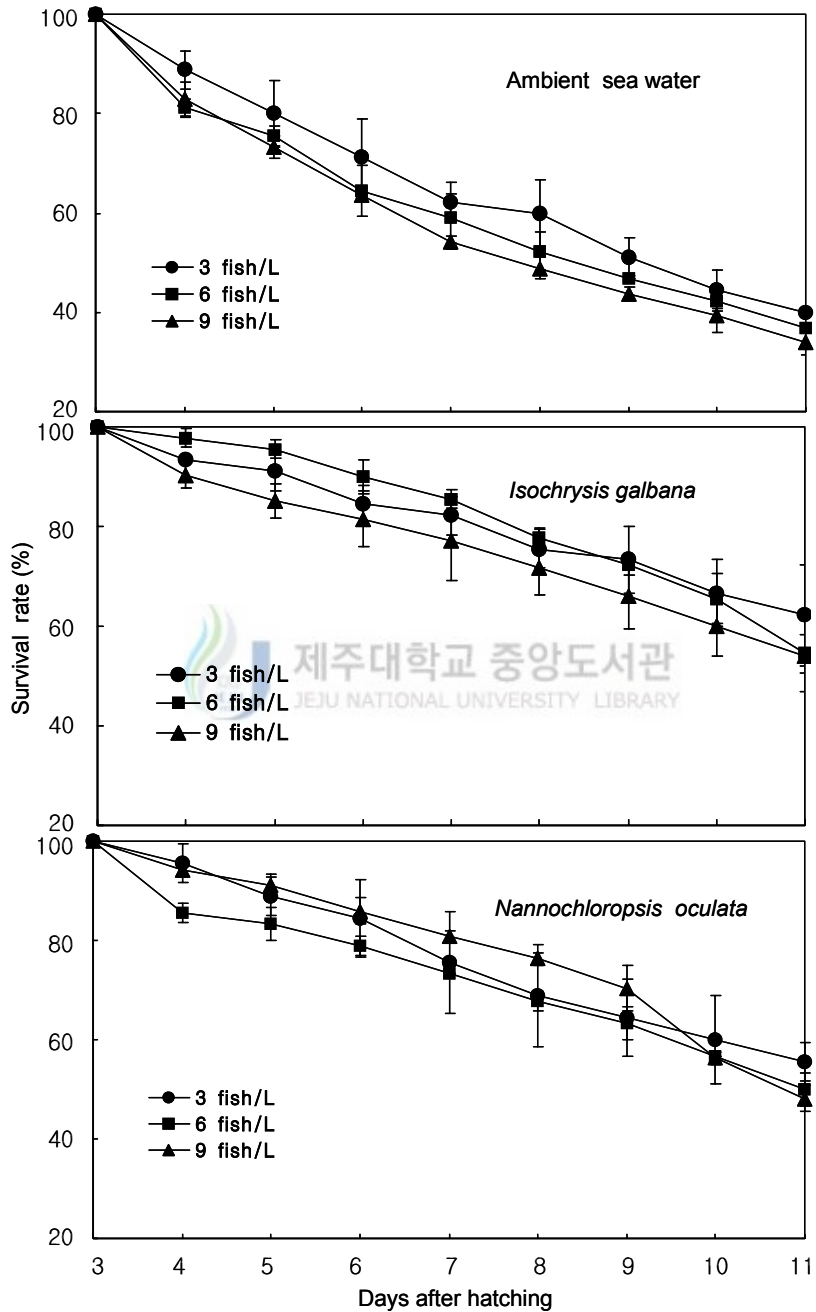


Fig. 23. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to survival rates *Premnas biaculeatus* larvae.

3. 자치어 사육과정 중의 병원성 미생물 확인

1) 분리균주의 생화학적 특성

GN2 Micro-Plate를 이용한 생화학 시험결과 Dextrin 및 Sucrose를 포함한 34가지 기질 이용능이 확인되었으며 α -Cyclodextrin을 비롯한 53가지 기질은 분해하지 못하였고, Glycogen을 비롯한 8가지 기질은 약한 이용능을 나타내었다(Table. 12). 생화학적 특성 결과 이 균은 *Vibrio ponticus* 균으로 여겨진다.

2) *Vibrio ponticus* 균의 분자생물학적 동정

분리된 균주의 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열 분석 결과 *Vibrio ponticus*와 99.8%의 상동성을 보여 분리균을 *V. ponticus* strain kjs1으로 동정하였으며(Fig. 24), *V. fluvialis* ATCC 33809와는 97.2%, *V. fluvialis* NCTC 11327과는 96.8%, 그리고 *V. furnissii* ATCC 35016과는 97.3%의 상동성을 나타내었다(Table 13). Parsimony 분석을 실시한 후 계통도에 대한 신뢰도를 얻기 위하여 100 bootstrap 분석을 하여 consensus tree를 얻었다(Fig. 25).

3) *Vibrio ponticus* 균의 항생제 감수성

14종의 약제감수성 실험용 항생제 디스크를 사용하여 항생제 감수성 실험을 실시한 결과 Quinolone계 항생제인 Oxolinic acid, Flumequine, Ciprofloxacin 등과 Pefloxacin과 Doxycycline hydrochloride에 감수성이 높게 나타났으며 Erythromycin, Oxacillin, Spiramycin에는 내성을 나타내었다(Table. 14).

Table 12. Physiological and biochemical characterization of the *Vibrio ponticus* strain kjs1 using the BIOLOG analysis system

Substrate	Results	Substrate	Results
Water	-	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-
α -Cyclodextrin	-	Itaconic Acid	±
Dextrin	+	α -Keto Butyric Acid	+
Glycogen	±	α -Keto Glutaric Acid	-
Tween 40	±	α -Keto Valeric Acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic Acid	+
N-Acetyl-D Galactosamine	+	Malonic Acid	-
N-Acetyl-D Glucosamine	+	Propionic Acid	+
Adonitol	-	Quinic Acid	-
L-Arabinose	-	D-Saccharic Acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic Acid	-
D-Cellobiose	-	Succinic Acid	+
i-Erythritol	-	Bromosuccinic Acid	±
D-Fructose	+	Succinamic Acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	±
D-Galactose	-	L-Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
α -D-Glucose	+	L-Alanine	+
m-Inositol	-	L-Alanyl-glycine	+
α -D-Lactose	-	L-Asparagine	+
Lactulose	-	L-Aspartic Acid	±
Maltose	+	L-Glutamic Acid	+
D-Mannitol	+	Glycyl-L aspartic Acid	+
D-Mannose	+	Glycyl-L glutamic Acid	±
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
β -Methyl-D-Glucoside	-	Hydroxy-L-Proline	-
D-Psicose	+	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	±	L-Proline	+
Sucrose	+	L-Pyroglutamic Acid	-
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	+	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	D,L-Carnitine	-
Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	+	γ -Amino butyric Acid	-
Acetic Acid	+	Urocanic Acid	-
Cis-Aconitic Acid	-	Inosine	+
Citric Acid	-	Uridine	+
Formic Acid	-	Thymidine	+
D-Galactonic Acid Lactone	-	Phenyethylamine	-
D-Galacturonic Acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic Acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic Acid	-	2,3-Butanediol	-
D-Glucuronic Acid	+	Glycerol	-
α - Hydroxybutyric Acid	+	D,L- α -Glycerol Phosphate	-
β - Hydroxybutyric Acid	+	α -D-Glucose- 1-Phosphate	-
γ -Hydroxybutyric Acid	-	D-Glucose- 6-Phosphate	+

+, positive reaction; -, negative reaction; ±, borderline

```

V. ponticus strain KJS1  GGCCTACCN--TGCAAGTCGAGCGGCAGCGACAACATTGAACCT
V. ponticus CECT 5869  GGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGACAACATTGAACCT
***** * *****
V. ponticus strain KJS1  TCGGGGGATTGTGTTGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
V. ponticus CECT 5869  TCGGGGGATTGTGTTGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
*****
V. ponticus strain KJS1  GCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGA
V. ponticus CECT 5869  GCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGA
*****
V. ponticus strain KJS1  TGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTT
V. ponticus CECT 5869  TGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTT
*****
V. ponticus strain KJS1  CGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT
V. ponticus CECT 5869  CGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT
*****
V. ponticus strain KJS1  GGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
V. ponticus CECT 5869  GGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
*****
V. ponticus strain KJS1  GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACT
V. ponticus CECT 5869  GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACT
*****
V. ponticus strain KJS1  CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
V. ponticus CECT 5869  CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
*****
V. ponticus strain KJS1  GCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
V. ponticus CECT 5869  GCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
*****
V. ponticus strain KJS1  GTAAAGTACTTTTCAGTAGGGAGGAAGGTTTCATRCGTTAATAGCGT
V. ponticus CECT 5869  GTAAAGTACTTTTCAGTAGGGAGGAAGGTTTCATRCGTTAATAGCGT
*****
V. ponticus strain KJS1  ATGGATTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
V. ponticus CECT 5869  ATGGATTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
*****
V. ponticus strain KJS1  GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGA
V. ponticus CECT 5869  GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGA
*****
V. ponticus strain KJS1  ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTAGTTAAGTCAGAT
V. ponticus CECT 5869  ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTAGTTAAGTCAGAT
*****

```

Fig. 24. Alignment of the partial 16S rDNA sequence of a isolated bacterium *Vibrio ponticus* kjs1 and *Vibrio ponticus* CECT 5869 (AJ630103).

V. ponticus strain KJS1 GTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGC
V. ponticus CECT 5869 GTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGC

V. ponticus strain KJS1 TGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGG
V. ponticus CECT 5869 TGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGG

V. ponticus strain KJS1 TGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
V. ponticus CECT 5869 TGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG

V. ponticus strain KJS1 CCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGA
V. ponticus CECT 5869 CCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGA

V. ponticus strain KJS1 GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
V. ponticus CECT 5869 GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG

V. ponticus strain KJS1 TCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAA
V. ponticus CECT 5869 TCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAA

V. ponticus strain KJS1 CGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAA
V. ponticus CECT 5869 CGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAA

V. ponticus strain KJS1 CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
V. ponticus CECT 5869 CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT

V. ponticus strain KJS1 GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT
V. ponticus CECT 5869 GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT

V. ponticus strain KJS1 CCATAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTATG
V. ponticus CECT 5869 CCATAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTATG

V. ponticus strain KJS1 AGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGT
V. ponticus CECT 5869 AGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGT

V. ponticus strain KJS1 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCC
V. ponticus CECT 5869 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCC

V. ponticus strain KJS1 AGCGAGTAATGTGCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAA
V. ponticus CECT 5869 AGCGAGTAATGTGCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAA

V. ponticus strain KJS1 CCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
V. ponticus CECT 5869 CCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC

Fig. 24. Continued.

V. ponticus strain KJS1 GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGYATACAGAGGGCTG
V. ponticus CECT 5869 GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCTG

V. ponticus strain KJS1 CCAACCAGCGATGGTGAGCGAATCCCAAAAAGTACGTCGTCGTC
V. ponticus CECT 5869 CCAACCAGCGATGGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTCGTC

V. ponticus strain KJS1 CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA
V. ponticus CECT 5869 CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA

V. ponticus strain KJS1 GTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCT
V. ponticus CECT 5869 GTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCT

V. ponticus strain KJS1 TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTG
V. ponticus CECT 5869 TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTG

Fig. 24. Continued.



Table 13. Sequence divergences in the combined data set of isolated strain (*Vibrio ponticus* kjs1) and type strains. Number below the diagonal are divergence values corrected for multiple substitutions using the parameter model

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	99.8	97.3	96.8	97.2	96.2	95.6	95.9	96.0
2	0.0022	-	97.5	97.0	97.3	96.3	95.8	96.0	96.1
3	0.0266	0.0250	-	99.1	99.5	97.7	96.5	97.0	96.5
4	0.0321	0.0305	0.0087	-	99.6	98.2	96.3	97.2	96.4
5	0.0282	0.0266	0.0050	0.0036	-	97.8	96.3	97.0	96.3
6	0.0383	0.0366	0.0228	0.0183	0.0221	-	96.3	96.2	96.3
7	0.0437	0.0420	0.0349	0.0366	0.0372	0.0374	-	97.8	99.6
8	0.0415	0.0397	0.0298	0.0284	0.0298	0.0376	0.0222	-	97.6
9	0.0405	0.0389	0.0348	0.0358	0.0371	0.0366	0.0036	0.0236	-

1, *V. ponticus* KJS1; 2, *V. ponticus* CECT 5869 (AJ630103); 3, *V. furnissii* ATCC 35016 (X76336); 4, *V. fluvialis* NCTC 11327 (X76335); 5, *V. fluvialis* ATCC 33809 (X74703); 6, *V. vulnificus* ATCC 27562 (X76333); 7, *V. harvey* ATCC 14126 (X74706); 8, *V. nereis* ATCC 25917 (X74716); 9, *V. campbelli* ATCC 25920 (X74692).

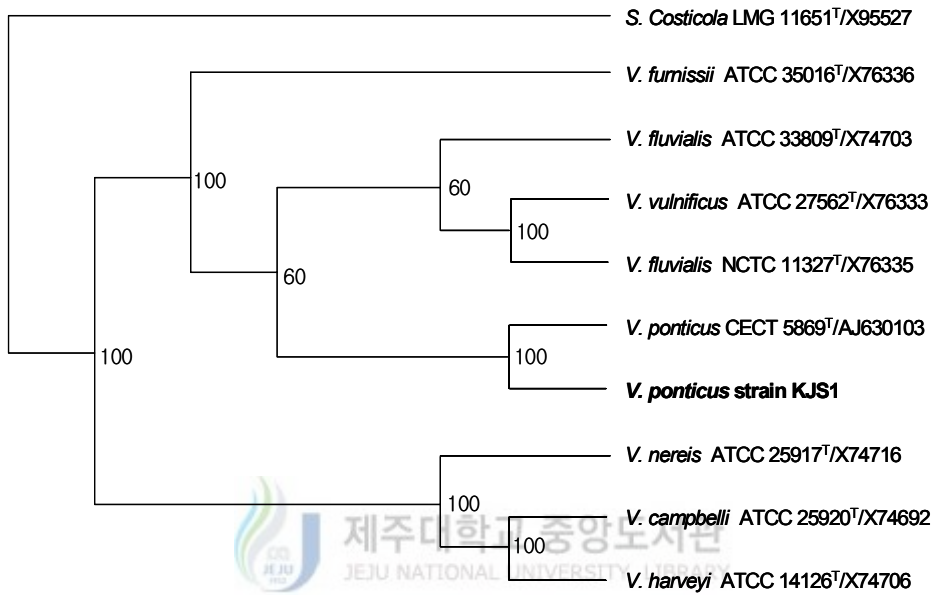


Fig. 25. A strict consensus tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strain with type strains.

Table 14. Sensitivity to chemotherapeutic agents of *Vibrio ponticus* isolated from diseased Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*

Agent (μg)	Sensitivity
Oxolinic acid (2)	+++
Erythromycin (15)	-
Ampicillin (10)	++
Cephalothin (30)	++
Flumequine (30)	+++
Doxycycline hydrochloride (30)	+++
Oxacillin (1)	-
Ciprofloxacin (5)	+++
Ofloxacin (5)	+++
Norfloxacin (10)	+++
Nalidixic acid (30)	+++
Spiramycin (100)	-
Pefloxacin (5)	+++
Oxytetracycline (30)	++

-, No sensitivity; +, weak sensitivity; ++, sensitivity; +++, good sensitivity.

4. 골격계의 기재 및 *Premnas*속의 골학적 특징

1) 골격계의 기재

(1) 두개골(Neurocranium)

두개골은 비골(nasal), 사골(ethmoid), 서골(vomer), 측사골(lateral ethmoid), 액골(frontal), 노정골(parietal), 상이골(epiotic), 상후두골(supraoccipital), 익설골(pterosphenoid), 설이골(sphenotic), 익이골(pterotic), 외후두골(exoccipital), 기저설골(basisphenoid), 전이골(prootic), 후이골(intercalar), 기저후두골(basioccipital), 그리고 부설골(parasphenoid)의 17개 골편으로 구성되어 있다. 그 중 사골, 서골, 상후두골, 기저설골, 그리고 부설골은 1개씩이고 나머지 골편은 쌍으로 존재한다(Fig. 26).

두개골의 전방부에 해당하는 사부(ethmoid region)는 비골, 사골, 서골 및 측사골의 4개의 골편으로 구성되어 있다. 비골은 얇은 판상의 소형 골편으로 후각기관을 덮고 있으며, 후방으로 액골에 부착되어 있다. 사골은 두개골 전방의 정중선상에서 양 측사골 사이에 위치하며 전하단부는 연골이다. 서골은 두개골 전하단부에 위치하는 삼각형의 골편으로 서골치는 없다. 후방으로 부설골과 융합한다. 측사골은 안와전반부를 차지하며 측방으로 돌출되어 있고, 측방의 관절면을 통해 누골과 관절한다.

사부와 이부(otic region)사이에 위치하는 안와부(orbital region)는 액골이 가장 뚜렷하다. 액골은 사각형의 비교적 큰 골편으로 정중선 상에서 반대편 액골과 융합하며 표면은 매끄럽다. 측면에 두부감각관이 있다. 액골은 후방으로 상후두골, 노정골에, 후하방으로 설이골과 익설골에 접한다. 설이골은 안와 후상방의 약간 돌출된 골편으로, 후하방에서 설악골과 관절한다. 안와의 후방에 익설골과 양 익설골을 서로 연결하는 기저설골이 있다. 안와부와 후두부(occipital region)의 저면에는 비교적 큰 부설골이 있다. 부설골은 복면

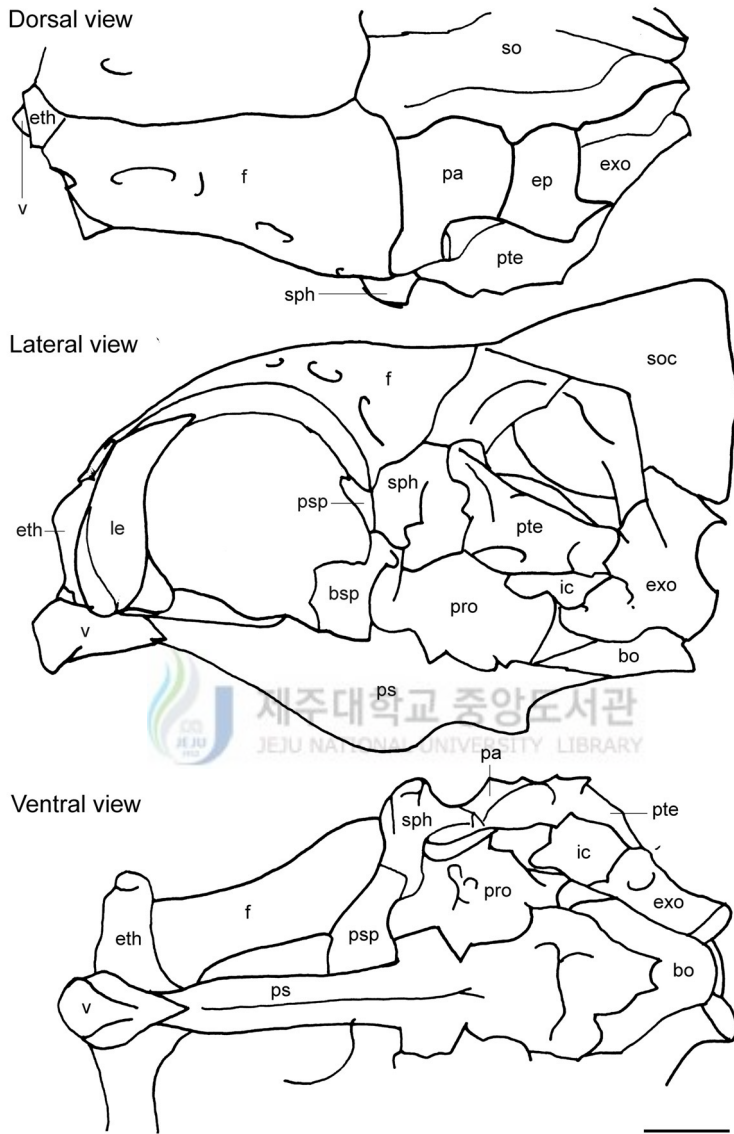


Fig. 26. Neurocranium of *Premnas biaculeatus*, MRIC 2522. bo, basicphenoid; bsp, basioccipital; ep, epiotic; eth, ethmoid; exo, exoccipital; f, frontal; ic, intercalar; le, lateral ethmoid; pa, parietal; ps, parasphenoid; psp, pterosphenoid; pte, pterotic; pro, prootic; soc, supraoccipital; sph, sphenotic; v, vomer. Scale bar=1 mm.

정중선이 얇은 판상으로 확장되어 있고, 그 후방에 들출부가 있다.

전이골은 두개골의 측벽에 위치하며 설이골, 익이골, 간재골, 외후두골, 부설골, 기저설골, 익설골에 둘러싸여 있다. 전이골에는 제3, 5, 7 뇌신경들이 달리는 3개의 개공이 있고, 상단에서는 익설골과 함께 설악골에 관절한다.

상후두골은 두개골의 상후단에 위치하는 골편으로 전방으로 전두골과, 측방으로 노정골과 상이골과 접하며 정중선상에 판상의 들출부가 있다.

노정골과 상이골은 상후두골의 측방에 위치하며, 이들 골편은 측방으로 설이골과 익이골과 만난다. 노정골, 상이골, 익이골 사이는 오목하며 연골부가 있고, 그 상부에는 상측두골(supratemporal)이 위치한다. 상이골은 후측방에는 후측두골(posttemporal)이 부착된다. 익이골은 두개골의 후측방에 위치하는 골편으로 전하단부에서 설악골 관절부가 있다. 전이골, 익이골, 외후두골 사이에 소형 판상의 후이골이 있다.

외후두골와 기후두골은 두개골의 후단부에 위치하며, 이 두 골편에 의해서 두개골은 제1척추골과 관절한다.

(2) 안와골(Circumorbital bones)

안와골은 누골(lacrimal)과 4개의 안하골(infraorbital)로 구성되어 있다 (Fig. 27). 누골은 전방 상단으로 측사골에 인대에 의해 강하게 연결되며 후방으로 제1안하골과 접한다. 누골은 내측으로 확장되어 있으며, 후하단에는 잘 발달된 가시가 있다. 안하골은 모두 4개로, 제1안하골은 직사각형이며 내측으로 넓게 확장되어 있고 후하단에 잘 발달된 가시가 있다. 제2-4안하골은 짧은 막대모양으로, 제4안하골은 엽이골의 외측면에 강하게 부착되어 있다.

(3) 악골(Jaws)

악골은 상악과 하악으로 구분되며, 상악은 전상악골(premaxilla)과 주상악골(maxilla)로, 하악은 치골(dentary), 각골(angular), 후관절골(retroarticular), coronomeckelian, 그리고 맥켈씨연골(Meckel's cartilage)로 이루어져 있다(Fig. 28).

전상악골은 L자 모양으로 상행돌기(ascending process)가 비교적 짧으며 관절돌기(articular process)는 발달이 빈약하다. 전상악골의 복측에는 선단이 무딘 원추치가 1-2열로 늘어서 있다. 주상악골은 전상단부에서 인대에 의해 비골과 구개골의 전단에 부착되어 있으며, 내측에 돌기가 있다

치골과 각골은 비교적 강하게 접촉하며 치골의 배측에 1-2열의 선단이 무딘 원추치가 배열되어 있다. 각골은 후방으로 방형골에 관절한다. 후관절골은 각골의 후하단에 강하게 접촉되어 있는 작은 골편으로 인대에 의해서 간새개골에 연결된다. 맥켈씨 연골은 각골의 내측 중앙부에 있는 막대모양의 연골이며, Coronomeckelian은 맥켈씨 연골의 안쪽에 위치하는 작은 골편이다.

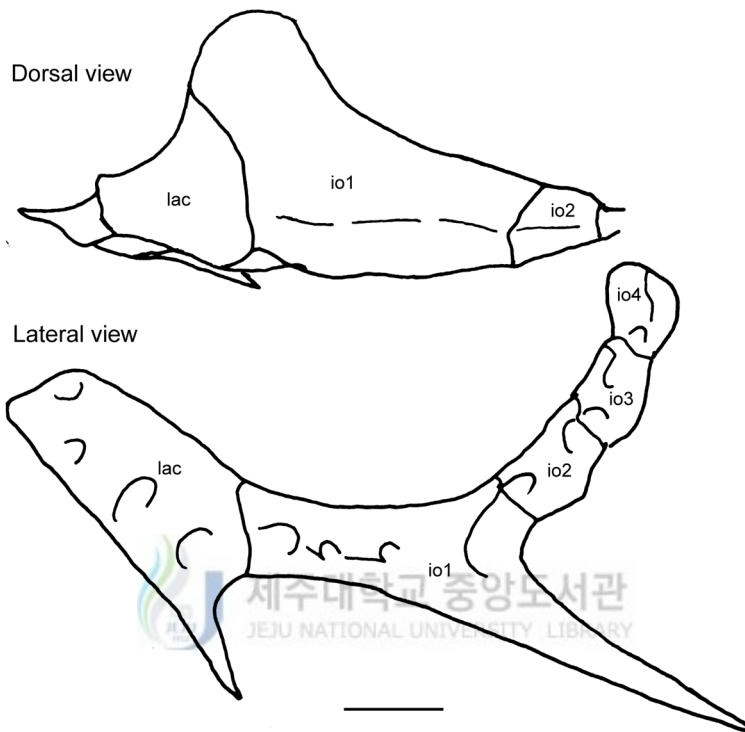


Fig. 27. Circumorbital bone of *Premnas biaculeatus*, MRIC 2857. io, infraorbital; lac; lacrimal. Scale bar=1 mm.

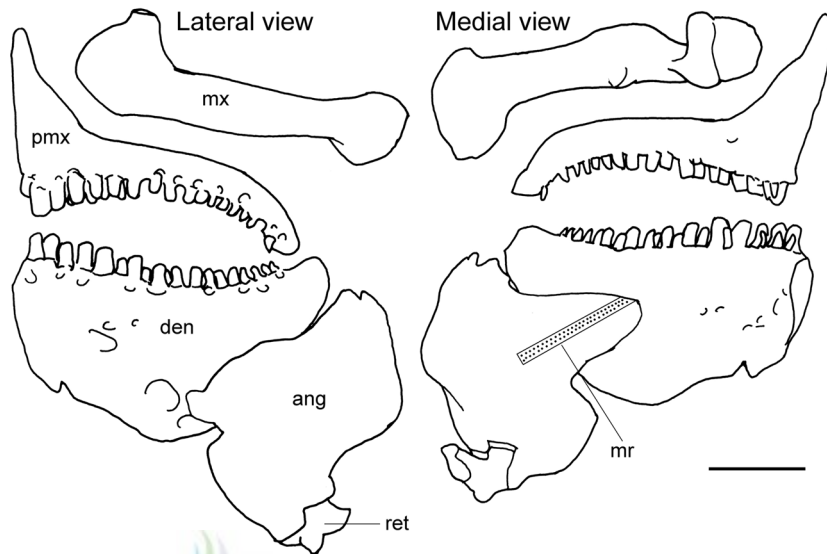


Fig. 28. Upper and lower jaws of *Premnas biaculeatus*, MRIC 2477. ang, angular; den, dentary; mr, Meckl's cartilage; mx, maxilla; pmx, premaxilla; ret, retroarticular. Scale bar=1 mm.

(4) 현수골(Suspensorium)과 새개골(Opercular apparatus)

현수골은 구개부와 새개부로 구분되며, 전자는 구개골(palaine), 내익상골(endopterygoid), 외익상골(ectopterygoid), 후익상골(metapterygoid), 설악골(hyomandibular), 접속골(symplectic), 방형골(quadrate)로 구성되어 있고, 후자는 전새개골(preopercle), 주새개골(opercle), 하새개골(subopercle), 그리고 간새개골(interopercle)로 구성되어 있다(Fig. 29).

구개골은 현수골의 가장 전방에 위치하는 비교적 작은 골편으로 내측으로 결합조직에 의해서 서골에 강하게 부착되어 있다. 후방으로는 돌기가 발달되어 외익상골과 겹쳐져 있고, 내익상골과 연결한다. 구개골치는 없다. 내익상골은 얇은 판상으로 내측으로 확장되어 있으며, 하방으로 가는 연골대를 사이로 외익상골과 접하고, 후방으로 후익상골과 겹쳐있다. 외익상골은 부데랑모양의 골편으로 전방으로는 구개골과, 후방으로는 방형골과 접한다. 후익상골은 사각형의 판상 골편으로 설악골, 내익상골, 접속골, 방형골과 접한다. 설악골은 3개의 관절면(articular facet) 있어 상방으로 두개골에, 후방으로 주새개골과 관절한다. 하방으로는 후익상골과 만나며, 측방으로는 전새개골과 접한다. 하단에서는 연골을 사이에 두고 접속골과 함께 간설골의 상단과 만난다. 접속골은 가는 막대모양의 골편으로 방형골의 내측에 강하게 부착되어 있으며, 상방으로 후익상골과 설악골에, 후방으로 전새개골에 접한다. 방형골은 삼각형 모양으로 하방에 관절부가 있어 하악의 각골에 관절하고, 후방으로는 전새개골의 전하단부에 강하게 부착되어 있다.

전새개골은 초승달 모양의 골편으로 laterosensory canal system의 preopercular sensory canal이 달린다. 후연부는 뭉툭한 거치가 있다. 전방으로 설악골, 접속골 그리고 방형골과 만나며, 후방으로 주새개골과 하새개골, 후하방으로 간새개골과 접한다. 주새개골은 새개부에서 가장 큰 판상의 골편으로 후단부에 2-3개의 돌기가있고 내측 설악골 관절부에 약한 움기가

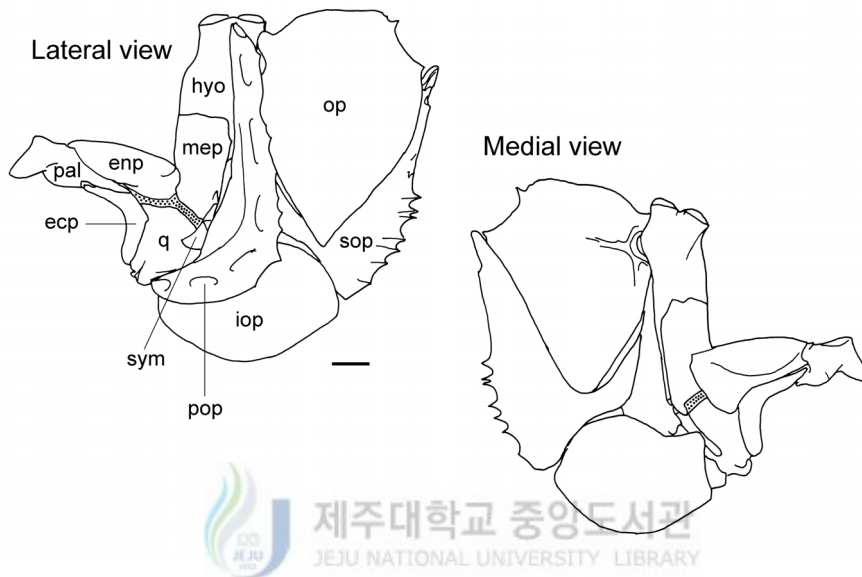


Fig. 29. Suspensorium and opercular apparatus of *Premnas biaculeatus*, MRIC 2857. ecp, ectopterygoid; enp, endopterygoid; hyo, hyomandibular; iop, interopercle; mep, metaptergoid; op, opercle; pal, palatine; pop, preopercle; q, quadrate; sop, subopercle; sym, symplectic. Scale bar=1 mm.

있다. 전방으로 설악골과 관절하고, 전새개골 및 하새개골과 만나며, 하방으로는 하새개골과 겹쳐있다. 하새개골은 부메랑 모양이며 후하단부에 6-7개의 돌기가 있다. 간새개골은 난형의 골편으로 전새개골의 후하단부에 위치하며 후방으로 하새개골과 접한다. 개체에 따라 간새개골 후단부에 돌기가 있기도 하다.

(5) 설궁(Hyoid arch)

설궁은 인설골(basihyal), 하설골(hypohyal), 각설골 (ceratohyal), 상설골(epihyal), 간설골 (interhyal), 미설골(urohyal) 그리고 새조골(branchiostegal ray)로 구성되어 있다(Fig. 30).

인설골은 하설골과 제1기새골의 상부에 위치하는 주걱모양의 골편이다. 하설골은 후방으로 각설골에 강하게 부착되어 있다. 복하설골은 결합조직에 의해서 미설골의 전방돌기에 연결된다. 비교적 큰 골편인 각설골은 하설골과 상설골 사이에 위치하며 상부에 골이 있고, 하부에 3개의 새조골에 부착되어 있다. 상설골은 연골대를 사이로 각설골 후방에 위치하며, 후상방으로는 결합조직에 의해 간설골과 연결되며, 전하방에 1개의 새조골이 부착되어 있다. 비교적 큰 개체에서는 각설골과 상설골이 내측에서 융합한다. 간설골은 짧은 막대모양으로 하방으로는 상설골과 연결되고, 상방으로 현수골의 설악골 하단과 접촉골 상단사이에 연골로 부착되어 있다. 새조골은 모두 6개로 전방의 2개는 각설골과 분리되어 있고 나머지는 3개는 각설골과, 마지막 1개는 상설골에 부착되어 있다. 미설골은 삼각형 모양으로 전방으로 인대에 의해서 복하설골에 연결되어 있다. 전방 좌우와 상단에 돌기가 있다.

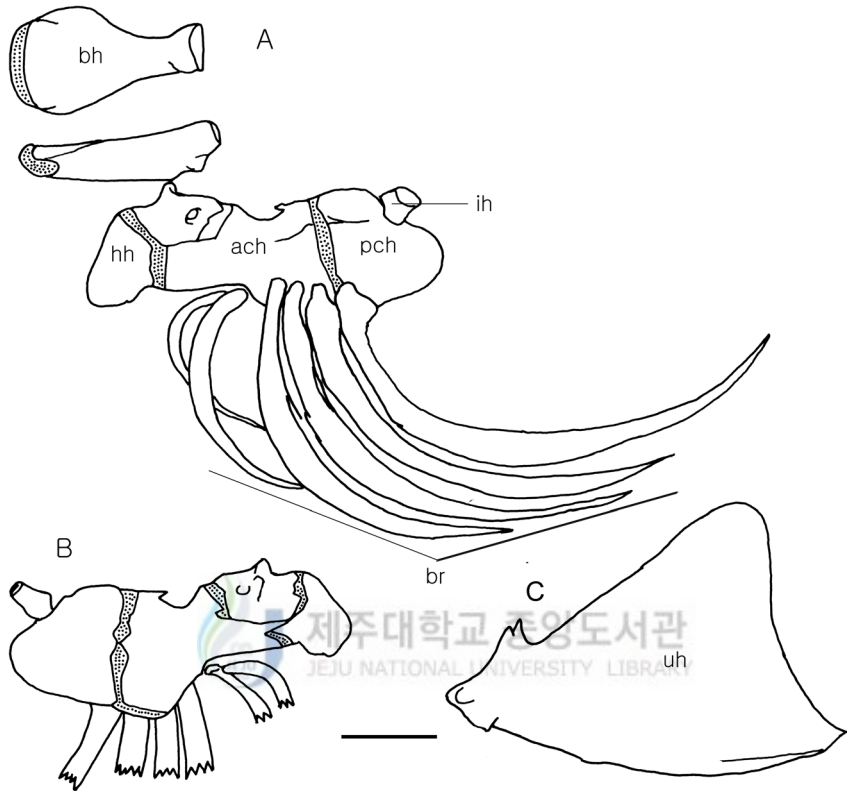


Fig. 30. Hyoid arch of *Premnas biaculeatus*, MRIC 2478. A, dorsal and lateral view of basihyal and lateral view of left component of hyoid arch, except for urohyal, B, medial view of A, C, lateral view of urohyal. ach, ceratohyal; bh, basihyal; br, branchiostegal ray; hh, hypohyal; ih, interhyal; pch, epihyal; uh, urohyal. Scale bar=1 mm.

(6) 새궁(Branchial arch)

새궁은 기새골(basibranchial), 하새골(hypobranchial), 각새골(ceratobranchial), 상새골(epibranchial), 그리고 인새골(pharyngobranchial)로 구성되어 있다 (Fig. 31, 32).

기새골은 모두 4개로 새궁 저부의 정중선상에 늘어서 있다. 제1-3기새골은 경골이며 차례로 연결되어 있지만, 제4기새골은 연골이며 제3기새골과 떨어져서 하새골에 둘러싸여 있다. 제 1기새골은 그 선단이 뾰족하고 인설골 아래에 위치한다. 제3기새골의 후단은 연골로서 제3하새골 아래에 위치한다. 하새골은 모두 3개로 제1, 2하새골은 짧은 판상이며, 각각 제2기새골-제1각새골, 제2-3기새골-제2각새골 사이에 위치한다. 제3하새골은 전하방으로 길게 돌출되어 있으며 그 선단이 제2하새골 아래에 위치한다. 제1,2하새골에도 복측으로 돌출된 돌기가 있으나 뾰족하거나 짧다. 각새골은 모두 5개로 제1-4각새골은 긴 막대모양이고 제5각새골은 좌우 융합되어 있으며 많은 이빨이 있다. 제5각새골의 전단은 뾰족하며 다른 골편으로부터 떨어져 있고, 그 대신 가늘고 긴 인대에 의해서 제3하새골의 복면에 연결된다. 또한, 복면에는 좌우 돌기가 발달되어 있다. 상새골은 모두 4개로 그 모양이 각각 다르며 인새골과 각새골사이에 위치한다. 제1상새골은 분지되어 한 쪽은 제1인새골과, 다른 한 쪽은 interarcual cartilage를 사이에 두고 제2인새골과 연결된다. 제 3-4상새골은 각각 중앙부가 돌출되어 서로 부착되어 있다. 인새골은 모두 3개로 상새골과 함께 새궁의 천정부를 차지한다. 제1인새골은 막대모양이며 제2, 3인새골과 분리되어 있다. 제2, 3인새골은 연골을 사이에 두고 서로 부착되어 있으며, 복측에 각각 치판이 발달되어 있다.

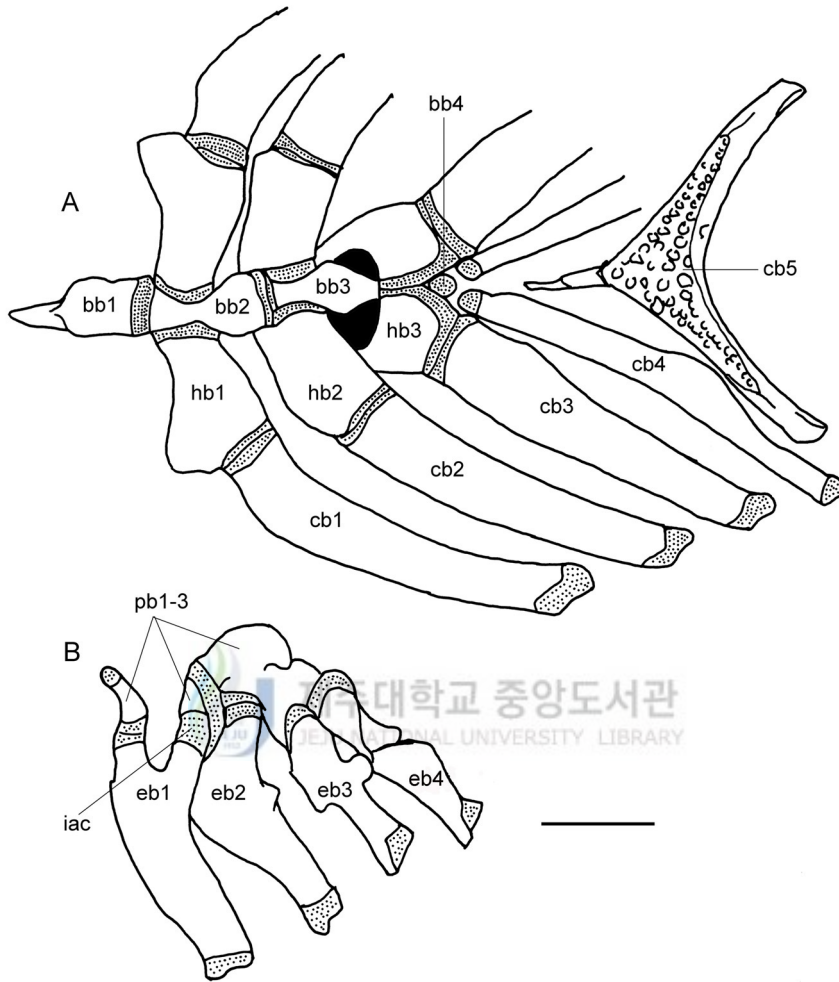


Fig. 31. Dorsal view of lower component (A) and upper component (B) of branchial arch in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2857. bb, basibranchial; cb, ceratobranchial; eb, epibranchial; hb, hypobranchial; iac, interarcual cartilage; pb, pharyngobranchial. Scale bar=1 mm.

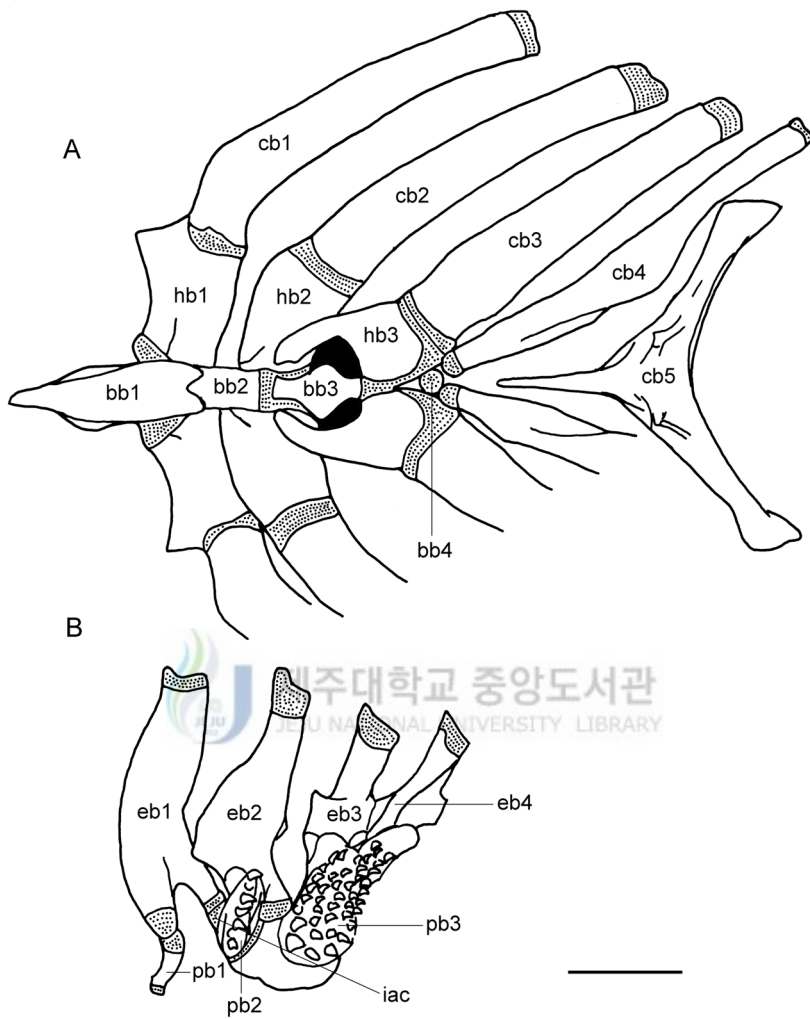


Fig. 32. Ventral view of lower component (A) and upper component (B) of branchial arch in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2857. bb, basibranchial; cb, ceratobranchial; eb, epibranchial; hb, hypobranchial; iac, interarcual cartilage; pb, pharyngobranchial. Scale bar=1 mm.

(7) 견대(Pectoral girdle)

견대는 가슴지느러미를 지지하는 골격으로 상측두골(supratemporal), 후측두골(posttemporal), 상쇄골(supracleithrum), 쇄골(cleithrum), 견갑골(scapula), 오혜골(coracoid), 사출골(actinost), 후쇄골(postcleithrum)로 구성되어 있다(Fig. 33).

상측두골은 Y자형으로 후측두골에 연결된다. 후측두골은 V자형으로 상부가지는 결합조직에 의해서 상이골에 강하게 부착되고, 하부가지는 인대에 의해서 익이골에 연결된다. 상쇄골은 길쭉한 판상으로 상단으로 후측두골에, 하단 내측으로 쇄골상단에 부착된다. 쇄골은 견대에서 가장 큰 골편으로 상부로는 상쇄골과, 하부내측으로는 반대쪽 쇄골과, 후방으로 견갑골과 오혜골에 접한다. 쇄골의 전단 하부는 방패모양으로 확장되어 있다. 견갑골은 중앙에 1개의 견갑골공(scapular foramen)이 있으며, 얇은 연골대를 사이로 하방으로 오혜골과 접하며 후방으로는 3개의 사출골과 관절한다. 오혜골은 하부 전후로 길게 신장되어 전단에는 연골껍이 있으며, 후단으로는 제일 하단의 사출골에 인접한다. 사출골은 모두 4개로 짧은 막대모양이며 양끝이 연골로 되어 있고, 특히 제일 하단의 사출골은 확장되어 있다. 전방으로는 오혜골 및 견갑골-오구골 연골대, 후방으로는 가슴지느러미 기초의 기부에 관절한다. 후쇄골은 모두 2개로 상부 후쇄골은 쇄골 상후단 내측에 강하게 부착되는 판상골편이다. 하부 후쇄골은 가늘고 긴 막대모양의 골편으로 상부 후쇄골의 하부 내측에 부착되어 있으며 그 하단부는 뾰족하다.

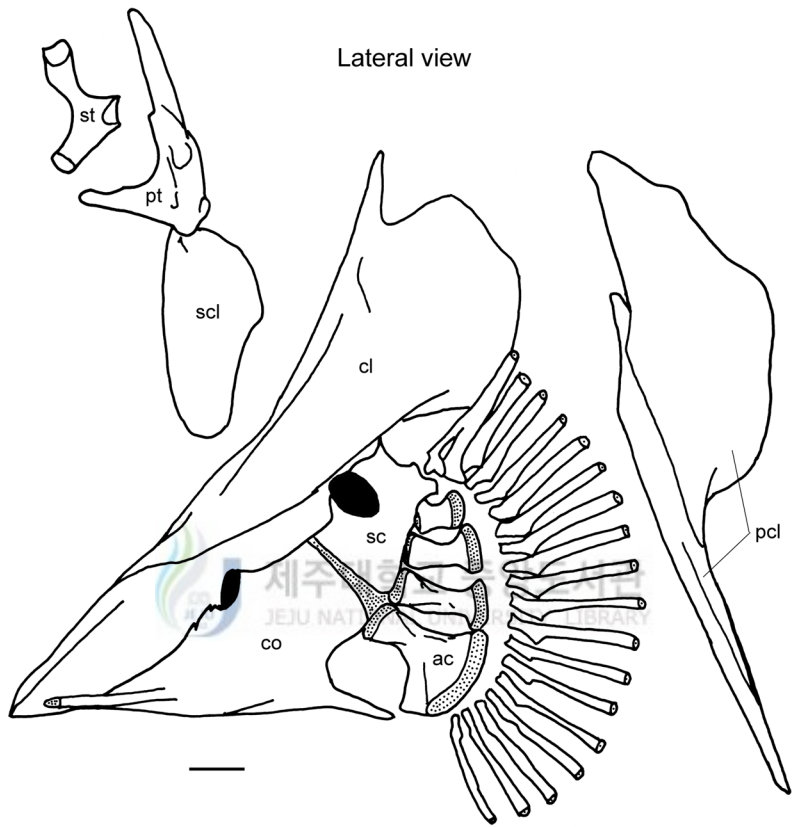


Fig. 33. Pectoral girdle in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2857. ac, actinost; cl, cleithrum; co, coracoid; pcl, postcleithrum; pt, posttemporal; sc, scapula; scl, supracleithrum; st, supratemporal. Scale bar=1 mm.

(8) 요대(Pelvic girdle)

요대는 좌우 한 쌍의 요골(basipterygia)로 이루어져 있으며 배지느러미를 지지한다(Fig. 34).

요골은 삼각형 골편으로 전단 측방으로 쇄골의 내측에 결합조직에 의해서 부착된다. 후단으로는 배지느러미 기조과 관절한다. 요골 복면에 미약한 subpelvic keel과 subpelvic process가 있다. 요골 전단부는 세장하며 반대쪽 요골과 분리되어 V자형을 이룬다.



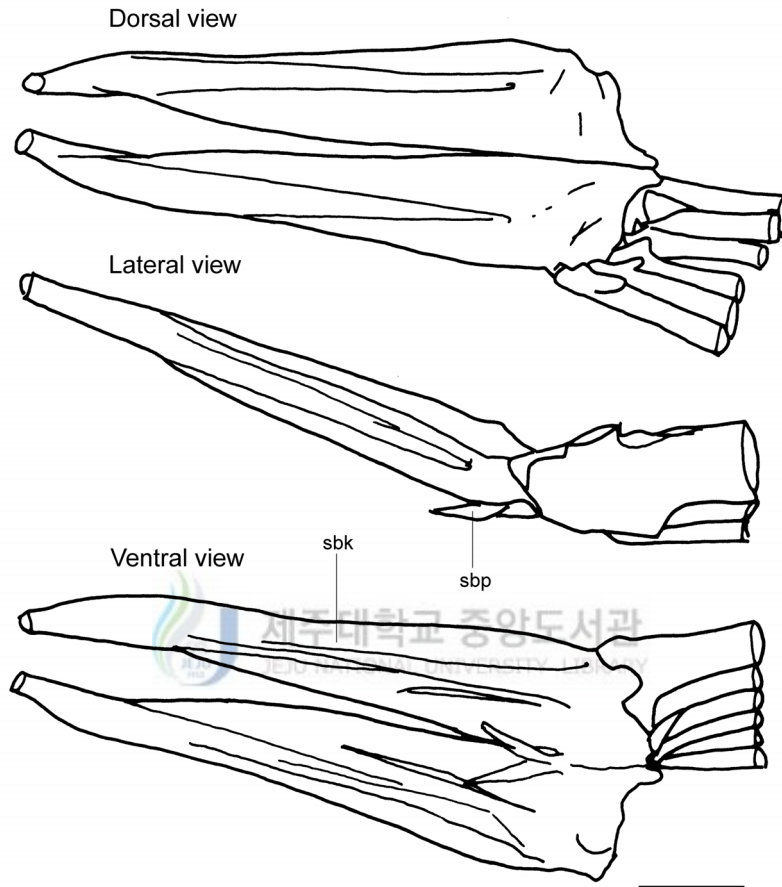


Fig. 34. Pelvic girdle in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2478. Pelvic fin rays on left side removed. sbk, subpelvic keel; sbp, subpelvic process. Scale bar=1 mm.

(9) 미골격(Caudal skeleton)

미골은 제2-3미전추체(preural centrum) 및 각각의 신경극과 혈관극, 상미축골(epural), 미신경극-미부봉상골-하미축골 복합체, 준하미축골-하미축골 복합체, 하미축골로 구성되어 있다(Fig. 35).

제3미전추체의 신경극은 잘 발달되어 있으며 혈관극은 추체와 유합하지 않는다. 제2미전추체의 신경극은 짧고 넓으며, 혈관극은 추체와 유합하지 않는다. 상미골은 미신경극 상부에 위치하며 막대모양으로 모두 3개이다. 미신경극은 미부봉상골과 유합되어 있으며, 후방으로 유합된 하미축골 3+4에 다시 유합되어 미신경극-미부봉상골-하미축골3+4 복합체를 형성한다. 준하미축골은 유합된 하미축골 1+2와 불완전 유합하고, 전상방에 돌출된 hypurapophysis가 있다. 상미골 후하단부에 작은 막대모양의 제5하미축골이 있다.

(10) 중축골격(Axial skeleton) 및 수직지느러미 지지골격(median fin supports)

중축골격은 척추골(vertebra), 상능골(epipleural), 그리고 능골(pleural)로 구성되어 있고, 수직지느러미 지지골격은 신경간극(supraneural), 근위담기골(proximal pterygiophore), 원위담기골(distal pterygiophore), 그리고 stay 로 구성되어 있다(Fig. 36).

척추골은 복추골(abdomial)과 미추골(caudal)로 나눌 수 있다. 복추골은 모두 10개로, 제1-10척추골까지이며 추체의 상부에 신경돌기(neural spine)와 신경궁문(neural arch)이 있다. 제2척추골부터 추체의 측방에 측돌기(parapophysis)가 있으며, 뒤로 갈수록 점점 발달하여 제11척추골에서는 좌우 측돌기가 유합하여 혈도궁문을 형성한다. 미추골은 모두 16개로, 제11척추골부터 미골까지이며 복측으로 혈관돌기(haemal spine)과 혈관극(haemal arch)이 있다.

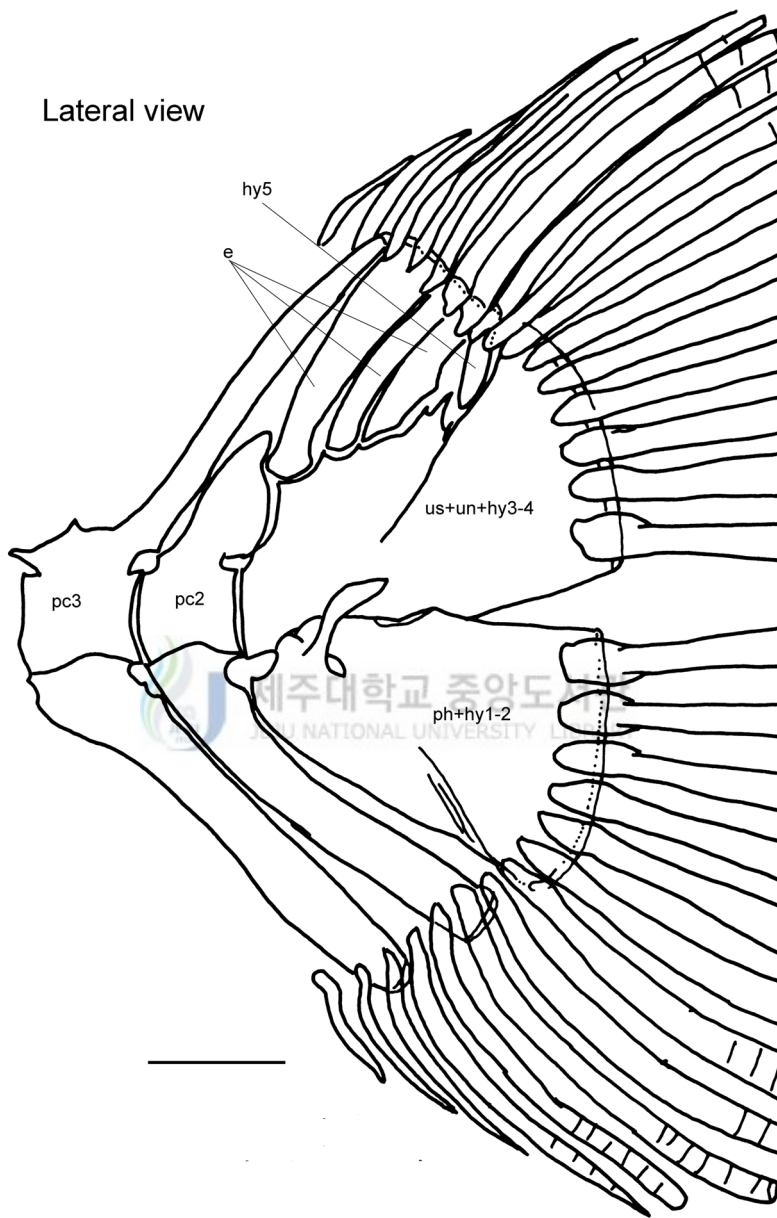


Fig. 35. Caudal skeleton in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2478. e, epural; hy, hypural; pc, preural centrum; ph, parhypural; un, uroneural; us, urostyle. Scale bar=1 mm.

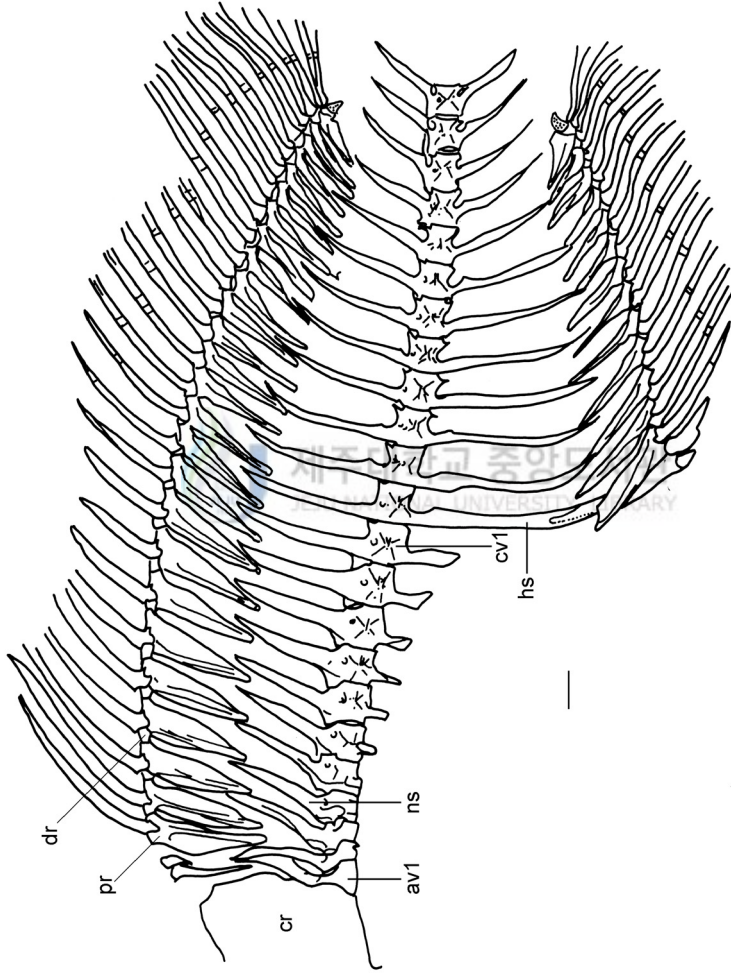


Fig. 36. Lateral view of axial skeleton including median fin supports, except caudal skeleton in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2478. av1, 1st abdominal vertebra; cv1, 1st caudal vertebra; cr, neuro cranium; dr, distal pterygiophore; hs, haemal spine; ns, neural spine; pr, proximal pterygiophore. Scale bar=1 mm.

상늑골은 모두 12개로 가늘고 길며, 제1-12척추골의 측돌기에 부착되어 있다. 늑골은 모두 8개로 긴 칼모양이며, 제3-10척추골의 측돌기에 부착되어 있다.

신경간극은 1-2개로 하단부가 뾰족한 막대모양의 골편으로, 후측두골과 등지느러미 제1 근위담기골 사이에 위치한다. 등지느러미를 지지하는 담기골은 모두 26개로, 하방으로는 신경극 사이에 삽입되어 있고, 상방으로는 등지느러미 기조와 관절한다. 근위담기골은 삼각형이며 그 상후단에 짧은 판상 또는 막대모양의 원위담기골이 부착 또는 관절한다. 등지느러미 제9 극조까지를 지지하는 근위담기골은 원위담기골과 부착되어 있으며, 등지느러미 제10극조를 지지하는 근위담기골부터는 후단부가 연골로 되어 있고 각 기조 기저부 내측에 있는 원위담기골과 관절한다. 마지막 등지느러미 기조를 지지하는 근위 담기골의 후단에는 작은 삼각형 모양의 stay가 부착한다. 뒷지느러미 제1극조를 지지하는 원위담기골은 모두 13개로 모양은 등지느러미의 경우와 유사하다. 최전방의 근위담기골은 3개의 기조를 지지하는데, 전방의 2개는 극조이며 마지막 것은 연조이다. 뒷지느러미 제2연조를 지지하는 근위담기골 후단은 연골로 되어 있으며 원위담기골과 관절한다. 최후방 근위담기골 후단에는 삼각형의 stay가 있다.

2) 골학적 특징

이 실험에서 관찰된 *P. biaculeatus*의 골격계의 특징과 자매군으로 알려진 *Amphiprion*속 어류와 비교를 통해 *Premnas*속에서는 누골 및 안하골과 새개부에서 *Amphiprion*속과는 다른 다음의 3가지 특징이 관찰되었다.

(1) 누골 후하연의 가지

*P. biaculeatus*는 누골의 후하방에 1개의 긴 가시가 잘 발달 되어 있는데 비해, 관찰한 *Amphiprion*속 어류에서는 *A. polymnus*를 제외하고 누골 후하방에 2개 이상의 짧은 가시가 있다. *A. polymnus*에서는 누골에 1개의 가시가 있지만 짧다. 단, *P. biaculeatus*의 종묘생산 된 소형 개체에서는 누골의 가시가 짧고 몽푼하였다(Fig. 37).

(2) 제1안하골의 가지

*P. biaculeatus*는 제1안하골의 외연부에 누골과 같이 1개의 긴 가시가 있는데(Fig. 27) 비해, 관찰한 *Amphiprion*속 어류에서는 2개 이상의 짧은 가시가 있다(Fig. 37). 특히, *A. periderarion*에서는 제1안하골이 누골과 융합되어 있으며, 외연부에 8개의 짧은 가시가 있다. 단, *P. biaculeatus*의 종묘생산 된 소형 개체에서는 일부 안하골이 없기도 하였다.

(3) 주새개골, 하새개골 및 간새개골의 가지

*P. biaculeatus*는 주새개골과 간새개골 후연에 가시의 발달이 저조(가시의 수가 3개 이하)하고 하새개골의 경우 하반부에 제한되어 가시가 나타나는데 비해, 관찰한 *Amphiprion*속 어류에서는 새개부의 외연부에 가시가 잘 발달되어 있다(Fig. 38).

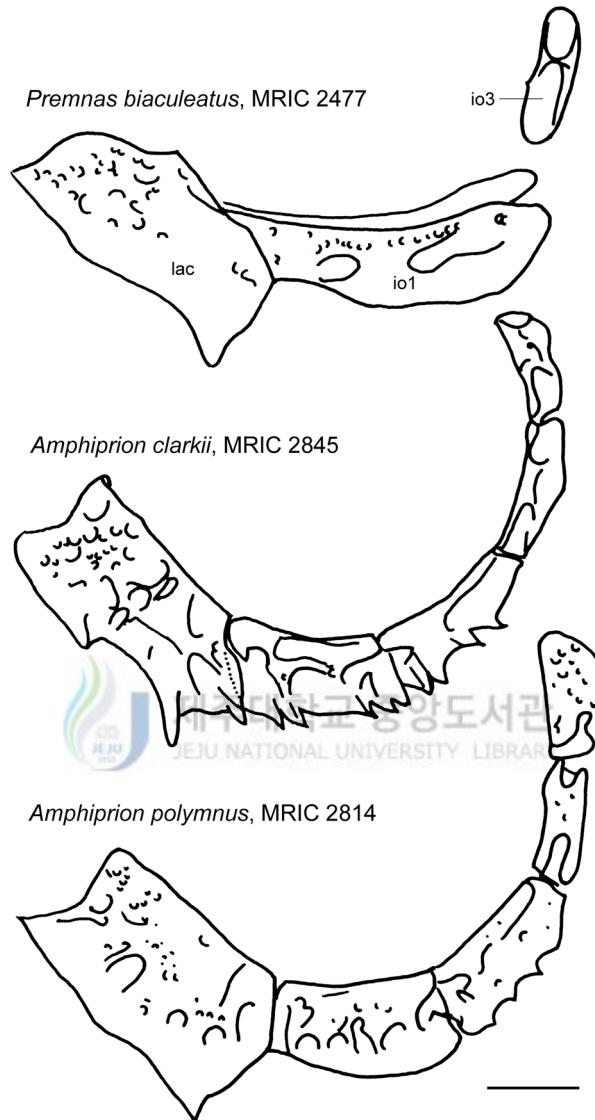
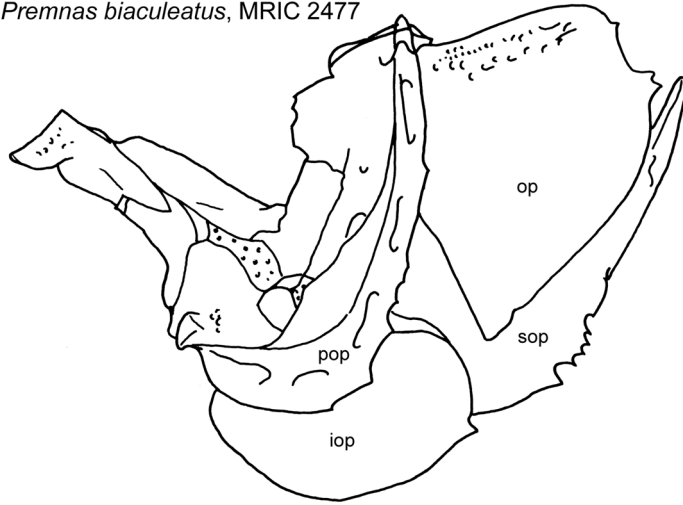


Fig. 37. Lateral view of circumorbital bones. lac, lacrimal; io, infraorbital.

Scale bar=1 mm.

Premnas biaculeatus, MRIC 2477



Amphiprion clarkii, MRIC 2845

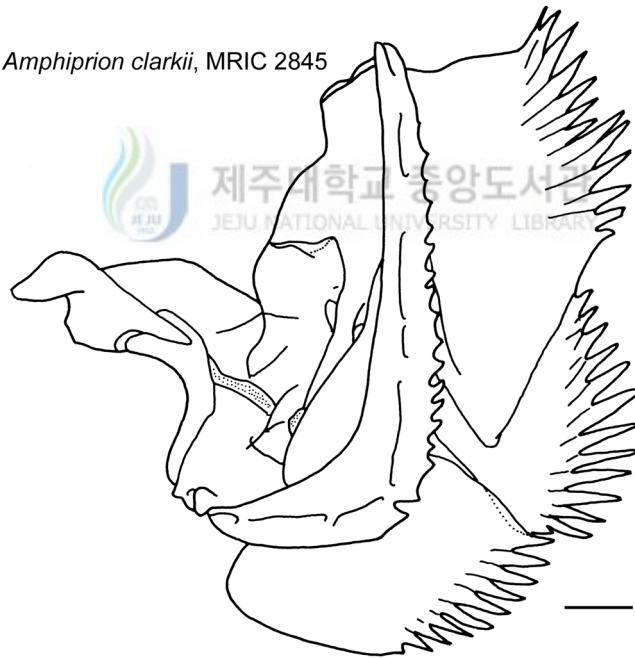


Fig. 38. Lateral view of suspensorium and opercula apparatus. pop, preopercle; op, opercle; sop, subopercle; iop, interopercle. Scale bar=1 mm.

IV. 고 찰

1. 산란, 부화 및 자치어 사육

Clownfish는 일반적으로 암컷이 사망할 때까지 일부일처를 유지하지만, 일부 종에서는 일부다처 현상도 보고되고 있다(Hoff, 1996). Sebae clownfish, *A. clarkii*는 한 쌍의 지배계급과 2-3마리의 부 지배계급이 공동 생활하지만 생식 활동에는 지배계급만 참여한다(Moyer and Bell, 1976). 또한 clownfish의 수컷은 암컷에 비하여 크기가 작다(Fautin and Allen, 1992).

이 실험에서 maroon clownfish는 크기가 비슷한 개체를 수용한 결과 심한 몸싸움으로 짝짓기가 이루어지지 않았으나, 전장이 1/2 정도 되는 개체를 수용하였을 경우에는 작은 쪽이 큰 쪽에 순종하면서 짝짓기가 순조롭게 이루어졌다. 한 번 짝이 이루어진 쌍은 항상 같이 행동하였으며, 이는 saddleback clownfish의 짝짓기 과정과 유사하였다(Yoon, 2004).

산란기에 들어간 흰동가리류는 일반적으로 자연에서나 인위적인 사육조 안에서나 산란상에 붙어 있는 조류 등 불순물을 제거하고, 꼬리지느러미나 입을 이용하여 산란상 주변의 모래를 쓸어버리는 행동을 보인다. 그리고 머리를 움직이거나 때때로 몸을 건드리는 구애습성을 보이기도 하고 암컷이 수컷에 비하여 공격적이다(Moyer and Bell, 1976; Suzuki and Takamatsu, 1989; Hoff, 1996; Wilkerson, 1998; Stratton, 2000). Saddleback clownfish도 다른 흰동가리류의 산란행동과 유사하였으며 특히 산란장소를 준비하기 위하여 암컷이 더욱 적극성을 보여 자신의 몸보다 큰 PVC shelter를 옮겼다(Yoon *et al.*, 2005). 이 실험에 이용된 maroon clownfish도 다른 흰동가

리류와 마찬가지로 산란시기가 가까워지자 산란상으로 제공한 타일(15×15 cm) 주변을 입과 꼬리지느러미를 이용하여 깨끗하게 청소하고 타일 위치를 입으로 이동시키기도 하였다.

흰동가리류의 산란 후 알 관리는 암컷에 비해 수컷이 관리하는 시간이 길며 외부 포식자로부터 알을 지킨다. 어미들은 가슴지느러미를 이용하여 알에 산소를 공급하여 준다. 그리고 난 발생과정 중에 정지된 알은 입으로 제거하여 곰팡이나 세균감염을 사전에 차단하였다(Suzuki and Takamatsu, 1989; Wilkerson, 1998; Kim *et al.*, 2001b; Yoon *et al.*, 2005). Maroon clownfish도 다른 흰동가리류와 마찬가지로 산란 후에 암컷과 수컷이 번갈아가면서 알을 보호하는 행동을 보이며 특히 수컷은 먹이도 잘 먹지 않으면서 계속해서 알을 보호하였다. 부화시기가 가까워지면서 어미들의 알 관리 시간이 늘어졌으며 알을 향하여 휘젓는 가슴지느러미의 부채질 운동도 활발해졌다. 이때 수류에 의한 충격으로 탈락되는 알이 많아졌으며 탈락되는 알을 어미들이 삼키는 행동이 관찰되었다.

Maroon clownfish는 약 18일 간격으로 1회 산란 때 2,000여개 정도의 알을 산란하는데 1회 산란 시 보통 1,500여개의 알을 낳고 산란은 연중 일어난다(Wilkerson, 1998). 다른 흰동가리류의 산란량을 보면 tomato clownfish 1,000개, ocellaris clownfish 250-1,190개, saddleback clownfish, 1,500-3,000개, orange skunk clownfish, *A. sandaracinos* 30-300개, 그리고 pink skunk clownfish, *A. perideraion*는 280-600개 정도의 알을 산란한다(Suzuki and Takamatsu, 1989). Saddleback clownfish의 종묘생산에 관한 연구에서 산란량은 1차 산란 시 103개였고 산란 횟수가 증가할수록 산란량이 많아져 7차 산란 시 1,257개로 증가하였다가 8차 산란 시에는 1,008개로 약간 감소하였다(Yoon *et al.*, 2005). 이처럼 maroon clownfish는 흰동가리류 중에서 대형종에 속하며 1회 산란량이 다른 흰동가리류에 비하여 많은 것으로 판단된다. 그러나

이는 사육환경이나 암컷과 수컷의 영양상태, 산란 횟수, 암컷과 수컷의 크기 차이 등에 의해서 좌우될 것으로 여겨진다.

Maroon clownfish의 산란은 보통 15시에서 20시 사이에 약 90분에서 120분에 걸쳐 진행되었다. Tomato clownfish는 12시-16시, saddleback clownfish 12시 30분-03시 30분, orange skunk clownfish 12시-16시 20분 사이에 산란한다 (Suzuki and Takamatsu, 1989). 그리고 sebae clownfish는 자연에서 산란 시간이 09시-15시 사이에 이루어진다(Moyer and Bell, 1976). 이처럼 maroon clownfish는 tomato clownfish, saddleback clownfish, orange skunk clownfish보다는 산란 시간이 늦었다. 또한 인공종묘생산에서 maroon clownfish의 산란은 일반적으로 오후 일찍 일어나고, sebae clownfish는 16시에서 18시, tomato clownfish는 오후 늦게 산란하며 percula clownfish는 저녁에 산란한다(Wilkerson, 1998). 이와 같이 흰동가리류의 산란은 어미의 크기, 수온, 산란 횟수 등에 의해 변동이 되지만 일반적으로 산란은 오후에 일어나는 것으로 판단된다.

흰동가리류를 부화시키는데 있어서 어미가 알을 포식하거나 보통 야간에 부화함에 따라 관리가 불편하기 때문에 효율적이고 간편한 부화기에 대해 필요성이 높다. Hoff (1996)의 aeration법은 간편하게 만들 수는 있으나 어미가 알을 관리하는 정도의 수류를 자유자재로 만들어 줄 수가 없어 자체적으로 부화기를 개발하게 되었다. 자체개발한 부화기는 순환펌프를 이용하여 수면 위에서 해수를 일정하게 공급해 줄 수 있고 또한 해수의 량도 자유자재로 조절해 줄 수 있기 때문에 어미가 관리하는 것과 비슷한 효과를 낼 수가 있었다.

Maroon clownfish의 수정란은 타원형이고 난경이 장경 1.95-2.01 mm이며 부착사에 의하여 산란기질에 부착하는 침성부착란이다. 이는 Suzuki와 Takamatsu (1989)가 보고한 이 종의 난경이 장경 1.86-1.98 mm라고 한 것과

거의 비슷한 결과였다. 그리고 흰동가리류인 tomato clownfish 2.6-2.9 mm, ocellaris clownfish 2.2-2.4 mm, saddleback clownfish 2.2-2.4 mm 보다는 조금 작았고, orange skunk clownfish 2.0-2.2 mm, pink skunk clownfish 2.0-2.1 mm와는 크기가 비슷하였다. 그리고 maroon clownfish의 수정란 장경은 침성부착란을 가지는 다른 해산어류 중에서 수정란의 크기가 꼼치, *Liparis tanakai* 1.68-1.78 mm (Kim *et al.*, 1986)와 두줄망둑, *Tridentiger trionocephalus* 1.40-1.58 mm (Kim and Han, 1990), 모치망둑, *Mugilogobius abei* 0.93-0.96 mm (Kim and Han, 1991), 흰점독가시치, *Siganus canaliculatus* 0.55-0.62 mm (Hwang, 1999), 연무자리돔, *Chromis fumea* 0.73-0.88 mm (Kim *et al.*, 2001b)보다는 크고, 똑지, *Aptocyclus ventricosus* 2.28-2.36 mm (Kim *et al.*, 1987)와 미끈날망둑, *Chaenogobius laevis* 3.40-4.04 mm (Kim and Han, 1989), 미끈망둑, *Luciogobius guttatus* 2.71-2.80 mm (Kim *et al.*, 1992), 쥐노래미, *Hexagrammos otakii* 2.00-2.15 mm (Kim *et al.*, 1993)보다는 작았다.

흰동가리류의 산란 직후 알 색깔은 종에 따라 차이가 있는데 saddleback clownfish는 선홍색, tomato clownfish는 붉은색, ocellaris clownfish는 노란색, pink skunk clownfish는 핑크색 그리고 sebae clownfish는 주황색 또는 노란색이다(Yoon *et al.*, 2005). Maroon clownfish의 산란 직후 알 색깔은 진홍색(Wilkerson, 1998)으로 이전 연구와 동일하였다. 알 색깔은 동일종이라 하더라도 어미의 영양 상태에 따라 달라지는데 영양상태가 안 좋을수록 알 색은 연하게 나타나고 영양상태가 좋을수록 알 색깔이 진하다(Wilkerson, 1998). 또한 알 색깔은 발생이 진행될수록 변한다(Hoff, 1996; Wilkerson, 1998; Yoon *et al.*, 2005). 이 연구에서도 산란 직후 진홍색이었다가 점차 알 색깔이 진해지면서 산란 후 3일째에는 검붉은 색이 되었다. 그리고 부화 직전에는 눈이 은백색으로 반짝거리는 것이 확인되어 부화시기를 예측할 수가 있었다.

Maroon clownfish 부화에 소요된 시간은 수온 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 120-150시간이 걸렸다. 이는 이전의 연구에서 사육수온 $26.6-29.5^\circ\text{C}$ 일 때 최초 부화에 소요된 시간이 152시간 30분 이었던 것보다 30여 시간이 빠른 결과였다 (Suzuki and Takamatsu, 1989). 수온 $26.0-28.0^\circ\text{C}$ 일 때 흰동가리류가 수정된 후 부화하는데 까지 걸리는 시간이 maroon clownfish와 sebae clownfish는 6일, *A. akallopisos*와 saddleback clownfish는 7일, red saddleback clownfish, *A. ephippium*과 ocellaris clownfish, percula clownfish는 8일 그리고 tomato clownfish와 red and black clownfish, *A. melanopus*는 9일 정도가 소요된다(Hoff, 1996). 그리고 이전 연구에서는 최초 부화 후 1시간 이내에 전 자어의 부화가 완료된 반면에(Suzuki and Takamatsu, 1989) 이 연구에서는 30 시간 정도의 시간이 소요되었다. 또한 일부 개체에서 난막을 완전하게 제거하지 못하고 산란기질에서 떨어진 경우가 있었는데 난막을 인위적으로 제거해 주면 정상적으로 유명하였다.

Maroon clownfish의 난발생 중 흑색소포의 출현 시기는 수정 후 32시간 20분이 경과한 후이고 출현한 위치는 난황 윗부분 이었다. 이전 연구에서는 수정된 후 27시간이 지나서 안구 후방과 난황 위에 흑색소포가 출현했다고 하였는데(Suzuki and Takamatsu, 1989) 이보다 5시간 정도 늦게 출현하였다. 그리고 ocellaris clownfish는 수정 후 28시간, saddleback clownfish 수정 후 35시간, pink skunk clownfish 수정 후 30시간, orange skunk clownfish는 수정 후 78시간이 지나서 흑색소포가 최초로 발견되었는데(Suzuki and Takamatsu, 1989), maroon clownfish는 ocellaris clownfish 보다는 늦게 발견되었고 saddleback clownfish와 pink skunk clownfish와는 비슷하게 발견되었다. 그리고 orange skunk clownfish 보다는 46시간 정도 빨리 출현하였다.

부화 직후 maroon clownfish의 자어 전장은 3.1-3.4 mm로 이 종의 부화 직후 자어 전장이 3.7-4.2 mm라는 연구(Suzuki and Takamatsu, 1989)에 비해서는 약 0.6-0.8 mm정도 작았다. 그리고 tomato clownfish 4.2-4.5 mm, ocellaris clownfish 4.4-4.7 mm, saddleback clownfish 4.2 mm, orange skunk clownfish 3.7-3.9 mm보다는 작았고 pink skunk clownfish 3.2 mm와 비슷한 크기였다.

부화 후 12일째 maroon clownfish 치어(전장 6.2-7.6 mm)들이 수조에서 떼를 지어 수영하는 것이 확인되었는데, 부화 후 9일째 치어(전장 5.6-6.4 mm)에서 상호간에 군집성을 보이기 시작하여 부화 후 18일이 경과하여 전장 7.9-10.5 mm가 되었을 때 군집성이 나타났다는 연구(Suzuki and Takamatsu, 1989)와 비슷한 경향을 보였다. 그리고 ocellaris clownfish는 부화 후 10일이 경과되어 전장이 6.0-8.5 mm가 되어 초기 치어기에 들어갔을 때 군집성을 보이며 saddleback clownfish는 부화 15-20일 후(전장 11.5-14.3 mm)에 저층에서 중층으로 군집 수영한다. 그리고 orange skunk clownfish는 부화 10일 후 전장 6.6-7.7 mm가 되었을 때 수조 벽면에 무리를 짓는다(Suzuki and Takamatsu, 1989). 이처럼 초기치어기에 군집성을 보이는 것은 흰동가리류의 일반적인 특징으로 여겨진다.

부화 후 15일이 경과한 후 maroon clownfish가 전장 7.4-9.0 mm로 성장했을 때 3개의 백색 가로띠가 모두 출현하였다. 이는 부화 후 15-20일이 경과한 후에 전장 8.7 mm의 개체에서 3번째 백색 가로띠가 출현했던 결과와 비슷하였다(Suzuki and Takamatsu, 1989). 이 시기가 지나면 maroon clownfish 치어에서 폐사 개체가 거의 나타나지 않았다.

부화 후 45일이 된 maroon clownfish 치어가 전장 13.6-19.4 mm 정도로 성장한 후부터는 서로 머리를 맞대고 싸우는 개체들이 생겨났다. 이는 영역확보에 민감한 clownfish 종의 특징으로 maroon clownfish의 경우 말미잘

류인 *Entacmaea quadricolour*에 1쌍 만이 서식하며 다른 개체의 접근을 허용하지 않는다. 또한 clownfish는 수컷보다 암컷이 영역확보에 더욱 민감하여 다른 어류에 대해 매우 공격적이다(Srinivasan *et al.*, 1999). 그리고 다른 연구에서도 부화 후 40-60일이 지난 maroon clownfish 치어가 전장 11.0-17.0 mm 정도로 성장한 때부터 수조 전체에 흩어져 유영하고 치어 상호간에 1:1 투쟁이 시작되었고, tomato clownfish는 부화 후 20일이 경과(전장 8.5-9.2 mm)된 후 저서생활을 하면서 치어 상호간에 입으로 충돌하기 시작하였다. 그러나 orange skunk clownfish는 부화 후 170일이 경과하여 전장이 40 mm에 달하여도 개체 간에 충돌이 일어나지 않았다(Suzuki and Takamatsu, 1989).

부화 후 50일이 지난 후에도 가운데 백색 가로띠가 기형인 치어들이 4회째 부화부터 7회째 부화까지 평균 35.9% 나타났다. 특히 7회째 부화되어 성장한 치어인 경우에 한 면만 기형인 개체가 4회부터 6회까지 부화하여 성장한 치어들 보다 11.0% 정도 많이 출현하였다. 7회째 부화된 치어인 경우 기형 개체가 43.0%를 차지하여 거의 반 수 가까이가 비정상적인 가로띠를 가진 개체였다. Clownfish의 가로띠 기형은 변태의 지연이나 수질악화에 의해서 생기며, 변태기간이 긴 *sebae* clownfish 종묘생산 시 자주 발생한다(Hoff, 1996). 또한 골격기형의 원인은 여러 요인이 있겠으나, 현재까지 알려진 바에 의하면 Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*의 유생과 치어의 종묘생산 시 변태과정 중 발생하는 골격기형은 영양과 환경의 영향이고(Lewis *et al.*, 2004), 넙치, *P. olivaceus* 유생의 골격기형은 비타민A 화합물의 독성에 의해서 발생하며(Takeuchi *et al.*, 1998), 비타민 A 유도체인 레티노산(retinoic acid)이 턱 기형의 원인 물질로 작용 된다(Haga *et al.*, 2003). 이 연구에서 종묘생산 된 maroon clownfish 치어인 경우 체색기형 뿐만 아니라 일부 개체에서 골격기형이 함께 나타났는데 이에 대한 원인은 변태지연

이나 영양문제인 것으로 추측되며 정확한 원인을 밝히기 위해서는 지속적인 연구가 요구된다.

2. 인공 종묘생산

어류에 있어 염분은 대사활동, 삼투조절 및 생체리듬 등에 영향을 주며 (Kang *et al.*, 2004), 종묘생산 과정 중에 자어의 성장과 생존률 뿐만 아니라 부화율, 자어의 활력, 난황흡수, 먹이효율 등에 영향을 준다(Holliday, 1969).

넙치, *P. olivaceus* 난 및 자치어의 염분내성에 관한 연구에서 전장 20 mm 정도의 치어는 염분 20.0 psu 이상의 갑작스런 변화에서는 1-3일 사이에 폐사하였으나, 단계적으로 적응시키면 14.1 psu까지도 생존하였으며(Chun and Rho, 1991), 자주복, *Takifugi rubripes*도 부화 직후 자어는 27.0 psu, 33.0 psu에서 70% 이상 생존하였고, 부화 후 10일째에는 20.0 psu 이상의 염분에서 64.8%이상 생존하였으며 부화 후 20일째 89.2%, 부화 후 30일째에는 3.5 psu에서도 92.8%가 생존하였다(Go and Rho, 1996). 또한 saddleback clownfish의 산란과 부화유생 사육에 관한 연구에서 실험초기 32.0 psu에서 일주일당 5.0 psu씩 내린 실험구에서는 22.0 psu에서 모든 개체가 폐사되었으나, 3일에 2.0 psu씩 내린 실험구에서는 16.0 psu에서 폐사되어 이 종은 25.0 psu 내외에서 안정적인 사육이 가능할 것으로 여겨지고(Yoon, 2004), 다른 연구에서도 clownfish는 사육수의 염분이 27.0 psu 내외일 때에는 산란과 성장에 아무런 영향이 없었다(Hoff, 1996).

이 연구에서 부화 후 8일째 까지 염분별 자어의 생존율을 보면 수온 26.5±0.5℃에서 염분 15.0 psu와 20.0 psu에서는 부화 후 4일째와 5일째 생존율이 50% 이하로 떨어졌고, 염분 25.0, 30.0, 33.0 psu에서는 부화 후 7일째

생존율이 50% 이하로 떨어졌다. 그리고 염분 35.0 psu에서는 부화 후 8일째 생존율이 50%이하로 떨어졌다. 이처럼 염분이 25.0-33.0 psu인 경우 maroon clownfish 자어의 생존율은 비슷하였다.

해수관상어에 대한 저염분 사육은 관상수조의 유지 관리 비용을 줄일 수 있고 해산 세균이나 기생충의 피해를 줄일 수 있다는 측면에서 매우 중요한 요소이다(Yoon, 2004). 따라서 저염분에서 사육이 가능한지 여부를 알아보기 위하여 저염분으로 인한 생리적 장애와 이에 따른 어병 발생 유무, 그리고 산란 과정에서의 문제점 등 이에 대한 세부적이고 체계적인 연구가 요구된다.

건강한 해산어류 종묘생산을 방해하는 결정적인 요소 중 하나가 난황흡수 시기와 첫 번째 먹이를 먹을 동안의 높은 폐사율이다(Tagawa *et al.*, 2004). 또한 해산어류의 난황은 자어의 성장 및 대사 활동에 이용되기 때문에 큰 난황을 가진 자어가 작은 난황을 가진 자어에 비해 생존 기간이 훨씬 높다(Johns and Howell, 1980). 또한 붉바리, *Epinephelus akaara* 자어의 경우 난황 및 유구의 흔적이 존재하는 부화 후 60-72시간에 첫 먹이를 공급한 경우에는 자어의 생존률이 거의 일정하게 나타났으나 난황 및 유구가 완전히 소모된 부화 후 84시간째 첫 먹이를 공급하였을 때는 생존율이 60-72시간의 경우와 비교해 약 20-25%로 떨어졌다. 그리고 먹이를 공급하지 않은 실험구에서는 부화 후 72시간째에 생존율이 68.8%였으나 96시간째부터 자어의 사망률이 급격히 높아지기 시작하여 부화 후 120시간째에 전량 폐사하였다(Lee and Hur, 1997).

흰점독가시치, *S. canaliculatus*를 대상으로 무급이 상태에서 염분별 자어의 생존율 비교에서는 염분 15.0 psu 및 37.0 psu 실험구에서 부화 후 72시간 만에 전량 폐사하였으며 25.0 psu와 30.0 psu 실험구에서도 부화 후 계속적인 폐사로 84시간 만에 전량 폐사하였다. 생존율이 가장 높았던 35.0 psu 실험구도 부화 후 108시간 만에 전량 폐사하였다(Hwang, 1999).

또한 장갱이, *Stichaeus grigorjewi*를 굶졌을 때의 최대 생존 일수는 10.8℃에서 16.7일인 반면 19.8℃에서는 7.2일 동안 생존하여 수온이 낮을수록 생존기간이 길었다. 그리고 부화 자어의 체중 감소도 수온이 높을수록 빠른 것으로 나타났다(Lee, 1996). 이 실험에서 염분 15.0 psu에서는 부화 후 5일째, 20.0 psu에서는 부화 후 6일째 전개체가 폐사하였으며, 염분 25.0-33.0 psu에서는 부화 후 8일째 전개체가 폐사하여 maroon clownfish의 기아 시 염분별 자어의 생존율과 비슷하였다. 먹이를 공급한 실험구와 공급하지 않은 실험구의 생존율은 부화 후 4일째부터 차이를 보이기 시작하여 부화 후 6일째 염분 15.0 psu와 20.0 psu에서 무급이 실험구에서는 전량 폐사하였다. 그리고 먹이를 공급한 실험구에서는 28.0-42.7%의 생존율을 보였고 염분 25.0-33.0 psu에서는 무급이 실험구에서 11.1-20.0%의 생존율을 보였으며 먹이를 공급한 실험구에서는 52-58.7%의 생존율을 보였다. 또한 부화 후 8일째 무급이 실험구에서는 전량 폐사한 반면에 먹이를 공급한 실험구에서는 14.7-42.7%의 생존율을 보였다. Maroon clownfish 부화 자어는 부화 시에 입과 항문이 열려 있고 난황 흡수가 빨리 이루어지므로 부화 즉시 먹이를 공급해 주어야 할 것으로 보인다.

Shirota (1970)의 방법으로 계산한 부화 직후 maroon clownfish의 입 크기(d)는 0.38 mm였고 0.5d는 0.19 mm로 능성어, *E. septemfasciatus*의 입 크기(d) 0.21 mm, 0.5d 0.11 mm (Song, 2004b)보다 컸다. 또한 부화 후 72시간이 경과한 흰점독가시치 자어의 입 크기는 0.17-0.19 mm, 0.5d는 0.08-0.10 mm (Hwang, 1999)로 부화 직후 maroon clownfish의 입 크기가 컸다. 이처럼 maroon clownfish의 부화 직후 입이 크기 때문에 초기 먹이생물을 섭식 하는데 어려움이 없는 반면에 부화 직후 먹이를 공급하지 않았을 경우에는 폐사율이 높아졌다.

*Artemia nauplii*는 일반적으로 어류 종묘생산 과정 중에 로티피 다음

단계의 먹이 생물로서 유용하게 이용되고 있다(Hwang, 1999). 이 연구에서 maroon clownfish 치어는 *Artemia nauplii* 밀도가 높을수록 많은 양을 섭식하는 것이 확인되어 치어 1마리가 12시간 동안 섭식한 양은 평균전장 6.27 mm에서 45.2-75.5 개체였다. 그리고 평균전장 8.15 mm에서 233.3-445.2개체, 10.32 mm에서는 459.5-673.2 개체였다. 이는 흰점독가시치(Hwang, 1999), 감성돔(Lee and Rho, 1987), 넙치(Rho and Pyen, 1986) 보다는 많은 양이고 saddleback clownfish (Yoon, 2004)와는 비슷한 량이다.

해산어류 종묘생산에 있어서 양질의 먹이를 적당한 시기에 공급해 줄 수 있는지 여부는 매우 중요한 문제 중 하나이다. 일반적으로 부화 자어의 첫 먹이 섭식은 난황을 완전히 흡수하기 직전에 하기 때문에 부화 전에 미리 첫 먹이를 준비하고 자어가 성장함에 따라 먹이량과 크기를 조절하면서 공급해 주어야 한다. 해산어류 중에 넙치, *P. olivaceus* (Rho and Pyen, 1986), 돌돔, *Oplegnathus fasciatus* (Kumai, 1984) 등과 같이 부화 후 일정시간이 지난 후 입이 열리는 어종이 있는 반면에 쥐노래미, *Hexagrammos otakii* (Kim *et al.*, 1993), 장갱이, *S. grigorjewi* (Lee, 1996), saddleback clownfish (Yoon, 2004) 등과 같이 부화되면서 이미 입과 항문이 열려 있는 종도 있다. 이 연구에 이용된 maroon clownfish는 부화되면서 이미 입과 항문이 열려 있는 종에 속하며, 이러한 종들은 먹이 공급을 빨리 해 주어야 초기 감모를 줄일 수 있다. 그래서 부화 직후 자어를 사육수조에 옮긴 직 후 로티퍼를 공급하였더니 바로 섭식행동이 관찰되었다.

먹이 불임을 성공적으로 하기 위해서는 먹이를 공급하는 시간이나 먹이 주는 방법 등 여러 가지가 고려되어야 하겠지만 특히 적당한 크기의 먹이를 선택하는 것이 무엇보다도 중요하다. 일반적으로 해산어 종묘생산 시 먹이 계열은 로티퍼, *Artemia nauplii*, 배합사료 순으로 공급해 주고 있으나, 흰점독가시치, *S. canaliculatus* (Hwang, 1999)는 입이 작기 때문에 굴 유생과

소형 로티퍼를 이용하여 종묘생산 하였고, 자바리, *E. bruneus*는 종묘생산을 위하여 로티퍼만을 단독으로 공급하였다(Song *et al.*, 2005).

종묘생산 시 먹이생물 공급은 능성어류인 경우 *E. coioides*와 *E. suillus* 자어에 로티퍼만을 20,000개체/L의 밀도로 공급하였을 때 5일째 100% 섭이한 반면에(Duray, 1994), 5일된 *E. taurina* 자어의 대부분은 5,000개체/L의 로티퍼 밀도에서는 먹이를 섭취한 개체가 없었다(Randall and Heemstra, 1991). 그리고 종묘생산 시 *Artemia* nauplii의 섭식량을 보면 흰점독가시치는 부화 후 12일째 자어(평균 전장 7.0 ± 0.6 mm) 1마리가 12시간 동안 평균 43.5개체의 *Artemia* nauplii를 섭식하였다(Hwang, 1999). 장갱이는 부화 후 10일이 경과된 전장 9.8 mm 내외에서 최초 *Artemia* nauplii 섭식이 가능하였으나 초기에 *Artemia* nauplii 섭식량은 매우 적었고 주로 로티퍼를 섭식하였다(Lee, 1996). 그리고 범가자미, *Verasper variegatus*는 부화 후 16일째부터 *Artemia* nauplii를 공급하였다(Cho *et al.*, 1995). Hoff (1996)는 clownfish 유생 사육에 있어서 부화 6일 후부터 300-400 μ m의 *Artemia* nauplii를 공급하였고, Wilkerson (1998)은 clownfish 중 ocellaris clownfish는 4일째 *Artemia* nauplii를 공급하였으며 maroon clownfish와 sebae clownfish는 7-8일째 공급하였다. 그리고 Suzuki와 Takamatsu (1989)은 maroon clownfish의 경우 부화 후 8일째부터 로티퍼와 함께 *Artemia* nauplii를 공급하였고 부화 후 15일째부터 *Artemia* nauplii만 단독 급이하였다. 이 실험에 사용된 maroon clownfish는 부화 직후부터 200 μ m 내외의 로티퍼를 충분히 섭식하였고, 전장 5 mm 내외에서 *Artemia* nauplii를 섭식하는 것이 관찰 되었다. 이 실험에서는 부화 5일째에 *Artemia* nauplii를 공급하고 9일째와 20일째에 각각 *T. japonicus*와 배합사료를 공급한 A 실험구와 먹이 공급 시기를 하루씩 늘린 B 실험구(A+1일), 이틀씩 늘린 C 실험구(A+2일)를 비교한 결과 A 실험구가 다른 두 실험구에 비해 성장에서

유의하게 높은 결과를 얻었고($P < 0.05$) 생존율도 비슷한 결과를 보였다. 이는 참돔, *Chrysophrys major*의 종묘생산에 있어서 부화 직후 로티퍼를 공급한 실험구가 성장과 생존율이 높게 나타났고, 로티퍼와 *Artemia nauplii* 그리고 바지락을 혼합하거나 *T. japonicus*를 공급한 시기가 빠를수록 생존율이 높게 나타난 것과 비슷한 결과이다(Back *et al.*, 1986). 그리고 불락, *Sebastes inermis*의 먹이 급이 방법에 관한 실험에서 로티퍼와 *Artemia nauplii*를 단독으로 공급한 실험구에 비해 혼합 공급한 실험구에서 생존율이 높게 나타났고, 성장에 있어서도 로티퍼와 *Artemia nauplii*를 혼합 공급하면서 *Artemia nauplii*를 35일 이상 공급해 준 실험구가 양호한 성장을 나타낸 것처럼(Kim *et al.*, 2001a) 자어에 있어서 초기 먹이 선택을 어떻게 하느냐에 따라 성장과 생존율에는 많은 차이를 보일 수 밖에 없다.

양식시설에서 먹이생물로 이용되고 있는 식물플랑크톤인 *I. galbana*와 *N. oculata*를 사육수조에 첨가하여 “green water”를 만들어 준 결과 대조구와 비교하여 성장과 생존율에서 모두 좋은 결과를 얻을 수 있었다($P < 0.05$). 이것은 능성어, *E. suillus* 치어의 초기 성장과 생존율에 있어서 green water가 조성된 실험구가 대조구와 비교하여 성장과 생존율이 모두 우수하였는데 이는 사육수조의 배경색에 따라 로티퍼에 대한 가시성의 차이가 원인이라고 보고한 것과 연관성이 있다(Duray *et al.*, 1996). 그리고 Sea bream, *Sparus aurata* 유생 사육 시 식물 플랑크톤을 첨가하여 사육한 결과 사육 후 20일째의 생존율이 $44.0 \pm 17.0\%$, 개체의 건중량이 2.0 ± 0.2 mg에 달한 것과 비교해서 식물플랑크톤을 첨가하지 않은 경우에는 생존율과 성장률이 각각 $16.6 \pm 6\%$, 1.1 ± 0.2 mg 감소하였다(Papandroulakis *et al.*, 2002). Oie *et al.*, (1997)의 연구에서는 *I. galbana*를 turbot, *Scophthalmus maximus* 사육수조에 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 비교한 결과 첨가한 쪽의 생존율과 성장이 모두 높게 나타났다. 이는 *I. galbana*를 첨가한 쪽의 유생이

그렇지 않은 경우보다 소화력이 높기 때문이었다. 또한 *Chlorella*를 첨가하였을 때 병원성 세균의 수가 감소하는 결과를 얻을 수 있었는데 이처럼 환경을 악화 시키는 원인이 되는 항생물질이나 화학물질을 사용하지 않고도 친환경적인 green water 조성방법을 이용하여 병원성 세균을 억제하거나 예방할 수 있다(Tendencia and Pena, 2003).

이 연구에서 maroon clownfish의 종묘생산을 위한 자치어 사육은 식물 플랑크톤을 사육수조에 첨가하는 green water 조성 방법으로 실시하였는데 부화 후 5일 정도가 경과한 후에 즉시 *Artemia*와 로티퍼를 혼합하여 공급하여 주는 것이 성장과 생존율에서 모두 양호한 결과를 보였다($P < 0.05$).

3. 자치어 사육 과정 중의 병원성 미생물의 확인

어류양식 시 발생하는 세균성 질병에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으며, 특히 넙치와 같은 중요 양식어종에 발병하는 어종에 대해서는 꾸준한 연구가 수행되고 있다. 제주도에서는 넙치에 발병하는 세균성 질병에 대하여 *Vibrio*속 세균에 대해서는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법을 이용하여 동정하였다(Kang, 2003). 이 방법에 따라 maroon clownfish 자어의 폐사개체에서 균을 분리한 후 분석한 결과 99.8%의 상동성을 보여 *V. ponticus*균으로 동정 하였다. *V. ponticus*는 gilthead sea bream (*Sparus aurata*)과 해수 등에서 분리하여 신종으로 보고한 종으로 *V. fluvialis* 및 *V. furnissii*와 16S rDNA 염기서열이 각각 97.1%와 97.3% 상동성을 갖는다고 보고하였다(Macian *et al.*, 2004). 이 균은 sea bream, *S. aurata*의 질병을 일으키는 원인균으로 밝혀졌으며 우리나라에서는 현재까지 발표되지 않았다. *V. ponticus*균은 maroon clownfish 종묘생산 시 폐사된 자어의 장내에서 연속하여 검출되는 등 병원성이 있다고 판단되며 어체 감염 실험을 통하여 이에 대한

검증이 되어야 할 것으로 보인다.

약제 감수성 실험 결과 Quinolone계 항생제인 Oxolinic acid, Flumequine, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Nalidixic acid, Pefloxacin과 Doxycycline hydrochloride에 높은 감수성을 보였는데 Kang (2003)도 제주 지역에서 분리한 *Vibrio* sp. 261균주에 대하여 15종의 항생제를 가지고 감수성 실험을 한 결과 Oxolinic acid, Ciprofloxacin, Nalidixic acid에 70% 이상의 균주가 감수성을 나타낸 결과와 유사한 경향을 보였다. 그리고 제주도에 서 발병된 *Vibrio* sp. 7균주에 대하여 8종의 항생제에 대한 최소발육억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정결과 Flumequine의 MIC는 12.5-50.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 비슷한 경향을 보였으나 Oxolinic acid는 3.13-12.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나 상이한 결과를 보였다(Oh, 1996).

어류 종묘생산을 비롯한 어류 양식 시 질병에 의한 피해로 경영에 막대한 지장을 초래하는 경우를 많이 볼 수 있다. 그러므로 어류를 건강하게 키우기 위해 노력을 기울여야 하며 만약 병이 발생하였을 경우에는 신속·정확하게 진단하고 치료할 수 있는 방안을 마련해야 한다. 특히 현재 국내에서 최초로 해수관상어의 대량 종묘생산 및 양식을 시도하는 시점에 지금까지 국내에서 접해보지 못했던 어병에 노출될 가능성이 높다. 따라서 이상이 발견되었을 경우에는 원인균 및 기생충을 밝혀내는 노력과 함께 적절한 치료방법에 대한 연구가 필요하다.

4. 골학적 특징

자리돔과의 흰동가리아과 어류는 *Amphiprion*속과 *Premnas*속으로 구성 되어 있으며, 말미잘류와 공생관계를 갖고 있다(Fautin and Allen, 1992; Nelson, 1994).

최근 자리돔과의 *Premnas*속은 분자계통학적 접근을 통해 *Amphiprion*속과 자매군 관계에 있으며, 그 중에서도 ocellaris clownfish가 가장 근연인 것으로 밝혀졌다(Jang-Liaw *et al.*, 2002; Quenouille *et al.*, 2004). 형태학적으로 자리돔과의 계통추정을 시도한 Fitzpatrick (1992)은 비록 자리돔과 어류의 단계통성(monophyly)을 지지하는 형질들을 밝혀낼 수는 있었지만, 아파나 속간의 유연관계의 추정까지는 이르지 못하였다(Quenouille *et al.*, 2004).

이 연구에서는 단일종 maroon clownfish를 포함하는 *Premnas*속의 골격적 특징을 해명하고자 전 골격계를 상세히 관찰하고 기재하였다. 또한, 기존의 분자계통학적 접근을 통해 자매군으로 밝혀진 *Amphiprion*속 대표종과의 골격계 특징을 검토하였다. 그 결과 누골과 안하골, 새개부에서 *Premnas*속 어류에서만 나타나는 특징을 발견하였다. 즉, 누골과 제1안하골에 잘 발달된 1개의 가시가 있었고 *Amphiprion*속 어류에서는 전새개골을 제외한 새개부의 가시가 잘 발달되어 있는 반면에 maroon clownfish는 주새개골과 간새개골 후연에 가시의 발달이 저조하고 하새개골의 경우 하반부에 제한되어 가시가 나타났다.

*Premnas*속과 *Amphiprion*속 어류를 포함하는 흰동가리류는 말미잘과 공생관계에 있다. 말미잘 촉수독에 내성이 있는 흰동가리류는 먹이 부스러기를 말미잘에게 제공해주고 말미잘은 포식자로부터 흰동가리류를 보호해 준다 (Suzuki and Takamatsu, 1989; Fautin and Allen, 1992; Hoff, 1996; Wilkerson, 1998; Stratton, 2000). 흰동가리류는 자연에서 말미잘의 종류에 따라 선택적으로 공생하는데 maroon clownfish는 *E. quadricolor* 1종 하고만 공생하고 saddleback clownfish는 *Macrodactyla doreensis*, *Heteractis crispata*, *Stichodactyla haddoni* 3종과 공생관계를 갖는다. 이외에 ocellaris clownfish는 3종, sebae clownfish는 10종과 공생관계를 갖고 있다(Fautin and Allen, 1992; Tullock, 1998). 말미잘과의 공생이 외부의 포식자로부터

자신을 보호하기 위한 방법으로 볼 때 maroon clownfish는 다른 흰동가리류에 비해 도피할 수 있는 피신처가 상대적으로 부족함에 따라 이를 보완하기 위한 방어기능으로 누골과 제1안하골에 발달된 가시가 있는 것으로 추측된다.

Maroon clownfish를 비롯한 흰동가리류의 관상 사육시 말미잘은 매우 중요한 요소이기 때문에 사육수조 내에서의 공생관계 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이 연구에서도 maroon clownfish 치어를 사육 수조 내에서 제주연안에 분포하는 호리병말미잘, *Parasicyonis actinostoloides* (Song, 2004a)와 함께 사육한 결과 치어가 호리병말미잘 속에 잠입하는 것이 확인되었다.



V. 요약

Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*의 인공종묘생산을 위하여 산란, 부화, 자치어 사육, 자어 폐사의 원인이 되는 병원균을 분리 동정 및 골학적 특성에 관한 번식생물학적 요소들을 연구하였다.

친어를 사육하여 짝짓기, 산란행동, 수정란 관리, 난 발생, 자치어 사육을 하였다. 짝짓기 및 산란 후 수컷과 암컷은 가슴지느러미와 입을 이용하여 알 관리를 하였으며, 주로 수컷이 하였다. 수정란은 진홍색을 띤 분리침성부착란으로, 장경 1.95-2.01 mm (1.99 ± 0.03 mm), 단경 0.83-0.91 mm (0.88 ± 0.03 mm)의 타원형이었다. 수온 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 조건하에서 수정 1시간 10분경과 후에 최초 난할이 시작되어 2세포기가 되었다. 수정 후 23시간 40분에는 배체가 형성되었고, 부화는 120-150시간 사이에 이루어졌다. 부화 직후의 자어는 전장 3.10-3.44 mm (평균 3.22 ± 0.07 mm)로 타원형의 적갈색 난황(평균 장경 0.58 ± 0.08 mm, 평균 단경 0.46 ± 0.04 mm)을 복부 전반부에 가지고 있었으며, 근절수는 9+17=26개이고 입과 항문은 열려있었다. 부화 후 10일째 치어는 전장 5.64-6.89 mm (평균 6.21 ± 0.69 mm)로 성장하였고, 등지느러미 28개, 뒷지느러미 17개, 꼬리지느러미에 28개의 기조수를 보였다. 부화 후 19일째 치어의 전장은 8.32-10.98 mm (평균 9.34 ± 1.11 mm)이었고, 3개의 백색 가로피가 주황색 몸체에 생기기 시작했다.

종묘생산과정 중 효율적인 먹이 공급 방법을 알아보기 위하여 먹이계열과 식물성 플랑크톤 첨가에 따른 green water 효과를 조사하였다. 기본 먹이로서 로티퍼 공급 이후, 부화 후 4일째 *Artemia nauplii*, 부화 후 9일째 *Tigriopus japonicus*, 부화 후 15일째 배합사료를 공급한 먹이계열에서 부화 17일째 치어는 전장 9.97 ± 0.8 mm로, 로티퍼 이후의 먹이 공급 시기를

1일, 2일 늦춘 실험구에 비하여 성장이 빨랐다. 사육수에 *Isochrysis galbana* (5×10^5 cells/mL)와 *Nannochloropsis oculata* (5×10^5 cells/mL)를 첨가한 비교 실험에서 전자는 전장 7.63 ± 0.50 mm, 후자는 전장 7.33 ± 0.43 mm로 두 실험구 사이에는 성장차가 인정되지 않았으나($P > 0.05$), 대조구의 전장 6.76 ± 0.55 mm와는 유의차가 인정되었다($P < 0.05$).

자어 폐사의 원인이 되는 병원성 미생물을 분리, 동정하였고 약제감수성 시험을 하였다. 자어 사육기간 중 부화 후 3-7일 사이에 섭식을 하지 않고 힘없이 유영하면서 폐사하는 개체들로부터 폐사 원인균으로 추정되는 균주를 분리하였다. 이 균에 대한 생화학적 특성 및 16S rDNA sequencing 분석 결과, *Vibrio ponticus* CECT5869와 99.8%의 상동성을 보여 *V. ponticus* kjs1으로 동정 하였다. 분리균주에 대한 항생제 감수성 실험 결과, Oxolinic acid, Flumequine, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Nalidixic acid, Pefloxacin등의 Quinolone계 항생제와 Doxycycline hydrochloride에 높은 감수성을 보였다.

*Premnas*속에 유일한 종인 maroon clownfish의 골학적 특성을 알아보기 위하여 전 골격계를 기재하고, 유연속인 *Amphiprion*속과 검토하였다. 이 속 어류는 특징적으로 누골과 제1안하골에 잘 발달된 1개의 가시가 있었다.

VI. 참고문헌

- Back, J. H., S. J. Son and K. Y. Yang, 1986. Effects of initial feeding time on growth and survival rates of fry and fingerlings of red sea bream, *Chrysophrys major* (Temminck et Schlegel). Bull. Fish. Res. Dev. Agency, Korea, 39, 97-104. (in Korean)
- Bromley, P. J. and B. R. Howell, 1983. Factors influencing the survival and growth of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L., during the change from live to compound feeds. Aquaculture 31, 31-40.
- Cho, K. C., J. H. Kim, C. S. Go, Y. Kim and K. K. Kim, 1995. A study on seedling production of the spotted flounder, *Verasper variegatus*. Bull, Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea, 50, 41-57. (in Korean)
- Chun, J. C. and S. Rho, 1991. Salinity tolerance of eggs and juveniles of flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). J. Aquacl., 4(2), 73-84. (in Korean)
- Cobb, C., 1997. The immune response of the tomato clownfish, *Amphiprion frenatus* to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* and selection of candidate antigens for a vaccine. Diss. Abst. Int. Pt. B. Sci. Eng., 58(6), p. 2899.
- Cobb, C., Levy. M. G. and E. J. Noga, 1998. Development of immunity by the tomato clownfish, *Amphiprion frenatus* to the dinoflagellate parasite *Amyloodinium ocellatum*. J. Aqua. Anim. Health 10(3), 259-263.

- Duncan, D. B. 1955. Multiple-range test and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Duray, M. N., 1994. Daily rates of ingestion on rotifers and *Artemia* nauplii by laboratory-reared grouper larvae of *Epinephelus suillus*. *Philipp. Sci.*, 31, 32-41.
- Duray, M. N., C. B. Estudillo and L. G. Alpasan, 1996. The effect of background color and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. *Aquaculture* 146, 217-224.
- Fautin, D. G. and G. R. Allen, 1992. Anemone fishes and their host sea anemones. *West. Aust. Mus.*, Sydney, 160 pp.
- Fitzpatrick, S., 1992. Pomacentrid intrafamilial relationships: a cladistic approach. Unpublished Honours Thesis, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia.
- Go, H. B. and S. Rho, 1996. Low salinity tolerance of eggs and juveniles of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *J. Aquacult.*, 9(1), 43-55. (in Korean)
- Haga, Y., T. Suzuki, H. Kagechika and T. Takeuchi, 2003. A retinoic acid receptor-selective against causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 221, 381-392.
- Hoff, F. H., 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. *Aquaculture Consultants Inc.*, Florida, 212 pp.
- Holliday, F. G. T., 1969. The effects of salinity on the eggs and larvae

- of teleost. Fish Physiology, Vol. I. Academic Press, New York, pp. 293-310.
- Hwang, H. K., 1999. Biological studies on aquaculture of the Rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). Ph.D. Thesis, Cheju Nat'l Univ., pp. 42-68. (in Korean)
- Jang-Liaw, N. H., K. L. Tang, C. F. Hui and K. T. Shao, 2002. Molecular phylogeny of 48 species of damselfishes (Perciformes: Pomacentridae) using 12S mtDNA sequences. Mol. Phylog. Evol. 25, 445-454.
- Job, S. D. and D. R. Bellwood, 1996. Visual acuity and feeding in larval *Premnas biaculeatus*. J. Fish. Biol., 48(5), 952-963.
- Johns, D. M. and W. H. Howell, 1980. Yolk utilization in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) embryos and larvae reared at two temperatures. Mar. Ecol. Prog. Ser., 2, 1-8.
- Johnson, G. D., Baldwin, C. C., Okiyama, M. and Tominaga, Y. 1996. Osteology and relationships of *Pseudotrichonotus altivelis* (Teleostei: Aulopiformes: Pseudotrichonotidae). Ichthyol. Res., 43, 17-45.
- Kang, B. J., 2003. A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flouders (*Paralichthys olivaceus*) showing disease symptoms in Jeju area of Korea. Ph.D. Thesis, Cheju Nat'l Univ., 112 pp. (in Korean)
- Kang, J. C., J. H. Jee, S. G. Kim, G. S. Park and S. Y. Park, 2004. Tolerance of juvenile gobiidae, *Tridentiger trignocephalis* exposed to various salinity. Kor. J. Environ. Biol., 22(1), 153-158. (in Korean)

- Kawamura, K and K. Hosoya, 1991. A modified double staining technique for making a transparent fish-skeleton specimen. Bull. Nat'l. Res. Inst. Aquacult. Japan, 20, 11-18. (in Japanese)
- Kim, Y. U. 1978. Introduction of Ichthyology. Tae Hwa Pub. Co., Pusan, 270 pp.
- Kim, J. H., Y. H. Lee, Y. B. Moon and C. S. Ko, 2001a. Survival and growth of larvae and juveniles of rockfish, *Sebastes inermis* at different water temperature, feed and rearing density. Bull, Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea, 59, 90-98. (in Korean)
- Kim, Y. U. and J. K. Kim, 1997. Morphological study of the genus *Chromis* from Korea. II. Comparison of skeletal characters of *Chromis notata*, *Chromis analis* and *Chromis fumea*. J. Kor. Fish. Soc. 30(4), 562-573. (in Korean)
- Kim, Y. U. and K. H. Han, 1989. Egg development, larvae and juveniles of *Chaenogobius laevis* (Steindachner). Bull. Kor. Fish. Soc., 22(5), 317-331. (in Korean)
- Kim, Y. U., K. H. Han and J. W. Park, 2001b. Male parental care, egg and larval development of the smoky damselfish, *Chromis fumea*. Kor. J. Ichthyol., 13, 166-172. (in Korean)
- Kim, Y. U. and K. H. Han, 1990. Early life history and spawning behavior of the gobiid fish, *Tridentiger trigonocephalus* reared in the laboratory. Kor. J. Ichthyol., 2(1), 53-62. (in Korean)
- Kim, Y. U. and K. H. Han, 1991. Early life history and spawning behavior of the Gobiid fish, *Mugilogobius abei* (Jordan et Snyder) reared in the laboratory. Kor. J. Ichthyol., 3(1), 1-13. (in Korean)

- Kim, Y. U., K. H. Han and B.H. Kim, 1993. The embryonic and larval development of the greenling, *Hexagrammos otakii* Jordan et Starks. Kor. J. Ichthyol., 5(2), 151-159. (in Korean)
- Kim, Y. U., K. H. Han, C. B. Kang and J. W. Ryu, 1992. Early life history and spawning behavior of the gobiid fish, *Luciogobius guttatus* Gill. Kor. J. Ichthyol., 4(1), 1-13. (in Korean)
- Kim, Y. U., Y. S. Park and G. M. Jung, 1987. Development of eggs, larvae and juveniles of smooth lumpsucker, *Aptocyclus ventricosus* (Pallas). Bull. Kor. Fish. Soc. 20(2), 157-165. (in Korean)
- Kim, Y. U., Y. S. Park and G. M. Jung, 1986. Egg development and larvae of the snailfish, *Liparis tanakai* (Gilbert et Bürke). Bull. Kor. Fish. Soc., 19(4), 380-386. (in Korean)
- Kumai, H., 1984. Biological studies on culture of Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. Bull. Fish. Lab. Kinki Univ. 2, 5-10. (in Japanese)
- Lee, C. K. and S. B. Hur, 1997. York resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. Aquacult., 10(4), 473-483. (in Korean)
- Lee, J. J. and S. Rho, 1987. Studies on the seeding production of the black porgy, *Mylio macrocephalus*. Bull. Mar. Resour. Res. Inst. Cheju Nat'l. Univ., 11, 1-20. (in Korean)
- Lee, J. U., 1996. Spawning season and controlled seedling production of long shanny, *Stichaeus grigorjewi*. Ph.D. Thesis Nat'l. Fish. Univ. Pusan, 187 pp. (in Korean)
- Lewis, L. M., P. L. Santosh and P. E. Witten, 2004. Morphological

- descriptions of the early stages of spine and vertebral development in hatchery-reared larval and juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 241, 47-59.
- Macian, M. C., E. Garay, P. A. Grimont and M. J. Pujalte, 2004. *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*. *V. fumissii* clade, isolated from gilthead sea bream, mussels and seawater. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27(5), 535-540.
- Masumura, K., H. Yasunosu, N. Okada and K. Muroga, 1989. Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathol.*, 24(3), 135-141. (in Japanese)
- Moon, Y. G., G. T. Park, H. J. Son, S. H. Lee, J. M. Lee and M. S. Heo, 2004. Rapid detection of the pathogenic agent of bacterial white enteritis of larval and juvenile stages in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Fish Pathol.*, 17(3), 159-169. (in Korean)
- Moyer, J. T. and L. J. Bell., 1976. Reproductive behavior of the anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima, Japan. *Jap. J. Ichthyol.*, 23(1), 23-32.
- Moyer, J. T. and R. C. Steene, 1978. Nesting behavior of the anemonefish *Amphiprion polymnus*. *J. J. Ichthyol.*, 26(2), 209-214.
- Moyer, T. M. and C. E. Sawyers, 1972. Territorial behavior of the anemonefish *Amphiprion xanthurus* with notes on the life history. *Jap. J. Ichthyol.*, 20(2), 85-93.
- Nelson, J. S., 1994. *Fishes of the World*. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 600 pp.
- Oh, S. P., 1996. Bacterial diseases from flounder farms of Cheju Island

- and minimum inhibitory concentration of antibacterial reagents.
M.S. Thesis, Cheju Nat'l. Univ., 40 pp. (in Korean)
- Oie, G., P. Markidis, K. I. Reitan and Y. Olsen, 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153, 103-122.
- Papandroulakis N., P. Divanach and M. Kentouri, 2002. Enhanced biological performance of intensive sea bream (*Sparus aurata*) larviculture in the presence of phytoplankton with long photophase. *Aquaculture*, 204, 45-63.
- Quenouille, B., E. Bermingham and S. Planes, 2004. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylog. Evol.* 31, 66-88.
- Randall, J. E. and P. C. Heemstra, 1991. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae) with descriptions of five new species. *Indo-Pacific Fishes No. 20*. Bernice Pauahi Bishop Museum. Honolulu, 322 pp.
- Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo, G. Oie and Y. Olsen, 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 118, 257-275.
- Rho, S. and C. K. Pyen, 1986. Mass fry production of rock cod, *Epinephelus fario* and flat fish, *Paralichthys olivaceus*. *Rept. Aquacult. Lab. Coll. Mar. Sci. Technol. Cheju Nat'l Univ.*, 3, 20-37. (in Korean)
- Shirota, A., 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. *Bull. Jap.*

- Soc. Sci. Fish., 36, 353-368. Silphaduang, U., K. Hatai, S. Wada and E. Noga, 2000. Cladosporiosis in a tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*). J. Zoo Wildlife Med., 31(2), 259-261.
- Silphaduang, U., K. Hatai, S. Wada and E. Noga, 2000. Cladosporiosis in a tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*). J. Zoo Wildlife Med., 31(2), 259-261.
- Song, J. I., 2004a. Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea. Vol. 39 Anthozoa. Ministry of Education & Human Resources, Korea, pp. 374-469. (in Korean)
- Song, Y. B., 2004b. Induction of sexual maturation and early development of the seven band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ph.D. Thesis, Cheju Nat'l Univ., 106 pp. (in Korean)
- Song, Y. B., S. R. Oh, J. P. Seo, B. G. Ji, B. S. Lim and Y. D. Lee, 2005. Larval development and rearing of long tooth grouper, *Epinephelus bruneus* in Jeju island, Korea. J. World Aquacult. Soc., 36(2), 209-216.
- Srinivasan, M., G. P. Jones, and M. J. Caley, 1999. Experimental evaluation of the roles of habitat selection and interspecific competition in determining patterns of host use by two anemonefishes. Mar. Ecol. Prog. Ser., 186, 283-292.
- Stratton, J. D., 2000. Clownfishes (Anemonefishes): Care, Feeding and Breeding Identifying the Clownfish Species Clownfishes and Anemones. T. F. H. Publications Inc. Neptune, 64 pp.
- Suzuki, K. and S. Takamatsu, 1989. Saltwater fishes reproduction. Midori Shobo, Tokyo, pp. 32-71. (in Japanese)

- Tagawa, M., T. Kaji, M. Kinoshita and M. Tanaka, 2004. Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 230, 517-525.
- Takeuchi, T., J. Dedi, Y. Haga, T. Seikai and T. Watanabe, 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 169, 155-165.
- Tendencia, E. A., M. d. Pena, 2003. Investigation of some components of the greenwater system which makes it effective in the initial control of liminous bacteria. *Aquaculture*, 218, 115-119.
- Tulloch, J. H., 1998. Clownfishes and Sea Anemones. Barron's, 11 pp.
- Wilkerson, J. D., 1998. Clownfishes. T. F. H. Publications, Inc., 240 pp.
- Yoon, Y. S., 2004. Studies on spawning and larval culture of saddleback clownfish, *Amphiprion polymnus*. M.S. Thesis, Cheju Nat'l Univ., 43 pp. (in Korean)
- Yoon, Y. S., S. Rho, Y. U. Choi, J. S. Kim and Y. D. Lee, 2005. Studies on seed production of saddleback clownfish, *Amphiprion polymnus*. 1) Spawning, egg development and larvae culture. *J. Aquacult.* 18(2), 107-114. (in Korean)
- Yu, J. M. and S. M. Lee, 1995. Marine Fishes around Cheju Island. Jeju-do, Office of Education, Jeju, 248 pp.

감사의 글

어떤 분은 큰일을 했다고 하시고, 또 어떤 분은 지금부터 시작이라고 하십니다. 그런데 지금 저는 그저 홀가분한 기분만 느껴집니다. 지금까지 어깨를 누르고 있던 큰 짐을 내려놓았다는 생각과 함께 기쁜 마음으로 짐을 함께 들어주셨던 여러 고마운 분들이 생각납니다.

지도 교수님이신 노섭 교수님과 부족한 논문을 심사하시며 정성스럽게 다듬어 주신 홍성윤 교수님, 이정희 소장님, 이영돈 교수님, 허문수 교수님을 비롯하여, 학문의 길을 바르게 가도록 가르침을 주신 이정재 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 최광식 교수님, 이경준 교수님 감사합니다.

직장을 다니면서 학업을 계속할 수 있도록 도와주신 해양수산부 부원찬 총무 과장님과 고인철 청장님을 비롯하여 김대환·진창남 과장님, 최영진·송윤경·이법권·정성필·장근수 계장님과 오상필님, 고경호님, 김원평님, 강문규님, 오순진님, 김미선님, 김미순님, 강원진님, 부훈식님, 강기창님, 김태경님 감사합니다. 그리고 지금은 소속이 바뀌었지만 제주지방해양수산청에 함께 근무했던 여러 직원들과 제주특별자치도 공무원으로 바뀐 후 첫 소속이 된 해양수산자원연구소의 김수완 소장님을 비롯한 직원 분들, 그리고 해양수산본부의 이종만 본부장님과 홍성삼·강문수 과장님을 비롯한 직원 분들과 기쁨을 나누고 싶습니다.

이 논문이 완성되는 날까지 함께 고민하며 도와준 송영보 박사와 김병직 박사님, 강봉조 박사님, 정민민 박사, 임봉수 박사, 이치훈 박사, 최영웅 박사, 윤영석님과 어류양식연구실 및 발생학 연구실 후배들에게도 감사드립니다. 그리고 해경희 변수철, 현충훈 선배님을 비롯한 여러 선·후배님과 서종표님, 이성익님, 양준봉님과 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

큰 아버님을 비롯하여 다 큰 자식을 위해 지금도 애쓰시는 사랑하는 부모님과 장인·장모님 은혜에 다시 한번 머리 숙여 감사드리고 형님내외분과 ,누님내외분, 동생내외, 처제내외, 큰처남내외, 작은처남과도 기쁨을 나누고 싶습니다. 그리고 항상 믿음과 사랑으로 가정을 지켜주는 아내 문숙미에게 깊은 감사를 드리며, 예쁘고 착한 큰 딸 연주, 자랑스러운 큰 아들 민규, 귀여운 막내 민환이 모두모두 사랑합니다. 영원히!!!



Table 2. Spawning interval and egg numbers of *Premnas biaculeatus*

Spawning times	Date	Interval of spawning	Number of eggs
1st	2004. 2. 22.	-	583
2nd	2004. 4. 14.	52 days	861
3rd	2004. 5. 17.	33 days	938
4th	2004. 5. 29.	12 days	1,071
5th	2004. 6. 16.	18 days	1,288
6th	2004. 7. 7.	21 days	2,475
7th	2004. 7. 25.	18 days	2,694
8th	2004. 8. 9.	16 days	2,371

Table 3. *Premnas biaculeatus*. Comparison of egg survival and hatching by different incubation conditions

(Unit: Number of eggs)

Tank	Incubation condition	Spawning times	Spawned	Days after spawning					Hatching
				1-day elapsed	2-day elapsed	3-day elapsed	4-day elapsed	5-day elapsed	
Combination tank	Taking care	1st	583	471	2	0	0	0	0
	by breeder	2nd	861	798	548	362	248	0	0
	Aeration	3rd	938	894	806	728	653	328	273
		4th	1,071	1,006	914	838	746	420	364
Incubation tank	Water circulation	5th	1,288	1,215	1,207	1,087	924	712	648
		6th	2,028	1,764	1,239	843	505	246	213
		7th	2,012	1,861	1,453	957	645	335	302
		8th	1,829	1,629	1,324	739	349	128	104

Table 5. Comparison of normal and abnormal coloration forming three white bands by different spawning of *Premnas biaculeatus*

Spawning times	Normal band formation (%)	Abnormal band formation of one side (%)	Abnormal band formation of both sides (%)
4th	65.4	12.3	22.3
5th	66.3	13.3	20.4
6th	67.9	10.7	21.4
7th	57.0	23.0	20.0

Table 6. Mouth size of *Premnas biaculeatus* larvae by growth in total length

Day after hatching	Total length (mm)	Upper jaw length (mm)	Mouth length (mm)	
			d ¹⁾	0.75d
1	3.22±0.25	0.27±0.03	0.38	0.29
2	3.85±0.30	0.29±0.03	0.40	0.30
3	4.16±0.41	0.30±0.05	0.43	0.32
4	4.22±0.66	0.32±0.07	0.46	0.34
6	5.14±0.90	0.40±0.10	0.56	0.42
8	6.17±1.08	0.52±0.11	0.73	0.55

¹⁾ $\sqrt{2}$ x upper jaw length.

Table 7. Comparison of growth of *Premnas biaculeatus* larvae reared different feeding regimes

(Unit: mm)

Feeding regime	Days after hatching				
	5	8	11	14	17
A	5.26±0.35 ^a	6.32±0.54 ^a	7.49±0.58 ^a	8.71±0.5 ^a	9.97±0.8 ^a
B	5.19±0.35 ^a	6.0±0.48 ^b	6.92±0.48 ^b	7.95±0.57 ^b	9.11±0.67 ^b
C	5.22±0.31 ^a	5.81±0.33 ^b	6.71±0.46 ^b	7.69±0.57 ^b	8.79±0.66 ^b

A, Feeding with *Artemia* nauplii, *Tigriopus* sp., and artificial feed were started at 4, 9, and 15 days after hatching, respectively; B and C, Feeding regimes were delayed one and two days comparing A feeding trial.

Table 8. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 3 fish/L)

(Unit: mm)

Treatment	Days after hatching				
	3	5	7	9	11
Control	4.21±0.11 ^a	4.34±0.20 ^b	5.07±0.22 ^b	6.09±0.32 ^b	6.76±0.55 ^b
<i>Isochrysis galbana</i>	4.18±0.12 ^a	4.63±0.22 ^a	5.99±0.34 ^a	6.73±0.52 ^a	7.63±0.50 ^a
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.19±0.13 ^a	4.56±0.23 ^a	5.79±0.24 ^a	6.57±0.39 ^a	7.33±0.43 ^a

Table 9. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 6 fish/L)

(Unit: mm)

Treatment	Days after hatching				
	3	5	7	9	11
Control	4.19±0.18 ^a	4.30±0.17 ^b	5.03±0.28 ^b	6.03±0.25 ^b	6.63±0.46 ^b
<i>Isochrysis galbana</i>	4.17±0.15 ^a	4.54±0.26 ^a	5.90±0.30 ^a	6.60±0.46 ^a	7.46±0.48 ^a
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.18±0.16 ^a	4.48±0.29 ^{ab}	5.74±0.37 ^a	6.42±0.33 ^a	7.23±0.36 ^a



Table 10. Green water effects supplemented with two phytoplankton species to growth rates of *Premnas biaculeatus* larvae (stocking density: 9 fish/L)

(Unit: mm)

Treatment	Days after hatching				
	3	5	7	9	11
Control	4.20±0.14 ^a	4.25±0.15 ^a	4.98±0.26 ^c	5.95±0.30 ^b	6.53±0.42 ^b
<i>Isocryptus galbana</i>	4.21±0.19 ^a	4.41±0.30 ^a	5.77±0.31 ^a	6.47±0.42 ^a	7.29±0.45 ^a
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4.17±0.21 ^a	4.35±0.26 ^a	5.50±0.28 ^b	6.33±0.29 ^a	7.12±0.48 ^a



Table 11. Green water effects supplemented with two phytoplankton species and larval rearing density to survival rates of *Premnas biaculeatus* larvae

Trial	Fish/L	Days after hatching									
		Survival rates (%)									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Control	3	100	88.9	80.0	71.1	62.2	60.0	51.1	44.5	40.0	
	6	100	81.1	75.6	64.4	58.9	52.2	46.7	42.2	36.7	
	9	100	83.0	73.3	63.7	54.1	48.9	43.7	39.3	34.1	
<i>Isochrysis galbana</i>	3	100	93.3	91.1	84.5	82.2	75.6	73.3	66.7	62.2	
	6	100	97.8	95.6	90.0	85.6	77.8	72.2	65.6	54.5	
	9	100	90.4	85.2	81.5	77.0	71.9	65.9	60.0	54.1	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3	100	95.6	88.9	84.4	75.6	68.9	64.4	60.0	55.6	
	6	100	85.6	83.3	78.9	73.3	67.8	63.3	56.7	50.0	
	9	100	94.1	91.1	85.9	80.7	76.3	70.4	56.3	48.2	

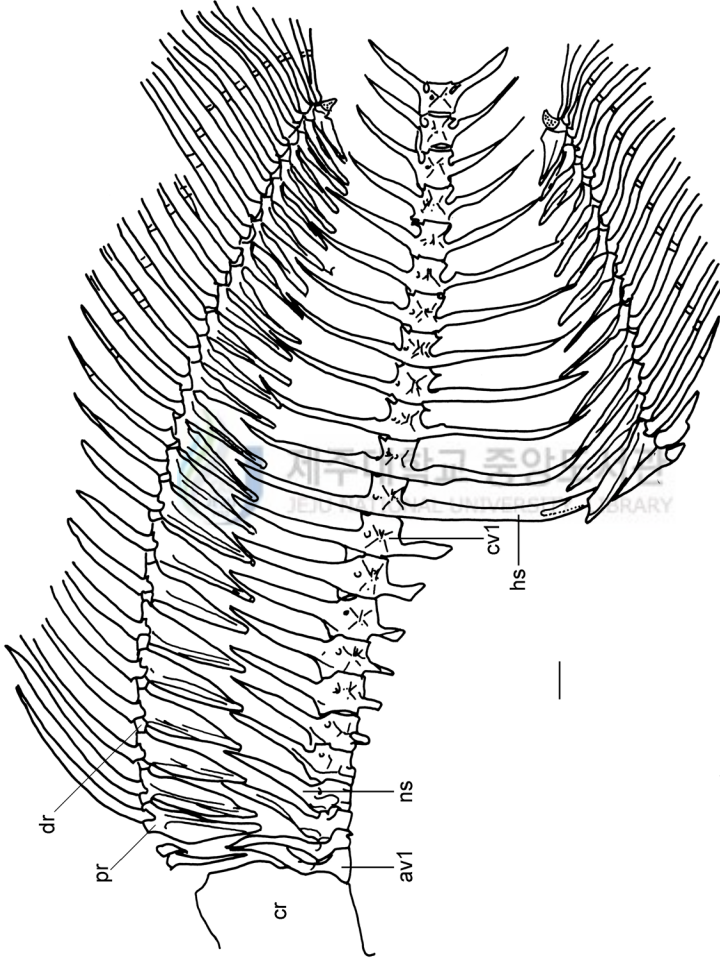


Fig. 36. Lateral view of axial skeleton including median fin supports, except caudal skeleton in *Premnas biaculeatus*, MRIC 2478. av1, 1st abdominal vertebra; cv1, 1st caudal vertebra; cr, neuro cranium; dr, distal pterygiophore; hs, haemal spine; ns, neural spine; pr, proximal pterygiophore. Scale bar=1 mm.