



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

박사학위논문

홍바리, *Epinephelus fasciatus*의  
번식생리 특성

제주대학교 대학원

수산생물학과

주해성

2012년 12월

# 홍바리, *Epinephelus fasciatus*의 번식생리 특성

지도교수 이 영 돈

주 해 성

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2012년 12월

주해성의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장	김 형 배
위 원	이 경 준
위 원	여 인 규
위 원	김 기 영
위 원	이 영 돈

제주대학교 대학원

2012년 12월

Characteristics of reproductive physiology  
in blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*

Hae-Sung Joo

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

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

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

December 2012

# 목 차

List of figures .....	i
List of tables .....	iv
Abstract .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. 실험어 .....	3
2. 번식생리 특성 .....	3
1)성 특성 .....	3
2)배우자 특성 .....	3
3)번식 내분비 특성 .....	5
3. 성 성숙 유도 .....	9
1)환경조절을 통한 성 성숙 유도 .....	9
2)성 성숙 제어 사육시스템 .....	11
4. 정자 동결보존 조건과 해동정자의 운동성 .....	14
1)정자 동결보존 조건 .....	14
2)해동정자의 운동성 .....	14
5. 초기발생과 자·치어 발달 .....	19
1)배란 유도와 수정 .....	19
2)초기 난 발생 .....	21
3)부화자어의 발달 .....	21
4)자·치어의 형태 발달과 성장 .....	21
5)자·치어의 성장에 따른 소화관 형태 발달 .....	22

III. 결과	25
1. 번식생리 특성	25
1) 성 특성	25
2) 배우자 특성	30
3) 번식 내분비 특성	36
2. 성 성숙 유도	44
1) 환경조절을 통한 성 성숙 유도	44
2) 성 성숙 제어 사육시스템	44
3. 정자 동결보존 조건과 해동정자의 운동성	48
1) 혈장과 희석액의 물리적 특성	48
2) 신선정자의 운동성	48
3) 냉동정자의 해동 후 운동성	53
4) 냉동정자의 해동 후 시간경과에 따른 운동성	53
4. 초기발생과 자·치어 발달	57
1) 배란 유도와 수정	57
2) 초기 난 발생	57
3) 부화자어의 발달	60
4) 자·치어의 형태 발달과 성장	60
5) 자·치어의 성장에 따른 소화관 형태 발달	67
IV. 고찰	71
V. 요약	82
VI. 참고문헌	84

## List of figures

Fig. 1. Broodstock management of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	4
Fig. 2. Recirculating rearing system of schematic diagram and environmental control (photoperiod and water temperature) scheme to sex maturation of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	10
Fig. 3. Diagram and illustration used to evaluate sperm motility .....	18
Fig. 4. Examination of sexual development in <i>Epinephelus fasciatus</i> using cannulation method .....	20
Fig. 5. Serial view images of artificial fertilization and fertilized egg ..	20
Fig. 6. Measurement of <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	23
Fig. 7. Schematic diagram of rearing system of <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	24
Fig. 8. Feeding scheme during the larval rearing of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	24
Fig. 9. Frequency in total length and body weight of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	26
Fig. 10. Structure of gonad of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	27
Fig. 11. Sex distribution of <i>Epinephelus fasciatus</i> according to total length and body weight .....	28
Fig. 12. Photomicrographs of gonad of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	29
Fig. 13. A scanning electron and transmission electron micrographs of <i>Epinephelus fasciatus</i> spermatozoa .....	31
Fig. 14. A transmission electron micrographs of <i>Epinephelus fasciatus</i> spermatozoon .....	32

Fig 15. A scanning electron micrograph of the unfertilized egg .....	34
Fig. 16. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule .....	35
Fig. 17. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding the blacktip grouper <i>Epinephelus fasciatus</i> FSH $\beta$ (A) and LH $\beta$ (B) subunits .....	38
Fig. 18. Alignments of amino acid sequences of the FSH $\beta$ and LH $\beta$ subunits of blacktip grouper <i>Epinephelus fasciatus</i> and other actinopterygian species using Clustal W multiple sequence alignment program .....	39
Fig. 19. Phylogenetic analysis of teleost FSH $\beta$ and LH $\beta$ subunits based on amino acid sequence .....	41
Fig. 20. The tissue specificity of blacktip grouper <i>Epinephelus fasciatus</i> FSH $\beta$ and LH $\beta$ mRNA expression analyzed by RT-PCR .....	43
Fig. 21. Gonadosomatic index (GSI) change of female <i>Epinephelus fasciatus</i> in control and treatment group during experimental period .....	45
Fig. 22. Photomicrographs of ovarian development in female <i>Epinephelus fasciatus</i> during experimental period .....	45
Fig. 23. Gonadosomatic index (GSI) change of female <i>Epinephelus fasciatus</i> in control and treatment group during experimental period .....	46
Fig. 24. Photomicrographs of ovarian development in female <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	46
Fig. 25. FSH $\beta$ and LH $\beta$ mRNA levels in the pituitary of female <i>Epinephelus fasciatus</i> under different treatment conditions .....	47
Fig. 26. Change in fresh sperm motility of <i>Epinephelus fasciatus</i> according to the time course .....	51

Fig. 27. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course .....	56
Fig. 28. Embryonic development of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	59
Fig. 29. Absorptions of the yolk and oil globule volume in <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae according to the time course .....	61
Fig. 30. External development and growth of <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	62
Fig. 31. Growth of the second dorsal spine and the pelvic spine by day after hatching in <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	64
Fig. 32. Changes of the upper jaw length and lower jaw length by day after hatching in <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	65
Fig. 33. Change of total length in <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae by days after hatching .....	66
Fig. 34. Morphological observations of the digestive system during the development of <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	68
Fig. 35. Sagittal section of the digestive system during the development of <i>Epinephelus fasciatus</i> larvae .....	70

## List of tables

Table 1. Primer sets used of quantitative Real-time RT-PCR of FSH $\beta$ , LH $\beta$ and 18s rRNA in <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	13
Table 2. Constituents of the diluents tested for cryopreservation of <i>Epinephelus fasciatus</i> sperm .....	16
Table 3. Diluents, cryoprotectant and fresh sermen mixture rate for sperm cryopreservation of <i>Epinephelus fasciatus</i> .....	17
Table 4. Criteria index used to evaluate sperm motility .....	18
Table 5. The homologies of amino acid sequences of <i>Epinephelus fasciatus</i> FSH $\beta$ and LH $\beta$ subunits in comparison with those of FSH $\beta$ and LH $\beta$ subunits from the other fish .....	40
Table 6. Osmolarity and pH of seminal plasma of <i>Epinephelus fasciatus</i> and diluents used for cryopreservation .....	49
Table 7. Change of fresh sperm motility in different groups according to the time course .....	50
Table 8. Fresh sperm motility according to the time course .....	52
Table 9. Change of thawed sperm motility in different groups .....	54
Table 10. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course .....	55
Table 11. Thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course .....	56
Table 12. Artificial stripping of <i>Epinephelus fasciatus</i> eggs after HCG hormone injection .....	58

## Abstract

The blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* are protogynous hermaphroditic fish. Female is distributed 36 to 37 cm total length and 400 to 900 g body weight. Male is distributed 34 to 41 cm total length and 600 to 1,000 g body weight. Ultrastructural characteristics of egg and spermatozoa in blacktip grouper different from those of other grouper and spermatozoal head diameter is a close correlation with egg micropylar diameter. We cloned and sequenced the cDNA encoding the follicle-stimulating hormone beta subunit (FSH $\beta$ ) and luteinizing hormone beta subunit (LH $\beta$ ) from the pituitary of the blacktip grouper, which regulate vitellogenesis and maturation in vertebrates. The full-length cDNAs of FSH $\beta$  and LH $\beta$  were 571 bp and 617 bp, encoding 120 amino acid (aa) and 147 aa proteins, respectively.

Induction of sex maturation by environmental control investigated the involvement of photoperiod and temperature in ovarian development of the blacktip grouper. The photoperiod and water temperature was adjusted to 12L:12D and 22°C, respectively. In the treatment group, every 3 weeks daylight was increased as follows a 13L:11D and 14L:10D, and control group was maintained 12L:12D. After 9 weeks water temperature was increased 25°C both treatment and control group. Sex maturation of blacktip grouper induced only 14L:10D and 25°C treatment group.

To development of sex maturation control rearing system of the female blacktip grouper, this study investigated the effects of photoperiod and water temperature on gonadal activity and FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA expression. Photoperiod and water temperature in control group was exposed to natural conditions. Photoperiod and water

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

To suitable storage and use of sperm, cryopreservation condition and survival rate and activity of thawed sperm investigated. The survival rate and activity in thawed sperm were high using 5% and 10% glucose as the diluent and DMSO as cryoprotectants.

To production of fertilized egg, hormonal induced ovulation was attempted in females with an average vitellogenic oocyte diameter of at least 400  $\mu$ m. Induce of ovulation occurred to following HCG (500 IU/kg BW) injection. Eggs were stripped successfully 24–48h after the injection. Stripped fertilized eggs of blacktip grouper *E. fasciatus* were colorless spheres, 700–800  $\mu$ m in diameter, with a 160–170  $\mu$ m oil globule. Hatching began about 28h after fertilization. Yolk absorption was completed within 48h and the mouth open about 72h after hatching.

In the development of larvae and juveniles, the newly hatched larvae measured 1.2 mm TL. At 2 DAH, the larvae reached 2.4 mm TL. At 12 DAH, the larvae reached 5.4 mm TL and the dorsal fin developed. At 22 DAH, the larvae reached 10.5 mm TL and began metamorphosis to post larvae stage. At 45 DAH, the larvae reached 22.4 mm TL and transferred to juvenile stage. At 60 DAH, the juvenile fish reached 30.2 mm TL and showing features with those of the adult fish.

At 29 DAH, the number of gastric glands and pyloric ceca were observable. The muscular layer of the posterior stomach was increased in size and formed the pyloric sphincter, which separated the stomach from the anterior intestine. At 34 DAH, the canine-like pharyngeal tooth occurred in the buccopharyngeal cavity and the stomach size and the numbers of gastric glands continually increased. Blacktip grouper larvae developed a well-differentiated digestive system with a functional stomach at about 29 DAH. Weaning of blacktip grouper larvae to formulated feeds was started on 29 DAH at 25°C when the functional stomach, pyloric sphincter, and pyloric ceca were formed.

## I. 서론

홍바리, *Epinephelus fasciatus*는 농어목(Perciforme) 바리과(Serranidae)에 속하는 어종으로 우리나라의 제주도를 비롯한 남해안 일부 연안, 일본 중부이남, 중국, 필리핀 등 온대 및 아열대 지역의 외양과 접한 해역에 분포한다. 바리과(Serranidae) 해산종은 15속에 159종으로 보고되고 있으며(FAO, 1993), 제주연안에는 홍바리, *E. fasciatus*를 비롯한 자바리 *E. bruneus*, 능성어 *E. septemfasciatus*, 구실우럭 *E. chlorostigma*, 닳줄바리 *E. poecilonotus*, 붉바리 *E. akaara*등 10여종이상 분포하고 있다(Kim et al., 2005). 바리과 어류는 한국을 비롯하여 일본, 중국 등 동남아시아 지역에서 식용어로서 기호도가 높고 고가어종이나 최근 남획 등으로 인하여 자원량이 급감하고 있어, 국가 상호간 공동연구 및 기술협력 등 다양한 자원관리 정책 방안이 제시되고 있다.

바리과 어류의 자원 회복관리를 위해 일본, 중국, 대만, 필리핀 등 동남아시아 국가를 중심으로 어미관리와 성 성숙 유도 및 성 전환 등 번식생리 특성 그리고 수정란 생산과 초기 사육관리 등 종묘생산에 관한 연구가 진행되고 있으며(Chen et al., 1977; Fukuhara, 1989; Sugama and Ikenoue, 1999; Tsuchihashi et al., 2003a, b; Song, 2004; Alam et al., 2006), 미국과 호주 지역에서도 바리과 어류의 성숙과 성 전환에 관한 자원생물학적 연구들이 진행되고 있다(Shapiro et al., 1993; Ferreira, 1995). 우리나라에서 바리과 어류의 양식에 관한 연구는 1993년부터 능성어 *E. septemfasciatus*, 자바리 *E. bruneus*, 붉바리 *E. akaara*에 대한 종묘생산 기술개발을 시도하였으나 건강한 수정란을 안정적으로 확보하는데 아직까지 애로사항이 많다(Kim et al., 1997; Hwang et al., 1998; Song, 2004; Oh, 2006).

세계적으로 바리과 어류의 양식은 60%이상 자연산 치어를 채포하여 축양하는 형태로 이루어지고 있으며(Sadovy et al., 2003), 국내에서도 대부분이 남해안에서 자연산 치어를 채포하여 사육하고 있는 실정이다. 바리과 어류는 자성선숙형의 성 특성과 종 특이적 산란행동으로 사육수조 내에서 수정란 확보에 어려움이 많다. 바리과 어류를 포함한 어류의 성숙과 산란은 생식 내분비계에 의하여

조절되지만, 이들의 성숙 조절을 유도하는 것은 주로 환경요인으로 광주기와 수온이 성 중추 활동을 강하게 제어한다(De Vlaming, 1972, 1975; Nishi and Takano, 1979; Asahina and Hanyu, 1983; Baek and Lee, 1985; An, 1995). 어류의 생식소 발달과 산란은 수온과 광주기 조건들이 단독적인 작용보다는 상호 보완적 작용을 하며, 종에 따라 그 범위가 각각 다르게 나타난다(Donaldson and Hunter, 1983; Shimizu, 2003; Hermelink et al., 2011; Kanemaru et al., 2012). 따라서 수온과 광주기 조절을 통한 양식대상 어류의 성성숙 유도 및 수정란 생산이 시도되고 있으나, 양식대상 어류의 상용화를 위해서는 건강한 수정란의 안정적 공급이 필수적이다. 이를 위해 배우자세포의 미세구조적 연구(Gwo et al., 1994; Garcia-Diaz et al., 1999) 및 번식 내분비에 관여하는 유전자 탐색과 발현(Li et al., 2005; Kanemaru et al., 2012)에 관한 연구들이 진행되고 있고, 앞으로 바리과 어류의 양식 상용화를 위해서는 번식생리 특성 탐색과 그 특성 이용을 통한 상용화 연구개발이 요구되고 있다.

이 연구는 바리과 어류인 홍바리, *Epinephelus fasciatus* 양식 상용화를 위해 홍바리의 성 특성, 환경조절을 통한 성 성숙제어, 난과 정자의 미세구조적 특징, 정자 동결보존, 수정란 및 종묘생산, 자·치어 발달 등 번식생리 특성에 관한 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어

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

### 2. 번식생리 특성

#### 1)성 특성

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

#### 2)배우자 특성

##### (1)정자의 미세구조적 특성

이 연구에 사용한 재료는 순환여과식 수조에서 사육중인 성숙한 어미(전장,  $39.6 \pm 1.5$  cm, 체중,  $1.06 \pm 0.94$  kg)를 복부압박과 cannulation 방법으로 정소를 적출하였다. 주사형 및 투과형 전자현미경 관찰을 위한 시료는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 완충용액인 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde에 4℃에서 2시간 전고정 하였으며, 2% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) 고정액으로 4℃에서 2시간 후고정 하였다. 시료는 ethanol 농도 상승순으로 탈수한 후 propylene oxide로 치환하여 epon-araldite 812 mixture에 포매하였다. 포매시료는 LKB ultramicrotome으로 70~80 nm 두께로 초박절편



Fig. 1. Broodstock management of *Epinephelus fasciatus*.

을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 70 KV 하에서 투과형(JEM 100CX-2) 전자현미경으로 관찰하였다. 주사형 전자현미경 관찰을 위한 시료는 critical-point로 건조한 후 platinum으로 도금하여 주사형(JSM-6700F, JEOL) 전자현미경으로 검경하였으며, 정자 세포소기관의 측정치는 평균과 표준편차로 나타내었다.

## (2)인공수정 전·후 난문의 미세구조적 변화

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

## 3)번식 내분비 특성

### (1)성 성숙 유도 및 제어 인자 탐색

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

(hypothalamus), 뇌하수체(pituitary)와 주변조직인 간(liver), 신장(kidney), 생식소(gonad) 등을 적출하여 조사하였다.

## (2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

홍바리의 각 부위에서 적출한 50~100 mg의 조직들은 1.5 mL tube에 크기 별로 300~500  $\mu$ L의 TRI Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 사용한 시약의 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 그 농도를 측정하였고, 흡광도 비율(A260/A280)이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 샘플만을 선택하여 실험에 이용하였다. cDNA 제조는 각 조직에서 추출한 total RNA 1  $\mu$ g을 주형으로 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 역전사 시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT Primer 1  $\mu$ L, PrimeScript™ RT Enzyme mix 1  $\mu$ L 그리고 5 $\times$ PrimeScript™ Buffer 4  $\mu$ L를 첨가하였고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20  $\mu$ L가 되도록 조절하였다. 37°C에서 15분간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85°C에서 5초간 가열하여 합성을 중단하였다. 합성된 cDNA는 각 유전자의 cloning 및 mRNA 발현 분석에 사용되었다.

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

생식선자극호르몬 유전자 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit의 부분염기서열 분리를 위한 degenerated primer는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 보고된 자바리, *E. bruneus* (Accession number, FSH $\beta$ : EF583919, LH $\beta$ : EF583920)와 Honeycomb grouper, *E. merra* (Accession number, FSH $\beta$ : AB525770, LH $\beta$ : AB525771)의 유전자 정보를 참고로 제작하였으며, FSH $\beta$ 의 증폭용 primer는 FSH $\beta$ F primer (5'-TGGT(A/T)GTCATGGCAGCAGTG-3')와 FSH $\beta$ R primer (5'-A(G/T)ACAGCTGGGT(A/G)TGTCTCC-3')를 사용하였다. LH $\beta$ 의 증폭용 primer는 LH $\beta$ F primer (5'-TCAACCAGAC(A/C)GTGTCTCTG-3')와 LH $\beta$ R primer (5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGA(C/T)G-3')를 사용하였다.

PCR 반응은 1  $\mu$ L의 cDNA를 주형으로 Go Taq Green Master Mix (Promega, USA)와 Primer 세트 그리고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 25  $\mu$ L이 되도록 조절하여 94°C에서 2분간 열변성 후 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1분을 35회 반복하여 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel를 이용한 전기영동으로 확인하여 정제하였다. 정제된 각각의 증폭 유전자 산물은 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation하여 plasmid DNA를 만든 후, JM109 competent cell (Takara, Japan)에 형질 전환하였다. LB agar (Sigma, USA) 고체배지를 이용해 37°C에서 12시간 동안 배양된 clone 중 3개를 선택하여 LB broth (Sigma) 액체 배지에서 37°C에서 10시간 동안 cell을 대량으로 배양하였다. 그 후 cell로부터 plasmid DNA를 정제하여 유전체 분석기관(Genotech, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

각 유전자의 전염기서열은 SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, USA)를 이용하여 분리하였으며, 5'과 3' cDNA 단편을 위한 종 특이적 primer는 확인된 부분염기서열 정보를 이용하여 합성하였다. 제작된 FSH  $\beta$ 와 LH  $\beta$  subunit의 5'과 3' cDNA 단편 증폭용 primer set는 다음과 같다:

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

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

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

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

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

#### (4) 구조적 및 계통발생학적 분석

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

#### (5) RT-PCR

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

primer는 아래와 같이 합성하였다:

rtFSH $\beta$ F (5'-CATCTGACCAGCATCAGCAT-3')

rtFSHR (5'-TGGATATGTCTCCAGGAAAGC-3')

rtLH $\beta$ F (5'-AGGTCGGCAGAGTGATGTTC-3')

rtLH $\beta$ R (5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGATG-3')

rt18sF (5'-GATCAATTGGAGGGCAAGTC-3')

rt18sR (5'-CCTCCGACTTTCGTTCTTGA-3')

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

### 3. 성 성숙 유도

#### 1) 환경조절을 통한 성 성숙 유도

사육환경 조절을 통한 성 성숙을 유도하기 위해 제주대학교 해양과환경연구소 실험수조에서 순치·사육관리하고 있는 홍바리 어미를 대상으로 12시간 명기 12시간 암기 (12L:12D)의 광조건을 지속적으로 유지한 대조구와 13L:11D에서 14L:10D의 광조건으로 변화시킨 실험구로 나뉘었고 수온은 22 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 이후 수온에 의한 영향을 조사하기 위해 대조구와 처리구의 수온을 실험 시작 9주후부터 22 $^{\circ}$ C에서 25 $^{\circ}$ C로 상승 시킨 후 유지시켜 주었다(Fig. 2). 사육환경 조절에 따른 실험어의 생식소 발달과 성숙 유도 효과를 조사하기 위해 생식소중량지수(GSI, gonadosomatic index)의 변화와 생식소 발달 양상을 조직학적 방법으로 조사하였다. 생식소중량지수는 다음과 같은 방법으로 구하였다.

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

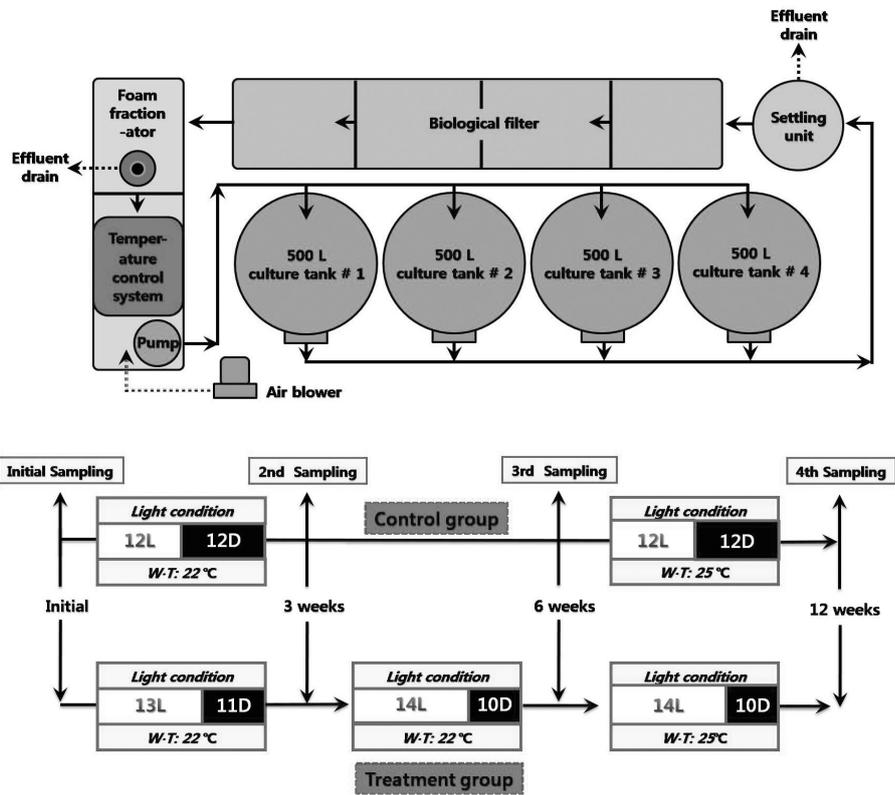


Fig. 2. Recirculating rearing system of schematic diagram and environmental control (photoperiod and water temperature) scheme to sex maturation of *Epinephelus fasciatus*.

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

## 2) 성 성숙 제어 사육시스템

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

환경조절에 따른 실험구들간의 생식생리인자의 활성을 조사하기 위해 실험어의 뇌하수체를 적출한후 300  $\mu\text{L}$ 의 TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 사용하여 농도를 측정하였으며, A260/A280 nm의 비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 샘플만을 선택하여 실험에 이용하였다. cDNA제조는 각 조직의 total RNA 0.5  $\mu\text{g}$ 을 주형으로

PrimeScript<sup>TM</sup>RT reagent Kit(Takara,Japan)을 이용하여 역전사시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT Primer 1  $\mu$ L, PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme mix 1  $\mu$ L 그리고 5 $\times$ PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4  $\mu$ L를 첨가하였고 Nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20  $\mu$ L이 되도록 조절하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85 $^{\circ}$ C에서 5초간 가열하여 합성을 중단하였다.

실험구별 생식생리인자의 활성은 생식소자극호르몬 유전자 (FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit)의 mRNA 발현량을 Quantitative Realtime RT-PCR 방법으로 조사하였다. 실험에 사용된 primer는 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  각각의 염기서열을 참고로 하여 특이적 primer를 제작하였으며(Table 1), quantitative Real-time RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq II kit (Takara)를 사용하였다. cDNA 3  $\mu$ L를 template로 하여 SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ L, primer ste 1.0  $\mu$ L, nuclease-free water 8.5  $\mu$ L를 각각 첨가하여 총 25  $\mu$ L의 volume으로 반응하였다. Quantitative Real-time RT-PCR은 CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하였으며, 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 initial denaturation, 95 $^{\circ}$ C에서 5초간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing과 elongation 하였으며 40 cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 3반복으로 수행되었으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량 하였다.

Table 1. Primer sets used of quantitative Real-time RT-PCR of FSH $\beta$ , LH $\beta$  and 18s rRNA in *Epinephelus fasciatus*

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

#### 4. 정자 동결보존 조건과 해동정자의 운동성

##### 1) 정자 동결보존 조건

정자 동결보존 실험은 실내수조에서 자연적 성 전환된 홍바리의 정액을 채취하여 실시하였다. 정액 채취는 배정이 확인된 홍바리를 대상으로 HCG (Human chorionic gonadotropin, Calbiochem Co., USA) 500 IU/kg BW로 등지느러미 제 1극 아래 부분 근육에 주사 후 24~48시간째에 복부를 압박하여 채정하였다. 정액은 1.5 ml 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box (2~4℃)에 보관하였다. 홍바리 정자 동결보존을 하기 위한 정자 동결보존에 적합한 희석액(diluent)과 동해방지제(cryoprotectant)를 탐색하기 위하여 2가지 희석액과 2가지 동해방지제를 사용하였다. 희석액은 glucose와 marine fish ringer solution (MFRS)을 사용하였으며, 동해방지제는 dimethylsulfoxide (DMSO)와 Test Yolk Buffer (TYB, Irvine Scientific)를 사용하였다(Table 2). 정액과 희석액의 삼투압 농도와 pH는 각각 삼투압 측정기 (The Advanced™ Osmometer)와 pH 측정기 (Mettler Toledo)를 이용하여 조사하였다.

##### 2) 해동정자의 운동성

정자 동결보존 과정에서 동해피해 방지를 위한 각각의 희석액과 동해방지제 종류의 혼합비율은 Song (2004) 등의 방법을 응용하여 설정하였다(Table 3). 모든 실험구의 평형시간은 1분 이내로 하였고 정자 냉동에는 0.5 ml 용량의 정자보존용 straw를 이용하였다. 각 실험에서 정자가 주입된 0.5 ml 정자보존용 straw를 액체질소 증기(-76℃)로 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다. 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 7일간 저장한 후 30.0±0.5℃의 항온수조를 이용하여 10초 이내에 해동시켰다.

동결보존 후 해동된 정자의 운동성 평가는 각 실험구별 정자를 해동 후 자연해수와 1:9의 비율로 희석한 후 Integrated Semen Analysis System (ISAS)를 이용하여 운동성을 7~10회 측정하여 평균을 구하였다. ISAS 프로그램을 이용한 동결정자 운동성 평가는 정자 운동성에 따라 A그룹부터 D그룹까지 4단계로 나누어 평가하였다(Table 4). 그리고 동결정자의 해동 후 운동성 비교

는 각 실험구의 A그룹 정자의 직선경로속도(VSL, straight line velocity), 평균경로속도(VAP, average-path velocity), 곡선경로속도(VCL, curvilinear velocity), 곡선경로 선형도(LIN, linearity) 그리고 선형운동도(STR, straightness)를 조사하였다(Fig. 3). 해동 후 시간 경과에 따른 정자운동성 평가는 신선정자와 동결정자 실험구를 대상으로 시간 경과에 따른 운동성을 조사하였다.

Table 2. Constituents of the diluents tested for cryopreservation of *Epinephelus fasciatus* sperm

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

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

Table 3. Diluents, cryoprotectant and fresh semen mixture rate for sperm cryopreservation of *Epinephelus fasciatus*

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

1)TYB: test yolk buffer; DMSO: dimethylsulfoxide

Table 4. Criteria index used to evaluate sperm motility

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

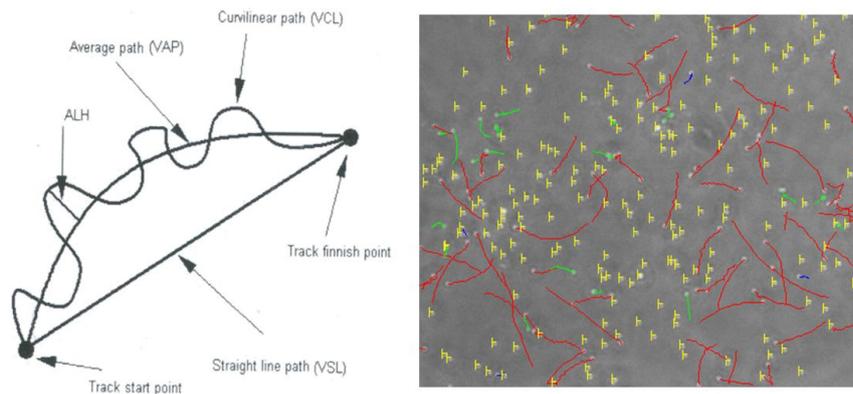


Fig. 3. Diagram and illustration used to evaluate sperm motility.

## 5. 초기발생 및 자·치어 발달

### 1) 배란 유도과 수정

환경조절을 통한 홍바리 성 성숙 유도 결과를 토대로 순환여과 사육시스템의 원형 사육수조(4.5×1.2 m, 유효수량 20 ton)에 순치·사육관리 하고 홍바리를 대상으로 cannulation 방법을 이용하여 성 성숙 단계를 조사하였다. 실험어는 200~300 ppm의 2-phenoxyethanol에 마취시킨 후 외부 생식공의 발달 정도에 따라 실험어를 선택하여 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 하였다. 난 성숙과 배란 유도를 하기위해 400  $\mu\text{m}$  이상 난모세포를 가진 어미를 선별하였다(Fig. 4).

Cannulation 방법을 이용하여 선별된 성숙유도가 가능한 암컷을 대상으로 태반성 성선자극호르몬(HCG, Sigma Co., USA)을 사용하여 배란을 유도하였다. HCG는 생리식염수에 용해 후 500 IU HCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 호르몬 주사 후 24-48시간 경과 후 배란을 유도하였고, 습식법으로 인공수정 하였다(Fig. 5).

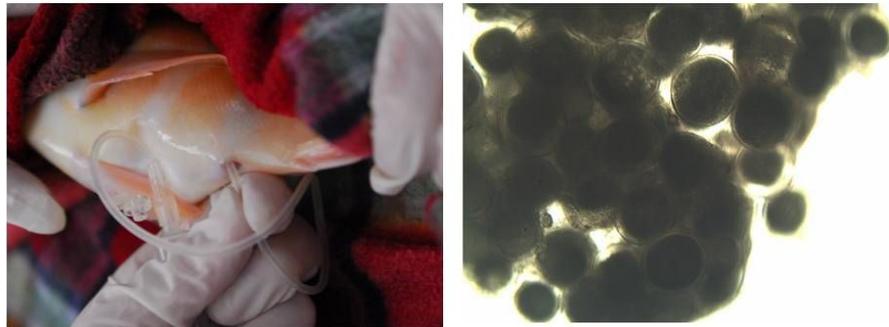


Fig. 4. Examination of sexual development in *Epinephelus fasciatus* using cannulation method.



Fig. 5. Serial view images of artificial fertilization and fertilized egg.

## 2) 초기 난발생

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

## 3) 부화자어의 발달

부화된 자어를 대상으로 난황·유구 흡수율과 개구시간 그리고 행동변화를 조사하였다. 홍바리 부화자어의 난황·유구 흡수율 및 개구시간 조사는 항온실에서 20 L 아크릴 수조에 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하여 200~500개의 수정란을 수용한 뒤 부화 직후의 자어로부터 실시하였다. 난황 및 유구의 측정은 부화 직후로부터 24시간 간격으로 5~10 마리를 표본 추출하여 2-phenoxyethanol에 마취시킨 다음 광학현미경과 profile projector하에서 측정하였다(Fig. 6). 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 아래의 식으로 계산하였다.

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

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

자어의 개구시간 조사는 난황·유구 흡수율 조사 방법과 동일한 조건에서 조사하였으며, 자어의 80%가 개구된 시점을 기준으로 하였다.

## 4) 자·치어의 형태 발달과 성장

부화일수에 따른 자어의 성장변화를 조사하기 위해 실내 원형수조 ( $0.75 \times 0.75$  m, 유효수량 250 L)에서 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하여 10,000~20,000개의 수정란을 수용한 뒤 부화된 자어를 정기적으로 채집하여 조사하였다(Fig. 7). 자어의 먹이로는 Rotifer, *Brachionus* sp.를 25개체/mL 밀도로 공급하였으며, 사육수조내 Rotifer의 먹이와 수질안정을 위해 시판용 *Nannochloropsis*와 시판용 *Pavlova*를 각각  $3 \times 10^5$  cell/mL과  $2 \times 10^5$

cell/mL 농도로 매일 2회 첨가하였다. 알테미아 유생의 공급은 부화 후 22일 후부터 시판용 영양강화제를 이용하여 영양강화 시킨 개체를 1~2개체/mL의 밀도로 공급하였으며, 부화 후 25일 후부터 250  $\mu\text{m}$  이하의 어류 초기 미립자사료를 로티퍼, 알테미아와 함께 공급하였다(Fig. 8). 사육수의 용존산소 유지를 위해 산소발생기를 설치하여 사육기간중 용존산소의 농도를 10 mg/mL 이상을 유지하였으며, 부화 후 20일까지 지수식을 유지하다 20일 이후 1일 1회전의 환수를 시작하여 점차 환수량을 늘려주었다.

#### 5) 자·치어의 성장에 따른 소화관 형태 발달

##### (1) 홍바리 자·치어의 소화기관 외부형태 발달

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

##### (2) 홍바리 자·치어의 소화기관 발달양상

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

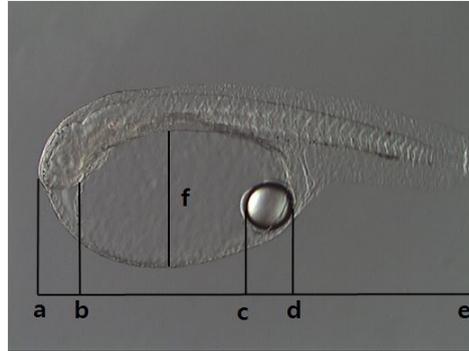


Fig. 6. Measurement of *Epinephelus fasciatus* larvae. a–e, total length; b–d, major axis of yolk; c–d, diameter of oil globule; f, minor axis of yolk.

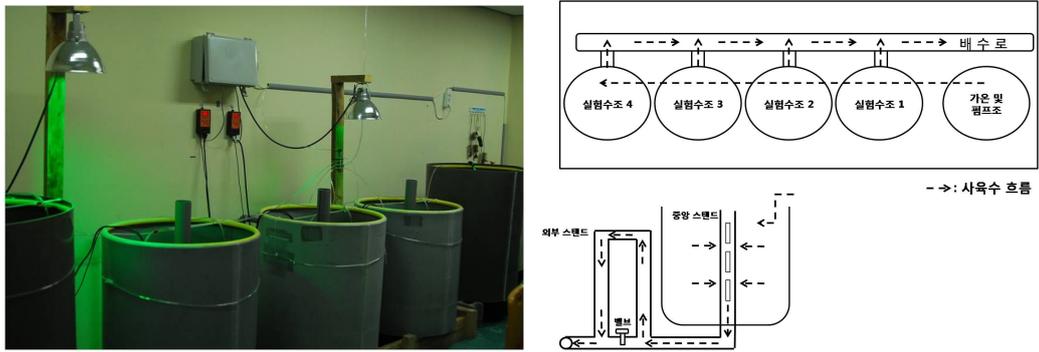


Fig. 7. Schematic diagram of rearing system of *Epinephelus fasciatus* larvae.

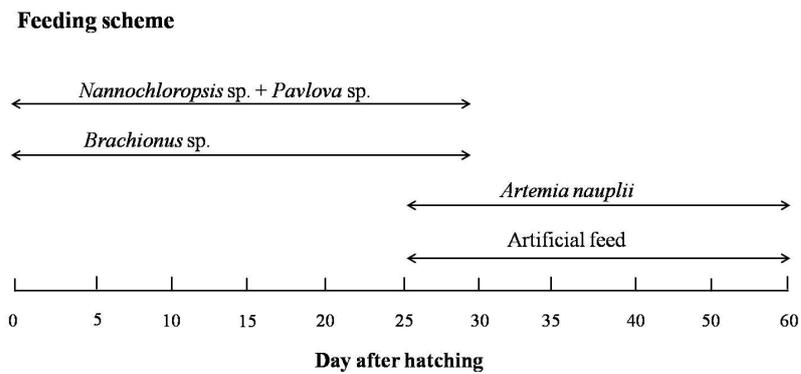


Fig. 8. Feeding scheme during the larval rearing of *Epinephelus fasciatus*.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 번식 생리 특성

##### 1) 성 특성

어획된 홍바리의 전장은 22~47 cm 범위였고, 28.0~30.9 cm 범위에 29.6%로 가장 많이 분포하였고, 31~33 cm 범위에 25.2%가 분포하였다. 그리고 체중은 100~1,190 g 범위였고, 200~390 g 범위에 41.3%, 400~590 g 범위에 31.7%가 분포하였다 (Fig. 9).

##### (1) 생식소 구조

홍바리는 다른 바리과 어류와 마찬가지로 자성선속형 자웅동체 어류로 먼저 암컷으로 성숙한 후 수컷으로 발달하는 양상을 보였다. 난소는 결합조직으로 둘러싸여 있고, 결합조직 내에 난소 내강을 이루고 각각의 소낭 선단부에 관상의 구조가 관찰되었다. 난소 내강은 난소 소낭들이 일정한 배열로 돌기형으로 구성되어 있었다. 소낭 내에는 어린 난모세포와 성장중인 유구기 난모세포들이 관찰되었다(Fig. 10A and B). 성전환 개체의 생식소는 소엽내에 퇴행하는 난모세포와 정원세포, 정모세포 무리들이 관찰되었다(Fig. 10C). 수컷의 생식소는 소엽내부에 정원세포, 정모세포, 정세포 무리들이 관찰되었고 기부에 수정관이 관찰되었다(Fig. 10D).

##### (2) 성 분포 양상

홍바리 크기별 성 출현 양상을 보면, 암컷은 전장 32~36 cm, 체중 400~900 g 범위에 출현하였고, 수컷은 전장 34~41 cm, 체중 600~1000 g에 나타났다. 간성 개체는 전장 31~35 cm, 체중 500 g 범위에서 관찰되었다 (Fig. 11). 암컷의 경우 약 30~70  $\mu\text{m}$  크기의 주변인기 난모세포와 100~120  $\mu\text{m}$  크기의 유구기 난모세포가 혼재하여 발달하고 있었다. 암컷에서 수컷으로 성전환하는 간성개체의 경우 생식소 소엽 내에 약 50  $\mu\text{m}$  크기의 어린 난모세포와 정모세포 무리들이 혼재되어 관찰되었다. 수컷의 경우 소엽내에 정원세포, 정모세포와 정세포 무리들이 발달하고 있었다(Fig. 12).

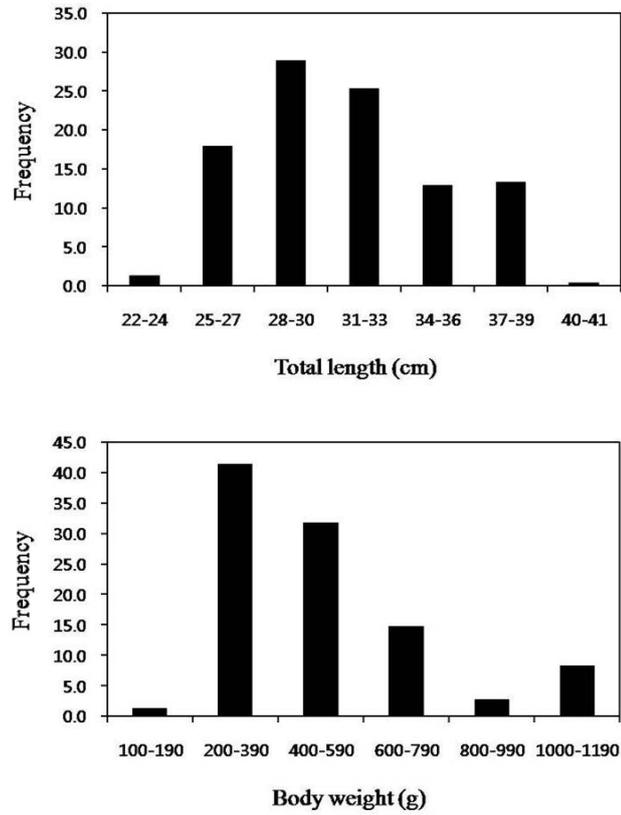


Fig. 9. Frequency in total length and body weight of *Epinephelus fasciatus*.

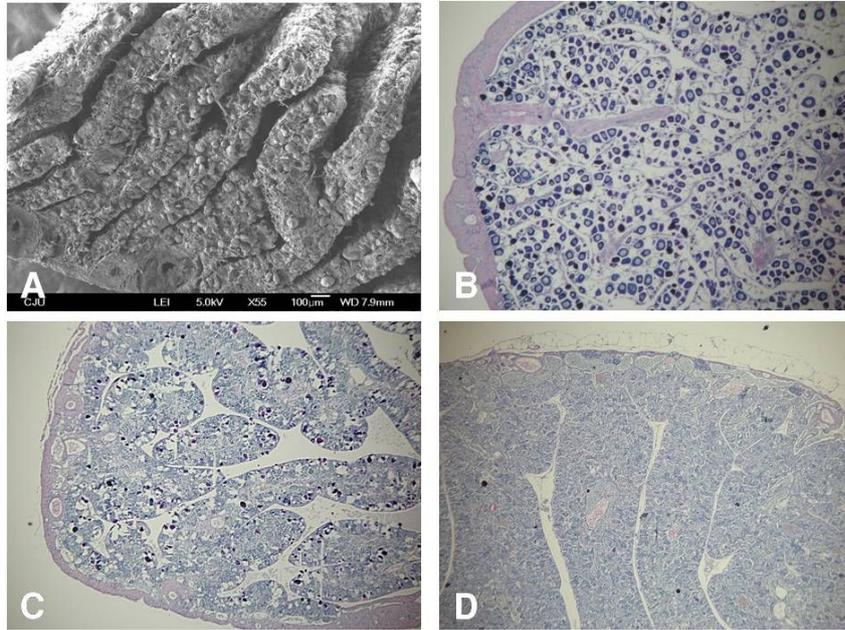


Fig. 10. Structure of gonad of *Epinephelus fasciatus*. A, scanning electron micrograph of the ovary; B, ovary; C, inter-sex gonad; D, testis.

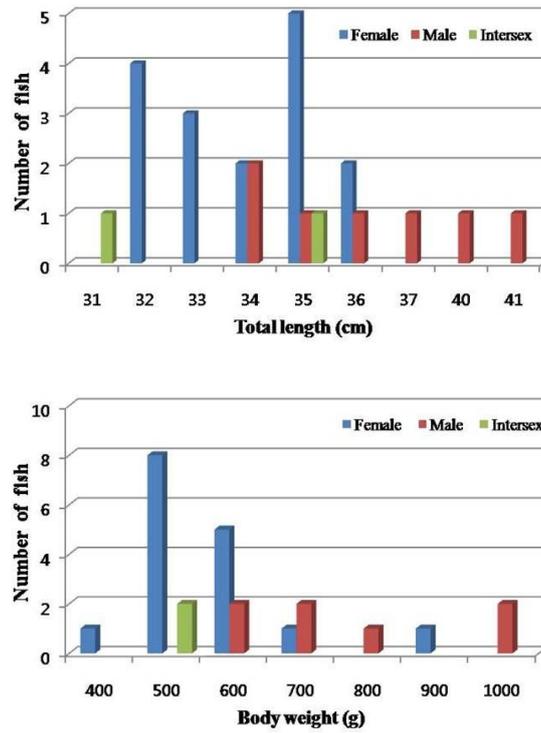


Fig. 11. Sex distribution of *Epinephelus fasciatus* according to total length and body weight.

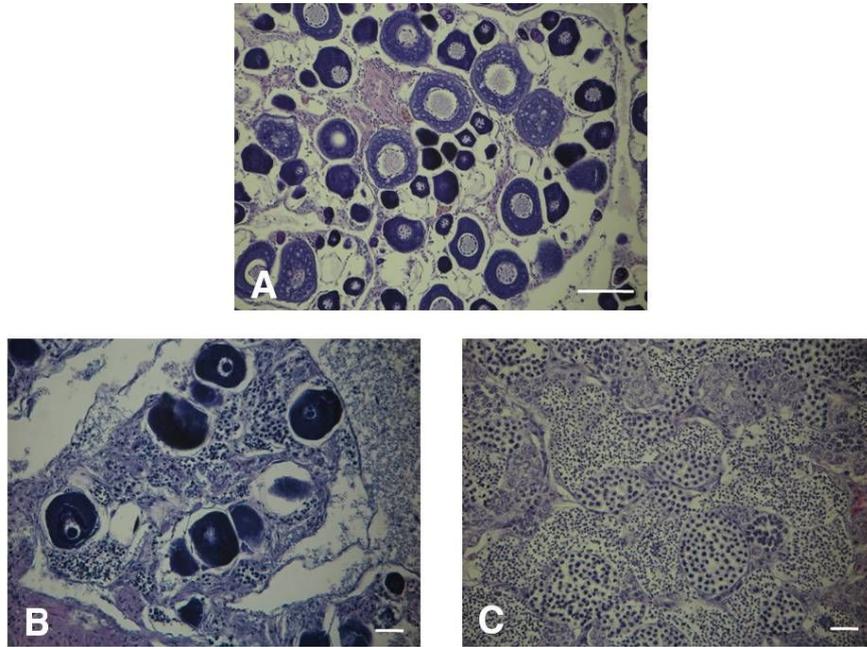


Fig. 12. Photomicrographs of gonad of *Epinephelus fasciatus*. A, female; B, inter-sex; C, male. Scale bars = 100  $\mu$ m.

## 2) 배우자 특성

홍바리 정자는 주사형 현미경으로 관찰한 결과 구형의 두부(직경  $3.27 \pm 0.53 \mu\text{m}$ ), cytoplasmic sleeve와 고리형 빈공간인 cytoplasmic canal의 입구 등을 포함한 중편부 그리고 1개의 편모에 lateral fins을 갖는 미부 등으로 구분되었다(Fig. 13A and B). 투과형 전자현미경 관찰한 결과 홍바리 정자의 핵(직경  $2.15 \pm 0.25 \mu\text{m}$ )은 구형이며, 이중막인 핵막을 갖고 있었다. 핵질은 전자밀도가 높은 이질 염색질이 과립상으로 조밀하게 분포하였고, 침체구조물은 존재하지 않으나 두부 세포질에는 막성의 vesicles이 관찰되었다(Fig. 13C). 홍바리 정자의 핵은 centriolar complex에서 기원하는 osmophilic filament로 centriolar complex와 서로 연결되어 있고, 또한 편모와 핵은 수직 (Fig. 13D) 또는 평행 (Fig. 13E)으로 놓여 있으며, 이 부위에는 핵막이 함몰되어 핵강(nuclear fossa)을 관찰할 수 있었다. 홍바리 정자의 핵 후방부 편모 선단부에는 proximal centriole과 distal centriole이 osmophilic filament로 연결되어 서로 수직으로 놓여 있다. 또한 distal centriole 하단부에는 osmophilic basal plate가 1개의 면 형태로 관찰되며 편모와 연결된다 (Fig. 14A). 홍바리 정자의 proximal centriole과 distal centriole의 횡단면 미세구조는 9개의 osmophilic spoke을 갖는 수레바퀴 형태로 각각 “9+0”의 미세소관 축사구조이다 (Fig. 14B and C). 홍바리 정자의 중편부는 cytoplasmic canal을 중심으로 편모와 구형의 8~9개 미토콘드리아 (직경  $0.74 \pm 0.09 \mu\text{m}$ )를 갖는다 (Fig. 14C and D). 홍바리 정자의 중편부 횡단면과 종단면의 관찰 결과 편모를 중심으로 cytoplasmic sleeve 원형질막 사이에 길이가  $0.91 \pm 0.27 \mu\text{m}$ 이며 너비가  $0.36 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 인 좌우에 2개의 빈공간인 cytoplasmic canal 모양의 구조를 갖는다 (Fig. 14E). 홍바리 정자의 necklace는 편모 선단부 cytoplasmic canal과 접하는 편모 원형질막에 전자밀도가 높은 7~8개의 구형 입자 형태로 존재하였다 (Fig. 14F). 홍바리 정자의 편모는 어류에서 일반적으로 관찰할 수 있는 1개의 편모를 갖는 uniflagellate 정자이며, 편모축사의 미세구조는 1쌍의 중심 미세소관과 이를 둘러싸는 9쌍의 주변 미세소관으로 구성된 전형적인 “9+2”의 축사구조이었다 (Fig. 14G). 홍바리 정자 편모에는 크기와 모양이 다양한 lateral fin이 존재하며, lateral fin 내부에는 전형적인 “9+2”의 축사구조와 막성의 vesicle 등이 관찰된다(Fig. 14H).

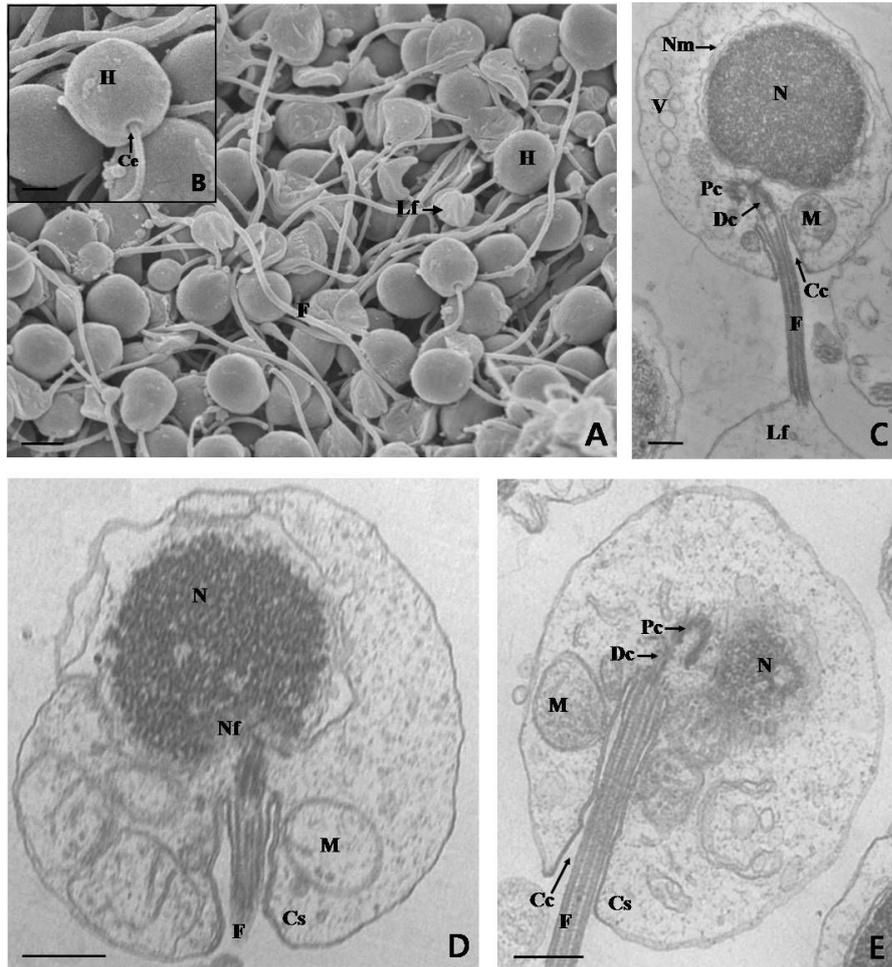


Fig. 13. A scanning electron and transmission electron micrographs of *Epinephelus fasciatus* spermatozoa. A and B, scanning electron micrographs of spermatozoa. Scale bar=2.0  $\mu\text{m}$ . C, transmission electron micrographs of spermatozoon. Scale bar=1.0  $\mu\text{m}$ ; D, the nucleus lies perpendicular to the flagellar axis. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; E, the nucleus lies parallel to the flagellar axis. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ . Cc, cytoplasmic canal; Dc, distal centriole; H, head; F, flagellum. Lf, lateral fin; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Pc, proximal centriole; V, vesicle.

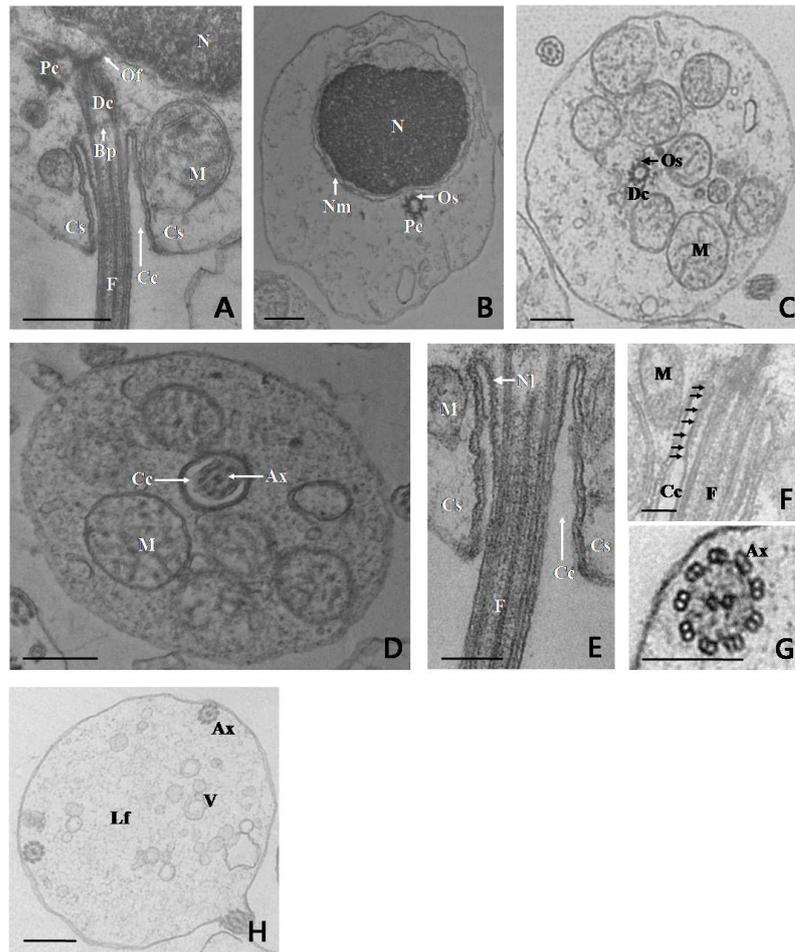


Fig. 14. A transmission electron micrographs of *Epinephelus fasciatus* spermatozoon. A, the longitudinal section; B, proximal centriole (Pc) showing nine osmophilic spoke (Os) of wagon wheel type. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; C, proximal centriole (Pc) showing nine osmophilic spoke (Os) of wagon wheel type. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; D, cross section of midpiece. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ ; E, cytoplasmic canal (Cc). Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; F, necklace particles (arrows). Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; G, axoneme (Ax) of spermatozoa flagellum. Scale bar=0.2  $\mu\text{m}$ ; H, lateral fin (Lf) of spermatozoa flagellum. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$ . Ax, axoneme; Bp, basal plate; Cc, cytoplasmic canal; Ce, cytoplasmic canal entrance; Cs, cytoplasmic sleeve; Dc, distal centriole; F, flagellum; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Nl, necklace; Of, osmophilic filament; Pc, proximal centriole; V, vesicle.

홍바리 미수정란의 난문은 동물극에 1개가 존재하였다(Fig. 15A). 난문(직경  $6.6 \pm 0.41 \mu\text{m}$ )은 원통형의 분화구형태(Fig. 15B)로 vestibule과 canal로 구성되었고, vestibular ridge의 구조는 시계방향으로 6~7개의 나선형 고리구조로 관찰되었다(Fig. 15C). 홍바리 난문의 vestibule 구조는 시계방향으로 6~7개의 나선형 고리구조가 관찰되어 바리과 어종간에 상이하였다. 홍바리 미수정란의 난문 주변부에는 크기가 다른  $0.15 \sim 0.55 \mu\text{m}$ 의 pore들이 동심원상으로 혼재되어 개구된 형태로 관찰되었고, pore들은 230~270개가 존재하였다(Fig. 15B). Pore 내부에는 어류 아가미의 filament와 유사한 돌기가 방사상으로 분포하였고(Fig. 15D), 전 난막 표면에 존재하는 pore의 가장자리와 주변부에는 고리형과 불규칙한 돌기형 nodule이 관찰되었다(Fig. 15E). 수정 후 난문의 vestibular ridge가 활성화 되어 뚜렷한 형태를 보였고(Fig. 16A), 부풀어 용기가 되면서(Fig. 16B), 돔(dome)형의 수정구(fertilization cone)로 분화 형성되었다(Fig. 16C). 난문 주변부와 난막 표면에 존재하는 pore들이 닫히는 현상을 관찰할 수 있었으나 nodule들은 관찰할 수 없었다(Fig. 16D).

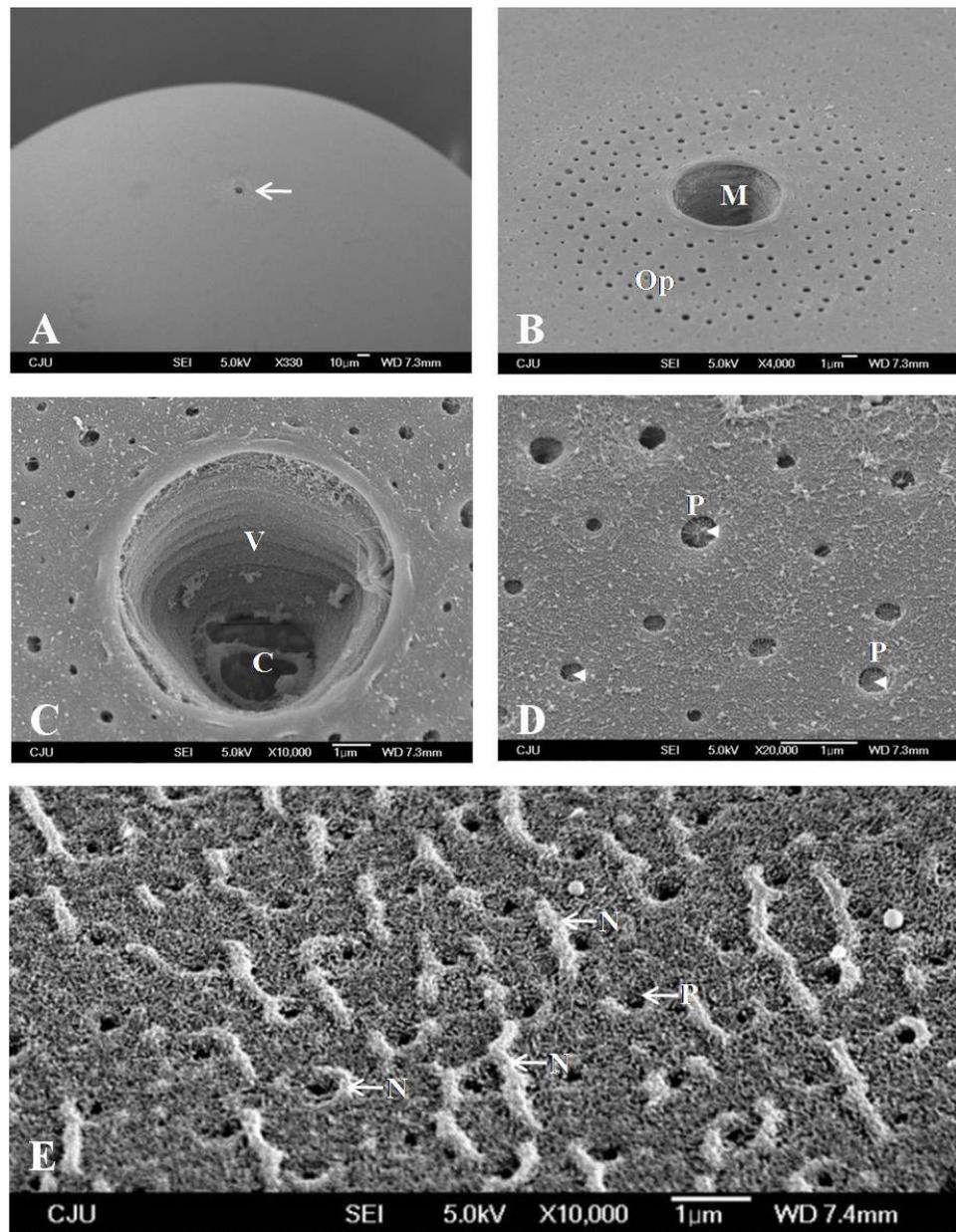


Fig 15. A scanning electron micrograph of the unfertilized egg. A, micropyle (arrow) in the animal pole; B, the opening pores (Op) distributing only around the unfertilized egg micropyle (M); C, the micropyles consisted of vestibule (V) and canal (C). The vestibule presented a clockwise 6–7 spiral arrangement; D, the various pores (P) in the unfertilized egg. Note gill filament–shape projection structure (arrowheads); E the chorionic surface showing pores (P) and nodules (N) in the unfertilized egg.

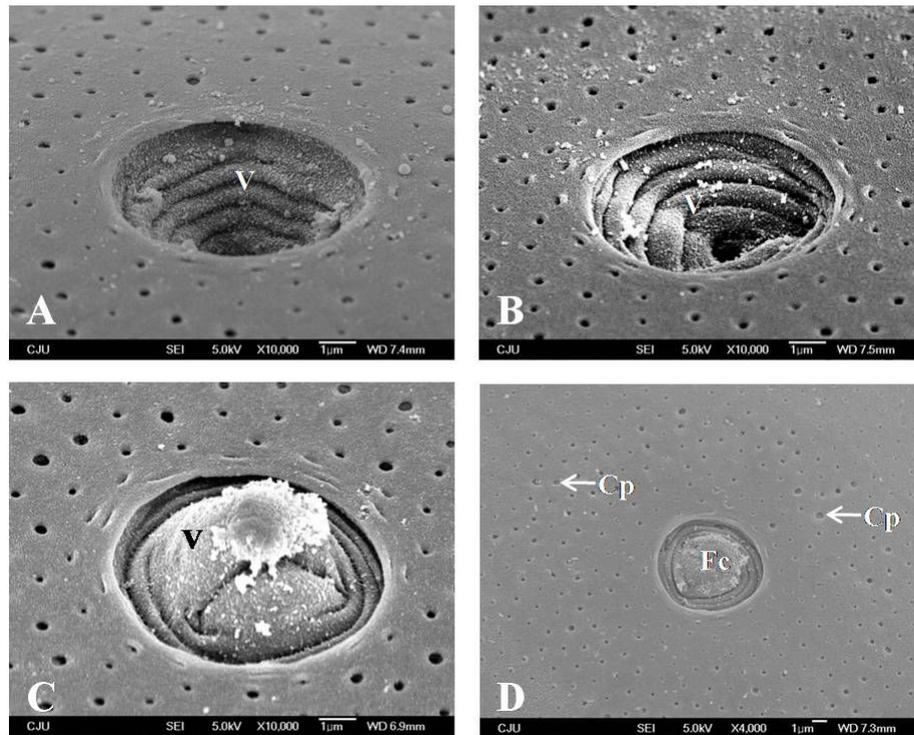


Fig. 16. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule. A, the micropylar vestibule (V) appeared as a thickened structure by activation; B, the micropylar vestibule exhibited swollen structure; C, micropylar vestibule (V) showing dome-shaped structure; D, the closed pores (Cp) distributed around the fertilization cone (Fc) of the fertilized egg.

### 3) 번식 내분비 특성

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

홍바리 뇌하수체로부터 증폭한 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA를 cloning하여 전염기서열을 분석한 결과, FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA 길이는 각각 571 bp와 617 bp이었다. FSH $\beta$  cDNA의 ORF 길이는 360 bp이었으며, 5' untranslated region (UTR)과 3' UTR의 길이는 각각 102 bp와 106 bp이었다. LH $\beta$  cDNA의 ORF 길이는 441 bp이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 30 bp와 143 bp이었다(Fig. 17). 홍바리 FSH $\beta$  subunit 단백질 구조는 SignalP V3.0 프로그램(Nielsen et al., 1997; Dyrlov et al., 2004)을 사용하여 확인해 본 결과, 21 amino acid (aa)의 신호 펩티드(signal peptide)와 99 aa의 성숙 펩티드(mature peptide)가 구성되어 총 120 aa에 코드(code) 되었고, 홍바리 LH $\beta$  subunit은 각각 32 aa의 신호 펩티드와 115 aa의 성숙 펩티드가 합쳐진 총 147 aa에 코드 되어 단백질을 구성하였다. 대부분의 진핵생물의 mRNA등에서 관찰되는 것처럼, 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 의 polyadenylation signal (AATAAA)은 polyadenylation site (poly A tail)의 시작 위치로부터 각각 14 bp와 20 bp 상류 쪽에 위치하였다.

홍바리의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열은 이미 NCBI에 등록된 다른 어종들의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열들과 비교하였다(Fig. 18). 그 결과 홍바리를 포함한 조사된 모든 종들의 아미노산 서열에서 각각 12개의 cysteine이 동일한 위치에 나열되고 있음을 확인하였다. 조사된 다른 어종의 FSH $\beta$  아미노산 서열과는 다르게 홍바리 FSH $\beta$ 는 자바리 FSH $\beta$ 와 함께 N-linked glycosylation site가 존재하지 않았으나, 홍바리 LH $\beta$ 에서는 자바리(*E. bruneus*) LH $\beta$ 를 포함한 조사된 모든 어종들의 LH $\beta$  아미노산 서열 중의 N-linked glycosylation site의 위치와 동일하게 존재하였다. 각각의 어류들과의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열의 상동성을 비교해 본 결과, 홍바리 FSH $\beta$ 는 같은 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 참다랑어(*Thunnus thynnus*)와 77%의 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인 철갑상어(*Acipenser spp.*)와 32%의 낮은 상동성을 나타내었다. 홍바리 LH $\beta$ 의 경우는 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 유럽산 농어(*Dicentrarchus*

*labrax*)와 91%의 가장 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인 철갑상어와 45~49%의 낮은 상동성을 나타내었다. 분류체계에서 그 외 다양한 어종들 간의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  아미노산 서열들의 상동성 비교는 Table 5에 자세히 나타내었다. 중간 계통유연관계에 관한 분석에서도 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 는 동일한 농어목의 어류들과 가장 가까운 유연관계를 보였다(Fig. 19).

(A)

```

GCTGCTACAGATGTTACAGAGCAACAGAAACAAGACGTGCAACTGAGGGTCCAAGC 60
AACAAACGGAGCTCTACAGTGTCTGACGTGAGACCTGCGGACGATGCAGCTGGTTGTCATG 120
      M Q L V V M
      -21
GCAGCAGTGTGGCACTGGCGGGGGGGGGCGGGTTGCCACTCCGACTGCCATCTGACC 180
A A V L A L A G A G P G C H S D C H L T
      -1 1
AGCATCAGCATCCCTGTGGAGAGCTGCGGCCACACCGAGTACATCTACACCACCATATGT 240
S I S I P V E S C G H T E Y I Y T T I C

GAAGGACAGTGTACCACAAGGATCCGGTCTACATCGGCCCTGATGACTGGGCTGAACAG 300
E G Q C Y H K D P V Y I G P D D W A E Q

AAAGTCTGCAACGGGACTGGACCTATGAGGTGAAACACTTCCAAGGATGTCAGTGGGC 360
K V C N G D W T Y E V K H F Q G C P V G

GTCACCTACCCCTGTGGCCAGAACTGCAAGTGCACGGCATGTAACGAGGAAACACGTAC 420
V T Y P V A R N C K C T A C N A G N T Y

TGGGGCGCTTTCCTGGAGACATATCCAGCTGTCTGTCTTTAAAGAAACCGTCCGTC 480
C G R F P G D I S S C L S F *
      99
CTACGTTGACTTATATCTTTATGTACATGACTTGTATTTAAATAAAACAGGTATCCC 540
TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 571

```

(B)

```

AGCACACTGCOCTGCAGACACTAGAGAATCATGGCTGTACAGGTGCGCAGAGTGTGTTTC 60
      M A V Q V G R V M F
      -32
CCTTTGATGTTGAGTTTGTCTCTGGGAGCCTCATCTCCATTTGGTCTCTGGCTCCTGCA 120
P L M L S L F L G A S S S I W S L A P A

GCGGCCTTCCAGCTGCCCCCTGCCAACTCATCAACCAGACAGTGTCTCTGGAGAAGGAA 180
A A F Q L P P C Q L I N Q T V S L E K E
      -1 1
GGCTGTCCAAGTGTCAACCGGTGGAACAACCATCTGCAGCGGTCACTGCATTACAAG 240
G C P K C H P V E T T I C S G H C I T K

GACCCGTGCATCAAGATACCAATTCAGCAATGTGTACCAGCATGTGTGCACGTACCGGGAC 300
D P V I K I P F S N V Y Q H V C T Y R D

TTGTACTACAAGACATTTGAGCTTCTGACTGTCTCTGGGCTGGACCGACTGTCAACC 360
L Y Y K T F E L P D C P P G V D P T V T

TACCCCGTGGCTTTGAGCTGTCACTGTGGGCGCTGTGCCATGGACACATCTGACTGCACC 420
Y P V A L S C H C G R C A M D T S D C T

TTCGAGAGCCTGCAGCCCACTTTTGCATGAATGACATACCTTTCTACTACTAGTCTCAA 480
F E S L Q P N F C M N D I P F Y Y *
      115
GCAATAGCAGCATTAAATCACATTAATAAACTGGGTTTACATTCAGCATCAACTGTTGTA 540
ATAAAAGAGTGTACATTCACCAAGTGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 600
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 617

```

Fig. 17. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* FSH $\beta$  (A) and LH $\beta$  (B) subunits. The nucleotide numbers are shown on the right-hand side of sequence, and the amino acid residue number below the amino acid sequence. Amino acids are given as single capital letters below the cDNA sequences. The first amino acid of the putative mature subunit is numbered +1. Amino acids that comprise the predicted signal sequence are underlined with minus numbers. The stop codon indicated by an asterisk. Possible polyadenylation signal (AATAAA) is marked by a black box. GenBank accession numbers: blacktip grouper FSH $\beta$ , JF520407; blacktip grouper LH $\beta$ , JF520408.



Fig. 18. Alignments of amino acid sequences of the FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* and other actinopterygian species using Clustal W multiple sequence alignment program (Thompson et al., 1994). Twelve conserved cysteines are shaded. The putative N-linked glycosylation sites are boxed. Aa, *Anguilla anguilla* (European eel); Ob, *Odontesthes bonariensis* (Pejerrey); Ci, *Ctenopharyngodon idella* (Grass carp); Ef, *Epinephelus fasciatus* (Blacktip grouper); Eb, *Epinephelus bruneus* (Longtooth grouper); Tt, *Thunnus thynnus* (Northern bluefin tuna); Po, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder); Om, *Oncorhynchus mykiss* (Rainbow trout); Cg, *Clarias gariepinus* (North African catfish); As, *Acipenser sinensis* (Chinese sturgeon).

Table 5. The homologies of amino acid sequences of *Epinephelus fasciatus* FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits in comparison with those of FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits from the other fish

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

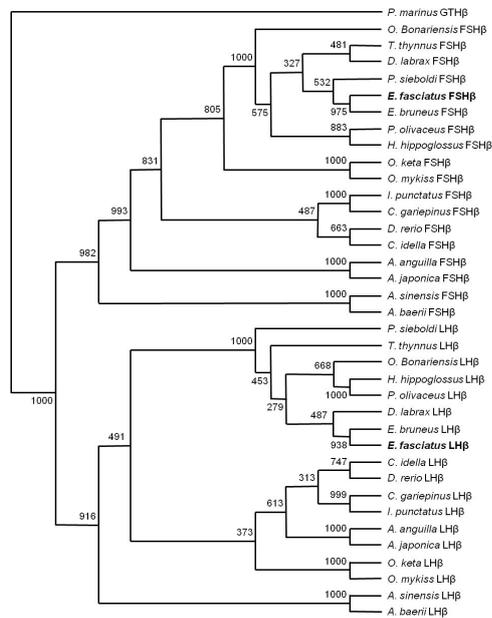


Fig. 19. Phylogenetic analysis of teleost FSH $\beta$  and LH $\beta$  subunits based on amino acid sequence. The *Petromyzon marinus* GTH $\beta$ -like protein was used as an outgroup to root the tree. Analysis was performed using the neighbor-joining method. The values at nodes are bootstrap values estimated by 1000 replications.

## (2) 조직별 FSH $\beta$ 및 LH $\beta$ mRNA 발현

홍바리의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체, 간, 신장 및 생식소 조직 등에서 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA는 주로 뇌하수체에서 강하게 발현하였으나, 반면에 중추신경조직 중의 후엽에서는 LH $\beta$  mRNA가 약하게나마 발현하였고 그 이외의 조직들에서는 거의 발현되지 않았다. 또한 RT-PCR 반응과정 중에 genomic DNA에 의한 PCR 증폭 오류는 RT-PCR 반응 시 역전사 효소를 넣지 않은 negative control에서 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  mRNA의 발현을 통해 검정하였다. 그 결과 genomic DNA 증폭이 전혀 없었음을 확인하였다(Fig. 20).

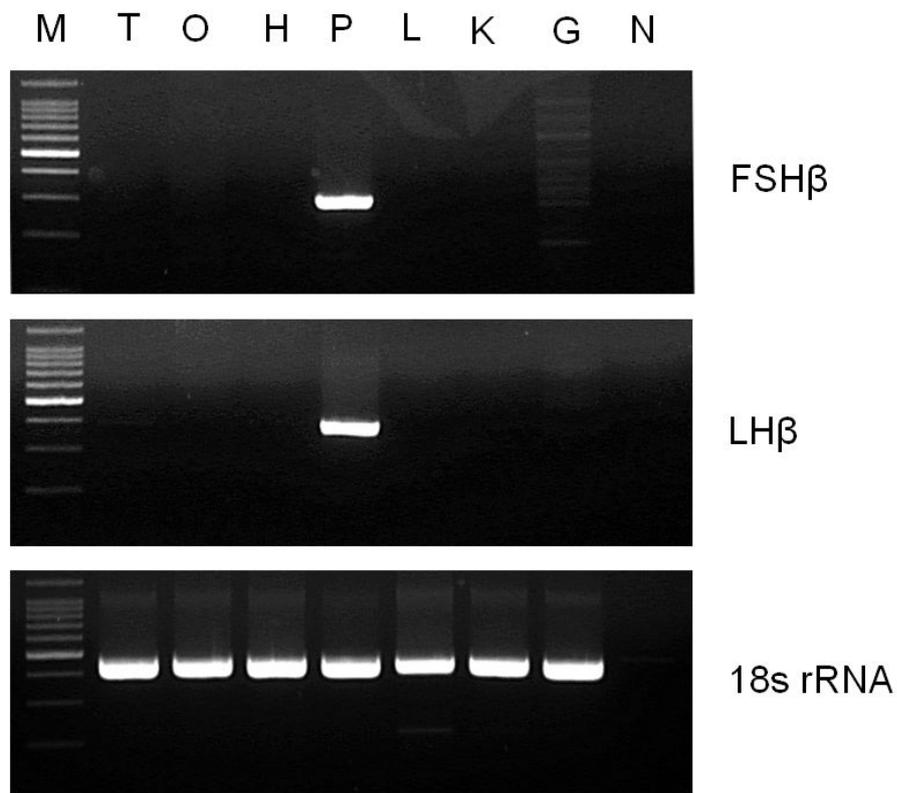


Fig. 20. The tissue specificity of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA expression analyzed by RT-PCR. 100 ng of total RNA each from telecephalon (T), optic tectum (O), hypothalamus (H), pituitary (P), liver (L), kidney (K) and gonad (G, ovary) was subjected to RT-PCR for FSH $\beta$  (32 cycles) and also 18s rRNA (28 cycles) which served as a reference of the loading amount of total RNA for each tissue. PCR products of cDNAs were revealed by 1% agarose gel electrophoresis. N, negative control; M, marker of 100 bp DNA ladder.

## 2. 성 성숙 유도

### 1) 환경조절을 통한 성 성숙 유도

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

### 2) 성 성숙 제어 사육시스템

실험 시작 시 실험어의 생식소중량지수(GSI)는  $0.40 \pm 0.23$ 이었고, 생식소는 난소소엽내 약  $30 \sim 80 \mu\text{m}$  크기의 주변인기 난모세포만 관찰되는 미성숙 단계였다. 처리 12주 후 대조구와 처리구 I의 GSI는 각각  $0.30 \pm 0.22$ ,  $0.50 \pm 0.15$ 이었고, 생식소는 주변인기 난모세포와 유구기 난모세포들이 관찰되었다. 그러나 처리구 II의 GSI는  $3.40 \pm 1.74$ 로 대조구와 처리구 I보다 높은 값을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 또한 처리구 II의 실험어 생식소는  $30 \sim 40 \mu\text{m}$ 의 어린 난모세포들과  $150 \sim 180 \mu\text{m}$ 의 유구기 난모세포들 그리고  $320 \sim 400 \mu\text{m}$  크기의 성숙 난모세포들이 난소 소엽내에 혼재되어 발달하고 있었다(Fig. 23, 24).

FSH $\beta$  mRNA 발현량은 실험시작과 실험 종료 후 모든 처리구간에 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ ). 그러나 LH $\beta$  mRNA 발현량은 처리구 II가 대조구와 처리구 I에 비해 유의적인 높은 경향을 보였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 25).

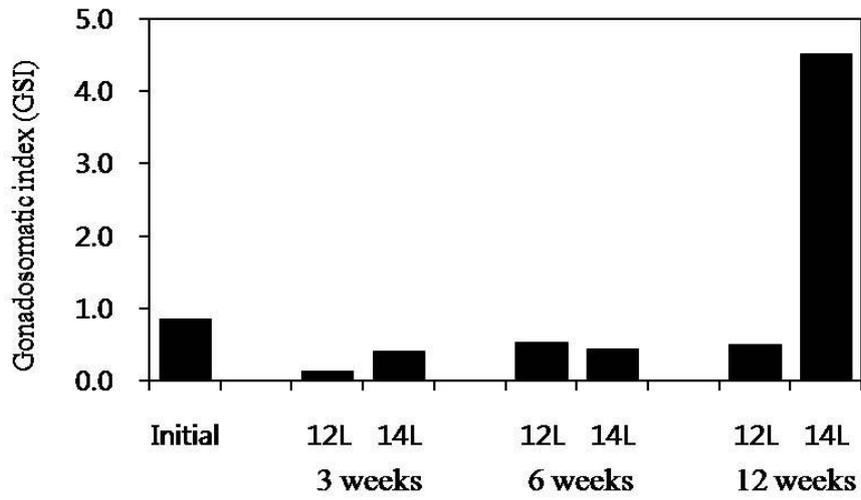


Fig. 21. Gonadosomatic index (GSI) change of female *Epinephelus fasciatus* in control and treatment group during experimental period.

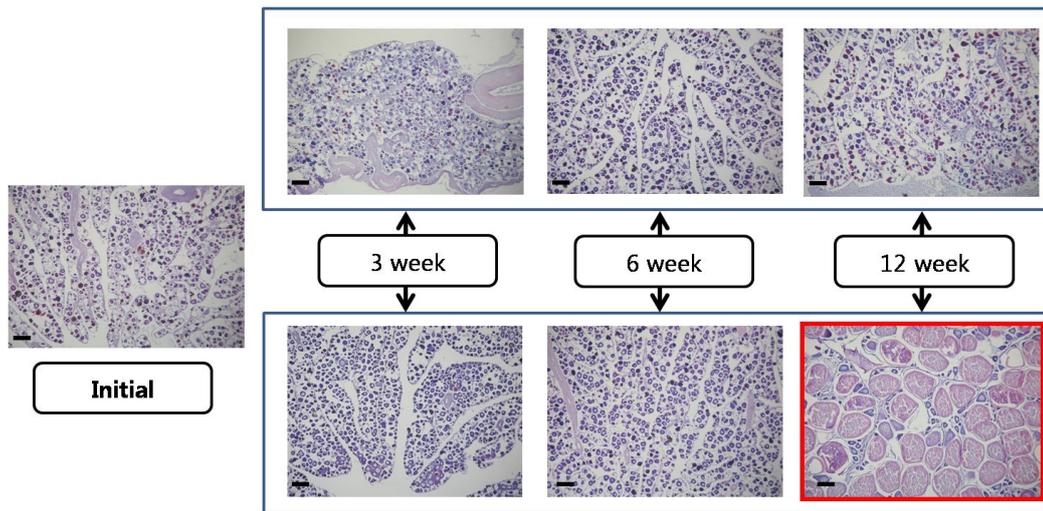


Fig. 22. Photomicrographs of ovarian development in female *Epinephelus fasciatus* during experimental period.

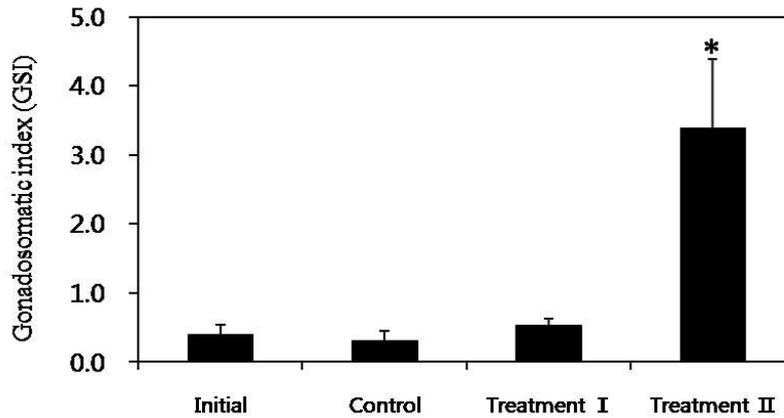


Fig. 23. Gonadosomatic index (GSI) change of female *Epinephelus fasciatus* in control and treatment group during experimental period. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control and treatment group ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

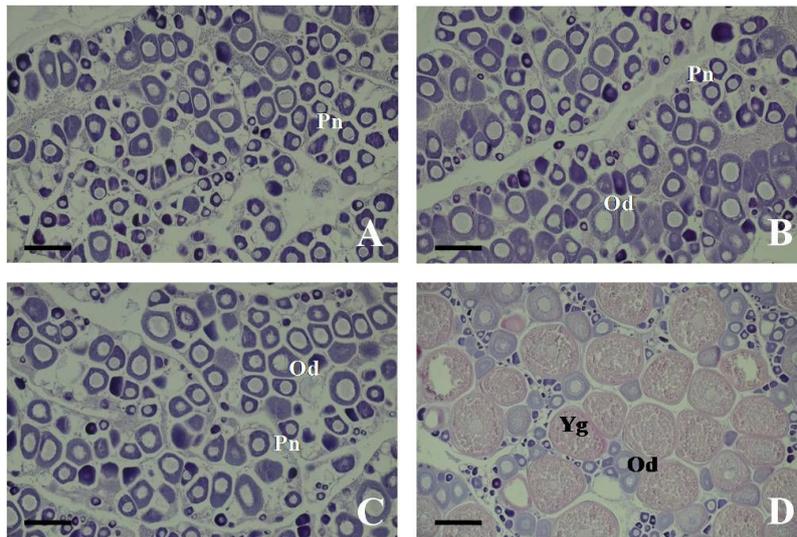


Fig. 24. Photomicrographs of ovarian development in female *Epinephelus fasciatus*. A, initial group; B, control group; C, treatment I group; D, treatment II group. Od, oil-droplet stage; Pn, peri-nucleolus stage; Yg, yolk globule stage. Scale bar=200  $\mu\text{m}$  (A to C) and 400  $\mu\text{m}$  (D).

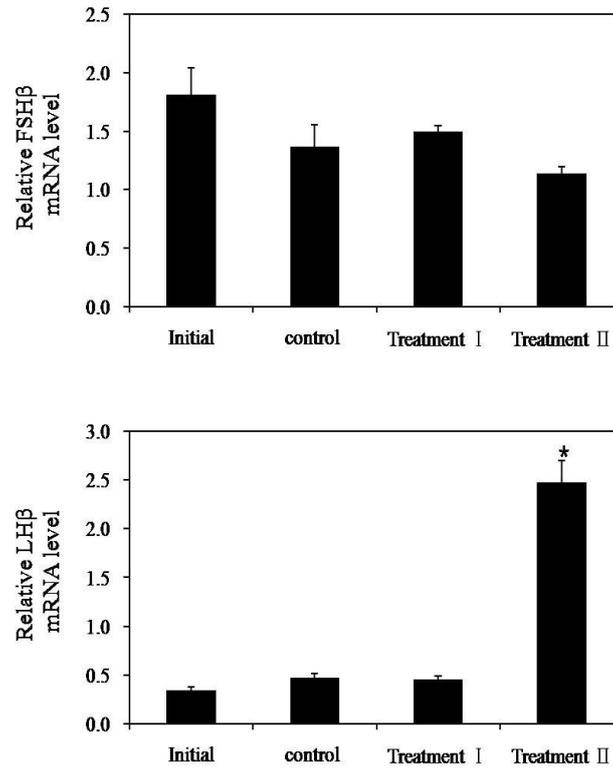


Fig. 25. FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA levels in the pituitary of female *Epinephelus fasciatus* under different treatment conditions. Asterisk on columns indicate significant difference comparison with control and treatment groups ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.E.

### 3. 정자 동결보존 조건과 해동정자의 운동성

#### 1) 혈장과 희석액의 물리적 특성

홍바리 혈장의 pH는 7.69, 삼투압 농도는 360 mOsm/kg이었다. 그리고 동결보존에 사용한 2.5% glucose, 5.0% glucose, 10.0% glucose와 MFRS의 pH는 각각 6.40, 6.81, 7.39, 7.55이었고, 삼투압 농도는 145, 288, 585, 483 mOsm/kg이었다(Table 6).

#### 2) 신선정자의 운동성

신선정자의 운동성 조사결과 실험 시작시 수정에 참여하는 것으로 생각되는 A class와 B class 정자 비율은 각각 51.8%와 5.8% 이었다. 이후 10분 경과 시 A class와 B class 정자 비율이 각각 53.6%와 11.2%로 가장 활발한 운동성을 보였다. 이후 점차 운동성이 감소하기 시작하여 1시간 30분 경과 후 운동성은 A class와 B class 정자 비율이 각각 8.3%와 4.2% 로 가장 낮은 운동성을 나타내었다(Table 7). 곡선경로속도(VCL) 조사결과 시작시 65.2  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 64.6  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 59.9  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 직선경로속도(VSL) 조사결과 시작시 21.4  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 30.0  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 14.2  $\mu\text{m/s}$ 이었다. 평균경로속도(VAP) 조사결과 시작시 36.8  $\mu\text{m/s}$ 이었으며, 10분 경과 시 44.9  $\mu\text{m/s}$ 로 가장 빠른 속도를 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 29.7  $\mu\text{m/s}$ 이었다(Fig. 26, Table 8). 신선정자의 곡선경로 선형도(LIN) 조사결과 시작시 32.9%이었으며, 10분 경과 시 46.5%로 가장 높은 값을 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 23.7%이었다. 선형운동도(STR, straightness) 조사 결과 시작시 58.2 %이었으며, 10분 경과 시 66.9%로 가장 높은 값을 보였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 47.9%이었다(Fig. 27, Table 8)

Table 6. Osmolarity and pH of seminal plasma of *Epinephelus fasciatus* and diluents used for cryopreservation

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

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

Table 7. Change of fresh sperm motility in different groups according to the time course

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

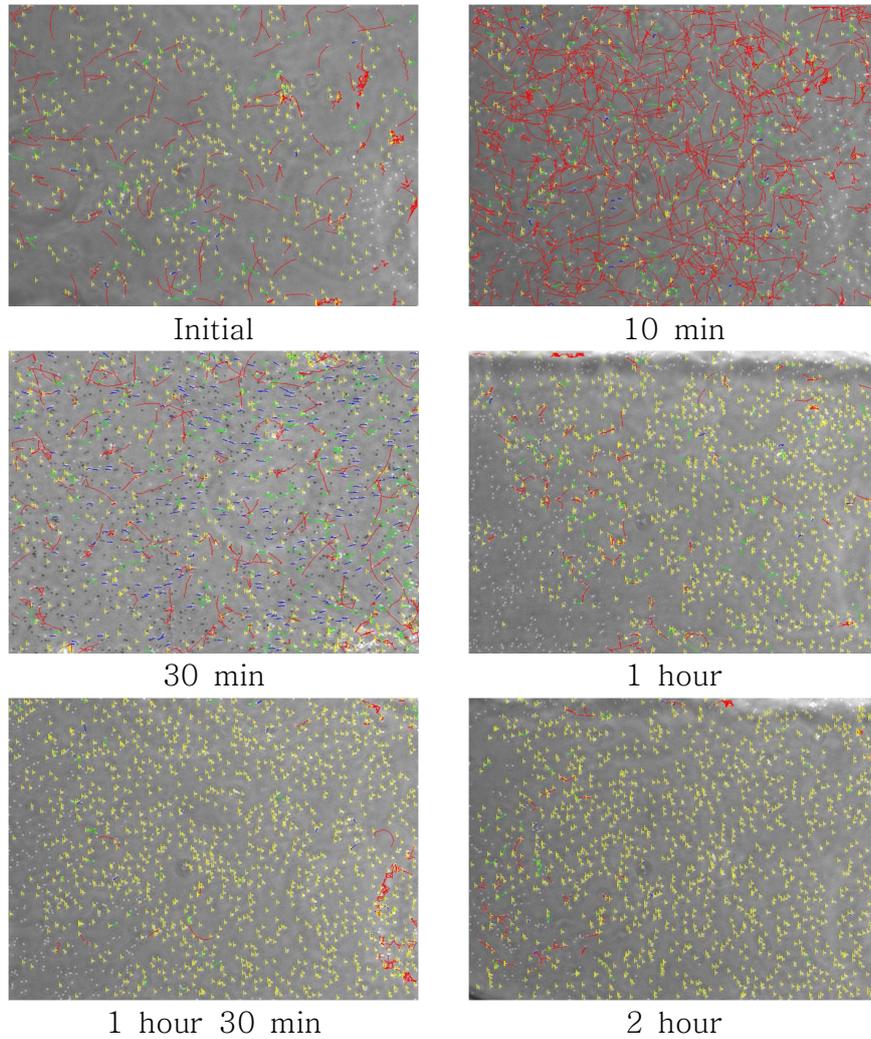


Fig. 26. Change in fresh sperm motility of *Epinephelus fasciatus* according to the time course.

Table 8. Fresh sperm motility according to the time course

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

### 3) 냉동정자의 해동 후 운동성

냉동정자의 해동 후 운동성 조사결과 GDS II와 GDS III 실험구에서 가장 양호하였다. GDS II와 GDS III 실험구의 해동 후 운동성을 조사한 결과 각각 A class 정자 비율은 각각 56.8%와 50.6% 이었다. 그리고 MDS와 MTS 실험구의 정자 운동성은 각각 29.1%와 25.0%이었다. GDS I의 정자 운동성은 각각 11.6%로 가장 낮았다(Table 9). 대부분 냉동정자의 해동 후 운동성 지속 시간은 30분 이내였으며, 실험구 중 가장 오랫동안 생존한 실험구는 GDS III 실험구 이었다. 신선정자의 운동성 지속시간은 2시간 이상 생존하였다.

### 4) 냉동정자의 해동 후 시간 경과에 따른 운동성

냉동정자의 해동 후 시간경과에 따른 운동성은 가장 양호한 실험결과를 나타낸 GDS III 실험구를 대상으로 조사하였다. GDS III 실험구의 시작시 수정에 참여하는 것으로 생각되는 A class와 B class 정자 비율은 각각 45.4%와 17.2% 이었다. 이후 30분 경과 시 A class와 B class 정자 비율이 각각 50.6%와 14.5%로 가장 활발한 운동성을 보였다. 이후 점차 운동성이 감소하기 시작하여 1시간 경과 후 운동성은 A class와 B class 정자 비율이 각각 14.1%와 5.9%로 가장 낮은 운동성을 보였다(Table 10). GDS III 실험구의 해동 후 정자 운동성 조사 결과 곡선경로속도(VCL) 조사결과 시작시 55.2  $\mu\text{m}/\text{s}$  이었으며, 1시간 경과 시 64.6  $\mu\text{m}/\text{s}$ 이었다. 직선경로속도(VSL) 조사결과 시작시 31.6  $\mu\text{m}/\text{s}$ 이었으며, 1시간 경과 시 18.5  $\mu\text{m}/\text{s}$ 이었다. 평균경로속도(VAP) 조사결과 시작시 43.5  $\mu\text{m}/\text{s}$ 이었으며, 1시간 경과 시 34.6  $\mu\text{m}/\text{s}$ 이었다(Fig. 27, Table 11). GDS III 실험구의 해동 후 정자 운동성 조사 결과 곡선경로 선형도(LIN) 조사결과 시작시 57.2 %이었으며, 10분 경과 시 43.7%로 낮아지기 시작하였다. 이후 점차 감소하기 시작하여 1시간 경과 시 28.6%이었다. 선형운동도(STR, straightness) 조사 결과 시작시 72.5 %이었으며, 이후 점차 감소하기 시작하여 2시간 경과 시 53.3%이었다(Fig. 27, Table 11).

Table 9. Change of thawed sperm motility in different groups

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

Table 10. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course

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

Table 11. Thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course

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

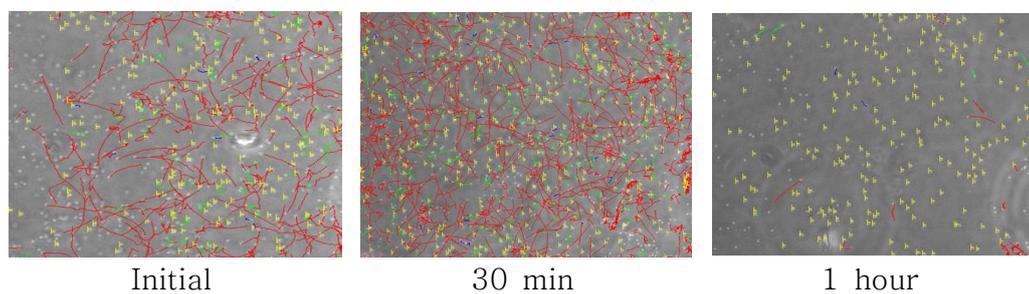


Fig. 27. Change of thawed sperm motility in GDS III groups according to the time course.

#### 4. 초기 발생 및 자·치어 발달

##### 1) 배란 유도과 수정

Cannulation 방법으로 배란유도가 가능한 7마리를 선별하였고, 배란을 유도하기 위해 500 IU HCG/kg BW 농도로 1회 근육주사 하였다. 총 7마리 개체 중 6마리가 배란이 가능하였고, 배란된 양은 187 mL 이었고, 이중 부상된 수정란은 137 mL이었다(Table 12).

##### 2) 초기 난 발생

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

Table 12. Artificial stripping of *Epinephelus fasciatus* eggs after HCG hormone injection

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

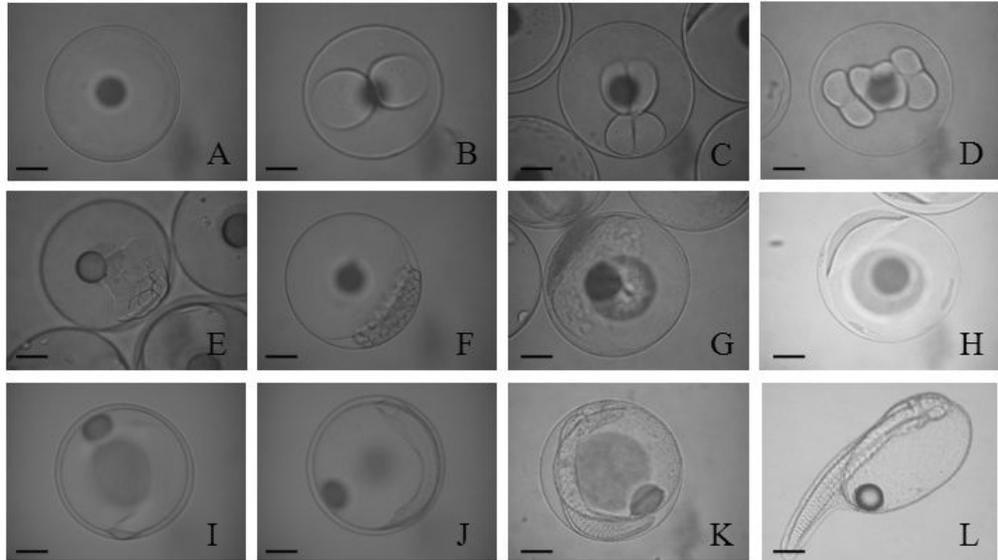


Fig. 28. Embryonic development of *Epinephelus fasciatus*. A, fertilized egg; B, 2-cell stage; C, 4-cell stage; D, 8-cell stage; E, 16-cell stage; F, morula stage; G, blastula stage; H, gastrula stage; I, early embryo stage; J, myotomes formation stage; K, lens and ear vesicle formation stage; L, hatched larval. Scale bar=150  $\mu\text{m}$  (A to K), 800  $\mu\text{m}$  (L).

### 3) 부화자어의 발달

자어의 개구시간 조사는 난황·유구 흡수율 조사 방법과 동일한 조건에서 조사하였으며, 자어의 80%가 개구된 시점을 기준으로 하였다. 수온 25℃ 조건에서 홍바리 자어의 부화일수에 따른 난황·유구 흡수율 변화는 Fig. 29와 같다. 난황 흡수율의 경우, 부화 직후 난황 용적 비율이  $0.040 \pm 0.006 \text{ mm}^3$  (100%)에서 부화 후 24시간에 47.5%, 부화 후 48시간에 15.8%로 대부분의 난황이 부화 후 48시간 이내에 흡수되었다. 유구 흡수율의 경우, 부화 직후 유구 용적 비율이  $0.001 \pm 0.0002 \text{ mm}^3$  (100%)에서 부화 후 24시간에 50%, 부화 후 48시간에 30%로 난황 흡수에 비해 다소 느리게 흡수되는 경향을 보였다. 부화 후 개구까지 걸린 시간은 난황흡수가 거의 완료된 부화 후 72시간째에 대부분 이루어졌다(Fig. 29).

### 4) 자·치어의 형태 발달과 성장

#### (1) 부화자어의 발달

부화 후 0~1일 : 몸의 대부분을 난황이 차지하고 있으며, 유구는 항문과 인접하여 난황의 끝 부분에 위치하였다. 항문은 난황에서 약간 떨어져 있으며 가늘고 일직선의 형태를 나타냈다. 대부분의 부화자어들은 수표면 또는 상층에 머물러 순간적인 움직임을 보이며 큰 활동성을 나타내진 않았다(Fig. 30A).

부화 후 3~6일 : 난황과 유구가 완전 흡수되었으며, 입이 개구되고 항문이 열렸다. 안구에 흑색소포가 침적되어 안구의 형태가 확인되었으며, 위의 상단부에 흑색소포가 나타나기 시작하여 복부전체로 확산되었다. 꼬리지느러미 부분 몸통과 막지느러미에 흑색소포가 상·하 대칭으로 나타났다(Fig. 30B, C).

부화 후 9~12일 : 등지느러미 제 2극과 가슴지느러미 극이 돌출되어 나타났다. 꼬리지느러미 부분의 흑색소포는 더욱 선명하게 짙어졌으며 막지느러미의 상부에 작은 흑색소포가 나타났다(Fig. 30D).

부화 후 22일 : 후기자어 시기로 진입하여 등과 꼬리지느러미의 기초적인 줄기가 발달하였다(Fig. 30E).

부화 후 45일 : 지느러미 분화가 완료되고, 체색이 형성되어 변태 단계를 끝내고, 자어에서 치어의 형태로 변하였다 (Fig. 30F).

부화 후 60일 : 성체의 모습과 동일한 형태를 나타냈다(Fig. 30G).

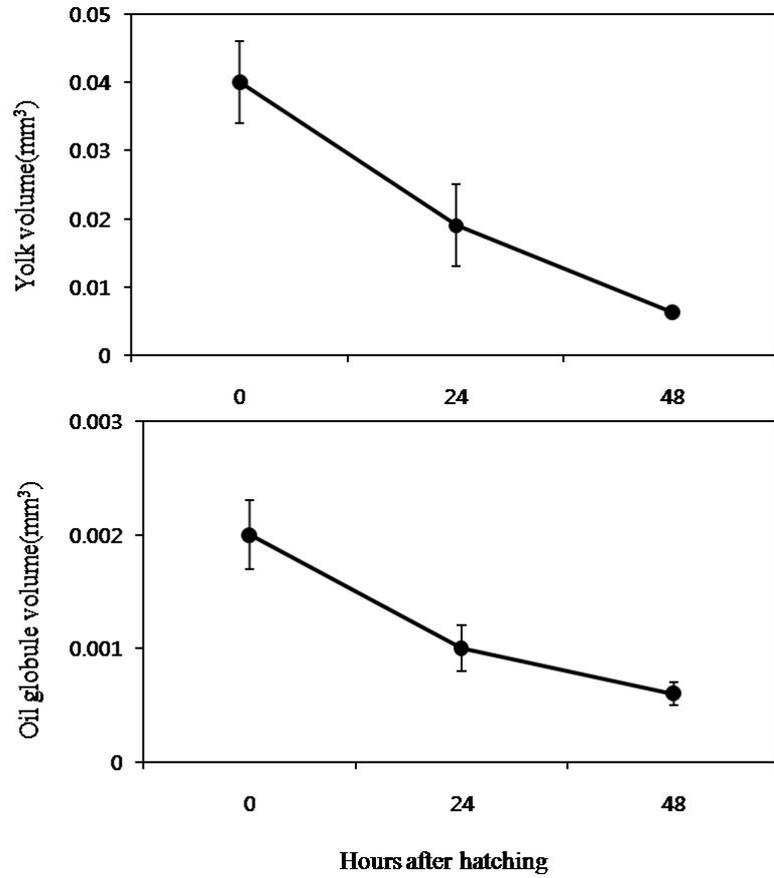


Fig. 29. Absorptions of the yolk and oil globule volume in *Epinephelus fasciatus* larvae according to the time course. Vertical bars indicate standard error of means.

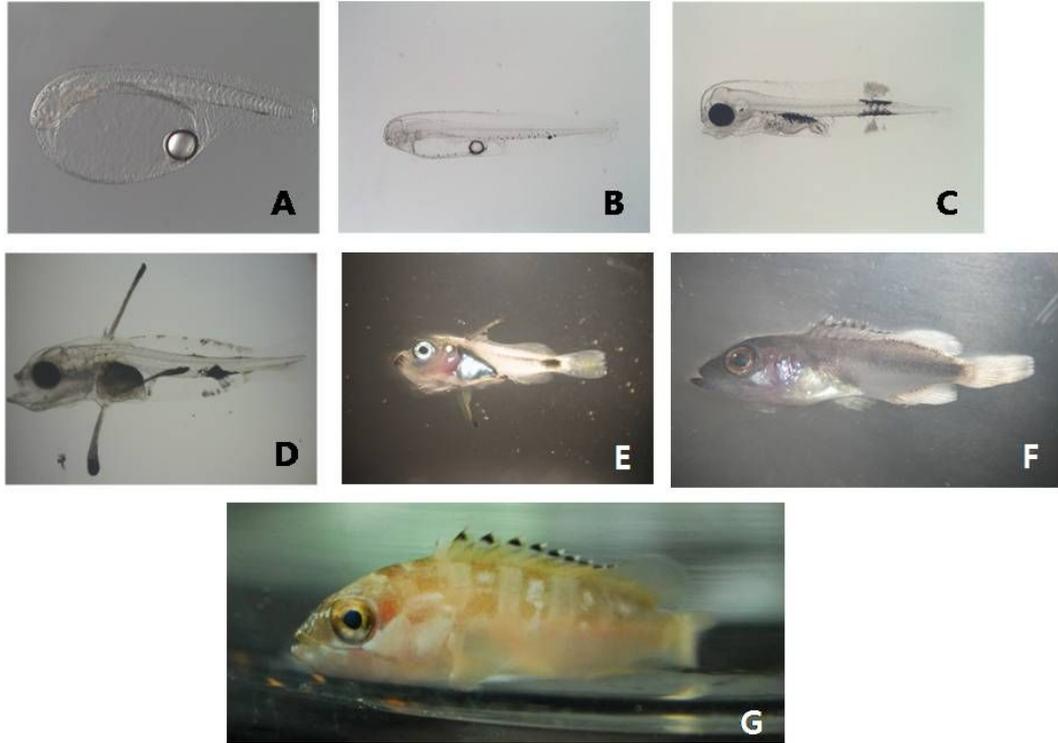


Fig. 30. External development and growth of *Epinephelus fasciatus* larvae. A, newly hatched larvae 1.5 mm TL; B, 1DAH larvae 2.4 mm TL; C, 3DAH larvae 2.7 mm TL; D, 12DAH larvae 5.4 mm TL; E, 22DAH larvae 10.0 mm TL; F, 45DAH larvae 22.4 mm TL; G, 60DAH larvae 30.2 mm TL.

## (2) 등지느러미와 배지느러미 극 발달

등지느러미 제 2극과 배지느러미 극의 출현은 부화 후 10일부터 출현하였다. 등지느러미 제 2극은 부화 후 10일째에  $616.6 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 에서 부화 후 30일에 최대  $2063.1 \pm 295.6 \mu\text{m}$ 까지 성장하였다. 배지느러미 극의 길이는 부화 후 10일째에  $676.7 \pm 19.3 \mu\text{m}$ 에서 부화 후 30일에 최대  $1648.7 \pm 292.0 \mu\text{m}$ 까지 성장하였다(Fig. 31).

## (3) 부화자어 입 크기 변화

부화 후 첫 개구시 자어의 상악장과 하악장 길이는 각각  $80.1 \pm 8.3 \mu\text{m}$ 과  $87.5 \pm 7.5 \mu\text{m}$  였으며, 부화 후 7일째 상악장  $176.2 \pm 6.7 \mu\text{m}$ 와 하악장  $200.4 \pm 15.2 \mu\text{m}$ 로 두배의 길이 성장을 하였다. 이후 급격히 증가하여 부화 후 12일째 상악장  $333.5 \pm 11.11 \mu\text{m}$ 와 하악장  $555.1 \pm 34.1 \mu\text{m}$ 에서 60일째 상악장  $2816.5 \pm 110.2 \mu\text{m}$ 와 하악장  $3101 \pm 99.4 \mu\text{m}$ 에 이르렀다(Fig. 32).

## (4) 부화자어의 성장

홍بار리 자어는 난황이 흡수가 완료되는 시점에서 머리를 바닥으로 향하여 정지상태로 수조내에 골고루 분포하다 부화 후 7일이 경과되며 정상적인 유영을 나타냈다. 자어의 먹이 섭이는 부화 후 5일째에 현미경하에서 육안으로 처음 관찰이 되었으며, 시간이 경과할수록 소화관쪽 흑색소포의 침적이 넓어져 육안으로 먹이 섭이의 확인이 어려웠다. 자어의 전장은 부화 직후 약 1.2 mm 이었으며 1일 경과 후 약 2.4 mm 크기로 급격한 변화를 보였다. 부화 후 7일까지 완만한 성장을 보이다 지느러미 극 발달이 이루어지는 12일째에 5.4 mm, 후기자어로 변태를 거치는 22일째에 10.5 mm 크기로 성장하였다. 부화 후 45일째에 자어에서 치어의 형태로 변하면서 22.4 mm 크기로 성장하였고, 부화 후 60일 이후에는 30.2 mm 크기로 성장하였다(Fig. 33).

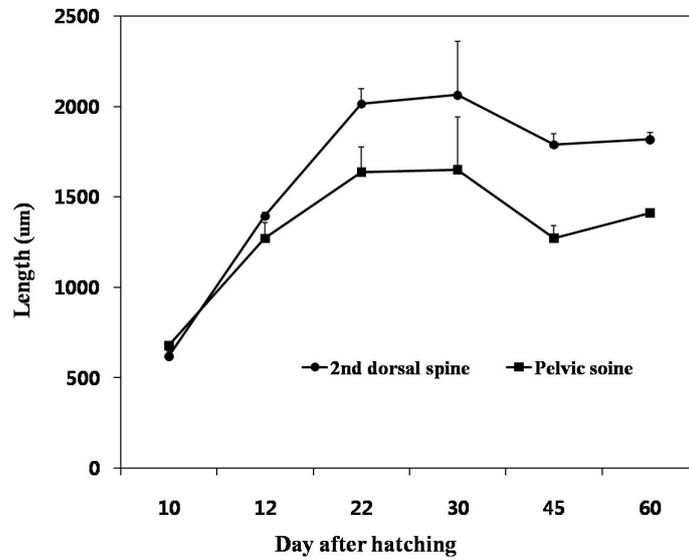


Fig. 31. Growth of the second dorsal spine and the pelvic spine by day after hatching in *Epinephelus fasciatus* larvae. Vertical bars denote standard errors of means.

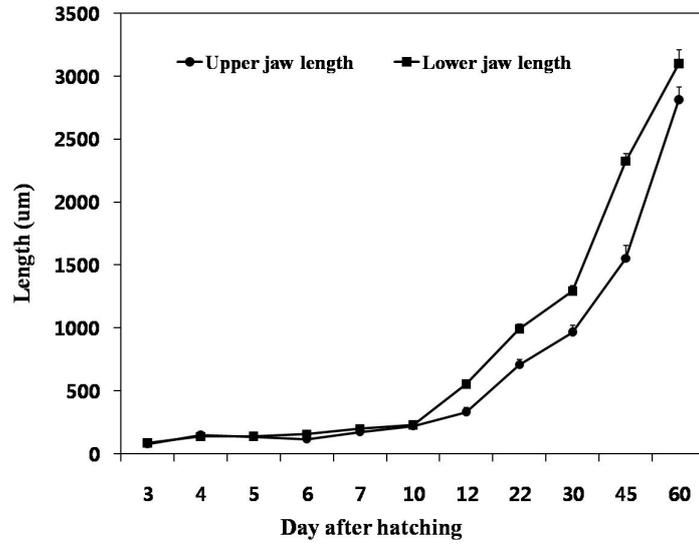


Fig. 32. Changes of the upper jaw length and lower jaw length by day after hatching in *Epinephelus fasciatus* larvae. Vertical bars denote standard errors of means.

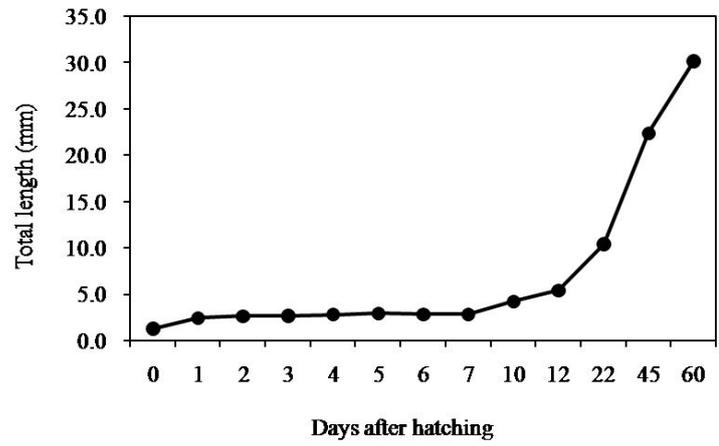


Fig. 33. Change of total length in *Epinephelus fasciatus* larvae by days after hatching.

## 5) 자·치어의 성장에 따른 소화관 형태 발달

### (1) 자·치어의 소화기관 외부형태 발달

홍바리 자·치어 소화관의 외부형태 발달은 현미경하에서 육안으로 관찰 가능한 부화 7일째까지 실시하였다. 부화 직후 (0 DAH) 입과 항문은 열리지 않았으며 큰 난황을 가지고 있었다. 부화 직후 소화관의 경우 직선상으로 가늘고 긴 내강이 관찰되었으며 항문과 연결되어 있었다(Fig. 34A). 부화 후 2일째 (2 DAH) 방광과 요도가 분화하였으며, 소화관의 직경이 확장되고 항문이 관찰되었다(Fig. 34B). 부화 후 3일째 (3 DAH) 소화관의 직경은 더욱 확장되었으며 식도, 장, 직장의 분화는 뚜렷하지 않았다. 부화 후 4일째 (4 DAH) 개구되었으며 소화관 내강의 직경이 확장되었다. 소화관의 경우 장의 뒷부분에 괄약근이 형성되어 후장부와 직장의 경계가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 34C). 부화 후 7일째 (7 DAH) 난황은 거의 흡수되었으며, 장이 꼬이기 시작하였다. 그리고 소화관내 섭이한 먹이가 관찰되었다(Fig. 34D). 부화 후 7일째(7 DAH) 처음으로 배변활동이 관찰되었으며 복측과 장측에 많은 흑색소포가 분포하였다(Fig. 34E, F).

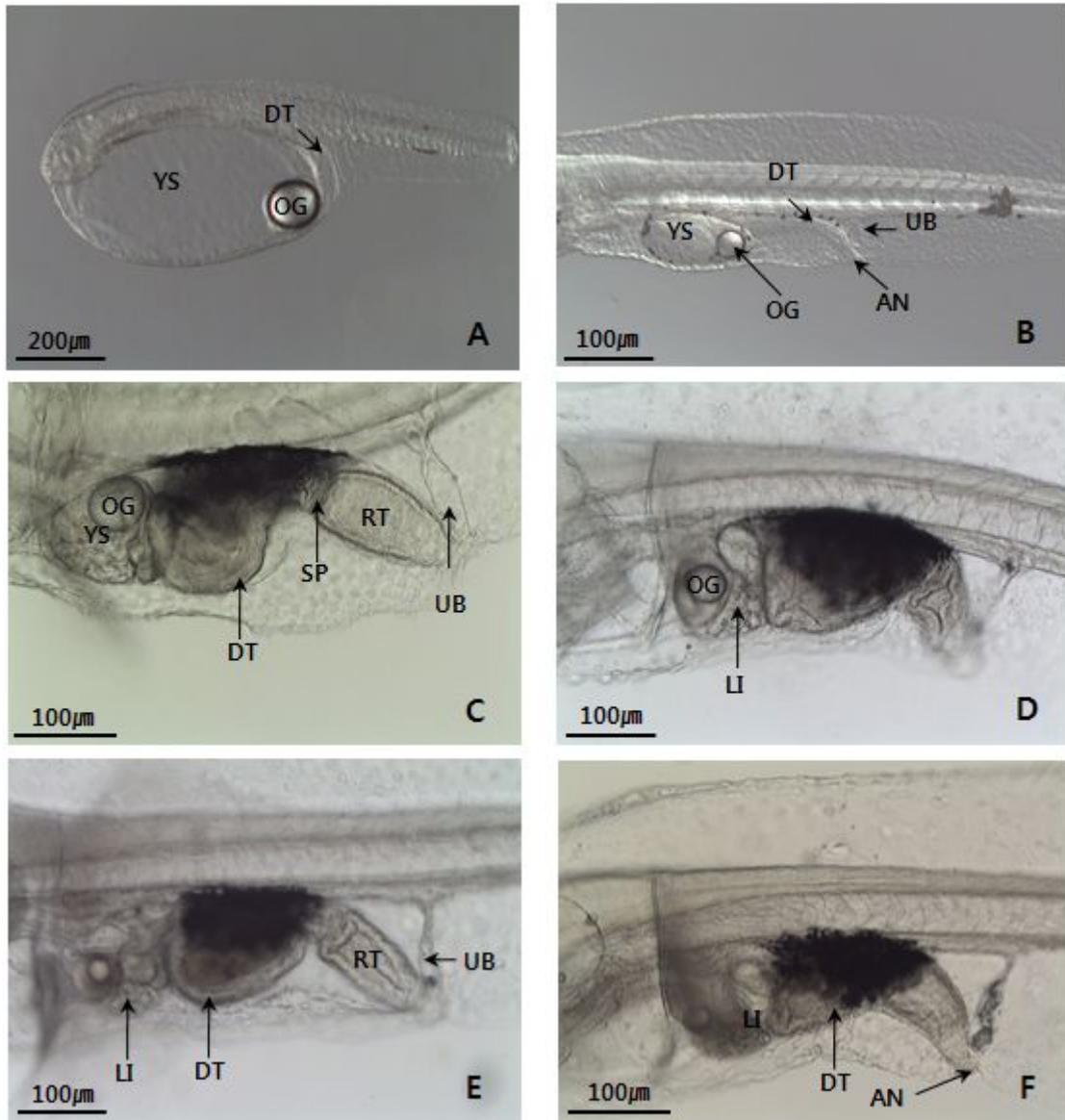


Fig. 34. Morphological observations of the digestive system during the development of *Epinephelus fasciatus* larvae. A, general view of the newly hatched larvae on 0 DAH; B, posterior region of the incipient intestine of newly hatched larvae on 2 DAH; C, posterior region of the incipient intestine of newly hatched larvae on 4 DAH; D, incipient intestine on 7 DAH; E, incipient intestine on 7 DAH; F, incipient intestine on 7 DAH. AN, anus; DT, digestive tract; E, eye; GL, gut lumen; IN, intestine; IV, intestinal valve; LI, liver; OG, oil globule; RT, rectum; UB, urine bladder; UD, urine duct; YS, yolk sac.

## (2) 자·치어의 소화기관 발달양상

부화 후 4일째 (4DAH) 복측과 난황사이에 간조직과 일부 체조직이 관찰되었으며 직장부의 점막주름이 형성되었다. 간에서는 담관과 소수의 지방구가 관찰되었다(Fig. 35A). 부화 후 7일째 (7DAH) 중장부와 후장부의 경계가 뚜렷이 관찰되었으며, 후장부에서 AB-PAS 양성반응을 나타내는 소수의 배상세포가 관찰되었다(Fig. 35B). 부화 후 9일째 (9DAH) 직장부 점막주름 상피층에 AB-PAS 양성반응을 나타내는 소수의 배상세포가 관찰되었으며 대부분의 난황과 유구가 흡수되었다(Fig. 35C). 소화관 주변에 산재되어 있는 체조직이 관찰되었으며 직장부 점막주름의 발달이 뚜렷이 관찰되었다. 부화 후 15일째 (15DAH) 전장부 점막주름 상피층에 AB-PAS 양성반응을 나타내는 배상세포가 관찰되었으며, 부화일수가 증가함에 따라 배상세포의 수가 증가하였다(Fig. 35D). 부화 후 24일째 (24DAH) 식도와 전장부 사이에서 위의 발달이 관찰되었지만 위선은 관찰되지 않았다. 중장부의 점막주름의 상피층에서 AB-PAS 양성반응을 나타내는 배상세포들 관찰되었다(Fig. 35E). 부화 후 29일째 (29DAH) 위에서 소수의 위선과 유문수가 관찰되었다(Fig. 35F). 위와 전장부 경계부에 유문괄약근이 형성되어 위와 전장부의 경계가 명확하였다(Fig. 35G). 부화 후 34일째 (34DAH) 인두강 상피층에서 인두치가 관찰되었으며, 위선의 수가 점차 증가하였다(Fig. 62H). 초기 소화생태조사 종료시점인 부화 후 44일째 (44DAH)는 성어와 같은 소화기관의 형태를 갖추었다. 홍바리의 경우 위산을 분비하여 실질적인 소화 기능을 수행하는 위에서의 위선 발달이 상대적으로 다른 어종에 비해 늦은 경향을 나타내었다. 그리고 위와 전장부 사이에 위치하여 소화된 영양분이 흡수될 수 있는 면적을 넓혀주는 유문수의 발달시기도 위선의 출현 시기와 같았다. 또한 먹이를 잘게 찢어 소화를 용이하게 해주는 인두치의 분화도 위선 분화 이후 관찰된 경향으로 보아 홍바리의 경우 실질적인 소화 작용은 부화 후 약 29일 경에 일어나는 것으로 사료된다.

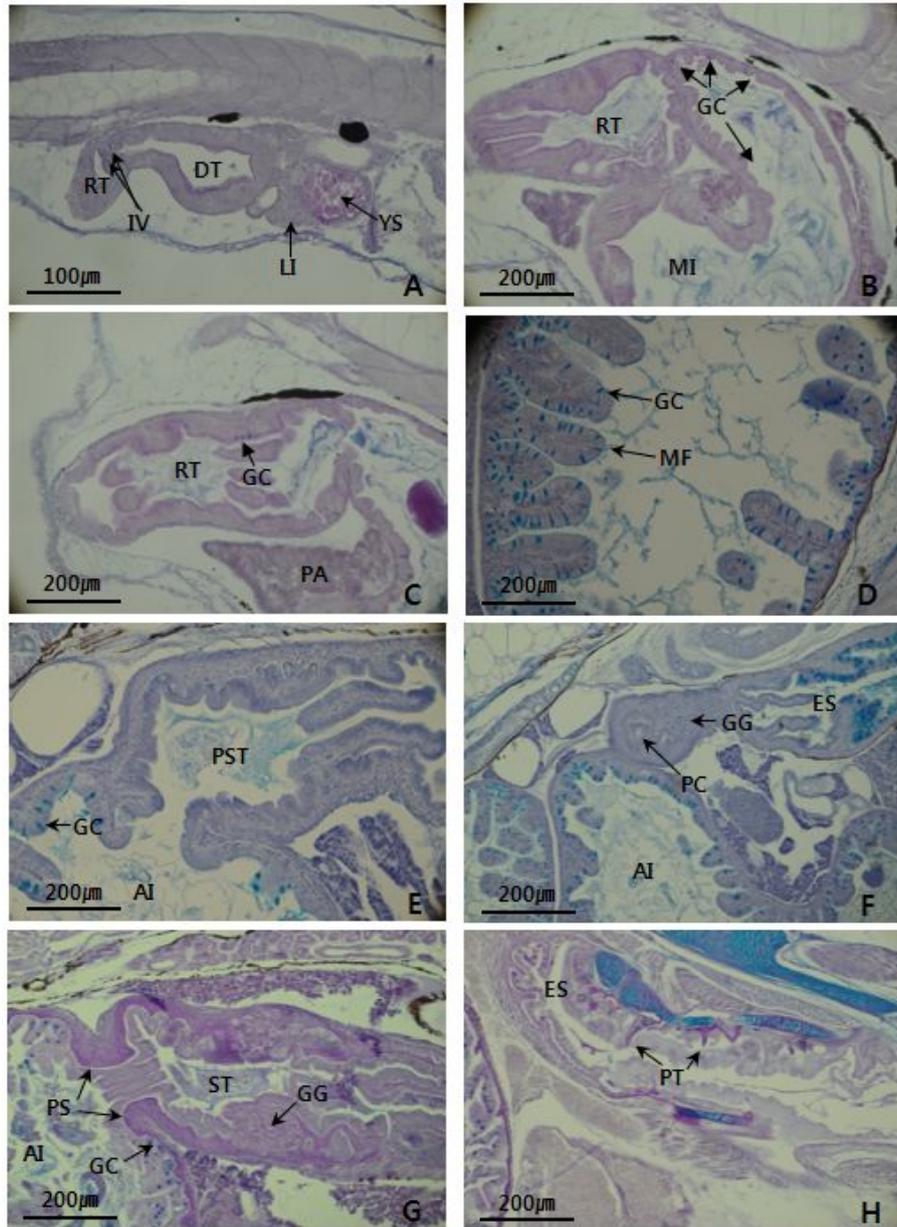


Fig. 35. Sagittal section of the digestive system during the development of *Epinephelus fasciatus* larvae. (A) Larvae of 4 DAH, (B) Larvae of 7 DAH, (C) Larvae of 9 DAH, (D) Larvae of 15 DAH, (E) Larvae of 10 DAH, (F) Larvae of 24 DAH, (G) Larvae of 29 DAH, (H) Larvae of 34 DAH. Abbreviations: AI, anterior intestine portion; DT, digestive tract; ES, esophagus; GC, goblet cell; GG, gastric gland; IV, intestinal valve; LI, liver; MF, mucosal fold; PA, pancreas; PC, pyloric caeca; PS, pyloric sphincter; PST, presumptive stomach; PT, pharyngeal teeth; RT, rectum; ST, stomach; YS, yolk sac.

## IV. 고 찰

바리과 어류는 암컷으로 먼저 성숙이 일어난 후 개체 중 일부가 수컷으로 성 전환하는 자성성숙형 자웅동체 어류로 어중에 따라 성전환 시기가 다르다. *E. tauvina*의 성전환 시기는 부화 후 7년이며, 만 10년에 이르렀을 때 완전한 수컷으로 기능을 하고(Chao and Lim, 1991), *E. marginatus*는 부화 후 14년 이상(Glamuzina et al., 2000), *E. mario*는 부화 후 9년, 체중 11 kg 이상(Randall and Heemstra, 1991), 붉바리는 전장 24~32 cm, 체중 500g 이상부터 성전환이 일어난다(Kayano, 1996). 능성어는 체중 6 kg 이상(Tsuchihashi et al., 2003a), 자바리는 전장 63~99 cm, 체중 4.4~13.2 kg에서 성전환이 일어난다(Oh, 2006). 이 연구에서 홍바리는 다른 바리과 어류와 마찬가지로 자성성숙형 자웅동체 어류로 먼저 암컷으로 성숙한 후 수컷으로 발달하는 양상을 보였다. 어체중에 따른 성비 조사 결과 암컷은 전장 32~36 cm, 체중 400~900 g 범위에 출현하였고, 수컷은 전장 34~41 cm, 체중 600~1000 g에 나타났으며, 간성 개체는 전장 31~35 cm, 체중 500 g 범위에서 관찰되어 홍바리의 성전환은 전장 31 cm, 체중 500 g 이상부터 성전환이 일어나는 것으로 생각된다.

안정적인 수정란 생산을 위하여 홍바리 배우자의 미세구조적 특징을 조사하였다. 어류 정자의 핵 형태는 반궁형, 역 “U”자형, 역 “V”자형 그리고 구형 등 다양하며, 이는 핵강(nuclear fossa), nuclear notch 그리고 centriole complex 등의 핵막으로 함몰정도에 기인한다 (Gwo et al., 1994, 2004, 2005; Gusmão-Pompiani et al., 2005; Maricchiolo et al., 2007, 2010). 또한 다양한 핵의 형태는 정자의 운동형태와 밀접한 연관성이 있다 (Jamieson, 1991; Lahnsteiner and Patzner, 1997). 홍바리 정자의 핵은 centriolar complex에서 기원하는 osmophilic filament로 centriolar complex와 서로 연결되어 있고, 또한 편모와 핵은 수직 또는 평행으로 놓여 있으며, 이 부위에는 핵막이 함몰되어 핵강 (nuclear fossa)을 관찰할 수 있었다.

체외 수정종 어류 정자의 편모축은 정자변형과정에서 핵회전이 일어난 경우

Type I spermiogenesis 그리고 핵회전이 일어나지 않은 경우 Type II spermiogenesis로 구분되며 (Mattei, 1970; Jamieson, 1991), Type II spermiogenesis는 농어목에서 일반적인 정자변형과정이다 (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). 한편, 홍바리 정자의 핵 후방부 편모 선단부에는 proximal centriole과 distal centriole이 osmophilic filament로 연결되어 서로 수직으로 놓여 있고, 또한 distal centriole 하단부에는 osmophilic basal plate가 1개의 면 형태로 관찰되며 편모와 연결되어 있었다. 어류 정자의 centriolar complex는 서로 수평 또는 수직으로 위치하며 각각의 길이는 짧거나 긴 모양 등 종에 따라 다양하고, centriolar complex가 존재하지 않은 어종도 있다 (Mattei and Mattei, 1978, 1984; Baccetti et al., 1984; Gwo et al., 1992; Lahnsteiner and Patzner, 1997; Morisawa, 1999). 홍바리 정자의 proximal centriole과 distal centriole의 횡단면 미세구조는 각각 9개의 osmophilic spoke을 갖는 수레바퀴 형태로 “9+0”의 미세소관 축사구조이었다. 어류 정자의 중편부에 존재하는 미토콘드리아의 수와 형태는 미세구조적으로 어종간에 상이하다 (Baccetti et al., 1984; Mattei, 1991). 바리과 어류의 정자 중편부에 존재하는 미토콘드리아의 수는 어종간에 상이하여 *E. malabaricus*는 구형 6개, *P. leopardus*는 구형 5개 또는 6개, *S. atricauda*는 구형 5개 그리고 *S. cabrilla*와 *S. scriba*는 각각 구형 4개 미토콘드리아가 존재한다 (Gwo et al., 1994; Garcia-Diaz et al., 1999). 이 연구에서 홍바리 정자의 중편부는 cytoplasmic canal을 중심으로 편모 선단부와 구형의 8~9개 미토콘드리아 (직경  $0.74 \pm 0.09 \mu\text{m}$ )가 존재하였다. 일반적으로 외부 수정종 어류 정자의 중편부에 존재하는 미토콘드리아는 정자 편모운동의 에너지원인 ATP 생성에 관여하며 (Christen et al., 1987; Cosson et al., 1999), 정자 운동의 지속성은 미토콘드리아의 수와 직경에 밀접한 상호 연관성이 있다는 보고가 있으나 (Baccetti et al., 1984), 최근 연구는 정자운동을 지속하는데 필요한 에너지를 확인하는데 있으며 (Mansour et al., 2003), 미토콘드리아의 ATP 생성정도는 정자의 유영속도 및 유영비율과는 상호관련성이 없다는 연구보고가 있다 (Burness et al., 2005).

어류정자의 중편부 미세구조적 특징 중 다른 하나는 편모 선단부를 중심으로 편모와 cytoplasmic sleeve 원형질막 사이에 좌우 2개의 빈공간인 cytoplasmic

canal를 갖는다는 연구가 있다. 이런 구조는 어류정자의 일반적인 미세구조적 형태이며 (Jamieson, 1991), 이는 척추동물과 무척추동물의 정자의 미세구조적 형태와는 상이하다 (Guraya, 1987; Koch and Lambert, 1990). 또한 어류 cytoplasmic canal의 길이는 긴형, 중간형 그리고 짧은형 등 어종간에 상이하다 (Jamieson, 1991; Gwo et al., 1994; Garcia-Diaz et al., 1999; Maricchiolo et al., 2002). 이 연구에서 홍바리 정자의 중편부는 미세구조적 횡단면과 종단면의 관찰 결과 편모를 중심으로 cytoplasmic sleeve 원형질막 사이 좌우에 2개의 빈공간인 cytoplasmic canal 모양의 구조가 관찰되었다. 이러한 바리과 어류 정자 중편부의 독특한 미세구조는 원활한 편모운동을 유지하고, 진화학적인 관점에서 서식환경인 해수의 유입과 유출의 용이성을 위해 분화된 구조물이라고 판단된다. 특히 해산어 바리과 어종의 정자 중편부에 존재하는 cytoplasmic canal 내부 편모 선단부 원형질막에는 전자밀도가 높은 구형의 입자를 갖는 necklace가 존재하며 (Gwo et al., 1994, 2005; Maricchiolo et al., 2010), necklace는 편모내로  $Ca^{2+}$ 이온의 유입으로 정자의 편모 운동과 막 투과성에 관여한다는 연구 보고가 있다 (Dentler, 1990; Gwo et al., 1994). 이 연구에서 홍바리 정자의 necklace는 편모 선단부 cytoplasmic canal과 접하는 편모 원형질막에 전자밀도가 높은 7~8개의 구형 입자 형태로 존재하였다 (Fig. 11). Cytoplasmic canal과 necklace의 생리학적 상호연관성 및 necklace의 기능에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

어류 정자 미부는 어종간에 상이하어 하나의 편모를 갖는 uniflagellate 정자, 2개의 편모를 갖는 biflagellate 정자 그리고 편모가 없는 aflagellate 정자 등으로 구분된다 (Jamieson, 1991). 바리과 해산어종인 *E. malabaricus*, *P. leopardus*, *S. atricauda*, *S. cabrilla* 그리고 *S. scriba* 등의 정자 미부는 하나의 편모를 가지며 미세구조적으로 전형적인 “9+2”의 축사구조이다 (Gwo et al., 1994; Garcia-Diaz et al., 1999). 홍바리 정자의 편모는 어류에서 일반적으로 관찰할 수 있는 1개의 편모를 갖는 uniflagellate 정자이며, 편모 횡단면의 미세구조는 1쌍의 중심 미세소관과 이를 둘러싸는 9쌍의 주변 미세소관으로 구성된 전형적인 “9+2”의 축사구조이었다. 그러나 뱀장어, *Anguilla japonica*는

“9+0”의 미세소관 축사 구조(Colak and Yamamoto, 1974)이며, 틸라피아는 “9+1”의 미세소관 축사구조 (Bern and Avtalion, 1990)를 갖는다.

또한, 어류 정자의 편모에 존재하는 lateral fin은 체외 수정종 해산어 *Boops boops* (Mattei, 1970; Zaki et al., 2005; Jamieson, 2009)과 *Diplodus sargus* (Lahnsteiner and Patzner, 1998) 그리고 *Pegellus erythrinus* (Assem, 2003; Maricchiolo et al., 2004)에서 보고된다. 또한 바리과 해산어종 *E. melabaricus*와 *P. leopardus*는 2개의 lateral fins를 갖지만 (Gwo et al., 1994), *S. atricauda*와 *S. cabrilla* 그리고 *S. scriba*에서는 lateral fin에 관한 보고가 없다 (Garcia-Diaz et al., 1999). 어류 정자 편모의 lateral fin은 정자의 운동 환경과 편모의 수 그리고 정자의 형태와는 관련이 없으나 정자의 운동성을 효율적으로 유지한다 (Mattei, 1978). lateral fin은 척추동물의 정자 편모에는 볼 수 없으며, 소수 무척추동물에서 보고가 있다 (Afzelius, 1978). 홍바리 정자 편모에는 크기와 모양이 다양한 lateral fin이 존재하며, lateral fin 내부에는 정자 편모의 횡단면 미세구조와 동일한 전형적인 “9+2”의 축사구조를 하며 막성의 vesicle 등이 관찰되었다.

이 연구결과 홍바리 정자의 미세소관은 바리과 어종간에 형태가 상이하여 계통 분류학적인 형질로서 이용될 뿐만 아니라, 어류 정자 세포소기관의 구조적 기능 연구에 이용될 수 있다고 판단된다. 또한 cytoplasmic canal과 lateral fin 그리고 necklaces등의 독특한 미세구조는 정자운동에 필요한 에너지를 편모내로 유입하는 기능을 수행하는 세포소기관 이라고 판단되나 정자의 세포소기관의 구조적 기능과 생리학적인 기능에 대한 상호 연관성에 관한 연구가 필요하다.

어류의 난문 형성과정은 배반 상층부에 존재하는 여포세포가 함몰된 후 난막의 외막 또는 내막이 변형되어 형성되며 난문과 정자의 침체 존재 유무는 종특이성을 갖는다(Laale, 1980; Guraya, 1987). 바리과 어류인 자바리와 능성어 그리고 붉바리 등 대부분의 어류는 1개의 난문이 존재하나(Kim et al., unpublished data), 칠갑상어류인 *Acipenser stellatus*의 난문은 1-13개가 있으며, *Polyodon spathula*는 4-12개, *Huso huso*는 33개, *A. gueldenstaedtii*는 52개의 난문이 존재한다(Dettlaff et al., 1993; Linhart and Kudo, 1997). 그러나 칠성장어와 곱상어의 난에는 난문이 존재하지 않고 정자의 두부에는 침

체를 갖고 있으며(Stanley, 1971), 흰철갑상어는 다수의 난문이 있으며 정자 또한 두부에 첨체를 갖는다(Cherr and Clar, 1985). 이와 같이 어류의 난문과 첨체의 존재 유무는 종 특이성으로 배우자 인식에 중요한 기능을 하는 난문의 형태도 종 특이성을 보인다(Kobayashi and Yamamoto, 1981). 난문은 vestibule와 canal로 구분되며, 이들의 미세구조적 형태에 따라 난문은 Type I, Type II, Type III 그리고 Type IV 등 4가지 유형(Riehl and Kock, 1989)과 원통형과 원추형 그리고 깔때기형 등의 3가지 유형으로 구분된다(Mikodina, 1987). 바리과 어류인 자바리와 능성어 그리고 붉바리의 난문형태는 Type I 이나(Kim et al., unpublished data), *E. malabaricus*와 *E. coioides*는 Type III로 알려져 있다(Li et al., 2000). 이 연구에서 홍바리 난문의 형태는 주사형 전자현미경 관찰 결과 vestibule과 canal의 형태학적인 특징에 따라 Type I의 원통형으로 구분되었다.

분류학적인 난 동정의 다른 요소는 난문의 구성 구조물인 vestibular ridge의 배열형태에 따라 종 특이성을 나타낸다. 예를 들어, 감성돔류인 청돔(*Sparus sarba*)과 새눈치(*Acanthopagrus latus*), 감성돔(*A. schlegeli*)은 나선형의 ridge 구조이며, 참돔(*Pagrus major*)는 10개의 두꺼운 고리형 구조를 갖는다(Chen et al., 1999). 바리과 어류의 난문 vestibular ridge의 배열은 대부분 시계방향인 나선형 고리로, *E. malabaricus*는 5~6개, *E. coioides*는 7~8개의 나선형 배열 구조를 보이며(Li et al., 2000), 또한 자바리 8~10개, 능성어 9개, 붉바리 8~9개의 시계방향의 나선형 고리구조를 보인다(Kim et al., unpublished data). 이 연구에서 홍바리 난문의 vestibule 구조는 시계방향으로 6~7개의 나선형 고리구조가 관찰되어 바리과 어종간에 상이하었다.

난문의 크기와 정자의 두부 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있으며, 협소한 난문 입구는 다수정 방지(Hart, 1990; Linhart and Kudo, 1997)와 중간잡종교배 방지(Chen et al., 1999) 등의 역할을 하고, 이러한 물리적인 제한 요소는 종 특이성을 갖는다고 알려져 있다(Kobayashi and Yamamoto, 1981). 어류 난문의 크기와 정자 두부의 크기를 관련지어 볼 때, 서로 비례관계가 있으므로 이 연구에서 홍바리 또한 난문의 크기와 정자 두부의 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

미수정란의 난막표면의 미세구조적 특징과 세포화학적 분석은 어류 난의 분류 동정에 중요한 형질 요소로 이용된다(Chiou et al., 2004; Mekkawy and Osman, 2006). 일반적으로 어류의 침성란은 점착성 물질을 가지며, 난막 표면에 부착사와 같은 돌기형의 부속구조물이 발달되어 있으나, 부상란은 비점착성이며 난막 표면에 부속구조물을 관찰할 수가 없다(Rizzo et al., 2002). 또한 어류 난의 난막 표면 구조는 서식환경과 밀접한 연관성이 있다(Berois et al., 2007). 부상란을 산란하는 자바리와 능성어 그리고 붉바리는 난막 표면에 부착사 또는 돌기형의 부속 구조물이 존재하지 않으나 크기가 작은 pore(0.11~0.21  $\mu\text{m}$ )들이 전 난막 표면에서 관찰된다. 특히 난문 주변부에는 크기가 다른 pore (0.66~2.17  $\mu\text{m}$ )들이 동심원상으로 혼재하며, pore의 주변부와 가장자리에는 고리형과 고리연결형 그리고 불규칙한 형태 등 nodule이 다양하게 분포한다(Kim et al., unpublished data). 그러나 부상란을 산란하는 승어는 난막 표면에 pore가 존재하지 않다는 보고가 있다(Li et al., 2000).

홍바리 미수정란의 난막 표면 nodule의 형태는 종 특이성을 갖으며, 난문 주변부 동심원상으로 혼재하는 크기(0.15~0.55  $\mu\text{m}$ )가 다양한 pore의 개수는 자바리 200~250개, 능성어 280~320개, 붉바리 180~220개이나 홍바리 경우 230~270개로 종간에 차이가 있었다. Pore의 기능은 수정과 난 발생 과정에 해수와 난이 접촉면을 넓혀 영양염류 유입과 기체교환 그리고 삼투조절의 기능을 수행하는 것으로 추정되나 이에 대한 생리학적 및 미세구조적인 연구가 필요하다고 생각된다.

홍바리의 배우자 형성에 관여하는 내분비 인자 중 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 의 특성을 탐색하기 위해 홍바리의 뇌하수체로부터 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  단백질에 암호화하고 있는 것으로 추정되는 완전한 cDNA를 cloning하고 그 염기서열을 규명하였다. FSH $\beta$  cDNA는 총 571 bp 핵산을 가지며 21개의 signal peptide와 99개의 mature peptide로 코드화 되었다. LH $\beta$  cDNA는 총 617 bp 핵산을 가지며 32개의 signal peptide와 115개의 mature peptide로 코드 되었다. 홍바리 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$ 의 아미노산 서열은 자바리를 포함한 다른 경골어류들의 각각 유전자의 아미노산 서열들과 계통발생학적으로 비교해 본 결과, 홍바리 FSH $\beta$ 는 농어목 및 가자미목 어류들의 FSH $\beta$ 와 65~97%로 높은 상동성을 보였고, 반면

뱀장어목, 잉어목, 연어목 및 철갑상어목 등의 FSH $\beta$ 와는 약 32~66%로 그 상동성이 비교적 낮았다. 또한 홍바리 LH $\beta$ 는 농어목 및 가자미목 어류들의 LH $\beta$ 와 비교해서 75~97%로 높았고, 반면 그 이외 다른 어종들의 LH $\beta$ 와는 약 45~77%로 그 상동성이 상대적으로 낮았다. FSH $\beta$  계열과 LH $\beta$  계열의 비교어종들 간에는 상동성(약 22~33%)이 매우 낮게 나타났다. 이 연구에서 동정된 홍바리의 FSH $\beta$  및 LH $\beta$  subunit는 발생학적으로 서로 다른 진화적 특성을 가지고 있다고 추정되며, 홍바리 뇌하수체 생식소자극호르몬(gonadotropin, GTH) subunit은 각각의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  subunit 유전자 계열에 속하고 있음을 알 수 있었다.

홍바리 뇌의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체 등의 중추신경조직들과 간, 신장, 생식소 등의 주변조직들을 대상으로 한 RT-PCR 기법으로 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA의 조직별 발현 양상을 조사 비교한 결과, 뇌하수체에서 강하게 발현하였다. Yaron et al., (2001)은 어류가 외부의 물리적 환경, 영양, 스트레스 등에 의한 자극들은 감각기관을 통해 수용하여 다양한 형태의 체내신호로 전환하는데 그 중에서도 생식활성을 조절하는 GTH의 분비는 뇌하수체의 전엽기부(proximal pars distalis, PPD)와 중엽(pars intermedia, PI)에 집중적으로 위치하는 것을 확인하였다. 대서양 연어(Atlantic salmon, *Salmo salar*), 은연어(coho salmon, *O. kisutch*) 및 무지개송어(rainbow trout, *O. mykiss*) 등의 연어과 어류들은 초기 배우자 형성과 VTG 합성 이후의 최종 성숙시기에 이르러 FSH와 LH의 분비가 모두 증가하였다. 금붕어의 경우, testosterone, estradiol-17 $\beta$  및 11-ketotestosterone 등의 성 스테로이드 호르몬에 대한 FSH $\beta$  mRNA의 발현은 유생 및 미성숙 개체에서 음성 피드백(negative feedback) 변동을 하였지만, 성숙 개체에서는 양성 피드백(positive feedback)변동을 나타내었다. 반면에 LH $\beta$  mRNA의 발현은 성스테로이드 호르몬 활성화와 그 관련성이 없었다(Kobayashi et al., 2000; Huggard-Nelson et al., 2002). 홍바리 뇌하수체에서의 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA 발현은 생식세포의 발달, 최종성숙 및 산란 등에 깊게 관여한다고 여겨진다.

홍바리의 뇌하수체뿐만 아니라 뇌의 후엽에서도 LH $\beta$  mRNA가 미약하게나마 그 발현이 관찰되는데, 이러한 결과는 틸라피아의 경우와 마찬가지로 어류 뇌에서의 GTH는 대부분 당단백질 형태(GTH-like glycoprotein)로 존재하며 RT-PCR 방법에 의한 FSH와 LH mRNA의 발현은 아주 적은 양으로서 관찰되기 때문이다(Nozaki et al., 1990a,b; Yaron et al., 2001). 경골어류의 FSH와 LH mRNA의 발현은 주로 생식선자극호르몬 방출호르몬(GnRH)과 함께 시상하부의 신경세포(neuronal perikarya)와 인근의 융기부(pars tuberalis), 신경섬유(fiber processes) 그리고 뇌하수체의 전엽(anterior pituitary adenohypophysis)에서 확인되었다. 또한 그 발현이 GnRH의 직접적 작용으로 유도되거나, 성 스테로이드 호르몬의 간접적 피드백(feedback)에 의해 조절됨으로써 시상하부-뇌하수체-생식소의 축(axis)을 형성하는 체내의 내분비 시스템의 균형유지 및 항상성을 조절 하는 중심적인 역할을 한다(Hostetter et al., 1981; Melamed et al., 1998; Parhar et al., 2003; Schally et al., 1971; Yu et al., 1979). 홍바리의 뇌에 존재하는 신경세포와 신경섬유도 GTH의 분비와 관련 있는 것으로 사료된다.

최근 한국, 일본, 대만을 비롯한 아시아 여러 국가에서 다양한 바리과 어종들을 대상으로 종묘생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 특히 동북아시아에서 그 희귀성이 높은 홍바리의 번식생리 특성 및 산란 행동에 대한 연구가 서서히 주목받고 있다. 이 연구는 홍바리 중추신경조직 유래의 생식선 자극호르몬에 대하여 분자생물학적 방법으로 접근함으로써 바리과 어류의 특징인 자성선숙형의 성숙 및 산란 특성을 파악하기 위한 기초 자료로서 활용하고, 사육수조 내에서 안정적이고 건강한 수정란을 확보를 위해 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  cDNA의 동정 및 그 특정 부위의 발현 확인이 이루어졌다. 앞으로 홍바리의 어미확보, 건강한 수정란 생산 그리고 안정적인 종묘생산을 하기 위해 GTH에 대한 생리적인 특성 연구 및 그 유전자 이용이 필요한 실정이므로 이 연구 결과가 유용하게 활용되리라고 기대한다.

어류의 성숙 및 산란은 내분비 요인 즉 생식소자극호르몬방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 생식소자극호르몬(gonadotropins, GTH), 성호르몬 그리고 신경호르몬 등에 의해 조절되지만, 이들의 조절을

유도하는 것은 광주기와 수온과 같은 환경요인으로 (De Vlaming, 1975; Nish and Takano, 1979; Asahina and Hanyu, 1983), 이런 환경요인들은 단독적인 작용보다는 상호 보완적 작용을 하며, 종에 따라 그 범위가 각각 다르게 나타난다 (Donaldson and Hunter, 1983; Baek and Lee, 1985; An, 1995). 바리과 어류인 능성어 *E. septemfasciatus*의 경우 장일 광주기(14L/10D) 처리로 자연조건보다 2~3개월 앞당겨 성 성숙을 유도하며 (Song, 2004), 자바리 *E. bruneus*인 경우 성 성숙을 유도하는 요인은 수온이 주로 작용하고, 장일 광주기가 보상적으로 관여하는 것으로 추정하고 있다 (Oh, 2006). 또한 Kanemaru et al. (2012)는 고수온과 장일처리로 비산란시기에 *E. merra*의 성 성숙을 유도하였다. 이 연구에서 홍바리를 대상으로 광주기와 수온 조절을 통해 성 성숙 유도를 조사한 결과, 12L/12D, 13L/11D, 14L/10D의 광주기 조건의 실험어들은 22℃의 수온 조건에서 성 성숙이 유도되지 않았지만, 이후 수온을 25℃로 상승시킨 후 14L/10D의 실험구에서 성 성숙이 유도된 반면, 12L/12D의 광조건인 대조구에서는 25℃로 수온상승 후에도 생식소 발달이 이루어지지 않았다. 그러나 장일 광주기(14L/10D)와 저수온 (17~18℃) 처리구 그리고 장일 광주기와 고수온 (25℃) 처리구에서 고수온 (25℃) 처리구만이 성 성숙 유도되었으며 뇌하수체에서 최종성숙에 관여하는 LH mRNA 발현이 높았다. 따라서 홍바리의 성 성숙 유도 요인은 고수온(25℃)조건이 주로 작용하고, 장일 광주기(14L/10D)가 보상적으로 관여하는 것으로 생각된다.

바리과 어류와 같은 자성선속형 자웅동체어에서 수컷 확보의 어려움을 해결하기 위하여 정자 동결보존 방법을 이용하고 있으며, 여러 종류의 희석액과 동해방지제가 사용되고 있다 (Chao et al., 1975; Bolla et al., 1987; Gwo et al., 1991; Babiak et al., 1995). 어류 정자의 동결보존 효과에 영향을 미치는 중요 요소는 어중에 적합한 희석액, 동해방지제의 제조 및 사용, 평형시간, 해동 온도 처리 등이 있으며, 동해방지제의 경우 친수성과 높은 세포막 투과성, 정자에 대한 독성이 낮아야 좋다 (Jamieson, 1991). 희석액은 NaCl 또는 glucose가 주로 사용되며, 동해방지제는 glycerol, DMSO와 methanol이 주로 사용되고 있으나 (Gwo and Arnold, 1992; Lim and Chang, 1998; Zhang et al., 2003), 어중에 따라 희석액 및 동해방지제의 종류는 다양하다. 예를 들어, Black grouper

*E. malabaricus*는 150 mM NaCl과 해산어류 Ringer's solution에서 정자의 운동성이 높았으며(Gwo, 1993), 능성어 *E. septemfasciatus*의 경우 5% glucose와 참돔링거액이 정자동결보존 희석액으로 좋은 결과를 보였다(Song, 2004).

동해방지제인 DMSO는 세포내로 투과속도가 빠르고, 냉동이나 해동과정에서 정자 활성화에 미치는 영향이 적어 넓치 *Paralichthys olivaceus*, turbot *Scophthalmus maximus* 등 대부분의 해산어류에 사용되고 있다(Dreanno et al., 1997; Zhang et al., 2003). Black grouper *E. malabaricus*는 동해방지제로 20.0% DMSO를 사용했을때 glycerol이나 methanol을 사용했을때 보다 정자 운동성이 활발하였고(Gwo, 1993), 능성어 *E. septemfasciatus*의 정자 동결보존에서 DMSO와 난황성분이 들어있는 test yolk buffer(TYB)가 동해방지제로 적합하였으며(Song, 2004), 자바리 *E. bruneus*인 경우 각기 다른 DMSO 농도(5.0%, 7.5%, 10.0%)에 따른 정자 동결 후 해동 정자를 이용한 수정란의 수정률과 부화율에 있어 DMSO 농도에 따른 유의차는 없었다. 이 연구에서 홍바리 정자동결 보존에 적합한 희석액의 종류 및 농도와 동해방지제를 조사한 결과, 희석액 5.0%와 10.0% glucose 그리고 동해방지제 dimethylsulfoxide (DMSO)를 사용하는 것이 홍바리 정자 동결보존에 적합한 것으로 판단된다.

어류의 부화 자어는 내인성 영양물질로 난황과 유구가 사용되어지며, 난황의 흡수 속도는 사육조건에 따라 다르게 나타난다. 붉바리 *E. akaara*의 난황 흡수 속도는 수온 25~29℃ 조건에서 부화 후 24시간 이내에 90%가 소모되고, 99% 이상 난황을 흡수하는 시점은 부화 후 60~84시간이다(Lee and Hur, 1997). 자바리 *E. bruneus*는 수온 25℃ 조건에서 24시간 경과시 평균 79.1 %였고, 48시간째는 97.1%로 대부분의 난황이 흡수되나, 22℃조건에서 24시간 경과시 42.3%, 48시간째는 76.6%, 72시간째는 95.6%로 일부 난황이 존재하였다(Oh, 2006). 이 연구에서 홍바리의 경우 수온 25℃조건에서 부화 후 24시간에 47.5%, 부화 후 48시간에 15.8%로 흡수되었다.

경골어류의 소화계 형성 과정에는 난황흡수 말기로 섭이를 시작하는 시기와 위선이 완성되고, 유문수가 분화하는 시기, 즉 치어로 이행되기 직전의 시기 두가지 분화기가 있다(Tanaka, 1971). 이 연구에서 홍바리의 부화 직후 자어는 커다란 난황을 갖고 있으며, 부화 후 4일째 입이 개구되었고, 부화 후 7일째 난

황은 거의 흡수되었으며, 소화관내 섭이한 먹이가 관찰되어 처음으로 배변활동이 관찰되었다. 따라서 홍바리 자어는 부화 후 6~7일경에는 외부영양을 섭취 할 수 있는 소화계 기본구조가 확립되는 것으로 여겨진다. 난생어류의 경우에, 자어는 부화 직후 또는 부화 후 난황이 완전히 흡수된 이후부터는 고형물질을 섭이 하기 때문에 이들 소화관의 선조연, 배상세포 그리고 근육층의 발달과 함께 소화 기능을 수행 하게 된다 (Lee and Chin, 1995). 홍바리의 경우 위산을 분비하여 실질적인 소화 기능을 수행하는 위에서의 위선 발달이 상대적으로 다른 어종에 비해 늦은 경향을 나타내었다. 그리고 위와 전장부 사이에 위치하여 소화된 영양분이 흡수될 수 있는 면적을 넓혀주는 유문수의 발달시기도 위선의 출현 시기와 같았다. 또한 먹이를 잘게 찢어 소화를 용이하게 해주는 인두치의 분화도 위선 분화 이후 관찰된 경향으로 보아 홍바리의 경우 실질적인 소화작용은 부화 후 약 29일 경에 일어나는 것으로 사료된다.

## V. 요약

홍바리는 다른 바리과어류와 마찬가지로 자선성숙형 자용동체어로 암컷은 주로 전장 36~37 cm, 체중 400~900 g 범위에 출현하였고, 수컷은 전장 34~41 cm, 체중 600~1,000 g 범위에서 출현하였다. 간성 개체는 전장 31~35 cm, 체중 500 g 범위에서 관찰되었다. 난소는 결합조직으로 둘러싸여 있고, 결합조직 내에 난소 내강을 이루고 각각의 소낭 선단부에 관상의 구조가 관찰되었다. 난소 내강은 난소소낭들이 일정한 배열로 돌기형으로 구성되어 있었다. 소낭 내에는 어린 난모세포와 성장중인 유구기 난모세포들이 관찰되었다. 성전환 개체의 생식소는 소엽내에 퇴행하는 난모세포와 정원세포, 정모세포 무리들이 관찰되었다. 수컷의 생식소는 소엽내부에 정원세포, 정모세포, 정세포 무리들이 관찰되었고 기부에 수정관이 관찰되었다. 홍바리 난과 정자의 미세구조적 특징은 다른 바리과 어류와 상이하며, 난문의 크기와 정자 두부의 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

사육환경조절을 통한 홍바리의 성 성숙 유도를 위해 수온 22℃에서 광주기 12L:12D조건과 13L:11D에서 14L:10D의 광조건으로 변화시킨 실험구 그리고 9주후 수온 25℃로 상승시킨 실험구로 나누어 실험한 결과, 수온 25℃ 광주기 14L:10D 조건에서만 성 성숙이 일어났다. 홍바리의 성 성숙 유도를 위해 광조건과 수온이 홍바리 생식소 발달, 뇌하수체에서 FSH $\beta$ 와 LH $\beta$  mRNA 발현 양상을 조사하였다. 실험구는 홍바리의 성 성숙 유도 결과를 토대로 대조구(자연 광주기+자연수온), 처리구 I (14L+자연수온), 처리구 II (14L+25℃)로 나누었다. 실험 종료시 대조구와 처리구 I는 실험 시작시 생식소 발달 단계와 동일한 미성숙 단계였다. 그러나 처리구 II는 생식소가 성숙하였고, 뇌하수체는 난모세포의 최종성숙 및 배란에 관여하는 LH $\beta$  mRNA 발현이 유의하게 높았다. 따라서 홍바리의 성 성숙 제어 사육 시스템 개발은 광주기 14L 처리와 특히 수온 25℃ 이상을 유지하는 것이 중요하다고 판단된다.

홍바리 정자 동결보존에 적합한 동해방지제와 희석제의 종류 및 농도를 조사한 결과, 동해방지제 dimethylsulfoxide (DMSO)와 희석액 5.0%와 10.0%

glucose를 사용하는 것이 홍바리 정자 동결보존에 적합한 것으로 판단된다.

홍바리 수정란은 무색투명한 구형의 분리부성란으로 난경 700~800  $\mu\text{m}$ , 유구경 160~170  $\mu\text{m}$ 이었고, 수정 후 28시간 만에 부화가 시작되었다. 난황은 부화 후 48시간 이내에 흡수되었고, 부화 후 72시간째에 개구되었다. 자어의 전장은 부화 직후 약 1.2 mm 이었으며 1일 경과 후 약 2.4 mm 크기로 급격한 변화를 보였다. 부화 후 7일까지 완만한 성장을 보이다 지느러미 극 발달이 이루어지는 12일째에 5.4 mm, 후기자어로 변태를 거치는 22일째에 10.5 mm 크기로 성장하였다. 부화 후 45일째에 자어에서 치어의 형태로 변하면서 22.4 mm 크기로 성장하였고, 부화 후 60일 이후에는 30.2 mm 크기로 성장하였다. 부화 후 29일째 위에서 소수의 위선과 유문수가 관찰되었고, 위와 전장부 경계부에 유문괄약근이 형성되어 위와 전장부의 경계가 명확하였다. 부화 후 34일째 인두강 상피층에서 인두치가 관찰되었으며 위선의 수가 점차 증가하였다. 부화 후 44일째 성어와 같은 소화기관의 형태를 갖추었다. 홍바리의 경우 위와 전장부 사이에 위치하여 소화된 영양분이 흡수될 수 있는 면적을 넓혀주는 유문수의 발달시기가 위선의 출현 시기와 같았다. 또한 먹이를 잘게 찢어 소화를 용이하게 해주는 인두치의 분화도 위선 분화 이후 관찰된 경향으로 보아 홍바리의 경우 실질적인 소화작용은 부화 후 약 29일 경에 일어나는 것으로 사료된다.

## V. 참고 문헌

- Alam MA, Bhandari RK, Kobayashi Y, Soyano K and Nakamura M. 2006. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture*, 255, 532-535.
- An CM. 1995. Effects of photoperiod and water temperature on the reproductive cycle of the spring-spawning bitterling, *Rhodeus uyekii* (Pisces: Cyprinidae). *Korean J Ichthyol* 7, 43-55.
- Asahina K and Hanyu I. 1983. Role of temperature and photoperiod in annual reproductive cycle of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Bull Japan Soc Sci Fish* 49, 61-67.
- Assem SS. 2003. Reproductive biology, spermatogenesis and ultrastructure of the testes of the sparid fish, *Pagellus erythrinus*. *J Egypt German Soc* 42, 231-251.
- Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ, Kucharczyk D and Luczynski M. 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. *J Fish Biol* 46, 819-828.
- Baccetti B, Burrini AG, Callaini G, Gilbertini G, Mazzini M and Zerunian S. 1984. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven Cyprinid species. *Gamete Res* 10, 373-396.
- Baek HJ and Lee TY. 1985. Experimental studies on the mechanism of reproductive cycle in the longchin goby *Chasmichthys dolichognathus* (HILGENDORF). *Bull Korean Fish Soc* 18, 243-252.
- Bern O and Avtalion RR. 1990. Some morphological aspects of fertilization in tilapias. *J Fish Biol* 36, 375-381.
- Berois N, Arezo MJ, Chalar C, Brauer MM and Barros C. 2007. Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the white mouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823,

- Sciaenidae, Perciformes). J Appl Ichthyol 23, 34–39.
- Bolla S, Holmefjord I and Refstie T. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture 65, 371–374.
- Burness G, Moyes CD and Montgomery R. 2005. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). Comp Biochem Physiol A 140, 11–17.
- Chao NH, Chen HP and Liao IC. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. Aquaculture 5, 389–406.
- Chao TM and Lim LC. 1991. Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. Singapore J Pri Ind 19, 79–93.
- Chen, FY, Chow M, Chao TM and Lim R. 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 5, 1–21.
- Chen KC, Shao KT and Yang JS. 1999. Using micropylar ultrastructure for species identification and phylogenetic inference among four species of Sparidae. J Fish Biol 55, 288–300.
- Cherr GN and Clar WHJr. 1985. An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm. J Exp Zool 234, 75–85.
- Chiou LM, Chung MC, Tung PG, Hsu T and Yang JS. 2004. The use of egg chorion glycoprotein of *Epinephelus malabaricus* for egg identification. J Fish Biol 65, 1614–1621.
- Christen R, Gatti JL and Billard R. 1987. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm motility is related to changes in concentrations of ATP following the activation of flagellar movement. Eur J Biochem 166, 667–671.
- Colak A and Yamamoto K. 1974. An electron microscope study of spermiogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Bull Fac Fish Hokkaido Univ 25, 1–5.

- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C and Suquet M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, ed, *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*, pp. 161-186, Cache River Press, Vienna, IL.
- De Vlaming VL. 1972. Environmental control of teleost reproductive cycles : a brief review. *J Fish Biol* 4, 131-140.
- De Vlaming VL. 1975. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus ryssoleucas*. *Biol Bull* 148, 402-415.
- Dentler WL. 1990. Linkages between microtubules and membranes in cilia and flagella. In: Blood-good RA, ed, *Ciliary and Flagella Membrane*, pp. 31-64, Plenum Press, New York.
- Dettlaff TA, Ginsburg AS and Schmalhausen O. 1993. *Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture*. Springer-Verlag, Berlin, 300pp.
- Donaldson EM and Hunter GA. 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In : Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. Eds., *Fish Physiology. Reproduction*, Vol. IX B, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351-403.
- Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y and Billard R. 1997. Cryopreservation of turbot spermatozoa. *Theriogenology* 48, 589-603.
- Dyrlov BJ, Nielsen H, Heijne VG and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: Signal P 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
- FAO: *FAO species catalogue Vol. 16. Groupers of the world*. pp. 1-10, FAO Rome, 1993.
- Ferreira BP. 1995. Reproduction of the common coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae: Epinephelinae) from the central and northern Great Barrier Reef, Australia. *Bull Mar Sci* 56,

653–669.

- Fukuhara O. 1989. A review of the culture of grouper in Japan. Bull. Nansei. Reg. Fish. Res. Lab., 22, 47–57.
- García-Díaz MM, Lorenti MJ, Gonzales JA and Tuset VM. 1999. Comparative ultrastructure of spermatozoa of three marine teleosts of the genus *Serranus*: *Serranus atricauda*, *Serranus cabrilla* and *Serranus scriba*. J Submicr Cytol Pathol 31, 503–508.
- Glamuzina B, Glavić, Kožul V, Tutman P and Skaramuca B. 2000. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1875). Aquaculture Int 8, 551–555.
- Guraya SS. 1987. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. Springer Verlag, Berlin, pp, 1–430.
- Gusmão-Pompiani P, Olivera C and Quagio-Grassiotto I. 2005. Spermatozoa ultrastructure in Sciaenidae and Polynemidae (Teleostei: Perciformes) with some consideration on Percoidei spermatozoa ultrastructure. Tissue Cell 37, 177–191.
- Gwo JC. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. Theriogenology 39, 1331–1342.
- Gwo JC and Arnold CR. 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: Evaluation of morphological changes. J of Exp Zool 264, 444–453.
- Gwo JC, Chiu JY, Lin CY, Su Y and Yu SL. 2005. Spermatozoal ultrastructure of four Sparidae fishes: *Acanthopagrus berda*, *Acanthopagrus australis*, *Lagodon rhomboids* and *Archosargus probatocephus*. Tissue Cell 37, 109–115.
- Gwo JC, Gwo HH and Chang SL. 1992. The spermatozoon of the Japanese eel, *Anguilla japonica* (Teleostei, Anguilliformes, Anguillidae). J Submicr Cytol Pathol 24, 571–574.

- Gwo JC, Gwo HH, Kao YS, Lin BH and Shih H. 1994. Spermatozoon ultrastructure of two species of *Epinephelus malabaricus* and *Plectropomus leopardus* (Teleostei, Perciformes, Serranidae) from Taiwan. *J Submicr Cytol Pathol* 26, 131-136.
- Gwo JC, Kuo MC, Chiu JY and Cheng HY. 2004. Ultrastructure of *Pagrus major* and *Rhabdosargus sarba* (Perciformes: Sparidae: Sparinae). *Tissue Cell* 36, 141-147.
- Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT and Connie R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, 355-375.
- Hart NH. 1990. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int Rev Cytol* 121, 1-66.
- Hermelink B, Wuertz S, Trubiroha A, Rennert B, Kloas W and Schulz C. 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Gen Com Endocrinol* 172, 282-292.
- Hostetter G, Gallo RV and Brownfield MS. 1981. Presece of immunoreactive luteining hormone in the rat forebrain. *Neuroendocrinology* 33, 241-245.
- Huggard-Nelson DL, Nathwani PS, Kermouni A and Habibi HR. 2002. Molecular characterization of LH-beta and FSH-beta subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 188, 171-193.
- Hwang SI, Lee YD, Song CB and Rho S. 1998. Gonadal development and the effect of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J of Aquaculture* 11, 173-182.
- Jamieson BGM. 1991. *Fish Evolution and Systematics*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-319.
- Jamieson BGM. 2009. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp 1-788.

- Kanemaru T, Nakamura M, Murata R, Kuroki K, Horie H, Uchida K, Senthilkumaran B and Kagawa H. 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture* 358, 85–91.
- Kayano Y. 1996. Yearly change in egg production of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in a rearing tank. *Saibai Giken* 25, 47–52.
- Kim BH, Kim KM, Lee YD, Song CB and Rho S. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. I. The effect of hCG on ovulation induction. *J of Aquaculture* 10, 55–61.
- Kim IS, Choi Y, Lee CL, Lee YJ, Kim BJ and Kim JH. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyo-hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, pp. 615.
- Kobayashi MA, Sohn YC, Yoshiura YA and Aida KA. 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fisher Sci* 66, 223–231.
- Kobayashi W and Yamamoto TS. 1981. Fine structure of micropylar apparatus of the chum salmon egg with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J Exp Zool* 217, 265–275.
- Koch RA and Lambert CC. 1990. Ultrastructure of sperm spermiogenesis, and sperm-egg interactions in selected invertebrates and lower vertebrates which use external fertilization. *J Electron Microscop Tech* 16, 115–154.
- Laale HW. 1980. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. *Copeia* 2, 210–226.
- Lahnsteiner F and Patzner RA. 1997. Fine structure of spermatozoa of four littoral teleosts, *Symphodus ocellatus*, *Coris julis*, *Thalassoma*

- pavo* and *Chromis chromis*. J Submicr Cytol Pathol 29: 477-485.
- Lahnsteiner F and Patzner RA. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. J Fish Biol 52, 726-742.
- Lee CK and Hur SB. 1997. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J of Aquaculture 10, 473-483.
- Lee JS and Chin P. 1995. Morphology and histochemical characteristics of the alimentary tract in surfperch, *Ditrema Temmincki*. Korean J. Ichthyol 7, 140-149.
- Li CJ, Zhou L, Wang Y, Hong YH and Gui JF. 2005. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common  $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  in groupers. Mol Cell Endocrinol 233, 33-46.
- Li YH, Wu CC and Yang JS. 2000. Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Perciformes. J Fish Biol 56, 615-621.
- Lim HK and Chang YJ. 1998. Effect of diluents and cryoprotectants on cryopreservation of black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm. J of Aquaculture 11, 67-75.
- Linhart O and Kudo S. 1997. Surface structure of paddlefish eggs before and after fertilization. J Fish Biol 51, 573-582.
- Mansour N, Lahnsteiner F and Berger B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). Comp Biochem Physiol B 135: 285-296.
- Maricchiolo G, Genovese L, Laurà R, Micale V and Muglia U. 2002. The ultrastructure of amberjack (*Seriola dumerilli*) sperm. Eur J Morphol 40, 289-292.
- Maricchiolo G, Genovese L, Laurà R, Micale V and Muglia U. 2004. Fine structure of spermatozoa in pandora (*Pagellus erythrinus* Linnaeus,

- 1758) (Perciformes Sparidae). *Histol Histopathol* 19, 1237-1240.
- Maricchiolo G, Genovese L, Laurà R, Micale V and Muglia U. 2007. Fine structure of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) (Perciformes Sparidae). *Histol Histopathol* 22, 79-83.
- Maricchiolo G, Laurà R, Genovese L, Guerrera MC, Micale V and Muglia U. 2010. Fine structure of spermatozoa in the blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) with some considerations about the centriolar complex. *Tissue Cell* 42: 88-96.
- Mattei C and Mattei X. 1978. La spermiogenese d' un poisson teleosteen (*Lepadogaster lepadogaster*). I-Lespermatide. *Biologie Cellulaire* 32: 257-266.
- Mattei C and Mattei X. 1984. Spermatozoïdes biflagellès chez un poisson téléostéen de la famille Apogonidae. *J Ultrastruct Res* 88, 223-228.
- Mattei X. 1970. Spermiogenèse compare des poissons. In: Baccetti B, ed, *Comparative Spermatology*, pp. 57-70, Academic Press, New York.
- Mattei X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implication in fish. *Can J Zool* 69: 3038-3055.
- Mekkawy IAA and Osman AGH. 2006. Ultrastructural studies of the morphological variations of the egg surface and envelopes of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1982) before and after fertilisation, with a discussion of the fertilization mechanism. *Sci Mar* 702, 23-40.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A and Yaron Z. 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol* 119C, 325-338.
- Mikodina EV. 1987. Surface structure of the egg of teleostean fishes. *Voprosy Ikhtiologii* 1, 106-113.
- Morisawa S. 1999. Acrosome reaction in spermatozoa of the hagfish *Eptatretus burger* (Agnatha). *Dev Growth Different* 41, 109-112.

- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Heijne VG. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1–6.
- Nishi K and Takano K. 1979. Effects of photoperiod and temperature on the ovary of the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Bull. Fac. fish. Hokkaido Univ* 30, 63–73.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K and et al. 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneriirideus*). *Gen Comp Endocrinol* 77, 358–367.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y and et al. 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *Gen Comp Endocrinol* 77, 348–357.
- Oh SR. 2006. Seed production of longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* with induced sex reversal and maturation. Ph. D. thesis, Cheju Nat'l Univ., Jeju. Korea, 137 pp.
- Parhar IS, Soga T, Ogawa S and Sakuma Y. 2003. FSH and LH- $\beta$  subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *Gen Comp Endocrinol* 132, 369–378.
- Randall JE and Heemstra PC. 1991. *Epinephelus fasciatus*. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae), with descriptions of five new species. Indo-Pacific fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum, Honolulu.
- Riehl R and Kock KH. 1989. The surface structure of Antarctic fish eggs and its use in identifying fish eggs from the southern ocean. *Polar Biol* 43, 617–620.
- Rizzo E, Sato Y, Barreto BP and Godinho HP. 2002. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J Fish*

- Biol 61, 615–632.
- Sadovy YJ, Donaldson TJ, Graham TR, McGilvray F, Muldoon GJ, Phillips MJ, Rimmer MA, Smith A and Yeeting B, 2003. While stocks last: The live reef food fish trade. Asian Development Bank, Manila, Philippines, pp. 8–19.
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L and White WF. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science 173, 1036–1038.
- Shapiro DY, Sadovy Y, McGehee AM. 1993. Periodicity of sex change and reproduction in the red hind, *Epinephelus Guttatus*, a protogynous grouper. Bull Mar Sci 53, 1151–1162.
- Shimizu A. 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. Gen Comp Endocrinol 131, 310–324.
- Song YB. 2004. Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinepelus septemfasciatus*. Ph. D. thesis, Cheju Nat'l Univ., Jeju. Korea, 120 pp.
- Sower SA, Moriyama S, Kasahara M, Takahashi A, Nozaki M, Uchida K, Dahlstrom JM and Kawauchi H. 2006. Identification of sea lamprey GTHb-like cDNA and its evolutionary implications. Gen Comp Endocrinol 148, 22–32.
- Stanley HP. 1971. Fine structure of spermatogenesis in the elasmobranch fish *Squalussuckleyi*. J Ultrastruct Res 36, 86–102.
- Sugama K and Ikenoue H. 1999. Research and development: The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA., pp. 53.
- Tanaka M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive

- system in teleost larvae-III. Development of the digestive system during postlarval stage. Japanese J Ichthyol 18, 164-174.
- Tsuchihashi Y, Tanaka H, Kuromiya Y, Kashiwagi M and Yoshioka M. 2003a. Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51, 189-196.
- Tsuchihashi Y, Kuriyama I, Kuromiya Y, Kashiwagi M and Yoshioka M. 2003b. Effects of water temperature, illumination and feed oil addition on the survival of larvae in the mass seed production of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51, 49-54.
- Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Levavi-Sivan B and Elizur A. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. Comp Biochem Physiol 129B, 489-502.
- Yu JYL, Namiki H and Gorbman A. 1979. Rat gonadotropin release stimulated *in vitro* by GnRH-depleted rat brain extracts. Neuroendocrinology 29, 54-65.
- Zaki MI, Negm RK, El-Agamy A and Awad GS. 2005. Ultrastructure of male germ cells and character of spermatozoa in *Boops boops* (family Sparidae) in Alexandria Coast, Egypt. Egypt J Aquat Res 31, 293-313.
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J and Chen SL. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with practical methodology. Theriogenology 60, 989-996.

## 감사의 글

여기 논문이 완성되기까지 그야말로 우여곡절이 많았으며 중도에 포기하려고 했었던 적도 있었다. 그러나 그 때마다 “포기라는 말은 배추 셀 때나 필요하지, 그런 나약한 의지를 가지고서 다른 어떠한 일인들 할 수 있겠느냐”며 담금질과 격려로 지도해 주신 이영돈 교수님께 먼저 깊이 감사드립니다. 그리고 평소에 긍정적으로 있는 그대로를 바라보아 주셨던 여인규 교수님, 이경준 교수님, 김기영 교수님께 감사드리며 남달리 해양수산분야의 미래를 진단하며, 세상을 움직이는 동력이 배려라고 일깨워 주신 김형배 교수님께도 감사드립니다.

이 논문은 특히 이영돈 교수님의 해양동물번식학연구실 전임연구원으로 활동하는 이치훈 박사님의 헌신적인 도움과 김성훈 박사님, 송영보 박사님, 허상우 박사님, 허성표 박사님 그리고 강형철님, 김병훈님, 이승현님의 도움과 해양과환경연구소의 변수철 선생님을 비롯한 직원 여러분께도 진심으로 감사의 뜻을 포함합니다.

그 뿐만 아니라 이 공부를 시작하기 전에 “설령 남이 나를 알아주지 않는다 해서 섭섭히 생각하지 말며, 그럴수록 더욱 남을 공경히 대하라”고 부족한 저에게 학문을 몸소 행함으로 가르쳐 주신 금곡 선생님과 맺은 언약을 지킬 수 있어 감사드리며 이 외에도 성원과 도움을 주신 주위 분들께 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 지치고 힘들어 바둥 될 때 마다 묵묵히 이 과정을 지켜봐주며 마지막까지 용기와 믿음으로 화답해준 사랑하는 아내와 성환·성필 두 아들과 이 기쁨을 함께 나누고 싶다. 그러나 이를 계기로 인생 2막을 여는 새로운 시작의 출발점이자 전환점으로 삼으려하니 기쁨보다 그에 따른 책임감이 먼저 드는 것 또한 솔직한 심정이다. 그러기에 더욱 내 자신에게 발분을 촉구하면서, 지금 이 순간까지도 자나 깨나 이 못난 불효자식을 위해 잘 되기만을 간절히 바라시는 홀로 계신 어머님과 평생을 오직 한 길 교육자의 삶을 올곧게 사시다가 작년에 승화하신 아버님 영전에 삼가 이 논문을 바치고자 합니다.