



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

석사학위논문

붉바리 (*Epinephelus akaara*) 의

성숙 개시와 성 특성

제주대학교 대학원

해양생명과학과

오승보

2017년 2월

붉바리 (*Epinephelus akaara*) 의

성숙 개시와 성 특성

지도교수 이 영 돈

오 승 보

이 논문을 이학석사학위논문으로 제출함

2017년 2월

오승보의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 김 기 영 (인)

위 원 이 승 현 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

제주대학교 대학원

2017년 2월



Puberty and sex characteristic in red spotted
grouper, *Epinephelus akaara*

Seung-Bo Oh

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

A thesis submitted in partial

Fulfillment of the requirement for the

Degree of Master of Science

MARINE LIFE SCIENCE

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERERS

February, 2017

목차

목차	I
List of figures.....	III
List of tables.....	IV
Abstract.....	V
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험어 및 사육관리	3
2. 실험어 해부 및 조직학적 관찰	3
3. Total RNA추출 및 cDNA 합성	4
4. 번식생리관련 유전자의 발현양상	5
5. 인공수정	6
6. 통계처리	6
III. 결과	
1. 사육 수온 처리구별 생식소 형태와 생식소중량지수(GSI).....	8
2. 사육 수온 처리별 생식소발달과 성숙 비율.....	11
3. 사육 수온에 따른 번식생리관련 유전자의 mRNA발현 양상.....	14
4. 성 성숙 개시(Puberty)된 1년생 붉바리의 인공수정	16

IV. 고찰	18
V. 참고문헌.....	21

List of figures

Fig. 1. The exterior of red spotted grouper gonad in different rearing water temperatures.....	9
Fig. 2. Gonadosomatic index of the female red spotted grouper under each other rearing water temperatures.....	10
Fig. 3. Development of red spotted grouper gonad by histological analysis in different rearing water temperatures.....	12
Fig. 4. Matured fish rate under each other rearing water temperatures by histological analysis.....	13
Fig. 5. Expression of reproduction-related genes in brain (with pituitary) by real-time PCR.....	15
Fig. 6. Fertilization and hatching rate by artificial fertilization using eggs and sperms collected.....	17

List of tables

Table 1. Primer set used for real time quantitative PCR	7
---------------------------------------------------------------	---

Abstract

It takes quite a long time for the grouper to spawn. In the case of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*), at least three to four years of rearing is usually required to reproduce them for the first time. Reproductive control techniques can be applied to repress, delay or advance the onset of puberty. Thus, they can be used to accelerate the process of selective breeding in this species. The present study investigated whether alterations of rearing water temperature (WT) can advance the onset of puberty in the red spotted grouper. Juvenile red spotted grouper (110 DAH, 7.25 ± 0.5 cm, 6.45 ± 1.5 g) were randomly divided into 4 groups and reared for approximately 10 months (from Nov. 2014 to Aug. 2015) at four different WT: natural treatment (12.6–19.5°C), 20°C, 24°C and 28°C treatment. When they were reared at 24 or 28°C WT, sexually mature individuals appeared within 12 months after hatching during their breeding season (Jul. to Aug.). The mRNA levels of reproduction-related genes such as Kisspeptin, GnRH, FSH β and LH β were higher at these rearing WT than at natural or 20°C WT ($P < 0.05$). Mature yolk stage oocytes (≥ 300 μ m diameter) were found in the ovaries of female red spotted grouper reared at 24 or 28°C WT, while only oogonia were found at natural WT and peri-nucleolus stage oocytes were observed at 20°C WT, respectively. Moreover, males were found to produce sperm only at 24 or 28°C WT. The one-year-old mature females ovulated 6–10

ml of eggs that corresponded to 10% of their body weight. In artificial fertilization performed at 24°C WT, the fertilization and hatching rates were determined to be 95% and 97%, respectively. This is the first report demonstrating that rearing at 24 or 28°C WT can significantly advance the onset of puberty in the red spotted grouper.

서론

어류의 puberty 는 부화 후 성 분화하여 처음으로 배우자 형성을 할 수 있는 시기며(Schulz and Miura, 2002; Carrillo et al., 2009), puberty 조절은 어류의 양식산업에 있어서 매우 중요하다(Goos, 1993). 어류의 puberty 는 주로 연령과 성장, 등 번식내분비축의 활성화와 연관성을 보인다(Okuzawa, 2002; Taranger et al., 2010). 어류의 배우자 형성 과정에는 생리적 요인과 외부 환경적 요인들에 의해 활성화 또는 억제 된다. 대표적인 생리적 요인 (Physiological factors)으로는 영양, 스트레스, 면역 등을 들 수 있다. 그리고 외부환경요인(Environmental factors)으로는 광, 수온, 수압, 조석 등이 있다.

광과 수온은 대표적인 외부환경 요인으로 배우자 형성(Glasser et al., 2004; Bayarri et al., 2009)에 관여하며, puberty 에도 매우 중요한 역할을 한다(Yoneda., 2005; Taranger et al., 2010). Eurasian perch, yellow perch 어종과 같이 주로 광이 puberty 에 많은 영향을 주는 어종이 있으나(Oliveira et al., 2011; Giannecchini et al., 2012), 종에 따라서 atlantic halibut, grass carp 어종과 같이 수온이 핵심적으로 성숙에 관여하는 어종도 있다(Glasser et al., 2004; Brown et a., 2006).

이런 외부환경 요인은 각 기관의 수용체를 자극하고 뇌에서 종합되어 번식내분비축(B-P-G axis)을 활성화 시킨다(Goos, 1993). 이전 연구에서는 puberty 와 성 성숙 관련 연구에 있어서 주로 Gonadotropin-Releasing Hormones (GnRH)과 Gonadotropic Hormones (GtHs)의 활성화에 관한 연구들이 진행되었다(Gen et al., 2000; Ryu et al., 2013). 하지만 최근 연구에 의하면 Kisspeptine

(Kiss)과 수용체인 G-protein receptor54 (GPR54)가 GnRH의 분비를 촉진하는 상위인자로 밝혀지면서 (Gottsch et al., 2004; Messenger et al., 2005; Ohga et al., 2015) puberty와 성 성숙 관련하여 Kiss와 Gpr54의 많은 연구들이 진행되고 있다(Castellano et al., 2005; Kuohung et al., 2006; Kang et al., 2012).

붉바리를 포함한 바리과 어류는 아시아와 같은 아열대 지역에서 서식하며, 제주 연안에 서식하는 붉바리(*Epinephelus akaara*)는 6~8월에 산란한다. 붉바리의 성 특성은 암컷으로 성 분화 후 3년이 지나서야 성 성숙하며, 그 중 일부(26 cm이상, 5년 이상)가 수컷으로 전환하는 자성선숙형 자웅동체어 (protogynous hermaphrodite)이다(Kayano et al., 1994; Li et al., 2006, 2007; Huang et al., 2009). 붉바리는 다른 바리과 어류와 같이 아시아에서 수요가 증가하는 고부가가치의 어종이다(Lee et al., 2008; Sao et al., 2012; Kim et al., 2015). 그러나 현재 국제식량기구(FAO)와 국제자연보호기구(IUCN)에서 멸종위험종으로 분류하고 있다(Annalie et al., 2000; Baillie et al., 2004). 현재 바리과 어류에 있어서 외부환경 조절 및 호르몬 주입 방식으로 성 성숙과 성 전환이 이루어지는 연구는 상당 부분 발표 되었다(Kang et al., 2012; Kim and Baek, 2014; Lee et al., 2014). 그러나 puberty에 관한 연구 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 puberty에 이르는 데 오랜 시간 소요되는 붉바리를 대상으로 외부환경 요인 중 사육 수온 조절을 통해 puberty를 유도하는 방법을 밝혔다. 그리고 puberty 시 번식 생리 관련 유전자들의 발현 기작을 탐색하기 위한 Kiss, Gpr54, GnRH, GtHs의 발현 양상과 생식소 발달을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 사육관리

실험어는 제주대학교 해양과학연구소에서 종묘 생산한 붉바리 치어(부화 후 110일령, 7.25 ± 0.5 cm, 6.45 ± 1.5 g)를 사용하였다. 붉바리 치어는 해양과학연구소에서 사육 중인 붉바리 성어를 14L:10D의 광 주기 조건과 $21.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 사육 수온 조절을 통해 2014년도 7월에 종묘 생산한 개체이다. 사육 수온 조절을 통한 붉바리의 puberty 유도를 위하여 실험구를 2군으로 나누었다. 자연 수온 (Natural treatment, N)과 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 처리구로 구분하여, 각각의 처리구에 600마리씩 수용하였다. 실험수조는 6톤 원형수조(3 m*85 cm)를 이용하여 유수식으로 사육하였고, 각 수조당 환수량은 15~17 L/min이었다. 실험 기간은 2014년 10월부터 2015년 7월까지 약 8개월간 실행하였다. 실험기간 중 광 주기는 자연광 주기로 처리하였다. 용존산소량(Dissolved Oxygen, DO)은 8 ± 1 mg/L, 염분은 $30 \text{ ppt} \pm 2 \text{ ppt}$, pH는 8.0 ± 0.1 이다. 사료는 1일 2회 공급하였다.

2. 실험어 해부 및 조직학적 관찰

B-P-G축 활성화와 생식소의 발달 단계를 확인하기 위하여 붉바리의 산란 시기인 7월에 각각의 수조에서 10~15마리씩 무작위로 선택하였다. 0.01%의 2-penoxyethanol에서 마취 후 전장과 체중을 측정하고, 뇌하수체를 포함한 뇌 전

체를 적출하여 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 처리구 간의 생식소 증량지수(Gonadosomatic index, GSI)와 생식소 발달을 비교 분석하기 위해 실험어의 생식소를 적출하여 무게 측정 후, Bouin' s solution에 고정하여 조직학적 분석에 사용하였다. 상법인 파라핀 절편법에 의해 조직 표본을 $5-7\mu\text{m}$ 의 두께로 절편하여 Hematoxylin과 0.5% Eosin으로 대비 염색 후, 광학현미경(Olympus BX53, Japan)을 이용하여 검경하였다.

3. Total RNA추출 및 cDNA합성

Total RNA는 각각의 실험구에서 적출한 뇌와 생식소 조직을 1.7 ml tube에 RiboExTM LS (GeneAll, Korea) 600 μl 과 넣고 homogenizer로 조직을 균질화시켰다. 균질화 된 tube에 RiboExTM LS 1.0 μl 당 0.2 μl 의 chloroform을 넣은 후, 상온에서 5분간 반응하게 하고, 4°C 를 유지한 원심분리기(Vision VS-15000CFN II, Korea)에서 15분 간 $12,000 \times \text{g}$ 로 total RNA를 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 새 tube에 옮겨 500 μl 의 iso-proanol을 넣고 상온에서 반응을 시켜준 후, 4°C 에서 10분간 $12,000 \times \text{g}$ 로 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 제외한 나머지 상층액은 제거 후, diethyl pyrocarbonate (DEPC)처리한 H_2O 로 75%와 95% Ethanol로 희석하여 수세하고, DEPC H_2O 로 용해하여 Total RNA를 얻었다. Total RNA 정량 및 정성 분석은 분광 광도계(Spectrophotometer, Nanovue)로 측정하여 A_{260}/A_{280} nm의 비율이 1.7~2.1 순도 값의 샘플을 선택하고 전기영동으로 확인했다.

cDNA합성은 뇌 조직의 Total RNA를 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, USA)를 사용하여 DNase처리 후, PrimeScriptTM 1st strand cDNA

synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. DNase처리한RNA는 RNase-free H₂O를 사용하여 8.0 μ l 만들고, Random 6mers 1.0 μ l, dNTP mixture 1.0 μ l 을 혼합하여 65°C에서 5분 반응하였다. 그리고 5X PrimeCript Buffer 4.0 μ l, RNase inhibitor 0.5 μ l PrimeCript RTase 10 μ l, RNase free dH₂O 4.5 μ l를 첨가하여 총 20 μ l의 볼륨으로 맞추었다. 30°C에서 10분, 42°C에서 60분 반응 후, 95°C에서 5분간 효소 활성화하고 합성을 완료하였다.

4. 번식생리관련 유전자의 발현양상 (Quantitative Real-time RT-PCR)

번식 생리 관련 유전자들(Kiss, GnRH, GtHs)의 primer는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 유전자 염기 서열을 참고하여 gene specific primer를 디자인하여 사용하였다(Table 1). 번식 관련 유전자 발현 양상을 확인하기 위해 Quantitative Real-time RT-PCR을 이용하여 정량 분석하였다. 정량 분석은 BioRad CFX96™ Touch™Real Time PCR (BioRad, Hercules, CA)을 이용하여 EvaGreen 2X qPCR MasterMix-RoxKit(abm, Canada)를 사용하였다. cDNA 2.0 μ l를 주형으로 EvaGreen 2X qPCR MasterMix 5.0 μ l, forward primers 0.3 μ l, reverse primers 0.3 μ l andRNasefree H₂O 2.4 μ l를 혼합하여 total 10 μ l volume으로 맞추고 denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 58°C) 그리고 extension (1m, 72°C)에서 40 cycle 증폭하였다. 각 sample 별로 2번 반복 실시하였으며, B-actin을 이용하여 상대 정량 후, 실험의 평균 값을 이용하였다.

5. 인공수정

2015년 8월에 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 처리구에서 puberty 유도된 1년생 붉바리 개체를 선별하여 복부압박법으로 채란과 채정하였으며, $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 여과 해수를 이용하여 습식법으로 인공수정하였다. 수정률과 부화율은 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 사육 수온에서 진행하였다. 붉바리 수정란의 특징은 부상란이었으며, 수정률은 인공 수정 후 부상란의 비율로 조사하였다. $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 사육 수온에서 48시간 후 부화하였으며, 부화율은 세란된 수정란 500개를 1000 ml 비이커에 수용하여 부화한 자어와 사란을 계수하였다.

6. 통계처리

통계 분석은 SPSS version 21을 이용하였으며 One-Way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 유의성 검정하였다. 평균값 \pm 표준편차로 나타내었으며 유의차는 $P < 0.05$ 일 때 통계적인 유의성을 인정하였다.

Table 1. Primer set used for real time quantitative PCR

Gene	Primer information		
	Primer	5'-3' sequence	Amplicon size (bp)
Kiss1	Kiss1 F	TGCCACGACTCATTGTTGC	225
	Kiss1 R	AGATCCACCATCCTGACCTG	
Kiss2	Kiss2 F	GGCCTGATTGTTGGACAGGA	166
	Kiss2 R	TCTCGCTCAGGGACAACAC	
GPR54	GPR54 F	TCTCCC TGGATGGATCTTTG	198
	GPR54 R	GAGCCAATCCAAATGCAGAT	
sbGnRH	sbGnRH F	ACTGTGTCTGCTGCTTGTGG	192
	sbGnRH R	TTGGCAAAAGGTGATTCCCTC	
FSH β	FSH β F	ACGTGAGACC TGCAGACGAT	301
	FSH β R	AGTTTCTGGCCACAGGGTAG	
LH β	LH β F	TACAGGTCGGCAGAGTGATG	389
	LH β R	CTCGAAGGTGCAGTCAGATG	
B-actin	B-actin F	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC	390
	B-actin R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	

결과

1. 수온 처리구별 생식소 형태와 생식소중량지수(GSI)

수온 처리 8개월 후, 360일령 자연수온(12.2 ± 1.0 cm / 28.5 ± 11.5 g) 처리구와 20°C (15.2 ± 2.3 cm / 54.3 ± 15.0 g) 처리구의 붉바리 생식소는 매우 작아서(Fig. 1A,B) 정확한 GSI 측정이 불가능하였다(Fig. 2). 그러나 24°C 처리구(18 ± 1 cm / 89.0 ± 24 g)와 28°C 처리구(20.1 ± 2.0 cm / 131.4 ± 39 g)의 붉바리 생식소는 자연수온과 20°C 처리구의 생식소보다 발달하였으며(Fig. 1C, D), GSI 값은 각각 0.7 ± 0.1 , 1.7 ± 0.5 이었다(Fig. 2).

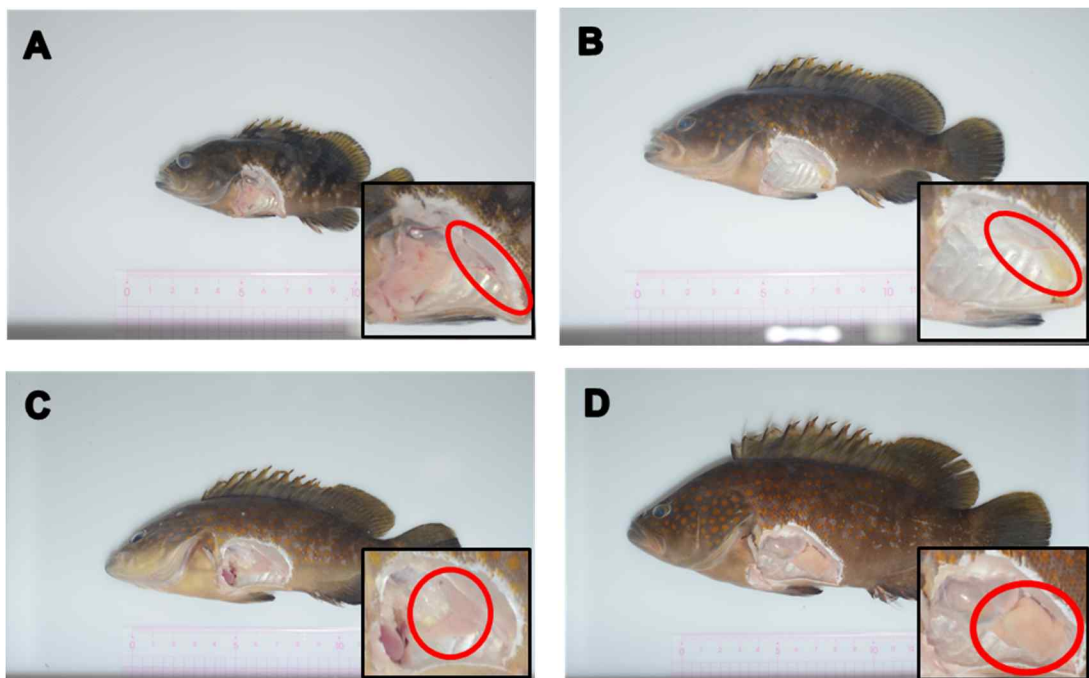


Fig. 1. The exterior of red spotted grouper gonad in different rearing water temperatures. A, the gonad of fish reared natural water temperature treatment(N); B, the gonad of fish reared 20°C treatment; C, the gonad of fish reared 24°C treatment; D, the gonad of fish reared 28°C treatment.

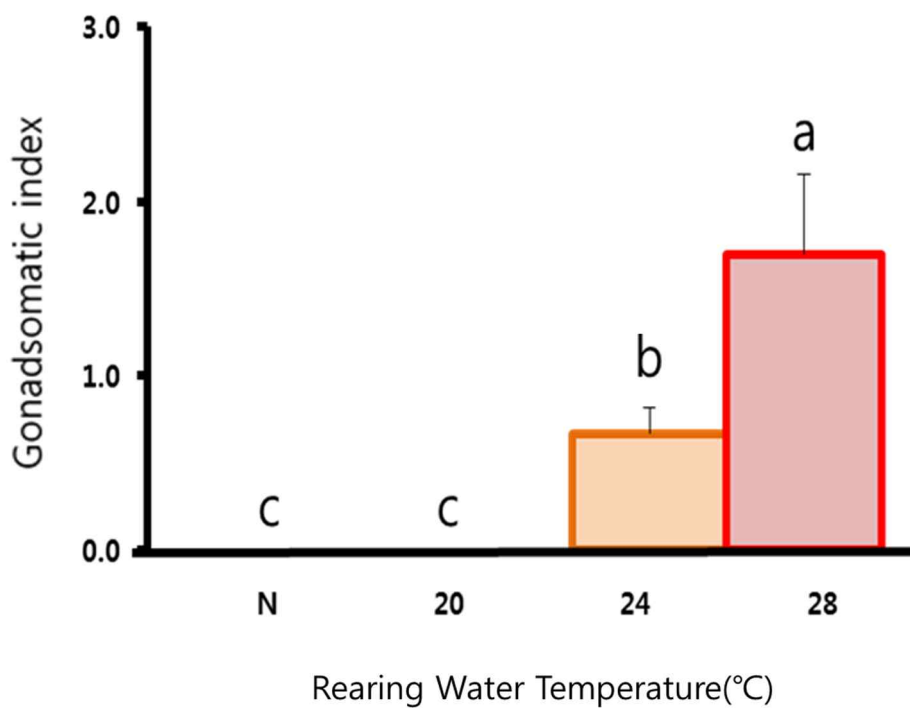


Fig. 2. Gonadosomatic index of the female red spotted grouper under each other rearing water temperatures. Means represent by different letters are significant ($p < 0.05$). N; Natural treatment.

2. 수온 처리구별 생식소 발달과 성숙 비율

수온 처리 8개월 후, 각각의 수온 처리구에 따른 생식소 발달은 조직학적 분석 방법을 통해 비교 분석하였다. 자연수온 처리구 붉바리의 생식소는 평균 12-17 μm 의 난원세포 단계가 관찰 되었다(Fig. 3A). 그리고 20 $^{\circ}\text{C}$ 처리구 붉바리의 생식소는 주로 평균 37-42 μm 의 주변인기 난모세포의 단계가 관찰되었고(Fig. 3B), 성숙한 개체가 나타나지 않았다(Fig. 4). 그러나 24 $^{\circ}\text{C}$ 와 28 $^{\circ}\text{C}$ 처리구의 붉바리 생식소는 주로 평균 320-350 μm 의 난황구기 난모세포가 관찰되는 성숙한 단계였으며(Fig. 3C, D), 각각 33.3%와 53.3%의 비율로 성숙한 개체가 출현하였다(Fig. 4).

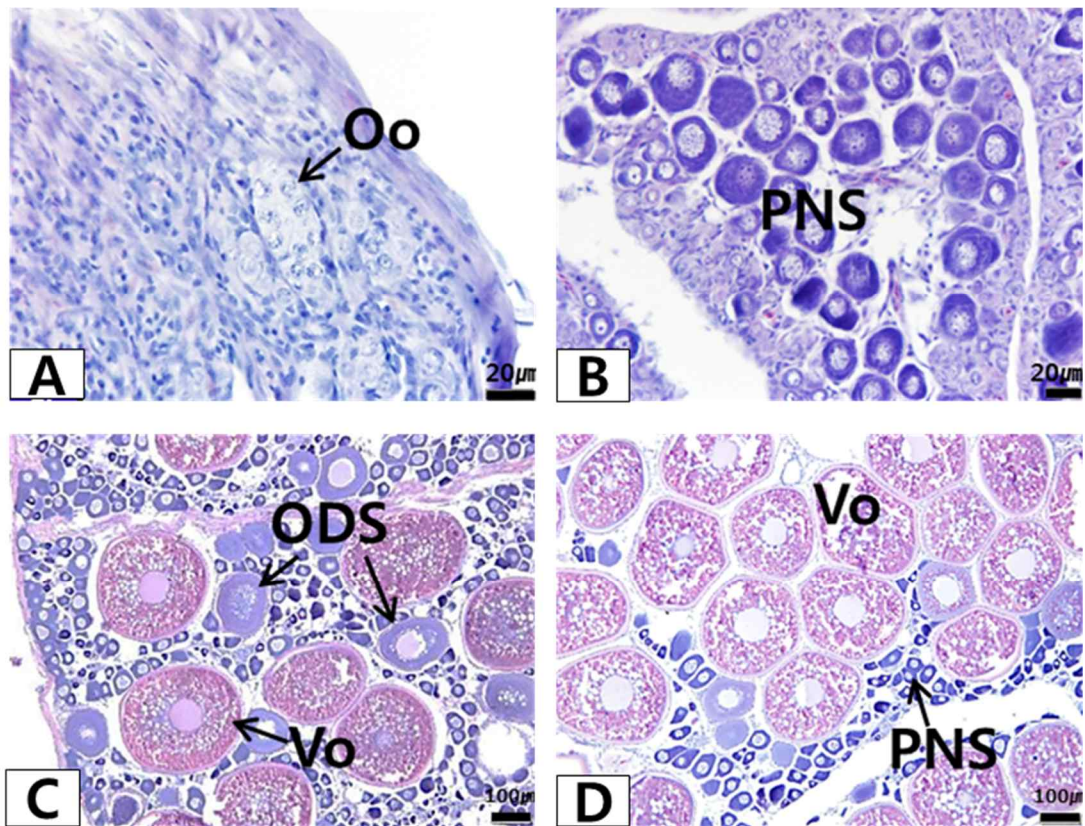


Fig. 3. Development of red spotted grouper gonad by histological analysis in different rearing water temperatures (n= 5; 5; 10; 10). A, the fish reared in Natural treatment; B, an immature fish reared in 20°C treatment; C, a few mature fish reared in 24°C treatment; D, a mature fish reared in 28°C treatment. Oo, oogonia; PNS, peri-nucleolus stage; ODS, oil droplet stage; Vo, vitellogenic oocytes.

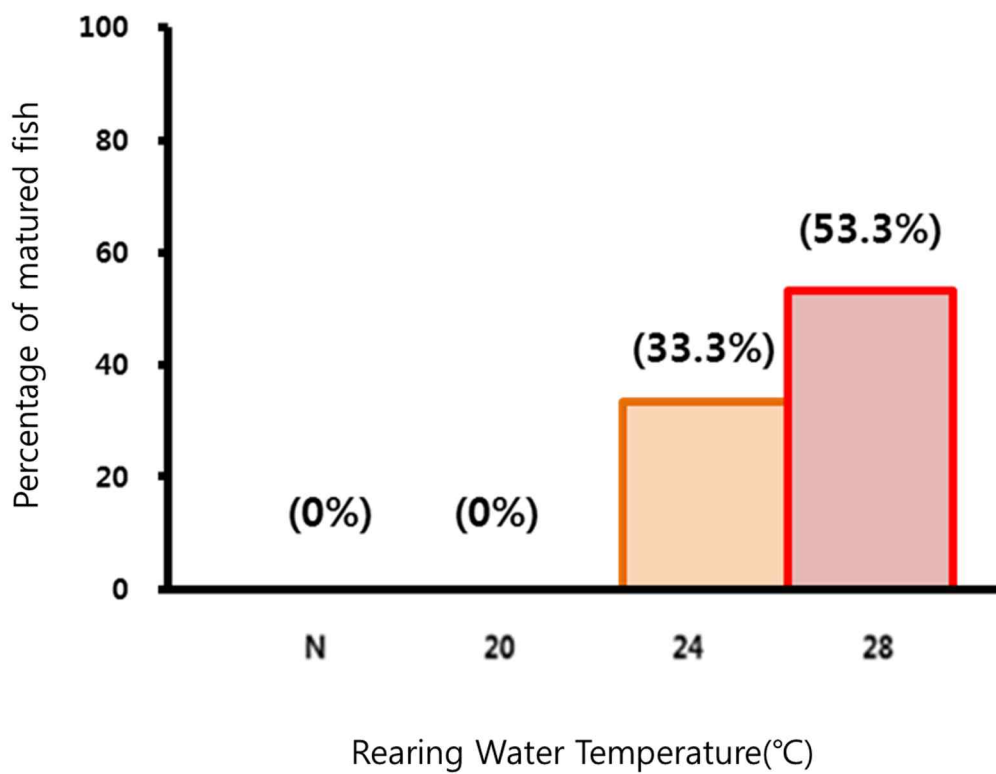


Fig. 4. Matured fish rate under each other rearing water temperatures by histological analysis (n=10; 10; 15; 15). N; Natural treatment.

3. 사육수온 처리에 따른 번식생리관련 유전자의 mRNA 발현 양상

사육수온 처리에 따른 B-P-G축의 활성을 탐색하기 위해 뇌하수체를 포함한 뇌 전체에서 번식생리 관련 유전자의 mRNA 발현 양상을 조사했다. Kisspeptin1, 2 mRNA 발현은 각각의 수온 처리구별 유의적인 차이는 없었다. Kisspeptin1 의 경우는 28℃ 처리구에서 다른 처리구보다 상대적으로 높게 발현되었고(Fig. 5A). Kisspeptin2의 경우는 24℃ 이상 처리구가 20℃ 이하의 처리구에 비해 상대적으로 높게 발현되는 경향을 보였다(Fig. 5B). Gpr54 (kiss1r) mRNA의 발현은 28℃ 처리구가 나머지 처리구보다 높으며, Kisspeptin1 mRNA 발현과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 5C). GnRH (seabream type) mRNA 발현은 자연수온 처리구와 20℃ 처리구 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 24℃와 28℃ 처리구에서 자연수온 처리구에 비해 유의적으로 높았고(Fig. 5D, $P < 0.05$), GtHs (FSH β , LH β)mRNA의 발현은 20℃ 이하 처리구에 비해 24℃ 이상 처리구가 높았다(Fig. 5E, F, $P < 0.05$).

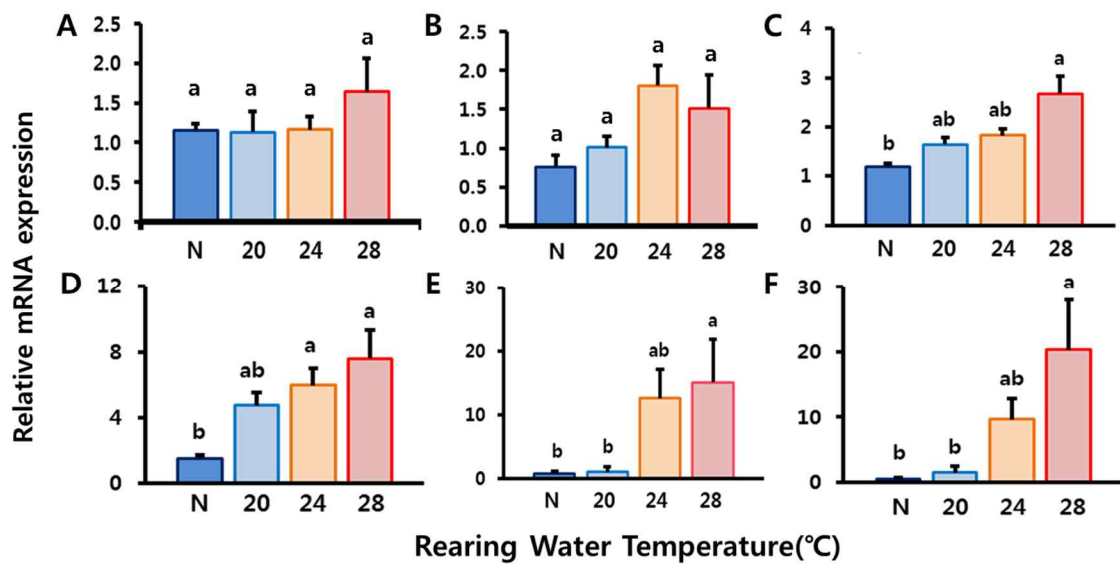


Fig. 5. Expression of reproduction-related genes in brain (with pituitary) by real-time PCR (n= 5; 5; 10; 10). A, Kisspeptin1 mRNA; B, Kisspeptin2 mRNA; C, G protein-coupled receptor 54 mRNA; D, GnRH (seabream type) mRNA; E, FSH β mRNA; F, LH β mRNA each other rearing water temperatures. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant (p<0.05). N, Natural treatment.

4. 성 성숙 개시(Puberty)된 1년생 붉바리의 인공수정

2015년 8월에 28℃ 처리구에서 성숙한 1년생 붉바리 수컷(110.8 ± 40.4 g / 19.7 ± 1.8 cm)과 암컷(131.0 ± 40.2 g / 18.6 ± 0.3 cm)을 선별 후 복부 압박법으로 정자와 난을 채취하였으며, 배란량은 6-13ml로 어체의 약 10%였다 (Fig. 6A). 인공수정 시 수정률은 95%였으며, 부화율은 97%였다(Fig. 6B).

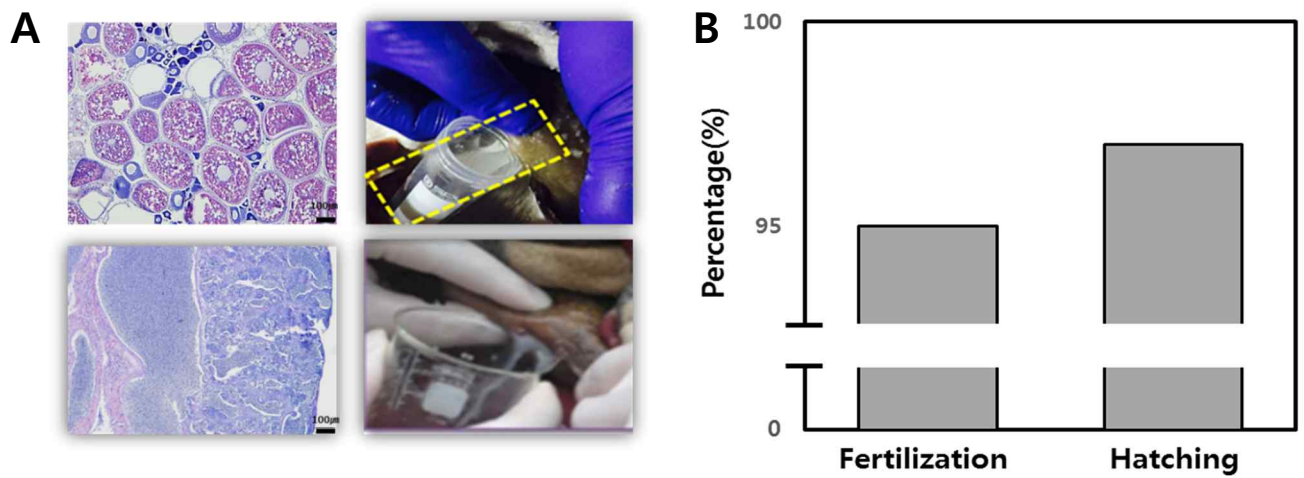


Fig. 6. Fertilization and hatching rate by artificial fertilization using eggs and sperms collected. A, collect eggs of one year female fish (131.0 ± 40.2 g, 18.6 ± 0.3 cm) and collect sperms of one year male fish (110.8 ± 40.4 g, 19.7 ± 1.8 cm). B, fertilization and hatching rate.

고찰

어류의 puberty는 주로 연령과 성장 그리고 번식내 분비축인 B-P-G축의 활성화와 연관성이 있다고 보이며, 이러한 어류의 B-P-G축 활성화는 광과 수온, 체중, 먹이의 영향을 받는다(Shearer et al., 2006; Taranger et al., 2010). Nile tilapia와 sea bass는 광주기 조절에 의해 번식생리 관련 유전자의 발현이 증가하여 puberty가 유도되었으며(Martinez-Chavez., et al 2008; Carrillo et al., 2009), pikeperch는 자연광 주기 조건과 14℃ 사육수온에서 puberty가 유도되었다(Hermelink et al., 2013). Longtooth grouper와 dusky grouper의 puberty는 체중과 연관성이 있고(Andrade et al., 2003; Ryu et al., 2013), 여러 양식어 종들의 puberty도 성장, 나이 등과 연관성이 있다(Taranger et al., 2010). 이와 같이 어류의 번식내 분비축은 외부환경 요인과 생리적 요인의 신호를 받고 번식생리 관련 유전자(Kiss, Gpr54, GnRH, GtH)의 발현을 시작으로 생식소가 성숙하여 puberty가 유도된다.

어류의 번식생리 관련 유전자 중 Kisspeptin과 Gpr54는 puberty와 관련하여 중요한 유전자이다(Navarro et al., 2007; Martinez-Chavez., et al 2008). Nile tilapia는 puberty 시작시 Gpr54 발현이 증가하는 경향을 보였으며(Martinez-Chavez., et al 2008), 포유류(rat, mouse, sheep)에서도 puberty 시작 시 Kisspeptine의 발현이 GnRH의 분비를 유도하였다(Messenger et al., 2005). GtHs의 분비를 유도하는 GnRH는 Gpr54의 발현이 증가하면서 영향을 받고(Mohamed et al., 2007;Nocillado et al., 2007; Filby et al., 2008), GnRH mRNA의 분비량은 puberty가 시작하면서 증가하였다(Ojeda et al., 2006;Nocillado et

al., 2007; Martinez-Chavez., et al 2008). GnRH type에는 여러 종류가 있는데 바리과 어류와 bass류는 주로 Sea bream type의 GnRH 발현이 생식소 발달에 영향을 받는다(Rodriguez et al., 2000; Holland and Zohar, 2001; Ryu et al., 2013).

GtHs 또한 puberty에 중요한 요인으로 작용한다 (Patino and Sullivan 2002; Schulz and Miura et al., 2002; Carrillo et al., 2009). Chinook salmon 어종에서 puberty시 FSH β 와 LH β 의 발현양이 증가하였으며(Shearer and Swanson 2000), african catfish 와 european sea bass 어종에서도 puberty 시기에 LH β 의 발현양이 증가하였다(Schulz et al. 1997; Rodriguez et al. 2000).

이번 연구에서도 붉바리의 puberty 유도시 Kiss1, 2 mRNA의 발현은 처리구별 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 상대적으로 고수온 처리구로 갈수록 증가하는 경향을 보였다. 그리고 Gpr54, GnRH(sb), GtHs mRNA의 발현은 상대적으로 고수온 처리구에서 저수온 처리구에 비해 유의적으로 높게 발현하였다. 조직학적 방법을 통해 생식소를 관찰한 결과 자연수온 처리구와 20 $^{\circ}$ C 처리구에서는 생식소가 발달하지 않았으나, 24 $^{\circ}$ C 이상의 처리구에서는 주로 성숙한 난모세포를 갖는 성숙한 개체가 관찰되었다.

Rainbow trout 은 수온 영향에 의해 성장호르몬인 Growth hormone(GH)가 Insulin-like Growth Factor(IGF1) 분비를 자극하여 성장이 촉진되었다 (Gabillard et al., 2003). 포유류에서는 성장호르몬인 Gh, Igf 와 성숙에 관한 연구들이 보고 되었고(Darendeliler et al., 1990; Sharara et al., 1997; Shahat et al., 2014), Atlantic halibut 어종에서도 성장과 성숙의 연관성을 보였다(Jakupsstovu and Haug, 1988). 성장 호르몬인 Gh 는 간에서 Igf1, 2 의 합성을 유도한다(Reinecke, 2010). Japanses eel 과 tilapia 어종에서 Igf1 은

생식소를 자극하여 11-Ketotestosterone 의 분비를 유도하고 정자형성과정에 관여한다(Nader et al., 1999; Tokalov and Gutzeit, 2005). 그리고 gilthead seabream 과 tilapia 의 초기난황구기단계에서 Igfs 이 발현되며(Schmid et al., 1999; Perrot et al., 2000), goldfish 어종에서는 난황의 형성을 조절한다.(Srivastava and Kraak, 1994) 이번 실험에서는 성장관련 유전자인 Igfs 과 Gh 의 유전자 발현양상은 조사하지 못하였지만, 자연수온 처리구와 20℃ 처리구보다 24℃와 28℃ 처리구에서 높은 성장을 보였다. 따라서 아열대성 어종인 붉바리의 puberty 는 수온의 직접적인 영향과 간접적인 영향을 받아 유도되었으며, 사육수온과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

최근 zebrafish와 rainbow trout 등 다양한 어종에서 광과 수온을 감지하는 수용체와 대사, 생리, 행동에 관한 연구가 보고 되고 있어(Kastenhuber et al., 2013; Nisembaum et al., 2015; Gracheva and Bagriantsev, 2015), 추후 수온을 감지하는 수용체와 번식내분비축의 연관 기작에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Andrade, Á. B., Machado, L. F., Hostim-Silva, M., & Barreiros, J. P. (2003). Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Braz Arch Biol Technol*, 46(3), 373–382.
- Annalie V. M., C. M. Roberts and J. P. Hawkins., 2000. The treatedened status of groupers (*Epinephelinae*). *Biodivers Conserve* 9, 919–942.
- Baillie, J., C. H. Taylor, S. N. Stuart. 2004. The 2004 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Glands, Switzerland.
- Bhandari, R. K., Alam, M. A., Higa, M., Soyano, K., & Nakamura, M. 2005. Evidence that estrogen regulates the sex change of honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. *J. Exp. Zoolog. Part A Comp. Exp. Biol.*, 303(6), 497–503.
- Brown, N. P., Shields, R. J., & Bromage, N. R. 2006. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Aquaculture*, 261(3), 993–1002.
- Brusle-Sicard, S., Debas, L., Fourcault, B., & Fuchs, J. 1992. Ultrastructural study of sex inversion in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon* (*Teleostei, Serranidae*). *Reprod. Nutr. Dev*, 32(4), 393–406.
- Carrillo, M., A. Felip, et al. 2007. Effects of sexual steroids on photoperiodic arrested early puberty (precocity) in juvenile male sea bass. In 8th Int.

- Symp. Reprod. Physiol. FishG. Roudaut, C.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Felip, A., Bayarri, M. J., Molés, G., & Gómez, A. (2009). Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1163(1), 49–59.
- Castellano, J. M., Navarro, V. M., Fernandez–Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., ... & Pinilla, L. (2005). Changes in hypothalamic KiSS–1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 146(9), 3917–3925.
- Chang–Kyu Lee, Sung–Bum Hur. (1997.11). Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Journal of Aquaculture*, 10(4), 473–483.
- Darendeliler, F., Hindmarsh, P. C., Preece, M. A., Cox, L., & Brook, C. G. D. (1990). Growth hormone increases rate of pubertal maturation. *Acta Endocrinol*, 122(3), 414–416.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11(1), 1–42. ISO 690.
- El–Shahat, K. H., Khaled, N. F., & El–Far, F. I. (2014). Influence of growth hormone on growth and onset of puberty of Rahmani ewe lamb. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(3), 224–230.
- Filby, A. L., van Aerle, R., Duitman, J., & Tyler, C. R. (2008). The kisspeptin/gonadotropin–releasing hormone pathway and molecular

- signaling of puberty in fish. *Biol. Reprod*, 78(2), 278–289.
- Gen, K., Okuzawa, K., Senthilkumaran, B., Tanaka, H., Moriyama, S. and Kagawa, H. 2000. Unique expression of gonadotropin–I and –II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol. Reprod*, 63: 308–319.
- Giannecchini, L. G., Massago, H., & Fernandes, J. B. K. (2012). Effects of photoperiod on reproduction of Siamese fighting fish *Betta splendens*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(4), 821–826.
- Glasser, F., Mikolajczyk, T., Jalabert, B., Baroiller, J. F., & Breton, B. (2004). Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Gen. Comp. Endocrinol*, 136(2), 171–179.
- Goos, H. T. (1993). Pubertal development: big questions, small answers. (in) F. Facchinetti, I. W. Henderson, R. Pierantoni and A. M. Polzonetti–Magni(eds.), *Cellular Communication in reproduction*, Journal of Endocrinology. Bristol, UK, pp. 11–20.
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., ... & Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), 4073–4077.
- Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2015). Evolutionary adaptation to

- thermosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 34, 67–73.
- Hassin S, Holland MCH, Zohar Y (2000) Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). *Biol Reprod* 61:1608–1615.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Rennert, B., Kloas, W., & Schulz, C. (2013). Temperature control of pikeperch (*Sander lucioperca*) maturation in recirculating aquaculture systems—induction of puberty and course of gametogenesis. *Aquaculture*, 400, 36–45.
- HjaltilJákupsstovu, S., & Haug, T. (1988). Growth, sexual maturation, and spawning season of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, in Faroese waters. *Fish. Res.*, 6(3), 201–215.
- Holland MCH, Hassin S, Zohar Y (2001) Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. *J Endocrinol* 169: 527–538.
- Huang, W., Zhou, L., Li, Z., & Gui, J. F. (2009). Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (Cyp19a1a) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 307(1), 224–236.
- Hur, S. P., Lim, B. S., Hwang, I. J., Kim, S. J., Ryu, Y. W., Hur, S. W., ... & Lee,

- Y. D. (2012). Masculinization in juvenile longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*, with aromatase inhibitor: changes in GtH subunit mRNA expression and steroids hormone levels. *Animal Cells Syst*, 16(2), 127–134.
- Kang HC, Lee CH, Song YB, Baek HJ, Kim HB and Lee YD. 2012. KISS1, KISS2, GPR54 mRNA Expression of the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*. *Dev Reprod* 16, 121–128.
- Kastenhuber, E., Gesemann, M., Mickoleit, M., & Neuhauss, S. C. (2013). Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes. *Dev. Dyn*, 242(11), 1236–1249.
- Kato, K., Ishimaru, K., Sawada, Y., Mutsuro, J., Miyashita, S., Murata, O., & Kumai, H. (2004). Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fish Sci*, 70(6), 1061–1069.
- Kayano, Y., & Oda, T. (1994). Growth and spawning of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, under artificial rearing condition. *Suisan Zoshoku (Japan)*.
- Kim, H. K., Kim, J. H., Kim, W. S., Baek, H. J., & Kwon, J. Y. (2015). Early Gonadal Differentiation of the Protogynous Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. *Dev Reprod*, 19(4), 209.
- Kuohung, W., & Kaiser, U. B. (2006). GPR54 and KiSS-1: role in the

regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord*, 7(4), 257–263.

Li GL, Liu XC, Lin HR (2006) Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiol. Biochem*, 32:25–33.

Li, G. L., Liu, X. C., & Lin, H. R. (2007). Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Anim. Reprod. Sci*, 99(1), 156–166.

Lee, C. H., Hur, S. W., Na, O. S., Baek, H. J., Noh, C. H., Han, S. H., & Lee, Y. D. (2014). Induction of primary male in juvenile red spotted grouper *Epinephelus akaara* by immersion of 17 α -methyltestosterone. *Dev Reprod*, 18, 127–131.

Lee, C. K., Hur, S. B., Ko, T. S., & Park, S. (1998). Maturation, sex ratio and sex-reversal of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J Aquacult*, 11, 573–580.

Lee YD, Song YB, Lim BS, Oh SR, Kim HB (2008) Grouper aquaculture research in Jeju Island, Korea. In: Liao IC, Leñaño EM, eds. *The Aquaculture of Groupers*, J World Aquac Soc, p49–60.

Martinez-Chavez, C. C., Minghetti, M., & Migaud, H. (2008). GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *Gen.*

- Comp. Endocrinol, 156(2), 224–233.
- Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., ... & Colledge, W. H. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin–releasing hormone release via G protein–coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(5), 1761–1766.
- Mohamed, J. S., Benninghoff, A. D., Holt, G. J., & Khan, I. A. (2007). Developmental expression of the G protein–coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J. Mol. Endocrinol.*, 38(2), 235–244.
- Nader, M. R., Miura, T., Ando, N., Miura, C., & Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin–like growth factor I stimulates all stages of 11–ketotestosterone–induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol. Reprod*, 61(4), 944–947
- Navarro, V.M., J.M. Castellano, et al. 2007. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Rev. Endocr. Disord.* 8: 11– 20.
- Nisembaum, L. G., Besseau, L., Paulin, C. H., Charpantier, A., Martin, P., Magnanou, E., ... & Falcón, J. (2015). In the Heat of the Night: Thermo–TRPV Channels in the Salmonid Pineal Photoreceptors and Modulation of Melatonin Secretion. *Endocrinology*, 156(12), 4629–4638.
- Nocillado, J. N., Levavi–Sivan, B., Carrick, F., & Elizur, A. (2007). Temporal

- expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen. Comp. Endocrinol*, 150(2), 278–287.
- Ohga, H., Adachi, H., Matsumori, K., Kodama, R., Nyuji, M., Selvaraj, S., ... & Matsuyama, M. (2015). mRNA levels of kisspeptins, kisspeptin receptors, and GnRH1 in the brain of chub mackerel during puberty. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol*, 179, 104–112.
- Oh, S. R., Kang, H. C., Lee, C. H., Hur, S. W., & Lee, Y. D. (2013). Sex reversal and masculinization according to growth in longtooth grouper *Epinephelus bruneus*. *Dev Reprod*, 17, 79–85.
- Ojeda, S.R., A. Lomniczi, et al. 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 147: 1166–1174.
- Ojeda, S.R. & M.K. Skinner. 2005. Puberty in the rat. In *The Physiology of Reproduction*. J.D. Neill, Ed.: 2061–2126.
- Okuzawa, K. (2002). Puberty in teleosts. *Fish Physiol. Biochem*, 26(1), 31–41.
- Oliveira, C., Mañanós, E., Ramos, J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Impact of photoperiod manipulation on day/night changes in melatonin, sex steroids and vitellogenin plasma levels and spawning rhythms in

- Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol*, 159(3), 291–295.
- Park, I. S., & Im, S. Y. (2011). Effects of 17 α -Methyltestosterone on Growth and Induced Sex Change in Longtooth Grouper *Epinephelus bruneus* (Bloch). *Fish Aquatic Sci*, 14(1), 11–15.
- Patino, R. & C.V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 57–70.
- Perrot, V., Moiseeva, E. B., Gozes, Y., Chan, S. J., & Funkenstein, B. (2000). Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. *Biol. Reprod*, 63(1), 229–241.
- Plant T. 2002. Neurophysiology of puberty. *J. Adolescent Health* 31: 185–191.
- Reinecke, M. (2010). Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biol. Reprod*, 82(4), 656–661.
- Rodríguez L., S. Zanuy, et al. 2001. Influence of day length on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 196: 159–175.
- Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L. A., Soubrier, M. A., Mañanós, E., Holland, M. C. H., ... & Zanuy, S. (2000). Pituitary levels of three forms

- of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. Gen Comp Endocrinol, 120(1), 67–74.
- Ryu, Y. W., Hur, S. W., Hur, S. P., Lee, C. H., Lim, B. S., & Lee, Y. D. (2013). Characterization of pubertal development phases in female longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* via classification of bodyweight. Dev Reprod, 17, 55–62.
- Sao PN, Hur SW, Lee CH, Lee YD (2012). Gonadalsex differentiation of hatchery-reared longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*). Dev Reprod 16: 185–193.
- Schmid, A. C., Näf, E., Kloas, W., & Reinecke, M. (1999). Insulin-like growth factor-I and-II in the ovary of a bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: in situ hybridisation, immunohistochemical localisation, Northern blot and cDNA sequences. Mol Cell Endocrinol, 156(1), 141–149.
- Schulz, R.W. & T. Miura, 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. Biochem. 26: 43–56.
- Schulz, R.W., Zandbergen, M.A., Peute, J., Bogerd, J., van Dijk, W. and Goos, H.J.Th. 1997. Pituitary gonadotrophs are strongly activated at the beginning of spermatogenesis in African catfish, *Clarias gariepinus*. Biol. Reprod. 57: 139–147.

- Sharara, F. I., & Giudice, L. C. (1997). Role of Growth Hormone in Ovarian Physiology and Onset of Puberty. *J Soc Gynecol Investig*, 4(1), 2–7.
- Shearer, K. D., & Swanson, P. (2000). The effect of whole body lipid on early sexual maturation of 1+ age male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 190(3), 343–367.
- Shearer, K., Parkins, P., Gadberry, B., Beckman, B., Swanson, P., 2006. Effects of growth rate/body size and a low lipid diet on the incidence of early sexual maturation in juvenile male spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 252, 545–556.
- Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q., Lu, D., Liu, M., ... & Lin, H. (2010). Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 α -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biol Reprod*, 83(1), 63–74.
- Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford. 249 pp.
- Srivastava, R. K., & Van Der Kraak, G. (1994). Regulation of DNA synthesis in goldfish vitellogenic ovarian follicles by hormones and growth factors. *J Exp Zool*, 270(3), 263–272.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., ... & Andersson, E. (2010). Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp*

Endocrinol, 165(3), 483–515.

Teruya, K., Yoseda, K., Fujii, A., Kurokawa, Y., Kawai, S., Oka, M., ... & Hamasaki, K. (2008). Effects of photoperiod on survival, growth and feeding of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* larvae. Nippon Suisan Gakkaishi (Japan).

Tokalov, S. V., & Gutzeit, H. O. (2005). Spermatogenesis in testis primary cell cultures of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev Dyn, 233(4), 1238–1247.

Yoneda, M., & Wright, P. J. (2005). Effects of varying temperature and food availability on growth and reproduction in first-time spawning female Atlantic cod. J Fish Biol, 67(5), 1225–1241.

Park, Y. J., Kang, H. C., Lee, C. H., Song, Y. B., Hur, S. W., Baek, H. J., ... & Lee, Y. D. (2011). Environmental Control of Gonadal Development in the Female Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*. Indian J Sci Technol, 4(S8), 130–130.

Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, L., Zhao, H., Li, X., Huang, H., & Lin, H. (2007). The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β -subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus Coioides*) during 17 α -methyltestosterone-induced precocious sex change. Mol Reprod Dev, 74(6), 665–673.