

능성어 번식기술개발을 통한 양식 산업화

Aquatic Industrialization by Development of Reproductive Technology of Sevenband Grouper,
Epinephelus septemfasciatus

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	이영돈
발행년월	2003-11
주관부처	해양수산부
사업관리기관	한국해양수산기술진흥원
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO200400001122
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 15:15:23

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

최 종
연구보고서

능성어 번식기술개발을 통한 양식 산업화

Aquatic Industrialization by Development of
Reproductive Technology of Sevenband Grouper,
Epinephelus septemfasciatus

2003. 11

연구기관
제주대학교
제주도해양수산자원연구소

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “능성어 번식기술개발을 통한 양식산업화” 과제의 최종보고서로 제출
합니다.

2003년 11월 일

주관연구기관명 : 제주대학교

총괄연구책임자 : 이영돈

연구원 : 김세재, 서종표

김광배, 나오수

송영보, 이치훈

진영석, 김삼연

허상우, 진영준

협동연구기관명 : 제주도해양수산자원연구소

협동연구책임자 : 고경민

연구원 : 김문관, 오성립

요 약 문

I. 제 목

능성어 번식기술개발을 통한 양식 산업화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

능성어류 (Epinephelinae) 중 해산종은 15속에 159종이 보고되고 있으며, 이들은 대부분 아열대와 열대지방에 암초와 산호초가 발달한 지역에 서식하고 있다 (FAO, 1993). 그리고 우리나라에서는 남해안과 제주도 연안에 자바리, 능성어, 붉바리, 홍바리, 구실우럭, 도도바리, 닻줄바리 등 11종이 분포하고 있다 (Kim et al., 2001). 능성어류는 우리나라뿐만 아니라 일본, 중국 그리고 동남아시아 지역에서도 식용어로서 기호도가 높은 어종이기 때문에 어미관리에 대한 번식생물학적 특성 및 종묘생산 기술 개발과 산업화에 적극적인 연구개발 투자가 이루어지고 있으며, 미국과 호주지역에서도 연안자원 관리와 능성어류의 성 현상에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 제주 연근해에 서식하는 능성어류의 자원이 급격히 감소하여 자바리와 능성어는 어체중 kg당 10만원 내외를 호가하고 있고, 이러한 수요급증으로 일부는 외국으로부터 수입 되고 있다. 일반 양어가에도 능성어 양식에 관심이 고조되고 있으나, 능성어 어미확보와 어미관리의 어려움 때문에 수정란 생산조차도 어려운 실정이다. 능성어는 생후 7~8년이 되어야 성 성숙을 하므로 이들을 대상으로 성 성숙 제어에 관한 연구 수행에 어려움이 많다. 그리고 이들은 암컷에서 수컷으로 성 전환을 하는 어종이고, 지역에 따라 종 특이적 산란주기를 가지므로 특히 산란기의 어미관리에 있어서 적절한 사육밀도 조절이 요구된다. 이 사업은 능성어 어미 사육의 광주기와 수온조절을 통한 성 성숙유도 기술 개발, 융성호르몬을 이용한 기능적 수컷유도 및 정자동결보존 기술 개발, 양질의 인공수정란 생산 기술 개발, 자어의 먹이계열 개발 그리고 자·치어의 유영행동 등을 조사하여 능성어 양식 산업화를 도모하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 능성어 대량 종묘 생산 기반 조성

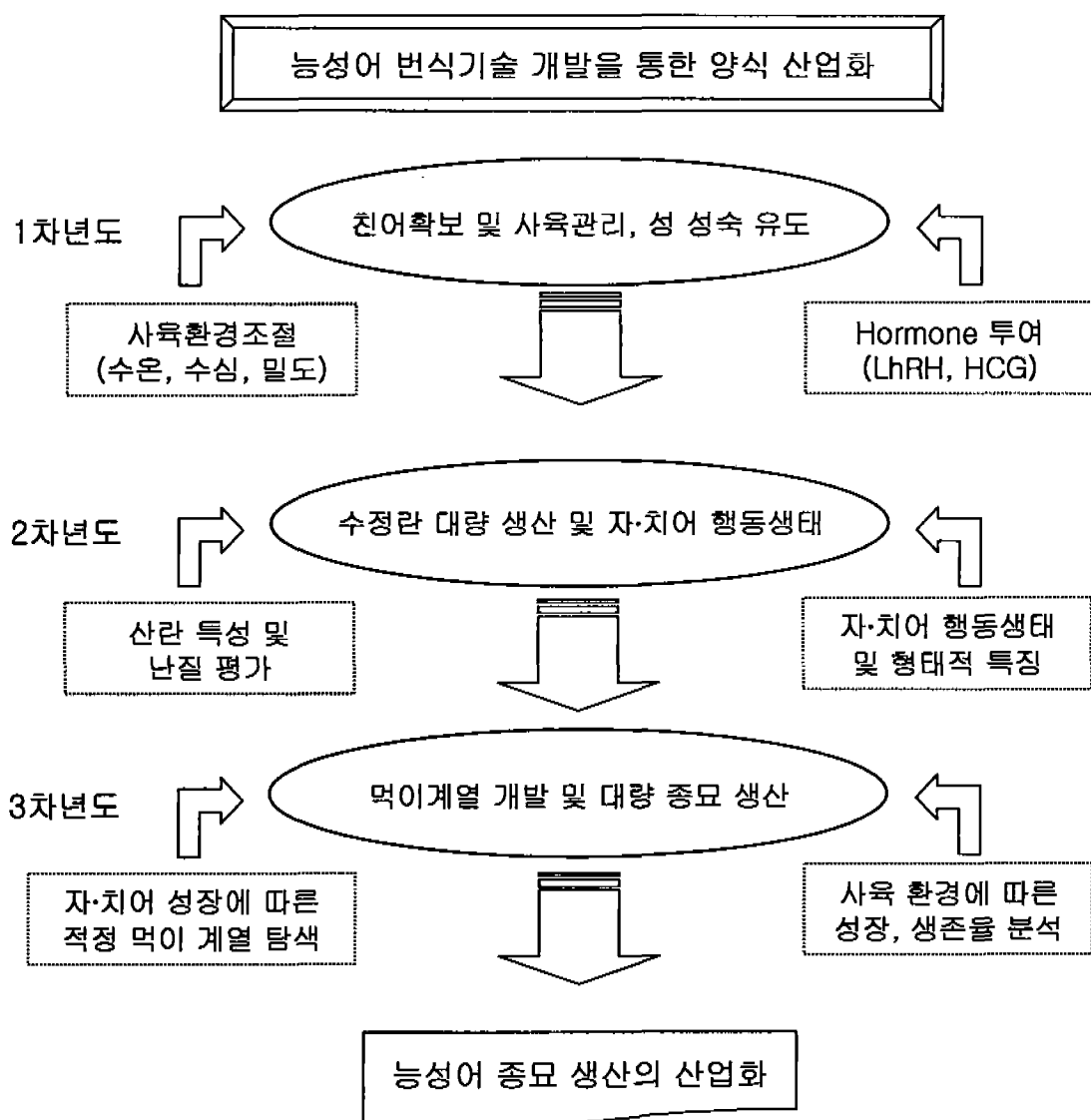
- 어미관리
- 광주기·수온 조절을 통한 인위적 성성숙 유도

2. 능성어 성성숙 유도 및 산란 그리고 수컷 유도

- 자연산란 및 인공채란
- 수컷유도 및 정자 냉동 보존
- 먹이계열 개발

3. 대량종묘 생산 기술 개발

- 자·치어 행동생태 및 형태적 변태과정 탐색
- 능성어 종묘생산 기술 확립



IV. 연구개발결과

1. 어미 사육관리

능성어, *Epinephelus septemfasciatus* 어미 사육에서, 광주기 및 수온 조절을 통한 조기 성성숙 및 산란 유도 가능성을 조사한 결과 광 및 수온 조절을 통해 능성어의 자연산란시기인 7~8월보다 3~4개월 빠르게 조기 성성숙 유도가 가능하였다. 그리고 이 기술을 이용한 능성어의 연중 산란 기술 개발을 위한 기초 자료를 제시 할 수 있었다.

2. 수정란 생산

가. 배란 유도

능성어의 수조내 자연산란은 불규칙적인 산란량과 난질 때문에 애로가 많았다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 능성어의 인위 성성숙 및 산란유도를 수행하였다. 수온과 광주기를 조절하여 성성숙이 유도된 암컷과 자연 조건에서 사육한 능성어를 대상으로 cannulation을 통한 성성숙 유무 및 적정 hormone 농도와 주사시기를 조사하였다.

Cannulation 방법을 이용하여 성숙 난모세포 (400~480 μm)를 가지 능성어를 대상으로 LhRH (50 $\mu\text{g/kg}$ BW)와 HCG (500 IU/kg BW)를 주사하였을 때 48시간 후 인공 채란이 가능하였다. 이 방법을 이용하여 12마리에서 3,780 ml의 난을 얻을 수 있었으며, 이 배란된 난중 부상란은 1,360 ml였다.

나. 배정 유도

능성어류의 성전환 특성 때문에 기능적 수컷 확보가 어렵다. 따라서 정자 확보를 위하여 17 α -methyltestosterone (MT)을 이용한 기능적 수컷 유도를 실시하였다. Hormone 농도 및 계절별 그리고 처리방법에 따라 모두 5회 실시 하였다. 실험결과 MT 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg을 근육내 주사하여 정자를 가진 기능적 수컷을 유도하였다. 그리고 생식소의 배우자 형성 활성 초기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월)에 MT를 처리한 실험구에서는 8주후부터 운동성을 가진 정자를 얻을 수 있었다. 산란시기에 가까운 4~5월에 MT를 처리한 실험구에서는 9~11주 후에 정자를 얻을 수 있었다. 그리고 1월에 silastic capsule을 이용한 MT 2.0 mg/kg 처리구는 MT 1.0 mg/kg 주사 처리구보다 2주 늦은 10주 만에 정액 채취가 가능하였다.

회석액과 동해방지제 종류에 따라 능성어의 정자 냉동 보존 방법을 개발하였다. 이 실험 결과 회석제로 5% glucose와 동해방지제로 MFRS 또는 TYB를 이용한 실험구에서 대조구 (row semen)와 비교했을 때 운동성 및 수정 능력은 유의차가 없었다 ($P>0.05$). 그리고 대부분의 냉동정자의 운동성은 해동 후 20~30분에 가장 활발한 운동성을 보였다.

따라서 MT를 이용한 능성어의 수컷 유도 및 정자 냉동 보존 방법은 능성어의 암수 배우자 성숙 및 산란시기의 불일치 문제를 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 자·치어 사육

가. 자·치어 형태 발달

능성어의 수정란은 구형으로 분리. 부성란이다. 난경은 $760\sim 880\ \mu\text{m}$ (평균 $821.8\pm 2.0\ \mu\text{m}$)이었고, 유구는 $170\sim 220\ \mu\text{m}$ (평균 $192.9\pm 0.9\ \mu\text{m}$) 1개가 있고, 난황은 무색투명하였다. 그리고 수온별 각 발생단계에 도달하는 시간은 22°C 에서 상실기까지 평균 5시간인 반면 25°C 에서는 평균 4.5 시간이었다. 포배기까지 발생은 22°C 에서 12시간, 25°C 에서는 10.5시간이 소요되었다. 그리고 배체형성 시기까지 22°C 에서 23시간, 25°C 에서는 17시간이었다. 부화시기까지의 평균 소요시간은 22°C 일 때 46시간, 25°C 일 때 35시간으로 수온이 높을수록 발생단계별 소요시간이 짧아지는 경향이었다. 염분별 부화율에서 저염분 실험구로 갈수록 부화율은 비교적 낮았다.

능성어 부화 자어의 수온별 난황 흡수 및 유구 흡수율은 25°C 조건에서 대부분 부화 후 3일 이내에 거의 흡수되었으나, 22°C 조건에서는 다소 늦었다. 부화자어의 개구는 25°C 에서 부화 후 3일째 개구되었고 자어의 상악장 크기는 $0.148\pm 0.009\ \text{mm}$ 이었다.

부화 1일째 자어는 전장 $2.30\sim 2.40\ \text{mm}$ 로 대부분 수표면에 분산하여 유영하고, 머리를 아래 쪽으로 향하고 정지상태를 유지하다가 순간적으로 빠르게 유영하는 행동을 보였다. 부화 2~3일째 두부 골격 형성이 뚜렷하게 관찰되고, 가슴지느러미 원기가 발현하며, 자어는 대부분 수조 저면으로 이동하였다. 부화 4~5일째 자어는 전장 $2.55\sim 2.72\ \text{mm}$ 로 입과 항문이 열렸으며, 안구에 흑색 색소포가 형성되었다. 그리고 일부 개체에서 rotifer를 섭이한 개체가 관찰되었다. 부화 7~10일째는 막지느러미가 소실되고 등지느러미와 꼬리지느러미 그리고 가슴지느러미가 분화되었으며 소화관이 분화발달 하였다. 복강 위 벽을 따라서 흑색소포가 더욱 많이 침착되어 다. 부화 17~23일째 전장 $4.15\sim 5.12\ \text{mm}$ 로 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 출현, 신장하였고, 두부 골격 형성이 뚜렷하였다. 복강부위의 흑색층이 발달하였으며, 꼬리지느러미가 분화 발달하기 시작하였다.

나. 먹이생물 개발

능성어의 종묘 생산 시기에 이용 가능한 먹이생물로서 Thai-strain rotifer는 접종 후 5~6일째 peak에 달했으며, 그 후 성장속도가 급격히 떨어지는 경향을 보였다. 수온 28°C 실험구에 있어서는 15% 실험구가 다른 실험구에 비해 현저한 개체수 증가를 보였으며 ($p<0.05$), 33% 실험구가 가장 낮은 개체수 증가를 보였다 ($p<0.05$). 그리고 서로 다른 수온과 염분농도 조건에서 30일간 연속계대배양을 한 개체군내 rotifer 개체의 배갑장 크기분포를 조사한 결과 섭이 초기에 공급할 수 있는 배갑장 $120\sim 150\ \mu\text{m}$ 미만의 분포는 28°C 와 32°C 조건에서 15%와 25% 실험구가 다른 실험구에 비해 현저히 높았다.

다. 종묘생산

능성어의 대량 종묘 생산 실험은 최적의 종묘생산 기술을 개발하기 위해 서로 다른 조건 (먹이생물 및 사육 환경 조절)을 가진 제주도해양수산자원연구소 (A-type)와 대학수산 (B-type) 그리고 국립수산물과학원 남제주종묘시험장 (C-type)에서 실시하였다. 종묘 생산 실험 결과 대부분 능성어 자어의 대량 폐사는 부화 직후와 부화 후 7~10일 사이에 많이 발생하였다. 사육과정에서 결과 대량 폐사의 원인은 난질과 사육 환경 그리고 먹이 생태의 불안정으로 사료된다.

라. 자바리 종묘생산

능성어의 종묘생산 기술을 적용하여 능성어류의 일종인 자바리, *E. bruneus*의 종묘생산 기술을 시도하였다. 성성숙 유도 및 인공수정 방법을 이용하여 얻은 수정란을 이용하여 자바리 수정란 500 ml (약 100만개)를 이용하여 종묘생산 결과 5만 마리의 자바리 치어 (부화 90일, 전장 84.0 mm)를 생산 하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 양식 산업화

국내 해산어류양식은 주로 넙치와 조피볼락 생산에 치우쳐 있어 양어가에서는 양식경쟁력이 가능한 어종으로 능성어, 자바리, 붉바리 등 바리과 어류의 어미관리와 종묘생산기술개발에 대한 관심이 매우 높다. 이들 바리과 어류는 성장에 따라 난소형의 생식소를 가진 유어기를 지나 성어가 되면 암컷으로 먼저 성숙한 후 개체 중 일부가 수컷으로 성전환하는 특성을 가지고 있다. 이러한 성 특성 때문에 어미확보와 수정란 생산에 어려움이 있었다. 이 사업 연구수행에서 양질의 난과 정자를 생산할 수 있는 어미의 사육과 성 성숙 제어, 정자 생산 및 확보를 위한 성전환 기능적 수컷유도, 그리고 정자보존 기술을 개발하였다. 이 사업에서 얻어진 연구 성과를 활용하면 양질의 수정란 생산으로 종묘생산이 가능해질 것이다. 그리고 이 사업을 수행하면서 어미의 사육과 성 성숙제어에 많은 노력과 운영비가 필요하였다. 효율적인 바리과 어류의 양식 산업화를 위해 어미관리 사육과 수정란 생산 전문 양어장 육성 또는 중소기업형 연구소 활성화가 요구된다.

2. 연안어업자원의 조업효율화

바리과 어류는 연안 정착성이 강한 어종으로 이 사업에서 얻어진 어미관리 및 성 성숙제어, 기능성 수컷으로 성전환 유도, 수정란 생산 기법 등으로 종묘생산이 가능하게 되었다. 지방정

부나 국공립 수산관련 연구소에서 종묘를 생산 방류하는 수산정책을 수행한다면 바리과 어류 양식사업장의 활성화, 연안어족자원의 증대, 마을 바다 목장화 사업 어종 개발 그리고 연안어업인의 어획기회 증대에 기여 할 것으로 기대된다.

3. 명품 브랜드전략

바리과 어류의 양식 산업에는 집적된 양식 생물공학 기술과 노하우가 요구된다. 바리과 어류 양식 산업화 활성화를 위해서는 이 사업에서 얻은 성과를 이용하여 지역 환경 특성에 맞는 명품 브랜드 전략으로 적정생산이 이루어진다면 환경친화적인 수산양식 산업화에 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

Summary

Groupers are protogynous hermaphroditic fish that inhabit coral reefs in the tropics and subtropics. They belong to the family Epinephelinae, which includes 159 marine species in 15 genera (FAO, 1993). Eleven species of grouper inhabit the Southern Sea near Jeju Island, Korea, including the longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*, the sevenband grouper, *E. septemfasciatus*, and the red spotted grouper *E. akaara*, (Kim et al., 2001). Groupers are highly regarded as food and as ornamental fish in Korea, China, Japan, and Southeast Asia.

Studies on the reproductive biology of groupers have begun (Hwang et al., 1998; Johnson et al. 1998; Lee et al., 2002b; Song et al., 2003), including studies on broodstock management for seed production (Kayano, 1996; Duray et al., 1997; Sugama and Ikenoue, 1999), sex inversion (Lee et al., 2000, 2002a; Tsuchihashi et al., 2003; Yeh et al., 2003), and sex maturation (Kim et al., 1997; Marino et al., 2003), to support commercial cultivation or conservation of resource programs.

The sevenband grouper is an excellent eating fish. Due to overfishing in Jeju coastal waters, the catch has been decreasing rapidly. To allow the recovery of this species in coastal waters, and to help the aquaculture industry, a larviculture technique must be developed. This paper describes the sex maturation, ovulation, fertilized egg and larval development, malformation, and larval rearing of the sevenband grouper, *E. septemfasciatus*, and longtooth grouper, *E. bruneus*.

1. Natural spawning

During the period 2000 to 2002, the sevenband grouper, *E. septemfasciatus*, spawned naturally in a rearing tank. In 2000, the fish spawned naturally from 6 July to 28 August. The total volume of eggs collected was 3,855 ml, and the total volume of floating eggs was 265 ml. The fertilization rate was 0~76%. In 2001, the fish spawned naturally from 5 July to 6 August. The total volume of eggs collected was 1,650 ml, and the total volume of floating eggs was 472 ml. The fertilization rate was 0~80%. In 2002, the fish spawned naturally from 25 July to 20 August. The total volume of eggs collected was 1,330 ml, and the total volume of floating eggs was 38 ml. The fertilization rate was 0~50%. Egg production and quality decreased gradually at the end of the spawning period.

2. Induction of sex reversal

In this species, techniques for accelerating sex reversal to obtain male brooders are required for the success of induced breeding. We examined the induction of sex reversal in immature female *E. septemfasciatus* by injecting 17 α -methyltestosterone (MT). MT was injected at a dose of 0.5~2.0 mg/kg BW. Initial controls had immature ovaries containing primary oocytes in lamellae that extended into the central lumen. At four weeks, the ovaries of control fish were similar to those of the initial control. In contrast, the MT treatment group was undergoing spermatogenesis, although no spermatozoa were observed. Sperm were obtained from gonads from the 1.0 and 2.0 mg/kg MT treatment groups at eight weeks using the stripping method.

3. Cryoprotectant

We studied the cryopreservation of sperm in *E. septemfasciatus*. The survival rate and activity were highest using 5% glucose as the diluent and DMSO and TYB as cryoprotectants for *E. septemfasciatus* spermatozoa, although the levels were lower than in controls ($P < 0.05$). The fertilization rate of eggs was highest in the GDS group at $97.6 \pm 1.2\%$ and next highest in the control group at $94.9 \pm 2.0\%$, although the difference was not significant ($P > 0.05$). The hatching rate of eggs was $94.2 \sim 97.0\%$.

4. Induction of ovulation

Fish were maintained under the ambient photoperiod and temperature in a 50 m³ flow-through tank. The ovary maturity of the broodstock was assessed weekly during the spawning season using biopsy methods. A cannula was inserted into the oviduct of female *E. septemfasciatus* and *E. bruneus*, and a sample of gonadal tissue was removed by suction.

Hormone-induced spawning was attempted in females with an average vitellogenic oocyte diameter of at least 400 μm . To induce spawning, HCG (human chorionic gonadotropin) was used. The hormone treatment strategies tested included HCG alone (500 IU/kg).

Females with mean oocyte diameter ranging from 300 to 500 μm were suitable for hormone-induced spawning. Oocyte diameter increased to 300~700 μm within 24 h of the injection and to 800 μm within 48 h. Eggs were stripped successfully 48 h after the injection. The total volume of stripped eggs was 2,480 ml, and the total volume of floating

eggs was 1,360 ml; floating rate was 54.9%.

5. *E. septemfasciatus*

Egg development

Stripped fertilized eggs of *E. septemfasciatus* were colorless spheres, 790~890 μm (average $821.8 \pm 2.0 \mu\text{m}$) in diameter, with a 170~230 μm oil globule (average $192.9 \pm 0.93 \mu\text{m}$). The fertilization and hatching rates were 56.2~94.9 and 70.0~97.7%, respectively, using the dry fertilized method.

At a water temperature of $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, first cleavage took place about 1.0 h after fertilization. The egg reached the morula, blastula, gastrula, and embryo stages about 5.0, 12.0, 16.5, and 23.0 h after fertilization, respectively. Hatching began about 46.0 h after fertilization.

Yolk sac stage

To examine the time taken for yolk absorption at various water temperatures (22 and 25 $^\circ\text{C}$), changes in the absorption rate of the yolk and oil globule in newly hatched larvae were investigated. The rate of yolk absorption at 25 $^\circ\text{C}$ in newly hatched larvae was 83.5% after 24 h and 97.8% after 48 h. Yolk absorption was completed within 48 h. By contrast, at 22 $^\circ\text{C}$, the rate of yolk absorption was 32.7% after 24 h, 88.2% after 48 h, and 93.1% after 72 h.

The rate of oil globule absorption at 25 $^\circ\text{C}$ in newly hatched larvae was 34.0% after 24 h and 80.3% after 48 h. By contrast, at 22 $^\circ\text{C}$, the oil globule absorption was 29.5, 40.2, and 28.2% after 24, 48, and 96 h, respectively. The oil globule persisted until mouth opening. The elapsed time from hatching to mouth opening was 3 days at 25 $^\circ\text{C}$, and 4 days at 22 $^\circ\text{C}$.

Upper jaw length (UJL)

The UJL of larvae with newly opened mouths was $0.148 \pm 0.009 \text{ mm}$, and this increased to 0.169 ± 0.006 and $0.230 \pm 0.005 \text{ mm}$ at 4 and 11 DAH (day after hatching), respectively.

We defined 0.75d as 75% of the mouth opening and 0.5d as 50% of the mouth opening. At 3~11 DAH, when the larvae were first fed, the mouth size (d) of the larvae was 0.20~0.325 mm, 0.75d was 0.157~0.244 mm, and 0.5d was 0.105~0.162 mm.

Morphological development

In newly hatched larvae, the oil globule was situated in the posterior part of the yolk.

The body surface, marginal fin, and yolk were covered with colorless granules. Most newly hatched larvae tended to float to the surface. The larvae were suspended head down in the water column, and swam rapidly soon after hatching.

At 2~3 DAH, the larvae retained the yolk and oil globule, and the mouth had not opened. The head skeleton formed, and the pectoral fin bud appeared. Most of the larvae tended to settle to the bottom. Most of the yolk and oil globule were absorbed by this time. The larvae began to feed on 3 DAH. By 4~5 DAH, the yolk and oil globule were absorbed completely, and the mouth and anus had opened. The eyes appeared in the melanophores.

The rudiments of the second dorsal and pelvic spines appeared at 11 DAH. Both spines, a larval characteristic, began to elongate; the abdominal cavity was densely lined with melanophores; and the two spines appeared on the preoperculum of larvae at 17 DAH.

Growth

The newly hatched larvae measured 1.75 mm TL. By day 4, the larvae reached 2.72 mm TL and the mouth and anus had opened. By day 11, the larvae reached 3.24 mm TL and began to metamorphose. By day 24, the larvae reached 5.12 mm TL.

6. *E. bruneus*

In total, 735,000 eggs were stripped from a female *E. bruneus* and 700,000 (95.2%) were floating eggs. The fertilized eggs were colorless spheres, 830~950 μm (average 900 ± 2 μm) in diameter with a 200~260 μm oil globule (average 244 ± 2 μm). The fertilization and hatching rates were $97.7\pm0.6\%$ and $96.7\pm0.5\%$, respectively.

At a water temperature of $25.0\pm0.5^\circ\text{C}$, first cleavage took place about 1.0 h after fertilization. The egg reached the morula, blastula, gastrula, and embryo stages about 5.0, 4.5, 10.0, and 13.0 h after fertilization, respectively. Hatching began about 32 h after fertilization.

The newly hatched larvae measured 2.02 ± 0.20 mm TL. By day 11, the larvae reached 4.12 ± 0.09 mm TL and began to metamorphose. By day 54, the larvae reached 41.12 ± 1.20 mm TL, and had completed metamorphosis. Thereafter, the larvae grew quickly and reached 93.78 ± 0.98 mm TL at 93 DAH.

The AL (anal length) of the newly hatched larvae was 1.22 ± 0.02 mm, and the AL at 54 and 72 DAH was 22.53 ± 0.51 and 30.57 ± 0.81 mm, respectively.

The second dorsal and pelvic spines appeared at 11 DAH. The first and third dorsal

spines appeared at 17 DAH. The second dorsal spine was initially 0.56 ± 0.20 mm long, and increased to 5.35 ± 0.20 mm at 38 DAH. The pelvic spine was initially 0.83 ± 0.23 mm long, and increased to 4.11 ± 0.17 mm at 33 DAH. The dorsal and pelvic spines differentiated into fins at 48 DAH. At 23 DAH, when TL was 7.62 ± 0.33 mm, the size of the second dorsal and pelvic spines relative to TL attained their maximums: 40% and 35%, respectively.

CONTENTS

Summary	vii
Contents	xii
List of Figures	xiii
List of Tables	xvi
Chapter I. Introduction	1
Chapter II. Materials and Methods	2
Section 1. Adult fish and management	2
Section 2. Induction of maturation and spawning	4
Section 3. Induction of sex reversal and Cryoprotectant	9
Section 4. Development of egg and larva	16
Section 5. Food and Larvae culture	19
Section 6. Larvae culture of <i>Epinephelus bruneus</i>	22
Chapter III. Results	25
Section 1. Natural spawning	25
Section 2. Induction of maturation and striping egg	29
Section 3. Induction of sex reversal and Cryoprotectant	38
Section 4. Development of egg and larva	45
Section 5. Food and Larvae culture	56
Section 6. Larvae culture of <i>Epinephelus bruneus</i>	67
Chapter IV. Discussion	77
Chapter V. Proposal on application	87
Chapter VI. Reference	90

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of semi closed recirculation system used in the experiment.	5
Fig. 2. Examination of sexual development in <i>E. septemfasciatus</i> using cannulation method.	7
Fig. 3. Measurement sites for larvae of <i>E. septemfasciatus</i>	18
Fig. 4. Measuring the mouth size of <i>E. septemfasciatus</i>	18
Fig. 5. Feeding scheme and tank management used during <i>E. bruneus</i>	24
Fig. 6. Volume of natural spawned eggs of <i>E. septemfasciatus</i> in 2000.	26
Fig. 7. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2000.	26
Fig. 8. Volume of natural spawned eggs of <i>E. septemfasciatus</i> in 2001.	27
Fig. 9. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2001.	27
Fig. 10. Volume of natural spawned eggs of <i>E. septemfasciatus</i> in 2002.	28
Fig. 11. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2002.	28
Fig. 12. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 11 March to 19 August 2001.	29
Fig. 13. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 9 December 2001 to 19 May 2002.	30
Fig. 14. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 20 October 2002 to 19 March 2003.	31
Fig. 15. Different development stage of oocytes in the ovary of <i>E. septemfasciatus</i> by cannulation.	32
Fig. 16. Hormone injection and artificial striping of eggs.	33
Fig. 17. Egg variation with the passage of time after LhRH hormone injection.	34
Fig. 18. Change in egg diameter with time after HCG injection on 12 July 2003.	35
Fig. 19. Change in egg diameter with time after HCG injection on 21 July 2003.	36
Fig. 20. Effect of HCG treatment on ovulation in a female <i>E. septemfasciatus</i> in 2003.	37
Fig. 21. GSI variation with MT treatment in <i>E. septemfasciatus</i>	39
Fig. 22. Sex reversal of the gonad with MT treatment in <i>E. septemfasciatus</i>	39
Fig. 23. Change in serum testosterone and 11 KT with MT treatment, as compared to the	

control group.	41
Fig. 24. Variation in sperm activity of <i>E. septemfasciatus</i> in different diluents and cryoprotectants.	43
Fig. 25. Variation in sperm activity of <i>E. septemfasciatus</i> with time after dilution in seawater.	43
Fig. 26. Effect of different diluents on the fertilization rate of <i>E. septemfasciatus</i>	44
Fig. 27. Effect of different diluents on the hatching rate of <i>E. septemfasciatus</i>	44
Fig. 28. Frequency of oil globule (A) and egg (B) diameter of <i>E. septemfasciatus</i>	46
Fig. 29. Embryonic development of <i>E. septemfasciatus</i>	48
Fig. 30. Fertilization and hatching rate of the floating eggs in <i>E. septemfasciatus</i> using artificial ovulation methods in 2003.	50
Fig. 31. Hatching rates of <i>E. septemfasciatus</i> eggs at different water temperatures and salinities.	51
Fig. 32. Absorptions rate of the oil globule (A) and yolk (B) volume in <i>E. septemfasciatus</i> larvae reared at different water temperatures.	52
Fig. 33. Larval development of <i>E. septemfasciatus</i> for 30 days.	54
Fig. 34. Growth in total length and anal length of <i>E. septemfasciatus</i> larvae at different water temperatures.	55
Fig. 35. The population growth curves of the Thai-strain rotifer, <i>B. rotundiformis</i> , cultured at various water temperatures and salinities.	57
Fig. 36. Distribution frequency of lorica length of the Thai-strain rotifer, <i>B. rotundiformis</i> at various water temperatures and salinities.	58
Fig. 37. Variations of water temperature, DO, and pH in Rearing Tank 1 during the experiment.	60
Fig. 38. Variations of water temperature, DO, and pH in Rearing Tank 2 during the experiment.	60
Fig. 39. Distribution of lorica length in the Thai-strain rotifer, <i>B. rotundiformis</i>	61
Fig. 40. Distribution of lorica length in the S-type rotifer, <i>Brachionus</i> sp.	61
Fig. 41. Distribution of lorica length of rotifers in the larvae culture.	63
Fig. 42. Microscopic findings of <i>E. septemfasciatus</i> larvae fed rotifers.	64
Fig. 43. Total length growth of <i>E. septemfasciatus</i> larvae in the excremental Group A.	64

Fig. 44. Total length growth of <i>E. septemfasciatus</i> larvae in the experimental Group B.	65
Fig. 45. Total length growth of <i>E. septemfasciatus</i> larvae in the experimental Group C.	66
Fig. 46. Number of surviving cultured of <i>E. septemfasciatus</i> larvae in experimental Group C.	66
Fig. 47. Frequency of egg and oil globule diameter in <i>E. bruneus</i>	68
Fig. 48. Development of fertilized <i>E. bruneus</i> eggs.	69
Fig. 49. Hatching rates of <i>E. bruneus</i> eggs at various salinities.	69
Fig. 50. Absorptions rate of the oil globule (A) and yolk (B) of <i>E. bruneus</i> larvae reared at different water temperatures.	71
Fig. 51. Growth of the 1st, 2nd, and 3rd dorsal spines and pelvic spine of <i>E. bruneus</i> larvae.	73
Fig. 52. Change in the lengths of the 2nd dorsal and pelvic spines as a frequency of the total length during larval and juvenile development of <i>E. bruneus</i>	73
Fig. 53. Development of larval and juvenile <i>E. bruneus</i> in the laboratory.	75
Fig. 54. Growth of total length and anal length of <i>E. bruneus</i> in the laboratory at 25°C.	76

List of Tables

Table 1. Total length and body weight of <i>E. septemfasciatus</i> in experimental area	3
Table 2. Hormone treatments used to induce ovulation in <i>E. septemfasciatus</i>	8
Table 3. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of <i>E. septemfasciatus</i> from June to September in 2001	10
Table 4. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of <i>E. septemfasciatus</i> from March to May in 2002	10
Table 5. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of <i>E. septemfasciatus</i> in 2003	11
Table 6. Measurements of functional male <i>E. septemfasciatus</i> used for this experiment	13
Table 7. Constituents of the diluents tested for cryopreservation of <i>E. septemfasciatus</i> ...	13
Table 8. Experimental groups of diluents and cryoprotectants tested for cryopreservation of <i>E. septemfasciatus</i> sperm	14
Table 9. Numerical index used to evaluate sperm motility	15
Table 10. Artificial stripping of <i>E. septemfasciatus</i> eggs after LhRH hormone injection	34
Table 11. Effects of 17 α -methyltestosterone injection on sex reversal in <i>E. septemfasciatus</i>	38
Table 12. Induction of functional males and gonadal development with MT treatment ...	40
Table 13. Stages and time of egg development in <i>E. septemfasciatus</i>	47
Table 14. Relationship between water temperature and time (hour) required to reach each development stages after fertilization in <i>E. septemfasciatus</i>	49
Table 15. Variation in the mouth length of <i>E. septemfasciatus</i> larvae during the early larval periods	53
Table 16. Distribution percentage of lorica length of the Thai-strain rotifer, <i>B. rotundiformis</i> at various water temperatures and salinities	58
Table 17. Variation in mouth length of <i>E. bruneus</i> larvae during the early larval period	72

목 차

제 1 장. 서론	1
제 2 장. 재료 및 방법	2
제 1 절 어미관리 및 사육	2
제 2 절 성성숙 유도 및 산란	4
제 3 절 기능적 수컷유도 및 정자 냉동 보존	9
제 4 절 난 및 자·치어 발달	16
제 5 절 먹이계열 개발 및 대량 종묘 생산	19
제 6 절 자바리 종묘생산	22
제 3 장. 결과	25
제 1 절 자연산란	25
제 2 절 성성숙 유도 및 인공채란	29
제 3 절 기능적 수컷유도 및 정자 냉동 보존	38
제 4 절 난 및 자·치어 발달	45
제 5 절 먹이계열 개발 및 대량 종묘 생산	56
제 6 절 자바리 종묘생산	67
제 4 장. 고찰	77
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	87
제 6 장. 참고문헌	90

제 1 장. 서 론

능성어류 (Epinephelinae)중 해산종은 15속에 159종이 보고되고 있으며, 이들은 대부분 아열대와 열대지방에 암초와 산호초가 발달한 지역에 서식하고 있다 (FAO, 1993). 그리고 능성어류는 우리나라뿐만 아니라 일본, 중국 그리고 동남아시아 지역에서도 식용어로서 기호도가 높은 어종으로서, 우리나라에서는 남해안과 제주도 연안에 능성어 *E. septemfasciatus*, 자바리 *Epinephelus bruneus*, 붉바리 *E. akaara* 등 11종이 분포하고 있다 (Kim et al., 2001).

능성어류의 종묘생산을 위해 어미관리 (Lim et al., 1990; Kayano, 1996; Duray et al., 1997; Hassin et al., 1997; Sugama and Ikenoue, 1999), 성전환유도 (Lee et al., 2000; Lee et al., 2002a; Tsuchihashi et al., 2003; Yeh et al., 2003), 그리고 성성숙유도 (Kim et al., 1997; Marino et al., 2003)등에 관한 연구들이 이루어지고 있다. 그리고 연안자원 관리와 능성어류의 성현상 (Hwang et al., 1998; Johnson et al. 1998; Lee et al., 2002b; Song et al., 2003)에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

능성어는 우리나라의 제주도 연안과 일본 남부에 주로 서식하는 어종으로, 자성선속형 자웅동체어로서 생후 7~8년이 되어야 성성숙을 하는 성 특성을 가지고 있다. 그리고 능성어는 제주도에서는 특산품으로 기호도가 높은 어종이다. 그러나 최근에 들어 연안 자원의 남획으로 자원이 급격히 감소하는 추세이다.

이 연구는 연안자원회복과 양식어종의 다양화를 위해 능성어의 번식 기술 개발을 통한 양식산업화를 유도하기 위하여 수행한 능성어의 성성숙과 배란유도, 성전환과 정자 냉동보존, 수정란의 발생, 자어의 발달과 성장, 그리고 사육기술 개발을 보고하고자 한다.

제 2 장. 재료 및 방법

제1절. 어미 확보 및 사육관리

제주 연안에서 채집하여 사육한 능성어, *E. septemfasciatus* 어미 21마리를 구입하여 제주대학교 해양과환경연구소 어미 사육동 (50 ton 콘크리트 수조 4개조)에서 사육 관리 하면서 광주기와 수온 조절을 통한 성성숙 유도를 수행하였다. 어미의 크기는 전장 66.6 ± 4.4 cm이고, 체중 5.3 ± 1.1 kg이었다. 그리고 대조구로서 자연산란 유도 및 성성숙 유도 실험을 하기 위하여 참여기업인 대학수산에 능성어 어미 30마리 (전장 70.7 ± 1.6 cm, 체중 6.1 ± 0.4 kg)를 확보하여 어미 사육동 (55 ton 콘크리트 수조 2개조)에서 자연산란 유도를 실시하였다. 또한 국립수산물과학원 남제주종묘시험장에서 미성어 23마리 (전장 56.8 ± 1.0 cm, 체중 3.0 ± 0.2 kg)를 대상으로 성성숙 유도 실험을 실시하였다 (Table 1). 먹이는 생사료 단독 공급하거나 또는 배합사료와 생사료를 이용한 MP (moist pellet)를 제조하여 1회/1일 공급하였고, 능성어 어미의 사육밀도는 $1,383.6 \sim 1,665.2$ g/m²로 유지하였다.

Table 1. Total length and body weight of *E. septemfasciatus* in experimental area

Fish Number	Experimental area					
	MERI*		Daehark Aquafarm		NFRD**	
	Total length (cm)	Body weight (kg)	Total length (cm)	Body weight (kg)	Total length (cm)	Body weight (kg)
1	69.3	4.15	72.0	6.38	53.0	2.20
2	65.8	4.53	68.0	5.40	58.0	2.30
3	62.3	5.09	84.0	9.66	51.0	1.90
4	62.3	3.39	70.0	5.92	60.0	3.78
5	69.7	5.51	73.0	5.60	50.0	2.11
6	71.2	6.21	78.0	8.84	49.0	1.68
7	65.7	5.71	75.0	6.00	60.0	3.45
8	63.4	5.07	70.0	5.14	60.0	3.71
9	74.2	6.43	76.0	6.50	58.0	3.12
10	69.3	5.61	71.0	4.86	54.0	3.41
11	69.5	5.07	73.0	5.78	58.0	3.37
12	64.0	5.29	79.0	8.50	62.0	3.84
13	65.6	4.73	88.0	11.22	61.0	3.50
14	59.6	2.95	76.0	7.16	59.0	2.84
15	74.2	7.29	72.0	6.10	52.0	2.08
16	63.8	5.53	80.0	8.46	68.0	5.21
17	69.8	7.35	82.0	8.82	59.0	3.43
18	65.8	5.41	58.0	3.30	60.0	3.19
19	70.3	6.73	67.0	5.52	57.0	3.10
20	59.8	4.61	58.0	3.38	50.0	1.91
21	63.2	4.71	61.0	3.66	59.0	3.30
22			62.0	3.86	58.0	2.99
23			58.0	3.74	50.0	1.91
24			60.0	4.08		
25			59.0	3.96		
26			61.0	3.66		
27			75.0	6.80		
28			82.0	8.32		
29			71.0	6.98		
30			63.0	6.12		
Average±se	66.6±0.9	5.3±0.2	70.7±1.6	6.1±0.4	56.8±1.0	3.0±0.2

MERI: Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University.

*NFRD: National Fisheries Research & Development Institute Namjeju Marine Hatchery.

제2절. 성성숙 유도 및 산란

1. 자연산란 유도

사육 수조내 자연산란 조사는 참여기업인 대학수산에서 수행하였다. 능성어 어미 30마리 (전장 70.7 ± 1.6 cm, 체중 6.1 ± 0.4 kg)를 확보하여 어미 사육동 (55 ton 콘크리트 수조 2개조)에서 자연산란 생태를 조사하였다. 산란 시기는 2000~2002년까지 6~8월이었다. 수조내 산란은 주로 새벽에서 이른 아침에 일어났으며, 산란된 난의 수거는 능성어 난의 특성을 이용하여 저녁 먹이를 공급하고 사육 수조 내 물갈이 후 알받이 그물망을 설치하였다. 그리고 다음날 아침에 자연산란된 난을 1일 1회 수거 하였다. 수거된 난을 이용하여 산란량을 조사하고, 즉시 세란 후 부상란과 사란으로 구분하였으며, 부상란을 대상으로 수정률을 조사하였다.

2. 광주기 · 수온 조절을 통한 인위적 성성숙 유도 및 인공 채란

가. 사육시설

성성숙 인위제어를 통한 어미의 조기 성성숙을 유도하기 위하여 인위적인 환경제어 (광 · 수온)가 가능한 반순환 여과시스템을 이용하였으며, 사육수조 (R-1, R-2, R-3, R-4) 및 여과조 (F-1, F-2, F-3)의 구조와 배치는 Fig. 1과 같다. 사육수조는 직경 5 m × 수심 2 m 콘크리트 수조 4개를 이용하였고, 각 수조의 수량은 50 ton으로, 광주기 · 수온 조절을 함에 따라 일일 환수량은 2~12회전을 유지하였다.

실험기간 동안 사육 수조내의 수질 측정은 매일 오전 10시를 전후로 하여 수온과 염분 (S/Mill-E, ATAGO), DO (dissolved oxygen, DO-14P), pH (HM-12P)를 측정하였다.

나. 광주기 · 수온조절

성성숙 인위제어를 위한 환경조건은 제주도 연안의 능성어류의 자연산란 시기(6~8월)를 기준으로 하여 광주기와 수온 조절에 대한 time table을 만들어 사육하였다.

사육 환경 조절을 통한 인위적 성성숙 유도 실험은 모두 3회에 걸쳐 실시하였다. 1차 실험은 2001년 3월부터 2001년 8월까지, 그리고 2차 실험은 2001년 12월부터 2002년 5월까지, 3차 실험은 2002년 10월부터 이듬해인 2003년 3월까지 실시하였다.

사육수조의 광주기 (Light/dark, L/D)와 수온을 인위적으로 조절할 수 있도록, 수조의 윗부분을 차광막 및 점점 비닐로 외부의 빛을 차단하였다. 광주기 조절을 위한 광원은 100 W 백열등을 이용하여 500~750 Lux를 유지하였고, 광주기는 timer를 설치하여 조절하였다. 그리고 수온 조절은 보일러를 이용하여 조절하였다.

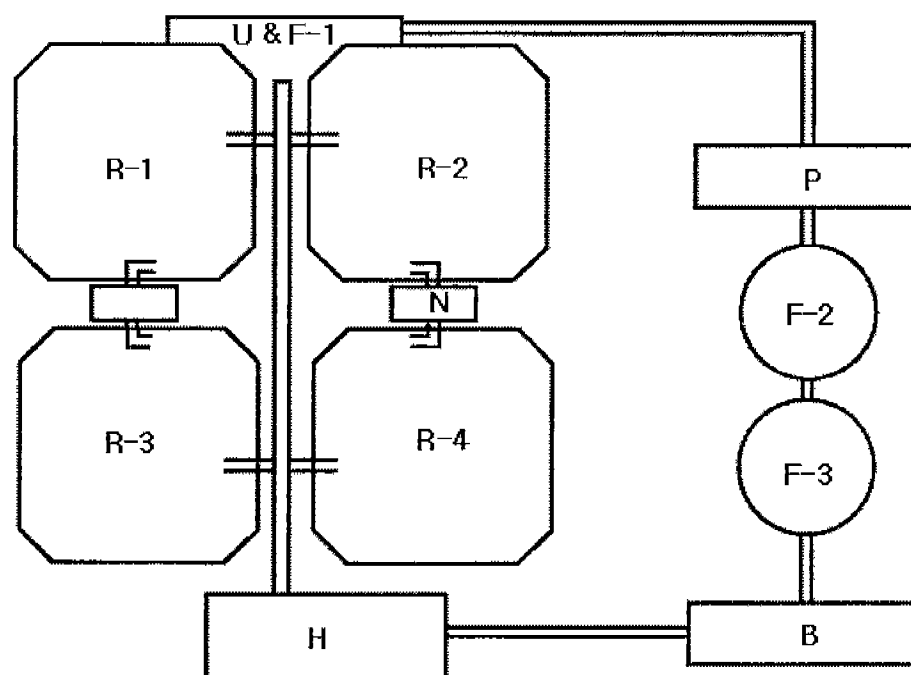


Fig. 1. Schematic diagram of semi closed recirculation system used in the experiment
 B: Boiler, F: Filter chamber, H: Heat exchanger, P: pump, R: Rearing tank
 N: Natural seawater filter chamber, U: ultraviolet lamp.

다. 성성숙 및 배란 유도

능성어의 성성숙 유도 및 인위 산란을 유도하기 위해 광주기와 수온을 조절한 실험어와 대조구의 실험어를 대상으로 생식공을 통한 cannulation 조사방법을 이용하여 성성숙 단계를 조사하고, 산란유도 가능 개체를 대상으로 각각 LhRH-a (desGly¹⁰ [D-Ala⁶] -luteinizing hormone releasing hormone ethylamide, Sigma Co., USA)와 HCG (human chorionic gonadotropin, Sigma Co., USA)를 이용하여 최종 성숙 및 배란유도를 실시하였다.

(1) cannulation 방법을 이용한 생식소 발달 조사

인위적 배란을 유도하기 위한 hormone의 적정 처리시기를 알아보기 위하여 cannulation 방법을 이용하여 능성어 어미의 성성숙 정도를 파악하였다. 실험에 사용한 능성어의 전장과 체중은 Table 1에 나타냈으며, 실험어는 외부 생식공의 발달 정도에 따라 실험어를 선택하여, 2-phenoxyethanol에 200~300 ppm 농도로 마취 후 내경 0.8 mm, 외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 실시하였다. 실험 후 실험어는 어류 질병 감염 예방을 하기 위하여 HCl-Oxytetracyclin 150 ppm으로 1시간 약욕을 실시하였다 (Fig. 2).

(2) hormone 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도

실험어는 cannulation 방법을 이용하여 생식소내 난경이 400 μ m 전후의 난을 가지고 있는 어미만을 대상으로 격리 수용하거나 tagging한 후 수조에 수용한 후 실험어를 확인하여 추적하였다. 난 최종성숙 및 배란유도를 하기 위한 hormone은 LhRH와 HCG를 이용하였다. LhRH 처리는 Ethyl alcohol에 용해한 LhRH 용해액과 cocoa oil (EA, Japan)을 혼합 후 1회 주사하였다. LhRH의 처리 농도는 어체중 kg당 50 μ g의 농도로 주사하였다. HCG 처리는 생리식염수에 용해 후 어체중 kg당 500 IU 농도로 1회 주사하였다. Hormone의 주사 부위는 어체의 등 근육 제1극조 아래 1 cm 부분에 주사하였다. Hormone 주사 후 24시간 간격으로 5일간 배란 유무 및 난의 변화를 관찰하였다 (Table 2).

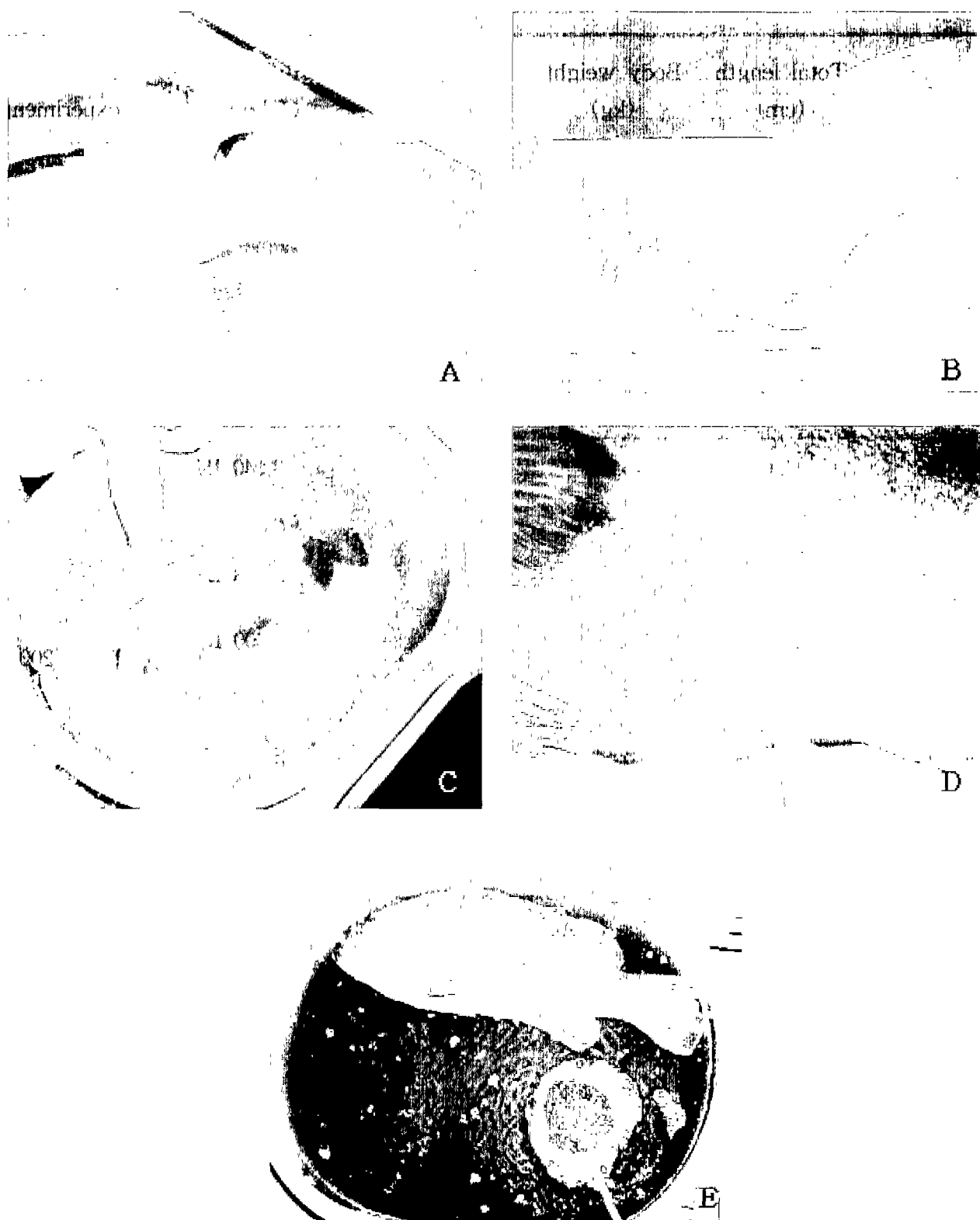


Fig. 2. Examination of sexual development in *E. septemfasciatus* using cannulation method. A: experimental fish. B: measure, C: anesthetize, D: cannulation, E: balneum medicatum.

Table 2. Hormone treatments used to induce ovulation in *E. septemfasciatus*

Fish No.	Total length (cm)	Body weight (kg)	Designed of hormone	Actual treatment of hormone	Duration of experiment
1	71.0	5.72		290 μg	
2	70.0	5.78	LhRH: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	290 μg	21 Apr. ~ 12 May 2002
3	66.0	4.50		230 μg	
4	72.5	5.36		270 μg	
5	88.0	11.18	LhRH: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	560 μg	
6	69.0	6.28		3,140 IU	
7	89.0	11.98		6,000 IU	
8	84.0	10.74		5,400 IU	
9	88.0	11.18	HCG: 500 IU/kg	5,600 IU	5 Jul. ~ 31 Jul. 2003
10	73.0	5.60		2,900 IU	
11	71.0	5.34		2,700 IU	
12	60.0	3.65		1,850 IU	
13	60.0	3.78		1,900 IU	

제3절. 기능적 수컷 유도 및 정자 냉동보존

정자의 확보를 위하여 제주도 연안에서 채집된 성적으로 미성숙한 능성어를 대상으로 17 α -methyltestosterone (MT)을 이용하여 기능적 수컷을 유도하였다. 그리고 능성어의 난 성숙 유도 및 정자형성시기의 시기적 불일치 문제를 해결하기 위하여 정자 냉동 보존 방법을 개발하였다.

1. MT 처리에 따른 기능적 수컷 유도

기능적 수컷 유도 실험은 2001~2003년까지 hormone의 처리시기와 방법에 따른 차이를 알아보기 위하여 5회 실시하였다. MT 처리 농도는 어체 중 1 kg당 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg 처리구와 대조구로 하였다. MT의 투여방법은 어체의 등 근육 부위에 hormone을 주사하는 방법과 복강내 삽입 방법을 이용하였다.

근육주사 방법은 MT를 ethyl alcohol (95%)에 용해시켜 cocoa oil과 혼합 후 어체에 등 근육 제1극조 아래 1cm 부분에 주사하였다. MT의 투여는 1차 실험 (2001년)에서는 hormone의 투여는 주 1회씩 5회에 걸쳐 주사하였으며, 이후 5주 후 생식소의 조직학적 관찰을 하였으며 (Table 3), 2차 실험 (2002~2003년)부터는 주 1회씩 4회에 걸쳐 주사하였으며, 주사 4주후부터 생식소의 조직학적 관찰 및 정액 추출 유무를 조사하였다 (Table 4, 5).

복강내 삽입 방법은 MT가 들어있는 silastic capsule을 제작하여 복강내 삽입하였다. Silastic capsule 제조 방법은 100 mg의 MT를 200 μ l의 ethyl alcohol (95%)에 용해시킨 후 800 μ l cocoa oil을 첨가하였다 (1 mg MT/10 μ l). 그리고 내경 1.2 mm의 실리콘튜브를 1 cm (MT 2 mg 함유용)와 1.5 cm (MT 3 mg 함유용) 그리고 2 cm (MT 4 mg 함유용)로 각각 절단하여 앞에서 제조된 hormone 용액을 각각 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l를 넣고 절단부위 양쪽을 실리콘으로 봉입하였다. 제작한 silastic capsule을 어체의 가슴지느러미 밑 부분을 약 0.5 cm 절개 후 삽입하고, 접착제를 이용하여 절개부위를 봉하였다. Hormone은 1회 처리하였으며, 처리 8주 후부터 정자의 출현 유무를 매주 조사하였다 (Table 5).

Table 3. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of *E. septemfasciatus* from June to September in 2001

Experimental group	Number	Total length (cm)	Body weight (g)	Actual treatment of MT
Control	1	34.7	740	only
	2	28.2	578	cocoa oil
MT 0.5 mg/kg	1	37.0	820	14.4
	2	30.0	638	11.2
MT 1.0 mg/kg	1	41.0	1,168	58.8
	2	32.8	585	20.5
MT 2.0 mg/kg	1	38.7	1,012	70.9
	2	35.3	610	42.7

Table 4. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of *E. septemfasciatus* from March to May in 2002

Experimental group	Number	Total length (cm)	Body weight (g)	Actual treatment of MT
Control	1	39.5	930.1	only cocoa oil
	2	40.0	1,322.2	
	3	47.0	1,797.4	
MT 0.5 mg/kg	1	33.0	718.5	10.1
	2	40.5	1,291.5	18.1
	3	44.2	1,720.9	24.1
MT 1.0 mg/kg	1	42.0	1,344.2	37.6
	2	30.7	933.7	26.2
	3	43.5	1,716.4	48.1
	4	43.5	1,771.5	49.6
MT 2.0 mg/kg	1	43.0	1,403.6	78.6
	2	41.3	1,298.0	72.7
	3	44.8	1,761.1	98.7
Sample	1	44.5	1,511.2	
	2	34.5	673.6	

Table 5. 17 α -methyltestosterone treatments for sex reversal of *E. septemfasciatus* in 2003

Experimental group	Number	Total length (cm)	Body weight (g)	Actual treatment of MT	Duration of experiment	Methods
MT 1.0 mg/kg	1	53.0	2,350	65.6	9 Jan. ~ 28 Feb.	Injection
	2	48.0	1,896	52.1		
	3	49.0	1,893	55.5		
	4	52.0	2,350	62.2		
	5	55.0	2,393	68.3		
	6	51.0	2,536	67.2		
	7	48.0	1,838	52.1		
MT 2.0 mg/kg	1	44.5	1,275	3.0	9 Jan. ~ 14 Mar.	Silastic capsule
	2	45.0	1,377	3.0		
	3	51.0	1,965	4.0		
	4	53.0	2,309	5.0		
MT 2.0 mg/kg	1	45.0	1,600	89.6	5 Apr. ~ 31 May	Injection
	2	57.0	2,700	152.2		
	3	46.0	1,620	90.8		
MT 1.0 mg/kg	1	63.0	3,220	90.2		
MT 2.0 mg/kg	1	38.5	960	53.8	2 May ~ 18 Jul.	Injection
	2	65.0	3,920	219.5		
	3	56.0	2,800	156.8		
	4	52.5	2,200	123.2		

2. Hormone 추출 및 정량

MT 처리를 통한 기능적 수컷 유도과정에서 성 스테로이드 hormone의 변화를 2주 간격으로 조사하였다. 성전환 및 정자형성 과정에 따른 Testosterone (T)과 11-ketotestosterone (11-KT)의 농도 변화를 조사하였다.

스테로이드 hormone의 추출은 각 분석대상 hormone 당 혈청 250 μ l를 채취한 다음, 2 ml의 diethyl ether를 첨가하여 잘 혼합한 후 5~10분간 안정시킨 뒤 -70°C 의 냉동고에서 15분간 결빙시켰다. 이후 상층의 유기용매층 (free steroid)만을 시험관에 옮겨 원심분리기로 완전 건조시켰으며, 앞의 추출과정을 2회 반복 실시하였다. 완전 건조된 스테로이드 추출물은 1 ml의 0.1% gel-PBS (pH 7.5)에 다시 용해 한 후, Aida et al., (1991)의 방법에 따라 방사면역측정법(RIA, radioimmunoassay)으로 분석하였다.

방사면역측정은 0.0075~3.84 ng/ml까지 10단계로 만들어진 standard와 시료를 각각 200 μ l에 ^3H 로 방사 표지된 스테로이드 (Amersham)를 100 μ l (약 12,000 cpm)씩 첨가 후 희석 항체를 200 μ l씩 넣고 교반시켜 4°C 에서 12시간동안 반응시켰다. 항원, 항체의 결합형과 유리형을 분리하기 위하여 DCC (dextran coated charcoal)를 250 μ l씩 첨가하여 4°C 하에서 15분간 방치한 후 원심분리 (4°C , $2,000\times G$, 15 min) 한 뒤, 결합형 상등액을 취하여 여기에 3 ml의 scintillation cocktail (optiphase, WALLAC)를 넣고 액체섬광계측기로 측정하였다.

3. 정자 냉동 보존

능성어류의 정자 보존 기술 개발은 능성어의 방란·방정시기 및 성비의 불균형에 의해 인공 채란 및 채정의 어려움을 극복하고, 수컷 어미의 사육관리에 필요한 노력과 경비를 절감할 수 있다.

실험에 이용한 능성어는 인위적 성전환 유도 과정을 걸친 기능적 수컷 (전장 47.8 ± 2.1 cm, 체중 2.1 ± 0.2 kg) 4마리에서 추출한 정자를 이용하여 실시하였다 (Table 6). 능성어의 정자 냉동 보존 기술 개발을 하기위해 정액의 운동특성과 정액의 냉동보존을 위한 희석액과 동해방지제 종류에 따른 냉동정자의 운동 특성을 조사하였다.

가. 정자 채취 및 희석액 종류에 따른 영향

정자의 채취는 실험어의 생식소를 적출한 후 절편을 제작하였다. 그리고 희석액을 첨가한 후 적당히 절편된 생식소를 부드러운 고무볼로 부드럽게 압박해서 정자를 채취하고 희석액을 첨가하면서 상층액만을 수거하였다. 수거된 용액을 원심분리 (3,000 rpm, 5 min)하고나서 상층액을 제거한 후 다시 희석액 (5 ml) 첨가하고 나서 원심분리 (3,000 rpm, 30 sec)를 실시하였다. 이후 상층액만 채취하여 재차 원심분리 (3,000 rpm, 5 min) 후 최하층에 sperm pellet을 채취하여 실험에 이용하였다.

능성어 정자의 냉동보존에 적합한 희석액을 찾기 위해 5% glucose 와 MFRS (marine fish ringer's solution), Ham's-F10, 참돔 링거액 (PMRS, *Pagulus major* ringer's solution)을 이용하였으며, 이들의 조성 표는 Table 7과 같다.

Table 6. Measurements of functional male *E. septemfasciatus* used for this experiment

Experimental fish	Total length (cm)	Body weight (kg)	Gonad weight (g)
1	45.0	1.7	5.5
2	48.0	2.0	3.6
3	48.0	2.1	3.7
4	50.0	2.5	3.9
Average±s.e	47.8±1.0	2.1±0.2	4.2±0.5

Table 7. Constituents of the diluents tested for cryopreservation of *E. septemfasciatus*

Diluent	Constituent
5% glucose	5 g glucose / DW* 100 ml
MFRS**	0.346 g CaCl ₂ , 0.597 g KCl, 0.017 g MgCl ₂ , 13.5 g NaCl, 0.025 g NaHCO ₃ / DW 1,000ml
PMRS***	10 g NaCl, 0.22 g KCl, 0.25 g CaCl ₂ , 0.74 g MgSO ₄ · 7H ₂ O, 1.19 g HEPES, 0.9 g glucose, 0.1 g streptomycin, 10 IU penicillin G / DW 1,000 ml, NaOH - pH (7.4) control
Ham's-F10	Commodity

*DW: distilled water, **MFRS: marine fish ringer's solution, ***PMRS: *Pagulus major* ringer's solution.

나. 동해방지제 (Cryoprotectant) 종류 및 냉동보존에 따른 영향

정자의 냉동보존에 이용한 동해방지제의 종류로서 DMSO (dimethylsulfoxide)와 Test Yolk buffer (TYB, Irvine Scientific)를 이용하였다. 각각의 희석액을 첨가한 정액에 DMSO와 TYB를 혼합한 후 평형시간을 1분 이내로 하여 냉동하였다. 희석액과 동해방지제 종류에 따른 실험구의 혼합 비율은 Table 8과 같다. 그리고 각각의 실험에서의 정자 냉동을 위하여 희석 정액의 주입된 0.5 ml 용량의 정자보존용 straw를 액체질소 증기 (-76℃)에 의해 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소 (-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다. 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 7일간 저장한 후 30±0.5℃의 항온수조 또는 체운을 이용하여 10초 이내에 해동하였다. 이후 각각 실험구의 해동 정자는 일정비율로 해수에 희석한 후 해동 후 시간의 경과함에 따른 정자 활성도를 측정하였다.

냉동보존의 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여 각 실험구별 정액을 자연해수와 1:9의 비율로 희석 후, 광학현미경과 모니터를 이용하여 시간경과에 따른 정자의 운동성을 파악하였다. 정자의 운동성 파악은 Strussmann et al. (1994)의 정자 활성 지수 (sperm activity index: SAI) 측정 방법 중 실제 수정 능력을 가지고 있는 1단계의 정자 수만을 측정하였다. 각 실험에 대한 정자 활성은 3~5회 측정하여 평균을 구하였다 (Table 9).

Table 8. Experimental groups of diluents and cryoprotectants tested for cryopreservation of *E. septemfasciatus* sperm

Composition			Mixture rate	Remark
Diluents	Cryoprotectant	Sperm		
5% glucose				GTS
MFRS	TYB	sperm pellet	0.25:0.5:0.25	MTS
Ham's-F10				HTS
5% glucose				GDS
MFRS	DMSO	sperm pellet	0.60:0.05:0.35	MDS
Ham's-F10				HDS
PMRS	DMSO	sperm pellet	0.75:0.05:0.20	PDS

Table 9. Numerical index used to evaluate sperm motility

Index	Score	Motility characteristics
I	3	Spermatozoa display forward movement rapidly
II	2	Spermatozoa display forward movement slowly
III	1	Spermatozoa display vibrating movement moderately
IV	0	Immobile sperm

$SAI = \text{score} \times \text{percentage of motile spermatozoa (\%)} / 100$

4. 냉동정자에 따른 수정률 및 부화율

냉동 보존된 정자의 수정률 및 부화율은 인공 채란된 능성어 난을 이용하였으며, 난과 정자의 비율 (100만개: 0.1 ml)로 건식법으로 수정하였다. 실험에 이용된 냉동정자는 GDS와 PDS 실험구와 냉동하지 않은 정자를 이용하였다. 수정률은 각각의 실험구에서 인공수정 후 난의 상실기 단계에 도달했을 때를 기준으로 하였고, 부화율을 조사하였다.

제4절. 난 및 자·치어 발달

1. 난 발생 및 부화

성 성숙된 능성어 암컷을 이용하여 인공 채란된 난과 기능적 수컷에서 얻은 정자를 이용하여 건식법으로 수정한 수정란을 사용하였다. 수정란의 난경 및 유구경 그리고 시간경과에 따른 발생 과정을 조사하였다. 모든 실험은 항온 항습실 ($25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)에서 수행 하였으며, 광학현미경과 profile projector를 이용하여 관찰하였다. 수정 후 발생단계별 소요 시간은 각 발생단계가 50% 이루어졌을 때를 기준으로 하였고, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

2. 수온·염분별 발생속도와 부화 자어 특성

수온별 난 발생 속도를 구하기 위하여 실험구는 22°C 와 25°C 로 설정하였다. 수정란은 각 실험구당 250 ml 비이커에 100개의 수정란을 수용하여 관찰하였다. 난 발생 과정은 8 cell, 16 cell, 상실기, 포배기, 낭배기, Kuffer's vesicle 출현 및 배체형성, 그리고 부화까지 발생단계별 소요시간을 조사하였다. 부화율은 각 실험구의 부화자어와 사란을 전부 계수하였고, 동시에 기형개체의 출현을 조사하였다.

염분에 따른 수정란의 특성을 알아보기 위하여 정상해수 (34‰)와 26‰, 18‰ 해수를 제조하여 염분에 따른 부화율에 미치는 영향을 조사하였다. 수정란은 각 실험구별로 100 ml 비이커에 50개의 수정란을 수용하여 관찰하였다.

3. 자·치어의 형태발달과 성장

가. 수온별 난황흡수 및 개구시간

능성어 자어의 난황 흡수율 및 개구시간 조사는 항온 항습실을 이용하여 수온 22°C 와 25°C 실험구로 설정하여 조사하였다. 난황흡수를 조사는 20ℓ의 아크릴 수조에 2,000~3,000개의 수정란을 수용한 후 부화된 자어를 대상으로 조사하였다. 난황 및 유구의 측정 방법은 사육중인 자어를 대상으로 24시간 간격으로 5~10마리씩을 표본 추출하여 MS 222로 마취시킨 다음 profile projector와 광학 현미경하에서 $1\ \mu\text{m}$ 단위까지 측정하였다 (Fig. 3). 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 다음의 식으로 계산하였다.

난황용적 $=\pi/6\times Ih^2$ (I:난황자경, h:난황단경)

유구용적 $=\pi/6\times d^3$ (d:유구경)

자어의 개구시간 조사는 난황 흡수율과 동일한 방법으로 조사하였고, 개구시간 판정은 자어 중 약 80% 이상이 개구된 시점을 기준으로 하였다.

나. 부화자어의 전장과 입 크기 변화

사육경과 시간에 따른 자어의 전장과 입 크기 변화를 조사하기 위하여 20ℓ 아크릴 수조에 2,000~3,000개의 수정란을 수용한 후 부화된 자어를 대상으로 조사하였다. 자어의 먹이는 개구 후부터 일반적으로 먹이생물로 이용되고 있는 Rotifer, *Brachionus* sp. (size 110~210 μm)를 15 개체/ml의 밀도로 공급하고, 여기에 *Nannochloropsis* sp.와 *Isochrysis* sp.를 각각 50만 cell/ml 내외의 밀도로 공급하였다. 사육수의 환수는 부화 직후부터 3일까지는 지수 상태를 유지하였고, 그 후 매일 사육수의 약 10~30%를 부분 환수하였다. 입 크기(d)는 자어의 상악장 크기(UJL, Upper jaw length)를 기준으로 설정한 Shirota (1970)의 방법에 따라 $d=\sqrt{2} \times \text{UJL}$ 의 식으로 구하였다. 자어의 전장 및 상악장, 항문장 크기는 부화 후 24시간 간격으로 10마리 내외의 자어를 채집하여 MS 222에 마취시킨 후, profile projector를 이용하여 1 μm 단위까지 측정하였다 (Fig. 3, 4).

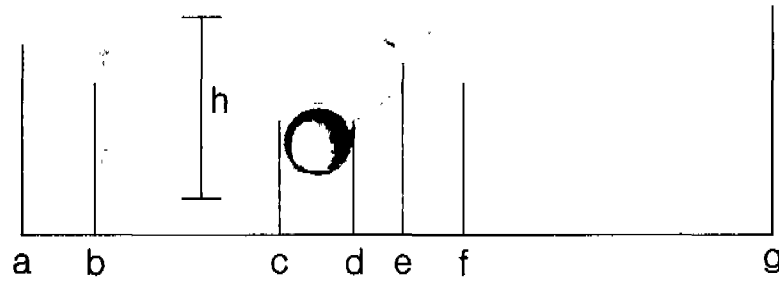


Fig. 3. Measurement sites for larvae of *E. septemfasciatus*. a-g: total length, a-f: anal length, b-e: length of yolk, c-d: diameter of oil globule, h: height of yolk.

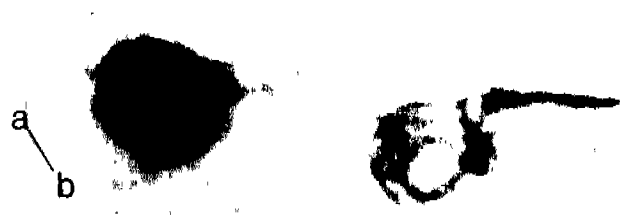


Fig. 4. Measuring the mouth size of *E. septemfasciatus*. a-b: upper jaw length.

제5절. 먹이계열 개발 및 대량 종묘 생산

1. Rotifer 배양

이 실험에 사용한 Thai-strain rotifer, *B. rotundiformis*는 2002년 8월 일본 미에현 오와세 재배어업센터에서 분양받아 2개월간 순치 배양 후 사용하였다.

온도·염분별 rotifer 개체군 성장을 조사하기 위해 2차에 걸쳐 실험을 실시하였다. 500 ml 삼각플라스크에 배양액 250 ml를 채우고, 초기 접종밀도를 10 개체/ml로 한 뒤 성장량이 급격히 감소할 때 까지 배양하였다. 수온은 $28\pm0.5^{\circ}\text{C}$, $32\pm0.5^{\circ}\text{C}$, 각 온도별 염분농도는 5‰, 15‰, 25‰, 33‰로 각각 설정하여 2반복으로 실시하였다.

그리고 능성어의 초기 먹이 생물로서 이용하기 위한 rotifer의 대량배양 기술개발을 위하여 초소형 rotifer인 Thai-strain rotifer와 일반 종묘장에서 사용하고 있는 S-type rotifer를 대량 배양하여 이용 가능성을 조사하였다. Rotifer 배양은 Thai-strain rotifer인 경우 염분농도 15~25‰, 수온 30°C 하에서 1,000~1,500 개체/ml의 밀도로 4개월 동안 배양하였고, S-type rotifer는 일반해수 (32‰), 수온 30°C 하에서 400~500 개체/ml의 밀도로 3개월 동안 배양하여 각각 rotifer의 배양장 분포를 조사 하였다.

2. 어미 및 수정란

능성어의 대량 종묘 생산을 위한 수정란은 제주대학교 해양과환경연구소와 대학수산 그리고 국립수산과학원 남제주수산종묘시험장에서 인위적으로 성성숙을 유도한 능성어를 대상으로 hormone (LhRH, HCG)을 처리 후 인공배란을 유도하고, 기능적 수컷에서 정자를 추출하여 인공수정을 하였다. 이들 수정란에서 사란과 미성숙 알을 제외한 양질의 수정란을 이용하여 종묘 생산 실험을 하였다. 그리고 일부 수정란을 일본 히로시마현의 민간배양장으로부터 인공수정 시킨 수정란을 분양받아 종묘 생산 실험을 하였다.

3. 종묘생산

능성어의 대량 종묘 생산 실험은 최적의 종묘생산 기술을 개발하기 위해 서로 다른 조건 (먹이생물 및 사육 환경 조절)을 가진 제주도해양수산자원연구소 (A-type)와 대학수산 (B-type) 그리고 국립수산과학원 남제주수산종묘시험장 (C-type)에서 실시하였다.

가. A-type

(1) 사육수조 및 관리

수정란수용은 3 m 콘크리트수조 2개조를 이용하여 각각 230,000개 수용하였다. 자어사육조의 수온조절은 보일러를 이용하여 관리하였으며, 액화산소를 공급해수와 함께 공급하였다.

수정란 수용시 사육 수조의 수온은 20.7℃이었으며 사육해수는 수정란 수용시부터 저층으로 소량의 물을 흘려주었다 (0.1회전/1일).

*N. oqculatab*를 일령 2일에서 10일까지 각각의 수조내에 100만 cells/ml로 유지하였고 일령 10일 이후는 50만 cells/ml로 유지시켜 주었다. 수조내 유막을 형성하기 위하여 일반 양식장에서 사용하는 피드오일 (Feed oil)을 0.1 ml/1 m² 비율로 아침저녁 (오전 9시, 오후 5시)으로 수조내 aeration 부근에 첨가하여 주었다.

실험수조의 기초 환경은 YSI (YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO, pH를 측정하였다.

(2) Rotifer 공급

Rotifer 공급은 개구가 시작되는 부화 3일째부터 15~20 개체/ml의 밀도로 공급하였다. 공급 방법은 100 µm 물러가제로 큰 개체를 제거한 후 30 µm 물러가제로 rotifer를 수거하여 공급하였다.

먹이생물은 사육수조 1과 2에서 각각 Thai-strain rotifer와 S-type rotifer를 100 µm 물러가제를 사용, 걸러진 소형개체들을 각각의 부화 수조내에 15~20 개체/ml로 일령 3일부터 9일까지 공급하였다. 일령 9일부터는 두 수조 모두 S-type rotifer를 그대로 10 개체/ml로 수조내에 공급하였다.

나. B-type

(1) 사육수조 및 관리

수정란 수용은 50 ton 콘크리트 수조 1개를 이용하여 300,000개를 수용하였다. 자어 사육조의 수온 조절은 보일러 시설을 이용하여 수용시 22.0℃에서 점차 상승시켜 먹이 공급시 25±0.5℃ 내외를 유지 하였다. 그리고 부화후 5일째부터 일부 (0.1~0.2 회전/일) 환수를 하였다. 사육 수조내 수질 안정을 목적으로 *Nannochloropsis* sp.와 *Isochrysis* sp.를 일령 2일부터 수조내에 50만 cells/ml로 그리고 일령 5일 이후부터는 *Chlorella* sp.를 같이 공급하였다. 부화자어의 수 표면의 표면장력에 의해 사망하는 것을 방지하기 위하여 수조내 유막을 형성시켰다. 유막 형성은 피드오일 (Feed oil)을 1 m²당 0.1 ml로 아침저녁으로 부화 개시일 (일령 0일)부터 부화후 3 일째 까지 수조내 aeration 부근에 첨가하여 주었다.

(2) Rotifer 공급

Rotifer는 S-type rotifer (size 110~210 μm)를 이용하였으며, 공급은 개구가 시작되는 부화3일째부터 수조내 항상 15 개체/ml의 밀도를 유지할 수 있도록 공급하였다. Rotifer 영양 강화는 시판용 *Nannochloropsis* sp.와 *Isochrysis* sp.를 이용하였다.

다. C-type

호르몬 주사에 의해 인위 성숙시킨 능성어 어미로부터 채란된 수정란 (200,000개)을 물만들기 기법을 이용하여 초기 자어 사육하였다. 물만들기는 수정란 수송 2개월 전에 자연해수를 여과 과정 없이 주수한 후 미소 생물이 자연 발생되도록 하였다. 사육 기간 중 물만들기 수조의 수온은 25~30℃의 실내수온 조건이었다. 수조는 콘크리트 수조로 사육수량은 12 ton이었다. 물만들기는 자연 발생된 미소생물을 이용하는 것을 기본으로 하고 배양 개시일부터 rotifer *B. rotundiformis*를 첨가하여 함께 배양하였다.

제6절. 자바리, *Epinephelus bruneus* 종묘 생산

능성어류의 일종인 자바리, *E. bruneus*는 제주에서 다금바리로 불리우며 능성어와 사육 형태 및 습성이 거의 유사한 종으로 식용어로서 기호도가 높은 어종이다. 이 실험은 능성어의 종묘생산 기술을 개발하기 위한 일환으로서 지금까지의 연구 결과를 적용하여 자바리의 종묘생산 기술을 개발하고, 능성어류 양식의 길을 넓히는데 있다.

1. 어미 및 수정란 생산

자바리의 성성숙 유도 및 인위 산란 유도는 능성어와 동일한 방법을 이용하였다. 이 실험에 이용된 자바리 어미의 어체 크기는 전장 81.5 ± 3.5 cm, 체중 7.38 ± 1.06 kg이다.

자바리 어미의 성성숙 유무와 인위적 배란을 유도하기 위한 hormone의 처리시기를 알아보기 위하여 실험어의 외부 생식공의 발달 정도에 따라 실험어를 선택하여, cannulation을 실시하였다. 그리고 생식소내 난경이 400 μ m 전후의 난을 가지고 있는 어체를 대상으로 HCG를 어체중 kg당 500 IU 농도로 1회 주사하였다. Hormone 주사 48시간 후 인위적으로 배란을 유도하였다.

2. 난 발생 및 부화

자바리 수정란의 난경 및 유구경 그리고 시간경과에 따른 발생 과정을 조사하였다. 모든 실험은 항온 항습실 ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$)에서 수행 하였으며, 광학현미경과 profile projector를 이용하여 관찰하였다. 수정 후 발생단계별 소요 시간은 각 발생단계가 50% 이루어졌을 때를 기준으로 하였고, 모든 실험은 3반복의 실험결과를 평균으로 하였다.

3. 수온·염분별 발생속도와 부화 자어 특성

자바리 수정란의 발생 속도를 구하기 위하여 실험구는 22°C 와 25°C 로 설정하였다. 수정란은 각 실험구당 250 ml 비이커에 100개의 수정란을 수용하여 관찰하였다. 난 발생 과정은 2 cell, 상실기, 포배기, 낭배기, 배체형성, 그리고 부화까지 발생단계별 소요 시간을 조사하였다. 부화율은 각 실험구의 부화자어와 사란을 전부 계수하였고, 동시에 기형개체의 출현을 조사하였다.

염분에 따른 수정란의 특성을 알아보기 위하여 정상해수 (34‰)와 28‰, 24‰, 18‰ 해수를 제조하여 염분에 따른 부화율에 미치는 영향을 조사하였다. 수정란은 각 실험구별로 100 ml 비이커에 50개의 수정란을 수용하여 관찰하였다.

4. 자·치어의 형태발달과 성장

가. 수온별 난황흡수 및 개구시간

자바리 자어의 난황 흡수율 및 개구시간 조사는 수온 22℃와 25℃조건에서 조사하였다. 난황 흡수율 조사는 20ℓ의 아크릴 수조에 2,000~3,000개의 수정란을 수용한 후 부화된 자어를 대상으로 조사하였다.

난황 및 유구의 측정 방법은 사육중인 자어를 대상으로 24시간 간격으로 5~10마리씩을 표본 추출하여 MS 222로 마취시킨 다음 profile projector로 1 μm 단위까지 측정하였다. 난황 및 유구의 용적은 Blaxter and Hempel (1963)의 방법에 따라 다음의 식으로 계산하였다.

난황용적= $\pi/6 \times Ih^2$ (I:난황자경, h:난황단경)

유구용적= $\pi/6 \times d^3$ (d:유구경)

자어의 개구시간 조사는 난황 흡수율과 조사와 동일한 방법으로 조사하였고, 개구시간 판정은 자어 중 약 80% 이상이 개구된 시점을 기준으로 하였다.

나. 부화자어의 전장과 입 크기 변화

자어의 입크기(d)는 자어의 상악장 크기(UJL)를 기준으로 설정한 Shirota (1970)의 방법에 따라 $d=\sqrt{2} \times UJL$ 의 식으로 구하였다. 자어의 전장 및 상악장, 항문장 크기는 부화 후 24시간 간격으로 10마리 내외의 자어를 채집하여 MS 222에 마취시킨 후, profile projector를 이용하여 1 μm 단위까지 측정하였다.

다. 등지느러미 극과 배지느러미 극의 변화

등지느러미와 배지느러미 극의 변화는 변태를 시작하는 부화후 11일째부터 변태 완료시기의 부화후 48일째까지 3~5일 간격으로 10마리 내외의 자어를 채집하여 MS 222에 마취시킨 후, profile projector를 이용하여 1 μm 단위까지 측정하였다.

5. 종묘생산

자바리의 대량 종묘 생산 실험은 대학수산에서 실시하였다. 자바리 종묘생산에 따른 사육수조 관리 및 먹이계열은 Fig. 5에 나타내었다.

가. 사육수조 및 관리

수정란수용은 50 ton 콘크리트수조 2개조에 각각 300,000개와 400,000개 수용하였다. 사육조의 수온조절은 보일러를 이용하여 관리하였으며, 수온은 25.0±0.5℃로 유지였으며 사육해수는 자외선 살균 해수를 이용하였으며, 부화후 5일째부터 일부 환수를 해주었다 (0.1 회전/1일).

사육 수조내 *Nannochloropsis* sp.와 *Isochrysis* sp.를 일령 2일부터 수조내에 50만 cells/ml로

그리고 일령 5일 이후부터는 *Chlorella* sp.를 같이 공급하였다.

부화자어의 수표면의 표면장력에 의해 사망하는 것을 방지하기 위하여 수조내 유막을 만들었다. 유막 형성은 피드오일 (Feed oil)을 1 m²당 0.1 ml로 아침저녁으로 부화 개시일 (일령 0일)부터 부화후 3일째까지 수조내 aeration 부근에 첨가하여 주었다.

나. 먹이 공급

S-type rotifer (size 100~210 μ m)를 개구가 시작되는 부화 3일째부터 수조내 15 개체/ml의 밀도를 유지할 수 있도록 공급하였다. Rotifer 먹이는 시판용 *Nannochloropsis* sp.와 *Isochrysis* sp.를 이용하였다. Artemia는 부화후 14일째부터 유화오일을 이용하여 영양 강화 시킨 개체를 수조내 2~3 개체/ml 되도록 공급하였다. 부화후 16일째부터 초기 인공사료 (150 μ m 내외, INVE, USA)를 rotifer와 artemia와 함께 공급하였으며 이후 자바리 자어가 성장함에 따라 점차 인공사료의 크기를 증가시켰다.

다. 성장

사육일수에 따른 자바리의 전장과 항문장의 변화는 부화 직후부터 변태 전까지 1~2일 간격으로 측정하였으며, 변태를 시작하는 부화후 11일째부터 변태 완료시기의 부화후 48일째까지 3~5일 간격으로 10마리 내외의 자어를 채집하여 MS 222에 마취시킨 후, profile projector를 이용하여 1 μ m 단위까지 측정하였다. 변태 완료 이후의 자어는 약 7일 간격으로 측정판을 이용하여 1 mm 단위 측정하였다.

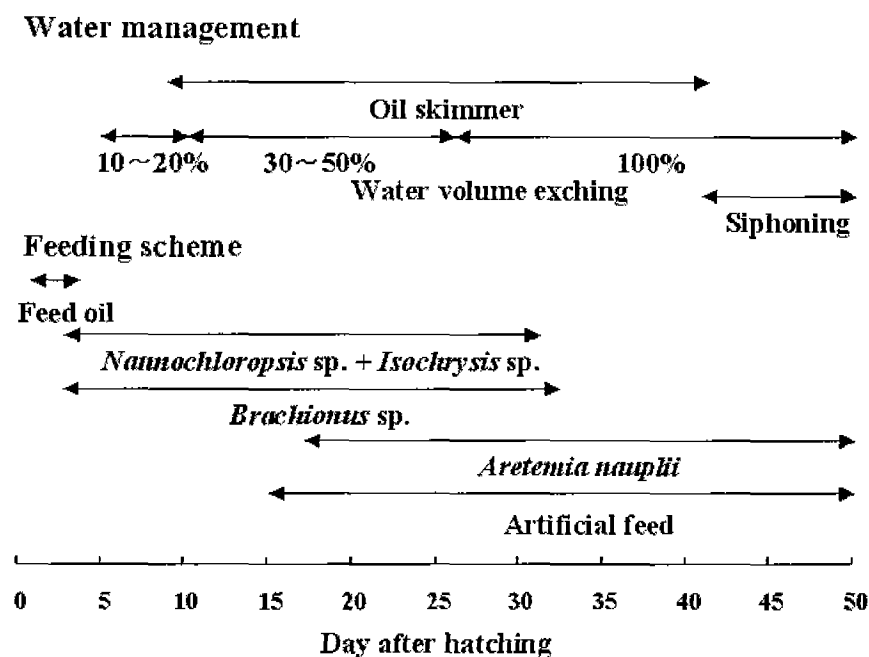


Fig. 5. Feeding scheme and tank management used during *E. bruneus*.

제 3 장. 결과

제1절. 자연산란

능성어의 수조내 자연산란 조사는 참여기업인 대학수산에서 사육관리하고 있는 능성어 어미를 대상으로 하였다. 산란은 2000~2002년까지 모두 3년에 걸쳐 조사하였다.

1. 2000년도

수조내 자연산란은 2000년 7월 6일부터 8월 28일까지 18회 일어났다. 산란은 처음 관찰된 이후 1~5일 간격으로 지속되는 경향을 보였다. 총 산란량은 3,855 ml이었다. 그리고 일일 산란량은 최대 405 ml부터 최소 35 ml이었다. 이들 중 부상란은 265 ml이었고, 부상란 중 수정률은 0~76% 범위였다. 수정률은 산란초기 거의 0%에 가깝게 낮았으나, 산란 횟수가 많아지면서 수정률이 최대 76.0% (8월 12일)까지 보여, 초기 및 후기 산란시기 보다 중기의 산란기에 수정률이 높은 경향을 보였다 (Fig. 6, 7).

2. 2001년도

자연산란은 2001년 7월 5일부터 8월 6일까지 총 12회에 걸쳐 일어났으며, 총 산란량은 1,650 ml이었다. 그리고 일일 산란량은 최대 250 ml부터 최소 5 ml이었다. 이들 중 부상란은 472 ml이었고, 부상란 중 수정률은 0~80% (8월 5일)까지 다양했다. 산란시기 동안 산란량은 산란기 초기에 많았으나 수정률은 떨어졌고, 후기 산란시기로 갈수록 산란량은 적어지는 반면 수정률은 높게 나타났다 (Fig. 8, 9).

3. 2002년도

수조내 자연산란은 2002년 7월 25일부터 8월 20일까지 9회 일어났다. 산란은 처음 관찰된 이후 3~4일 간격으로 지속되는 경향을 보였다. 총 산란량은 1,330 ml이었다. 그리고 일일 산란량은 최대 530 ml부터 최소 5 ml였다. 이들 중 부상란은 38 ml이었고, 부상란 중 수정률은 0~50% 범위였다. 산란량 및 수정률 모두 2000~2001년보다 낮은 경향을 보였다 (Fig. 10, 11).

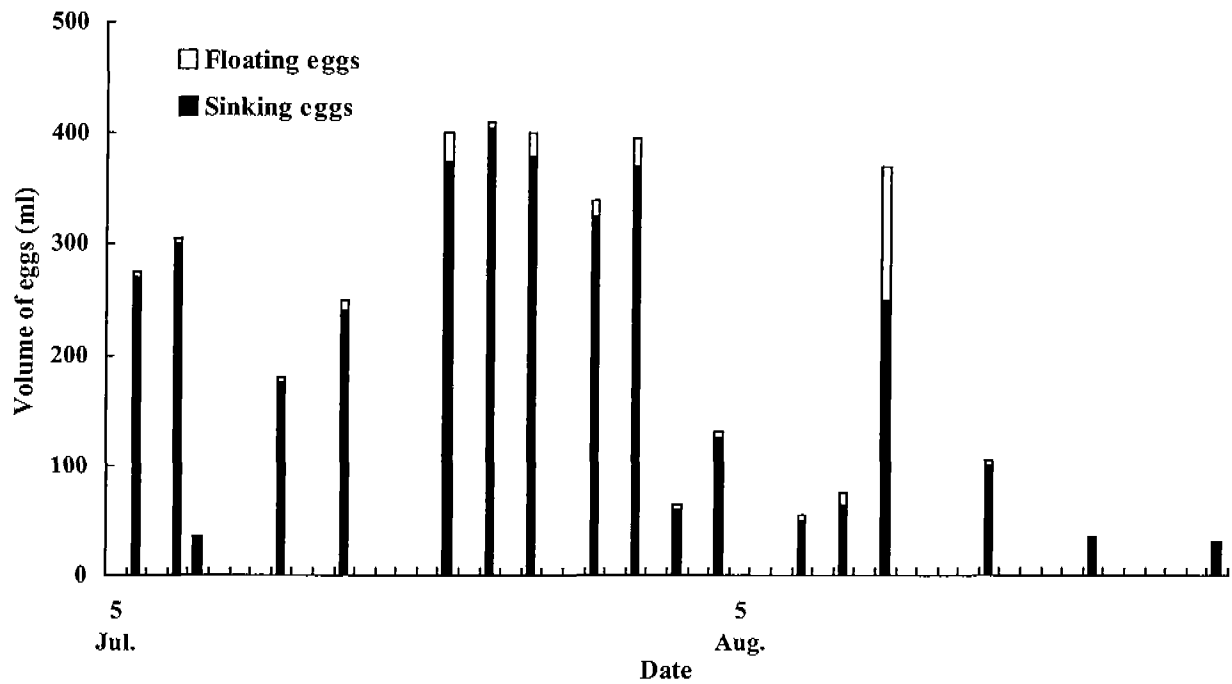


Fig. 6. Volume of natural spawned eggs of *E. septemfasciatus* in 2000.

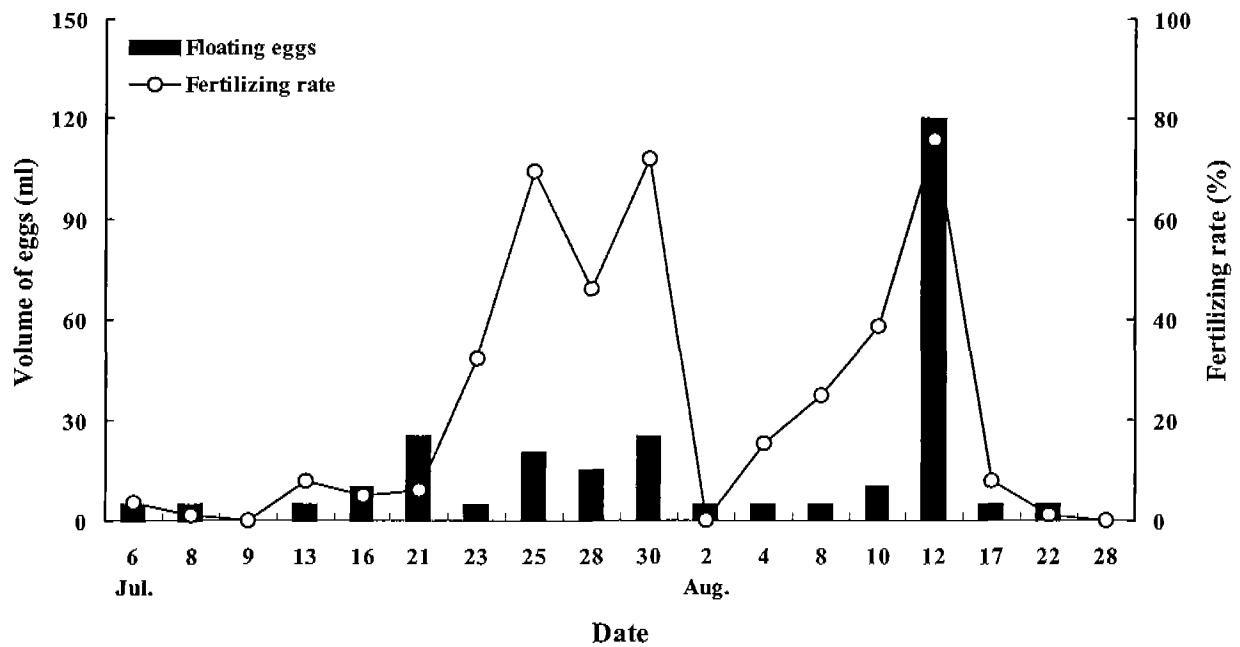


Fig. 7. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2000.

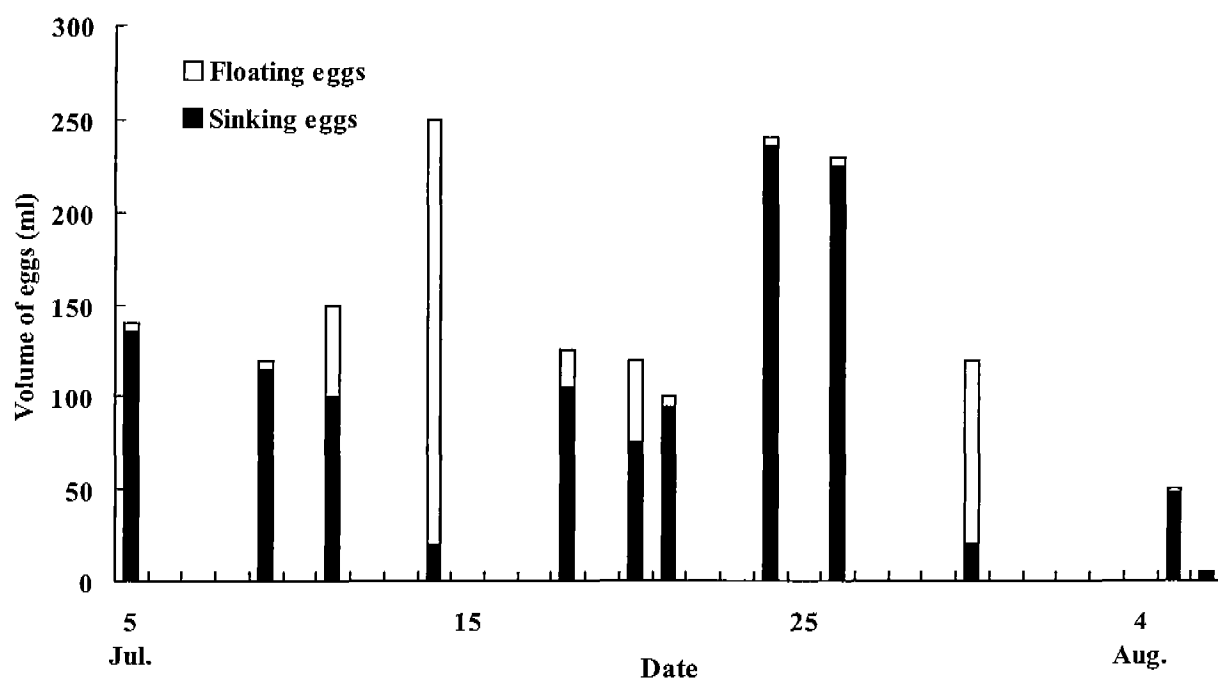


Fig. 8. Volume of natural spawned eggs of *E. septemfasciatus* in 2001.

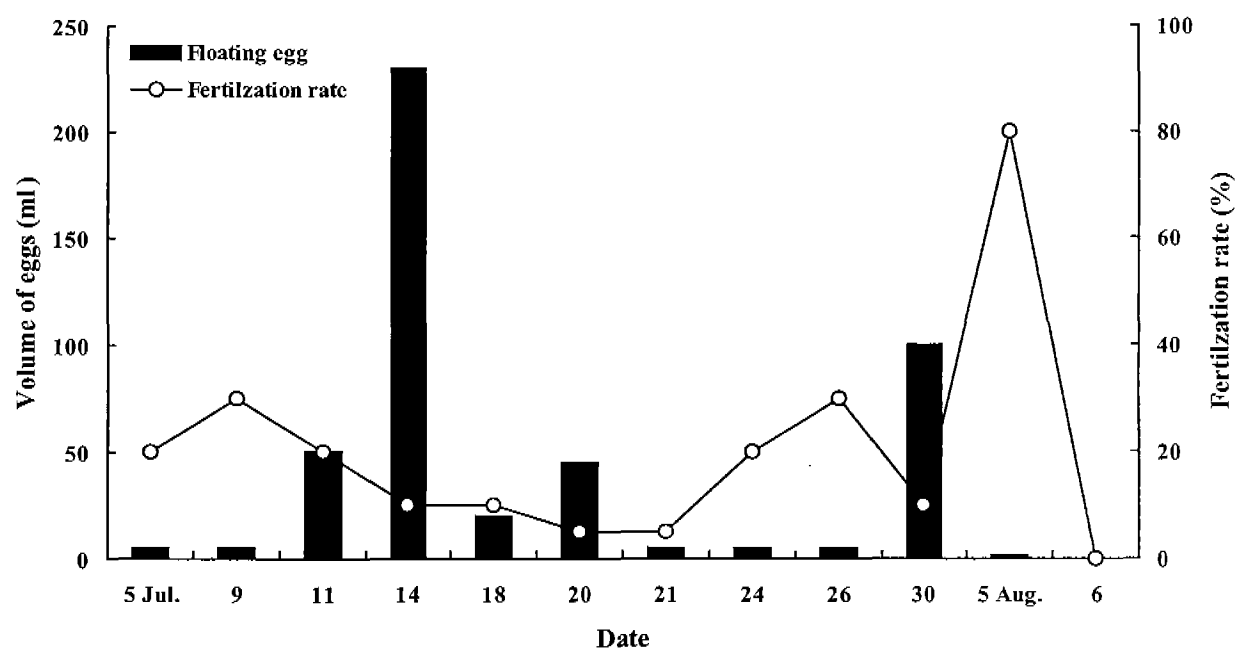


Fig. 9. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2001.

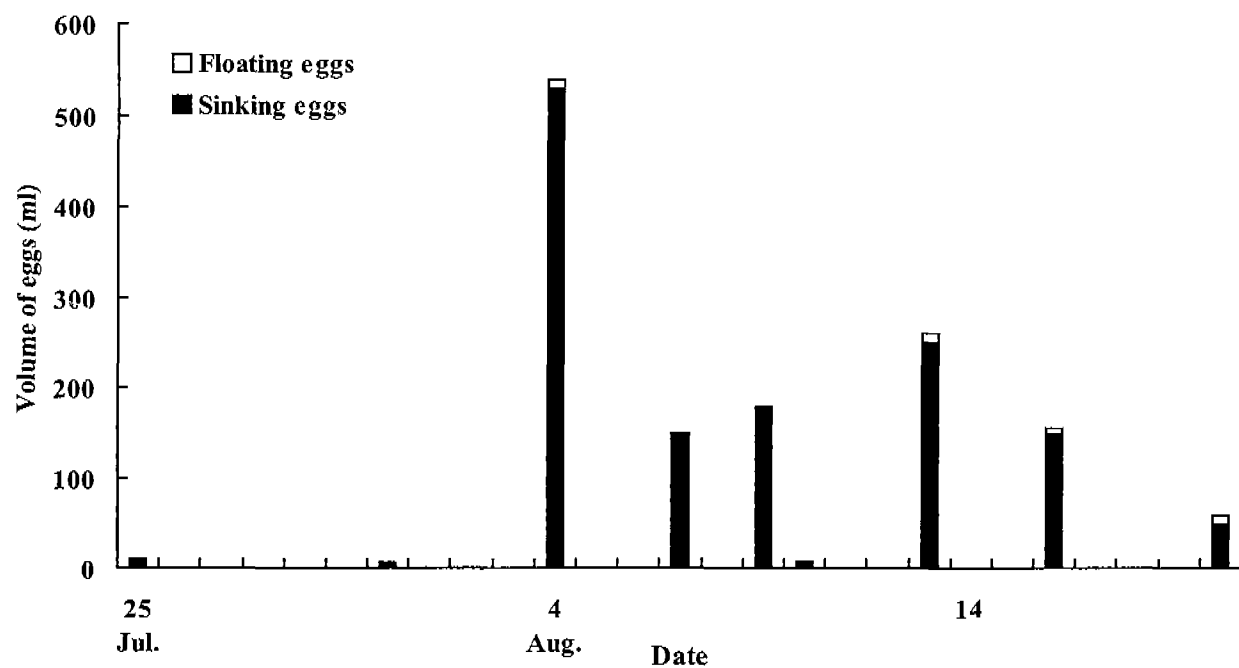


Fig. 10. Volume of natural spawned eggs of *E. septemfasciatus* in 2002.

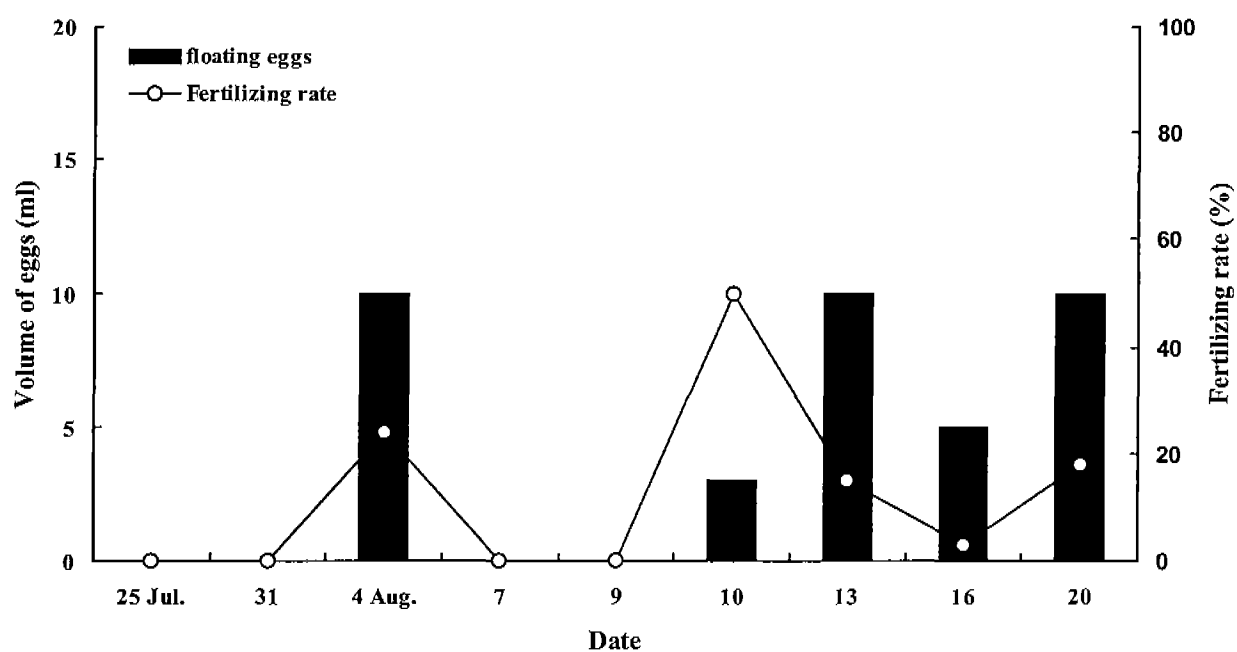


Fig. 11. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period in 2002.

제2절. 성성숙 유도 및 인공채란

1. 광·수온 조절을 통한 인위적 성성숙 유도

가. 1차 실험 (2001년 3월~8월)

자연조건보다 능성어의 조기 성성숙 유도를 통한 수정란 생산을 하기 위하여 광주기와 수온을 조절을 하였다. 자연조건과 인위적 환경제어 조건의 변화는 Fig. 12에 나타내었다. 광주기는 2001년 3월부터 명기가 점차 증가하였으며, 6월에 14.5L:9.5D로 명기 기간이 최고를 나타낸 이후 점차 명기가 감소하였다. 수온변화는 실험 시작시 13~14℃ 범위였던 것이 점차 상승하여 7월에 24~27℃ 범위를 보였다.

처리구의 수온 변화는 실험 시작 후 7일 간격으로 0.5~1.0℃ 온도를 상승시킨 결과 4월부터 자연조건보다 2~3℃ 높게 유지할 수 있었고, 5월부터 20℃내외로 성성숙 유무를 조사할 수 있었다. 광주기 조건은 자연조건과 비슷하게 조절하였다.

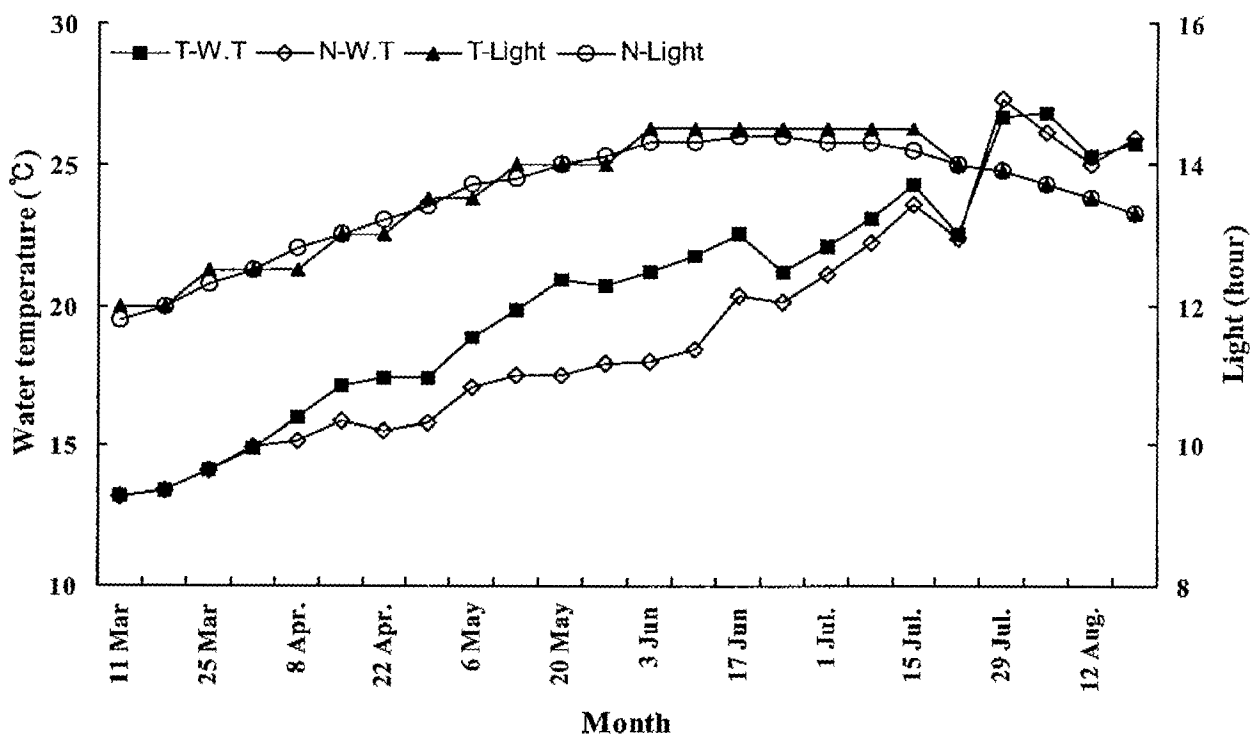


Fig. 12. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 11 March to 19 August 2001. N-Light: natural daylight, N-WT: natural water temperature, T-Light: treatment daylight, T-WT: treatment water temperature.

나. 2차 실험 (2001년 12월~2002년 5월)

2차 실험에서 자연조건과 인위적 환경제어 조건의 변화는 Fig. 13에 나타내었다. 자연조건의 광주기는 2001년 12월의 9.8L:14.2D의 단일조건에서 2002년 1월부터 자연 일주기에 따라 점차 명기가 증가하여 5월에 14.0L:10.0D의 장일 조건이 유지되었다. 그리고 수온은 2001년 12월에 15℃ 내외였던 것이 점차 감소하여 2월에 12~13℃ 범위로 가장 낮았으며, 이후 점차 증가하였다.

실험구의 광주기는 실험 시작시 9.5L:13.5D에서 매주 15~30분씩 증가시켜 3월에 14L:10D로 자연산란 시기의 장일조건으로 조절하였다. 그리고 수온 변화는 실험 시작 후 7일 간격으로 0.5~1.0℃ 온도를 상승시켜 3월부터 20℃이상 수온을 유지시켰다. 자연의 수온보다는 5~7℃ 이상 높았다. 그리고 광·수온 조절 실험구에서 4~5월부터 육안적으로 성성숙한 개체를 관찰할 수 있었다.

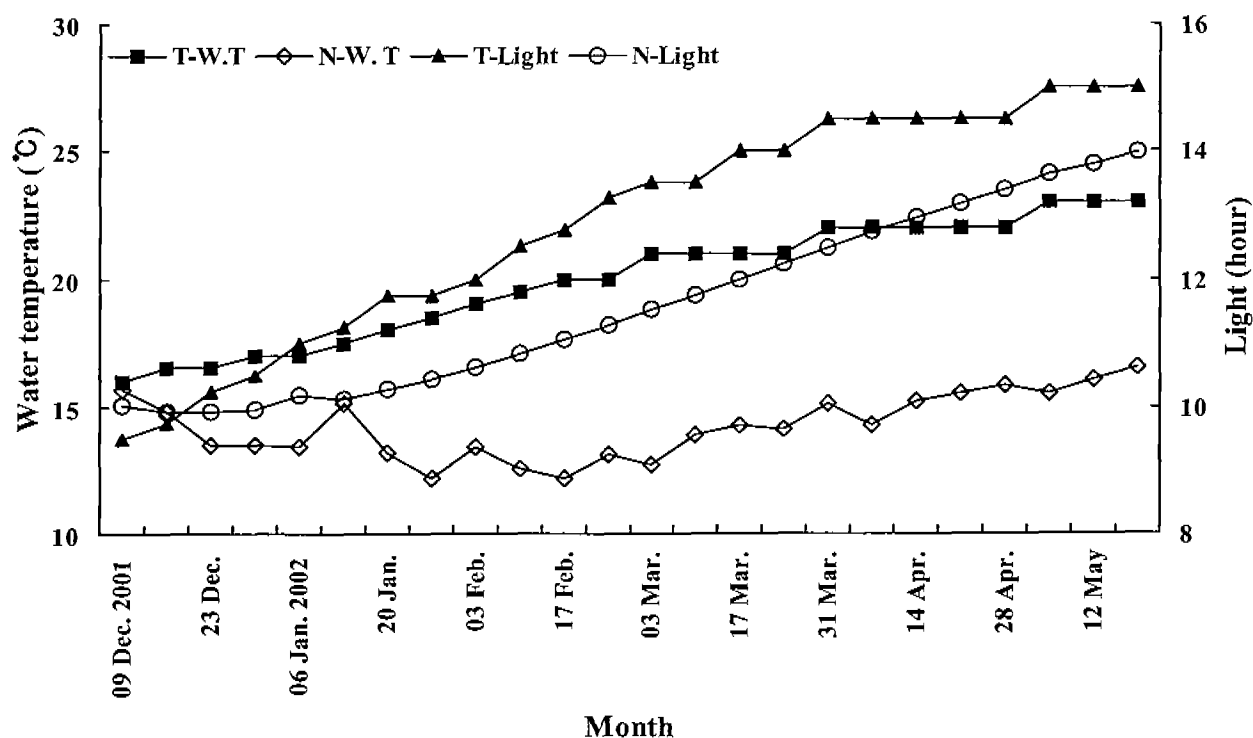


Fig. 13. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 9 December 2001 to 19 May 2002. N-Light: natural daylight, N-WT: natural water temperature, T-Light: treatment daylight, T-WT: treatment water temperature.

다. 3차 실험 (2002년 10월~2003년 3월)

3차 실험에서 자연조건과 인위적 환경제어 조건의 변화는 Fig. 14에 나타내었다. 자연조건의 광주기는 2002년 10월의 11L:13D에서 겨울철인 12월에는 단일조건인 9.6L:14.4D까지 명기가 줄었다. 12월 이후에는 자연 일주기에 따라 점차 명기가 증가하여 3월에 12L:12D를 유지하였다. 그리고 수온은 2002년 10월에 17~19℃내외였던 것이 점차 감소하여 2월에 12~13℃ 범위로 가장 낮았으며, 이후 점차 증가하였다.

실험구의 광주기는 시작시 단일조건인 9L:15D에서 매주 15~30분씩 증가시킨 결과 1월에 이르러 14L:10D의 자연산란 시기의 장일조건과 동일하게 조절하였다. 그리고 수온 변화는 실험 시작시 자연조건에서 수온이 하강하는 11월부터 7일 간격으로 0.5~1.0℃ 온도를 상승 시킨 결과 12월부터 20℃이상의 수온을 유지하였고, 자연 수온 보다 7~12℃ 이상 높였다. 그러나 실험기간 중 기계적 고장으로 인한 수온 변화가 심하였다. 실험구에서 육안적으로 성성숙한 개체를 관찰할 수 없었다.

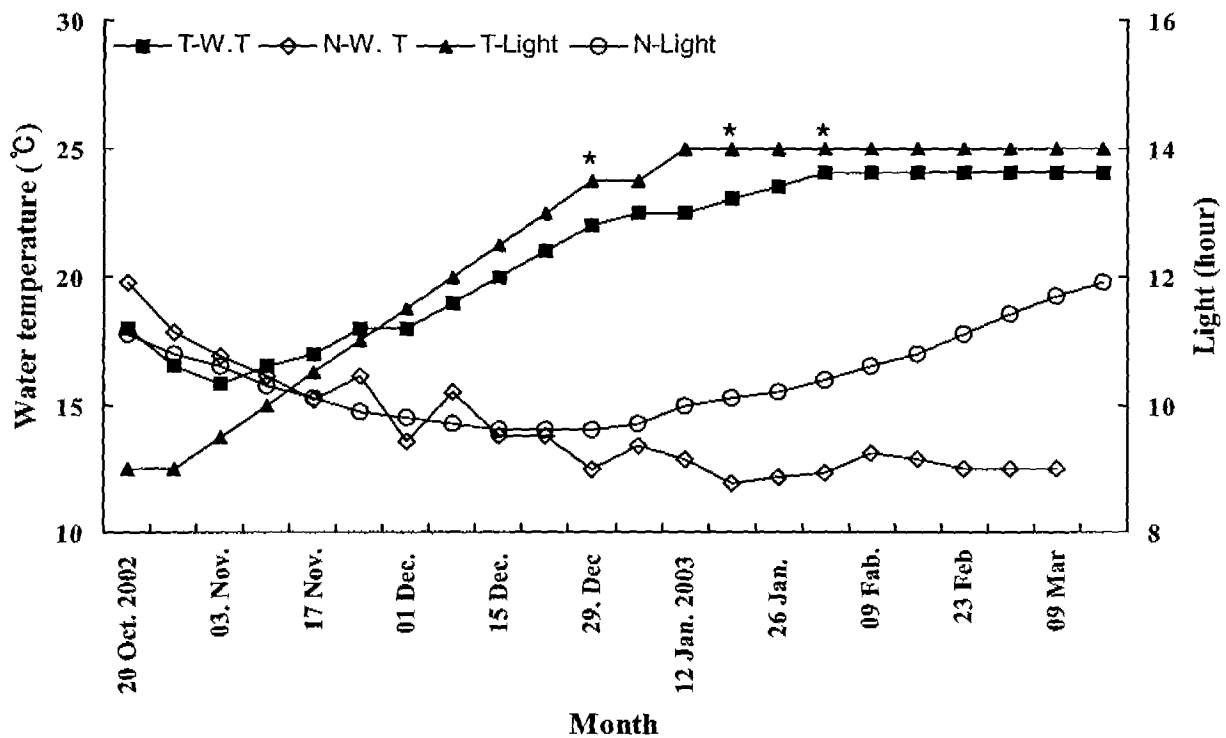


Fig. 14. Change in water temperature and photoperiod under natural conditions and in the treatment group from 20 October 2002 to 19 March 2003. N-Light: natural daylight, N-WT: natural water temperature, T-Light: treatment daylight, T-WT: treatment water temperature.

2. 성성숙 및 배란 유도

능성어의 성성숙 유도 및 산란을 유도하기 위해 광주기와 수온을 조절한 실험어와 대조구의 실험어를 대상으로 생식관을 통한 cannulation 방법으로 성성숙 단계를 조사하였다. 그리고 성숙한 개체를 대상으로 각각 LhRH와 HCG를 이용하여 배란유도를 실시하였다.

가. cannulation 방법을 이용한 생식소 발달 조사

2002년 5월에 생식소 발달 조사 결과 광주기와 수온조절을 한 실험구에서 조사대상 21마리 중 7마리가 주변인기 단계의 미성숙한 난모세포 (난경 $200\ \mu\text{m}$ 이하, Fig. 15-A)를 가졌으며, 그리고 2마리에서 생식소내에 난황구기 단계의 난모세포 (난경 $300\sim 400\ \mu\text{m}$ 이상, Fig. 15-B)들이 분포하였다. 그리고 2마리에서는 과숙란 (난경 $800\ \mu\text{m}$ 이상, Fig. 16-C)을 포란하고 있었다. 나머지 실험어는 cannulation이 불가능 하였다.

그리고 2003년도 자연조건에서 사육한 능성어 (총 53마리)를 대상으로 생식소 발달을 조사한 결과 cannulation이 가능한 28마리 대상 중 15마리가 주변인기 단계의 미성숙한 난모세포 (난경 $200\ \mu\text{m}$ 이하, Fig. 15-A)로 이루어져 있으며, 9마리에서 난황구기 단계의 난모세포 (난경 $300\sim 400\ \mu\text{m}$ 이상, Fig. 15-B)를 가지고 있었다. 그리고 4마리에서는 과숙란 (난경 $800\ \mu\text{m}$ 이상, Fig. 15-C)을 포란하고 있었다.

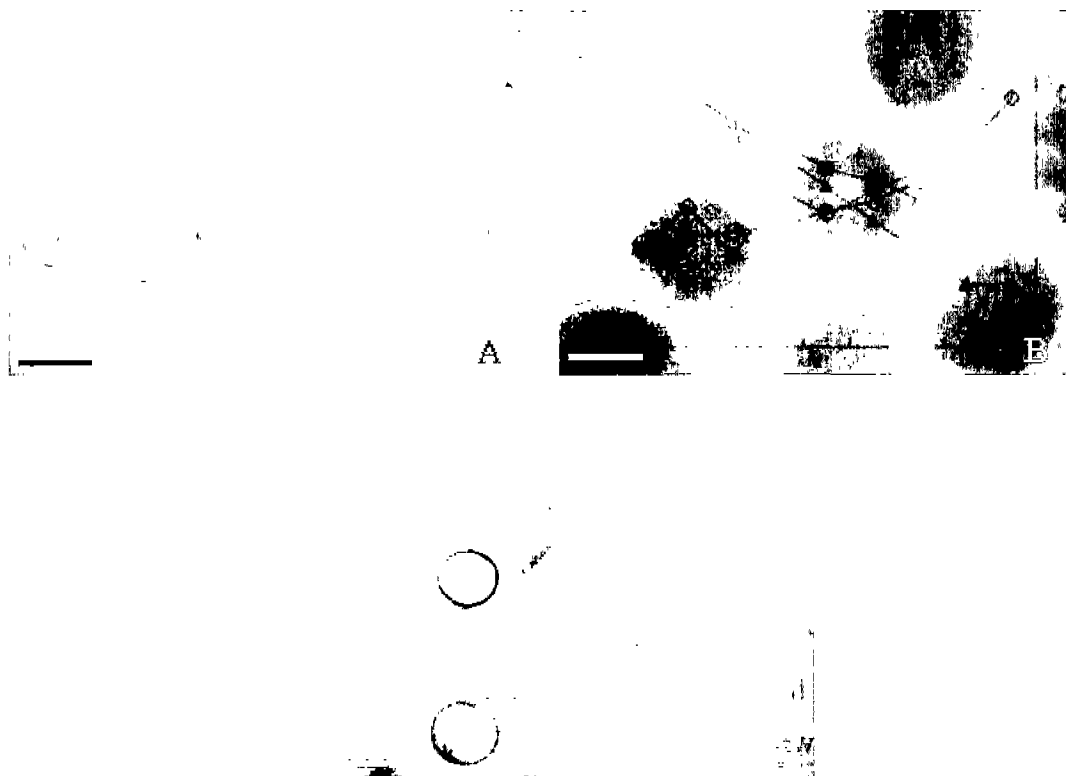


Fig. 15. Different development stage of oocytes in the ovary of *E. septemfasciatus* by cannulation. A: peri-nucleolus stage, B: yolk globule stage, C: over-mature egg stage. Scale Bar= $400\ \mu\text{m}$.

나. hormone 처리에 의한 난 성숙 및 배란 유도

실험어는 canulation 방법을 이용하여 생식소내 난경이 400 μm 전후의 난을 가지고 있는 어체를 대상으로 난 성숙 및 배란유도를 하기위해 LhRH 와 HCG을 처리하였다 (Fig. 16).

(1) LhRH

LhRH 처리를 통한 성숙 및 배란 유도는 2002년 5월에 전장 76.33 $\pm$ 5.84 cm 체중 7.56 $\pm$ 1.81 kg인 실험어를 대상으로 하였다. LhRH 처리 농도는 50 $\mu\text{g/kg}$ BW으로 주사하였으며, 주사 2일 경과 후, 그리고 5일 경과 후 각각 인공 채란을 실시하였다. 2일 경과시 7.5 ml의 2~8개의 유구를 가지고 있는 비성숙 난을 채란하였고, 5일 경과 후 1,260 ml 난을 채란하였으나 모두 과숙란이었다. 인공 채란된 난의 난경은 820.7 $\pm$ 16.6 μm 이었다 (Fig. 17, Table 10).

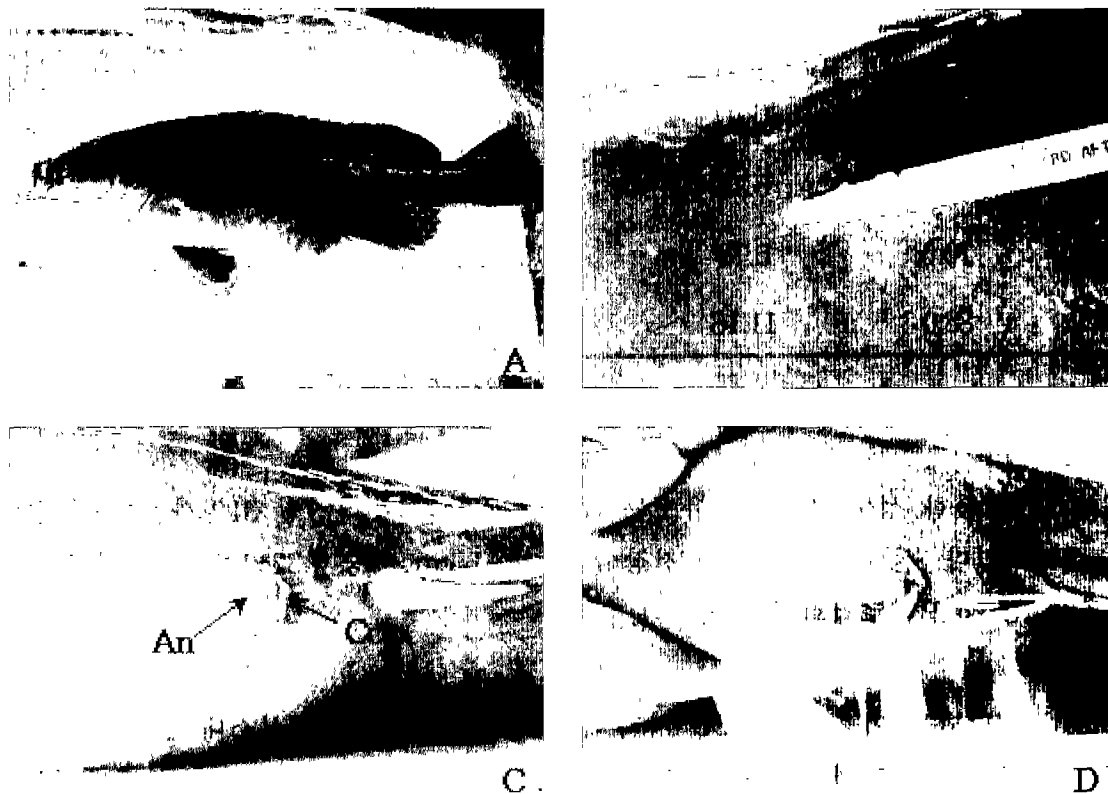


Fig. 16. Hormone injection and artificial stripping of eggs. A: experimental fish, B: hormone injection, C: mature stage of gonad, D: artificial stripping eggs. An: anus, Cop: copulatory organ.

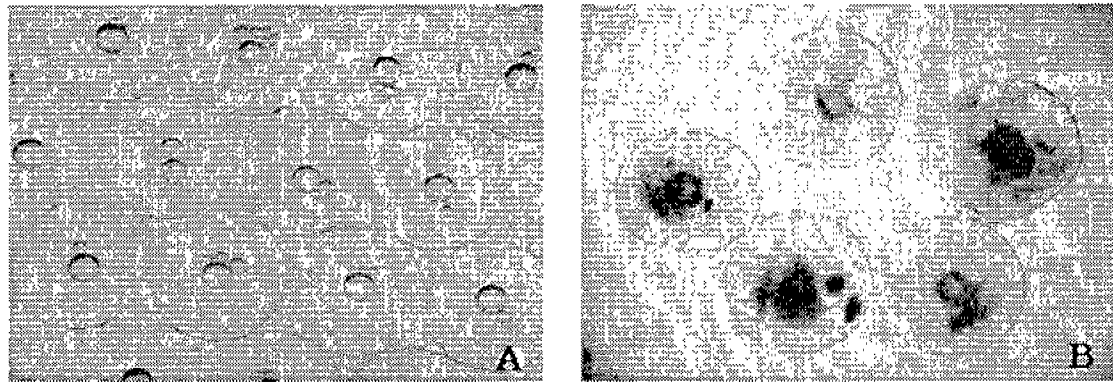


Fig. 17. Egg variation with the passage of time after LhRH hormone injection. A: immature eggs (after the 2 days), B: Over-mature eggs (after the 5 days).

Table 10. Artificial stripping of *E. septemfasciatus* eggs after LhRH hormone injection

Fish	Total length (cm)	Body weight (kg)	Egg diameter (μm)	Number of eggs (ml)	
				After 2 days	After 5 days
1	71.0	5.72	500	0.1	540
2	70.0	5.78	350~530	7.4	720
3	88.0	11.18	320~480	-	-

(2) HCG

HCG 처리를 통한 성숙 및 배란 유도는 2003년 7월 7일부터 7월 31일까지 모두 8마리를 대상으로 실시하였다. 실험어의 크기는 전장 74.25 ± 4.11 cm 체중 7.32 ± 1.21 kg이었다. HCG 처리 농도는 500 IU/kg BW로 1회 주사하였다.

① 난경변화

Cannulation 방법을 이용하여 HCG 처리 후 시간경과에 따른 생식소내 난경변화를 7월 12일과 21일 2회 조사하였다. HCG 처리 전 $300 \sim 500 \mu\text{m}$ ($461.1 \pm 6.6 \mu\text{m}$)인 난 분포가 24시간 경과 후 생식소내 난의 분포는 $300 \sim 700 \mu\text{m}$ ($509.6 \pm 11.8 \mu\text{m}$) 내외의 다양한 분포를 보였다. 그리고 48시간 경과 후 대다수 난의 분포는 $800 \mu\text{m}$ ($837.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$) 내외였다 (Fig. 18, 19).

② 배란유도 및 난

HCG 처리를 통한 성숙 및 배란 유도 대상 실험어 8마리 중 7마리가 배란되어 87.5%가 배란되었고, 배란된 난은 일부 미성숙 난과 과숙란을 제외하고 대부분의 정상적인 난이었다. 배란된 난의 수는 70~710 ml로 총 2,480 ml이었다. 그리고 배란된 난중 부상란은 1,360 ml로 부상율은 54.9%였다 (Fig. 20).

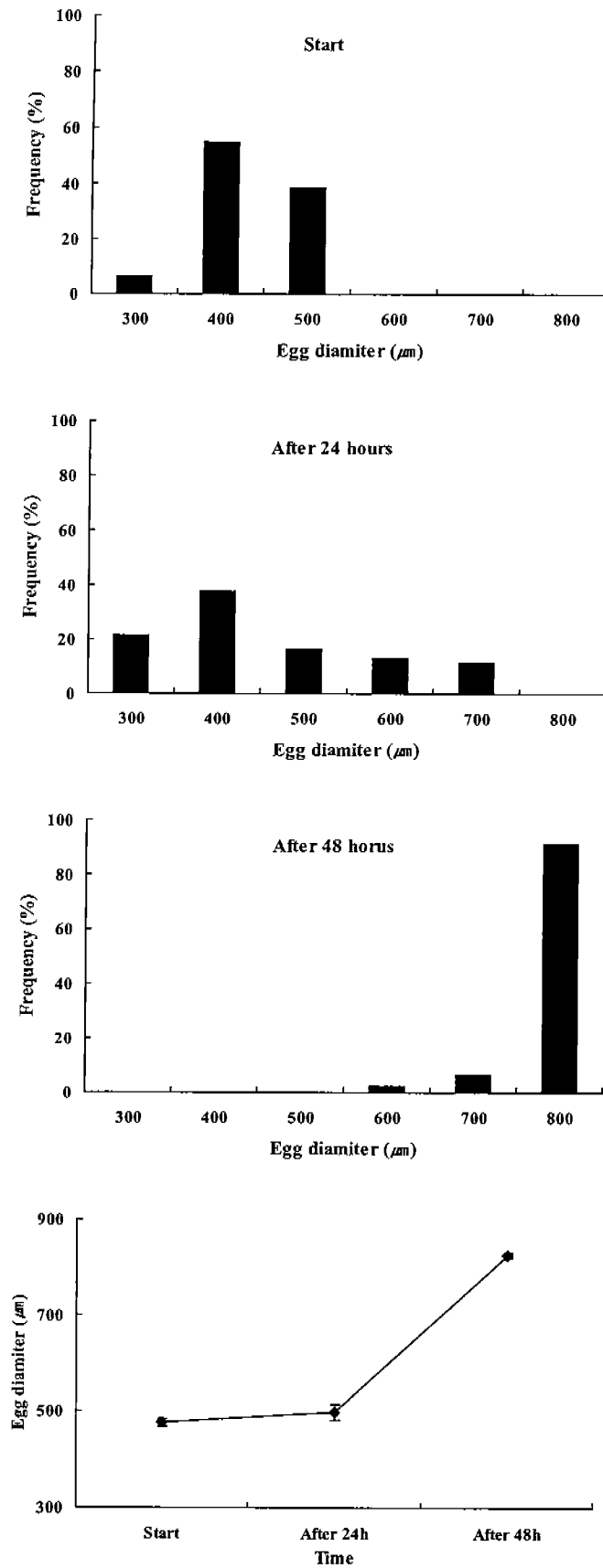


Fig. 18. Change in egg diameter with time after HCG injection on 12 July 2003

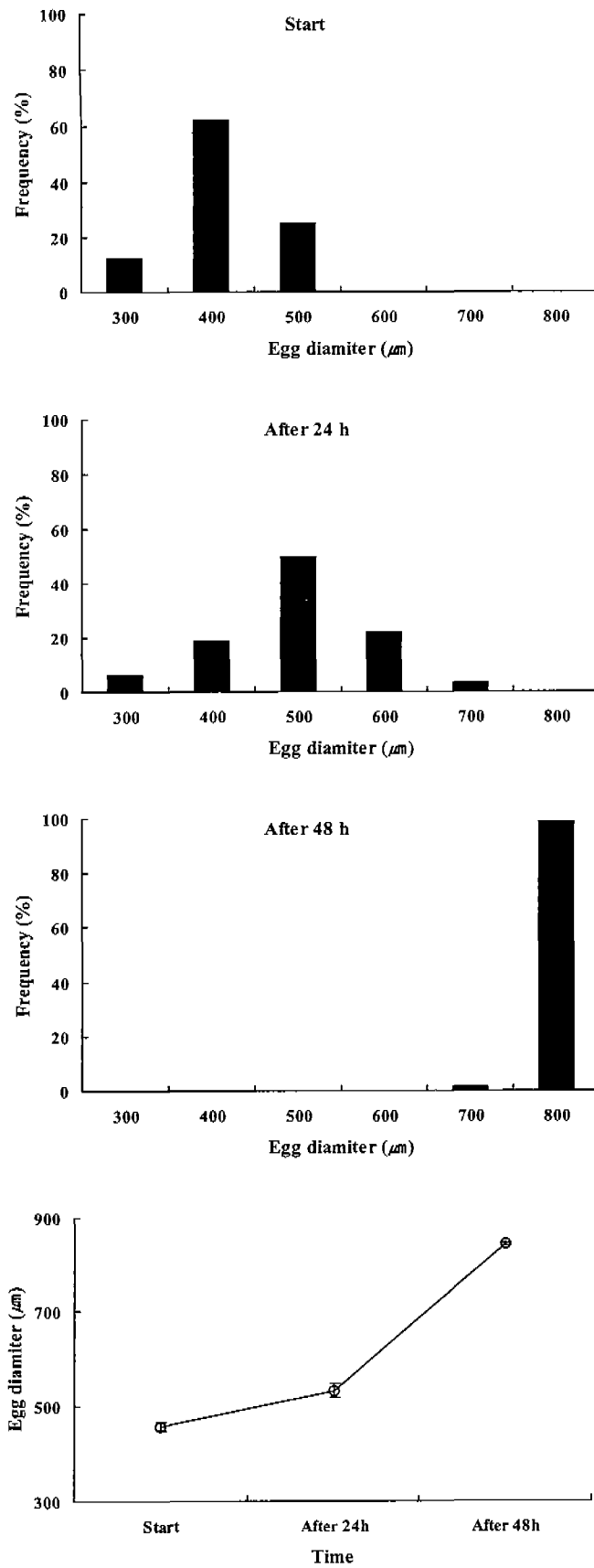


Fig. 19. Change in egg diameter with time after HCG injection on 21 July 2003

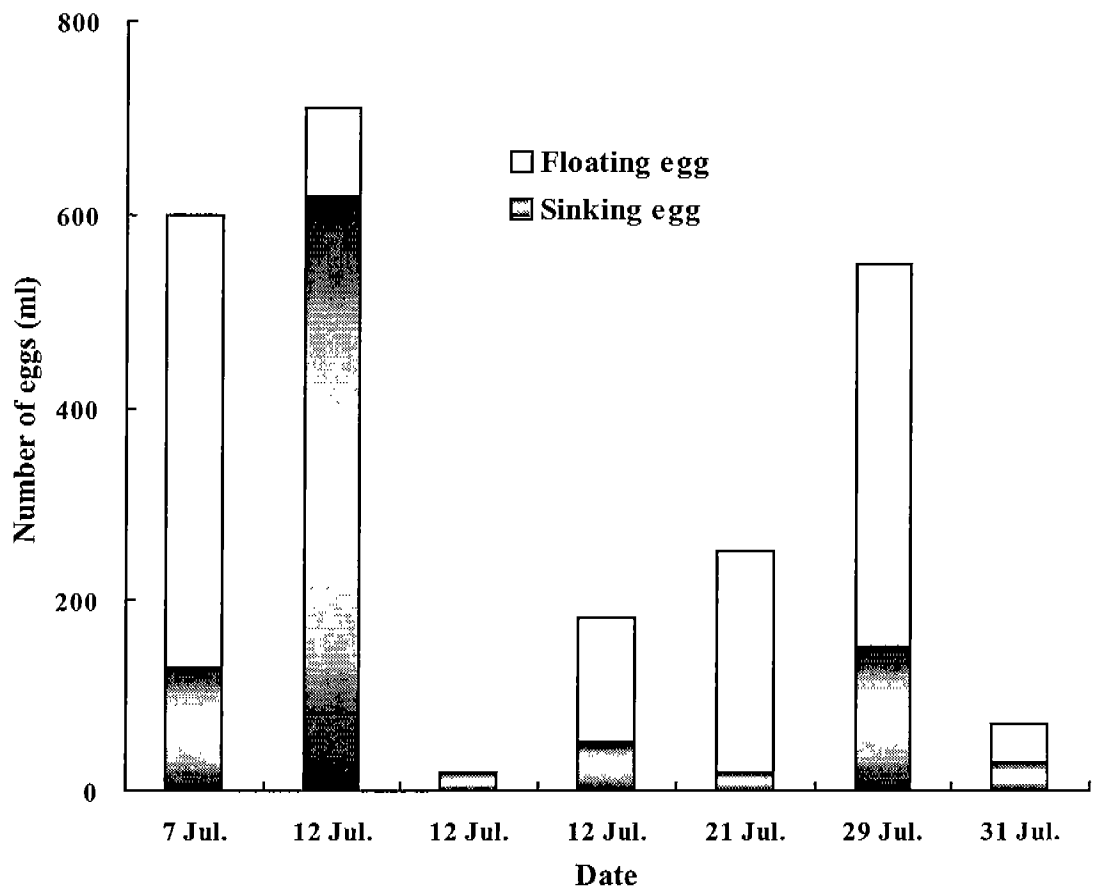


Fig. 20. Effect of HCG treatment on ovulation in a female *E. septemfasciatus* in 2003.

제3절. 기능적 수컷 유도 및 정자 냉동보존

1. MT 처리에 따른 기능적 수컷 유도

능성어의 정자의 확보를 위하여 MT (17 α -methyltestosterone)을 이용한 기능적 수컷을 유도 하기위하여 제주도 연안에서 채집된 미성어를 대상으로 2001년 9월부터 2003년 7월까지 모두 5회 실시 하였다. MT 처리로 웅성화 유도의 정도 파악은 조직학적 관찰 또는 정액산출 유무로 판단하였다.

가. GSI 변화 및 조직학적 관찰

실험 시작시 대조구의 GSI 값은 0.03 ± 0.02 이었고, 종료시 GSI 값은 0.04 ± 0.01 로 변화가 없었다. 그리고 생식소내 세포구성도 유사하였다. 그러나 MT 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg의 처리구에서는 GSI값이 0.06 ± 0.01 , 0.12 ± 0.04 , 0.11 ± 0.03 로 대조구의 GSI 값보다 MT 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 처리구에서 높은 값을 나타내었으며, 생식소내 정자형성 과정이 관찰되었다 (Table 11, Fig. 21, 22).

Table 11. Effects of 17 α -methyltestosterone injection on sex reversal in *E. septemfasciatus*

Experimental group	Weeks after the initiation of treatment	N	TL (cm) (mean $\pm$ s.e)	BW (g) (mean $\pm$ s.e)	GSI (mean $\pm$ s.e)	Sex distribution			spermiation
						F	I	M	
Control	8	3	36.90 $\pm$ 2.57	787.50 $\pm$ 65.82	0.036 $\pm$ 0.009	3	0	0	0
MT 0.5 mg	8	3	38.57 $\pm$ 0.99	871.53 $\pm$ 123.69	0.059 $\pm$ 0.007	0	0	3	0
MT 1.0 mg	8	3	37.50 $\pm$ 1.50	750.50 $\pm$ 98.51	0.119 $\pm$ 0.036	0	0	3	3
MT 2.0 mg	8	3	39.17 $\pm$ 1.74	876.83 $\pm$ 192.39	0.111 $\pm$ 0.033	0	0	3	3

F: Female, I: Intersex, M: Male.

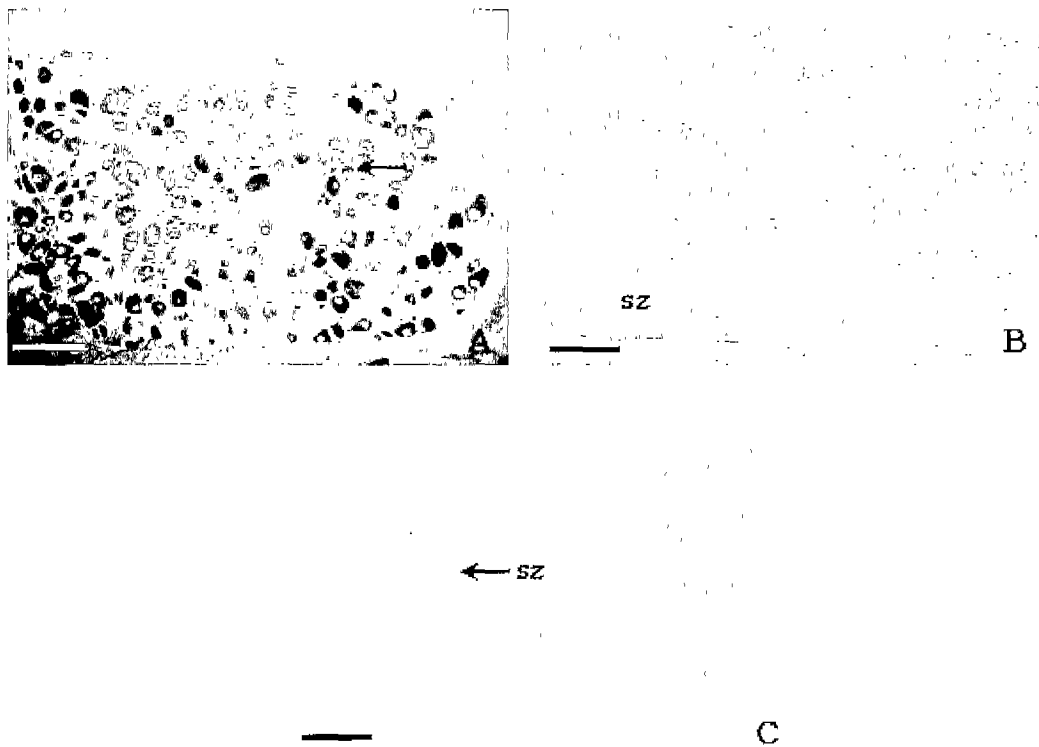
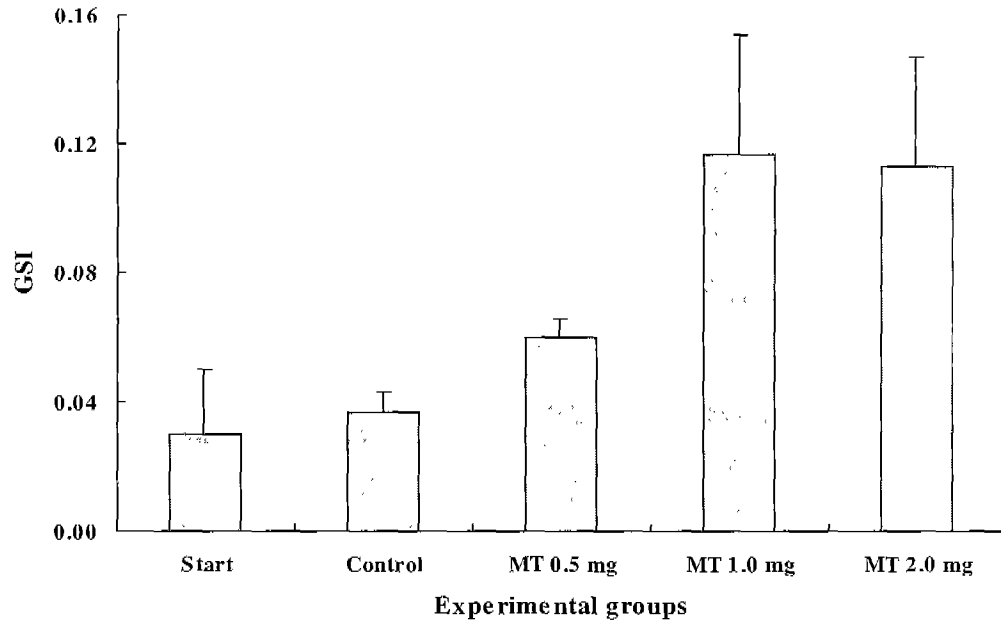


Fig. 21. GSI variation with MT treatment in *E. septemfasciatus*. Vertical bar denotes a standard error of means.

Fig. 22. Sex reversal of the gonad with MT treatment in *E. septemfasciatus*. A: cross section of gonad of control group, B: cross section of sex reversed gonad by MT treatment, C: stripping sperm. po: perinucleolus oocyte, sz: spermatozoa. Scale Bars=100 μ m.

나. 정자 확보

MT 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 근육내 주사 방법을 이용하여 기능적 수컷으로 유도된 개체에서 정자를 채정하였다. 그리고 생식소의 배우자 형성 활성 초기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월)에 MT를 처리한 실험구에서는 8주후부터 운동성을 가진 정자를 채정하였다. 산란시기에 가까운 4~5월에 MT를 처리한 실험구에서는 9~11주후에 정자 채정을 할 수 있었다. 그리고 1월에 silastic capsule을 이용한 MT 2.0 mg/kg 처리구는 MT 1.0 mg/kg 주사 처리구보다 2주 늦은 10주후에 정자 채정이 가능하였다 (Table 12).

Table 12. Induction of functional males and gonadal development with MT treatment

Times	Groups	Periods (Week)	N	TL (cm) (mean±s.e)	BW (g) (mean±s.e)	spermiation
Sep. 2001	Control	10	2	31.5±3.3	659.0±81.0	0
	MT 0.5 mg	10	2	33.5±3.5	729.0±91.0	0
	MT 1.0 mg	10	2	36.8±4.1	876.5±291.5	3
	MT 2.0 mg	10	2	37.0±1.7	811.0±201.0	3
Mar. 2002	Control	8	3	42.2±2.4	1,349.0±250.8	0
	MT 0.5 mg	8	3	39.2±3.3	1,243.6±290.4	0
	MT 1.0 mg	8	4	39.9±3.1	1,441.5±194.0	4
	MT 2.0 mg	8	3	43.0±1.0	1,487.6±140.1	3
Jan. 2003	MT 1.0 mg	8	7	50.9±1.0	2,179.4±110.2	7
	MT 2.0 mg*	10	4	48.4±2.1	1,731.5±245.3	2
Apr. 2003	MT 1.0 mg	9	1	63.0	3,220	1
	MT 2.0 mg	9	3	49.3±3.9	1,940.0±380.7	3
May 2003	MT 2.0 mg	11	4	53.0±5.5	2,470.0±616.7	3

*:It was treated by silastic capsule

2. 혈청 성 스테로이드 hormone의 변화

MT 처리를 통한 기능적 수컷 유도과정에 따른 Testosterone (T)과 11-ketotestosterone (11-KT)의 농도 변화를 조사하였다 (Fig. 23).

T의 혈액내 농도 변화는 대조구에서 0.116~0.073 ng/ml 범위로 실험기간 내내 비교적 변화가 없었으나, MT 처리구에서는 2주후 MT 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 처리구에서 각각 0.152, 0.223, 0.189 ng/ml 으로 대조구보다 높은 값을 나타내었다. 그리고 이후 점차 감소하여 8주후 대조구와 유사한 0.078~0.098 ng/ml 값을 나타내었다.

11-KT의 혈액내 농도변화는 대조구에서 0.029~0.059 ng/ml 범위로 실험기간 내내 비교적 변화가 없었으나, MT 처리구에서는 2주후 MT 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 처리구에서 각각 0.112, 0.232, 0.240 ng/ml로 대조구보다 높은 값을 나타내었다. 그리고 4주후 MT 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 처리구에도 각각 0.133, 0.203, 0.211 ng/ml로 대조구보다 높은 값을 나타내었다. 이후 11-KT의 혈액내 농도는 점차 감소하여 8주후 MT 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg 처리구에서 각각 0.043, 0.070, 0.112 ng/ml로 MT 0.5 mg 처리구에서 대조구보다 높은 값을 나타내었다.

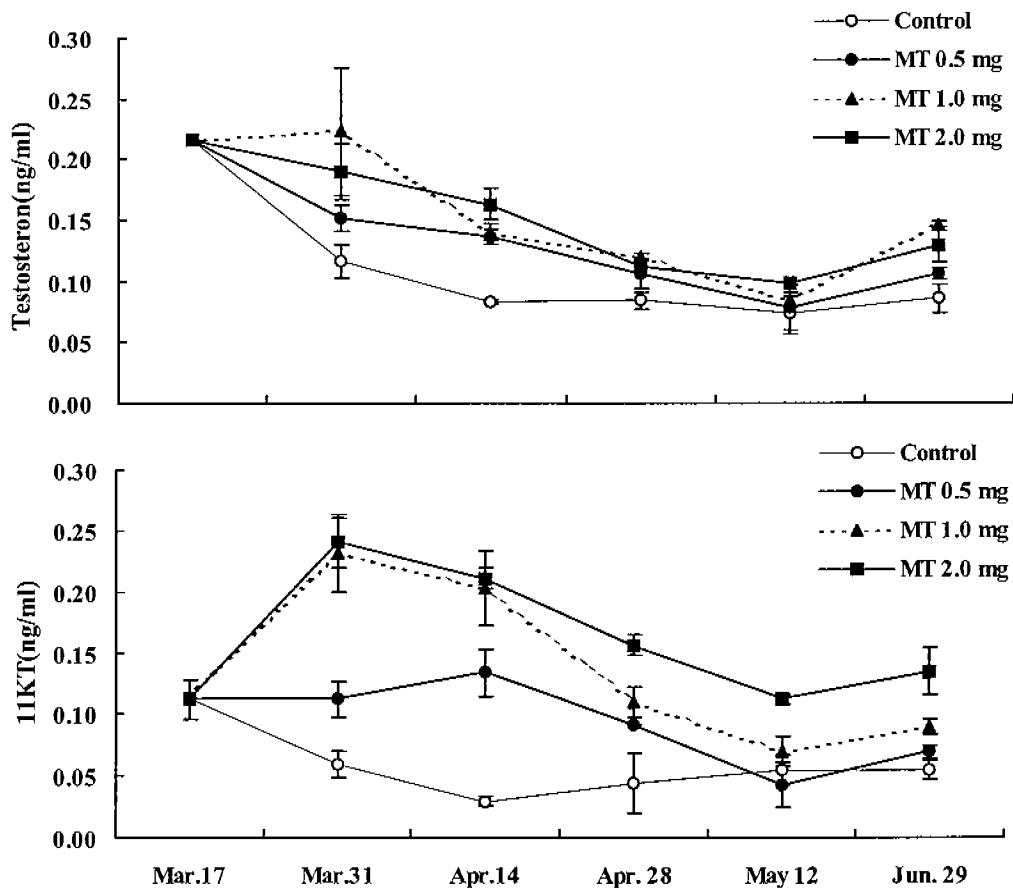


Fig. 23. Change in serum testosterone and 11 KT with MT treatment, as compared to the control group. Vertical bar denotes a standard error of means.

3. 정자 냉동 보존

가. 냉동정자의 특성

회석액과 동해방지제 종류에 따른 정자의 운동성을 대조구 (row semen, 20.42 ± 2.30)와 비교했을 때 GTS (13.68 ± 1.77)와 GDS (14.24 ± 1.84) 실험구가 대조구보다 낮은 값을 나타내었다. 그러나 HTS (7.76 ± 1.00), MTS (6.08 ± 0.78), MDS (3.60 ± 0.46), HDS (7.52 ± 0.77) 실험구보다 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$, Fig. 24).

냉동정자의 운동성은 GDS 실험구에서 해동 후 운동성이 활발하기 시작하여 20~30분 사이에 가장 활발하게 운동하였으며, 이후 점차 감소하였다. 그리고 GTS 실험구의 경우 해동 정자의 운동성은 서서히 증가하기 시작하여 해동 후 60분 전후로 가장 활발한 운동성을 보였다. 그러나 나머지 실험구에서도 대부분 운동성은 해동 후 20~30분 사이에 가장 활발한 운동성을 보였으나 GTS와 GDS 실험구보다 운동성은 낮았다 (Fig. 25).

나. 냉동정자에 따른 수정률 및 부화율

냉동 보존된 정자에 의한 수정률 및 부화율은 대조구 (row semen)와 GDS, PDS 실험구를 대상으로 조사하였다.

냉동정자에 따른 수정률은 GDS ($97.66 \pm 1.22\%$) 실험구에서 대조구 ($94.85 \pm 2.02\%$)와 PDS ($93.93 \pm 1.77\%$)보다 높은 값을 나타내었다 ($P > 0.05$, Fig. 26). 그리고 부화율은 대조구에서 $97.33 \pm 1.45\%$ 로 가장 높은 수정률을 나타냈으며 GDS 와 PDS 실험구에서 각각 97.00 ± 0.89 와 94.00 ± 1.32 를 나타내었다. 대조구와 실험구간에 유의차는 없었다 ($P > 0.05$, Fig. 27).

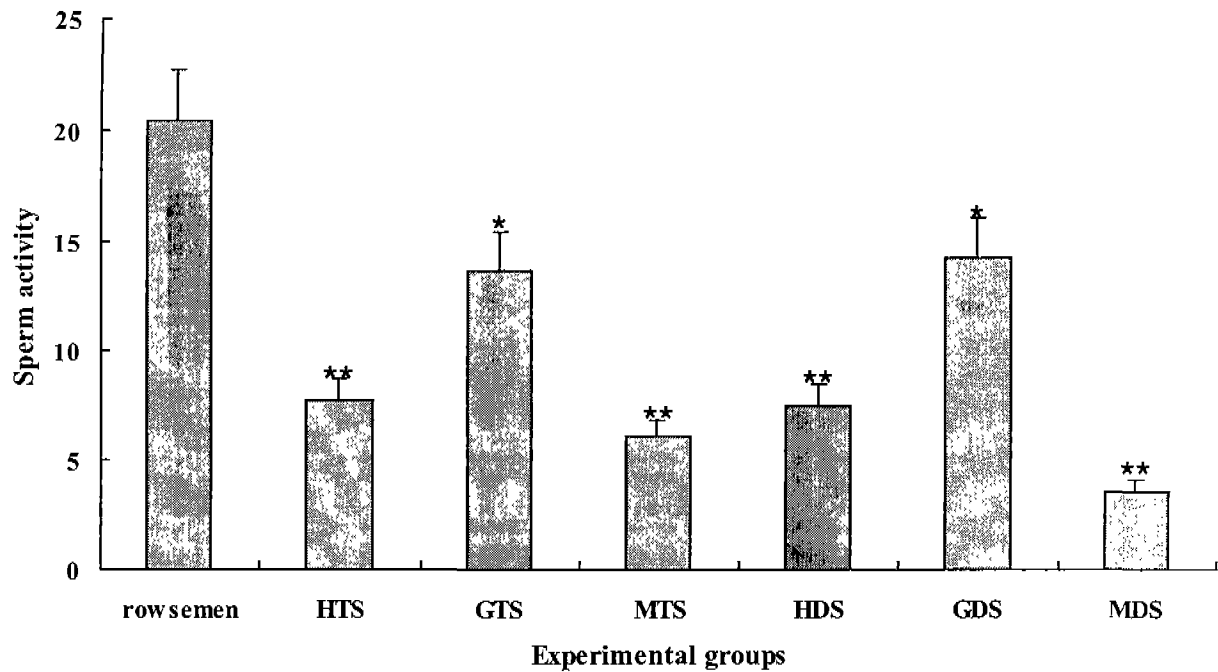


Fig. 24. Variation in sperm activity of *E. septemfasciatus* in different diluents and cryoprotectants. Vertical bar denotes a standard error of means. Asterisks indicate significant different at $P < 0.05$.

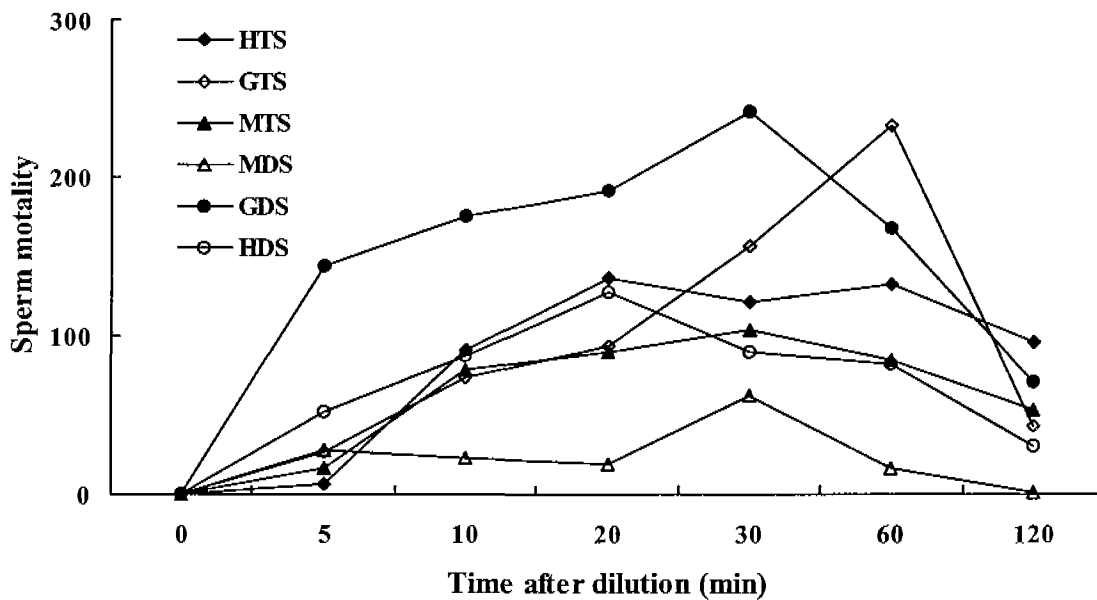


Fig. 25. Variation in sperm activity of *E. septemfasciatus* with time after dilution in seawater.

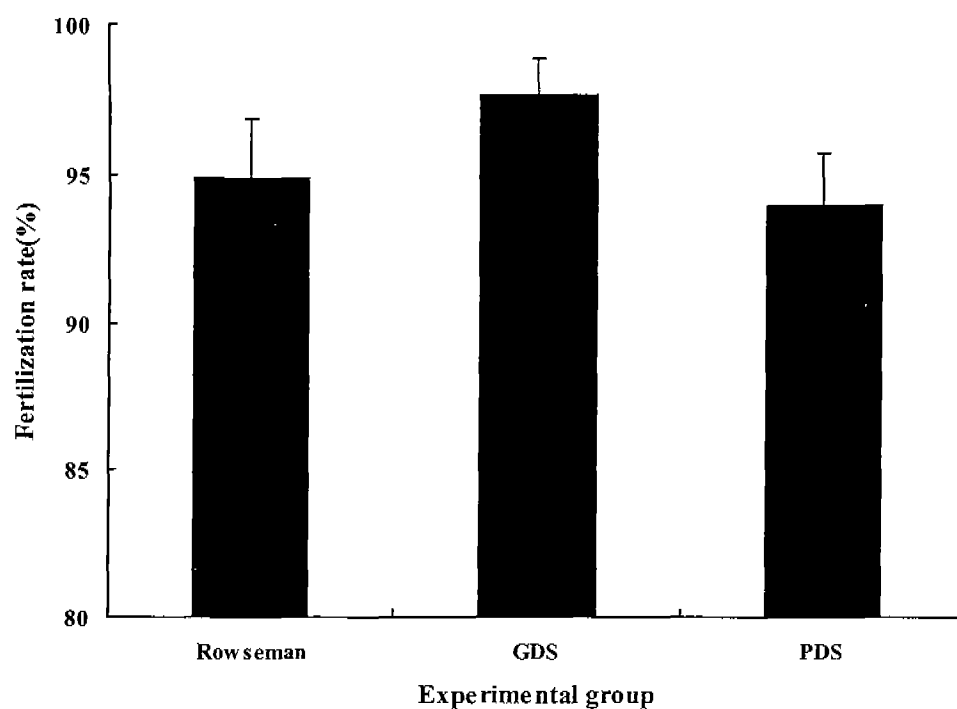


Fig. 26. Effect of different diluents on the fertilization rate of *E. septemfasciatus*. Vertical bar denotes a standard error of means.

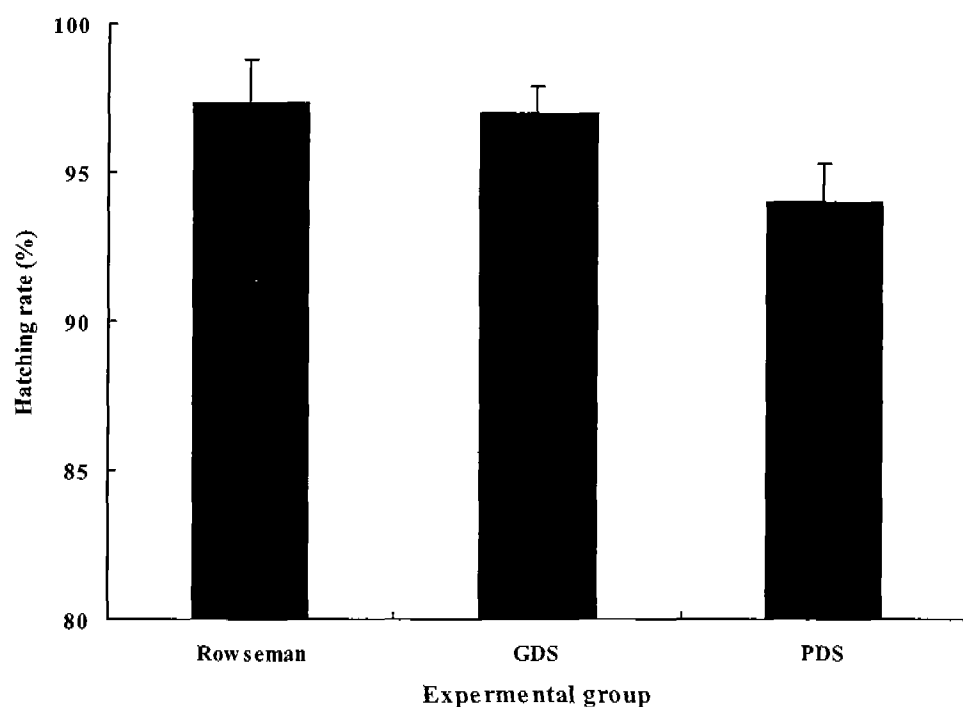


Fig. 27. Effect of different diluents on the hatching rate of *E. septemfasciatus*. Vertical bar denotes a standard error of means.

제4절. 난 및 자·치어 발달

능성어 수정란의 특성 및 자·치어 생태 및 형태발달에 관한 연구를 수행하였다.

1. 난 발생

능성어의 수정란은 무색투명한 구형으로 분리부성란이다. 난경은 $790\sim 890\ \mu\text{m}$ (평균 $821.8\pm 2.0\ \mu\text{m}$)이었고, 유구는 $170\sim 230\ \mu\text{m}$ (평균 $192.9\pm 0.9\ \mu\text{m}$)이었다 (Fig. 28).

능성어의 난 발생 과정에 소요시간 (Table 13)과 발생과정 (Fig. 29)을 조사하였다. 알은 수온 22°C 에서 수정 후 좁은 위란강 (perivitelline space)이 생기면서 배반 (blastodisc)이 형성되었다 (Fig. 29A). 수정 후 1시간 만에 배반이 동·식물극을 축으로 둘로 나누어지는 제 1난할이 시작되어 2세포기에 이르렀다 (Fig. 29B). 제 2난할은 제 1난할이 완료된 후 약 1시간 경과 후 4세포기에 이르렀고 (Fig. 29C), 1시간 30분 후에 8세포기 (Fig. 29D), 2시간 30분 후에 32세포기에 이르렀다 (Fig. 29E).

난할이 계속 진행되면서 할구의 크기가 점점 작아지고, 수정 후 5시간에 상실기로 되었다 (Fig. 29F). 수정 후 12시간이 경과 되었을 때 포배기에 이르면서 배반엽 (blastoderm)이 융기되기 시작했다 (Fig. 29G). 그후 차츰 배반엽이 넓어지면서 난황을 덮기 시작하였다. 수정 후 16시간이 경과되었을 때 배반은 차츰 난황을 덮어씌우면서 배환 (germ ring)이 형성되면서 낭배기에 접어들었다 (Fig. 29H). 수정 후 23시간이 경과되었을 때 원구가 합입되고, 서서히 배순 (embryonic shield)이 형성되었다 (Fig. 29I).

수정 후 27시간이 지나면서 두부가 발달하면서 안포가 형성되었고, 7~9개의 근절이 형성되었다. 이때 Kuffer's vesicle이 배체의 뒤쪽 부분에서 관찰되었다 (Fig. 29J, K). 수정 후 29~31시간이 경과 후 Kuffer's vesicle이 소멸되고, 이때 근절수는 11~12개에 이르렀다 (Fig. 29L).

수정 후 37시간 만에 눈에 lens가 생기고 안포 뒤쪽에 이포가 형성되었으며, 이때 근절 수는 17~20개였다 (Fig. 29M). 수정 후 44시간이 경과하였을 때 배체의 움직임이 시작되면서 가끔 심장박동이 관찰되었다 (Fig. 29N). 수정 후 46시간 후에 일부 부화가 시작되었다 (Fig. 29O).

그리고 수온에 따른 영향을 조사한 실험에서, 수온별 각 발생단계에 도달하는 시간은 22°C 에서 상실기까지 소요된 시간은 평균 5시간인 반면 25°C 에서는 평균 4.5 시간이었다. 포배기까지의 발생은 22°C 에서 12시간, 25°C 에서는 10.5시간이 소요되었다. 그리고 배체형성 시기까지의 소요 시간은 22°C 에서 23시간, 25°C 에서는 17시간이었다. 또한 부화시기까지의 평균 소요시간은 22°C 일 때 46시간, 25°C 일 때 35시간으로 수온이 높을수록 발생단계별 소요시간이 짧아지는 경향이었다 (Table 14).

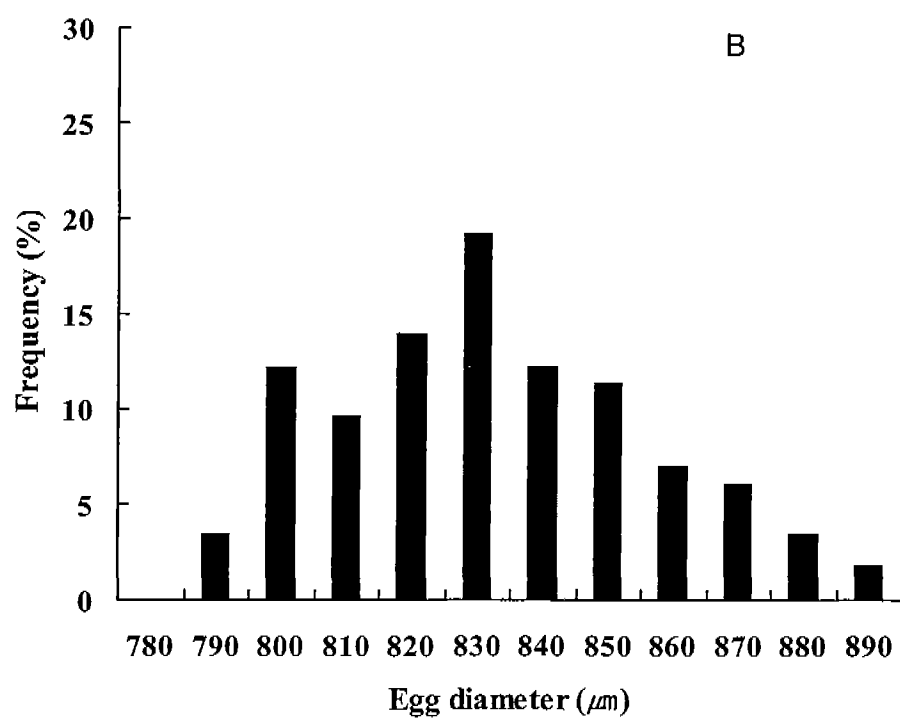
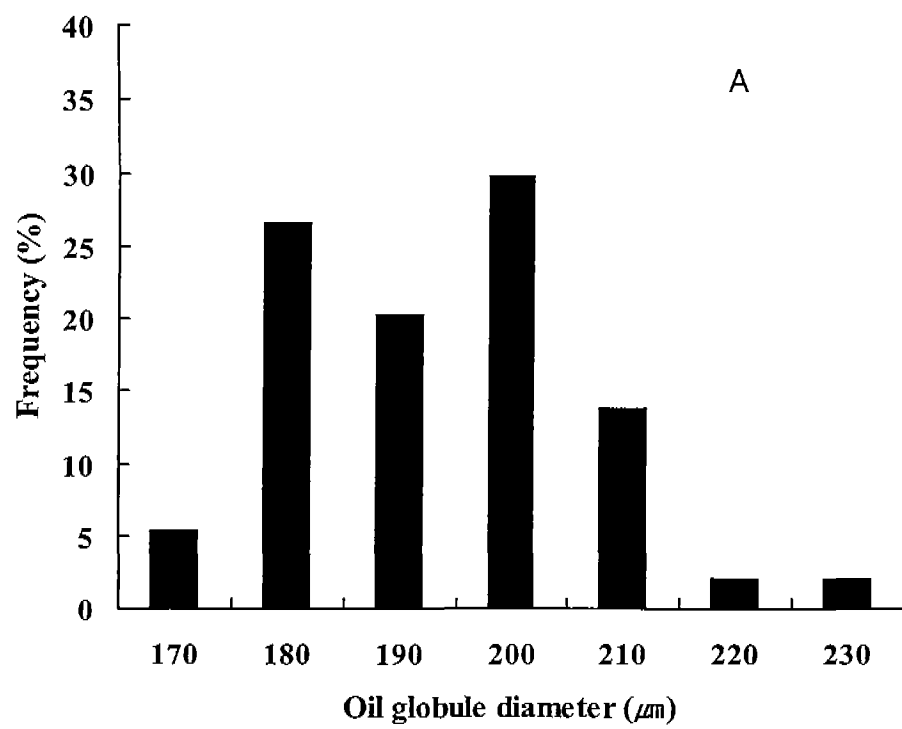


Fig. 28. Frequency of oil globule (A) and egg (B) diameter of *E. septemfasciatus*

Table 13. Stages and time of egg development in *E. septemfasciatus*

Developmental stage	Symbols in Fig. 29	Time after fertilization	Features of eggs and embryos
Fertilized egg	A	0 h	
2 cell stage	B	1 h	
4 cell stage	C	1 h	
8 cell stage	D	1 h 30 min	
32 cell stage	E	2 h 30 min	
Morula stage	F	5 h	
Early blastula stage	G	12 h	
Later blastula stage	H	16 h 30 min	
Gastrula stage	I	23 h	blastopore depression
Early embryo formation	J, K	27 h	Kuffer's vesicle appearance 7~9 myotomes stage
Myotomes formation stage	L	29~31 h	Kuffer's vesicle disappearance 11~12 myotomes stage
Lens and ear formation stage	M	37 h	17~20 myotomes stage
Heart beat stage	N	44 h	
Hatched larval stage	O	46 h	

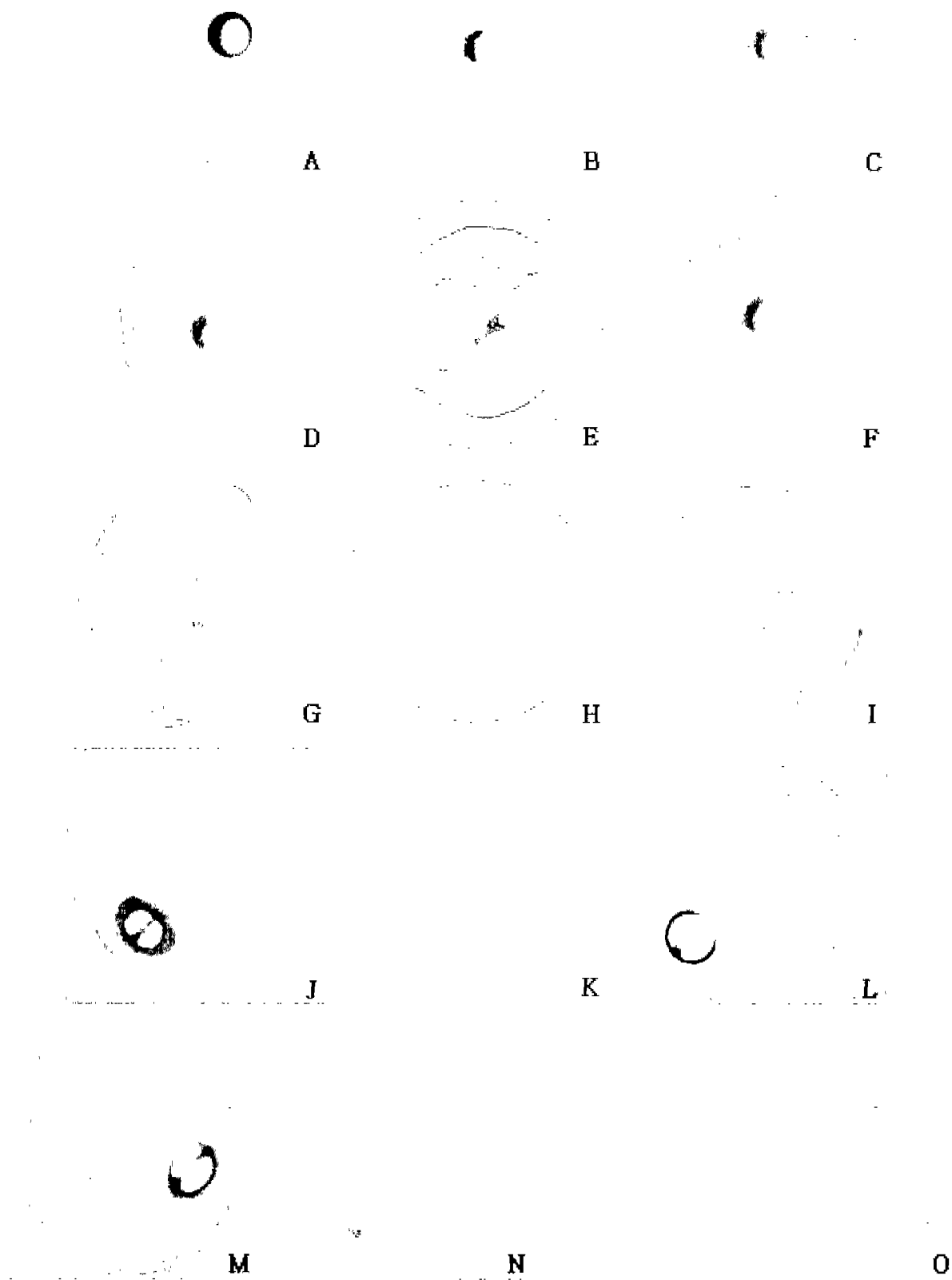


Fig. 29. Embryonic development of *E. septemfasciatus*.

Table 14. Relationship between water temperature and time (hour) required to reach each development stages after fertilization in *E. septemfasciatus*

Developmental stage	Water temperature (°C)	
	22°C	25°C
Morula stage	5.0 h	4.5 h
Blastula stage	12.0 h	10.5 h
Gastrula stage	16.5 h	14.0 h
Embryo formation	23.0 h	17.0 h
Hatching	46.0 h	35.0 h

2. 부화율

인공채란한 난과 기능적 수컷에서 얻은 정자를 이용하여 수정시킨 능성어 난의 수정률과 부화율의 변화는 Fig. 30에 나타내었다. 인공수정 방법을 이용 했을 때, 수정률은 56.2~94.9% 범위였으며, 이 수정란의 부화율은 70.0~97.7% 범위였다.

그리고 수온과 염분에 따른 수정란의 부화율에 미치는 영향을 조사하였다. 수온 22°C와 25°C 조건에서 정상해수와 26‰, 18‰의 염분에 따른 수정란의 부화 시간은 정상해수와 26‰, 18‰ 실험구에서 차이가 없었다. 그러나 부화율은 22°C조건에서 정상해수에서 100%로 26‰와 18‰의 89.3±1.8%와 64.0±6.4%로 정상해수와 26‰, 18‰의 저염분 실험구와는 유의차가 있었다 ($P<0.05$). 그리고 25°C 조건에서 부화율은 정상해수에서 99.3±0.7%로 26‰와 18‰의 98.7±0.7%와 89.3±3.7%로 정상해수와 26‰ 실험구에는 유의차가 없었으나, 18‰의 저염분 실험구와는 유의차가 있었다 ($P<0.05$, Fig. 31).

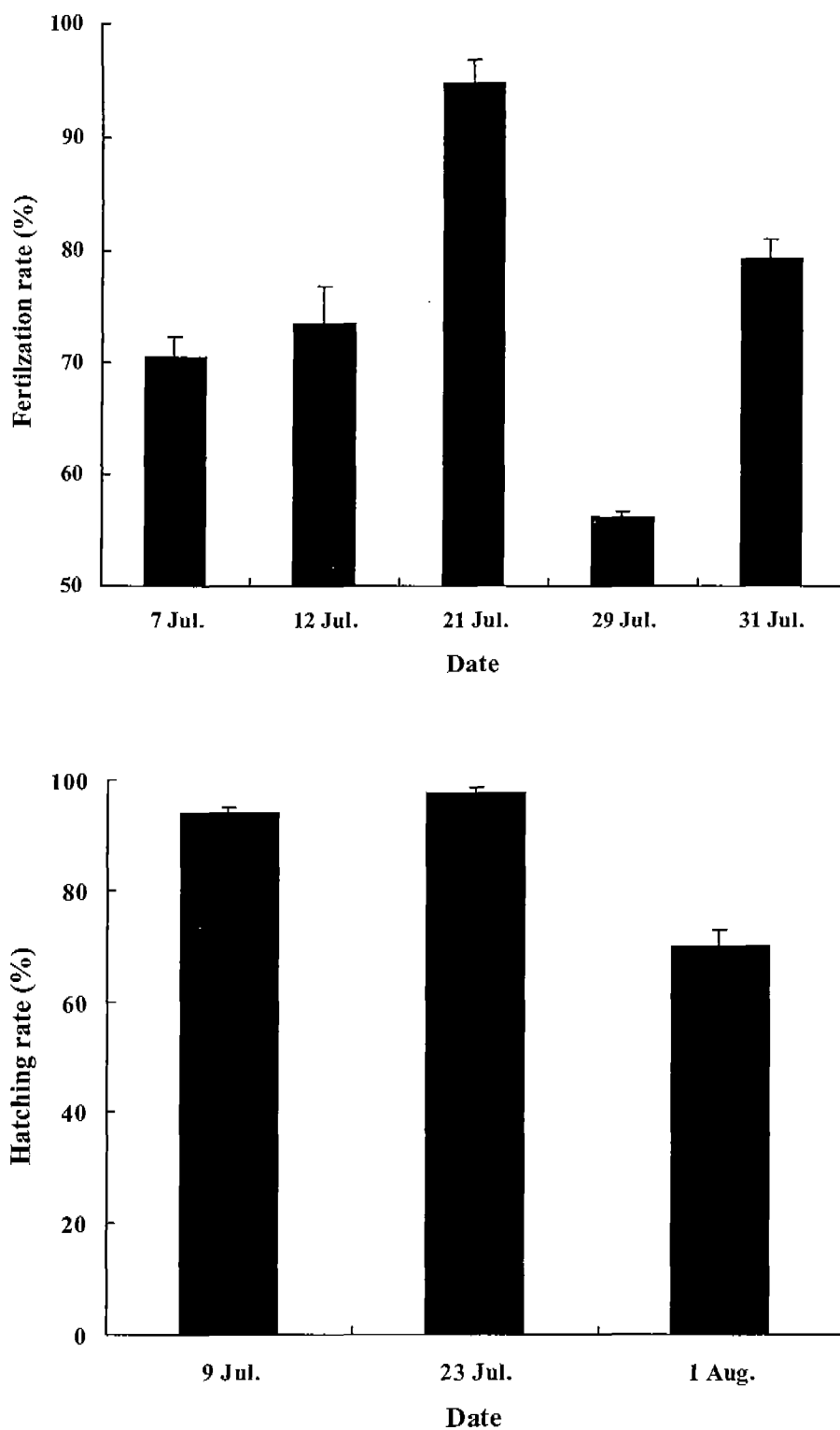


Fig. 30. Fertilization and hatching rate of the floating eggs in *E. septemfasciatus* using artificial ovulation methods in 2003. Vertical bar denotes a standard error of means.

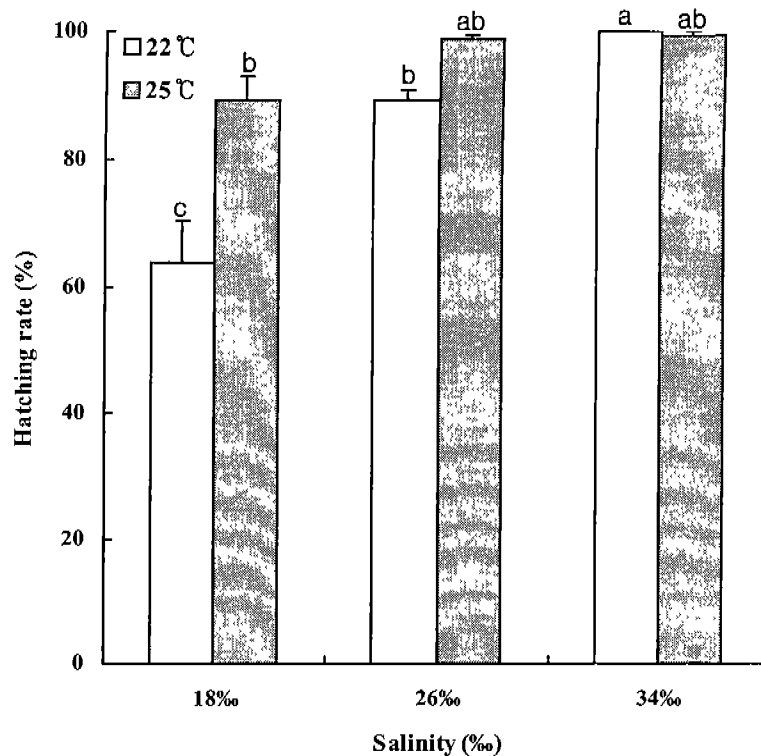


Fig. 31. Hatching rates of *E. septemfasciatus* eggs at different water temperatures and salinities. Vertical bar denotes a standard error of means. Different superscripts on the bars are significantly different ($P<0.05$).

3. 자·치어의 형태발달과 성장 단계

가. 난황흡수 및 개구시간

농성어 자어의 수온별 난황 흡수 시간을 조사하기 위해 수온 22°C와 25°C 실험구로 설정하여 경과시간에 따른 부화 자어의 난황, 유구 흡수율 변화는 Fig. 32와 같다. 난황흡수율의 경우, 부화 직후 자어의 난황 용적 비율이 $0.244 \pm 0.020 \text{ m}^3$ (100%)에서 부화 후 25°C조건에서 24시간 경과시 16.46%였고, 48시간째는 2.14%로 부화 후 48시간 이내에 난황이 흡수 되었다. 그러나 22°C 조건에서 24시간 경과시 67.28%였고, 48시간째는 11.84%, 72시간째는 6.90%로 부화 후 72시간까지도 일부 난황이 존재하였다.

유구 흡수율의 경우, 부화 직후 자어의 유구 용적 비율이 $0.0034 \pm 0.0002 \text{ m}^3$ (100%)에서 부화 후 25°C 조건에서 24시간 경과시 65.98%였고, 48시간째는 19.65%, 96시간째 0.92%로 부화 후 48~72시간 이내에 유구가 급격히 흡수 되었다. 그러나 22°C조건에서 24시간 경과시 70.47%였고, 48시간째는 59.79%, 96시간째는 31.83%로 서서히 흡수된 후, 120시간째 7.85%로 급격히 흡수되었다.

부화 후 개구시까지 소요된 시간은 25°C 조건에서 난황이 거의 흡수하는 부화후 3일째, 22°C에서는 부화 후 4일째 개구가 되기 시작하였다.

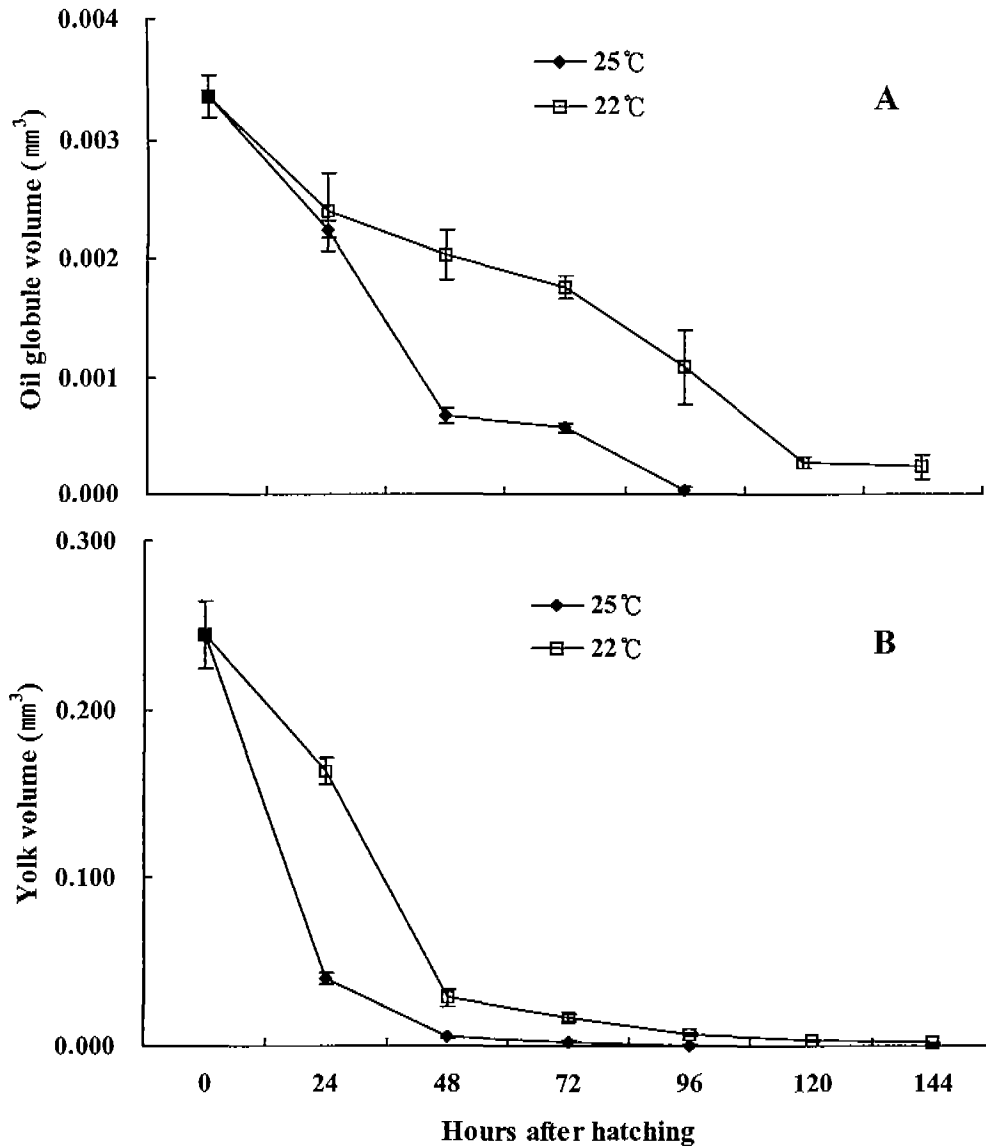


Fig. 32. Absorptions rate of the oil globule (A) and yolk (B) volume in *E. septemfasciatus* larvae reared at different water temperatures. Vertical bar denotes a standard error of means.

나. 부화자어의 전장과 입 크기 변화

부화자어의 입 크기 및 전장의 변화는 Table 15와 같다. 부화 후 첫 개구시 자어의 상악장 크기는 0.148 ± 0.009 mm로 부화후 4일째 0.169 ± 0.006 mm로 점차 증가하여 부화후 11일째 0.230 ± 0.005 mm에 이르렀다. 입 크기는 Shirota (1970)의 방법에 따라 자어의 개구각 90° , 45° , 0° 를 각각 100, 50, 0%의 개구율로 가정할 때 개구율이 75%, 50%일 때의 입 크기를 각각 0.75d, 0.5d로 구하였다. 먹이를 섭취하기 시작하는 부화 후 3일째부터 11일까지 자어의 입 크기 d는 0.209~0.325 mm, 0.75d는 0.157~0.244 mm, 0.5d는 0.105~0.162 mm이었다. 이 기간동안 자어의 전장 크기 변화는 부화후 4일째부터 점차 증가하여 상악장의 크기 변화와 유사하였다.

Table 15. Variation in the mouth length of *E. septemfasciatus* larvae during the early larval periods

Day after hatching	Total length (mm±s.e)	Upper jaw length (mm±s.e)	Calculated mouth length		
			d*	0.75d	0.5d
2	2.55±0.03				
3	2.48±0.04	0.148±0.009	0.209	0.157	0.105
4	2.72±0.06	0.169±0.006	0.238	0.179	0.119
5	2.75±0.05	0.180±0.002	0.255	0.191	0.127
6	2.78±0.03	0.195±0.004	0.275	0.207	0.138
7	2.62±0.04	0.205±0.017	0.290	0.218	0.145
9	2.94±0.04	0.209±0.005	0.295	0.221	0.148
11	3.24±0.12	0.230±0.005	0.325	0.244	0.162

* $\sqrt{2} \times$ Upper jaw length

다. 자어의 형태 발달

(1) 부화 0~1일: 전장 1.75~2.40 mm로 유구는 난황이 끝부분, 항문은 몸체 중앙보다 뒤에 위치하였다. 꼬리부분 중앙의 등과 복부면에 흑색소포가 있었다. 막지느러미를 가지는 몸측전면은 포상의 과립으로 덮혀있다. 부화자어는 대부분 수표면에 분산하여 유영하고, 머리를 아래쪽으로 향하고 정지상태를 유지하다가 순간적으로 빠르게 유영하는 행동을 보였다 (Fig. 33A).

(2) 부화 2~3일: 전장 2.46~2.55 mm로 난황과 유구가 남아있고, 일부 부화 3일째부터 개구되기 시작하였다. 두부 골격 형성이 뚜렷하게 관찰되고, 가슴지느러미 원기가 발현하였다. 자어는 대부분 수조 저면으로 이동하였다 (Fig. 33B).

(3) 부화 4~5일째: 전장 2.55~2.72 mm로 난황과 유구가 완전하게 흡수되었다. 입이 개구되고, 항문이 열렸으며, 안구에 흑색 색소포가 침적되었다. 등지느러미와 꼬리지느러미는 미분화되었으나, 가슴지느러미는 발달하기 시작하였다. 흑색소포는 소화관 위쪽으로 보다 농밀하게 산재하고 있었으며, 근절을 따라 복부쪽으로도 산재되어 있었다. 자어들은 수표면으로 이동하여 활발한 섭식 행동을 보였으며, 일부 개체에서 rotifer를 섭이한 개체가 관찰되었다 (Fig. 33C).

(4) 부화 7~10일째: 전장 2.62~2.94 mm로 막지느러미가 소실되고 등지느러미와 꼬리지느러미 그리고 가슴지느러미가 분화되었으며 소화관이 분화발달 하였다. 복강 위 벽을 따라서 흑색소포가 더욱 많이 침착되어 있으며, 근절을 따라 막지느러미 부분에 색소포 침착부위가 증가하였다 (Fig. 33D).

(5) 부화 17~23일: 전장 4.15~5.12 mm로 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 출현, 신장하였고, 두부 골격 형성이 뚜렷하였다. 목강부위의 흑색소충이 발달하였다. 그리고 꼬리지느러미가 분화 발달하기 시작하였다 (Fig. 33E).

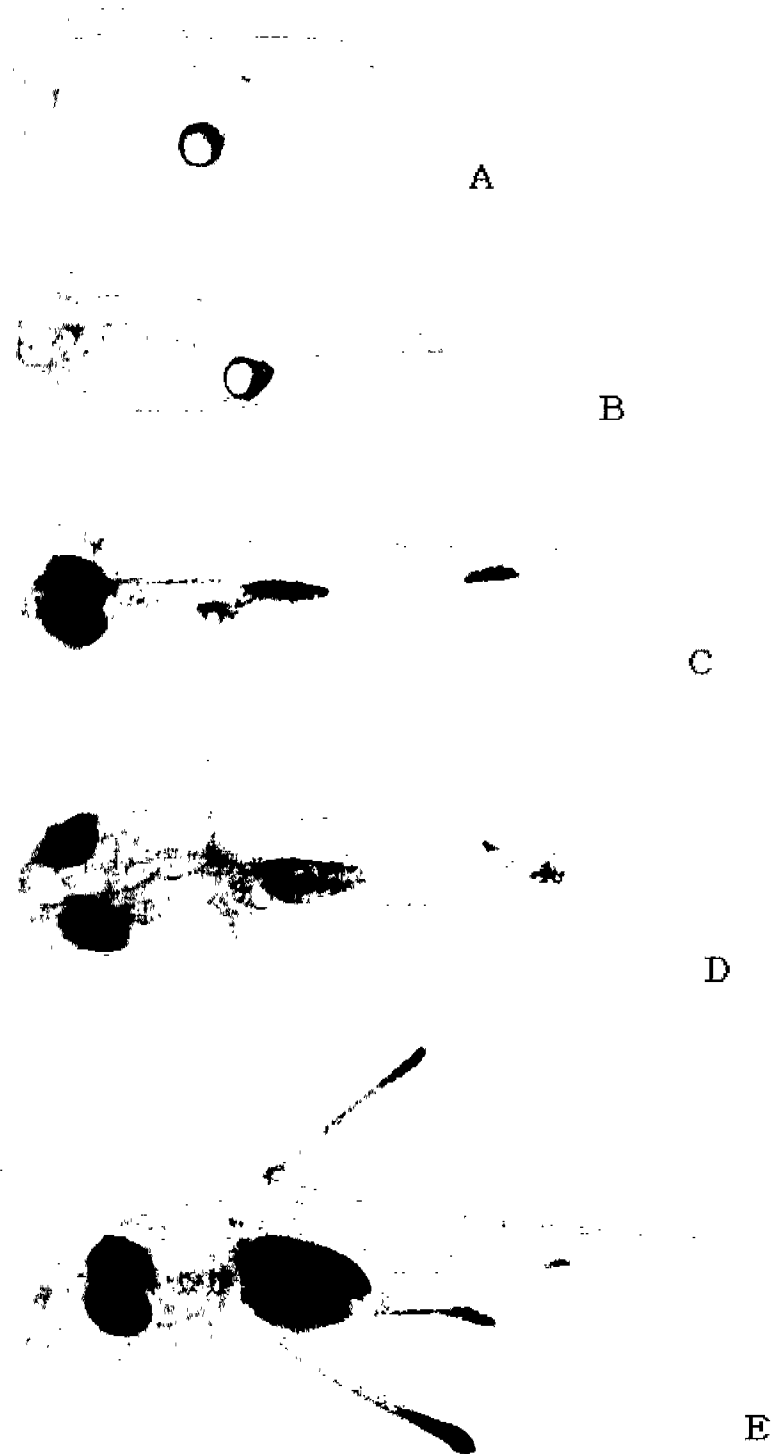


Fig. 33. Larval development of *E. septemfasciatus* for 30 days. A: newly hatched larva, 1.75 mm TL, B: postlarvae, 2 DAH, 2.46 mm TL, C: 4 DAH, 2.72 mm TL, D: 9 DAH, 2.94 mm TL, E: 24 DAH, 5.12 mm TL.

라. 자어 성장

22℃와 25℃의 수온에 따른 자어의 성장과 항문장의 변화를 조사하였다. 자어 전장의 변화는 부화 직후 1.75 mm에서 부화 3일까지는 전장의 큰 변화는 없었으며, 개구후 먹이를 섭이하기 시작하는 부화후 4일째부터 25℃ 조건에서 점차 성장이 빨라졌다. 그리고 변태를 시작하는 부화 후 11일째 (전장 3.24 mm)부터 빠른 성장을 보였으며, 부화후 24일에는 5.12 mm까지 성장하였다. 항문장의 변화도 전장의 변화와 유사한 경향을 보였다 (Fig. 34).

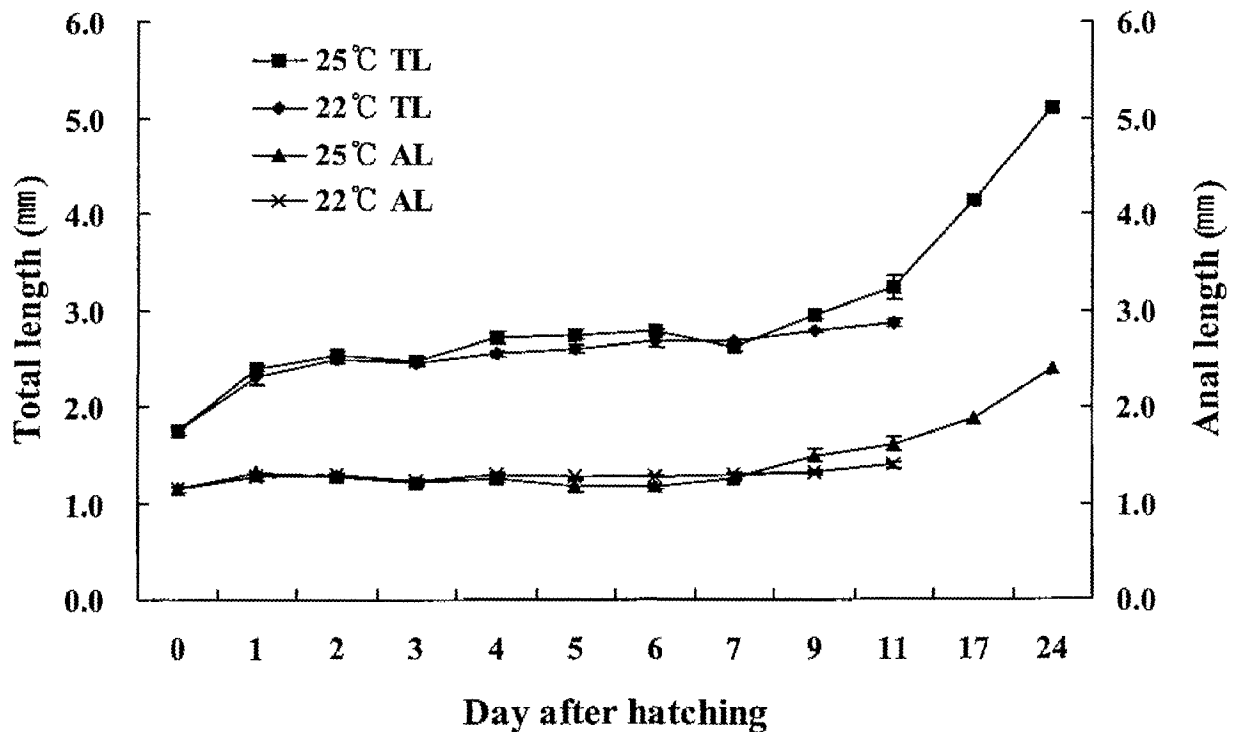


Fig. 34. Growth in total length and anal length of *E. septemfasciatus* larvae at different water temperatures. Vertical bar denotes a standard error of means.

제5절. 먹이계열 개발 및 대량 종묘 생산

1. 먹이계열 개발

가. 개체군 성장

수온과 염분별 개체군의 성장을 조사한 결과는 Fig. 35와 같다. Thai-strain rotifer는 접종 후 5~6일째 peak에 달했으며, 그 후 성장속도가 급격히 떨어지는 경향을 보였다. 수온 28℃ 실험구에 있어서는 15‰ 실험구가 다른 실험구에 비해 현저히 높은 성장량을 보였으며 ($P<0.05$), 33‰의 실험구가 가장 낮은 성장 속도를 보였다 ($P<0.05$). 다른 실험구간에는 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. 수온 32℃ 실험구에서도 33‰ 실험구가 가장 낮은 성장속도를 보였으며 ($P<0.05$), 나머지 실험구들 간에는 뚜렷한 경향을 보이지는 않았다. 28℃와 32℃ 수온 조건 개체군 성장에 있어서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

나. 개체크기 분포

수온과 염분농도별 조건에서 30일간 연속계대배양을 한 개체군내 rotifer 개체의 배갑장 크기 분포를 조사하였다.

배갑장 120 μm 미만의 분포는 28℃와 32℃ 실험구 모두 15‰와 25‰ 실험구가 다른 실험구에 비해 현저히 높았으며, 섭이초기에 공급할 수 있는 배갑장 150 μm 미만의 분포도 같은 양상을 보였다. 반면, 33‰ 실험구에서가 가장 낮은 분포를 보였다 (Fig. 36).

Table 16은 Fig. 36의 도수분포를 계급별로 누적 퍼센트로 나타낸 것이다. 이 실험의 결과 첫 섭이시기에 선택적 섭이를 보이는 크기인 120 μm 미만의 누적분포비율은 13.63~23.64% (32℃, 25‰ 가장 높았음)의 범위였으나, 5‰와 33‰에서는 2.73~6.54%에 지나지 않았다. 초기 먹이공급 가능한 크기인 150 μm 미만이 차지하는 누적분포비율은 15‰와 25‰에서 46.30~64.55%로 아주 높은 분포비율을 보인 반면, 33‰에서는 20%였다.

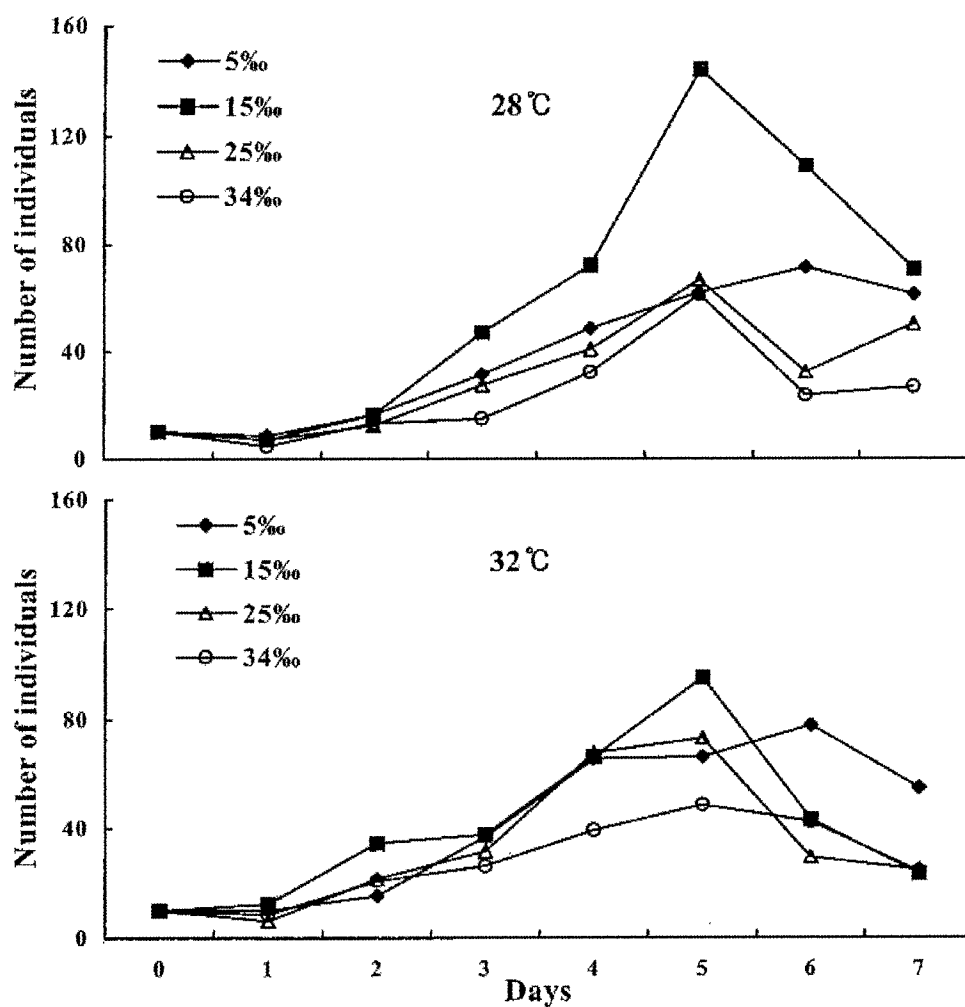


Fig. 35. The population growth curves of the Thai-strain rotifer, *B. rotundiformis*, cultured at various water temperatures and salinities.

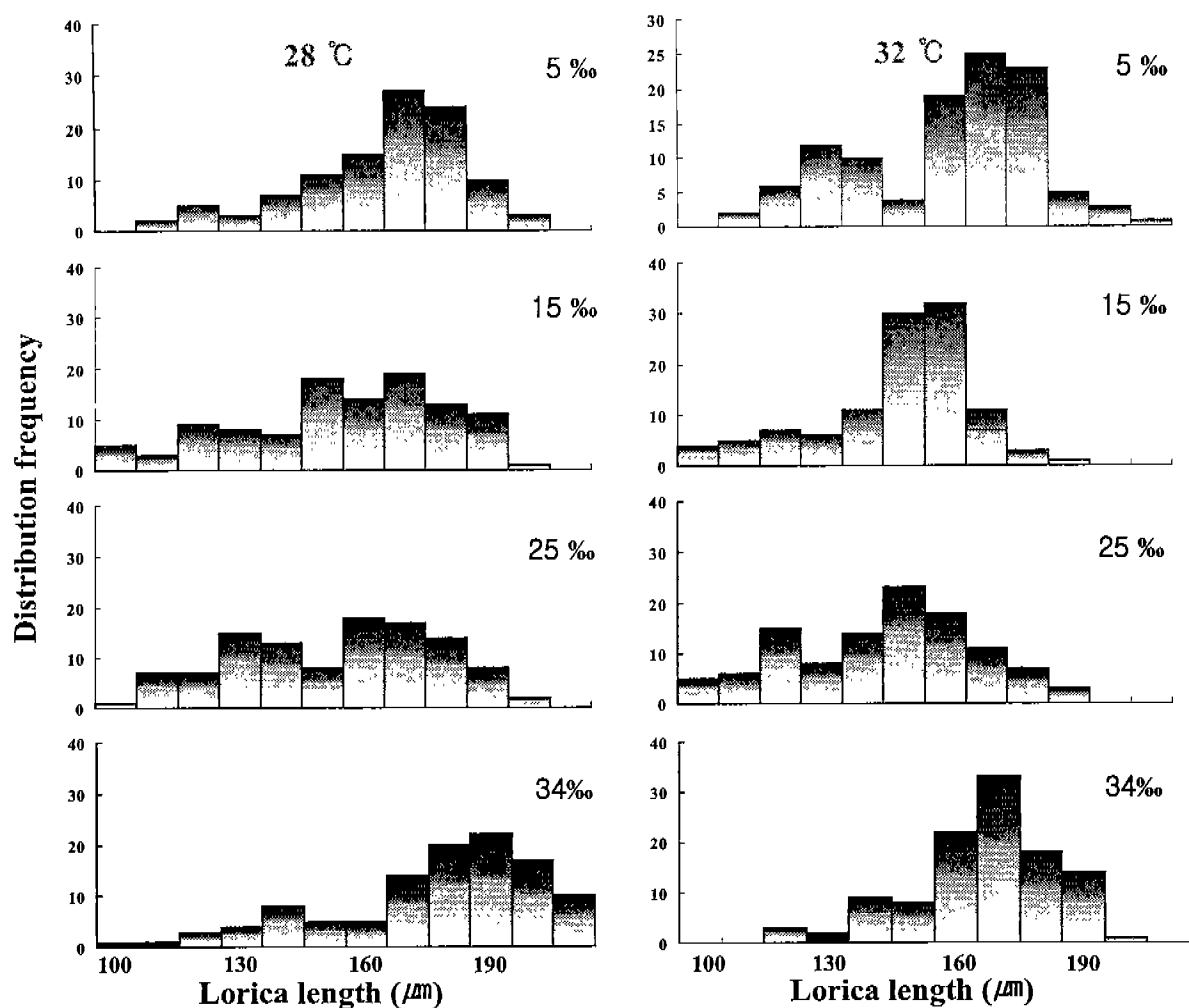


Fig. 36. Distribution frequency of lorica length of the Thai-strain rotifer, *B. rotundiformis* at various water temperatures and salinities.

Table 16. Distribution percentage of lorica length of the Thai-strain rotifer, *B. rotundiformis* at various water temperatures and salinities

		> 110 μm	120 μm	130 μm	140 μm	150 μm	< 150 μm
28 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$	5‰	1.87	6.54	9.34	15.88	26.17	73.83
	15‰	7.41	15.74	23.15	29.63	46.30	53.70
	25‰	7.27	13.63	27.27	39.09	46.37	53.63
	33‰	1.82	4.55	8.19	15.46	20.00	80.00
32 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$	5‰	1.82	7.27	18.18	27.27	30.90	69.10
	15‰	8.19	14.55	20.00	30.00	57.27	42.73
	25‰	10.00	23.64	30.91	43.64	64.55	35.45
	33‰	–	2.73	4.55	12.73	20.00	80.00

2. 종묘생산

능성어의 대량 종묘 생산 실험은 제주도해양수산자원연구소 (A-type)와 대학수산 (B-type) 그리고 국립수산물과학원 남제주수산종묘시험장 (C-type)에서 최적의 종묘생산 기술을 개발하기 위하여 서로 다른 종묘생산 방법을 도입하여 실시하였다.

가. A-type

(1) 사육환경

사육수조 1의 환경변화를 보면 수온의 경우 20.7℃에서 28℃의 변화를 보였다. 수정란 수용 일로부터 6일째까지 1일 1℃정도 상승시켜 25℃를 나타냈고 16일 이후부터 26℃를 유지시켰다. DO는 3.14~9.59의 변화를 보였으며 pH는 7.44~7.93의 변화를 보였다 (Fig. 37).

사육수조 2의 환경변화를 보면 수온의 경우 20.7℃에서 28℃의 변화를 보였다. DO는 2.12~8.92의 변화를 보였으며 pH는 7.21~7.95의 변화를 보였다 (Fig. 38).

(2) Rotifer 배양

종묘생산에 이용된 rotifer는 Thai-strain rotifer와 일반 종묘장에서 사용하고 있는 S-type rotifer를 사용하였다. Rotifer 배양은 Thai-strain rotifer인 경우 염분농도 15~25‰, 수온 30℃ 하에서 1,000~1,500 개체/ml 의 밀도로 4개월 동안 배양하였고, S-type rotifer는 일반해수(32 ‰), 수온 30℃하에서 400~500 개체/ml의 밀도로 3개월 동안 배양하여 사용하였다. 종묘생산에 이용된 Thai-strain rotifer의 배갑장 크기 (lorica length)는 81~184 μm (평균 $139.5 \pm 26.6 \mu\text{m}$), S-type rotifer는 89~222 μm (평균 $154.51 \pm 34.60 \mu\text{m}$)였다 (Fig. 39, 40).

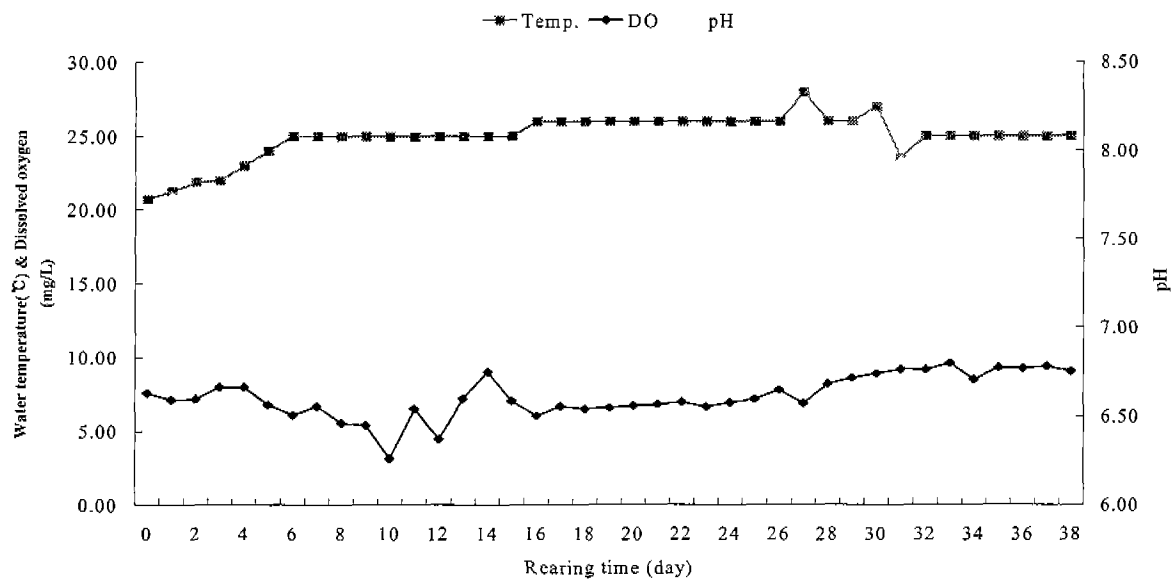


Fig. 37. Variations of water temperature, DO, and pH in Rearing Tank 1 during the experiment.

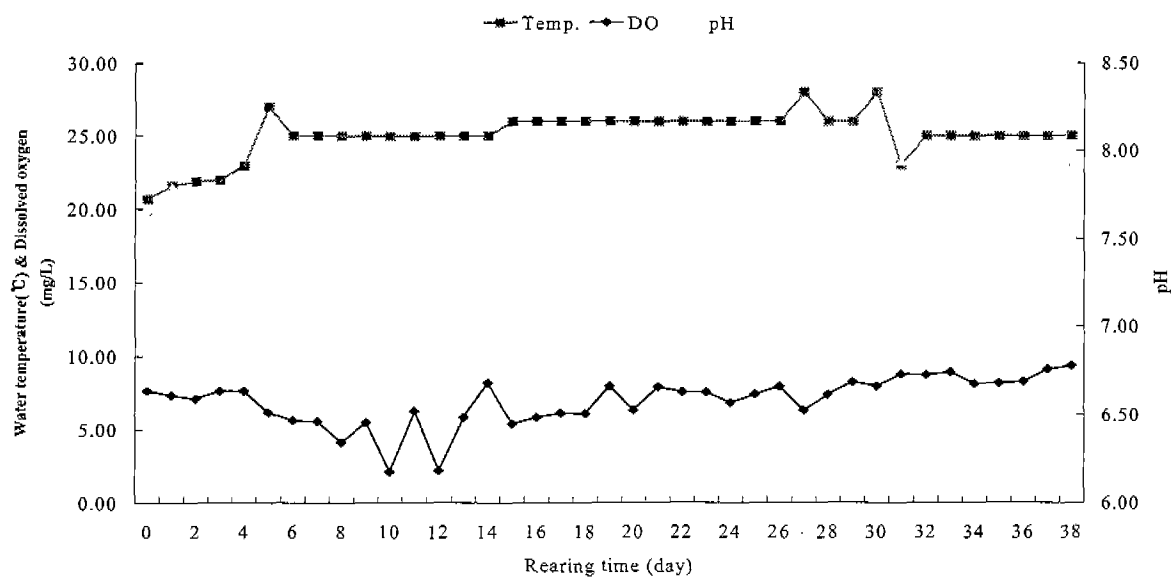


Fig. 38. Variations of water temperature, DO, and pH in Rearing Tank 2 during the experiment.

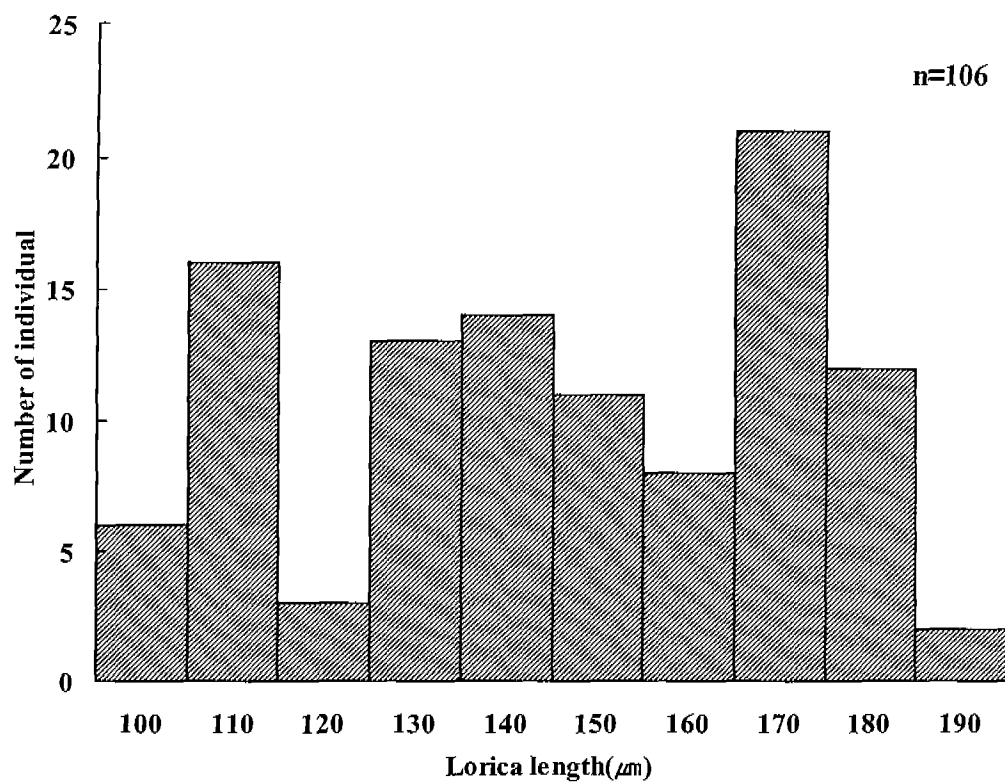


Fig. 39. Distribution of lorica length in the Thai-strain rotifer, *B. rotundiformis*.

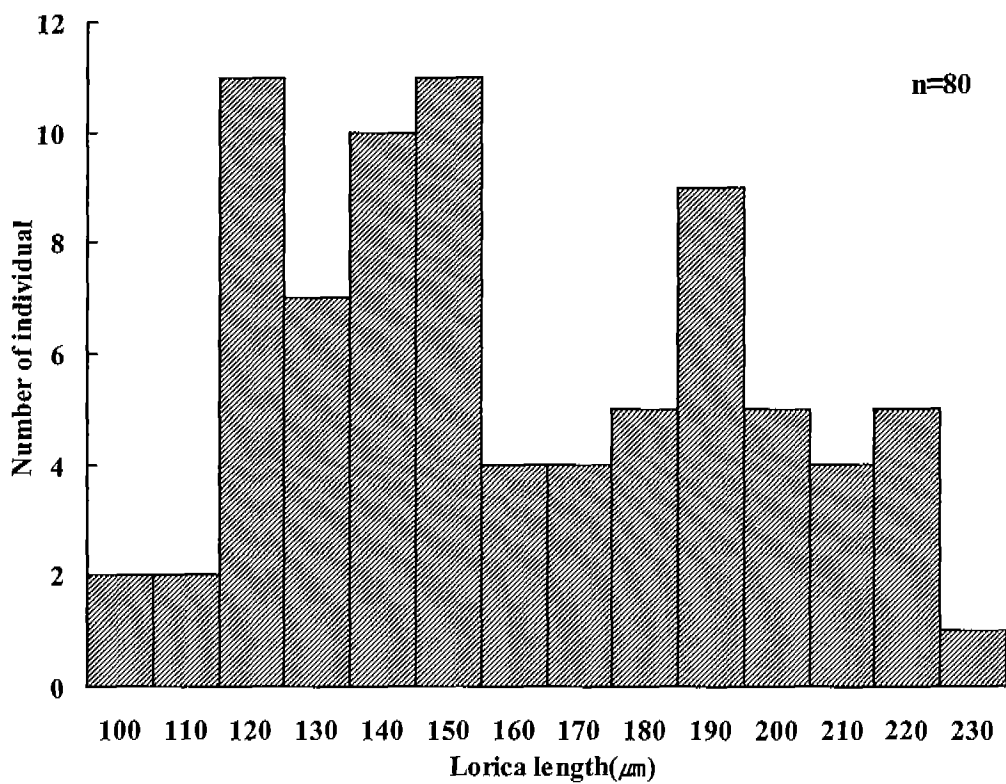


Fig. 40. Distribution of lorica length in the S-type rotifer, *Brachionus* sp.

(3) 종묘생산

100 μm 물러가제로 큰 개체를 제거한 후 수거된 rotifer의 채취율은 Thai-strain rotifer의 경우 60~70%였으며, S-type rotifer는 40%정도였고, 채취된 rotifer의 크기는 Thai-strain rotifer인 경우 80~160 μm (평균 $126.2 \pm 12.9 \mu\text{m}$)이고, S-type rotifer는 90~190 μm (평균 $130.4 \pm 16.9 \mu\text{m}$) 범위였다. 공급된 먹이 중 배갑장이 150 μm 미만이 차지하는 분포비는 Thai-strain이 97.53%, S-type rotifer 88.64%로 큰 차이가 없었으며, 섭이 초기시에 공급량 확보가 가능하였다 (Fig. 41).

자어의 소화관내 rotifer의 섭취유무를 관찰한 결과에서도 부화후 4일째 90%이상의 섭이율을 보였으며, 부화 5일째는 전 개체가 섭이하였다. 또한 소화가 되지 않은 위장내의 rotifer 크기를 측정한 결과 부화후 4일째는 104~125 μm , 부화후 5일째는 88~160 μm 크기의 rotifer들이 관찰되었다 (Fig. 42).

부화후 15일까지의 자어의 성장은 및 Fig. 43과 같다. 부화 직후 자어의 전장은 $1.68 \pm 0.21 \text{ mm}$ 를 보였고 부화 후 5일과 10일째에는 각각 $2.54 \pm 0.20 \text{ mm}$ 과 $3.11 \pm 0.14 \text{ mm}$ 의 성장을 보였다. 각각의 실험구는 부화 후 25일째와 32일째 전량 사망하였다.

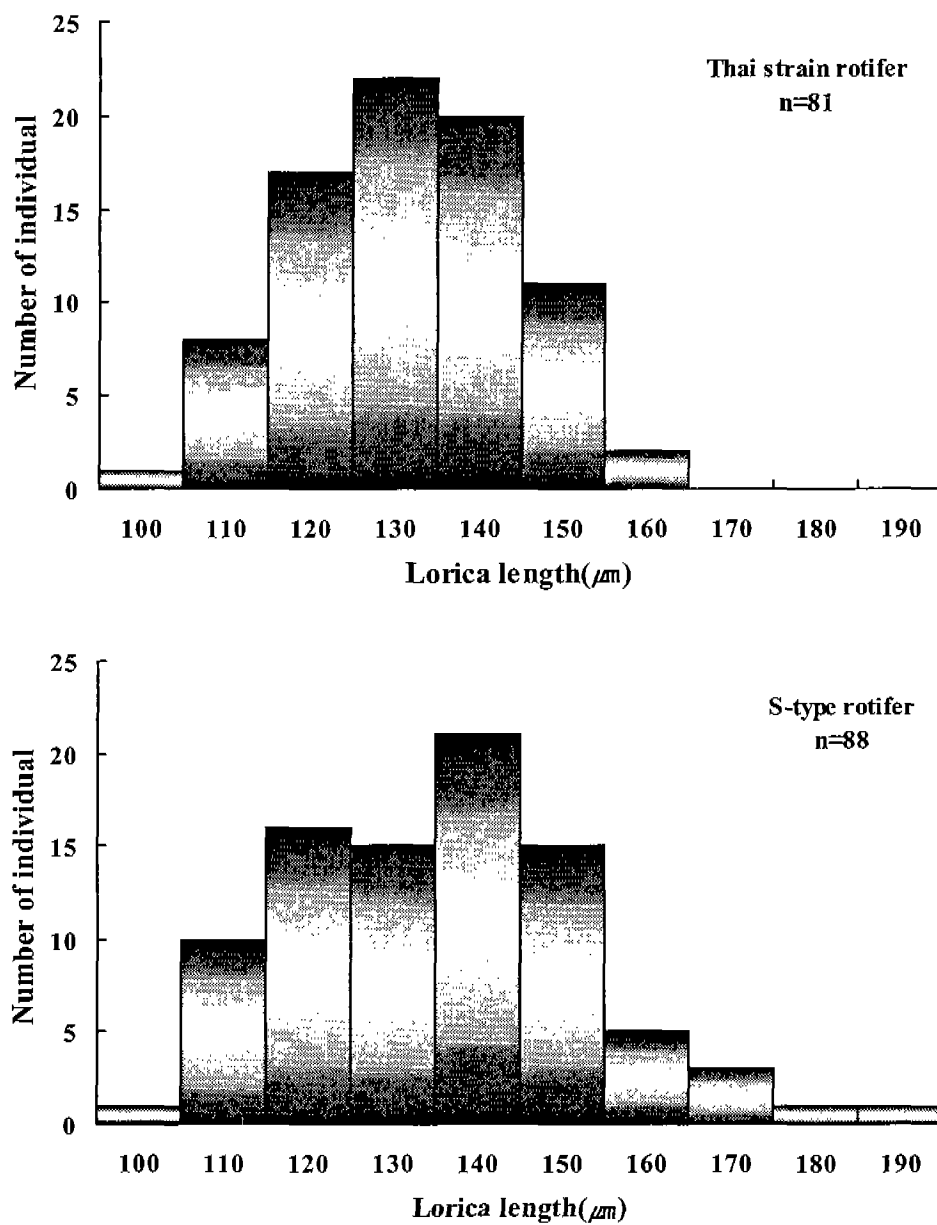


Fig. 41. Distribution of lorica length of rotifers in the larvae culture.

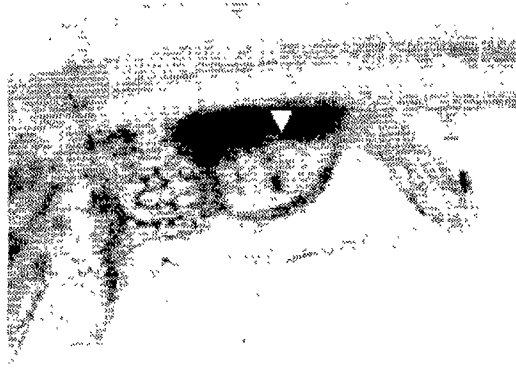


Fig. 42. Microscopic findings of *E. septemfasciatus* larvae fed rotifers (arrowhead)

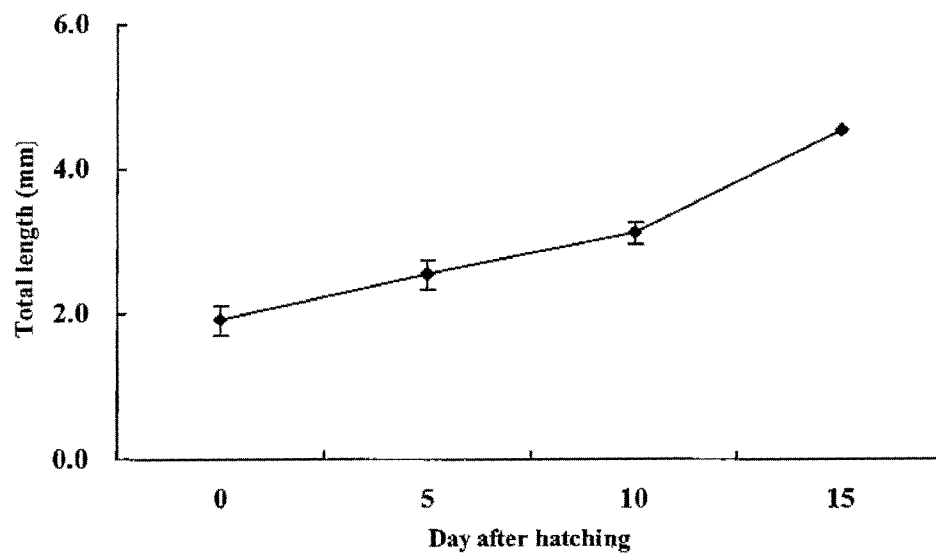


Fig. 43. Total length growth of *E. septemfasciatus* larvae in the excremental Group A. Vertical bar denotes a standard error of means.

나. B-type

수정란 수용은 7 m 콘크리트 수조 1개를 이용하여 300,000개를 수용하였고, 이때 수정률은 $94.85 \pm 2.02\%$, 부화율은 $99.3 \pm 0.7\%$ 이었다. 사육 자어의 전장은 부화 직후의 크기가 1.75 ± 0.03 mm 이었으나, 부화후 3일째에는 2.48 ± 0.04 mm이고 6일째에는 2.68 ± 0.65 mm로 전장의 변화는 없었으나, 9일째는 뚜렷한 성장이 관찰되어 2.94 ± 0.37 mm로 성장하였다. 그리고 24일째에는 5.12 mm까지 성장하였다. 사육 자어의 생존율은 11일째까지 높은 생존율을 보였으나 그 이후 급감하였고 일령 35일째는 전 개체가 폐사하였다 (Fig. 44).

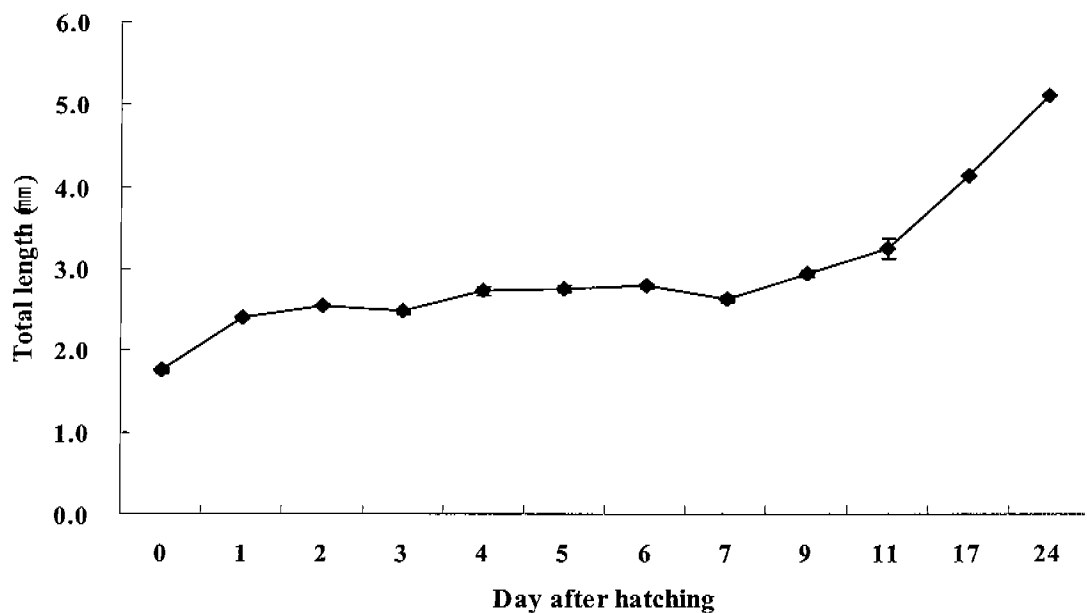


Fig. 44. Total length growth of *E. septemfasciatus* larvae in the experimental Group B. Vertical bar denotes a standard error of means.

다. C-type

806.1 ± 39.6 μ m ($n=30$)이고 부화 직후의 총 자어 수는 $175,770 \pm 16,571$ 개체였다. 사육 자어의 전장은 부화 직후의 크기가 2.45 ± 0.07 mm이었으나, 부화후 3일째에는 2.42 ± 0.15 mm이고 부화후 6일째에는 2.54 ± 0.19 mm로 거의 성장을 관찰할 수 없었으나, 부화후 9일째는 뚜렷한 성장이 관찰되어 3.01 ± 0.25 mm로 성장하였다. 그리고 부화후 12일째에는 3.02 ± 0.33 mm의 전장 성장이 관찰되었다 (Fig. 45).

사육 자어의 생존율은 부화후 3일째 89.3%, 6일째 82.6%, 9일째 81.3%로 매우 높은 수준을 유지하였다. 그러나, 사육 부화후 12일째 사육수온의 급상승 (30°C 이상)으로 인하여 생존율 1.3%로 급감하였고, 부화후 13일째는 전 개체가 폐사하였다 (Fig. 46).

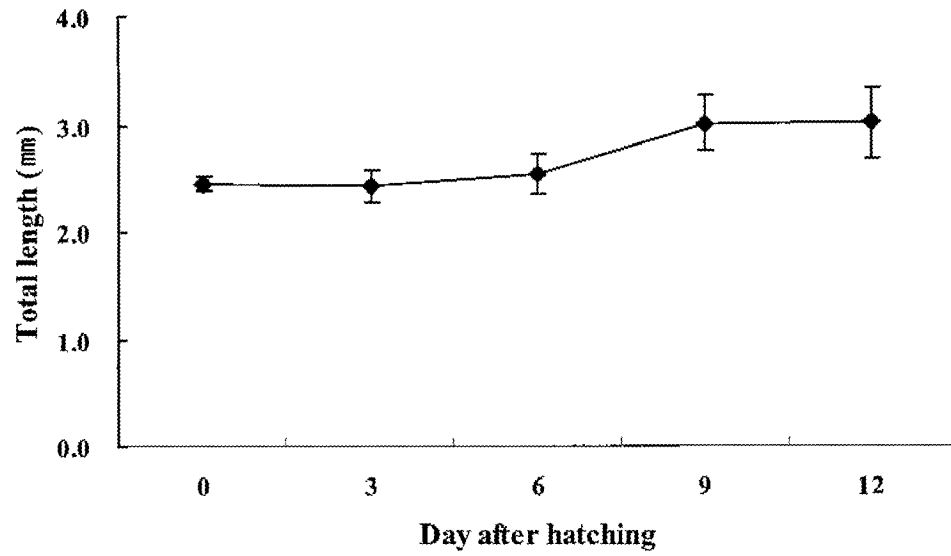


Fig. 45. Total length growth of *E. septemfasciatus* larvae in the experimental Group C. Vertical bar denotes a standard error of means.

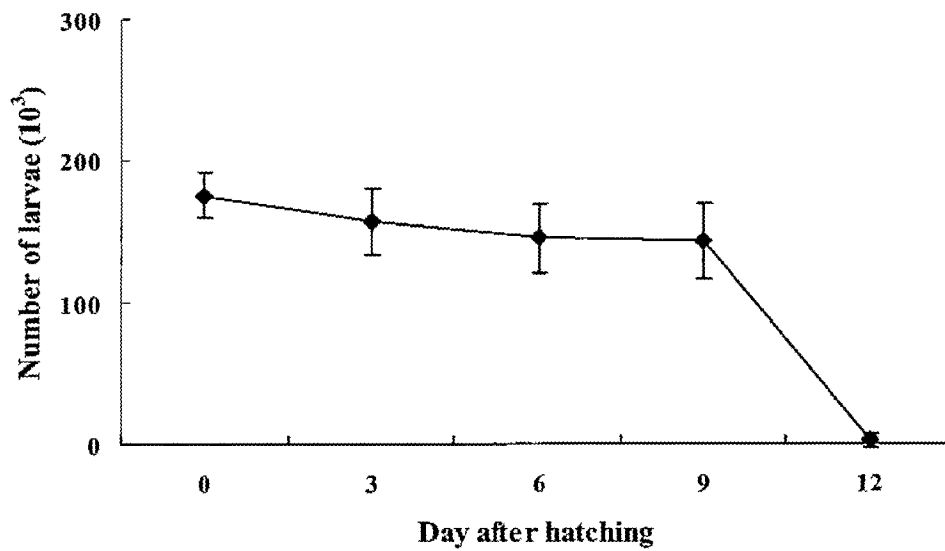


Fig. 46. Number of surviving cultured of *E. septemfasciatus* larvae in experimental Group C. Vertical bar denotes a standard error of means.

제6절. 자바리, *Epinephelus bruneus* 종묘 생산

1. 어미 사육 및 수정란

가. 수정란 및 난 발생

Cannulation 방법을 이용하여 생식소내 난의 발달을 조사한 결과 난경 270~560 μm (평균 $450 \pm 16 \mu\text{m}$)인 자바리 암컷 (전장 78.0 cm, 체중 6.80 kg)에서 HCG 500IU/kg 주사 48시간 경과 후 채란한 난은 모두 500 ml 이며 이중 부상란은 466 ml로 부상란의 비율은 95.2%였다. 이 배란된 난을 자바리 수컷 (전장 85.0 cm, 체중 8.44 kg)에서 채취한 정자를 이용하여 인공 수정을 하였다.

수정란은 무색투명한 난으로 난경은 830~950 μm (평균 $900 \pm 2 \mu\text{m}$)였으며, 유구경은 200~260 μm (평균 $244 \pm 3 \mu\text{m}$)이었으며, 수정률은 $97.7 \pm 0.6\%$ 이었다 (Fig. 47).

수정란 발생 (수온 25℃)은 수정 1시간 후 2세포기에 이르렀으며, 4.5시간 경과 후 상실기에 도달하였다. 그리고 10시간이 경과 되었을 때 포배기, 13시간이 경과되었을 때 낭배기에 접어들었다. 16.5시간이 경과되었을 때 배체가 형성되고, 수정 32시간 후부터 일부 부화가 시작되었다 (Fig. 48).

나. 염분별 부화율

25℃ 조건에서 각각의 염분에 따른 수정란의 부화 시간은 정상해수와 28‰, 24‰, 18‰ 해수 실험구에서 차이가 없었다. 그리고 부화율은 정상해수에서 $96.7 \pm 1.3\%$ 로 28‰, 24‰, 18‰의 $97.3 \pm 0.7\%$, $95.3 \pm 0.7\%$, $92.7 \pm 1.8\%$ 였다. 염분별 부화율에서 저염분 실험구로 갈수록 부화율은 비교적 낮았으나 실험구간에 유의차는 없었다 ($P > 0.05$, Fig. 49).

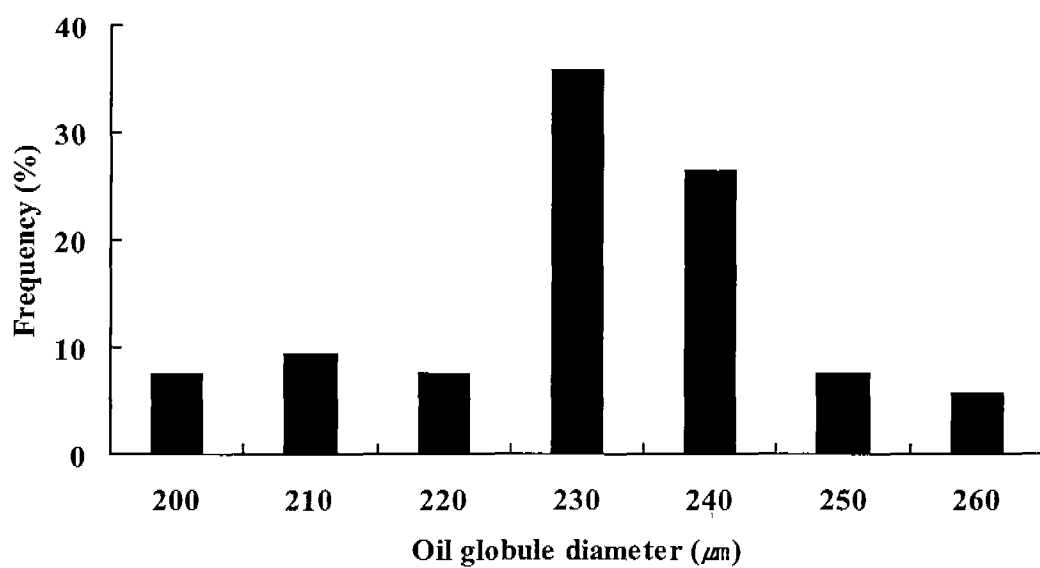
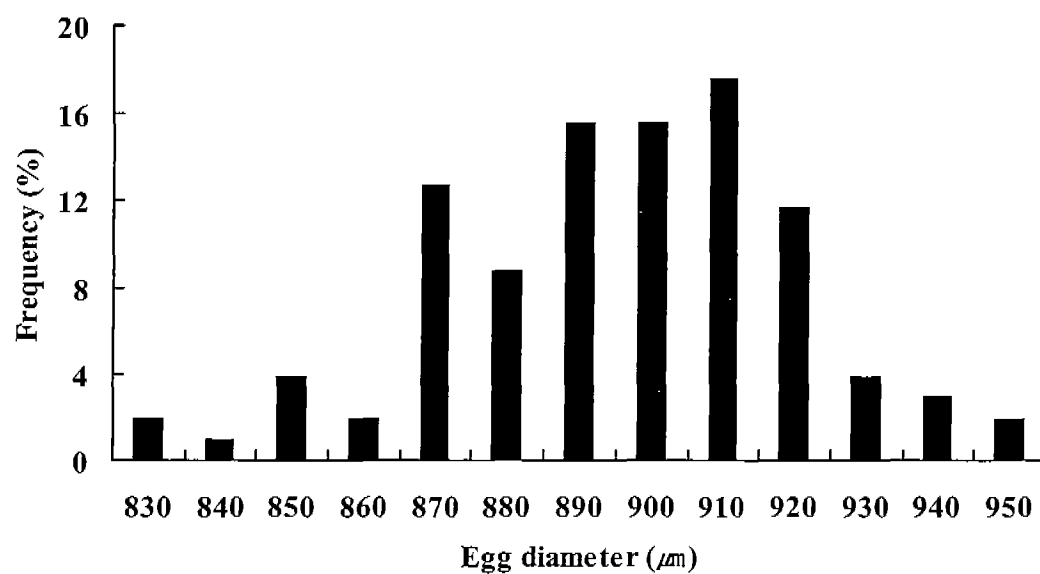


Fig. 47. Frequency of egg and oil globule diameter in *E. bruneus*.

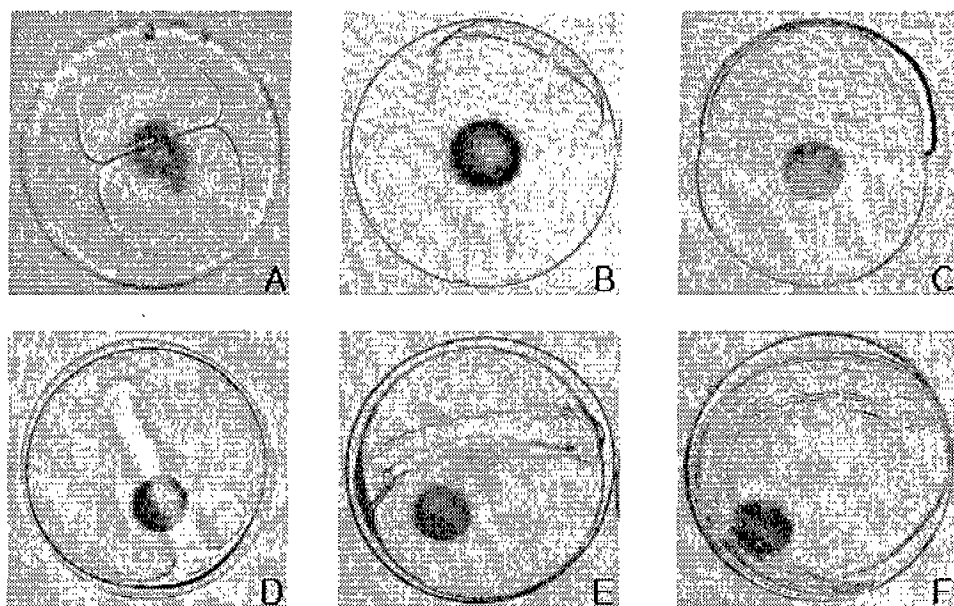


Fig. 48. Development of fertilized *E. bruneus* eggs. A: 2 cell (1 hour), B: Morula stage (4.5 hours), C: Blastula stage (10 hours), D: Embryo formation stage (16.5 hours), E: Kuffer's vesicle appearance (22 hours), F: Hatching (32 hours).

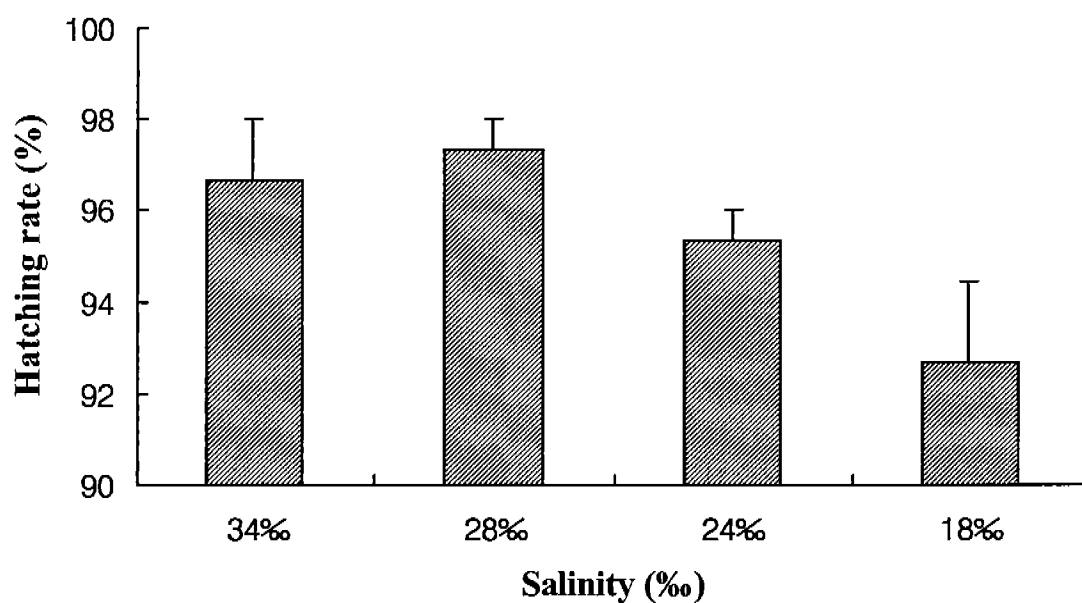


Fig. 49. Hatching rates of *E. bruneus* eggs at various salinities. Vertical bar denotes a standard error of means.

2. 자·치어의 형태발달과 성장

가. 난황흡수 및 개구시간

자바리 자어의 수온별 난황 흡수 시간을 조사하기 위해 수온 22℃와 25℃ 실험구로 설정하여 경과 시간에 따른 부화 자어의 난황, 유구 흡수율 변화는 Fig. 50과 같다.

난황 흡수율의 경우, 부화 직후 자어의 난황 용적 비율이 25℃ 조건에서 24시간 경과시 79.1%였고, 48시간째는 97.1%로 부화 후 48시간 이내에 난황이 흡수되었다. 그러나 22℃ 조건에서 24시간 경과시 42.3%였고, 48시간째는 76.6%, 72시간째는 95.6%로 부화 후 72시간까지도 일부 난황이 존재하였다.

유구 흡수율의 경우, 부화 직후 자어의 유구 용적 비율이 25℃ 조건에서 24시간 경과시 45.4%였고, 48시간째는 64.2%, 96시간 이전에 모두 흡수되었다. 그러나 22℃ 조건에서 24시간 경과시 55.5%였고, 48시간째는 46.5%, 96시간째는 13.3%로 서서히 흡수되어 개구후에도 일부 남아있었다.

부화 후 개구시까지 소요된 시간은 25℃ 조건에서 난황이 거의 흡수하는 부화후 3일째, 22℃에서는 부화 후 4일째 개구가 되기 시작하였다.

나. 부화자어의 입 크기 변화

부화자어의 입 크기 및 전장의 변화는 Table 17과 같다. 부화 후 첫 개구시 자어의 상악장 크기는 0.155 ± 0.008 mm로 부화후 6일째 0.176 ± 0.008 mm로 점차 증가하였다. 그리고 이후 급격히 상악장의 크기가 증가하기 시작하여 부화후 11일째 0.302 ± 0.006 mm에 이르렀으며, 부화 후 54일째 2.838 ± 0.176 mm에 이르렀다.

개구율이 75%, 50%일 때의 입 크기를 각각 0.75d, 0.5d로 구하였다. 그 결과 먹이를 섭취하기 시작하는 부화 후 3일째부터 4일까지 자어의 입 크기 d는 0.219~0.223 mm, 0.75d는 0.164~0.167 mm, 0.5d는 0.109~0.111 mm이었다.

다. 등지느러미와 배지느러미 극의 발달

등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 출현은 부화후 11일째부터 나타났으며, 등지느러미 제1, 3극은 부화후 17일째부터 나타났다.

등지느러미 제2극의 변화는 출현 시기에 0.56 ± 0.20 mm에서 부화후 38일에 최대 5.35 ± 0.20 까지 성장하였다. 배지느러미 극은 변화는 출현 시기에 0.83 ± 0.23 mm에서 부화후 33일에 최대 4.11 ± 0.17 mm 까지 성장하였다. 등지느러미와 배지느러미는 부화후 48일째 지느러미로 분화되었다 (Fig. 51).

자바리의 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 상대 성장은 전장 8 mm 전후시기에 전장의 40%, 35%로 최대를 보였다 (Fig. 52).

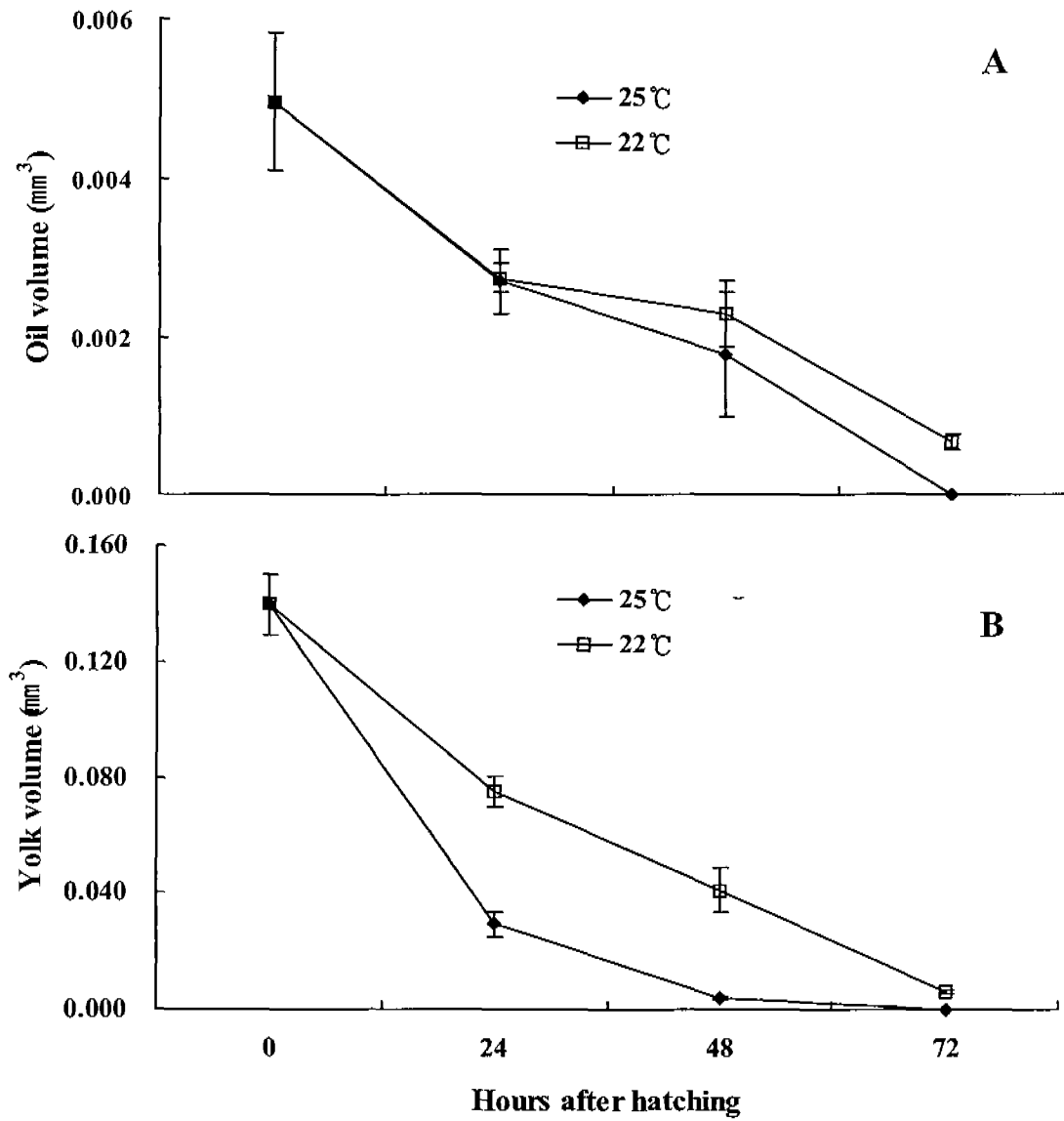


Fig. 50. Absorptions rate of the oil globule (A) and yolk (B) of *E. bruneus* larvae reared at different water temperatures. Vertical bar denotes a standard error of means.

Table 17. Variation in mouth length of *E. bruneus* larvae during the early larval period

Day after hatching	Total length (mm±s.e)	Upper jaw length (mm±s.e)	Calculated mouth length		
			d*	0.75d	0.5d
2	2.68±0.03				
3	2.76±0.08	0.155±0.008	0.219	0.164	0.109
4	2.84±0.06	0.157±0.006	0.223	0.167	0.111
6	2.76±0.04	0.176±0.008	0.249	0.187	0.125
8	2.95±0.09	0.160±0.005	0.226	0.170	0.113
11	4.12±0.09	0.302±0.006	0.427	0.320	0.213
14	4.95±0.12	0.287±0.008	0.406	0.305	0.203
17	6.10±0.14	0.406±0.039	0.574	0.430	0.286
20	5.75±0.30	0.536±0.057	0.758	0.569	0.379
23	7.62±0.33	0.687±0.056	0.972	0.729	0.486
26	10.42±0.17	0.957±0.152	1.353	1.015	0.677
33	15.93±0.42	0.905±0.011	1.280	0.960	0.640
38	21.18±1.14	1.466±0.123	2.074	1.555	1.037
44	25.60±1.17	1.741±0.058	2.462	1.847	1.231
48	30.74±0.95	2.001±0.081	2.816	2.112	1.408
54	41.12±1.20	2.838±0.176	4.013	3.010	2.007

$\sqrt{2} \times \text{Upper jaw length}$

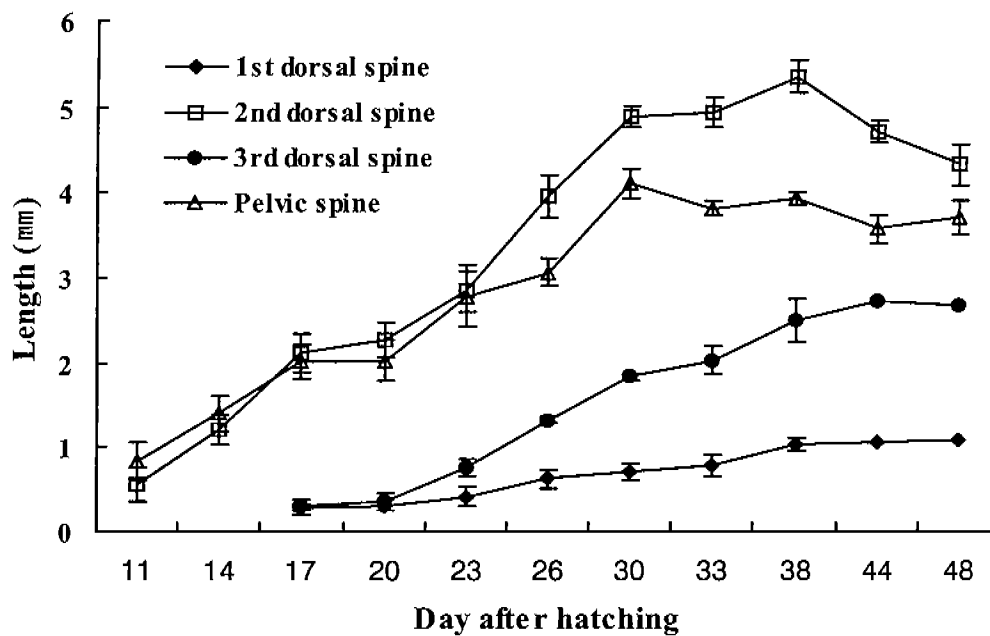


Fig. 51. Growth of the 1st, 2nd, and 3rd dorsal spines and pelvic spine of *E. bruneus* larvae. Vertical bar denotes a standard error of means.

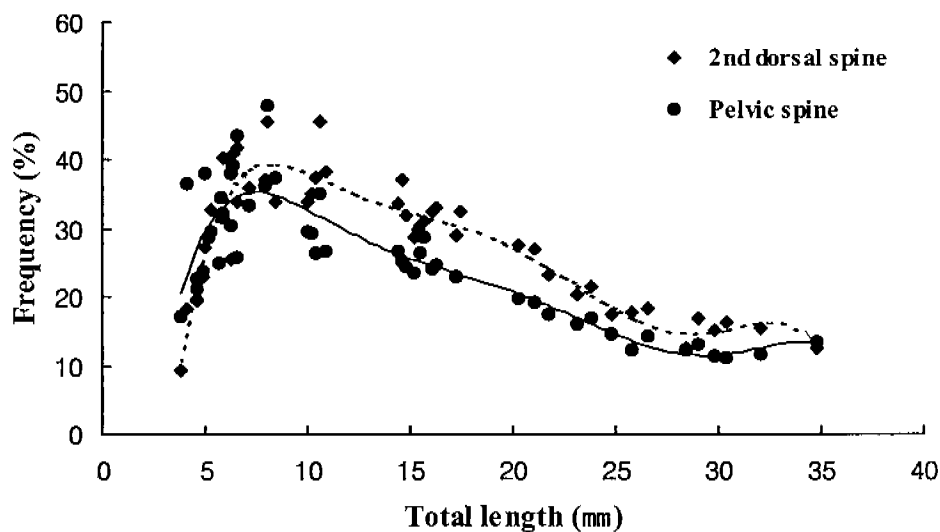


Fig. 52. Change in the lengths of the 2nd dorsal and pelvic spines as a frequency of the total length during larval and juvenile development of *E. bruneus*.

라. 형태발달

부화후 0~1일: 유구는 난황이 끝부분, 항문은 난황에서 약간 떨어진 몸이 중앙보다 뒤에 위치하였다. 꼬리부분 중앙의 등과 복부면에 흑색소포가 있다. 막지느러미를 가지는 몸측 전면은 포상의 과립으로 덮여있다. 부화자어는 대부분 수표면에 분산하여 유영하고, 머리를 아래쪽으로 향하고 정지상태를 유지하다가 순간적으로 빠르게 유영하는 행동을 보였다 (Fig. 53A).

부화후 4~5일째: 난황과 유구를 완전하게 흡수되었다. 입의 개구되고, 항문이 열렸으며, 안구에 흑색 색소포가 침적되었다 (Fig. 53B).

부화후 11-28일: 부화 11후에 등지느러미 제2극조와 배지느러미 극이 출현하였다 (Fig. 53C).

부화후 17일째 자어의 특징은 두 극이 신장하고, 복강부위의 흑색층이 발달하고, 등지느러미에 2극의 출현한다 (Fig. 53D).

부화후 28일째 후기 자어시기에 등과 꼬리지느러미의 기초적인 줄기가 형성 발달하기 시작하였다 (Fig. 53E).

부화후 50일 전후: 지느러미 분화가 완료되고, 체색이 형성되어 변태 단계를 끝내고 (Fig. 53F). 자어에서 치어의 형태로 변하여, 성체의 모습과 동일한 형태를 나타냈다 (Fig. 53G).

마. 성장

사육일수에 따른 자바리의 전장의 변화는 부화 직후 2.02 ± 0.20 mm이었으며, 변태 시작시 4.12 ± 0.09 mm 이었다. 변태 시작이후 점차 빠르게 성장하여 변태 완료시기에 41.12 ± 1.20 mm 까지 성장 하였다. 이후 급격한 성장을 하여 부화후 93일째 93.78 ± 1.98 mm까지 성장하였다 (Fig. 54).

그리고 항문장의 변화는 부화 직후 1.22 ± 0.02 mm이다. 부화 54일과 72일의 항문장의 변화는 각각 22.53 ± 0.51 mm에 30.57 ± 0.81 mm이었다 (Fig. 54).

자어의 대량 폐사는 변태 종료 후 공식에 의한 발생하였다. 그 결과 부화 후 93일째 최종 생존율은 7.46%였다.

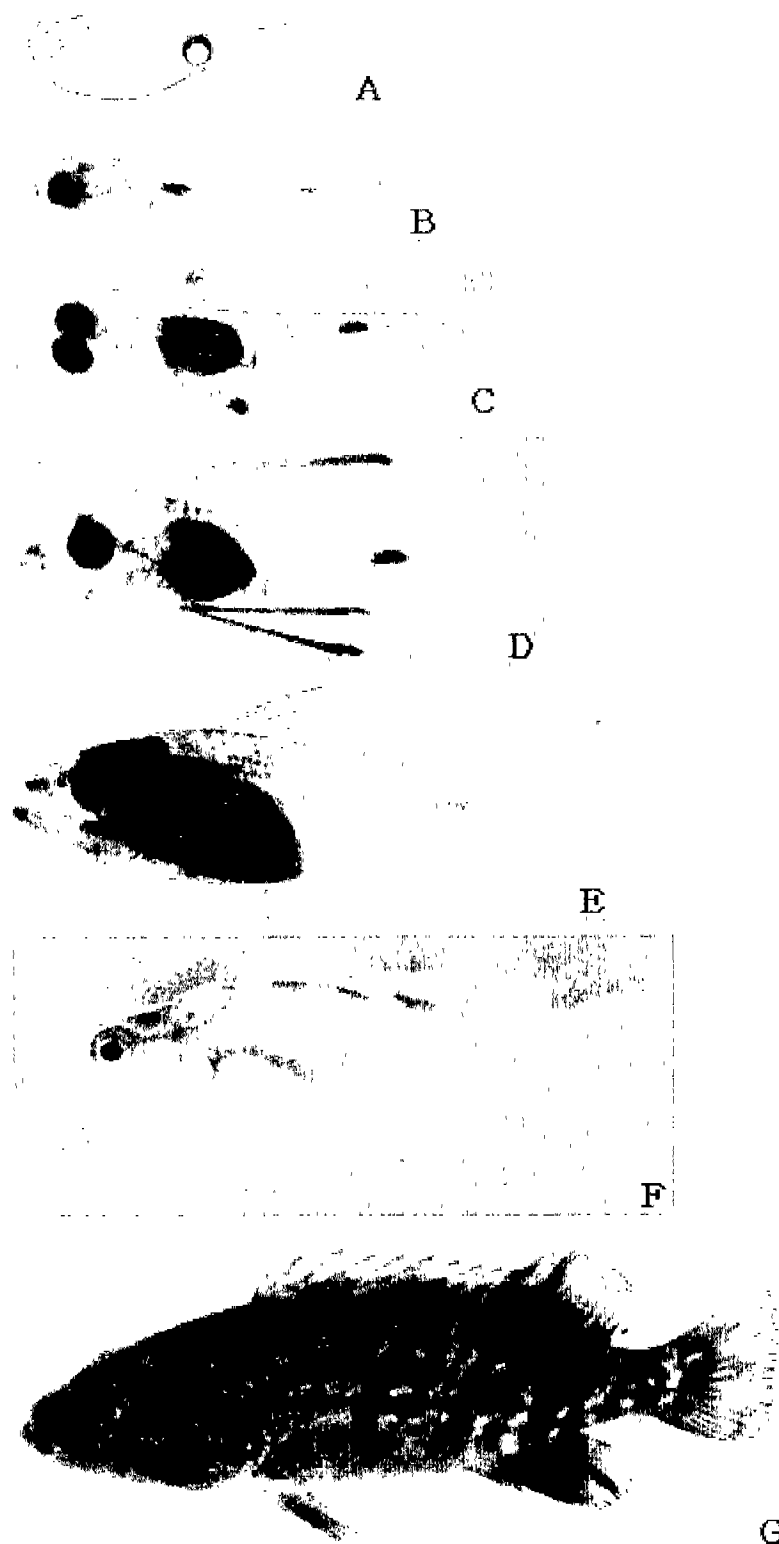


Fig. 53. Development of larval and juvenile *E. bruneus* in the laboratory. A: newly hatched larva, 2.02 mm TL, B: 4 DAH, 2.84 mm TL, C: 11 DAH, 4.12 mm TL, D: 28 DAH, 4.25 mm TL, E: 38 DAH, 21.18 mm TL, F: 50 DAH, 10.50 mm TL, G: 92 DAH, 93.78 mm TL.

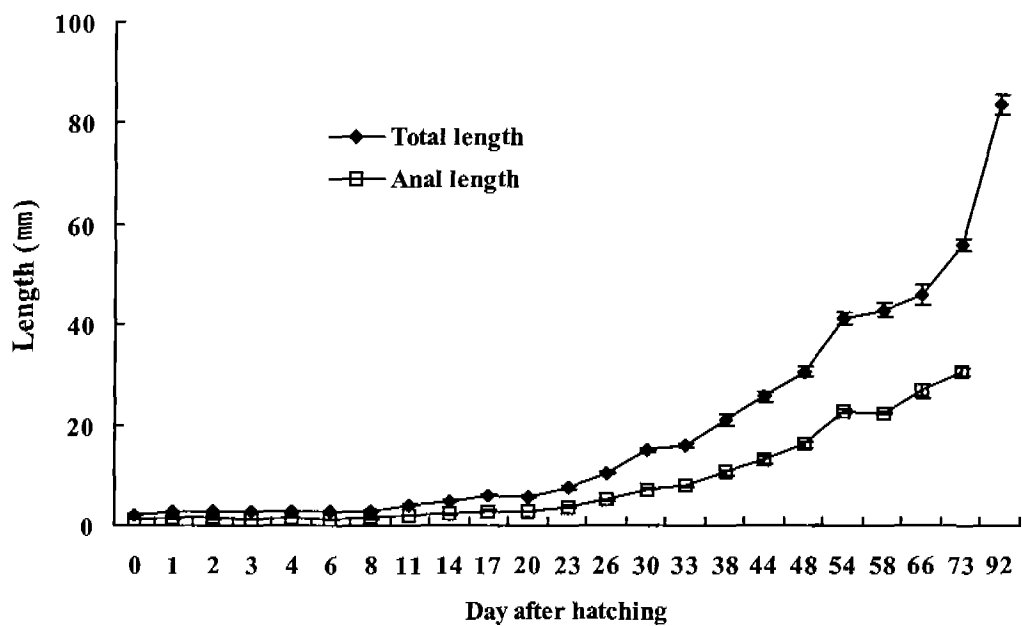


Fig. 54. Growth of total length and anal length of *E. bruneus* in the laboratory at 25°C
Vertical bar denotes a standard error of means.

제 4 장. 고 찰

어미사육 및 자연산란

능성어류의 수정란 생산을 하기위해 어미 사육은 가두리와 실내 사육방법을 이용하고 있으며, 능성어류의 사육수조내 자연산란 유도 (Kayano, 1996; Duray et al., 1997; Hassin et al., 1997; Okumura et al., 2002)를 수행하였다. 그리고 능성어류의 자연산란 시기 및 기간 그리고 산란량은 지역 및 위도에 따라 같은 종이라도 다르다. *E. polyphkadion*의 자연산란 기간은 2~6개월 동안 이루어지고 (James et al., 1998), *E. fuscoguttatus*은 9개월 동안 수조내에서 자연산란한다 (Lim et al., 1990). *E. suillus*은 사육수조 내에서 연중 연속적으로 산란하였고, 가두리 내에서 4개월 이상 산란 하였다 (Toledo et. al., 1993). 붉바리의 자연산란은 일본에서 19~20℃인 6월에 시작하여 26~27℃내인 9월초까지 이루어진다 (Kayano 1996; Okumura et al., 2002). 우리나라에서 붉바리의 자연산란은 완도지역에서는 7월초부터 8월 중순까지 (Kim and Park, 1993), 그리고 여수지역에서는 6월 중순부터 8월초까지 산란한다 (Kim and Kim, 1993). 능성어의 수조내 자연산란 기간은 주로 7~8월에 이루어졌다.

산란에 영향을 미치는 요인에는 어미의 연령외에, 수용밀도와 성비가 있다 (Okumura et al., 2002). 그리고 능성어류의 어미 양성중에 성전환이 일어나 성비 불균형이 발생 할 수 있고, 수컷 비율이 많은 경우 정상적인 산란행동을 방해하기 때문에 채란량의 감소와 수정률의 저하를 가져올 수 있다고 보고하였다 (Tanaka et. al., 1990). 붉바리의 성비와 1마리당 산란량과의 관계에서는 성비가 0.6~1.4 범위에서 산란량이 많은 경향을 보였다 (Kayano 1996).

그리고 열대 및 아열대 지역에 서식하는 능성어류 (*Cromileptes altivelis*, *E. striatus*, *E. merra*, *E. polyphkadion*)의 경우 달주기와 관련해 한정된 기간내에 산란하는 습성이 있다 (Colin et. al., 1997; James et al., 1998; Lee et al., 2002b; Okumura et al., 2002).

능성어류의 산란량은 *E. fuscoguttatus*경우 암컷 1마리가 산란기 동안 평균 2,300만개를 산란한다 (Lim et al., 1990). 그리고 붉바리의 암컷 1마리가 산란기 동안 83~125만개를 산란 하고, 산란량은 만 3세 이후 증가하며, 산란량은 약 8~9세에서 최대에 달한다 (Kayano 1996). 사육수조 내에서 능성어 30마리를 대상으로 자연산란을 유도한 실험에서 산란기간 중 총 산란량은 약 330~771만개 이었다.

자연산란된 난의 수정률 및 부화율은 9%와 24% 이하의 매우 낮은 것으로 보고 되고 있다 (Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990). 이러한 낮은 수정률과 부화율은 어미 고기의 영양결핍, 성비의 불균형 및 기타 환경요인으로 추정하고 있다 (Toledo et. al., 1993). 그리고 자연산란된 난의 특징은 산란초기의 난이 산란 후기의 난보다 난경이 더 크고, 부화율 및 생존

율이 높다 (Kayano et al., 1988; James et al., 1998). 능성어의 자연산란된 난의 부상률은 2.8~28.6% 범위였으며, 평균 수정률은 산란기간 내에 0~80% 범위였다. 그리고 산란양 및 부상률은 산란초기보다 후기에 갈수록 낮은 경향을 보였다.

따라서 능성어 종묘생산을 하기 위한 수정란 확보 문제점을 해결하기 위해 보다 양질의 수정란을 확보할 수 있는 방법 모색이 필요하다고 사료된다.

광주기 · 수온 조절을 통한 인위적 성성숙 유도

어류에 있어서 생식활동을 제어하는 요인으로 내적요인과 더불어 광주기와 수온이 관여하는 것으로 알려져 있으며 (Nishi, 1979), 특히 대다수 어류는 일조시간의 계절적 변화 패턴에 의해 생식 활동을 제어한다 (Bromage et al., 2001). 그리고 현재 연어류 (Taranger, 1993)와 넵치류 (Watanabe et al., 1998), 볼락류 (Park, 2000) 등 많은 양식 대상 어종에 광주기 조절을 통한 산란 시기 조절을 하고 있다. 또한 일부 열대 및 아열대 어종의 경우 성성숙에 수온이 영향을 주기도 한다 (Munro, 1990). 능성어의 광주기와 수온 조절을 통한 인위적 성성숙 유도 실험에서 3월에 14L:10D로 자연산란 시기의 장일조건과 수온 20℃ 이상 수온을 조절하여 자연산란 시기보다 2~3개월 빨리 성성숙을 유도할 수 있었다.

Hormone 처리에 의한 인공배란 유도

양식 대상 어종의 전제 조건은 사육 수조내에서 성성숙 제어를 통하여 필요한 시기에 수정란 공급이 가능해야 한다 (Bromage and Roberts, 1995), 그러나 수조내에서 사육하는 어류들은 다양한 형태의 생식 기능 장애를 나타낸다. 특히 대부분의 암컷에서는 난모세포의 최종 성숙유도 그리고 배란 및 산란 유도에 장애에 따른 난질 저하 등을 가져온다 (Zohar et al., 1989; Peter et al., 1993). 이러한 문제점은 많은 능성어류에서도 나타나고 있다 (Hussain and Higuchi, 1980; Lim et al., 1990).

어류의 생식기능 장애를 제어하기 위해 이용되어지는 hormone은 어류의 뇌하수체, HCG, 그리고 LhRHa/GnRHa 등이 있다. 어류의 성성숙 및 산란 유도를 하기위한 뇌하수체 이용은 초기에 이용되어진 방법으로서 LH 함유량에서의 변이성, hormone 처리된 어류에서 생리에 반대되는 영향을 주어 또다른 hormone 투여 필요, 그리고 질병 감염 등의 우려가 있다 (Zohar and Mylonas, 2001)

HCG는 현재 수산 양식분야에서 가장 많이 이용되어지고 있으며 (Lam, 1982; Donaldson and Hunter, 1983), 장점으로는 사용이 간편하고, 생식소에 직접적으로 작용하여 난모세포의 최종성숙 및 배란유도에 빠른 효과를 나타낸다 (Hodson and Sullivan, 1993). 그러나 HCG 사용에 따른 문제점으로는 hormone 처리이후 내성이 생길 수 있다는 단점이 있다 (Zohar and Mylonas, 2001).

LhRH (또는 GnRH)의 장점은 첫째, 면역반응을 유발시키지 않는다. 둘째, LH의 방출을 유도하여 생식소 발달에 균형 잡힌 자극을 줄 수 있다. 셋째, 합성이 용이하여 질병 감염 우려가 없다. 마지막으로 어류 종들간의 GnRH의 구조상 유사함 때문에 광범위하게 사용이 가능하다 (Sherwood et al., 1994; Zohar and Mylonas, 2001). 그러나 때때로 GnRHa는 효과성이 미약하거나 반응을 이끌어내는데 많은 시간을 요구한다 (Crim et al., 1988; Zohar et al., 1989).

이러한 hormone 처리를 통한 능성류의 수정란 생산에 관한 연구로서, 자바리와 능성어를 대상으로 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) 150 IU/kg 과 HCG 1,000 IU/kg를 각각 3회와 1회를 동시에 처리하여 수정란을 얻을 수 있었다 (Takaya and Arakawa, 1987). 능성어의 인공채란은 생리 식염수에 현탁시킨 연어 뇌하수체 7mg/kg와 Gonadotropin 500 IU/kg를 등 근육내에 함께 주사하여 48시간 후에 복부 압박하여 인공채란을 하였다 (Kitajima et al., 1991). *E. striatus* 어미의 인공배란을 유도하기위해 HCG, LHRH-a, 잉어 뇌하수체 (CPH, carp pituitary homogenate)를 각각 단독 또는 혼합투여하여 인공배란을 유도하였다 (Watanabe et al., 1995).

그리고 조직학적 조사를 통한 능성어의 생식소내 난경변화를 조사한 실험에서 붉바리 (Hwang et al., 1998)와 *E. merra* (Song et al., 2003)에서 230~500 μm 의 난모세포는 대부분 세포질내 난황물질이 축적된 난황구기 단계의 난모세포 이었다. 난경 400~500 μm 의 난모세포를 가지고 있는 *E. aeneus* 대상으로 hormone 처리를 통한 자연산란 유도 실험의 경우 GnRHa를 10 $\mu\text{g/kg}$ /2회 주사한 실험구와 25 μg 또는 75 μg GnRHa pellet를 어체 등 근육에 삽입하여 산란기 동안 2~3회 산란을 유도할 수 있었다 (Hassin et al., 1997). 그리고 400~500 μm 의 난모세포를 가지고 있는 *Cromileptes altivelis*에 GTH 500IU/kg를 1일 간격으로 총 2회 주사 후 인공채란을 하였다 (Sugama and Ikenoue., 1999).

이 실험에서 300~500 μm 내외이 난모세포를 가지고 있는 능성어 암컷을 대상으로 최종성숙 및 배란 유도를 위한 실험에서 LhRH 50 $\mu\text{g/kg}$ 농도로 1회 처리한 실험어에서 2일후 미성숙 난, 그리고 5일 후에 과숙난의 배란되었다. HCG 500 IU/kg BW로 1회 주사하여 처리한 실험구에서 난경변화는 주사 48시간 경과 후 대다수 난의 분포는 837.1 ± 2.6 μm 내외였다. 그리고 HCG 처리를 통한 성숙 및 배란 유도 대상 시험어 8마리 중 7마리가 배란되어 87.5%가 배란되었고, 배란된 난은 일부 미성숙 난과 과숙란을 제외하고 대부분의 정상적인 난이었다. 배란된 난중 부상란은 1,360 ml로 부상률은 54.9%였으며, 이는 자연산란한 난보다 높은 부상률을 나타내었다.

자바리 암컷 생식소내 270~560 μm (평균 450 ± 16 μm)의 난모세포를 가지고 있는 개체를 대상으로 HCG 500 IU/kg 주사후 48시간만에 채란한 난은 모두 500 ml 이며 이중 부상란은 466 ml로 부상란의 비율은 95.2%였다

기능적 수컷 유도

능성어류는 자성선숙형 자웅동체 종이다. 지금까지 알려진 능성어류의 성전환에 관한 연구로서 *E. tauvina*는 7년생부터 암컷에서 수컷으로 성전환이 일어나기 시작하여, 만 10년에 이르렀을 때 완전한 수컷으로 기능을 한다 (Chao and Lim, 1991). 그리고 *E. marginatus*는 사육수조 내에서 자연적인 성전환이 일어나는 시기는 생후 14년이 지난 후 나타난다 (Glamuzina et al., 2000). 또한 *E. mario*의 성전환은 생후 9년생, 체중 11kg부터 성전환이 일어나고, 붉바리는 전장 24~32 cm부터 성전환이 일어나고, 수컷이 출현은 대부분 40 cm이상 되어야한다. 그리고 능성어의 성전환은 전장 60~70 cm, 체중 6~7 kg부터 성전환이 일어난다 (Tsuchihashi et al., 2003). 이처럼 능성어류의 종묘생산을 하기 위한 어미 사육에 많은 시간과 노력이 필요하다. 따라서 수컷을 확보하기 위해 어린 개체를 대상으로 성전환 유도하여 정자를 확보하는 기술이 필요하다.

성전환을 유도하는 방법은 경구투여 (oral administration), 주사 (Injection) 그리고 피하 주입 (Implantation) 방법 등이 있으며, hormone의 종류와 처리량에 따라 성전환이 유도 성공 유무와 지속시간이 달라질 수 있다 (Kuo et al., 1988; Qunitio et al., 1997). 경구투여 방법에 있어서, *E. tauvina* (Chao and Lim, 1991)와 *E. fario* (Kuo et al., 1988)의 성전환을 유도하기 위해서는 많은 양의 hormone을 장기간 처리해야 하는 문제점이 있다. 그리고 주사 방법을 이용한 *E. suillus*의 성전환 유도 (Tan-Fermin et al., 1994)와 피하 주입 방법을 이용한 *E. tauvina* (Chao and Chow, 1990)와 능성어 (Tsuchihashi et al., 2003) 성전환 유도를 하였다. 특히 피하 주입 방법은 성전환 성공률과 hormone 비용, 취급에 따른 stress의 최소화 할 수 있는 장점이 있다 (Yeh et al., 2003).

일반적으로 능성어류의 성전환 유도에 남성 hormone인 17 α -methyltestosterone (MT) 사용되며, hormone의 처리농도는 다양하다. 경구투여 방법을 이용한 성전환 유도에서, *E. tauvina*는 1년 동안 145 mg/MT/kg BW (Chen et al., 1977)과 7개월동안 120 mg/MT/kg BW (Chao and Chew, 1990)농도로 처리했을 때 성전환유도를 할 수 있었다. 그리고 *E. tario*와 *E. salmonoides*의 경구투여를 통한 성전환 유도에는 각각 70 mg/MT/kg BW과 104 mg/MT/kg BW 처리했을 때 성전환 유도를 할 수 있었다 (Kuo et al., 1988). 주사방법을 이용한 체중 0.8~1.5 kg의 *E. suillus* 성전환 유도에서, 30 mg MT/kg BW를 격주로 6회 주사 하였을 때 성전환 유도가 가능하였다 (Tan-Fermin et al., 1994). *E. tauvina*를 대상으로 0.5 mg MT/kg BW 의 silastic capsule을 제작하여 피하 주입 했을 때, 4개월 후 기능적 수컷을 유도 할 수 있었다 (Chao and Lim, 1991). 그리고 *E. coioides*를 대상으로 androgen hormone (Testosterone, 17 α -methyltestosterone, testosterone propionate)을 같은 비유로 혼합하여 피하 주입 했을 때, 10~20 mg androgens/kg BW 처리구에서 처리 90후 완전한 수컷으로 성전환 유도를 할 수 있었다 (Yeh et al., 2003). 능성어를 대상으로 1.0 mg MT/kg BW 과 4.0 mg MT/kg BW 의 silastic capsule을 제작하여 피하주입했을 때, 1개월 후 기능적 수컷을 유도 할

수 있었으나, 2개월 후에 4.0 mg MT/kg BW 처리구에서 정자 채취를 할 수 있었다 (Tsuchihashi et al., 2003).

이 연구에서 미성숙한 능성어를 대상으로 주사 방법을 이용하여, 0.5~2.0 mg MT/kg BW injection 처리했을 때 4주후 모든 개체가 성전환이 일어났다. 그리고 정자 채취는 생식소의 배우자 형성 활성 초기 (3월)와 산란 후 휴지기 (9~1월)에 1.0~2.0 mg MT/kg BW를 처리한 실험구에서는 8주 후부터 운동성을 가진 정자를 얻을 수 있었다. 산란시기에 가까운 4~5월에 1.0~2.0 mg MT/kg BW를 처리한 실험구에서는 9~11주 후에 정자를 얻을 수 있었다. 그리고 1월에 silastic capsule을 이용한 MT 2.0 mg/kg 처리구는 MT 1.0 mg/kg injection 처리구보다 2주 늦은 10주후에 정액 채취가 가능하였다

인위적 성전환에 따른 혈중 스테로이드 hormone량의 변화

Testosterone은 정자형성 과정과 성전환에 중요한 역할을 하고, 산란기 동안 높게 나타난다 (Fostier et al., 1987). 붉바리의 생식주기에 따른 체내 혈중 스테로이드 hormone의 변화는 개체차이가 크지만, Testosterone (T)은 수컷에서는 정자형성이 왕성한 시기에 높은 수치를 보이고 간성개체의 steroid hormone양은 일반적으로 낮다 (Tanaka et al., 1990). *E. coioides*의 성전환 유도한 실험에서 T의 농도 변화는 androgen hormone 처리 후 높은 값을 나타낸 이후 점차 감소하여 정자 채취시기에 대조구와 유사한 값을 나타내었다 (Yeh et al., 2003). 능성어의 성전환 유도 실험에서 T의 혈액내 농도 변화는 MT 처리구에서는 대조구보다 2주후 높은 값을 나타내었다. 그리고 이후 점차 감소하여 8주후 대조구와 유사한 값을 나타내었다.

*E. morio*의 생식주기에 따른 체내 11-KT의 변화는 성성숙 시기에만 검출되고, 수컷이 성전환 개체보다 높게 나타난다 (Johnson et al., 1998). 그러나 *E. coioides*를 대상으로 androgen hormone 처리를 통한 인위적 성전환 유도 실험에서 11-KT의 혈액내 농도는 변화가 없었다 (Yeh et al., 2003). 능성어의 성전환 유도 과정 중 11-KT의 혈액내 농도 변화는 MT 처리구에서는 2주후 MT 처리구에서 대조구보다 높은 값을 나타내었고, 4주후 점차 감소하였으나, 정자 채취가 가능한 시기인 MT 처리 8주 후에도 대조구보다 높은 값을 나타내었다. 인위적 성전환 유도에 따른 체내 스테로이드 hormone의 변화에 대해서는 처리 hormone의 종류와 처리 농도에 따른 활성변화에 대한 많은 연구가 이루어질 필요가 있다고 사료된다.

정자 냉동보존

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 중요한 요인으로는 희석액, 동해방지제, 평형시간 및 해동 온도 등이 있다. 정자를 냉동보존하기 위한 첫 과정은 적정 희석액의 선택이라 할 수 있다. 어류 정자의 보존에 있어 희석액으로는 희석시 정자가 삼투질 농도 차이에 따른 자극에 의해 활성화되는 것을 방지하고, 정자의 삼투압 농도와 유사해야 한다 (Jamieson., 1991). 지금까지

지 어류 정자의 냉동보존을 위해 많은 종류의 희석액이 이용되고 있다 (Piironen, 1993; Babiak et al., 1995). *Micropogonias undulatus* 정자의 냉동보존에서 sodium chloride, glucose 및 sucrose와 같은 간단한 희석액이 유리하고 (Gwo et al., 1991), *Hippoglossus hippoglossus*에서 Mounib's solution과 MFRS를 사용했을 때 보존효과가 좋은 것으로 나타났다 (Bolla et al., 1987). 그리고 현재 사람의 정자 냉동 보존에는 Ham's F-10을 이용하고 있다. 능성어의 정자 냉동보존에는 glucose가 다른 희석재에 비해 보존효과가 높은 것으로 나타났으며, 이는 당질 (glucose, sucrose)을 포함한 희석액이 복섬 (Gwe et al., 1993) 및 연어과 어류 (Piironen, 1993) 등에서 우수한 보존 효과를 나타낸 것과 유사하였다.

냉동보존을 위해 필요한 여러 가지 요인 중 가장 중요한 것은 정자가 동해를 입는 것을 방지해 주는 동해 방지제라고 할 수 있다. 이러한 동해방지제는 친수성이 있어야 하고, 세포막에 대한 투과성이 높아야 하며, 정자에 대한 독성이 낮아야 한다 (Jamieson., 1991). 동해방지제는 종 특이적인 경향이 상당히 강하기 때문에 모든 어류에 일률적으로 적용하기는 힘들다. 이 연구에서는 해산어류에 많이 이용되어지는 DMSO (Gwo et al., 1993)와 사람의 난자 냉동보존에 쓰이는 TYB를 이용하였다. 능성어의 정자 냉동보존에 있어서 이 2가지 동해방지제에 따른 차이는 없었다. 능성어의 정자 냉동 보존에 있어서 희석재에 의한 영향이 가장 크고, 희석재로는 glucose가 가장 우수한 효과를 보였다.

냉동보존된 정자의 해동후 운동성에 영향을 미치는 요인으로서는 평형시간 (Harvey, 1983)과 해동온도 (Caylor et al., 1994)에 의한 영향이 가장 크다. 냉동 보존된 능성어 정자의 운동성은 대부분 해동후 30~60분 사이에 가장 활발한 움직임이 나타났다.

일반적으로 냉동정자를 이용한 수정률과 부화율은 매우 낮게 나타난다 (Lahnsteiner et al., 2000; Linhart et al., 2000; Lahnsteiner et al., 2003). 이 실험에 있어서 GDS와 PDS 실험구의 수정률과 부화율은 대조구 (Row seman)과 같은 95% 내외의 높은 수정률과 부화율을 보였다.

난

어류의 난이 크기는 부화 자어의 크기, 색이능력, 기아내성, 이용할 수 있는 먹이 크기의 범위 및 포식자로부터의 도피 능력 등에 의한 자연계에서의 자어의 생존력을 높일 수 있는 중요한 요인이다 (Kayano, 1996). 그리고 난의 크기와 질은 어미의 먹이와 환경요인에 따라 변하며 난경과 부상율과는 유의한 상관관계가 있어, 난경이 대형의 군에서 부상율이 높게 나타난다 (Hamamoto et al., 1986).

지금까지 보고 된 능성어류의 난의 크기는 0.70~0.90 mm 범위이다 (Fukuhara, 1989; Chao et al., 1993). *E. costae*의 난경은 평균 0.93 mm 범위이고 (Glamuzina et al. 2000), 붉바리 난경은 평균 0.77 mm였고 (Lee et al., 1997), 능성어의 난경은 평균 0.88 mm이다 (Kitajima et al., 1991). 그리고 같은 종이라고 할지라도 서식지역에 따라 난경의 변화가 있다. *E. polyphkadion*의 난경은 홍해지역에서 0.71~0.79 mm 범위였고 (Rasem et al., 1997), 프랑스

Polynesian에 서는 평균 0.86 mm 였다 (Aquacop et al., 1989). *E. coioides*의 경우 홍해 지역에 서식하는 경우 난경은 평균 0.77 mm 였으며 (Hussain et al., 1975), 필리핀 지역에 서식하는 경우 평균 0.84 mm 였다 (Toledo et al., 1993). 이는 같은 종이라도 고염분 (42~43‰) 지역에 서식하는 경우 난경의 작아지는 경향을 보였다 (Rasem et al., 1997).

이 연구에서 능성어와 자바리 수정란은 모두 무색투명한 구형으로 분리 부성란이다. 그리고 능성어의 난경은 760~880 μm (평균 $821.8 \pm 2.0 \mu\text{m}$)이었고, 유구는 170~220 μm (평균 $192.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$) 였으며, 이는 Kitajima et al., (1991)의 연구보고와 유사하였다. 자바리의 난경은 830~950 μm (평균 $900 \pm 2 \mu\text{m}$)였으며, 유구경은 200~260 μm (평균 $244 \pm 3 \mu\text{m}$)이었다.

수정란의 난 발생 속도 및 부화율 등에 영향을 주는 요인으로서는 수온 이외에 조도, aeration 그리고 염분농도 등에 의해 영향을 받는다 (Watanabe et al., 1995). 수온 조건에 따라 부화하는데 소요시간은 붉바리는 약 25시간 (수온 25℃) 이었으며, *E. striatus*는 25~20시간 (수온 26~30℃), *E. polyphekadion*은 19시간 (수온 29~30℃)이었다 (Masso and Masaki, 1966; Watanabe et al., 1995; Rasem et al., 1997). 능성어의 부화 하는데 소요시간은 46~35시간 (수온 22~25℃)이었으며, 자바리의 소요 시간은 32시간 (수온 25℃)이었다. 수온이 높을수록 부화하는데 소요 시간이 짧아지는 경향을 나타내었다.

난황 및 유구의 흡수시간

난황이 큰 자어는 난황이 작은 자어와 비교해 볼 때 체조직과 난황에 많은 양의 에너지를 보유할 수 있음으로 PNR (point of no return)에 도달하기 전까지 먹이를 섭취할 수 있는 시간적 여유가 많다 (Bagarinao, 1986). 그리고 난황이 큰 자어는 첫 먹이 섭취시 자어의 크기가 상대적으로 크기 때문에 유영능력 측면에서 먹이 섭취 가능성이 높아 생존에 유리하다 (Hunter, 1981; Quattro and Weeks, 1991).

그리고 어류의 난황 흡수 속도는 사육조건에 따라 다르게 나타날 수 있으나, 아열대성 어류인 능성어류와 독가시치는 온대성 어류 어종에 비해 상대적으로 적은 난황을 보유하면서, 난황의 흡수는 빠르게 진행된다 (Bagarinao, 1986). 붉바리가 수온 25~29℃ 조건에서 부화후 24시간 이내에 90% 내외의 높은 난황 소모율을 보이고, 99% 이상 난황을 흡수하는 시점은 부화후 84~60시간이었다 (Lee and Hur, 1997). 이 실험에서 능성어와 자바리는 수온 25℃ 조건에서 48시간 이내에 대부분의 난황이 흡수되었으나 22℃ 조건에서는 부화 후 72시간까지도 일부 난황이 존재하였다.

어류의 부화 자어의 성장 및 생존에 있어서 개구후 외부 먹이 섭취를 통한 외인성 영양물질을 이용하기 이전 내인성 영양물질로 난황과 유구가 이용되어진다. 그리고 이 내인성 영양물질 중 일반적으로 유구가 난황보다 다소 늦게 흡수되어진다 (Kuo et al., 1974). 능성어와 자바리의 유구 흡수율은 부화 후 25℃ 조건에서 96시간 이전에 모두 흡수되었다. 그러나 22℃ 조건에서 개구후에도 일부 남아있었다 이러한 현상은 난황 흡수기 동안 비교적 늦게 이용되는 것으

로 알려져 있는 triglyceride와 깊은 관련이 있을 것으로 생각된다 (Fyhn, 1989; Clyde et al., 1992)

개구시간 및 입 크기 변화

능성어류의 개구시점은 붉바리는 수온 23-31℃ 조건에서 난황 및 유구가 각각 99%, 95% 정도 흡수된 부화후 62~42시간 때 였으며 (Lee and Hur, 1997), 수온 20~28℃ 조건에서는 84~46시간 이었다 (Kayano, 1988). 이 실험에서 능성어와 자바리의 개구 시간은 수온 22~25℃ 조건에서 96~72시간 이었다.

Shirota (1970)의 방법에 따라 계산한 개구시 자어의 입의 크기 0.5d는 능성어는 0.105 mm 이었으며, 자바리는 0.109 mm 이었다. 붉바리 자어의 먹이 섭취시 구경은 최소 0.5d로 가정한 경우 입 크기가 0.078 mm (Kayano, 1988; Lee and Hur, 1997)보다는 다소 컸다. 이 결과는 능성어와 자바리 개구시 첫 먹이 선택에 있어서 공급할 수 있는 먹이 선택에 더 많은 장점이 있다고 생각된다.

종묘생산

대부분의 해산 어류는 부화후 난황흡수가 완료되기 이전까지 개구, 안색소 침적 및 소화관 등의 기능이 갖추어 지면서 외부 영양섭취를 한다 (Moser et al., 1984). 어류 자어의 생존을 가능하게 하는 전략을 초기 발생단계동안 4종의 열대 해산 어류들 (*E. fuscoguttatus*, *Chanos chanos*, *Siganus guttatus*, *Lates calcarifer*)을 대상을 초기 자어의 입과 몸크기, 내인성 영양물질 축적, 섭이능력 등의 생물학적 측면을 비교했을 때, 농어류 *L. calcarifer* 자어는 비록 상대적으로 몸과 입 크기가 작지만 내부 영양분 비축물이 풍부한 우수하다. 반대로 송어류, *C. chanos* 자어는 내부 영양분과 섭이 능력은 부족하나, 몸 크기로 보충할 수 있다. 그러나 능성어류 자어는 어느 유형으로든 분류하기 어렵다. 왜냐하면 입과 몸 크기가 작고, 내부 영양분 비축물도 적으며, 초기 섭이량도 매우 낮기 때문이다 (Kohno et al., 1997).

어류 자어의 먹이 선호는 조우율 (encounter rate), 먹이 포획율 (feeding strike rate)와 섭이 성공률 (feeding success rate)과 같은 요소에 의해 결정된다 (Hunter, 1981). 또한 어류 자어의 먹이 감지 능력 (prey perception ability)과 먹이 포획이 섭이 개시 초에 낮다 (Buskey et al., 1993). 그리고 자어가 개구되어 외부 영양섭취를 할 수 있는 기능이 갖추어졌더라도 실질적으로 먹이를 섭취하는 시기는 이보다 늦다 (Avila and Juario, 1987). 능성어와 자바리의 경우도 부화후 3일째 개구되었으며 부화후 4일째 먹이를 섭취하였다.

능성어류의 종묘생산에 초기 먹이 생물로서 rotifer와 요각류의 nauplius 유생 그리고 굴 유생 등을 혼합 또는 단독으로 많이 이용하고 있다. *E. coiodes* 자어의 종묘생산 시기에 먹이 생

물을 혼합 공급했을 때 4일째에 100%에 섭이 하였으나, rotifer만을 공급한 수조에서 100%의 섭이발생은 9일째에 얻을 수 있었다. *E. coioides* 자어에 rotifer만을 공급한 것에 비하여 요각류 *Acartia* 또는 *Pseudodiaptomus*의 초기 nauplius 유생을 혼합 투여하는 것이 성장과 생존을 향상에 기여했다 (Toledo et al., 1997).

먹이 밀도가 낮은 경우 자어는 먹이를 섭취하기 위해 체에너지를 소모하게 되고, 먹이 섭취가 어려운 경우 사망률은 증가 한다 (Hunter, 1980; Laurence, 1977). 초기 먹이 생물로서 rotifer만을 이용한 실험에서 *E. coioides*와 *E. suillus* 자어에서 rotifer를 20,000 ind/l 밀도로 공급하였을 때 5일째 100%의 섭이하였다 (Duray, 1994). 반면 5일된 *E. taurina* 자어의 대부분은 5,000 ind/l 의 rotifer 밀도에서 먹이를 섭취한 개체는 없었다 (Randall and Heemstra, 1991).

그리고 rotifer만을 공급하는 경우 자어들은 먹이 섭취시 rotifer 중 소형 개체를 우선 선택한다 (Duray et al., 1997). 붕바리 자어의 소화관내 rotifer의 피감장은 부화 3~4일째 70~150 μm 이고, 부화 5일째 127~147 μm 였으며 최대치는 170~210 μm 로 부화 일수의 크기와 함께 서서히 크기가 증가하였다 (Kayano and Wan, 1997). 그리고 붕바리의 종묘 생산시기에 있어서 rotifer를 먹이 생물로 이용한 실험에 있어서 초기 감모 시기는 일령 5~7일 사이에 대량으로 폐사하였으며, 이는 먹이로서 rotifer를 이용하지 못한 것으로 생각된다 (Kim and Park, 1993).

이 연구에서는 종묘생산 시기에 S-type rotifer만을 15,000 ind/l 밀도로 단독으로 공급하여 종묘생산이 가능하였다. 먹이 밀도와 종류는 종 특이적인 먹이 선택성과 초기 먹이 섭취시 구경의 크기에 기인하는 것으로 사료된다.

성장

부화 직후 능성어와 자바리 자어의 성장은 난황 흡수가 빠르게 진행되는 부화후 24시간까지는 급격한 증가를 하였으나, 이후 먹이를 섭이하는 부화후 5일 이내에는 성장이 완만한 증가 또는 거의 정지 상태를 보였다. 먹이를 섭이하여 대사 에너지로 이용하기 전까지 체성분이 대사 에너지로 이용 (Ishibashi, 1974)되었기 때문이라 사료된다. 그리고 이후 성장의 변화를 보면 변태시기부터 서서히 증가하기 시작하여 변태 완료 후에 빠른 성장을 보인다. 자바리의 성장은 변태 시작시 4.12 ± 0.09 mm에서 변태 완료시기에 30.74 ± 0.95 mm까지 성장하였다. 이후 급격한 성장을 하여 부화후 93일째 93.78 ± 1.98 mm까지 성장하였다. 능성어류: *C. altivelis* (Sugama and Ikenoue, 1999), 능성어 (Kitajima et al., 1991), *E. fuscoguttatus*, *E. polyphekadion* (James et al., 1998), *E. suillus* (Duray et al., 1997)의 성장과 유사하였다.

그리고 등지느러미 제2극과 배지느러미 극은 변화는 능성어에서 체장 8 mm 전후시기에 체장의 90%, 65%로 최대를 보이고 이후 성어와 유사한 상대성장을 보인다 (Kitajima et al., 1991). 자바리의 등지느러미 제2극과 배지느러미 극의 변화는 각각 부화후 38일에 5.35 ± 0.20 mm, 4.11 ± 0.17 mm 까지 성장하였다. 전장에 대한 상대성장은 능성어와 비슷한 전장 8 mm 전

후시기에 전장의 40%, 35%로 최대를 보였다.

능성어류의 성장은 사육 조건에 따라 차이가 있으나, 변태시기를 거쳐 artemia와 인공 사료를 섭이 이후부터 성장이 빠르게 진행되어 (Duary et al., 1997), artemia와 인공사료가 rotifer보다 더 많은 에너지를 함유하고 있어서, 섭이시 성장에 도움을 준다고 생각된다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용 계획

1. 실적

- 국내외 전문학술지 게재

연구자		연구제목	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관(국명)
국내	이영돈, 송영보	농성어류의 양식 산업을 위해서(1)	한국양식	Vol. 13. No 2	2001. 10	한국양식

-국내 및 국제학술회의 발표

발표자		발표제목	학술대회명	인쇄물 명칭, 통권, 호	년, 월, 일	장소, 국명
국내	송영보, 이치훈, 서종표, 이영돈	농성어의 산란과 난발생	한국양식학회 추계학술발표회	2001년도 추계발표회 요약집	2001. 11. 2	한국해양연구원, 한국
	송영보, 서종표, 지보근, 오성립, 이영돈	자마리의 난발생 및 자·치어 형태 발달	한국양식학회 추계학술발표회	2003년도 추계발표회 요약집	2003. 10. 23	강릉대학교, 한국
국외	Young-Bo Song, Jong-Pyo Seo, Se-Jae Kim, Young-Don Lee	Induction of sex reversal in juvenile sevenband grouper by injection of 17 α - methyltestosterone	The annual meetings of the world aquaculture society & the china society of fisheries	Book of abstracts- World Aquaculture 2002	April 23~27. 2002.	Beijing, China

-홍보실적(신문, 방송, 저널 등)

번호	홍보유형	매체	제 목	내 용	일시
1	월간잡지	수산양식	특별기고/농성어류 양식기술 개발	농성어류의 양식기술개발	2003.5
2	지방TV방송	KBS 9시 저녁 뉴스	농성어 수정란 생산	농성어의 수정란 대량생산 성공	2003.7
3	기타	연합뉴스	구문쟁이 인공수정 첫 성공	농성어의 인공수정란 생산	2003.7
4	지방Radio	제주 MBC 제주비전 열린이야기	제주산 고급어종인 농성어 대량생산 길 마련돼	농성어 종묘 생산길 열려	2003.7
5	지방일간지	제주일보	“구문쟁이” 대량생산 가능	제주산 고급어종이니 농성어 대량 생산할 수 있는길 열려	2003.7
6	중앙TV방송	KBS 7시 전국네트워크	농성어 수정란 대량 생산	농성어류의 양식 생산길 열려	2003.7
7	월간잡지	수산양식	현장을 가다 - 제주대 해양과환경연구소	다금바리의 배일을 벗긴다.	2003.9
8	지방일간지	한라일보	농성어 치어생산 성공	농성어류의 종묘생산 성공	2003.9
9	지방일간지	제주일보	다금바리 양식 성공-바다 목장화 청신호	대학수산 치어 생산-자원증가 효과	2003.9
10	지방일간지	한라일보	기획기사-5 명품으로 승부한다	제주산 다금바리	2003.9
11	지방일간지	제민일보	다금바리 양식시대 열렸다	국내 처음으로 다금바리 치어 인공생산 성공	2003.9
12	월간잡지	현대해상	다금바리 어미 관리와 종묘생산	다금바리 어미 관리와 종묘생산	2003.11
13	지방TV방송	JIBS 뉴스	다금바리 양식 성공	다금바리 인공 양식이 가능	2003.11

※ 보도 자료 일부 첨부

2. 연구결과별 활용계획

핵심기술 (연구내용)	활 용 계 획
능성어 어미 사육관리 및 성성숙 유도 기술	관련학회 및 수산관련 연구소의 세미나 참석을 통한 연구결과 발표 및 논문을 투고하여 기술적변 확대에 활용
능성어 수정란 생산	
능성어의 정자 동결 보존 기술	
능성어류의 종묘생산 기술	

제 6 장. 참고문헌

- Aida, K. 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms in teleostei. Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph. 16 : 173~187.
- Aquacop, J. Fuchs, G. Nedelee and E. Gasset. 1989. Selection of finfish species as candidates for aquaculture in French Polynesia. Advances in tropical aquaculture. Actes de Colloques. IFREMER, 9 : 143~156.
- Avila, E. M. and J. V. Juario, 1987. Yolk and oil globule utilization and developmental morphology of the digestive tract epithelium in larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). Aquaculture, 65 : 319~331.
- Babiak, I., J. Glogowski, M. J. Luczynski, D. Kucharczyk and M. Luczynski. 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. J. Fish Biol., 46: 819~828.
- Bagarinao, T., 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. Marine Biology, 91 : 449~459.
- Blaxter, J. H. S. and G. Hempel. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). J. Cons. int. Explor. Mer. 28 : 211~244.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture, 65 : 371~374.
- Bromage, N., M. Porter and C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture, 197 : 63~98.
- Bromage, N. R. and R. J. Roberts. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, pp. 424.
- Buskey, E. J., C. Coulter and S. Strom. 1993. Locomotory patterns of microzooplankton: potential effects on food selectivity of larval fish. Bull. Mar. Sci., 53 : 29~43.
- Caylor, R. E., P. M. Biesiot and J. S. Franks. 1994. Culture of cobia, *Rachycentron canadum*: cryopreservation of sperm and induced spawning. Aquaculture, 125 : 81~92.
- Chao, T. M. and M. Chow. 1990. Effects of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.) Singapore J. Pri. Ind., 18 : 1~14.
- Chao, T. M. and L. C. Lim. 1991. Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 19 : 79~93.
- Chao, T. M., L. C. Lim and L. T. Khoo. 1993. Studies on the breeding of brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) in Singapore. Finfish hatchery in Asia. TML

Conference Proceedings 3 : 143~156.

- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim. 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskal) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind. 5 : 1~21.
- Clyde, S. T., A. Harry and C. S. Lee, 1992. Fatty acid and free amino acid profiles of spawned eggs of striped mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 105 : 83~94.
- Colin, P. L., W. A. Laroche and E. B. Brothers. 1997. Ingress and settlement in the nassau grouper, *Epinephelus striatus* with relationship to spawning occurrence. Bulletin of Marine Science, 60 : 656~667.
- Crim, L. W., J. J. Nestor Jr. and C. E. Wilson. 1988. Studies of the biological activity of LHRH analog in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. Gen. Comp. Endocrinol., 71 : 372~382.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter. 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. IXB, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351~403.
- Duray, M. N. 1994. Daily rates of ingestion on rotifers and *Artemia* nauplii by laboratory-reared grouper larvae of *Epinephelus suillus*. Philipp. Sci., 31 : 32~41.
- Duray, M. N., C. B. Estudillo and L. G. Alpasan. 1997. Larval rearing of the grouper *Epinephelus suillus* under laboratory conditions. Aquaculture, 150 : 63~76.
- FAO. 1993. FAO species catalogue Vol. 16. Groupers of the world. pp. 1~10. FAO Rome.
- Fostier, A., F. Le Gae and M. Loir. 1987. Steroids in male reproduction. In Proceedings of the Third international symposium on reproductive physiology of fish (Idler, D. R., L. W. Crim and J. M. Walsh, eds). pp. 239~245. St John's. Canada Memorial University.
- Fyhn, H. J., 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy. Aquaculture, 80 : 111~120.
- Fukuhara, O. 1989. A review of the culture of grouper in Japan. Bulletin of the Regional Fisheries Laboratory, 22 : 47~57.
- Glamuzina, B. N. Glavić, P. Tutman, V. Kožul and B. Skaramuca. 2000. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1875). Aquaculture International, 8 : 551~555.
- Gwo, J. C., H. Kurokura and R. Hirano. 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. Nippon Suisan Gakkaishi, 59 : 777~782.

- Gwo, J. C., K. Strawn, M. T. Longnecker and R. Connie. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94 : 355~375.
- Hamamoto, S., K. Yokogawa and M. Tochino. 1986. Several problems on cultivating the parent fish of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schegel), and judging the qualities of the eggs obtained from them. *Bull. Kagawa Pref. Fish. Exp. Stn.*, 2 : 13~22.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32 : 313~320.
- Hassin, S. D. de Monbrison, Y. Hanin, A. Elizur, Y. Zohar and D. M. Popper. 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156 : 305~316.
- Hodson, R. and C. V. Sullivan. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24 : 389~398.
- Hunter, J. R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. in: *Marine fish larvae-morphology. Ecology and Relation to Fisheries* (ed. by R. I. Lasker). Univ. Washington Press. Seattle and London., 33~77.
- Hunter, J. R. 1980. The feeding behavior and ecology of marine fish larvae. In: J.E. Bardach, J.J. Mabnuson, R.C. May and J. M. Reinhart (Eds.), *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. ICLARM Conf. Proc., 5 : 287~330.
- Hussain, N. A., M. Saif and M. Ukawa. 1975. On the culture of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). Kuwait Institute for Scientific Research, Kuwait. pp. 12.
- Hussain, N. A. and M. Higuchi. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Aquaculture*, 19 : 339~350.
- Hwang, S. I, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho. 1998. Gonadal development and the effect of 17 α -methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J. Aquaculture*, 11 : 173~182.
- Jamieson, B. G. M. 1991. *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, New York. pp. 319.
- James, C. M., S. A. AL-Thobaiti, B. M. Rasem and M. H. Carlos. 1998. Comparative growth of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* and camouflage grouper, *E. polyphakadiuin* under hatchery and growout culture conditions. *Asian Fisheries Science*, 11 : 133~147.
- Johnson, A. K., P. Thomas and R. R. Wilson Jr. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous

- grouper in the eastern gulf of Mexico. J. Fish biology, 52 : 502~518.
- Ishibashi, N., 1974. Feeding, starvation and weight changes of early larvae. In: The early life history of fish. 339~344. Ed. by O.H.S. Blaxter. New York.
- Kayano, Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper *Epinephelus akaara*. Saibai. Giken., 3 : 55~60.
- Kayano, Y. 1996. Yearly change in egg production of the red spotted grouper *Epinephelus akaara* in a rearing tank. Saibai. Giken. 25 : 47~52.
- Kayano, Y. and H. Y. Wan. 1996. Initial feeding and growth of larval red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Suisanzoshoku, 45 : 213~218.
- Kim S. G. and S. Park. 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bulletin of NFRD, 101 : 137~140.
- Kim S. H. and P. H. Kim. 1993. Studies on the technology development for seed production of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bulletin of NFRD, 101 : 162~167.
- Kim B. H., K. M. Kim, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* I. The effect of HCG on ovulation induction. J. of Aquaculture, 10 : 55~61.
- Kim, I. S., Y. Choi and B. J. Kim, 2001. Percoid fishes of Korea. Korea research institute of bioscience and biotechnology, Korea, pp. 279.
- Kitajima, C., M. Takaya, Y. Tsukashima and T. Arakawa. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. Jap. J. Ichthyol. 38 : 47~55.
- Kohno, H., R. S. O. Aguilar, A. Ohno and Y. Taki. 1997. Why is grouper larval rearing difficult?: an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. Ichthyl. Res., 44 : 264~274.
- Kuo, C. M., C. E. Nash and Z. H. Shehadeh. 1974. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 3 : 1~14.
- Kuo, C. M., Y. Y. Ting and S. L. Yeh. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. Aquaculture, 74 : 113~126.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, A. Horvath, B. Urbanyi and T. Weismann. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology, 54 : 1477~1498.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, and T. Weismann. 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology, 60 : 829~841.
- Laurence, G. C. 1977. A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential

- of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. Fish. Bull. US, 75 : 529~546.
- Lam, T. J. 1982. Application of endocrinology of fish culture. Can. J. Aquat. Fish. Sci., 39 : 11~137.
- Lee, C. K. and S. B. Hur, 1997. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. Aquaculture, 10 : 473~483.
- Lee, C. K. and S. B. Hur, S. Park and B. G. Kim. 1997. Qualities of spawned eggs during the spawning period in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. J. Aquaculture, 10 : 463~472.
- Lee, S. T., T. J. Lam and C. H. Tan. 2000. Corticosteroid biosynthesis in vitro by testes of the grouper (*Epinephelus coioides*) after 17 α -methyltestosterone induced sex inversion. J. Experimental Zoology, 287 : 453~457.
- Lee, S. T., T. J. Lam and C. H. Tan. 2002a. Increased 21-hydroxylase and shutdown of C_{17,20} lyase activities in testicular tissues of the grouper (*Epinephelus coioides*) during the 17 α -methyltestosterone induced sex inversion. General and Comparative Endocrinology, 126 : 298~309.
- Lee, Y. D., S. H. Park, A. Takemura and K. Takano. 2002b. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycle in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawa waters. Fisheries Science, 68 : 872~877.
- Lim, L. C., T. M. Chao and L. T. Khoo. 1990. Observations on the breeding of brown-marbled grouper *Epinephelus fusocguttatus* (Forsk.) (Forsk.). Singapore Journal of Primary Industry, 18 : 66~84.
- Linhart, O., M. Rodina and J. Cosson. 2000. Cryopreservation of sperm of common carp *Cyprinus carpio* ; sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology, 2000 : 241~250.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. G. Finoia, Y. Zohar and C. C. Mylonas. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant, Aquaculture, 219 : 841~858.
- Moser, H. G., W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, Jr. and S. L. Richardson (Eds.), 1984. Ontogeny and systematics of fishes. pp. 760. Spec. Publ., No. 1. American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- Munro, A. D. 1990. Tropical freshwater fish. In: Munro, A., Scott, A., Lam, T. (Eds.), Reproductive seasonality in Teleosts : Environmental Influences. CRS Press, Florida, pp. 145~239.

- Nish, K. 1979. A daily rhythm in the photosensitive development of the in the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 30 : 109~115.
- Okumura, S., K. Okamoto, R. Oonori and A. Nakazono. 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Aquaculture, 206 : 165~173.
- Park, M. E. 2000. Control of reproductive mechanism related to parturition of Black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Dr Scient. Thesis, University of Cheju.
- Peter, R. E., H. R. Lin, G. van der Kraak and M. Little. 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: Muir, J. F., Robers, R. J. (Eds.), Recent Advances in Aquaculture. Blackwell Scientific, Oxford. pp. 25~30.
- Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture, 48 : 337~350.
- Quattro, J. M. and S. C. Weeks, 1991. Correlations between egg size and egg energetic content within and among biotypes of the genus *Poeciliopsis*. J. Fish Biol., 38 : 331~334.
- Quinitio G. E., N. B. Caberoy, and D. M. Reyes Jr. 1997. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. Isr. J. Aquaculture. Bamidgeh., 49 : 77~83.
- Randall. J. E. and P. C. Heemstra. 1991. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae). with descriptions of five new species. Indo-Pacific Fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum. Honolulu. Hawai., pp. 322.
- Rasem, B. M. C. M. James, S. A. Al-Thobaiti and M. H. Carlos. 1997. Spawning of the camouflage grouper *Epinephelus polyphekadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of Saudi Arabia. Asian Fisheries Science, 9 : 251~259.
- Sherwood, N. M., D. B. Parker, J. E. McRory and D. W. Lescheid. 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. In : Sherwood, N. M., Hew, C. L. (Eds.), Fish Physiology. Molecular Endocrinology of Fish, vol. VIII, Academic Press, New York, pp. 3~66.
- Shirota, A., 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 36 : 353~368.
- Song, Y. B., Y. J. Park, A. Takemura, H. J. Kim, M. S. Choi, Y. C. Choi and Y. D. Lee. 2003. Histological observations of the female reproductive cycle of honeycomb grouper, *Epinephelus merra* in Chuuk. Dev. Reprod., 7 : 20~28.
- Sugama, K. and H. Ikenoue. 1999. Research and development: The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA., pp. 53.
- Strussmann, C. A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey,

- Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish. Sci., 60 : 9~13.
- Tan-Fermin, J. D. and L. M. B. Garcia and A. R. Jr. Castillo. 1994. Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes) by injections of 17 α -methyltestosterone. Jap. J. Ichthyol., 40 : 413~420.
- Takaya, M. and T. Aarakwa. 1987. Hormon treatment for spawning induction of *Epinephelus moara* and *E. septemfasciatus*. Bulletin of Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, 13 : 16~18.
- Tanaka, H, K. Hirose, K. Nogami, K. Hattori and N. Ishibashi. 1990. Sexual maturation and sex reversal in red grouper, *Epinephelus akaara*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 17 : 1~15.
- Taranger, G. L. 1993. Sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.; aspects of environmental and hormonal control. Dr Scient. Thesis, University of Bergen.
- Toledo, J. D., A. Nagi and D. Javellana. 1993. Successive spawning of grouper, *Epinephelus suillus* (Valenciennes), in a tank and a floating net cage. Aquaculture, 115 : 361~367.
- Toledo, J. D., S. N. Golez, M. Doi and A. Ohno. 1997. Food selection of early grouper, *Epinephelus coioides*, larvae reared by the semi-intensive method. Suisanzoshoku, 43 : 327~337.
- Tsuchihashi, Y., H. Tanaka, Y. Kuromiya, M. Kashiwagi and M. Yoshioka. 2003. Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Suisanzoshoku, 51 : 189~196.
- Watanabe, W. O., E. P. Ellis, S. C. Ellis and M. W. Feeley. 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. J. World Aqua. Soc., 29 : 393~404.
- Watanabe, W. O., S. C. Ellis, E. P. Ellis, W. D. Head, C. D. Kelly, A. Moriwake, C. S. Lee and P. K. Bienfang. 1995. Progress in controlled breeding of nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. Aquaculture, 138 : 205~219.
- Yeh, S. L., C. M. Kuo, Y. Y. Ting and C. F. Chang. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture, 218 : 729~739.
- Zohar, Y., and C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197 : 99~136.
- Zohar, Y., A. Goren, M. Tosky, G. Pagelson, D. Leibovitz and Y. Koch. 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo and in vitro studies. Fish. Physiol. Biochem., 7 : 59~67.

제주일보

목요일
7월 10일
2003년
제주시청 1층 제11호

The Jeju Daily News

www.jejunews.com

‘구문쟁이’ 대량 생산 가능

중요생산 연구 2년6개월 만에 성과

제주대 해양과환경연구소 이병

준 교수는 9일 “국내 최초로 농성
어 알기(체중 4.5kg)에서 5000개
의 성숙란을 수확한 결과 더 중
요생산량 50%를 대량 생산하
는 데 성공했다”고 밝혔다.

이 교수는 “이제는 상해연구팀
(한국수산·대학수산·제주도해양수
산연구소·국립수산과학원·남
제주수산청·제주대 생명과학기술
연구소)은 2001년 ‘농성어 번식
기술 개발을 통한 양식산업화’로
는 연구 주제로 한국해양수산개발
원 수상특정 연구개발과제에 선정
돼 2년6개월 동안 농성어 중요
생산에 의해 연구해 왔다.

연구팀은 농성어의 성 특성에 대

한 연구 성과를 토대로 최종성숙우
도기(성숙)와 생명과학기술을 이용, 일
종의 성숙도를 유도하고 성 전하
수치를 통해 정자를 확보한 뒤 인
공 수정시킨 결과 대량의 인공수정
란을 생산하는 데 성공했다.

이에 따라 인공수정란 생산이 어
류의 양식 양식 대량 개발 여건에
서 제로백전 농성어가 양식 산업화
를 위한 대량 생산이 가능하게 된
다. 농성어는 50~60cm 수심의 암
초가 있고 해초류가 많은 곳에서
주로 서식하며 눈 색깔은 붉은색을
 띠며 약한 효능이라고 알려지며 7월
의 특산물로 기록되고 있다.

이 교수는 “농성어 생식 생산기
술이 개발됨에 따라 새로운 양식
종류 개발을 위한 제주 특산 해양
생물 발전에도 한신으로 작용할
것으로 기대하고 있다”고 밝혔다.

〈최경영 기자〉

jeju@jeju.com

名品으로 승부를 건다.

제주산 다름바리 (자바리)

양식산업·브랜드화로 살린다

[illegible]

제주에서만 잡히는 특산물

개척수업의 문헌기록 정리

1950년 12월 25일, 서울에서 태어났다. 서울대학교에서 철학과 사학을 전공했다. 1975년 서울대학교 철학과에서 석사학위를 취득했다. 1978년 서울대학교 사학과에서 박사학위를 취득했다. 1980년 서울대학교 사학과 조교수, 1983년 서울대학교 사학과 교수로 임명되었다. 1985년 서울대학교 사학과 학과장, 1988년 서울대학교 사학과 학과장, 1991년 서울대학교 사학과 학과장, 1994년 서울대학교 사학과 학과장, 1997년 서울대학교 사학과 학과장, 2000년 서울대학교 사학과 학과장, 2003년 서울대학교 사학과 학과장, 2006년 서울대학교 사학과 학과장, 2009년 서울대학교 사학과 학과장, 2012년 서울대학교 사학과 학과장, 2015년 서울대학교 사학과 학과장, 2018년 서울대학교 사학과 학과장, 2021년 서울대학교 사학과 학과장, 2024년 서울대학교 사학과 학과장.

[illegible]

1. 1945년 8월 15일 일본이 패망한 후, 우리 민족은 해방을 맞이하게 되었다. 그러나 해방 후에도 우리 민족은 여전히 일본의 지배를 받고 있었다. 1945년 8월 15일 일본이 패망한 후, 우리 민족은 해방을 맞이하게 되었다. 그러나 해방 후에도 우리 민족은 여전히 일본의 지배를 받고 있었다.

무엇다른 부연으로 말씀하시고 처음 나타나는 것은 1945년 실종된 남편을 찾았어라'였다. 이후 수차례의 실종과 재회를 반복한 여인은 드디어 프랑스로 이고선 되고, 이 해인 1977년 한국이후도움을 주. 결국 돌아, 돌아와서 한국에서 돌아 간 남편: 여인은 다시(이후)이후 수 차례의 실종과 재회를 반복한 여인은 드디어 프랑스로 이고선 되고, 이 해인 1977년 한국이후도움을 주. 결국 돌아, 돌아와서 한국에서 돌아 간 남편: 여인은 다시(이후)이후 수 차례의 실종과 재회를 반복한 여인은 드디어 프랑스로 이고선 되고, 이 해인 1977년 한국이후도움을 주. 결국 돌아, 돌아와서 한국에서 돌아 간 남편:

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

이런 50대, 60대 전후세대는 경제적으로 여유가 있을지 모르지만, 건강이 걱정이다. 특히 고혈압, 당뇨병, 비만, 고지혈증 등 만성질환이 많고, 암 발생률도 높다. 이런 문제를 해결하기 위해, 정부는 '건강관리'를 강조하고 있다. 특히, '건강관리'를 강조하고 있다. 특히, '건강관리'를 강조하고 있다.

한편, 장로회에서는 장로회총회 시정발령을 위해 정기간 회합과 및 기동자를 둔 대청의 안구와를 수색하고 있다. 같은도 서로 관수지반 오개나이를 총모집인 한해 있다. 재민은 유년이다. 장로회 총회를 해마다 개교한 이후에 상하 신학자들과 교류한다.

[illegible][illegible]

0.8%로 추산되는 것으로 나타났다. 반면 18~24세 연령층에서는 0.1%로 추산되는 것으로 나타났다.

수정판,종교생산 성공해

양식산업화 가능성 확인

[illegible]

작으로 중국산의와 감정도 밝히며했다고 있다.
 때문에 서주산 다음날의 보령군회와 충청남도
 3 일간을 출생의 후한 정심해/고 있다.

이 시에서 반드시 비로와야 할 것은 어떤
이다. 새로운 다음세대의 우월적인 수용이
는 저절로 형성되도록 조치를 취하고
있고, 다음세대는 전통 대신 이념(이념주의)
수용을 거론하고 있는 실정이다. 이념으로
일관한 투쟁을 다음세대는 적극으로 취
할 가능성이 있다.

도내 4개교를 중심으로 제1회 12집단의 이
동할 시기 위한 꾸준한 노력의 결실이다
/한양철거지

உருகாத கங்கைமுகம்

[illegible]

0:00:00 00:00:00

[illegible][illegible]

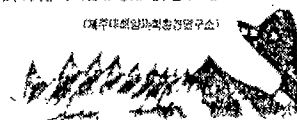
정호준 지주인과 추구영은 해방직접협회 회원으로 지현에서
대금바리 장년생장에 파출은 정호준 바닷가에서 농사지을
가 가지는 이에서 기지출 국고회장은 정호준으로인하여
정호준

(해주(海州))최충(崔忠)연구소

100

... ..

(원주(律)현암)·최충(崔)정(鄭)구(具)소(小)



보도자료 예3

