



## 이 학 석 사 학 위 논 문

# 산란 유도 호르몬 처리에 따른 붉바리 Epinephelus akaara의 난질 평가 인자 분석





이 다 솜

## 이 학 석 사 학 위 논 문

# 산란 유도 호르몬 처리에 따른 붉바리 Epinephelus akaara의 난질 평가 인자 분석

지도교수 백 혜 자

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 8월

OL

부경대학교대학원

해양생물학과

이다솜

# 이다솜의 이학석사 학위논문을 인준함.

2019년 8월 23일



목 차

List of figures	iii
List of tables	V
Abstract	vi
I. 서 론	1
Ⅱ. 재료 및 방법 ······	4
2.1 실험어 및 산란 유도 호르몬 처리	4
2.2 수정 및 난과 자어의 초기 발생 과정 분석	6
2.3 지방산 분석	8
2.4 난질 관련 유전 인자 발현 분석	9
2.5 통계 분석	11

Ⅲ. 결 과	12
3.1 형태학적 특징 분석	12
3.1.1 산란 및 수정	12
3.1.2 수정란 관찰	15
3.1.3 자어 난황 흡수 관찰	21

3.2 지방산 분석	24
3.2.1 미수정란의 지방산 조성	24
3.3 Cathepsin 분석 ·····	27
3.3.1 붉바리 수정란의 cathepsin 발현 양상	27

## List of figures

Fig. **1.** Measurement of hormone-treated red spotted grouper Epinephelus akaara, (A) egg and lipid droplet diameters (ED and LD), (B) yolk length and depth (YL and YD). ..... 7 Fig. 2. Mean spawning and fertilization rates, and volume of spawning eggs of hormone-treated red spotted grouper Epinephelus akaara. 14 Fig. 3. The observation of egg and lipid droplet during egg development in fertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper Fig. 4. The volumetric ratio of lipid droplet/egg (L/E) in fertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper Epinephelus akaara... 18 Fig. 5. The survival rate in fertilized eggs of hormone-treated red Fig. 6. The observation of yolk during larval development of hormone-treated red spotted grouper Epinephelus akaara. ..... 22 Fig. 7. The yolk volume in hatching larvae of hormone-treated red Fig. 8. he major fatty acid composition in unfertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara.* 26 **Fig. 9.** Transcript levels of cathepsin B and L in fertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara.* 28



## List of tables

Table 1. Water temperature at each experiment, mean (±standarderror, SE) total length and body weight, injected hormone type anddose, and number of females of red spotted grouper *Epinephelus*akaara broodstock.5Table 2. List of primers used in this study.10Table 3. Spawning rate, mean (±SE) volume of spawning eggs andfertilization rate at each experiment of hormone-treated red spottedgrouper *Epinephelus akaara*.13Table 4. The total fatty acid composition of unfertilized eggs ofhormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.25

S CH OL W

Analysis of assessment factors for egg quality

by spawning-induced hormone treatment of red spotted grouper *Epinephelus akaara* 

Da Som Lee

Department of Marine Biology, The Graduate School,

Pukyong National University

#### Abstract

Control of spawning is essential for the sustainability of aquaculture production in captivity and egg quality management is an important for healthy seed production of fish. The red spotted grouper Epinephelus akaara, have high commercial value in Korea, Japan, China, and Southeast Asia. However, commercial production is still due problems very limited to of spawning induction and synchronization. The objective of this study is to improve the quality of spawned eggs through hormone treatment and the quality was evaluated by morphological characteristics, fatty acid composition and maternal gene expression (cathepsin B and D). Red spotted grouper broodstocks were injected intramuscularly with human chorionic gonadotropin (hCG), prostaglandins (PGs; PGE2 and PGF2a), and luteinizing hormone-releasing hormone analog (LHRHa). Spawning occurred 36 to 40 hours after hormone treatment. The spawning rate was 47.8±3.95% at hCG treatment, 41.7±8.33% at PGF2a treatment and 37.5±12.50% at LHRHa treatment group. Fertilization rate was 81.4±14.30% at hCG treatment, 92.8% at PGF2a treatment and 99.1±0.46% at LHRHa treatment. The spawning rate was highest at hCG treatment group. The highest fertilization rate was observed at LHRHa treatment group. Egg and lipid droplet diameters were observed after 1, 2, 3, 6, 12, 24 and 36 hours of fertilization and the resorption rates of yolk in larvae were analyzed after 0, 2, 12 and 24 hours of hatching. In LHRHa treatment group, the volumetric ratio of lipid droplet/egg (L/E) was higher than that of hCG treatment group. The yolk volume in the LHRHa treatment group was higher than that of the hCG treatment group. The docosahexaenoic acid (DHA) in PGF2a treatment group was higher than that of LHRHa and hCG treatment groups. Cathepsin B expression of LHRHa treatment group higher than hCG treatment group until 36 hours after was fertilization. The results of this study indicate that LHRHa treatment is effective for egg quality improvement in E. akaara, although the spawning rate is lower than the hCG treatment group.

I. 서론

경골어류의 난소발달 과정은 시상하부-뇌하수체-생식소의 축(Hypothalamus-pituitary-gonad axis; H-P-G axis)에 의해 조절되며, 생식선자 극호르몬(gonadotropins, GtH)인 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)의 혈장 내 농도 증가와 함께 LH에 의해 성숙유도호르몬 (maturation-inducing hormone, MIH) 분비를 자극함으로써 난모세포의 성숙과 배란이 이루어진다(Lubzens et al., 2010). 경골어류의 주요 MIH 로 알려져 있는 prostesterone의 유도체인 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen -3-one (17α20βP)와 17α,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17α20β 21P)는 난모세포의 최종 성숙을 유도하며(Nagahama et al., 1994; Nagahama and Yamashita, 2008; Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003; Lubzens et al., 2010; Kagawa, 2013), 이 후 난모세포의 여포 층 으로부터 난모세포가 방출되는 배란이 시작된다(Goetz, 1983).

일반적으로 실내 양식 환경에서 어류의 성숙 및 생식소 발달은 가능하 지만 난모세포의 최종 성숙(final oocyte maturation, FOM)에 실패하거 나 산란을 하지 않는 경우가 많다(Mehdi and Ehsan et al., 2013). 어류 양식에서 호르몬에 의한 산란 유도는 수정란을 동시에 생산하여, 생산시 기를 조절하기 위해 필수적이며, 해양 어류에서는 대부분 human chorionic gonadotropin (hCG)와 luteinizing hormone-releasing hormone analog (LHRHa)가 이용된다(Wahbi et al., 2017). LHRHa는 GtH의 분 비를 촉진하며, hCG는 GtH와 같은 역할을 한다. 최근에는 배란과 LH 대량분비(surge)에 관여하는 것으로 알려져 있는(Stacey and Goetz,

1982) prostaglandins (PGs)도 이용된다(Takahashi et al., 2018).

인위적인 산란 유도를 하는 과정에서 난질 평가는 필수적이다. 난질 은 수정, 부화 및 첫 먹이 섭취 시기의 생존율을 통해 정의되며 (Bromage et al., 1992), 난질을 평가하기 위해서는 난이 수정되고 정상 적인 배(embryo)로 발달하는 시기까지 관찰해야 한다(Bobe and Labbé, 2010).

여러 연구에서 어류의 난질을 평가하기 위한 다양한 형태학적, 생화학 적, 분자생물학적 지표들이 제안 되고 있다(Bobe and Labbé, 2010; Valdebenito et al., 2013). 형태학적 지표는 배란 직후의 미수정란부터 수정란과 안구형성기까지의 생존율, 수정률, 난할 패턴, 그리고 부상란의 경우 부상력(buovancy)이 사용된다(Sakai et al., 1985; Kjörsvik et al., 1990; Mansour et al., 2007; Bobe and Labbé, 2010). 생화학적 분석을 통한 난질 평가 지표는 주로 수분, 단백질, 아미노산, 비타민, 총 지질량, 지방산 조성 등이 사용되며, 지방산 조성에서는 특히 docosahexaenoic acid (DHA)와 DHA/Eicosapentaenoic acid (EPA) 및 n3:n6 지방산의 비 율이 사용된다(Seaborn et al., 2009; Lanes et al., 2012; F.G da Silva et al., 2018). 분자생물학적 지표는 초기 배 발달 동안의 난황 대사에 관여 하는 것으로 알려진 cysteine protease cathepsin B, cathepsin L 및 aspartic protease cathepsin D가 연구되고 있으며(Carnevali et al., 2001; Kwon et al., 2001; Carnevali et al., 2006; Cerdà et al., 2007; Finn and Fyhn, 2010; Tingaud-Sequeira et al., 2011), 이외에도 다양한 지표들에 대한 연구가 진행되고 있다.

불바리는 한국, 중국, 일본, 동남아시아 등에서 상업적으로 중요한 고 부가가치 어종이지만 세계자연보전연맹(IUCN)의 적색목록(red list)에 의 하면 멸종위기(endangered, EN)종으로 분류되어 있어 양식을 통한 종자

생산을 필요로 하고 있다. Okumura et al., (2002)에 의하면 붉바리를 인 공 수정시킨 경우 수정률은 84.3%로, 수조에서 자연 산란하여 자발적으 로 수정시킨 수정률(19.0%)보다 유의하게 높았으나 자연산란 유도에 어 려움을 겪고 있다.

따라서 본 연구에서는 산란 유도 호르몬을 처리한 후 인공수정하여, 호르몬에 따른 난과 유구의 크기, 수정 후 난할과정동안의 형태적 특징 과 산란율, 수정률, 생존율, 지방산 조성, 그리고 cathepsin mRNA 유전 자 발현의 차이를 통해 난질을 <u>평가하고</u>자 하였다.



# Ⅱ. 재료 및 방법

## 2.1 실험어 및 산란 유도 호르몬 처리

실험어는 광주기 및 수온 조절에 의해 성숙 유도된 붉바리(*Epinephelus akaara*) 친어 개체를 사용하였다. 실험은 총 4회(2017년 6월, 2017년 7월, 2018년 2월 그리고 2018년 6월)에 걸쳐 수행되었다. 1, 2차 실험은 붉바리 의 산란 유도를 위한 적정 호르몬의 종류를 조사하기 위하여 Table 1.과 같이 여러 호르몬을 처리하였다. 암컷 개체는 hCG (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), LHRHa (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), PGE2 및 PGF2a (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), DISA), PGE2 및 PGF2a (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) 그리 고 17a20βP (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)를 근육주사 (intramuscularly injection)하였다. 수컷 개체는 500IU/kg body weight (BW)의 hCG를 처리하였다. 1, 2차 실험 결과를 바탕으로 3, 4차 실험은 hCG와 LHRHa를 각각 500IU/kg BW와 100 μg/kg BW로 처리하였다. 각 실험에 사용된 붉바리 친어의 평균 전장(total length, TL)과 평균 체중 (BW)은 Table 1. 과 같다.

**Table 1.** Water temperature at each experiment, mean (±standard error, SE) total length and body weight, injected hormone type and dose, and number of females of red spotted grouper *Epinephelus akaara*, broodstock.

Experiment	Water	Total length (cm)	Body weight (g)	Hormone type	Hormone dose	N
	temperature	(Wiedii ± SE)	(Mean ± SE)	UA.	(/Kg DW)	
1	22±1.0°C	42.1±0.55	1,058.3±35.8	hCG	500 IU	42
[June 2017]		5		PGE2	10 µg	3
				PGF2a	10 µg	3
2	26±1.0°C	41.5±1.25	1,01 <mark>4.3±50.02</mark>	hCG	500 IU	23
[July 2017]		2		PGF2a	$1 \ \mu g$	2
		L'A		PGF2a+17a20BP	$1 \ \mu g$	2
		N/S		LHRHa	1 μg	2
3	21±1.0°C	42.2±1.02	994.2±55.03	hCG	500 IU	8
[February 2018]				LHRHa	100 µg	8
4	21±1.0°C	30.1±0.33	409.53±12.78	hCG	500 IU	55
[June 2018]				LHRHa	100 µg	6

### 2.2 수정 및 난과 자어의 초기 발생 과정 분석

호르몬을 근육 주사하여 산란을 유도한 후 36시간 부터 3~4시간 간격 으로 복부압박을 통해 산란시켰고, 호르몬 처리에 따른 산란된 개체 수 를 관찰하였다. 난과 정자는 유리비커에서 습식법으로 인공 수정하였고, 수정 직후 부상란의 부피를 통해 수정률을 조사하였다. 수정란은 즉시 실험실로 옮겨 1L 유리비커에서 친어의 사육수온(Table 1)과 같이 유지 하며 배양하였다.

부화 후 자어의 난황 흡수는 부화 직후, 부화 후 1, 12, 24, 48시간에 난황의 부피를 측정하여 조사하였다. 난황의 부피는 Fig. 1-B와 같이 Blaxter and Hempel (1963)의 방법을 인용하여 난황의 가로 길이와 (Yolk length, YL) 세로 길이(Yolk depth, YD)를 측정하여 계산하였다. 난황 부피 계산식은 다음과 같다.

 $Yolk volume = \pi/6 \times YL \times YD^2$ 



Fig. 1. Measurement of red spotted grouper *Epinephelus akaara*, (A) egg and lipid droplet diameters (ED and LD), (B) yolk length and depth (YL and YD).

## 2.3 지방산 분석

지방산 분석은 호르몬 처리구 별 0.4-1.5 g의 미수정란에 14% Boron trifluoride (14% BF3, Sigma Chemical co., USA)를 첨가한 후 2분간 100℃에서 가열한 뒤 n-heptane 2-5 ml을 첨가하고 1분간 더 가열하였 다. 이 후 Sodium chloride 포화용액을 첨가하여 상층에서 약 1 ml의 heptane을 취한 후 소량의 Sodium sulfate를 탈수시켜 지방산 분석용 시 료로 사용하여 Gas Chromatography-mass spectrometry (GC/MS)로 분 석하였다. GC 분석은 fused silica capillary column (Supelco Inc., USA) 과 99.9% helium을 carrier gas로 사용하였다. 각 지방산은 동일한 조건 에서 표준지방산 methyl ester mixture (Sigma Chemical Co., USA)와 retention time을 비교하여 동정하였으며, 각 peak의 면적을 상대백분율 로 나타내어 정량하였다.

## 2.4 난질 관련 유전 인자 발현 분석

호르몬 처리구 별 미수정란, 수정 직후, 수정 후 6, 12, 24, 36시간 후 부상란을 샘플하여 즉시 -75℃에 보관 하여 난질 관련 유전인자 분석에 사용하였다.

Total RNA는 RNeasy protect mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하 여 추출하였고, cDNA는 QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)을 이용하여 합성하였고, 모든 실험은 manufacturer's protocol을 따라 수행하였다. 실험에 사용된 primer는 붉 바리의 cathepsin B (Gwon et al., 2017)와 18S rRNA (Lee and Baek, 2018) primer 및 orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)의 cathepsin L primer (Liang et al., 2012)를 이용하여 실험하였다(Table 2). Quantitative real-time PCR은 Chromo4 Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하였으며, 94°C 에서 3분간 initial denaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 65°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 30초간 elongation 하였으며 35 cycle을 반 응시켜 주었다. 각 샘플은 18S rRNA를 이용하여 상대정량하였다.

Name	Gene		Primer sequence (5'-3')
-4 - 1	Cathanain D	Forward	CTGTTGATTAGTCCCGTGTAGAG
CLSD	Cathepsin B	Reverse	GTGTCGCCCTCTAGTGATTAT
ctsl	Cathensin I	Forward	CCACATCCTCTCCCTGGAAGCCATAAC
	Cathepsin L	Reverse	CAGAGTTGTATGTGGGGGTCGTAGTGGC
180	18S-rRNA	Forward	CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCG
105		Reverse	CTTAATCATGGCCCCAGTTCAGAG

Table 2. List of primers used in this study.



## 2.5 통계 분석

산란 유도 호르몬 처리에 따른 붉바리의 산란율, 수정률, 생존율, L/E ratio, 난황흡수, 지방산 및 cathepsin 발현량은 모두 평균±표준오차로 나 타냈다. IBM SPSS Statistics (Version 21.0)을 통해 Levene's test로 분 산의 동질성을 검정하였으며, Kruskal-Wallis test를 실시하였다. Turkey test 사후 분석을 통해 95% 신뢰수준에서 산란 유도 호르몬에 따른 실험구간의 L/E ratio의 유의차 검정을 실시하였다(P<0.05).



# Ⅲ. 결과

## 3.1 형태학적 특징 분석

#### 3.1.1 산란 및 수정

붉바리의 인위적 산란 유도를 위해 사용된 호르몬은 hCG, LHRHa, PGF2a, PGE2 이다. 각 실험의 산란율, 산란량과 수정률은 Table 3과 같 고 호르몬에 따른 평균 산란율은 hCG 처리한 실험구가 47.8±3.95%, LHRHa가 37.5±12.50%, 그리고 PGF2a가 41.7±8.33%였으며, PGE2 처리 구 에서는 산란이 관찰되지 않았다. 산란량은 산란율과 유사한 경향이 관찰되었다. 산란된 난의 평균 수정률은 hCG 처리한 실험구는 81.4±14.30%, LHRHa는 99.1±0.46%, 그리고 PGF2a가 92.8% 였다(Fig. 2). 10 17

**Table 3.** Spawning rate, mean (±SE) volume of spawning eggs and fertilization rate at each experiment of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

Experiment	Hormone treatment	Spawning rate (%)	Mean volume of spawning eggs (mL)	Fertilization rate (%)
1	hCG	50.0	168.3±11.67	_
	PGF2a	33.3	70.0	-
2	hCG	56.5	101.7±20.88	95.4
	LHRHa	50.0	75.0	98.3
	PGF2a	50.0	50.0	92.8
3	hCG	37.5	30.0±7.64	52.8
	LHRHa	12.5	35	99.9
4	hCG	42.3	67.5±22.41	96.0
	LHRHa	50.0	35.0±7.64	99.0
		S. S	CH OY W	



Fig. 2. Mean spawning and fertilization rates, and volume of spawning eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

#### 3.1.2 수정란 관찰

가. 난 발생 과정

모든 호르몬 처리구에서 수정 직후 배반이 관찰되었으며(Fig. 3), 수정 1시간 후 제 1 난할이 시작되어 2세포기의 수정란이 관찰되었다. 수정 2 시간 후 8세포기, 3시간 후 상실기로 발달하였으며 호르몬 처리에 따른 발생과정의 차이는 관찰 할 수 없었다. 포배기로 발달하는 수정 6시간 후부터 호르몬 처리에 따른 난할 패턴의 차이가 관찰되었다. 6시간 후 PGF2a 처리를 통해 생산된 수정란에서 hCG와 LHRHa 처리를 통해 생 산된 수정란과 비교하여 비정상적인 난할이 진행되었으며, 12시간 후 낭 배기로 발달한 후에도 균일하지 않은 난할이 관찰되었다. 24시간 이후 안구가 관찰되었으며 근절이 형성되었으나 PGF2a 처리를 통해 생산된 수정란은 전체 폐사하였다. hCG와 LHRHa 처리를 통해 생산된 수정란 은 36-40시간에 부화하였다.

2

21

H ot ul

Hormone treatment	0 HPF	6 HPF	12 HPF	24 HPF	36 HPF	Hatching	6 HPH	24 HPH
hCG	•	0	0	0		0	0	
LHRHa	0	0	0	0	0	0	0	
PGF2α	0	0	0			ERS/		
<b>Fig. 3.</b> T	he observ	ation of o	egg and	lipid drop	let during e	gg developm	ent in fertili	zed eggs of
hormone-tre	eated red sp	potted grou	iper <i>Epine</i>	phelus akad	ara.			
HPF, Hours post fertilization.								
Scale bars i	ndicated 11	nm.		3	1 21			

나. 난과 유구의 부피비

수정 직후 시간 경과에 따른 난과 유구의 부피 비를 측정한 결과(Fig. 4), 1차 실험의 경우 hCG 처리로 생산된 수정 직후의 수정란은 1.14±0.089%, PGF2a 처리로 생산된 수정란은 1.14%로 수정 직후의 부피 비가 가장 낮게 관찰되었다. 이후 hCG 처리구는 수정 9시간 후 1.28±0.032%, PGF2a는 수정 12시간 후 1.27%로 가장 높은 부피비가 관 찰되었다. 2차 실험의 hCG, LHRHa 그리고 PGF2a 처리로 생산된 수정 란의 난과 유구의 부피 비는 수정 직후에 각각 1.54±0.142%, 1.80% 그리 고 1.45%로 가장 높은 부피비가 관찰되었다. 다른(1, 3, 4차) 실험의 난 과 유구의 부피 비의 범위가 0.9~1.4%였으며, 2차 실험은 1.0~1.8%의 범위로 나타났다. PGF2a의 경우 수정 후 24시간 뒤에 생존된 난을 관찰 할 수 없었다.





A, 1<sup>st</sup> experiment (June 2017); B, 2<sup>nd</sup> experiment (July 2017);

C, 3<sup>rd</sup> experiment (February 2018); D, 4<sup>th</sup> experiment(June 2018)

다. 호르몬 별 생존율 차이

수정 후 시간에 따른 호르몬 별 생존율은 Fig. 5와 같다. hCG 처리를 통해 생산된 수정란은 부화 2시간 후 81.5±14.97%의 급격한 생존율 감 소를 관찰되었으며 이후 부화시기까지 천천히 감소하여 36시간 이후 59.7±20.64%의 수정란이 생존하였다. LHRHa 처리를 통해 생산된 수정 란은 부화 24시간까지 91.1%의 생존율을 보였으며, 36시간 후에도 82.7%의 수정란이 생존하였다. PGF2a 처리를 통해 생산된 수정란의 부 화 2시간 후 생존율은 26.5%으로, 가장 높은 생존율 감소가 관찰되었고, 수정 12시간 후 8.6%, 24시간 후 7.2%의 수정란이 생존하였으며 이후 전체 폐사하였다.





Fig. 5. The survival rate in fertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

17

#### 3.1.3 자어 난황 흡수 관찰

hCG와 LHRHa 처리를 통해 생산된 난의 부화 후 자어의 난황 부피를 측정한 결과(Fig. 6, 7), 부화 직후 hCG 처리구는 10.6±0.60 mm, LHRHa 처리구는 18.1 mm였으며, 7.51 mm의 차이로 LHRHa가 1.7배 더 컸다. 부 화 2시간 후 자어의 난황부피는 hCG 처리구는 9.8±0.23 mm, LHRHa 처 리구는 11.4mm로, hCG는 7.5%, LHRHa는 37.0%의 난황이 흡수되었다. 부화 12시간과 24시간 후 난황의 부피는 hCG 처리구는 8.4±0.83 mm과 2.9±0.91 mm이며, LHRHa 처리구는 9.8 mm과 4.3 mm로 1.4 mm의 부피 차가 관찰되었다.



Hormone treatment	36 HPF	Hatching	6 HPH	24 HPH
hCG	0	0	0	
LHRHa	0	0	Co	

Fig. 6. The observation of yolk during larval development of hormone-treated red spotted grouper 12 Epinephelus akaara. व म थ

HPH, Hours post hatching

X



Fig. 7. The yolk volume in hatching larvae of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

u io

## 3.2 지방산 분석

#### 3.2.1 미수정란의 지방산 조성

호르몬(hCG; n=8, LHRHa; n=4, PGF2a; n=1)처리를 통해 생산된 미수 정란의 총 지방산 양은 유의한 차가 없었다. Table 4와 같이 총 지방산 양에 대한 각 지방산의 비율을 통해 다른 호르몬을 처리하여 생산된 미 수정란의 지방산 조성을 비교한 결과, 모든 호르몬 처리구에서 n-3 계열 의 고도불포화지방산(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA)에 속 하는 DHA (C22:6)가 가장 높은 조성비가 관찰되었다. 호르몬 처리에 따 른 DHA 조성비는 hCG 처리구는 26.5±1.24%, PGF2a 처리구는 40.0%, 그리고 LHRHa 처리구는 26.3±0.45%로, PGF2a 처리구의 DHA가 가장 높은 비율의 지방산 조성을 나타냈다. 다음으로 palmitic acid (C16:0)와 oleic acid (C18:1) 높았으며, 각각의 조성비는 hCG 처리구는 19.1±0.48% 와 17.2±0.42%, LHRHa 처리구는 20.2±0.26%와 16.7±.81%, 그리고 PGF2a 처리구는 14.4%와 14.3%로, PGF2a 처리구가 가장 낮은 조성비 가 관찰되었다.

Fatty acids (%)	hCG	LHRHa	PGF2a
14:00	3.46±0.28	3.62±0.14	2.15
15:00	$0.48 \pm 0.02$	$0.53 \pm 0.03$	0.32
16:00	$19.09 \pm 0.48$	20.23±0.26	14.44
18:00	$6.22 \pm 0.17$	$6.97 \pm 0.24$	5.49
20:00	$0.11 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.03$	0.10
$\Sigma$ SFA	29.38±0.68	31.42±0.50	22.49
16:1	7.74±0.44	7.27±0.21	6.37
18:1(n-9)	0.25±0.02	0.28±0.03	0.22
18:1(n-7)	17.23±0.42	16.66±0.81	14.26
20:1(n-11)	$1.07 \pm 0.04$	0.89±0.31	0.93
$\Sigma$ MUFA	26.28±0.60	25.10±1.01	21.78
18:2(n-6)	4.18±0.46	3.89±0.36	2.60
18:3(n-6)	0.39±0.30	0.06±0.03	0.13
20:2(n-6)	0.32±0.02	0.48±0.11	0.23
20:3(n-6)	$0.30 \pm 0.01$	0.25±0.09	0.22
$\Sigma$ n=6 PUFA	5.20±0.54	4.68±0.50	3.18
18:3(n-3)	0.76±0.05	0.69±0.03	0.66
20:3(n-3)	0.07±0.02	0.06±0.03	0.13
20:5(n-3) EPA	$7.63 \pm 0.27$	8.11±0.60	8.20
22:6(n-3) DHA	$26.54 \pm 1.24$	26.33±0.45	40.04
$\Sigma$ n-3 PUFA	$34.99 \pm 1.14$	35.19±0.91	49.04
$\Sigma$ PUFA	$40.19 \pm 1.01$	39.87±1.20	52.22
n-3:n-6	$7.40 \pm 0.97$	7.75±0.77	15.44
EPA/DHA	$0.29 \pm 0.02$	$0.31 \pm 0.02$	0.20

**Table 4.** The total fatty acid composition of unfertilized eggs ofhormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

Values are weight % of total fatty acids.



Fig. 8. The major fatty acid composition in unfertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

## 3.3 Cathepsin 분석

## 3.3.1 붉바리 수정란의 cathepsin 발현 양상

산란 유도 호르몬을 처리 한 붉바리의 수정란의 시간별 cathepsin B, D와 L 유전자의 발현량을 real-time PCR로 정량분석한 결과, cathepsin B는 난 발생 시간에 따라 증가하는 경향이 관찰되었으며 LHRHa가 hCG 처리 수정란에 비해 높게 유지되었다. Cathepsin L은 호르몬 종류 에 따라 발현량 및 발현 양상의 차이를 관찰 할 수 없었으나, 수정 후 12시간에 감소하였고 이후 증가하는 경향을 보였다.





Fig. 9. Transcript levels of cathepsin B and L in fertilized eggs of hormone-treated red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

## Ⅳ. 고 찰

많은 바리과(Serranidae) 어류에서 호르몬 처리를 통한 난질 평가를 수행하고 있다. Dusky grouper (*Epinephelus marginatus*)는 자연조건에 서는 배란이 유도되지 않았지만 30-60 µg/kg의 GnRHa를 이식(implant) 한 결과 배란이 유도되었다(Marino et al., 2003). 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*)에서는 ovaprim (0.5 mL/kg)과 hCG (500 IU/kg)보다 LHRHa (100µg/kg)와 LHRHa+pimozide (100+1,000 µg/kg)를 처리하였 을 때 더 높은 생존력을 관찰하였으며, LHRHa 처리가 가장 안정적으로 수정란을 확보 할 수 있다고 보고하였다(Hong et al., 2015). Leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*)는 LHRHa보다 hCG를 처리했을 경우 수정률과 생존력이 더 높았다(Kiewek-Martinez and Gracia-Lopez, 2010). Black sea bass (*Centropristis striata*)의 배란 유도를 위한 실험 에서 LHRHa를 사용하였으며, 펠렛이식 및 근육주사를 통한 호르몬 처 리 결과 모두 배란이 유도되었으며(Berlinsky et al., 2005), hCG와 LHRHa를 근육주사 한 결과 hCG 처리한 수정란의 수정률이 더 높았다 (Denson et al., 2007).

농어목(Perciformes) 전갱이과(Carangidae)에 속하지만, 붉바리와 유사 하게 5-8월에 산란하고 온대 및 아열대 연안에 서식하는 부시리(*Seriola lalandi*)의 GnRHa를 통한 배란 유도 연구에서는 산란율은 증가하였으나, 자연 산란된 난에 비해 난질이 저하되었다고 보고하였다(Setiawan et al., 2016). 따라서 호르몬에 의한 산란 유도에 있어 산란 유도율 뿐만 아 니라 수정률과 수정 이후 수정란의 난질 평가가 필수적으로 수행되어야 한다.

본 연구에서는 붉바리에 hCG 처리를 한 경우 높은 산란율을 나타내었 지만 LHRHa 처리를 통해 생산된 난이 수정률 및 생존율이 높았으며, 난에 대한 유구의 부피가 더 크게 관찰되었다. 유구의 분포 및 부피는 안구 형성기 단계의 배로 발달하는 난의 비율과 관련이 있으므로 (Mansour et al., 2007), LHRHa가 hCG 처리를 통해 수정된 난보다 산 란 유도율은 낮았으나, 더 고품질의 난인 것으로 판단된다.

Wolffish (Pavlov and Moksness, 1994)와 turbot (Kjorsvik et al., 2003)의 연구에서 비정상적인 할구의 비율은 성공적인 부화와 관련이 있다고 하였다. 본 연구에서 PGF2a 처리에 의한 산란 유도율과 생산된 수정란의 수정률은 다른 호르몬 처리(hCG, LHRHa)와 유의한 차는 없었으나, 수정 6시간 후 포배기 단계부터 비정상적인 난할 패턴이 관찰되었으며, 낮은 생존율이 관찰되었고, 24시간 이후 폐사하여 부화하지 못했다. 따라서 PGF2a 처리를 통해 생산된 난은 저품질의 난으로 판단된다.

친어의 산란과 난을 배양할 때의 수온은 난질에 큰 영향을 미치는 것 으로 알려져 있다(Brooks et al., 1997; Ochokwu et al., 2015). 특히 발달 중인 배의 대사와 구조(Kinne and Kinne, 1961), 그리고 난과 배의 형태 및 생존능력에도 영향을 주는 요인이다(Brown et al., 1995). 본 연구에 서 총 4회의 실험 중 2017년 7월에 수행된 2차 실험의 난과 유구의 부피 비가 hCG, LHRHa 그리고 PGF2a 처리로 생산된 수정란에서 모두 1.0~ 1.8%의 범위로 나타났으며, 다른 (1, 3, 4차) 실험의 부피비는 0.9~1.4% 였다. 친어의 사육수온과 같은 수온으로 유지하며 수정란을 배양하였기 때문에 21 또는 22±1.0℃의 수온을 유지한 1, 3, 4차의 실험과 달리 2차 실험은 26±1.0℃로 수행되었다. 수정란 배양 수온의 차이로 난과 유구의 부피비 차이가 관찰된 것으로 생각된다.

어류의 주요 지방산은 대부분 DHA와 EPA로 구성되는 n-3 PUFA와

palmitic acid (C16:0) 및 oleic acid (C18:1)로 알려져 있으며 어제 내 지 방산 중 함량이 높다고 보고되어있고, 일반적으로 해산어류는 n-3 PUFA를 필요로 한다고 알려져 있다. 본 연구에서 붉바리 미수정란의 지방산 조성을 분석한 결과, 낮은 초기 생존율을 나타낸 PGF2a 처리를 통해 산란된 미수정란의 DHA가 가장 높은 조성을 나타내었다. 그러나 palmitic acid (C16:0)와 oleic acid (C18:1) 조성비는 hCG와 LHRHa 처 리를 통해 산란된 난에서 보다 낮게 나타났다. Cruzado et al., (2011)에 의하면 해양 어류에서 DHA와 EPA는 초기자어 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나, 생존율과 수정률이 높은 난에서 유의하게 낮은 DHA와 높은 EPA 조성이 관찰되었다. 이외에도 난 내 지방산 조성에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 종에 따라 매우 다양한 결과가 제 시되고 있어 붉바리의 지방산 조성에 대한 연구가 추가적으로 수행되어 야 할 것으로 생각된다.

Cathepsin B, D, 그리고 L 등은 cathepsin family 단백질 중에서 어류 의 난황형성과정 및 수정 후 초기 배 발생 과정에서 발현되며, 에너지원 으로 중요한 작용을 하는 단백질로 알려져 있다(Carnevali et al.,2008). Tingaud-Sequeira et al., (2011)에 의하면 배 발생 과정 동안 mummichog (*Fundulus heteroclitus*)의 cathepsin B mRNA 발현량이 증가하였다고 보고하였으나, Kwon et al., (2001)에서는 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 배 발생 과정동안 cathepsin B 발현량은 낮게 유지되었으며, Palomino et al., (2017)의 부시리(*Seriola lalandi*) cathepsin B mRNA 발현량은 배 발생 초기에 높은 발현을 보이며 포배 기에 감소하였다. Gwon et al., (2017)에 의하면 난질 평가 지표로 추측 되는 붉바리 수정란의 cathepsin mRNA 발현량이 고품질의 난에서 수정 후 0 및 4시간에 높게 나타났고, 24시간에 감소하였으며, cathepsin D

mRNA 발현량은 난질에 따른 유의한 발현량의 차이가 관찰되지 않았다 고 보고하였다.

본 연구에서 cathepsin B와 L을 분석한 결과 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, hCG 처리를 통해 생산된 수정란에 비해 난황부피가 크고, 초 기 난황흡수가 빠르게 진행 되었던 LHRHa 처리를 통해 생산된 수정란 의 cathepsin B mRNA 발현이 더 높게 나타났으며, 난 발생과정동안 증 가하는 경향을 관찰하였다. Cathepsin L은 호르몬 종류에 따라 발현량 및 발현 양상의 차이를 관찰 할 수 없었으나, 일반적으로 고품질의 난을 평가하기 위한 대표적인 지표로 알려져 있으므로 추가적인 연구가 요구 된다.

본 연구에서는 산란 유도 호르몬을 처리한 후 형태학적, 생화학적, 그 리고 분자생물학적 지표를 통해 난질을 평가하였다. 실험어의 개체수 부 족으로 난질 평가 지표 간 유의한 차가 관찰되지 않았으나, 난질 평가 지표의 경향을 관찰할 수 있었으며 정확한 평가를 위한 반복실험이 요구 된다.

## Ⅵ. 참고문헌

- Berlinsky, D.L., King V, W., Smith, T.I.J., 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). Aquaculture 250, 813 - 822. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.074
- Blaxter, J. H. S., Hempel G., 1963. The Influence of Egg Size on Herring Larvae (*Clupea harengus* L.), ICES J. Mar. Sc. 28, 211 – 240. https://doi.org/10.1093/icesjms/28.2.211
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 535 - 548. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.0 2.011
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish : what makes a good egg? Rev. Fish Biol. Fish. 7, 387 416.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., and Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 100, 141–166. https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90355-O
- Brown, N.P., Bromage, N.R. and Shields, R.J. (1995) The effect of spawning temperature on egg viability in the Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). In Goetz, F.W. and Thomas, P., eds. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin, Texas, USA: Fish

Symposium '95, Austin, p. 181.

- Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Cerdà, J., Gioacchini, G., 2008. Changes in Cathepsin Gene Expression and Relative Enzymatic Activity During Gilthead Sea Bream Oogenesis. Mol. Reprod. Dev. 75, 97 - 104. https://doi.org/10.1002/mrd.20768
- Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Lubzens, E., Maradonna, F., 2006.
  Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation.
  Gen. Comp. Endocrinol. 146, 195 203. https://doi.org/10.10
  16/J.YGCEN.2005.12.007
- Carnevali, O., Mosconi, G., Cambi, A., Ridolfi, S., Zanuy, S., Polzonetti-Magni, A.M., 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. Aquaculture 202, 249 - 256. https://doi.o rg/10.1016/S0044-8486(01)00775-X
- Cerdà, J., Fabra, M., Raldúa, D., 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration, in: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.), The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 349 - 396. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3\_12
- Cruzado, I.H., Herrera, M., Quintana, D., Rodiles, A., Navas, J.I., Lorenzo, A., Almansa, E., 2011. Total lipid and fatty acid composition of brill eggs *Scophthalmus rhombus* L. relationship between lipid composition and egg quality. Aquac. Res. 42,

1011 - 1025. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02684.x

- Denson, M.R., Jenkins, W.E., Berlinsky, D.L., Smith, T.I.J., 2007. A comparison of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass *Centropristis striata* (Linnaeus, 1758). Aquac. Res. 38, 918 - 925. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.016 65.x
- F.G. da Silva, F., Jacobsen, C., Kjørsvik, E., G. Støttrup, J., Tomkiewicz, J., 2018. Oocyte and egg quality indicators in European eel: Lipid droplet coalescence and fatty acid composition. Aquaculture 496, 30 - 38. https://doi.org/10.1016/J.A QUACULTURE.2018.07.008
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. Aquac. Res. 41, 684 - 716. https://doi.org/10.1111/j.1365 - 2109.2009.02220.x
- Goetz, F.W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, New York, pp. 117 170. https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60303-9
- Gwon, S., Kim, H.K., Baek, H.J., Lee, Y., Kwon, J.Y., 2017. Cathepsin
  B & D and the Survival of Early Embryos in Red Spotted
  Grouper, *Epinephelus akaara*. Dev. Reprod. 21, 457 466.

HONG, C.G., CHO, J.K., PARK, J.Y., SON, M.H., PARK, J.M., HAN,

K.H., KANG. H.W., 2015. Ovulation Induction Effect of Sevenband Grouper, Epinephelus septemfasciatus by Treating 27. Hormones. I. Fish. Mar. Sci. Educ. 981 - 989. https://doi.org/https://doi.org/10.13000/JFMSE.2015.27.4.981

- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in Teleost Fish 6, 99-127. https://doi.org/10.5047/absm.2013.00604.0099
- Kiewek-Martinez, M., Gracia-Lopez, V., Carrillo-Estevez, M., 2010. Comparison of the effects Of HCG and LHRHA On the induction of ovulation of wild and captive leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*. J. World Aquac. Soc. 41, 733 - 745. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00415.x
- Kinne, O., Kinne, E.M., 1962. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen combinations. Can. J. Zool. 40, 231-253. https://doi.org/https://doi.org/10.1139/z62-025
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg Quality in Fishes. Adv. Mar. Biol. 26, 71 - 113. https://doi.org/10.1016/S00 65
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in Fishes. Adv. Mar. Biol. 26, 71 - 113. https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60199-6-2881(08)60199-6
- Kwon, J.Y., Prat, F., Randall, C., R. Tyler, C., 2001. Molecular Characterization of Putative Yolk Processing Enzymes and Their Expression During Oogenesis and Embryogenesis in

Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)1. Biol. Reprod. 65, 1701 - 1709. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.6.1701

- Lanes, C.F.C., Bizuayehu, T.T., Bolla, S., Martins, C., de Oliveira Fernandes, J.M., Bianchini, A., Kiron, V., Babiak, I., 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. Aquaculture 324 - 325, 267 - 275. https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2011.10.036
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts
  How fish eggs are formed. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 367 389. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. Aquaculture 273, 744 747. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.027
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. Aquaculture 219, 841 - 858. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00036-X
- Mehdi, Y., and Ehsan, S., 2011. A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. African Journal of Agricultural Research 6(7), 1643–1650.

- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Dev. Growth Differ. 50, 195 - 219. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
- Nagahama, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T. 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. Curr. Topics Dev. Biol. 30, 103 - 145. https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60074-6
- Ochokwu, I.J., Apollos, T., Oshoke, J.O., 2015. Effect of egg and sperm quality in successful fish breeding. IOSR J. Agric. Vet. Sci. 8, 48 - 57. https://doi.org/10.9790/2380-08824857
- Okumura, S., Okamoto, K., Oomori, R., Nakazono, A., 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Aquaculture 206, 165 - 173. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00722-0
- Palomino, J., Herrera, G., Torres-Fuentes, J., Dettleff, P., Patel, A., Martínez, V., 2017. Assessment of cathepsin mRNA expression and enzymatic activity during early embryonic development in the yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. Anim. Reprod. Sci. 180, 23 - 29. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.009
- Patiño, R., Thomas, P., Yoshizaki, G., 2003. Ovarian follicle maturation and ovulation : an integrated perspective. Fish Physiol. Biochem.
  28, 305 - 308. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030 565.74702.0a
- Pavlov, D.A., Moksness, E., 1994. Production and quality of eggs obtained from wolffish (*Anarhichas lupus* L.) reared in captivity.

Aquaculture 122, 295 - 312. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/00 44-8486(94)90339-5

- Sakai, K., Nomura, M., Takashima, F., 1985. Characteristics of naturally spawned eggs of red sea bream. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 51, 1395–1399.
- Seaborn, G.T., Smith, T.I.J., Denson, M.R., Walker, A.B., Berlinsky, D.L., 2009. Comparative fatty acid composition of eggs from wild and captive black sea bass, *Centropristis striata* L. Aquac. Res. 40, 656 - 668. https://doi.org/10.1111/j.1365-210 9.2008. 02141.x
- Setiawan, A.N., Muncaster, S., Pether, S., King, A., Irvine, G.W., Lokman, P.M., Symonds, J.E., 2016. The effects of gonadotropin-releasing hormone analog on yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) spawning and egg quality. Aquac. Reports 4, 1 - 9. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.05.00 1
- Stacey, N.E., Goetz, F.W., 1982. Role of Prostaglandins in Fish Reproduction. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 92 - 98. https://doi.org/10.1139/f82-011
- Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K., 2018. Prostaglandins in teleost ovulation : A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. Mol. Cell. Endocrinol. 461, 236 - 247. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017. 09.019

- Tingaud-Sequeira, A., Carnevali, O., Cerdà, J., 2011. Cathepsin B differential expression and enzyme processing and activity during *Fundulus heteroclitus* embryogenesis. Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol. 158, 221 - 228. https://doi.org /10.1016/j.cbpa.2010.11.002
- Valdebenito, I.I., Gallegos, P.C., Effer, B.R., 2013. Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors. Zygote 23, 177 - 197. https://doi.org/10.1017/S0967199413000506
- Wahbi, O. M., El-Greisy, Z. A. B., and El-Sayed, H. S., 2017. Reproductive Performance of Sea Bream (*Sparus aurata*) Induced with Two Different Hormone Protocols with Respect to the Effect on Gonadotrophic Cells. Journal of Biological Sciences 17(6), 278–287.
- G., Yoshizaki. Shusa. М., Takeuchi, Т.. Patiño, R.. 2001. Gonadotropin-dependent oocyte maturational competence requires activation of the protein kinase A pathway and synthesis of RNA and protein in ovarian follicles of Nibe, Nibea mitsukurii (Teleostei. Sciaenidae). Fish Physiol. Biochem. 25, 201 - 208. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1 022209710224

## Ⅵ. 감사의 글

석사과정을 수행하는 동안 항상 아낌없이 조언해주시고, 올바른 방향 으로 지도해주신 지도교수님이신 백혜자 교수님께 가장 먼저 감사드립니 다. 바쁘신 와중에도 꼼꼼히 심사해주시고 도움을 주신 김현우 교수님과 멀리서도 귀한 시간을 내어 논문을 검토해주신 황인준 박사님께도 깊이 감사드립니다. 학부생 때부터 전공지식을 가르쳐 주신 해양생물학과 남 기완 교수님, 김수암 교수님, 오철웅 교수님, 김진구 교수님, 박원규 교수 님, 현상윤 교수님께도 감사드립니다.

현장 실험에 대한 아낌없는 조언과 도움을 주신 김형배 교수님, 이영 돈 교수님, 이치훈 박사님, 김병훈 박사님, 송희에게도 진심으로 감사드 립니다. 또한 발생생식 내분비 연구실에서 함께 힘이 되어주었던 민주언 니, 재경오빠, 창현오빠, 유란, Rahman, 희원이와 해양생물학과의 모든 선후배님들과 동기들에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 항상 저를 걱정해주시고 응원해주신 가족들에게도 죄송하고 감사한 마음을 함께 전합니다. 앞으로 더욱 발전하도록 노력하겠습니다.