



저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

수산학박사 학위논문

Clownfish류의 인공번식과 대량
생산을 위한 발생생리학적 연구



2011년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

노 경 언

수산학박사 학위논문

Clownfish류의 인공번식과 대량 생산을 위한 발생생리학적 연구

지도교수 장 영 진

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.

2011년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

노 경 언

노경언의 수산학박사 학위논문을 인준함

2011년 8월



주	심	이 학 박 사	김 종 명 ①
위	원	수산학 박 사	남 윤 권 ①
위	원	농 학 박 사	손 영 창 ①
위	원	수산학 박 사	강 덕 영 ①
위	원	농 학 박 사	장 영 진 ①

목 차

Abstract	v
I. 서 론	1
II. 산란주기와 번식행동	4
1. 서 설	4
2. 재료 및 방법	5
2-1. 실험어와 사육조건	5
2-2. 산란횟수와 주기	6
2-3. 어미의 산란행동 및 알 관리	6
3. 결 과	8
3-1. 산란횟수와 주기	8
3-2. 산란행동 및 알 관리	8
4. 고 찰	12
III. 난발생과 자치어 발달	17
1. 서 설	17
2. 재료 및 방법	18
2-1. 실험어와 사육조건	18
2-2. 난발생	18
2-3. 자치어 발달	18
2-4. 먹이종류별 자치어 생존율	18
3. 결 과	19
3-1. 난발생	19
3-2. 자치어 발달	22

3-3. 먹이종류별 자치어 생존율	25
4. 고 찰	25
VI. 인공 부화장치 개발	30
1. 서 설	30
2. 재료 및 방법	31
2-1. 부화장치별 부화율 조사	31
2-1-1. 에어레이션형	32
2-1-2. 스프레이형	32
2-1-3. 회전수류형	32
2-2. 회전수류형 부화장치의 부화판 개수에 따른 부화율	32
2-3. 통계분석	34
3. 결 과	34
3-1. 부화장치별 부화율	34
3-2. 회전수류형 부화장치의 부화판 개수에 따른 부화율	34
4. 고 찰	34
V. 자치어 변태에 미치는 먹이종류와 갑상선호르몬(T_3)의 영향	40
1. 서 설	40
2. 재료 및 방법	41
2-1. 실험어	41
2-2. 먹이종류별 자치어 성장	42
2-3. 갑상선호르몬 처리에 따른 자치어 성장	42
2-4. 체색비교	42
2-5. 통계분석	43
3. 결 과	43

3-1. 먹이종류별 자치어 성장 및 체색발달	43
3-2. 갑상선호르몬 처리에 따른 자치어 성장 및 체색발달	47
4. 고 찰	54

VI. Prolactin, arginine vasotocin 및 isotocin 유전자 클로닝 및 저염분

환경에 의한 유전자 발현	57
1. 서 설	57
2. 재료 및 방법	59
2-1. 유전자 클로닝	59
2-1-1. genomic DNA 분리와 염기서열 sequencing	59
2-1-2. 5'-말단과 3'-말단 확보를 위한 DNA walking	59
2-1-3. Total RNA 추출과 cDNA 합성	60
2-2. 계통발생학적 분석	63
2-3. Reverse transcription PCR에 의한 mRNA 발현조사	63
2-3-1. 실험어	63
2-3-2. RT-PCR	63
2-4. 통계분석	63
3. 결 과	64
3-1. PRL, AVT, IT 유전자 염기서열	64
3-1-1. pro-PRL	64
3-1-2. prepro-AVT	64
3-1-3. prepro-IT	64
3-2. 계통발생학적 비교	68
3-2-1. pro-PRL	68
3-2-2. prepro-AVT	68
3-2-3. prepro-IT	71

3-3. PRL, AVT, IT mRNA 발현 비교	71
4. 고 찰	71
VII. 저염분 사육에 따른 생리·생화학적 조사	81
1. 서 설	81
2. 재료 및 방법	83
2-1. 실험어 및 실험구	83
2-2. 아가미 조직상	83
2-2-1. 주사전자현미경 관찰	83
2-2-2. 투과전자현미경 관찰	83
2-3. Na^+/K^+ -ATPase 활성	83
2-4. 혈액의 채취 및 분석	84
2-5. 통계분석	84
3. 결 과	85
3-1. 아가미의 조직상	85
3-2. 아가미 Na^+/K^+ -ATPase 활성	85
3-3. 혈장 Na^+ , K^+ , Cl^- 및 삼투질 농도	85
3-4. Glucose, AST, ALT 및 총단백질	89
4. 고 찰	89
VIII. 종합고찰	94
IX. 요 약	98
감사의 글	103
참고문헌	105

Studies on Developmental Physiology for Mass Production of Clownfishes

Gyeong Eon Noh

Department of Fisheries Biology, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

1. Spawning frequency and behavior

The measured numbers were from 38 to 127 times of total spawning frequency, 12.6 to 25.4 times for spawning frequency per year, and 1.4 to 2.3 times for spawning frequency per month. Maximum and minimum spawning frequency was 4 and 0 times, respectively. All experimental groups showed a year-round spawning except the resting periods. While experimental pair A and B showed the resting period continued for 6 and 5 months, respectively, pair C and D showed total 6 and 8 months of the intermittently resting period appeared. The results suggest that each pair of *A. melanopus* followed an unique circannual rhythm even when they

were reared under the constant condition, especially without the moon phase.

Spawning behaviors in *A. melanopus* were divided into four steps. 1) Cleaning of the plate and its surrounding with the mouth before spawning; 2) Female's mucous secretion on the plate; 3) Spawning and Fertilization; 4). The male seems to play as the main babysitter until the eggs hatch. Increased egg-fanning activity using the pectoral fin and egg-biting activity were noticed during the incubation.

2. Development of egg, larval and juvenile

The fertilized eggs of *A. melanopus* were in oval shape and light orange color. The eggs were 2.37 ± 0.09 mm in size as measured along the longer axis but different sizes of oil globule were also observed. Morula stage was at 9 hours after the fertilization and embryo disc was covering the half of the yolk at 24.8 hours. After 46 hours, optic vesicle and auditory vesicle were formed. The tail was separated from the yolk and the myometium at 24~25 hours. After 70 hours, heart beating was observed at a rate of 160 times per minute. Hatching, occurred at 180 hours, was appeared at 1.5 to 2.0 hours after turning off the light. The egg yolk of a hatched larva (3.5 ± 0.3 mm) was almost absorbed and the color of body was transparent. At DAH (Days after hatching) 5, the body of the larva became darkish. At DAH 9, an opaque and whitish stripe in the head and in the middle of the body was found. At DAH 15 to 20, the body color became blackened with more vivid white stripe. At DAH 30, the larva

showed a reddish color around the mouth, fin and the white stripes in the body and the tail began to disappear. After DAH 60, the body color became dark brown with only one white stripe in the head of an fish.

Survival rate of larva was investigated with three types feeding with live food (RO: only rotifer; RA: rotifer+*Artemia* nauplii; EA: RA with enriched *Artemia*) for 20 days after the hatching. It was the highest 78.3% for EA. RO was 0% and the majority of the death was occurred between 9 to 10 days. The results suggest that the specific nutritional food is necessary for the survival and body color development. Appearance of white stripe seemed to be correlated with the beginning of metamorphosis.

3. Development of artificial hatching system

More than 85% of hatching rate in RT (recirculating type) system in four clownfish species was investigated as compared to those of AT (aeration type), 60.5% and ST (spray type) systems, 74.4%. The hatching rate of 2, 3, 5 hatching plates in RT was 87.3%, 81.8% and 82.0%, respectively. RT system showed the highest hatching rate and the possibility of containing 5 hatching plates.

4. Effects of live food and thyroid hormone on body color

For the growth by the live food type, AT group (enriched *Artemia* + *Tigriopus japonicus*) showed the fastest growth, total length of 11.3 ± 0.7 mm, no significant difference with TJ group (only *T. japonicus*), 10.9 ± 0.8 mm. EA group (only enriched *Artemia*) was 10.2 ± 0.8 mm. In CMYK

analysis, the area around the mouth and the dorsal fin of TJ group showed the highest magenta level, $81.8 \pm 3.5\%$ and $75.8 \pm 6.7\%$, respectively. The dorsal fin of TJ group also showed the highest level, $94.8 \pm 4.3\%$, of the yellow color.

4 ppm- T_3 treated group showed the fastest growth, 11.4 ± 0.4 mm. 6 ppm- T_3 treated group showed the lowest growth, 10.2 ± 0.5 mm. In CMYK analysis, the magenta in the position around the mouth of juvenile grown in the presence of the 6 ppm- T_3 treated was the lowest, 53%, as compared to those of others. The dorsal fin of the fish treated with the 2 ppm- T_3 treated group and 4 ppm- T_3 treated group showed the highest level, $92.8 \pm 3.5\%$, $93.8 \pm 4.0\%$ of yellow level, respectively, together with $67.4 \pm 5.3\%$, $56.0 \pm 8.4\%$ of magenta level, respectively. In the caudal fin of 4 ppm- T_3 treated group, it showed the highest level of magenta and yellow, $73.6 \pm 3.6\%$, $99.8 \pm 0.2\%$, respectively, no significant with 2 ppm- T_3 treated group, $49.6 \pm 7.3\%$, $72.8 \pm 10.8\%$, respectively. The results indicates that two of factors, including *T. japonicus* and thyroid hormones, improve the growth and color expression of juvenile during metamorphosis. And CMYK analysis, the first attempt on fish bod color comparison, can be a useful tool to analyse the relative color for the small size of fish like a larvae and a juvenile.

5. Cloning of prolactin, arginine vasotocin, isotocin gene and the genes expressions during low salinity adaptation

cDNA encoding PRL precursor consists of 639 bp encoding a protein of

212 amino acids including 24 amino acids as a signal peptide. cDNA encoding AVT precursor consists of 462 bp encoding a protein of 153 amino acids including 19 amino acids as a signal peptide and 125 amino acids as a neurophysin. cDNA encoding IT precursor consists of 471 bp encoding a protein of 156 amino acids including 19 amino acids as a signal peptide and 128 amino acids as a neurophysin. Expression of pro-PRL in the pituitary was the highest at 24 hours upon the adaptation to 15 psu. RT-PCR analysis of the gene indicates that the expression of brain prepro-AVT and prepro-IT was increased from 48 hours to 144 hours upon the adaptation to 15 psu.

6. Physiological and biochemical study in the rearing on the low salinity water

Gill lamella surface of *A. melanopus* rearing in seawater was very rough and uneven in SEM. On the other hand, in 15 psu, it was relatively flat in shape. Apical crypt showed a typical feature of a gill in seawater fish with many of mitochondria in chloride cell. In 15 psu, apical crypt seems to be missed as the pavement cell covered the surfaces. Although plasma level of Na^+ , K^+ , Cl^- and osmolality in *A. melanopus* adapted to 15 psu for 4h, 8h, and 24h were lower than the those of the control fish reared under seawater, it recovered to that of the control in 144h. Analysis of glucose, AST, and ALT used as the markers for the stress condition showed the trend that all group has a lower level except 144h. Na^+/K^+ -ATPase activity in the gill increased upon shift to low salinity for 4, 8, and 24 hours.

Na⁺/K⁺-ATPase activity of 48 and 144h became decreased to seawater level.

Decreasing salinity in the surrounding water resulted in decline of the plasma level of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and osmolality upon its shift to low salinity. The results also indicates that the environmental change, salinity may stimulate the homeostasis in the body. This was reflected that, after the temporary change of Na⁺/K⁺-ATPase, PRL gene, histological change of gill, the plasma osmolality restored to seawater level. The results also suggest that *A. melanopus* is capable of adapting to low salinity.



I. 서 론

최근, 핵가족화, 독신주의, 노령인구, 고소득 전문 직종의 증가 그리고 주 5일제 도입과 같은 사회 구조의 변화를 통해 개인의 여가활동 시간이 증가하였고, 이에 따라 애완동물 사육을 비롯한 관련 산업도 괄목할 만한 발전을 이르게 되었다. 대한무역투자진흥공사(KOTRA)에서는 “2010 블루슈머: 미래를 지배할 12가지 골든 마켓”을 내세워 애완동물 시장에 대한 중요성을 강조한 바 있다. 이러한 애완동물 산업은 지금까지 강아지나 고양이가 중심이 되어 왔지만, 최근에는 바다 속 생물의 화려한 채색을 집에서 즐길 수 있는 해수 관상어 산업이 부상하고 있다. 전 세계적으로 150억 달러로 추산되는 관상어 산업은 담수 관상어 산업과 해수 관상어 산업으로 구분된다. 그 중 해수 관상어 산업은 규모적인 측면에서 전체 관상어 시장의 10% 밖에 차지하지 않으나 가치적인 측면에서는 더 높은 비율을 차지하고 있으며, 최근에 그 성장이 두드러지고 있다(Olivier, 2001, 2003; Livengood and Chapman, 2007; Wittington and Chong, 2007).

담수 관상어종은 대부분이 인공번식된 것인 반면, 해수 관상어는 90%이상이 자연에서 채집된다. 해수 관상어 시장의 규모가 커지고 그에 따른 수요가 증가함에 따라 자연에서 포획이 더 심해지고 있으며, 이로 인해 특정 어종의 개체수 감소 또는 멸종뿐만 아니라 주변 산호초 생태계의 붕괴에 대한 문제점들이 제기되고 있다. 해수 관상어의 주요 생산국인 동남아시아 일대에서는 NaCN과 같은 독극물이나 muro-ami 및 kayakas(물고기를 그물로 몰아넣기 위해 산호와 산호초를 부수는 방법)와 같은 파괴적인 어획 방법을 이용한다. 또한 완전히 해독되지 않은 상태에서 해수 관상어를 포장하고 운송함으로써 발생하는 스트레스와 폐사는 해수 관상어 산업의 발전을 저해시키는 요인이 되고 있다(Rubec, 2001; Wood, 2001; Ziemann, 2001; Calado, 2006).

이상과 같은 문제점들을 해결하기 위하여 법적규제와 라이선스 도입 등이 제안되고 있지만, 좀 더 적극적인 방법으로서 일반 식용어에서 이용되는 양식 기술을 해수 관상어종에 적용시켜 인공번식 해수 관상어종을 생산하는 기술개발이 대안으로 제안되고 있다. 실제로 미국에서는 플로리다를 중심으로 1980 년도부터 해수 관상어 인공번식 및 대량생산에 대한 기술개발이 시작되었고, 최근에는 한국을 비롯한 유럽 및 일부 아시아 국가에서도 개발이 진행 되고 있다(Wabnitz et al., 2003). Dr. Lim은 2005년 세계 양식학회에서“세계 관상어 산업의 최근 경향과 변화”라는 주제로 관상어 산업의 인공 번식생산이 담수 관상어에서 해수 관상어로 전환되어야 함을 강조한 바 있다(Lim, 2005).

2003년 UNEP에서 시행한 GMAD 통계(Global Marine Aquarium Database) 에 따르면, 1988년부터 2003년까지 1,471 종의 해수 관상어가 국제적으로 거래 되고 있다. 해수 관상어의 주요 수출국은 필리핀, 인도네시아, 솔로몬 제도, 스 리랑카, 호주, 몰디브, 팔라우와 같은 적도를 중심으로 한 국가들이며 세계 거래량 의 98%를 차지한다. 주요 수입국은 미국, 네덜란드, 프랑스, 독일로서 전체 수 입량의 99%를 차지하고 있으며, 그 외 대만, 일본, 홍콩, 중국 등이 포함된다.

Pomacentridae는 거래되는 어종 중 43%로 절반을 차지하고 있다. 다음으로 Pomacanthidae, Acanthuridae, Labridae, Gobiidae, Chaetodontidae, Callionymidae, Microdesmidae, Serranidae and Blenniidae 순으로 거래되고 있다.

Clownfish류는 농어목(Perciformes) 자리돔과(Pomacentridae)에 속하며, 27 종의 *Amphiprion* 속과 1종의 *Premnas* 속으로 구분된다. 이 종들은 주로 인 도네시아, 호주 및 서태평양, 서아프리카 동부 해안까지 아열대와 열대지역의 산호초 해역에 서식하고 있으며, 한국에는 흰동가리로 알려져 있는 clark's clownfish *A. clarkii* 가 제주도 문섬 근처에서 서식하고 있다(Yu and Lee, 1995). Clownfish류는 정착성 어류로 산호초 근처에서 말미잘류와 공생하는

것으로 알려져 anemonefish라고도 한다(Wilkerson, 1998).

본 연구에서는 해수 관상어의 잠재적인 산업적 가치와 더불어 환경보호라는 두 가지 상반되는 문제의 해결책으로써 제안되는 인공번식에 대한 기술을 Clownfish류를 대상으로 개발하고자 한다. 그러므로 clownfish류의 산란, 초기 발생에 대한 기초 정보를 획득하고, 이 정보를 기반으로 인공부화 시스템을 제안하고자 하며, 저염분 환경 적응능력을 통한 생리학적 기초 지식을 얻고자 한다.



II. 산란주기와 번식 행동

1. 서 설

일반적으로 열대지역에서 서식하는 clownfish류는 계절에 관계없이 연중산란 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 산란횟수와 산란주기는 위도에 따라 다를 수 있다. 열대지역의 clownfish류는 연중산란을 한 반면(Allen, 1972; Ross, 1978), 온대지역에서 서식하는 clownfish류는 여름시기에만 산란을 한다(Bell, 1976; Moyer, 1980; Ochi, 1985; Richardson et al., 1997). 열대지역에서 서식하는 clownfish류의 산란주기는 월령(lunar phase)과 더 밀접한 관계가 있다(Allen, 1972; Ross, 1978). 열대지역의 *Amphiprion melanopus*의 산란은 달의 모양이 상현과 하현일 때 일어났으며(Ross, 1978), Allen(1972)는 보름달이 뜨는 6일 전이나 그 후를 기점으로 clownfish류의 산란이 일어난다고 하였다. 그러나 환경적 요소가 제어되는 수조환경의 clownfish류는 연중 산란하며, 산란주기와 월령과의 관련성은 없는 것으로 보고되고 있다(Alava and Gomes, 1989). 그러나 생식연주기는 환경자극에 의해서만 지배되는 것은 아니며, 물고기 자신에 내재하는 연주기들에 의해서도 영향을 받는다. 무지개송어는 광주기가 짧은 6L:18D 에서도 산란을 한다(Duston and Bromage, 1986). 그러므로 월령을 제외한 외부환경을 열대지역의 환경조건과 동일하게 사육하면, clownfish는 자신이 가지고 있는 연주기들에 의해서 산란을 할 것이다.

일반적으로 clownfish류의 인공번식을 위한 어미 사육은 외부환경이 차단되어 있는 비닐하우스나 조립식 건물에서 수조내에서 이루어진다. 이러한 환경에서는 수온, 염분, 광주기 등의 환경요소가 인위적으로 제어가 가능하므로 산란을 위한 최적의 조건을 조성할 수 있다. 그러나 경제적인 측면에서 보면, 소

등 후 전기를 이용하여 월령을 조절하는 것은 비효율적일 수 있다. 그러므로 월령을 제외한 열대지역의 환경과 유사한 조건에서 사육된 clownfish가 산란을 하는 지 그리고 어떠한 산란주기를 보이는 지 조사하고자 하였다.

Cinnamon clownfish *A. melanopus*는 동남아시아, 호주 및 솔로몬 제도 등의 적도주변의 열대지방에 중심 분포한다. 응성선속형 자웅동체로서 산란은 주로 말미잘 근처의 평평한 암초나 대형 조개껍데기와 같이 딱딱한 기질에서 진행된다. 수정란은 주로 수컷에 의해 관리되는데, 수온에 따라서 7~10일 소요된다. 이 시기에는 암수 모두 강한 공격성을 지니면서 알을 지키는 습성이 있다. 이러한 생리·생태학적 특성은 대부분의 clownfish류에서 나타난다(Wilkerson, 1996). 수컷의 대표적인 알 관리 행동인 egg-fanning은 가슴지느러미를 흔들어서류를 일으켜 알들이 흔들리게 하는 것으로써, 이러한 행동은 알에게 신선한 물과 산소를 공급하고 알 주변에 미생물이나 이물질이 붙지 않도록 하는 것으로 추측된다.

일반적으로 어류의 번식생물학적 정보는 산업적인 측면에서 생산성과 직접적인 관련이 있기 때문에 매우 중요하다. 그러나 clownfish류의 번식생물학적 정보는 대부분이 자연산 어종을 대상으로 연구되었을 뿐, 수조환경에서 사육된 clownfish류의 산란주기와 산란행동에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

본 연구에서는 *A. melanopous*를 대상으로 실내수조에서 장기간 사육하면서 어미의 산란행동, 산란횟수 및 주기에 대하여 조사하였다. 그리고 수컷의 egg-fanning 행동을 면밀하게 파악하여 부화장치 개발에 대한 기반자료로 이용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험어와 사육조건

실험어는 발리에서 채집한 자연산 *A. melanopus* 성어 암수컷 4쌍(A, B, C, D, Table 1)으로서 제주도 한국해수 관상어센터(CCOR)에서 사육되었다. 장기간 사육을 위하여 순환여과장치(700×150 mm, 5 ton)를 설치하였고, 여과장치는 포말분리, 물리적 및 생물학적 여과로 구성되어있다. 각 어미는 여과시스템에서 6개월 간 순치 후 2006년 5월 12일부터 관찰하였으며, 실험기간 동안의 사육 수온, 염분 및 광주기는 각각 $27.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$, 31.5 ± 1.0 psu, 14L:10D 였다. 각 수조에는 어미의 알 부착 및 수정란이 부화하는 부화판(hatching plate)을 두었다. 부화판은 직사각형 건축용 타일(15 cm×15 cm) 한 장을 15 cm PVC pipe (20 mm)의 1/3 지점에 45도로 고정시켰다. 산란 유무를 확인하기 위하여 부화판의 앞·뒷면이 관찰자에게 보이도록 배치하였다. 배합사료(BioMarine, France)는 매일 두 차례(8시, 17시)에 공급하였으며, 12시에는 시중에서 판매되는 날치 알을 공급하였다. 먹이 공급할 때마다 산란유무를 조사하여 기록하였다.

2-2. 산란횟수와 주기

2006년 5월 12일부터 2010년 12월 31일(총 1675일)까지 산란일을 기록하여 총 산란횟수, 연간 평균 산란횟수, 월간 최대·최소 산란횟수를 조사하였다.

2-3. 어미의 산란행동 및 알 관리

어미의 산란은 2007년 6월부터 7월까지 평균 11.8 ± 1.9 일 간격으로 산란주기를 확인한 후 다음 산란일을 예상하였다. 산란 직후부터 종료시점까지 캠코더(HDR-SR10, SONY, Japan)로 어미의 행동을 녹화하여 산란행동을 분석하였다. 알 관리 행동조사를 위한 실험어는 어미 A의 수컷을 이용하였고, 수정한 다음날부터 부화 일까지 오전 10시부터 5분간 egg-fanning(가슴, 꼬리지느러미 및 몸을 5~10회 흔들어 수류를 일으키는 행동)의 횟수를 기록하였고 5회 실시하였다(Ross, 1978).

Table 1. Four pairs of *Amphiprion melanopus* for spawning frequency and periodicity

Pair	Total length (mm)		Spawning experience
	Male	Female	
A	65	98	Yes
B	59	110	Yes
C	67	103	Yes
D	65	104	Yes

3. 결 과

3-1. 산란횟수와 주기

각각 암수 한 쌍씩인 A, B, C, D의 첫 산란은 Table 2에서 보는 바와 같이 2006년 6월부터 9월 사이에 일어났다. 1,675일 동안의 실험기간 중 A의 산란 횟수가 127회로 가장 많았으며, B와 D는 각각 103회, 77회였다. C는 2008년 10월에 암컷이 폐사하였기 때문에 38회로 산란횟수가 가장 적었다. 각 쌍의 연평균 산란횟수는 각각 25.4 ± 9.1 , 20.6 ± 7.3 , 12.6 ± 6.1 , 15.4 ± 6.4 회였고, 월평균 산란횟수는 각각 2.3 ± 1.0 , 1.9 ± 0.9 , 1.4 ± 0.9 , 1.5 ± 0.7 회로 A가 가장 많았다. 월간 최대 산란횟수는 A와 B가 4회, C와 D가 3회였으며, 월간 최소 산란횟수는 모든 어미에서 0회였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 특정기간 동안 휴식기를 갖는 것을 제외하고 모든 어미는 연중 산란하였다. A의 경우, 2006년 11월부터 2007년 5월까지 6개월 동안 산란하지 않았으나, 2007년 6월 이후부터 실험 종료시점인 2010년 12월까지 계속 산란하였다. B는 2010년 5월부터 8월까지 그리고 같은 해 12월에 총 5개월 동안 산란하지 않았으며, C와 D는 각각 6, 8개월 동안 간헐적으로 산란하지 않았다.

3-2. 산란행동과 알 관리

암수의 순차적 산란행동은 Fig. 2와 같이 1) 부화판과 주변 청소, 2) 산란전 암컷의 점액질 점착, 3) 산란과 수정, 그리고 4) 수컷의 알 관리의 4 단계였다. 산란 4~5일전부터 부화판과 그 주변을 청소하였으며 특히, 자신의 입을 이용하거나 몸 전체를 흔들어서 수조의 산호사를 바닥 들어날 때까지 주변 정리하는 것을 목격할 수 있었다. 산란일이 가까워지면서 이런 행동이 많아졌으며, 산란 당일 오전에는 알을 부착할 부분을 중심으로 부화판 청소를 적극적으로 하였다. 본격적인 산란에 앞서 암수 모두 2~3 mm 정도의 산란관이 항문이 돌출

Table 2. Records of spawning frequency of four pair *Amphiprion melanopus* for 1,675 days from May 12, 2006 to December 31, 2010

Pair	I	II	III	IV
First spawning	Jun. 7, 2006	Jun. 11, 2006	Jul. 5, 2006	Sep. 6, 2006
Spawning frequency	127	103	38	77
year ⁻¹ (mean±SD)	25.4±9.1	20.6±7.3	12.6±6.1	15.4±6.4
month ⁻¹ (mean±SD)	2.3±1.0	1.9±0.9	1.4±0.9	1.5±0.7
max month ⁻¹	4	4	3	3
min month ⁻¹	0	0	0	0

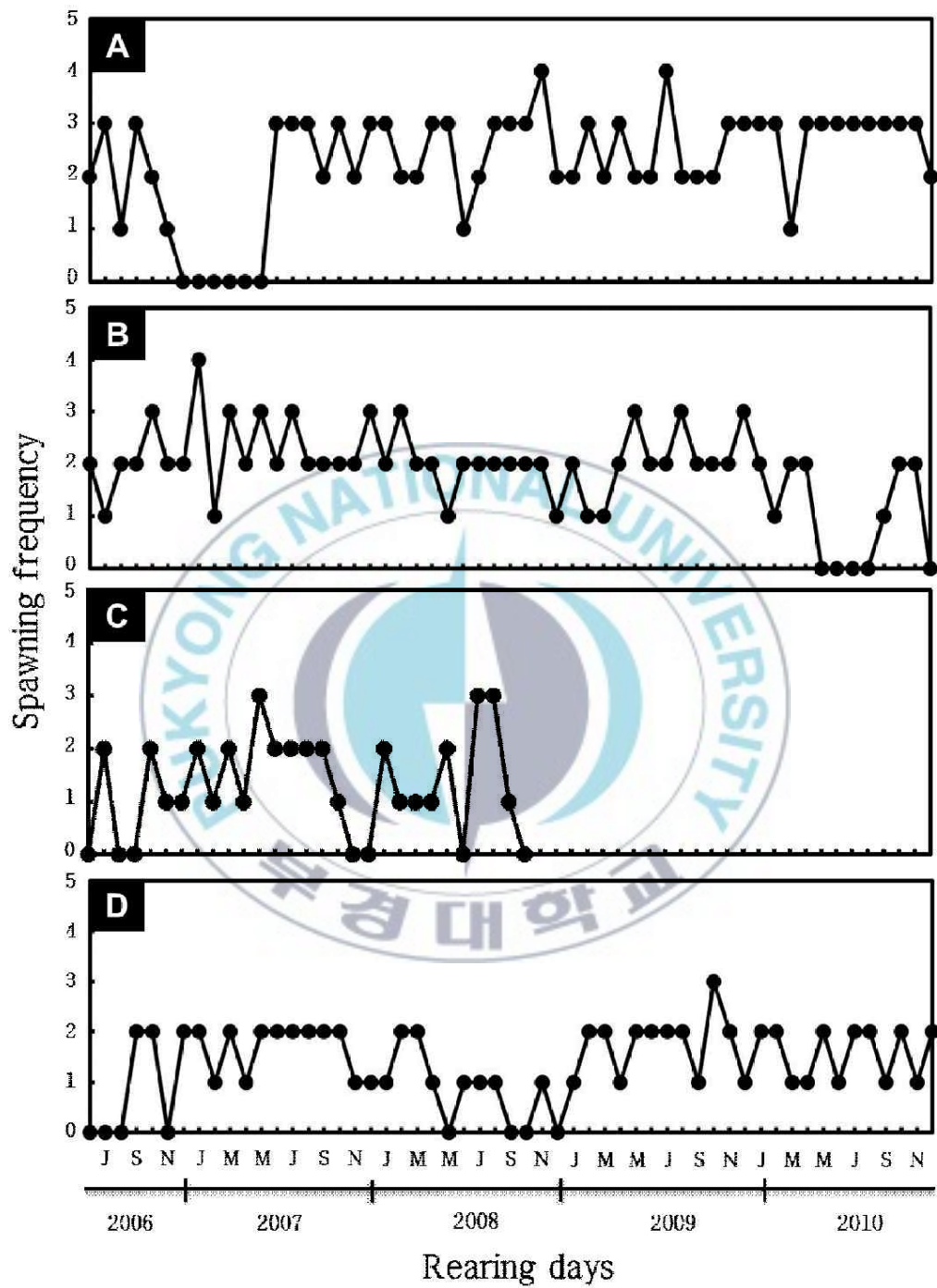


Fig. 1. Spawning cycles in four groups *Amphiprion melanopus* for 1,675 days from May 12, 2006 to December 31, 2010.

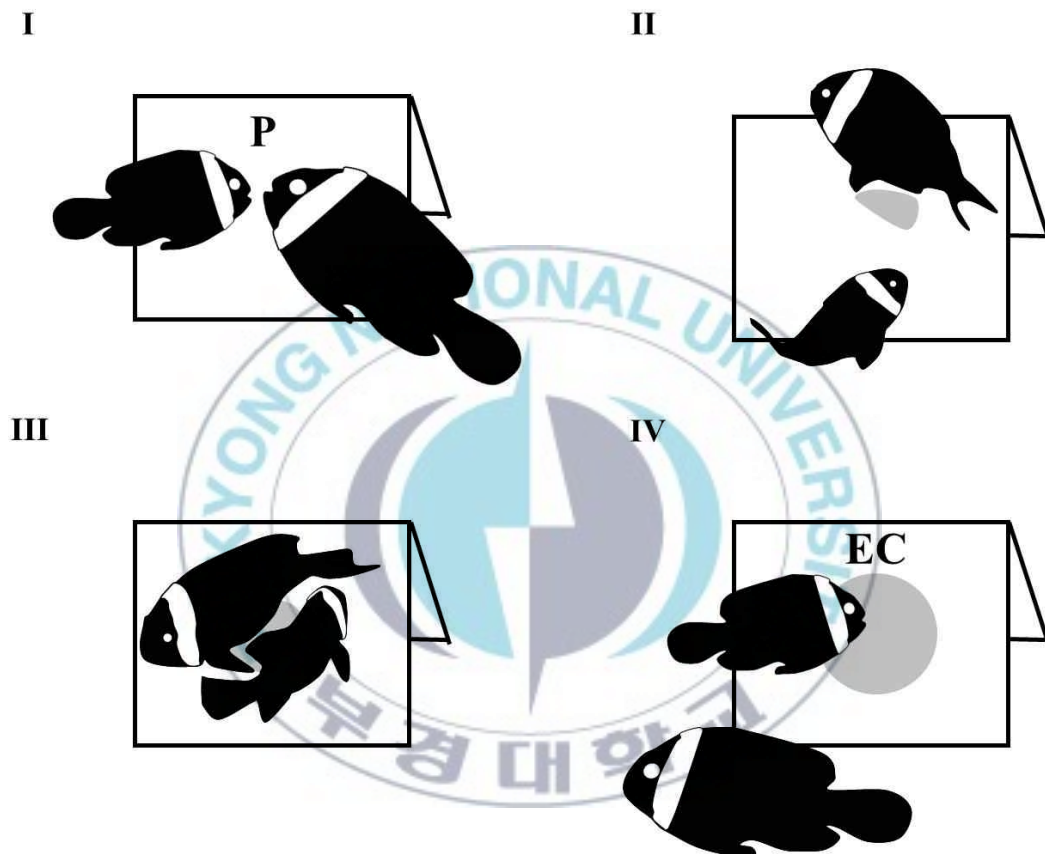


Fig. 2. Spawning behaviors of *Amphiprion melanopus*. I: Cleaning of the plate and its surrounding with the mouth before spawning; II: Female's mucous secretion on the plate; III: Spawning and Fertilization; IV: Nest care by male; EC: egg clutch, P: hatching plate.

되어 있었다(Fig. 3). 청소를 마친 암컷은 5~10 mm를 앞으로 서서히 전진하면서 산란관을 이용하여 점액질을 부화판에 분비하였다. 암컷은 점액분비 후 입의 개폐운동을 반복하면서 점액질을 부화판에 점착시켰으며, 이 때 수컷도 같은 행동을 하였다. 이러한 행동이 10~15분 지속되면 암컷이 일직선으로 4개의 알을 붙였고 다시 역방향으로 8개의 알을 부착시켰다. 암컷은 원을 그리면서 일정수의 알을 부화판에 붙였고 수컷이 그 뒤를 따르면서 수정하였다. 암컷의 산란은 오전 9시 55분경에 시작되어 11시 5분에 완료되었으며, 완료시점까지 50~60분이 소요되었다.

수컷에 의한 egg-fanning 행동은 Fig. 4에서 보는 바와 같이, 부화일이 가까워질수록 빈번해지는 경향을 보였다. 수정란은 주로 수컷에 의해서 관리되었고 암컷은 부화판에서 다소 떨어진 곳에 머물러 있었다. 관찰자가 다가갔을 때 두 가지 다른 특징적인 행동을 확인할 수 있었다. 하나는 수정란을 관리하던 수컷이 다소 놀라 수정란 근처에서 멀어지면 암컷이 수컷에게 다가가 공격적인 행동(입을 수컷의 몸에 붙여 밀어내는 행동)을 함으로써 수컷이 알 주변을 떠나지 않도록 하였으며, 수컷은 U자형으로 구부려 몸을 빠르게 흔들며 반응하였고 다시 알 관리를 하였다. 다른 하나의 행동은 수컷이 알에서 잠시 벗어나 암컷과 함께 관찰자에게 위협(관찰자를 향해 앞으로 돌진하다가 멈추는 행동)을 하거나 경계(몸을 위·아래로 흔드는 행동)를 하였다. 암컷은 주로 외부 자극에 공격적인 행동을 하지만 수컷은 같이 경계하다가도 수정란이 있는 곳으로 돌아와 알 관리 행동을 하였다.

4. 고 찰

실험 조건에서와 같이 일정한 환경에서 사육된 어미들의 산란횟수는 어미에 따라서 다르게 나타났다. 암컷이 2008년 10월에 폐사한 C를 제외하면, 월 산란

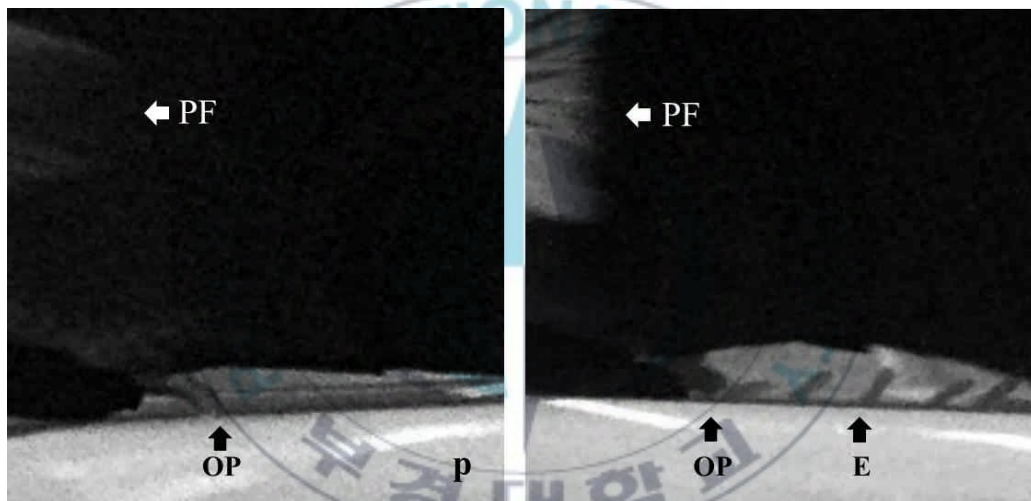


Fig. 3. Extended ovipositor of female *Amphiprion melanopus* during spawning. The mucus is secreted from the female ovipositor for 15–20 min, followed by the release of the eggs. E: eggs, OP: ovipositor, P: hatching plate, PF: pectoral fin.

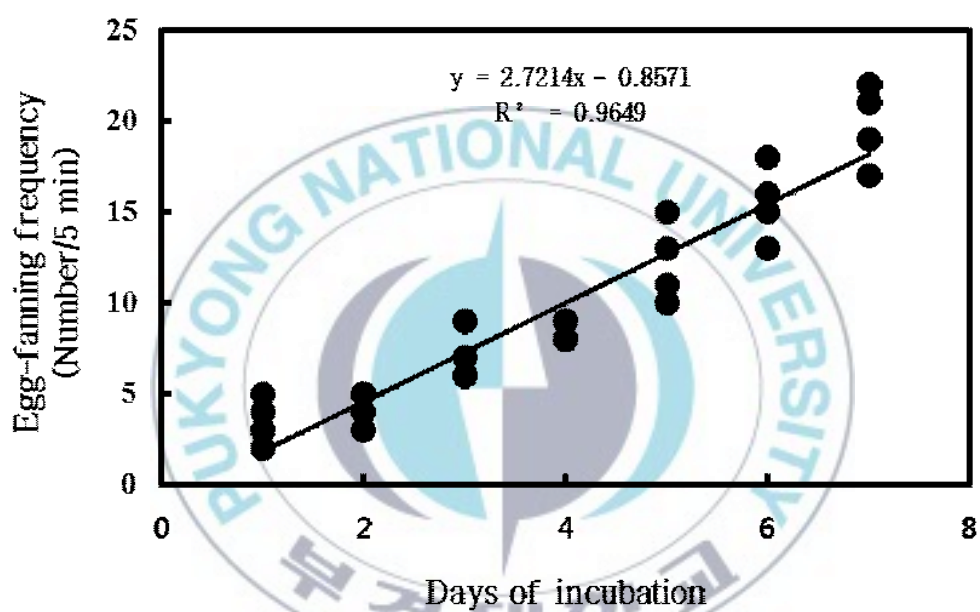


Fig. 4. Frequency of egg-fanning behavior in male *Amphiprion melanopus* during egg incubation.

횃수는 1.5~2.3회였다. 인공환경에서 사육된 *A. melanopus*의 다른 실험 보고에서도 월 평균 산란횃수는 1.7회로 나타났다. 그 외 다른 어종의 경우, 매월 *A. percula* 1.2회, *A. polymnus* 1.8회, *A. frenatus* 2.3회, *A. akallopisos* 2.4회, *A. clarkii* 2.9회로 나타났다(Hoff, 1996). 어종에 따라 산란횃수는 차이가 있지만, clownfish류는 평균 월 2.0회 산란한다. A, B, C와 D 모두 4~7개월 정도의 휴지기를 가졌으며, 그 외 기간에는 연속적으로 산란을 하였다. 휴지기를 갖는 시기는 Fig. 1과 같이, 어미에 따라 연속적 또는 간헐적으로 나타났다. 자연에서 서식하는 *A. melanopus*의 경우, 상현과 하현에 가장 높은 산란을 하였기 때문에 달의 모양변화에 영향을 받는 것으로 보고된 바 있으나(Ross, 1978), 인공적인 환경에서 사육된 *A. akallopisos*는 연중 2.2 ± 0.8 회/월 산란했고 월령과 관련성이 낮았다(Gordon & Bok, 2001).

같은 종일지라도 열대지역에서 서식하는 *Amphiprion* 종들은 계절적 영향에 관계없이 연중산란을 하지만(Allen, 1975; Ross, 1978), 아열대 지역의 *A. clarkii*는 여름에만 산란하는 것으로 보고되었다(Bell, 1976; Ochi, 1985). 그러나 본 연구에서는 각 쌍의 어미에 따라 여름에 휴지기를 갖거나 간헐적으로 산란을 하였다. 따라서 월령과 같은 환경요인이 차단된 인공적 환경에서 clownfish류의 산란주기는 개체의 연주리듬이나 암수 간의 사회적 관계와 같은 생태적 특성이 주도할 것으로 사료된다.

Clownfish류의 산란 전 행동은 일반적으로 종간에 유사하다. 복종의 의미로서 수컷의 머리 떨기, 암컷의 수컷을 향한 주의환기(공격적 행동), 암컷이 수컷의 배 부위를 자극하는 것과 같은 행동들이 나타나며, 특히, 산란 3~5일전부터 산란기질 주변을 깨끗하게 청소한다. 그러나 산란시간은 종에 따라 다소 차이가 있음을 보이는데, *P. biaculeatus*는 12시경, *A. clarkii*와 *A. frenatus*는 15~17시, *A. percula*는 17시 이후에 산란을 한다(Wilkerson, 1998). 본 연구에

서 *A. melanopus*는 산란이 9시부터 11시 사이에 일어났으나, 자연에서 서식하는 *A. melanopus*는 일출 후 2~3시간 후인 8~9시로 본 연구에서 보다 빨랐다(Ross, 1978). 이는 본 실험의 점등시간이 6시 30분에서 7시로서 일출시각보다 점등 시간이 늦기 때문에 산란유도 또한 늦게 일어난 것으로 추측된다.

Clownfish류의 알을 붙이는 원리 및 성분에 대한 연구는 보고는 미비하다. 산란 직전에 암컷의 항문에서 산란관이 돌출되며, 암컷은 점성이 있는 알을 산란 기질에 붙이는 것으로 알려져 있다(Hoff, 1996; Wittenrich, 2007). 그러나 본 연구의 동영상 분석결과, 암컷은 산란에 앞서 10~15분 동안 산란관을 기질에 붙여 조금씩 전진한 후, 입의 개폐운동을 반복하였다. 이것은 암컷이 점성의 알을 기질에 붙이는 것이라기보다 점액질을 기질에 분비하고 알을 붙이는 것으로 봐야할 것이다. 기존에 발표된 *Amphiprion* sp.의 난발생 결과(Hoff, 1996; Yoon et al., 2005; Kim and Hur, 2007)를 보면, 기질에 붙어 있는 알의 표면에는 점액질이 나타난다. 본 연구의 난발생 실험에서 부화판으로부터 탈락된 일부 알을 보면, 표면에 점액질이 없는 깨끗한 수정란을 볼 수가 있었다. 이것은 알 자체에 점액성분이 없고 점착성분의 점액질이 따로 존재한다고 볼 수 있다.

본 실험에서 수정란 관리는 대부분 수컷에 의해 이루어졌다. 수컷은 알을 관리하는 동안 먹이를 거의 먹지 않으며, 가슴지느러미를 움직여 수정란을 흔들며 주었다. 이것은 알에 신선한 물과 산소를 공급해주거나 미생물을 제거하는 행동으로 추측되며, 이러한 행동은 부화일이 가까워질수록 증가하는 경향을 보였다. 산란 직전에는 몸 전체를 이용해 알과의 접촉횟수도 증가하였는데, 이러한 행동은 자어가 알에서 깨어 나오는 것을 용이하게 하는 것으로 추측된다. 본 실험의 결과를 기반으로 알의 부화효율을 높일 수 있는 부화시스템을 개발하여, 4장에서 그 결과를 제시하였다.

III. 난발생과 자치어 발달

1. 서 설

일반적으로 clownfish류는 자어에서 치어, 치어에서 성어로 변태하면서 체색이 변하는 변태 과정을 겪는 것으로 알려져 있다. 초기 자어는 큰 입과 눈, 일직선의 창자, 미발달된 지느러미, 부레 및 비늘 그리고 투명한 체색이지만, 부화 후 7~10일 사이에 변태가 시작되면서 비늘이 생기고, 지느러미가 뚜렷해지며, 부레가 완벽하게 기능을 하게 된다. 창자는 소화의 흡수와 효율을 높이기 위해 회선상의 모양이 되며, 특히, 체색이 검게 변하고, 흰 줄무늬가 나타나기 시작한다. Clownfish류의 대표적인 특징의 하나인 흰 줄무늬는 *A. melanopus*의 경우, 머리에서 하나만 나타나지만, *A. ocellaris*는 머리, 몸 중간, 꼬리에 걸쳐 3개, *A. polymnus*는 머리에 하나 그리고 등지느러미에 말 안장처럼 짧은 흰 줄무늬를 가지고 있다. *A. akallopisos*는 머리에서 꼬리까지 척추를 따라서 흰 줄무늬가 있으며, *A. ephippium*은 흰 줄무늬가 없다. Clownfish류의 흰 줄무늬는 부화 후 7일 이후부터 생겨나지만, 각 어종의 특징이 결정되는 시기는 어종에 따라 차이가 있다(Bertschy, 1979; Hoff, 1996).

지질성분의 하나인 고도불포화 지방산(highly unsaturated fatty acids)은 자어 먹이의 필수 성분으로서 부족하게 되면, 시각 및 중추신경계 발달의 이상, 성장 및 스트레스 저항력 감소, 체색 이상, 유영능력과 섭식활동 감소 등의 문제를 일으킨다. 필수 지방산의 중요성은 일반 어류 뿐 만 아니라 yellow tail damselfish *Chrysiptera parasema* (Olivotto et al., 2003), cleaner goby *Gobiosoma evelynae* (Olivotto et al., 2005), *Pseudochromis flavivertex* (Olivotto et al., 2006)와 같은 관상어에서도 보고된 바 있다. HUFA로 영양강화된 먹이의 공급은 자어의 생존과 성장을 향상 시키는 것으로 알려져 있다.

인공번식을 많이 시도하는 생산 현장에서는 clownfish류의 체색변화가 일어나는 변태시기에 많은 폐사가 발생하는 것으로 알려져 있는데, 이것은 아마도 영양학적 문제에 의한 것으로 예상된다. 본 연구에서는 *A. melanopus*의 난발생과 초기발달에 관한 기초자료를 수집하고 변태과정 중 먹이종류에 따른 생존율을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험어와 사육조건

난발생 실험을 위한 수정란과 자치어 발달 및 먹이종류에 따른 생존율 조사는 제주도 한국해수관상어센터에서 실시하였다. 자치어 사육 조건으로서 수온, 염분 및 광주기는 각각 $27.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$, 31.5 ± 1.0 psu, 14L:10D였다. 자어수조에는 *Isochrysis galbana*를 첨가하여 수질 안정과 먹이생물의 먹이로 이용될 수 있게 해 주었다.

2-2. 난발생

난발생 관찰은 어미의 산란 및 수정 후, 수정란이 부착된 알판을 인공 부화 장치로 옮겨 7일간 두면서 관찰하였다. 수온, 염분 및 광주기는 각각 $28.8 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, 32 psu, 12L:12D로 유지하였으며, 난발생 관찰 시간은 수정 후부터 30분 간격으로 관찰하다가 2일째부터는 3시간 간격으로 부화시까지 관찰하였다.

2-3. 자치어 발달

자치어 발달에 대한 형태학적 조사를 위하여 0, 5, 10, 15, 30, 60 그리고 90 일째에 각각 10마리씩 선발하여 버니어캘리퍼스로 전장을 측정하였다. 자치어의 형태변화는 입체현미경(DV4, Zeiss)과 디지털 카메라(D300, Nikon, Japan)를 사용하여 관찰·분석하였다.

2-4. 먹이종류별 자치어 생존율

먹이종류에 따른 생존율을 조사하기 위하여 갯 부화한 자어를 20마리씩 10

L 플라스틱 원형 수조에서 넣은 다음, 먹이종류 및 혼합비율에 따라 3개 실험구(RO: only rotifer *Brachionus rotundiformis*, RA: rotifer+*Artemia* nauplii, EA: rotifer+*Artemia* nauplii+enriched *Artemia* sp.)로 나누어 20일간 사육하였다. Rotifer는 *Nannochloropsis* sp.로 4시간 영양강화하여 10개체/mL씩 공급하였다. *Artemia* nauplii의 경우, 영양강화제인 DHA Selco (INVE, USA)를 24시간 동안 영양강화하여 5개체/mL씩 공급하였으며, 먹이공급은 3시간 마다 먹이량을 확인하여 부족량을 보충해 주었다. 수온, 염분 및 광주기는 각각 $27.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 32 psu, 13L:11D로 유지하였다. RO구에서는 실험 종료시까지 rotifer만을 공급하였다. RA구에서는 5일째부터 *Artemia* nauplii만을 공급하였고, rotifer는 6일째부터 중단하였다. EA구는 6일째까지 RA구와 같은 방법으로 공급하다가 7일째 *Artemia* nauplii 대신 영양강화 *Artemia*를 실험 종료 시점까지 공급하였다. 본 실험은 3반복으로 실시하였고 각 실험구별 먹이공급 일정은 Table. 3과 같다.

3. 결 과

3-1. 난발생

수정란(n=20)은 타원형의 침성 부착란으로서, 다소 옅은 주황색이었다. 수정란의 크기는 장경 2.4 ± 0.1 mm, 단경 0.9 ± 0.9 mm였으며, 세포질에는 다양한 크기의 많은 유구가 관찰되었다(Fig. 5). 수정 후 1시간째에 배반이 형성되었고, 1.6시간이 지나서 2세포기로 이행하였다. 3시간이 경과하면서 제 2난할이 일어나 4세포기로 되었고, 수정 후 4.1시간째에 8세포기를 형성하였다. 32세포기, 64세포기, 상실기는 수정 후 각각 5.1시간, 6.5시간, 7.6시간, 9시간째에 관찰 되었다. 포배기는 수정 후 10.8시간째에 형성되었고 배반엽이 커지기 시작하였으며, 수정 후 19.3시간째에 낭배기에 도달하였다. 배반엽은 난황의 절반

Table 3. Feeding regime for the rearing of *Amphiprion melanopus* during the experimental period

Group Feed Days		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RO	Ro															
	Ro															
RA	An															
	An															
EA	Ro															
	An															
	Ea															

An: *Artemia* nauplii, Ro: rotifer *Brachionus rotundiformis*, Ea: enriched *Artemia* adult.

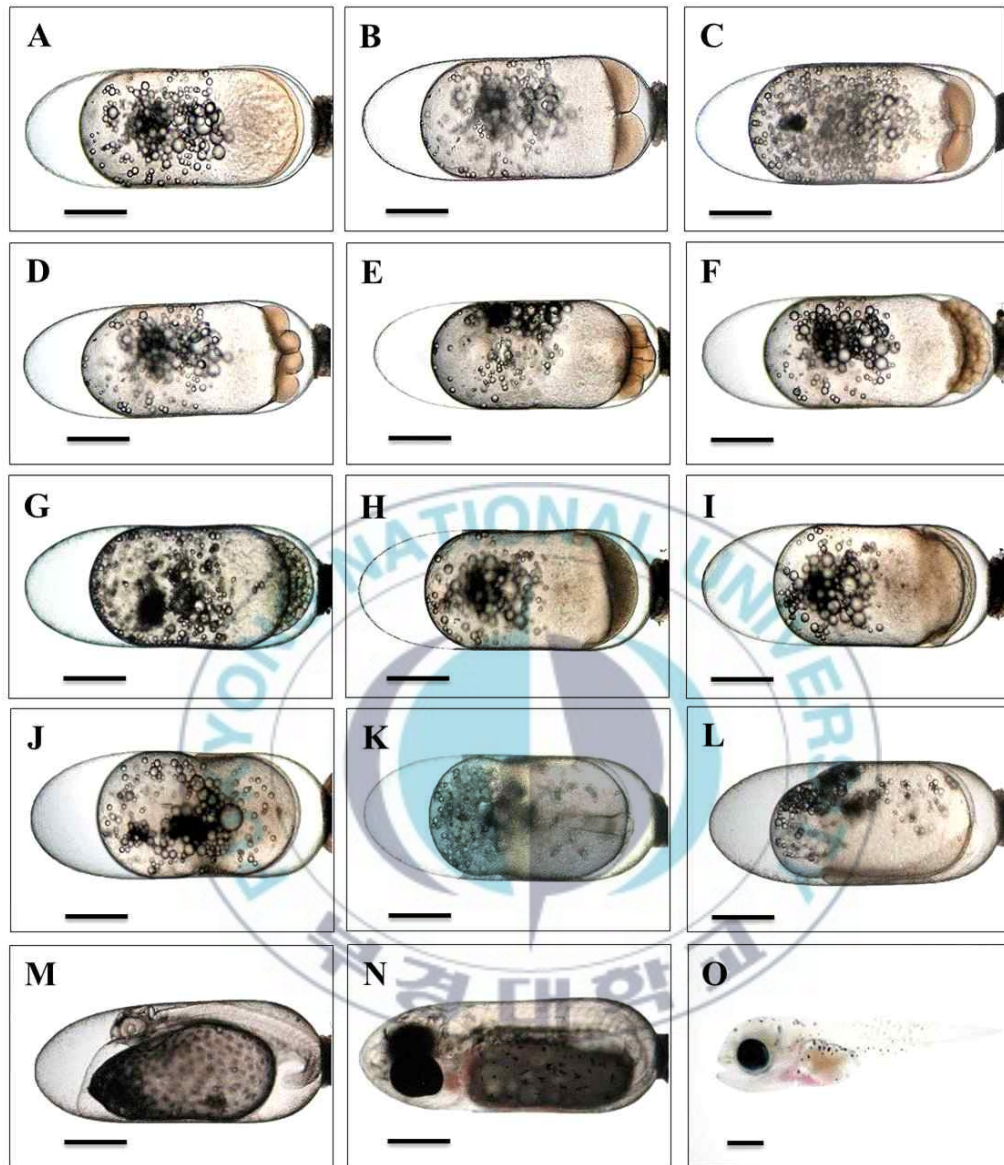


Fig. 5. Embryonic development of *Amphiprion melanopus*. A: fertilized egg; B: 2-cell; C: 4-cell; D: 8-cell; E: 32-cell; F: 64-cell; G: morula; H: blastula; I: gastrula; J: blastodisc covering of yolk; K: embryo formation; L: lens and ear vesicle formation; M: heart beating; N: embryo before hatching; O: hatch out. Bar= 500 μm .

을 덮었다. 수정 후 24.8시간이 지나서 배반엽이 난황의 대부분을 덮고 난 후에 배체가 출현하였다. 수정 후 46시간이 지나서 머리에 안포와 이포가 형성되었으며, 이후로 부착사 쪽으로 향해있던 머리가 반대쪽으로 이동하였고 14~15개의 근절이 관찰되었다. 수정 후 57시간째에는 꼬리가 난황과 분리되었고 근절부위에서도 흑색소포가 관찰되었으며, 이때 근절은 24~25개였다. 70시간 경과 후 심장형성과 함께 심장박동이 관찰되었다. 분당 심장 박동수는 160회/분으로 꼬리의 움직임도 관찰되었다. 수정 후 120시간째에는 혈액의 움직임과 근절의 일부 마디에는 황색소포가 관찰되었다. 이후는 부화 직전의 상태로 배체가 난대를 완전히 채웠으며 안구는 완전히 흑화되었다. 부화까지 소요된 시간은 수정 후 180시간이었으며, 소등 후 1.5시간에서 2시간 사이에 부화하였다(Table 4).

3-2. 자치어 발달

갯 부화한 자어는 전장 3.5 ± 0.3 mm로서 대부분 난황을 흡수한 상태였다(Fig. 6). 흑색소포는 주로 두부의 위쪽 그리고 복부와 척추사이를 따라 분포했으며, 등, 꼬리, 복부에도 부분적으로 열은 흑색소포가 관찰되었다. 그리고 눈과 입 주변에는 황색소포가 분포하였다. 5일째와 10일째 자어의 전장은 각각 5.8 ± 0.3 mm, 8.3 ± 0.3 mm였으며, 흑색소포가 몸 전체에 고루 발달해 있었다. 특히 9~10일째부터 머리 부위와 등지느러미가 시작되는 부분에서 반투명한 줄무늬가 관찰되었다. 부화 후 15일째 자어(10.1 ± 0.2 mm)의 입 주변과 각 지느러미는 황색에서 주황색으로 발달되었고, 몸 전체는 진한 고동색이었다. 대부분 자어의 머리와 등에는 흰 줄무늬가 선명하게 나타났으며, 20일이 지나면서 꼬리지느러미에도 흰 줄무늬가 나타나기 시작했다. 30일째 자어(13.1 ± 0.4 mm)의 입 주변과 각 지느러미는 주황색으로 선명했으며, 등지느러미와 꼬리지느러미의 흰 줄무늬는 사라지기 시작했다. 부화 후 60일째 자어(23.0

Table 4. Embryonic development of *Amphiprion melanopus*

Developmental stage	Time after fertilization (hours)
Fertilized egg	0
2-cell	1.5
4-cell	3.0
8-cell	4.1
32-cell	6.5
64-cell	7.6
Morula	9.0
Blastula	10.8
Gastrula	19.3
Blastodisc covering of yolk	24.8
Embryo formation	26.6
Lens and ear vesicle formation	46.0
Heart beating	70.0
Embryo before hatching	160.0
Hatch out	180.0

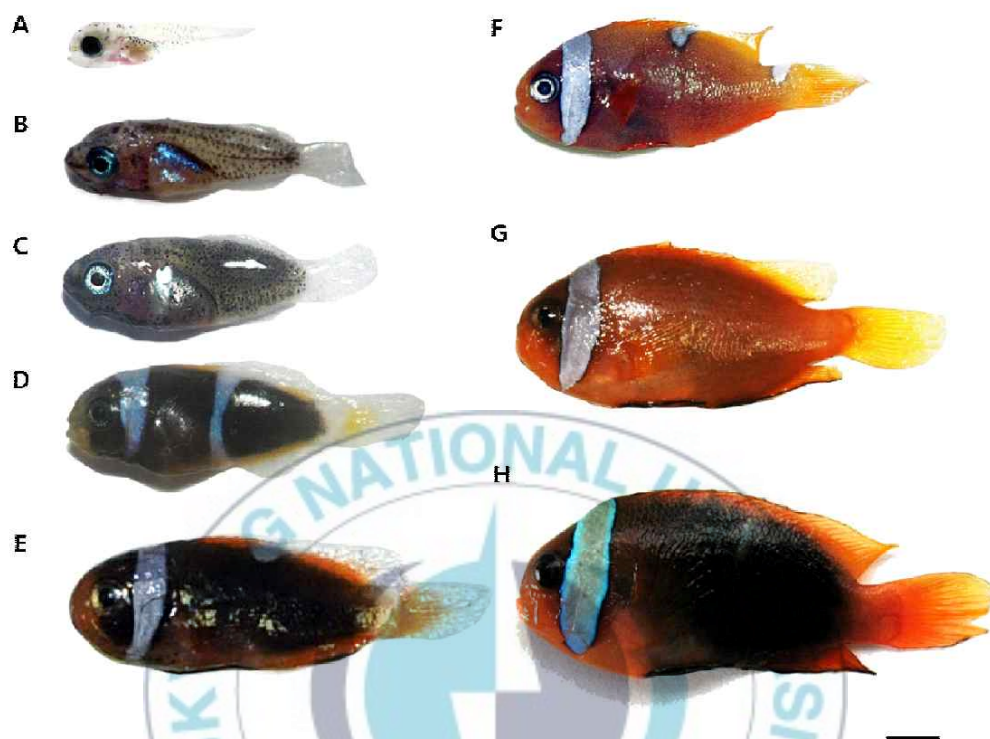


Fig. 6. Color development of Larval and juvenile *Amphiprion melanopus*. A: hatching larva (3.5 ± 0.3 mm), B: 5 days after hatching (5.8 ± 0.3 mm), C: 10 days after hatching (8.3 ± 0.3 mm), D: 15 days after hatching (10.1 ± 0.2 mm), E: 30 days after hatching (1.2 ± 0.3 cm), F: 60 days after hatching (2.3 ± 0.4 cm) G: 90 days after hatching (4.1 ± 0.3 cm), H: adult (9~10 cm). Bar= 1 mm (A, B); 1.5 mm (C, D, E); 3.5 mm (F); 5 mm (G); 10 mm (H).

± 0.3 mm)는 몸 전체의 색깔이 진한 고동색에서 적갈색으로 변해 있었다. 90 일째 자어(41.0 ± 0.3 mm)의 머리에는 흰 줄무늬가 선명하였다. 전장이 9 cm인 성어의 입 주변과 각 지느러미는 적갈색이었고, 몸통은 진한 고동색이었다. 개체에 따라서 진한 고동색이 차지하는 부위가 눈앞까지 오는 개체가 있는 반면, 일부는 머리의 흰 줄무늬 뒷부분까지 발달되어 있었다.

3-3. 먹이종류별 자치어 생존율

Fig. 7에서 보는 바와 같이, 1~2일 사이에 모든 실험구에서 일부 폐사개체가 발생하였다. RO구에서는 17일 이전에 모든 개체가 폐사하였다. 대부분 7~14일에 폐사가 일어났으며 특히 9~10일째에 폐사가 집중되었다. RA구와 EA구의 생존율은 각각 68.3%, 78.3%였다(Table 5).

4. 고 찰

본 연구에서 *A. melanopus*의 수정란은 부화까지 7일이 소요되었다. 자연에서 서식하는 개체의 경우, 7~8일째에 부화한다고 보고되었지만 수온 및 염분과 같은 환경조건이 제시되지 않았다(Ross, 1978). 반면, 수조환경에서 수온과 염분이 각각 30°C, 33 psu일 경우, *A. melanopus*의 수정란은 7일째 부화하며, 부화율도 높았다(Kim & Hur, 2007). Clownfish류의 부화일은 어종에 따라 다른 것으로 보고되고 있다. 수온조건이 26~28°C일 경우, *A. clarkii*는 6일, *A. akallopisos*, *A. polymnus*는 7일, *A. ephippium*, *A. ocellaris*, *A. percula*는 8일, *A. frenatus*, *A. melanopus*는 9일째 부화한다.

*A. melanopus*의 수정란은 타원형으로 장경 2.4 mm였는데, 이것은 *A. melanopus*와 같은 complex에 속하는 *A. frenatus*의 2.6~2.9 mm 보다는 작지만, 2.3~2.5 mm인 *A. polymnus*와 비슷하다. 그 외에 *A. ocellaris* 2.2~2.4 mm

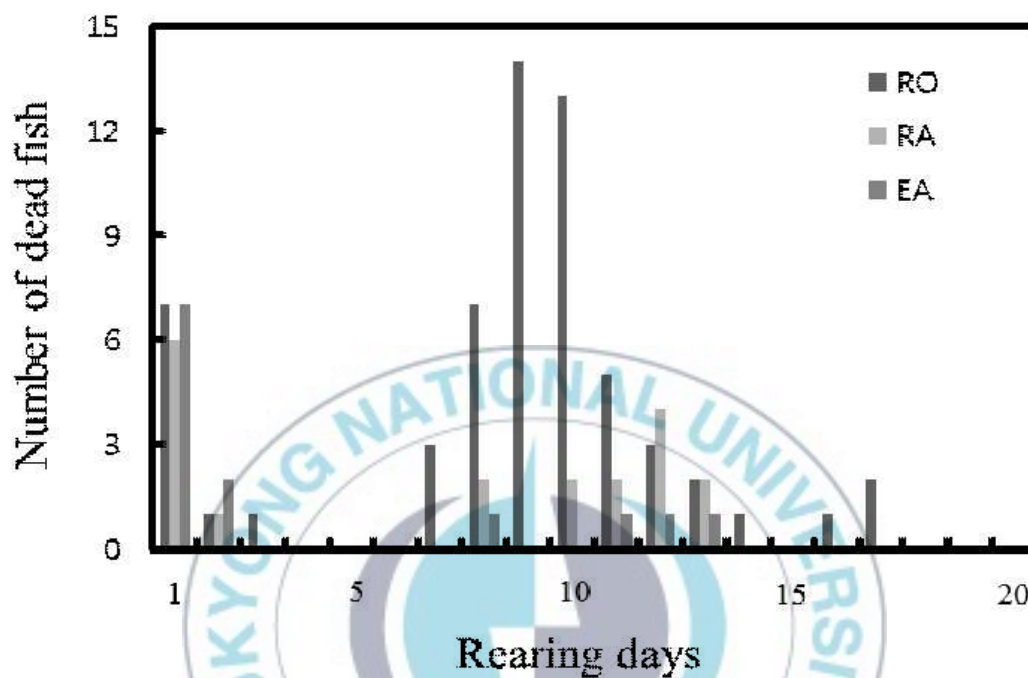


Fig. 7. Number of dead fish of *Amphiprion melanopus* by three types of live food feedings. RO: only rotifer *Brachionus rotundiformis*, RA: rotifer+*Artemia* nauplii, EA: rotifer+*Artemia* nauplii+enriched *Artemia* sp.

Table 5. Survival rate of larval (DAH 0 to 20) *Amphiprion melanopus* by live food type

Survival rate	RO	RA	EA
%	0±0	68.3±11.5	78.3±2.9

RO: rotifer; RA: rotifer with *Artemia* nauplii; EA: enriched *Artemia* sp.

A. sandaracinos 1.9~2.1 mm, *A. perideraion* 2.0~2.1 mm, *Premnas biaculeatus* 1.9~2.0 mm보다 크기 때문에 clownfish류 중에서 비교적 대형란에 포함된다. Clownfish류의 산란 직후 알 색깔은 종에 따라 다르다. *A. ocellaris* 주황색, *A. clarkii* 주황색 또는 노란색, *A. frenatus* 붉은 색, *A. perideraion* 핑크색, 그리고 *P. biaculeatus* 선홍색이다. Clownfish류의 난발생과정은 어종에 따라 시간적 차이를 보일 뿐, 전체적으로 비슷한 경향을 보인다.

*A. melanopus*의 자치어 발달은 부화 16일경까지 변태가 거의 완료되어 바닥에 정착하며, 거의 완벽한 어미의 특징을 갖춘다고 보고되었다(Kim and Hur, 2007). 그러나 *A. melanopus* 성어의 특징은 머리에만 흰 줄무늬를 가지는 데, 본 연구 결과 부화 후 15~20일에는 3개의 흰 줄무늬(머리, 몸 중앙, 꼬리)가 나타났고, 30일후에는 등과 꼬리의 흰 줄무늬가 다시 사라졌다. 부화 후 90일 이후부터 성어에 가까운 모습을 갖추었다. *A. ocellaris*의 경우, 14~30일에 3개의 흰 줄무늬가 완전히 발달하게 되며, 이후 꼬리지느러미에 검은 체색이 발달한다. *A. polymnus*의 경우, 부화 후 13일째에 3개의 흰 줄무늬가 나타나며, 부화 후 45일째 성어의 모습에 도달한다. 어종에 따라서 다소 차이는 있으나 일반적으로 성어의 체색발달은 80일 전후에 완료된다. Clownfish류의 경우, 변태시기에 영양적 결핍이나 스트레스는 흰 줄무늬 형성에 영향을 줄 수 있는데, 흰 줄무늬가 중간에 끊기거나 발달 자체가 되지 않는“mis-baring”현상이 생긴다. 비정상적인 변태과정에 의해 생긴 mis-bar를 갖고 있는 *A. clarkii*는 그 상태로 성장을 하며, 이것은 유전적 원인보다는 영양적·내분비적 문제인 것으로 사료된다. 관상어류에 있어서 체색이나 비정상적인 흰 줄무늬는 가치를 떨어뜨리는 요인이 되므로 이에 대한 대책이 필요하다(Hoff, 1996; Celement et al., 2001; Avella et al., 2007).

Rotifer *Brachionus plicatilis*는 *Artemia* sp.와 함께 해산어종의 초기 먹이생물로 이용되는 윤충류의 일종이다. Rotifer는 여과섭식을 하는 생물로서 28 μ m 이

하의 입자는 모두 섭취하기 때문에 EPA나 DHA를 포함하고 있는 미세조류를 공급하여 rotifer를 영양강화한다. 영양강화가 불충분한 상태의 rotifer를 공급하더라도 생존율에는 큰 영향을 주지 않기도 하지만, 종종 변태시기의 영양불균형은 형태적 돌연변이나 비정상적인 체색을 유발시킬 수 있다(Wittenrich and Martin, 2007). 본 연구에서 20일간 rotifer 만을 공급한 RO구에서는 모든 자어가 전량 폐사하였는데, 이것은 아마도 실험에서 실행한 rotifer의 영양강화가 불충분하거나 그 외 수질이나 관리 소홀에 의한 것으로 보인다. *Artemia*가 공급된 RA구, EA구는 50% 이상의 생존율을 보였고, 영양강화된 *Artemia*가 공급된 실험구는 78.3%의 생존율을 보였다는 점에서 영양학적 요소가 RO구의 주된 폐사원인이라고 생각된다. 특히, RO구의 자어폐사가 흰 줄무늬가 형성되는 9~10일째에 집중되었다는 점이 이를 뒷받침해주고 있다. 부화 후 1일째에 모든 실험구에서 폐사개체가 많이 발생했는데 이와 같은 초기 폐사는 실험을 위한 수조 이동 스트레스, 새로운 환경의 부적응 등에 기인하는 것으로 추측된다. Wilkerson(2001)은 부화 후 20일 동안 폐사를 일으킬 수 있는 요인으로 비정상적 먹이, 수조이동, 변태, 물리적 영향(수표면의 기름, 수류 등), 그리고 수질의 6가지를 제시하였다. 그러므로 초기 폐사를 줄이기 위해서 부화후 수조 이동을 줄이면서 충분한 영양강화를 통한 먹이공급이 이루어져야 될 것이다.

IV. 인공 부화장치 개발

1. 서 설

일반적으로 clownfish류 자어는 수정 후 7~10동안 어미에 의해 관리되다가 부화 당일에는 헤가지고 나서 1시간 30분에서 2시간째에 부화하며, 수표면으로 이동하여 1~3주 동안 먹이생물을 섭식하며 성장한다. 부화 후 14일째부터 다시 저층으로 내려가 말미잘과 같은 은신처에서 서식하게 된다. Clownfish류의 알 관리기간은 어종에 따라서 차이가 있다. 수온조건이 26~28℃일 경우, *A. clarkii*는 6일, *A. akallopisos*, *A. polymnus*는 7일, *A. ephippium*, *A. ocellaris*, *A. percula*는 8일, 그리고 *A. melanopus*와 *A. frenatus*는 8~10일이다.

일반적으로 어미가 수정란을 직접 관리하여 부화하는 것이 정상적인 방법일 것이다. 그러나 이것을 생산적인 측면에서 보면, 소등 후 부화 시간이 되면 다시 점등하여 어미가 있는 수조에서 갓 부화한 자어를 일일이 잡아 다른 수조로 옮기는 과정을 거쳐야만 한다. 이러한 과정들은 자어와 어미에게 스트레스를 줄 수 있어 생산효율을 떨어뜨리기에 생산과정의 개선이 절대적으로 필요하다.

II장에서 언급한 바와 같이, 알 관리 기간 동안 수컷의 egg-fanning 행동은 알에게 수류를 일으켜 신선한 물과 산소공급, 부착생물 제거 그리고 부화를 돕는 것으로 추측된다. 그러므로 수류를 일으킬 수 있는 장치를 고안한다면 수컷의 egg-fanning 행동을 대체할 수 있을 것이다. 이와 관련된 이전연구결과로는 Hoff(1996)의 에어레이션을 이용한 방법으로 에어스톤에서 만들어지는 공기방울이 직접 수정란에 부딪히게 하여 수정란을 움직이게 방법이 있다. 이 방법은 비교적 간단하고 저렴하여 쉽게 시행할 수 있으나, 물방울이 직접 수정란에 부딪히기 때문에 난막내의 발생중인 자어에게 스트레스를 줄 수 있는 단점이 있다.

Rho et al. (2006)은 물의 낙차에 의해 만들어진 힘을 이용하여 알에게 수류를 공급해 주는 스프레이형 부화장치를 제안하였다. 그러나 이 방법 역시 알에 연속적으로 수류를 일으켜 연속적으로 알이 움직이게 된다는 점에서는 에어레이션형 부화장치와 같은 단점을 가지고 있다. 수정란에 연속적으로 수류를 공급하면서 물리적으로 압박을 가하는 상기 인공부화 방법은 부화율의 저하를 초래할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 수류가 수정란에 영향을 주는 시간을 제한하는 회전수류형을 고안하였다. 따라서 본 연구에서는 3가지 형식의 수류공급 방법별 수정란의 부화율을 비교하였으며, 부화판의 개수에 따른 부화율을 함께 비교함으로써 대량 생산의 가능성을 파악하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 부화장치별 부화율 조사

부화율 조사는 제주도 한국해수 관상어센터에서 사육 중이던 4종의 어미(*A. melanopus*, *A. ocellaris*, *A. polymnus*, *P. biaculeatus*)의 산란을 확인하고 산란 후 1시간 후에 디지털 카메라(D300, Nikon, Japan)로 최대비율로 설정하여 근접 촬영하였다. 초기 수정란의 숫자(a)는 사진 편집프로그램인 photoshop을 이용하여 기록하였다. 부화당일에는 부화판을 부화장치로 옮기기 2시간 전에 알 관리기간 동안 탈락된 알의 숫자(b)를 위와 동일한 방법으로 기록하였다. 그리고 소등 후 2시간에 다시 점등하여 미부화한 알의 숫자(c)를 기록하였다. 부화율은 다음과 같이 계산하였다: 부화율(%): $(a-b-c)/(a) \times 100$.

수온 및 염분은 각각 $27.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$, 31.5 ± 1.0 psu로 설정하였고 부화장치별 3반복 실험을 실시하였다.

2-1-1. 에어레이션형(aeration type)

Fig. 8과 같이 에어스톤(지름: 1 cm, 길이: 10 cm)을 부화판 아래에 설치하여 공기방울이 직접 수정란에 부딪치면서 계속 알들이 흔들리도록 한다.

2-1-2. 스프레이형(spray type)

스프레이형(Fig. 8)은 2층으로 된 부화장치이며, 1층 부화조에는 부화판이 들어가고 부화조의 모서리에 설치된 10 w 소형 펌프는 2층으로 물을 올려 보낸다. 이 펌프의 유수구에는 부화 유생이 펌프에 흡입되지 않도록 표면적이 넓은 그물망이 설치되어 있다. 1층에서 올라온 물은 2층의 저수조로 이동해서 여기에 설치되어 있는 페트병(Pb)의 호스(지름 5 mm, Ph)를 통하여 높이차에 의해 수정란으로 다시 향하게 된다. 저수조에는 수위조절 장치(C)를 설치하여 일정한 수위까지 물이 차게 되면 펌프(P)를 멈추도록 하였다.

2-1-3. 회전수류형(rotating type, RT)

본 실험을 위해 제작된 회전수류형(Fig. 8)은 2층으로 된 부화장치다. 1층의 저수조의 물은 20w 펌프를 통해 2층의 부화조로 이동한다. 이때 물이 웨이브머신(WavySea, SMTEK, Korea)을 통과하면서 부화판의 수정란을 흔들게 하는 방법이다. 이 웨이브머신은 각도를 지정할 수 있어서 특정 지점을 반복적으로 왕복할 수 있으며, 본 실험에서는 알이 수류의 영향을 받는 시간과 왕복 시간을 각각 5초, 20초로 설정하였다.

2-2. 회전수류형 부화장치의 부화판 개수에 따른 부화율

회전수류형 부화장치에서 clownfish의 부화율은 부화판 개수에 따라 다음과 같이 세 그룹으로 나누어 조사하였다. 3개의 실험용 부화장치내에 각각 부화판 2개(2P), 부화판이 3개(3P), 5개(5P)를 설치한 다음, 각각의 부화율을 조사하였다. 부화율 조사를 위하여 동시에 같은 어종의 어미로부터 2개 이상의 부화판을 수거할 수가 없으므로, 4종의 어미로부터 부화날짜가 일치하는 부화판

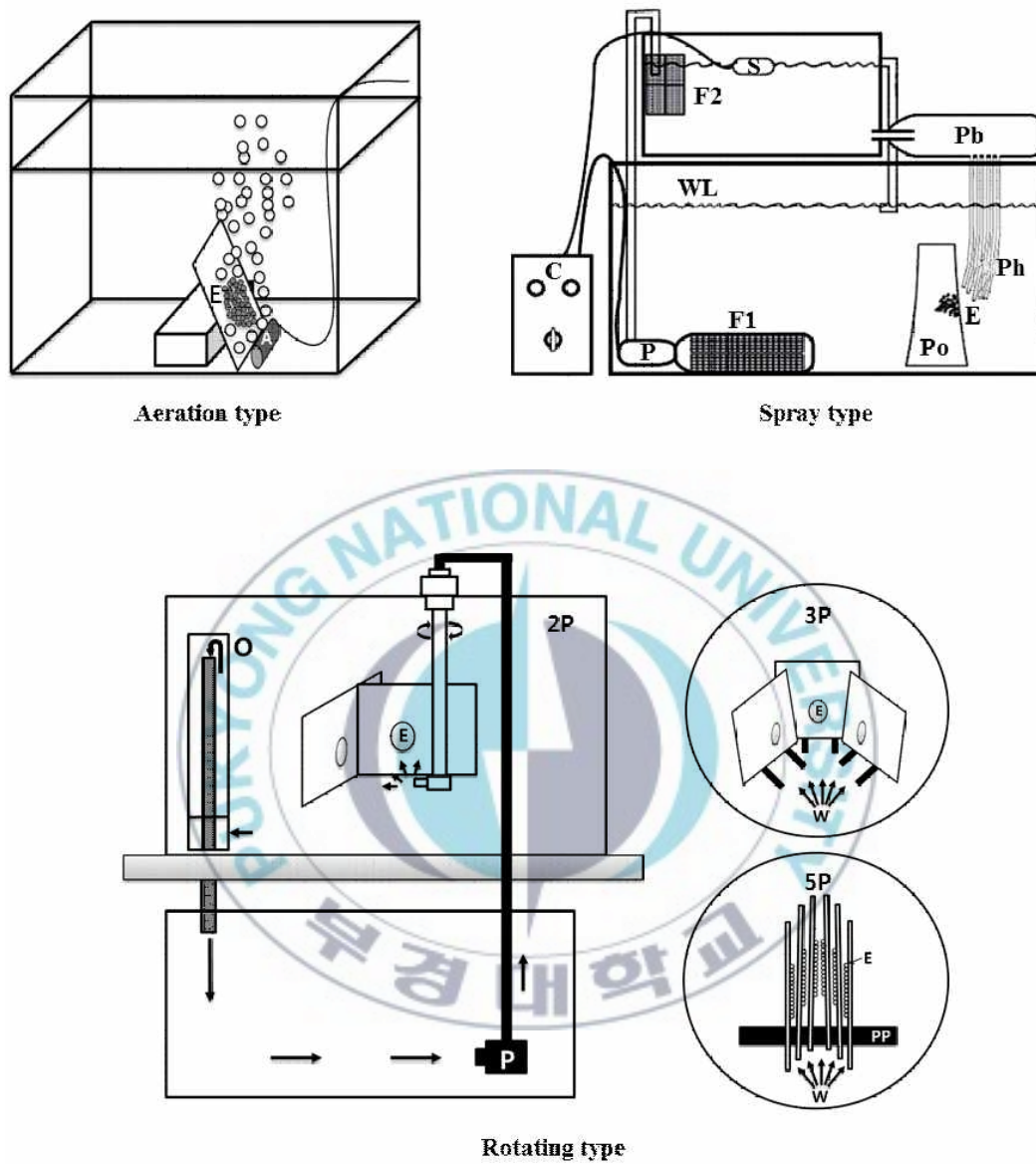


Fig. 8. Diagrams showing three types of system developed for the hatching of clownfishes. A: air stone; C: water level controller; E: eggs; F1&2: filter; O: over flow; P: pump; Pb: plastic bottle; Ph: plastic horse; Po: Pot; PP: PVC pipe; S: water level sensor; WL: water level.

을 사용하여 부화율을 조사하였다. 각 실험에 이용된 clownfish 종류는 Table 6에 나타내었다.

2-3. 통계분석

실험결과의 자료값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 로 나타내었다. SPSS(ver. 17)를 이용하여 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test로 95% 신뢰수준에서 유의차 유무를 검정하였고, Tukey test using ranks로 유의차 검정하였다.

3. 결과

3-1. 부화장치별 부화율

어종별 부화방법에 따른 부화율은 Table 7에서 보는 바와 같이, *A. melanopus*의 경우, 에어레이션형, 스프레이형, 회전수류형 부화장치에서의 부화율은 각각 $56.9 \pm 2.5\%$, $72.4 \pm 4.5\%$, $88.1 \pm 1.5\%$ 였고, *A. ocellaris* 수정란은 각각 $61.5 \pm 5.1\%$, $71.8 \pm 1.5\%$, $87.2 \pm 2.7\%$ 였다. *A. polymnus* 수정란은 각각 $61.4 \pm 4.8\%$, $79.2 \pm 3.3\%$, $88.9 \pm 1.2\%$, *P. biaculeatus* 수정란은 각각 $62.1 \pm 2.8\%$, $74.2 \pm 2.6\%$, $85.2 \pm 2.4\%$ 였다. 각 부화장치에서의 평균 부화율은 각각 $60.5 \pm 2.4\%$, $74.4 \pm 3.4\%$, $87.3 \pm 1.6\%$ 로 회전수류형이 다른 두 부화장치보다 높은 부화율을 나타냈다.

3-2. 회전수류형 부화장치의 부화판 개수에 따른 부화율

부화판 숫자에 따른 부화율은 Table. 8에서 보는 바와 같다. 부화판 2개의 경우, $87.3 \pm 2.0\%$, 3개의 경우, $81.8 \pm 0.8\%$, 그리고 5개의 경우, $82.0 \pm 2.5\%$ 로 2개의 경우가 비교적 높았다.

4. 고찰

본 연구에서 에어레이션형은 저비용으로 간단하게 설치할 수 있었지만, 4 어

Table 6. Clownfishes groups used for the hatching rate analysis according to the hatching plate number in the rotating type of hatching system

Group	Species
2P-I	<i>P. biaculeatus</i> -L, <i>A. melanopus</i> -R
2P-II	<i>A. melanopus</i> -L/R
2P-III	<i>A. melanopus</i> -L/R
3P-I	<i>P. biaculeatus</i> -M, <i>A. melanopus</i> -L/R
3P-II	<i>A. melanopus</i> -M, <i>A. ocellaris</i> -L/R
3P-III	<i>A. melanopus</i> -M, <i>A. ocellaris</i> -L/R
5P-I	<i>A. melanopus</i> -1, <i>A. ocellaris</i> -2, <i>P. biaculeatus</i> -3, 4, 5
5P-II	<i>A. melanopus</i> -1, <i>A. polymnus</i> -2, <i>P. biaculeatus</i> -3, 4, 5
5P-III	<i>A. melanopus</i> -1, 2, <i>P. biaculeatus</i> -3, 4, 5

P: hatching plate; L (left), M (middle) and R (right) mean the arrangement of the plate; In 5P, the number of scientific name is a arrangement sequence to fix in the PVC pipe.

Table 7. Mean hatching rates of clownfishes eggs incubated in 3-types of hatching system

Hatching system (type)	Aeration (%)	Spray (%)	Rotating (%)
<i>A. melanopus</i>	56.9±2.5 ^a	72.4±4.5 ^b	88.1±1.5 ^c
<i>A. ocellaris</i>	61.5±5.1 ^a	71.8±1.5 ^b	87.2±2.7 ^c
<i>A. polymnus</i>	61.4±4.8 ^a	79.2±3.3 ^b	88.9±1.2 ^c
<i>P. biaculeatus</i>	62.1±2.8 ^a	74.2±2.6 ^b	85.2±2.4 ^c
Total average	60.5±2.4	74.4±3.4	87.3±1.6

Values are mean±S.E. (n=20). Different letters indicate significant difference (P<0.05).

Table 8. Mean hatching rates of clownfishes reared under rotating type of hatching system with different numbers of hatching plate

Group	2P			3P			5P		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Hatching rate (%)	83.9	87.0	90.9	82.9	80.2	82.3	85.5	77.1	83.4
Total average	87.3±2.0			81.8±0.8			82.0±2.5		

Number: the number of hatching plate; P: hatching plate; Roman number: group number.

종의 평균 부화율은 60.5%로서 다른 두 방식에 비해 현저히 낮았다. 이것은 에어스톤에서 발생하는 공기방울이 연속적으로 수정란과 부딪히면서 발생 중인 자어에게 스트레스를 유발시켜 부화율이 낮았던 것으로 보인다. 공기방울의 크기도 영향을 미칠 수 있다. 미세한 공기방울은 수정란의 표면을 마치 침으로 찌르는 것 같은 스트레스를 줄 수 있고, 공기방울이 너무 크면 갓 부화한 자어에게 스트레스를 줄 수 있으므로, 직경 1~4 mm의 공기방울이 적당할 것으로 보인다(Juhl, 1992; Hoff, 1996). 그러나 수류를 이용한 다른 두 방법은 공기방울을 이용한 방법보다 효율적인 것으로 사료된다. 스프레이형은 높이 차이에서 발생하는 수류에 의해 수정란이 흔들리는 방식이지만, 에어레이션형처럼 연속적으로 수정란에 수류를 보내줌으로써 발생 중인 자어의 스트레스를 유발시켰을 것으로 사료된다. 회전수류형의 시간조건은 20초 주기로 5초간로 수정란에 수류가 지나가도록 설정하였다. 비교적 부화율이 높았던 회전수류형 부화장치에서 부화판은 2개를 설치했을 경우, 87.3%로 높았다. 부화판이 2개인 경우에는 부화판을 수류가 정면으로 받도록 했으며, 5개의 경우, 부화판을 옆으로 배치했다는 점이 다르다. 그러나 정면으로 수류가 지나가더라도 수정란은 수류가 지나가는 힘에 의해 한쪽 방향으로 쓰러지기 때문에 부화판의 배치는 부화에 결정적인 영향은 아닐 것으로 보인다. 오히려 부화판 간격이 좁거나 출수구와의 거리가 가까우면 수류의 양 끝에 배치되는 수정란은 수류의 영향을 받기 힘들 것으로 생각된다. 부화판 5개의 경우, 부화율이 82.0%였다. 부화판을 증가시키더라도 실제 부화자어수로 보면, 한 공간에서 더 많은 부화자어를 생산할 수 있을 것이다. 그러므로 부화판의 개수, 배치, 수류의 세기와 같은 추가 실험이 필요하다.

인공 부화장치 연구는 단지 부화에만 적용되는 것만 아니라 수컷의 알 관리를 완전 대체해야한다. 본 연구 외에 다른 일부 어미에서 알 관리기간 동안

수정란이 제거하기도 했다. 일반적으로 발생중인 수정란의 탈락은 소량으로 발생하지만, 종종 어미의 스트레스나 이로 인한 습관화에 의해 수정란이 제거되는 경우 종종 발생한다(노 등, 2009). 본 연구에서 회전 수류형 시스템이 부화시 알 관리 행동을 대신할 수 있을 것으로 판단되며, 장기간 알 관리를 위해 수질, 외부 기생 생물로 부터의 차단 및 수류제어와 같은 폭 넓은 연구가 진행되어 할 것이다.



V. 자치어 변태에 미치는 먹이종류와 갑상선호르몬(T_3)의 영향

1. 서 설

일반적으로 동물의 체색은 외피에 존재하는 색소세포에 의해 결정된다. 포유류의 경우, 오직 한 종류의 색소세포 즉, melanocyte(흑색, 갈색, 적색 또는 황색)만을 가지고 있는 반면에 어류는 melanophores(황색), xanthophores(황색), erythrophores(적색), iridophores(무지갯빛), leucophores(흰색), cyanophores(청색)와 같은 6종류의 색소세포를 가진다고 알려져 있다(Fujii, 2000; Kelsh, 2004). 어류의 체색변화는 장기간 지속되는 형태학적 체색변화와 외부자극(주변색, 조도, 사회적 변화 등)에 따른 일시적인 반응으로서 체색변화의 두 가지로 구분된다(Nery & Castrucci, 1997). 어류의 색소세포는 발생초기에 신경관(neural tube)을 따라 발달되는 neural crest cell이 분화되어 최종 위치로 이동을 하게 된다(Rawls et al., 2001). 색소세포가 자기의 위치로 이동하더라도 각각의 체색을 발현시키기 위해서는 색소원이 필요하다. Carotenoids계의 astaxanthin은 어류의 체색을 붉게 하는 대표적인 색소원으로 알려져 있는데, 더군다나, 어중에 따라서는 생체내 astaxanthin 합성 메카니즘을 가지고 있지 않아 외부로부터의 공급이 필요하다(Tanaka et al., 1976).

전 세계 어류의 양식에 있어서 초기 자어의 먹이로 rotifer (*Brachionus plicatilis*, *B. rotundifornis*)와 *Artemia* nauplii가 많이 이용되는데, 이는 고밀도 대량생산이 가능하기 때문이다. 그러나 영양학적 측면에서 자어성장에 필요한 불포화 지방산 등이 부족하기 때문에 먹이생물로는 최적의 성장향상을 기대하기 어렵다(Kahan 1980; Olivotto et al., 2003; Faulk and Holt, 2005). 최근 rotifer와 *Artemia* sp.를 대체할 먹이생물로 요각류의 이용이 제안되고 있다. 요각류는

단백질, 고도 불포화 지방산 등을 함유하고 있어서 자치어의 성장에 중요한 먹이생물로 알려져 있다(Evjemo et al. 2003; McKinnon et al., 2003). 특히, *Tigriopus japonicus*는 저서성 harpacticoid로서 대량배양이 용이하여 어류의 먹이생물로 널리 이용되고 있다. 또한, *T. japonicus*가 astaxanthin을 함유하므로 붉은 계통의 어종인 *A. melanopus* 자치어를 대상으로 요각류의 astaxanthin에 의한 체색 향상을 기대할 수 있을 것으로 예상되지만, 요각류가 어류의 체색에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이전 연구에 의하면 *A. melanopus*는 체색변화에 의한 변태를 하는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 어류의 변태에 직접 관여하는 것으로 알려진 갑상선호르몬은 고등동물에 있어서 발달, 기초 대사, 항상성 유지 등 다양한 생리학적 기능을 하며, 하등동물인 양서류의 경우, 변태 촉진 호르몬으로 잘 알려져 있다(Yamano, 2005). 어류에 대한 갑상선호르몬의 영향에 대한 연구 중 중요한 사실은 높은 농도의 갑상선호르몬이 알에 존재하여 자어-치어-성어로의 발달에 직접 관여한다는 점이다. 그리고 summer flounder *Paralichthys dentatus*의 변태, 연어류의 은화(smoltification)에 대한 연구가 이와 관련이 있다(Schreiber and Specker, 1999; Yamano, 2005; Björnsson et al, 2011). 그러므로 갑상선호르몬은 *A. melanopus* 자어의 변태에 관여함으로써 체색변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 예측된다.

본 연구에서는 *A. melanopus* 자어의 변태 과정동안에서, *T. japonicus*와 외인성 갑상선호르몬이 각각 체색 발달과 성장에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험어

본 실험에서 사용된 자치어는 제주도 한국해수관상어센터에서 부화·성장한 것이었다. 먹이생물과 갑상선호르몬에 따른 변태실험에는 각각 부화 후 10일째 자어(8.2 ± 0.6 mm)와 7일째 자어(7.3 ± 0.3 mm)가 사용되었다.

2-2. 먹이종류별 자치어 성장

실험구는 영양강화 *Artemia* sp.구(EA), *T. japonicus*구(TJ) 그리고 영양강화 *Artemia* sp.와 *T. japonicus*를 1:1로 혼합 투여한 구(AT)로 나누었고, 그룹별로 자어 10마리를 10 L 플라스틱 원형 수조에서 7일간 사육하였다. *Artemia*는 DHA Selco(INVE, Belgium)를 제조사의 사용법에 따라 영양강화하였다. 각 실험구에 공급한 먹이량은 4~5 개체/mL였으며, 2시간 간격으로 먹이를 확인하여 부족한 만큼 보충해 주었다. 수온, 염분 및 광주기는 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 32 psu, 13L:11D였다. 10일째 자어의 크기는 자어 20마리를 무작위로 선택해서 평균값으로 정하였고, 실험 종료 후, 버니어 캘리퍼스를 이용하여 개체별 전장크기를 측정하였다. 모든 실험은 2 반복 실시하였다.

2-3. 갑상선호르몬 처리에 따른 자치어성장

부화 후 7일째 자어 10마리를 4개의 실험구(0, 2, 4, 6 ppm)로 나누어 10 L 플라스틱 원형수조에서 10일간 사육하였고, 2 반복으로 실시하였다. 갑상선호르몬(3,5,3'-triiodo-L-thyronine salt, Sigma, USA)을 수산화칼륨(KOH)에 녹인 후, 여기에 실험어를 농도별로 1시간씩 침지하였다. 수온, 염분 및 광주기는 각각 $26.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 32 psu, 13L:11D로 유지하였고, 먹이로서 EA와 TJ는 1:1로 혼합해서 공급하였다.

2-4. 체색비교

체색변화를 조사를 위해서 직접 제작한 아크릴 케이스($10 \times 1.5 \times 10$ cm)에 치어를 넣은 다음, 디지털 카메라(D300, Nikon)로 촬영하였다. 카메라 조건은 초점거리 55 mm, 노출시간 1/200 sec, 조리개 f/8.0, 그리고 노출모드는 spot와

일정한 광량을 위해 플래쉬(SB-800, Nikon, Japan)를 이용하여 TTL(Through The Lens)모드로 촬영하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이, 어체부위(1: 입 주변, 2: 첫 번째 흰 줄무늬, 3: 몸 중간, 4: 등지느러미, 5: 꼬리지느러미)를 선정하였고, 사진편집 프로그램(photoshop CS5, Adobe)을 이용하여 CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Black)를 측정하였다.

2-5. 통계분석

실험결과의 자료값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 로 나타내었다. SPSS(ver. 17)를 이용하여 자료값의 정규성 및 등분산성 가정을 만족하는 지를 조사하였다. 두 조건을 만족하는 경우, 모수적인 방법인 one way-ANOVA를 실시하였으며, Tukey's multiple range test로 95% 신뢰수준에서 유의차 유무를 검정하였다($P < 0.05$). 두 조건을 만족하지 않을 경우, 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하였고, Tukey test using ranks로 유의성을 검정하였다.

3. 결 과

3-1. 먹이종류별 자치어 성장 및 체색발달

먹이생물에 따른 성장은 Fig. 10에서 보는 바와 같이, AT구가 11.3 ± 0.7 mm로 성장이 가장 빨랐으나, 10.9 ± 0.8 mm인 TJ구와는 유의한 차이가 없었다. 대조구인 EA구는 10.2 ± 0.8 mm로 성장이 가장 느렸다. 체색발달의 경우, Fig. 11에서 보는 바와 같이 TJ구에서 입 주변, 등지느러미, 배지느러미, 뒷지느러미, 꼬리지느러미는 뚜렷한 주황색을 나타내었을 뿐 만 아니라, 머리와 가슴의 흰 줄무늬도 선명하였다. AT구의 경우, 입 주변, 등지느러미, 배지느러미가 옅은 주황색이었고, 머리와 가슴의 흰 줄무늬는 다소 불투명하였다. 반면에, EA구의 각 지느러미는 완전히 투명했으며, 머리와 가슴의 흰 줄무늬는 AT구와 유사하였다.



Fig. 9. Positions selected for color comparison. 1: Around a mouth, 2: First white strip, 3: Middle of the body, 4: Dorsal fin, 5. Caudal fin.

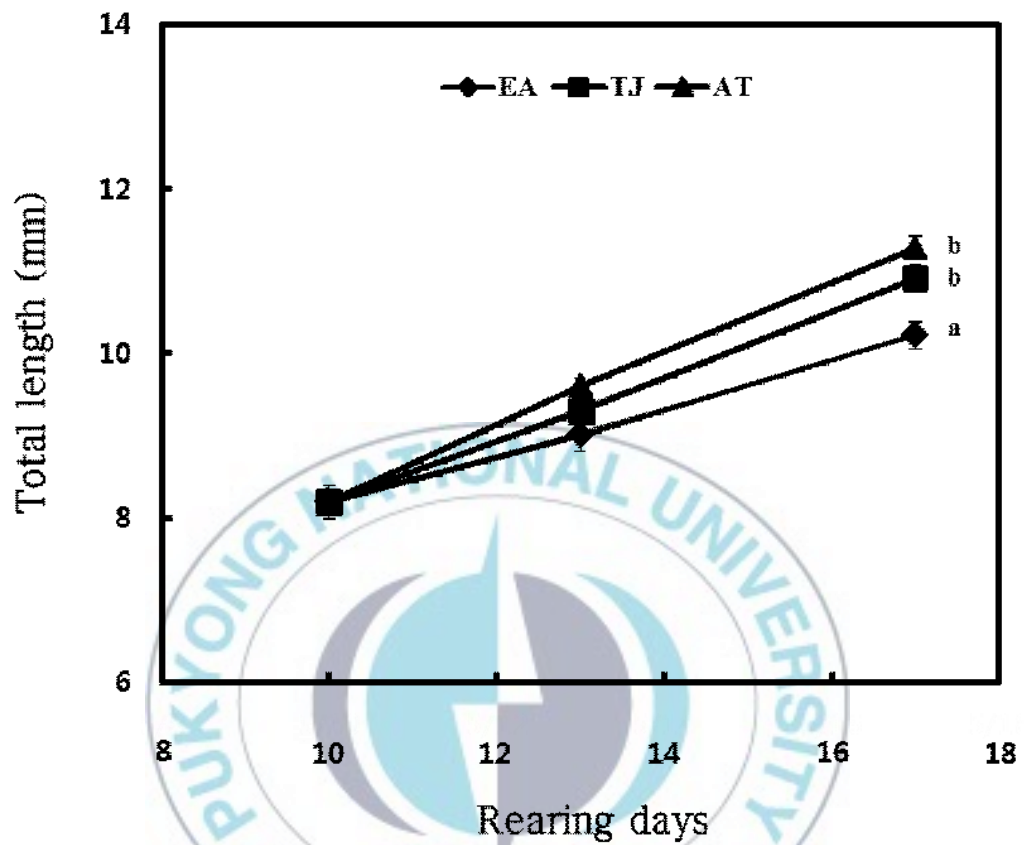


Fig. 10. Total length of the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) fed with different combination of live foods. Values are mean $\pm$ S.E. (n=20). Different letters indicate significant difference (P<0.05). EA: only enriched *Artemia*; AT: enriched *Artemia* + *Tigriopus japonicus*; TJ: only *T. japonicus*. DAH: days after hatching.

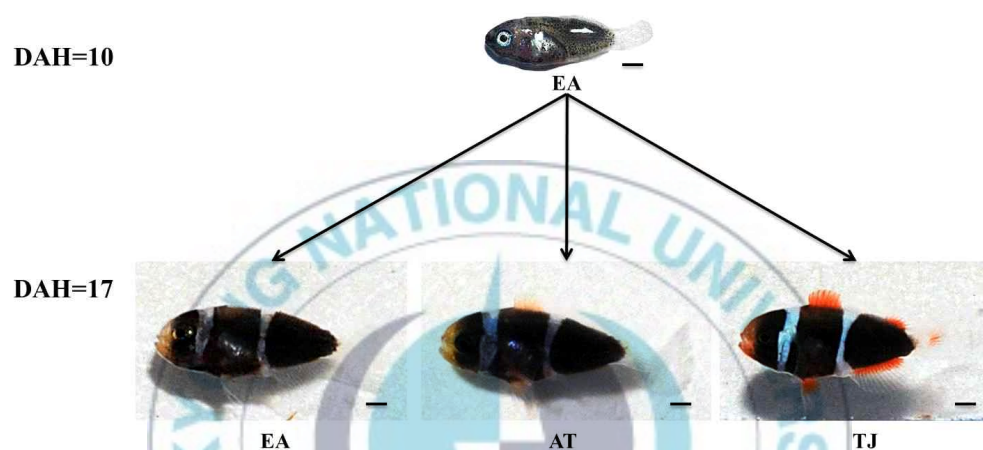


Fig. 11. Comparison of body coloration in the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) fed with different live foods. EA: only enriched *Artemia*; AT: enriched *Artemia*+*Tigriopus japonicus*; TJ: only *T. japonicus*. DAH: days after hatching. Bar=1 mm.

CMYK 분석 결과는 Table 9에서 보는 바와 같다. 입 주변의 magenta 수치는 TJ구가 $81.8 \pm 3.5\%$ 로 각각 $57.6 \pm 4.2\%$, $62.0 \pm 2.3\%$ 인 EA구와 AT구보다 유의하게 높았다. 흰 줄무늬의 black 수치는 TJ구가 $0.6 \pm 0.6\%$ 로 각각 $44.6 \pm 13.4\%$, $36.4 \pm 11.7\%$ 였던 EA구와 AT구에 비해 월등히 낮았다. 몸中间的 black 수치에서만 실험구사이에 유의한 차이가 있었다. TJ구는 $87.6 \pm 0.7\%$ 로 각각 $86.8 \pm 0.4\%$, $85.0 \pm 0.6\%$ 인 EA구와 AT구보다 높았다. 등지느러미의 경우, TJ구의 magenta와 yellow수치가 각각 $75.8 \pm 6.7\%$, $94.8 \pm 4.3\%$ 로 EA구와 AT구보다 유의하게 높았다. 꼬리지느러미의 경우에는 차이가 없었다.

3-2. 갑상선호르몬 처리에 따른 성장 및 체색발달

갑상선호르몬 처리에 따른 자치어의 성장은 Fig. 12에서 보는 바와 같이, 4 ppm구가 11.4 ± 0.4 mm로 가장 빠른 성장을 보였다. 0 ppm구와 2 ppm구는 각각 10.7 ± 0.4 mm, 10.8 ± 0.4 mm였으나, 두 실험구 사이에 유의차는 없었다. 반면, 6 ppm구에서는 10.2 ± 0.5 mm로 성장이 가장 느렸다. 부화 후 9일째, 모든 갑상선호르몬 처리구는 입 주변과 흰 줄무늬의 체색발달이 0 ppm구보다 빨랐다. 특히, 부화 후 10일째의 6 ppm구에서는 입 주변과 첫 번째 줄무늬가 선명한 반면, 0 ppm구에서는 희미했다. 17일째에 모든 갑상선호르몬 처리구는 0 ppm구에 비해 체색이 월등하게 선명했다. 특히, 갑상선호르몬 처리구를 포함한 각 지느러미는 진한 주황색을 나타낸 반면, 대조구는 옅은 주황색이었다 (Fig. 13).

CMYK 분석 결과는 Table 10에서 보는 바와 같다. 입주변의 경우, magenta에서만 실험구 사이에서 유의한 차이를 보였다. 6 ppm구는 $53.0 \pm 3.8\%$ 로 각각 $60.6 \pm 5.9\%$, $68.0 \pm 4.7\%$, $73.0 \pm 1.7\%$ 를 나타낸 2, 4, 6 ppm구에 비해 가장 낮았다. 흰 줄무늬와 몸 중간 부위의 CMYK 수치는 실험구 사이에서 차이가 없었던 반면, 등지느러미와 꼬리지느러미는 magenta와 yellow에 있어서 실험구 사이

Table 9. Comparison of coloration in juvenile *Amphiprion melanopus* fed with three types of live food

Group	Around mouth			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	45.0±4.7	57.6±4.2 ^a	84.0±5.5	36.6±11.4
AT	50.0±9.8	62.0±2.3 ^a	83.4±8.4	34.4±4.9
TJ	33.6±3.1	81.8±3.5 ^b	95.4±3.6	40.8±7.3
P	0.113	0.009	0.182	0.833
Group	First white strip			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	81.6±2.7	73.2±4.7	40.2±10.5 ^{ab}	44.6±13.4 ^b
AT	82.6±5.2	76.0±4.5	41.8±7.2 ^b	36.4±11.7 ^b
TJ	60.6±8.3	27.4±14.8	5.4±3.1 ^a	0.6±0.6 ^a
P	0.129	0.105	0.033	0.020
Group	Middle body			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	75.0±0.3	67.8±0.4	65.8±0.5	86.8±0.4 ^{ab}
AT	73.6±0.9	67.8±0.5	66.0±0.8	85.0±0.6 ^a
TJ	74.6±0.4	68.2±0.5	66.2±0.6	87.6±0.7 ^b
P	0.453	0.864	0.667	0.041

continued

Group	Dorsal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	7.2±4.5 ^{ab}	14.4±6.2 ^a	26.2±13.3 ^a	0.0±0.0
AT	5.4±2.4 ^a	6.4±2.7 ^a	14.4±6.4 ^a	0.0±0.0
TJ	19.2±4.3 ^b	75.8±6.7 ^b	94.8±4.3 ^b	0.0±0.0
P	0.040	0.008	0.009	1.000

Group	Caudal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	5.2±2.8	4.6±2.0	1.2±1.0	0.0±0.0
AT	6.8±1.9	6.8±2.4	8.2±4.1	0.0±0.0
TJ	14.6±7.2	37.4±15.2	44.2±20.0	0.0±0.0
P	0.410	0.348	0.291	1.000

AT: enriched *Artemia* + *Tigriopus japonicus*, EA: only enriched *Artemia*, TJ: only *T. japonicus*, Values are mean±S.E. (n=5). Different letters indicate significant difference (P<0.05).

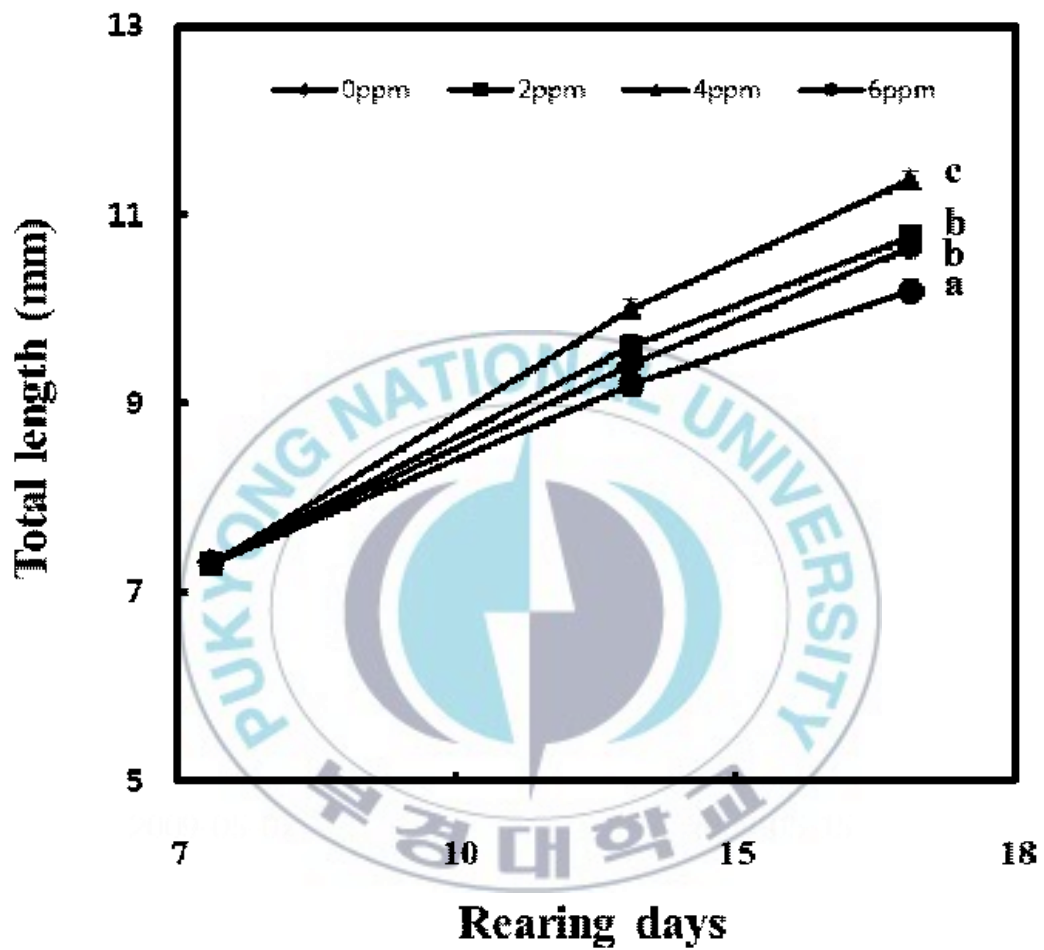


Fig. 12. Total length of the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) treated with different concentration of T_3 (0, 2, 4 and 6 ppm). Values are mean $\pm$ S.E. (n=20). Different letters indicate significant difference ($P<0.05$). DAH: days after hatching.

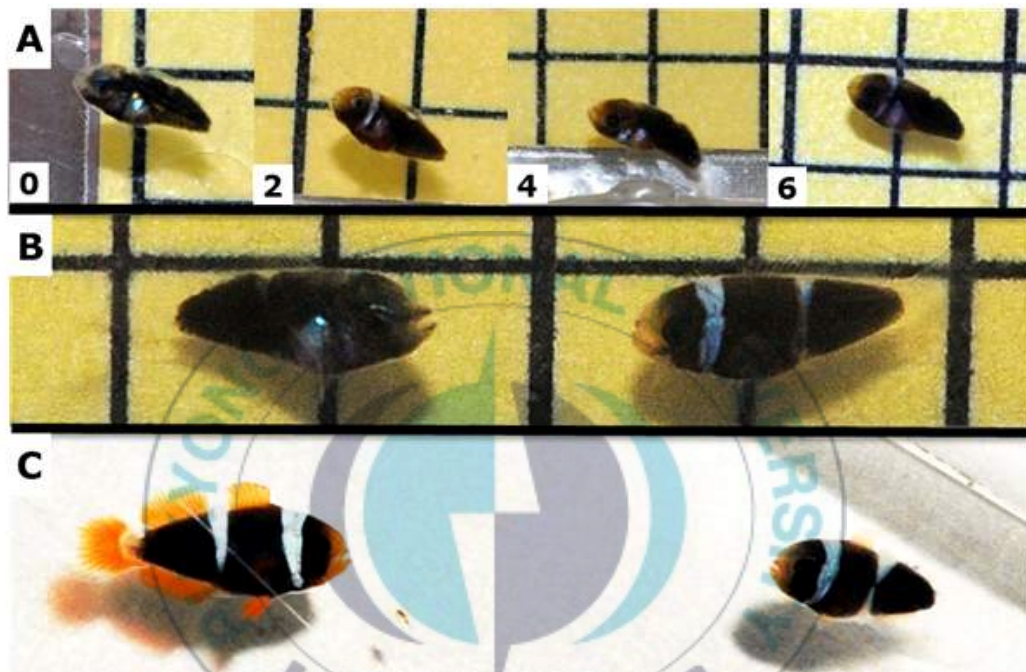


Fig. 13. Comparison of body coloration in the juvenile *Amphiprion melanopus* treated with several T_3 concentrations. A: DAH 9 (0: 0 ppm, 2: 2 ppm, 4: 4 ppm, 6: 6 ppm), B: DAH 10 (left: 0 ppm, right: 6 ppm), C: DAH 17 (left: 4 ppm, right: 0 ppm), DAH: days after hatching.

Table 10. Comparison of coloration in juvenile *Amphiprion melanopus* treated with T₃

Group (ppm)	Around mouth			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	32.8±2.8	60.6±5.9 ^{ac}	82.4±8.1	19.0±6.2
2	31.4±3.6	68.0±4.7 ^{ac}	91.2±4.6	27.8±9.6
4	24.8±3.1	73.0±1.7 ^c	99.4±0.4	17.4±5.7
6	27.8±2.7	53.0±3.8 ^a	86.8±7.4	9.4±4.1
P	0.304	0.034	0.210	0.414

Group (ppm)	First white strip			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	50.4±6.5	23.6±11.5	28.4±10.1	12.6±12.1
2	49.6±4.4	17.2±7.1	16.0±4.9	0.6±0.6
4	40.8±5.2	17.6±5.4	18.6±4.7	0.4±0.4
6	40.0±4.1	14.0±4.4	18.6±3.3	0.2±0.2
P	0.358	0.983	0.787	0.774

Group (ppm)	Middle body			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	73.6±0.6	67.6±0.4	66.2±1.6	81.0±4.0
2	69.8±2.3	67.2±0.4	68.6±1.4	83.8±1.3
4	73.0±1.3	67.6±0.4	66.6±0.5	85.6±1.5
6	72.4±0.7	67.2±0.4	67.2±0.5	84.0±1.0
P	0.204	0.879	0.614	0.446

continued

Group (ppm)	Dorsal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	1.6±0.7 ^a	28.8±9.6 ^{ab}	51.4±15.8 ^a	0.0±0.0
2	8.4±3.9 ^b	67.4±5.3 ^c	92.8±3.5 ^b	0.0±0.0
4	4.6±1.3 ^{ab}	56.0±8.4 ^{bc}	93.8±4.0 ^b	0.0±0.0
6	8.0±1.3 ^b	24.8±3.1 ^a	62.0±7.3 ^a	0.0±0.0
P	0.010	0.007	0.010	1.000

Group (ppm)	Caudal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	3.8±1.7	20.4±13.3 ^a	33.2±18.1 ^a	0.0±0.0
2	12.4±3.5	49.6±7.3 ^{ab}	72.8±10.8 ^a	0.0±0.0
4	3.6±1.0	73.6±3.6 ^b	99.8±0.2 ^b	0.0±0.0
6	9.2±3.3	25.8±8.3 ^a	51.8±15.1 ^a	0.0±0.0
P	0.077	0.007	0.006	1.000

Values are mean±S.E.M (n=5). Different letters indicate significant difference (P<0.05).

서 유의한 차이를 보였다. 등지느러미의 magenta 수치는 2 ppm구에서 $67.4 \pm 5.3\%$ 로 가장 높았으나, $56.0 \pm 8.4\%$ 인 4 ppm구와 유의차는 없었다. 6 ppm구는 $24.8 \pm 3.1\%$ 로 가장 낮았으나 $28.8 \pm 9.6\%$ 인 대조구인 0 ppm구와 유의차가 없었다. 등지느러미의 yellow 수치는 4 ppm구가 $93.8 \pm 4.0\%$ 로 가장 높은 수치를 보였으며, 2 ppm구도 $92.8 \pm 3.5\%$ 로 4 ppm구와 차이를 보이지 않았다. 반면에 0 ppm구는 51.4 ± 15.8 로 가장 낮은 수치를 보였으나, $62.0 \pm 7.3\%$ 인 6 ppm구와 유의한 차이를 보이지 않았다. 꼬리지느러미의 magenta 수치는 4 ppm구가 $73.6 \pm 3.6\%$ 로 가장 높은 수치를 보였지만 $49.6 \pm 7.3\%$ 인 2 ppm구와 유의차는 없었다. Yellow 수치의 경우, 4 ppm구가 $99.8 \pm 0.2\%$ 로 가장 높았으나 $72.8 \pm 10.8\%$ 인 2 ppm구와 유의차가 없었다. 0 ppm구는 $33.2 \pm 15.1\%$ 로 가장 낮은 수치를 보였다.

4. 고 찰

먹이생물에 따른 성장실험에서 TJ구와 AT구는 EA구보다 성장이 빨랐다. *A. clarkii*의 경우, rotifer나 *Artemia*를 단독적으로 공급하는 것 보다 harpacticoid copepods를 혼합 공급할 때 빨리 성장했다. 이와 같은 경향은 turbot 자어에서도 보고되었다(Stottrup & Norsker, 1997). *A. ocellaris*에 HUFA로 영양강화를 시킨 먹이생물을 공급하면, IGF (insulin-like growth factor) 유전자 발현은 증가하는 반면, myostatin 유전자 발현은 감소했다고 알려져 있으며(Olivotto et al., 2008), 이것은 copepod가 자어에게 필요한 불포화 지방산의 공급원으로서 이용될 수 있음을 의미한다.

육안관찰 결과에서는 *T. japonicus*를 공급한 실험어의 체색이 가장 선명한 것을 확인할 수 있었으며, CMYK 분석에서도 입 주변과 등지느러미의 magenta 및 yellow 수치가 EA구와 AT구에 비해 월등히 높았다. 이 결과에 의하면, *T.*

*japonicus*가 *A. melanopus*의 적색계통 체색발현을 향상시키는 것으로 보인다. 흰 줄무늬의 경우, TJ구에서 black 수치를 포함한 cyan, magenta, yellow 수치가 낮았다.

CMYK 분석은 white에 대한 정보를 확인할 수 없으나, 대신 그 대비색인 black 수치를 통해 white에 대한 정보를 유추할 수 있다. 그러므로 TG구의 black 수치가 낮게 나온 것을 통해서 white 수치가 높게 나온 것을 예측할 수 있다. 이와 함께 EA구와 AT구의 흰 색 줄무늬 CMY 수치가 비교적 높게 나온 것은 몸 중간의 CMYK가 전체적으로 높게 나온 것으로 유추해 볼 수 있을 것이다. 다시 말하면, 두 실험구의 흰색 줄무늬가 제대로 발달하지 않았기 때문에 수치가 비교적 높게 나온 몸 중간의 수치가 그대로 반영된 것이라고 볼 수 있다. 육안으로는 어두운 적갈색(고동색)이지만 CMYK 수치는 60% 이상이였다. 즉, 어두운 적갈색이 CMY 수치가 혼합되어 나온 것이라면, 흰 줄무늬에서 CMY 수치가 높게 나왔다는 것은 흰색 줄무늬가 미발달 상태라고 볼 수 있기 때문이다. 결과적으로 *Tigriopus* sp. 은 *A. melanopus* 치어의 체색을 더욱 붉고 선명하게 발현 시킬 수 있는 색소원으로서의 먹이생물로 이용 가치가 있고 성장 향상 또한 기대할 수 있을 것이다.

갑상선호르몬을 처리한 실험에서 0 ppm구의 각 지느러미 색깔은 모두 투명한 반면, 4 ppm구는 진한 적색이였다. 이러한 특징은 20일 이후의 체색발달과 동일한 것으로써 갑상선호르몬이 변태 및 체색발달을 촉진시켰을 것으로 사료된다. 그러나 6 ppm구는 가장 성장속도가 가장 늦었다. 갑성돔 치어에게 고농도의 T_3 처리는 성장을 억제시켰고, 전장과 체중의 성장을 위한 최적 농도는 10 ppm이였다(Kang & Chang, 1996). 갑상선호르몬은 척추동물의 정상적인 발달과 성장에 중요하지만(Leatherland, 1987), 어종, 연령, 크기 및 어체 상태에 따라 최적의 농도가 다를 수가 있다. 체색에 있어서도 6 ppm구는 다른 실험구에 비해 입 주

변의 magenta 수치가 가장 낮았다. 등지느러미와 꼬리지느러미의 경우, 2 ppm구와 4 ppm구의 magenta와 yellow 수치가 0 ppm구와 6 ppm구보다 월등히 높은 수치를 나타내었다. *A. ocellaris*의 경우, 2 ppm의 갑상선호르몬을 처리한 결과 흰 줄무늬가 없거나 기형적인 형태로 발달하였다(Clement et al., 2001). 이런 결과로 볼 때, 갑상선호르몬은 성장향상을 도모하며 체색 발현에 관여할 뿐 만 아니라, 변태촉진에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 결과는 성장보다는 체색에 중심을 두고 있는 관상어산업에서 다양한 어종의 체색향상 기술 개발에 응용할 수 있을 것으로 보이므로 갑상선호르몬에 의한 어종별 체색 변화에 더 많은 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 체색분석을 위해 사진편집 프로그램으로 알려진 photoshop의 CMYK분석을 처음으로 시도해 보았다. 일반적으로 어류의 체색(색도) 조사는 색차계를 이용하여 백색도(lightness), 적색도(redness) 및 황색도(yellow)를 측정하였다(Kim et al., 2008). 그러나 색차계는 그 부피가 커서 자치어와 같은 작은 어류의 특정 부위를 측정하기는 어려우며, 또한, 측정을 위해서는 센서를 몸체에 밀착시켜야 하기 때문에 측정과정에서 스트레스를 유발시킬 수 있다. 따라서 CMYK 분석은 동일한 조건(노출, 촬영거리 등)에서 촬영을 한다면, 작은 어종의 체색에 대한 상대비교를 수치분석이 가능하기 때문에 색차계를 이용한 방법보다 용이하게 응용될 것으로 생각된다.

VI. Prolactin, arginine vasotocin 및 isotocin 유전자 클로닝 및 저염분 환경에 의한 유 전자 발현 변화

1. 서 설

어류에 있어 염분은 대사활동, 삼투압조절 및 생체리듬 등에 영향을 주기 때문에 연어과 같은 회유성 어류 및 기수지역에 서식하는 광염성 어류의 생활사에 있어서 매우 중요한 요인으로 작용한다. Killifish의 뇌하수체를 제거하면 담수 중에서 생존하지 못하지만, 양의 PRL을 투여하면 생존 가능한 것으로 보고하고 있다(Pickford and Phillips, 1959). 뱀장어 등과 같이 prolactin 없이도 담수에 적응할 수 있는 종도 있지만, 지금까지 연구된 모든 광염성 어류를 높은 삼투압 환경에서 낮은 삼투압 환경으로 옮기면 혈액 중의 prolactin 농도가 상승하고, 역방향으로 옮기면 저하한다.

Prolactin(PRL)은 growth hormone/placental lactogen(helix bundle protein hormone의 그룹 I)과에 속한다. 포유류의 PRL은 약 28개 아미노산으로 이루어진 신호 펩타이드(signal peptide)가 결합된 전구호르몬(prohormone)으로서 합성되며, 3개의 이황화 결합(disulfide bridge)이 N-terminal과 중간 부분, 그리고 C-terminal에 위치한다. 어류의 경우, 신호 펩타이드는 23~24개의 아미노산으로 되어 있으나, 이황화 결합에 있어서 어종에 따라 차이가 있다. 철갑상어 *Acipenser transmontanus*나 폐어 *Protopterus annectens*의 PRL은 3개의 이황화 결합이 있지만, 대부분 경골어류의 경우, PRL의 N-terminal에는 이러한 결합이 존재하지 않는다. 양의 PRL에서 N-terminal의 이황화 결합을 제거한 후 어류를 대상으로 생물검정을 실시한 결과 삼투압조절과 밀접한 관련

이 있다는 보고가 있다(Doneen et al., 1979; Freeman et al., 2000; Manzon, 2001). PRL의 분비는 뇌하수체 전엽(anterior pituitary)의 lactotroph이라는 세포에서 일어나지만, mammosomotrophs (MS)라고 알려진 중개 세포집단이 PRL과 GH를 구분하여 분비시킨다고 알려져 있다. 최근에 gilthead sea bream *Sparus aurata*의 갯 부화한 자어에서 MS cell이 발견되었으며 (Villaplana et al., 2000), 일부 어종에서 뇌하수체 이외의 기관에서 PRL의 존재가 증명되었다. *S. aurata*의 경우, 뇌하수체, 간, 창자 및 생식소, 금붕어 *Carassius auratus*의 경우, 뇌하수체, 뇌, 간, 신장, 비장, 아가미, 근육 및 생식소에서 PRL 유전자 발현이 확인되었다(Hansen and Hansen, 1982; Wright, 1986; Santos et al., 1999; Imaoka et al., 2000).

뇌하수체 신경엽호르몬은 9개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬으로 이 1번과 6번째에 Cys를 가지고, S-S결합(disulfidebond)에 의한 원형구조를 취하며, 7~9번째의 아미노산이 측사슬을 형성한다. 측사슬 부분에 포함된 8번째 아미노산이 염기성이면 vasopressin(VP)족, 중성아미노산이면 oxytocin (OT) 족으로 구분한다. 본 실험의 AVT와 IT는 각각 vasopressin족, oxytocin 족에 포함된다. 일반적으로 척추동물은 VP족과 OT족의 두 가지 신경엽호르몬을 가지고 있다. 어류의 경우, 폐어류를 제외한 경골어류는 arginine vasotocin(AVT)과 isotocin(IT)을 가지고 있는 데, 이 호르몬들은 어류의 담수 적응에도 관여하는 것으로 추정되고 있다. AVT와 IT은 뇌하수체 신경엽에서 발현되는 신경엽호르몬이지만, 삼투압조절에 있어서 개별적 또는 상호적으로 작용하는지에 대해서는 아직도 불분명하다. AVT에 관한 초기 연구에서는 주로 이뇨작용에 연관되는 것으로 알려져 있었다(Maetz et al., 1964; Jones et al., 1969; Henderson and Wales, 1974). 그러나 이후 연구에서는 고농도의 AVT가 이뇨작용을 일으키지만, 저농도의 AVT는 사구체 여과율의 감소에 따

른 향이노 작용을 일으키는 것으로 보고되었다(Pang, 1983; Amer and Brown, 1995).

*A. melanopus*는 동남아시아와 같은 열대지역의 산호초 지역에서 서식한다. 열대지역의 기후적 특징은 건기와 우기를 들 수 있는 데, 특히, 우기 동안에 내리는 비는 육지와 가깝고 수심이 낮은 산호지역의 염분을 저하시킬 것이다. 그러므로 이런 환경에서 오랫동안 서식해 온 *A. melanopus*는 비교적 저염분 환경에서도 생존할 수 능력을 가졌을 것으로 예상된다. 그러므로 본 연구에서는 *A. melanopus*의 PRL, AVT, IT에 대한 유전정보 및 염분변화에 따른 각 유전자의 발현을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 유전자 클로닝

2-1-1. genomic DNA 분리와 염기서열

*A. melanopus*의 혈액으로부터 genomic DNA kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 다른 어종의 PRL, AVT 및 IT 보존영역으로부터 디자인 한 degenerate primer(Table 11)로 HiQ-PCRMix(GenoTech, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 1.5% agarose gel로 전기영동 후, gel extraction kit(NucleoGen, Korea)를 이용해 정제하였다. 정제된 DNA는 pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)에 ligation을 하고, *E. coli* DH5a에 transformation하였다. Plasmid purification kit(NucleoGen, Korea)로 plasmid DNA를 확보하고, EcoR I 제한효소로 digestion 하여 insert의 유무를 확인하였다. Sequencing은 GenoTech(Daejoen, Korea)에서 M13F과 M13R primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

2-1-2. 5'-말단과 3'-말단 확보를 위한 DNA walking

DNA Walking은 DNA Speed up™ Premix Kit II(Seegene, Korea)를 이용하였다. 제조사의 방법에 따라 PRL partial gene으로부터 target specific primer(TSP)를 디자인 하였다(Table 11). 1차 PCR을 위해 첨가된 조성성분은 2 uL genomic DNA (200 ng), 10 uL 2x SeeAmp™ACP™master mix II, 2 uL 5 μM DW2-ACP primer (DW2-ACP 1, 2, 3, 4), 0.5 uL 10μM DW-TSP F1 또는 DW-TSP R1이 최종 부피 20 uL에 포함되었다. 1차 PCR 반응조건은 94℃ 5분, 42℃ 1분, 72℃ 2분, 94℃ 30초/60℃ 30초/72℃ 100초 30cycle, 72℃ 7분, 4℃이며, PCR product는 PCR purification KIT(NucleoGen, Korea)를 이용하여 정제하였다. 2차 PCR을 위한 조성은 2 uL 1차 CR product, 10 uL 2x SeeAmp™ACP™master mix II, 2 uL DW2-ACPN, 0.5 uL DW-TSP F2 또는 DW-TSP R2가 전체 부피 20 uL에 포함되었으며, PCR 반응조건은 94℃ 3분, 94℃ 30초/60℃ 30초/72℃ 100초 35 cycle, 72℃ 7분, 4℃였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동 후, gel extraction kit를 이용하여 정제하였다.

2-1-3. Total RNA 추출과 cDNA 합성

*A. melanopus*로부터 뇌와 뇌하수체를 적출하여 액체질소로 급냉 시킨 후, 분석할 때까지 -77℃에 보관하였다. Total RNA는 TRI reagent™(Sigma, USA)를 사용하여 분리한 후, 37℃에서 30분간 RNase-free DNaseI를 처리하였다. cDNA합성은 ImProm-II™ Reverse Transcription System(Promega, USA)의 제조사 방법에 따라 시행하였다. 세 가지 유전자의 cDNA full sequence를 조사하기 위하여 DNA walking에서 확보한 5말단과 3말단의 염기 서열을 기반으로 각각 TSPful F1과 TSPful R1을 디자인하여 PCR을 실시하였다(Table 11). PCR 반응조건은 2 uL first strand cDNA, 4 uL HiQ-PCR Mix, 1 uL 10 μM PRL/AVT/ITful F1, 1 uL 10 μM PRL/AVT/ITful R1이 전

Table 11. Primers used for polymerase chain reaction

Primers	Sequences (5'→3')
PRL Deg. F	CCCTCCATGTGCCACACCTCC
PRL Deg. R	AGGACTTTCAGGAAGCTGTCAAT
DW-PRL F1	GTCTTGGAGTGCTCCTGCAGCTC
DW-PRL F2	TGACACTTGCAGAGCTTGTTCCTTGTC
DW-PRL F3	CTTGTCATTGGGCGTCTGCAGAG
DW-PRL R1	GAGCTGCAGGAGCACTCCAAGAC
DW-PRL R2	CTCGGCCAGGACAAGATCTCCAA
DW-PRL R3	GCTCGGTCCAGGGGTCCTGAT
DW-PRL R4	CTGATGGGAACAGCTTTACACGCTGC
PRLful F1	ATGGCTCAGAGAAGAACCAATGGAAGC
PRLful R1	TTAGCACATCTCAGGCTGCATCTTTGC
AVT Deg. F	CTGTCTTCGGCTTGTTACATCCAGAA
AVT Deg. R	GAGAACTACCTGCTCACCCCCTG
DW-AVT F1	TGCTTCGGCCCCAGTATTGCTGT
DW-AVT F2	GCTCCCCAGAAACAGCTCACTGTGT
DW-AVT R1	AAACAGGGAACTCTTGTCTCTCACCTG
DW-AVT R2	GGACTTCTTGCCCTTTCTCTGCTG
AVTful F1	GAATTCATGCATCACTCCTTGTTCCCC
AVTful R1	GTCGACGCGTACTCATTCTGTCCTCT
IT Deg. F	TGGAGCCTCTGTGTCCGTGTGCCT
IT Deg. R	GAGAACTACCTGCTCACCCCCTG
DW-IT F1	TGCTTCGGCCCCAGTATCTGCTGT
DW-IT F2	GCTCCCCAGAAACAGCTCACTGTGT
DW-IT F1	TGCATCTATGATGGACCTCTTCCCACC

continued

DW-IT F2	GGACAGTTGGAGATGTAACAGGCTGAG
ITful F1	GAATTCATGCCGGAGCTGCTGTGCCC
ITful R1	GTCGACTGGTGGATTTCGGTGAGGAGAAGT

F: forward, R: revser, Deg.: degenerate primer.



체 20 uL에 포함되었으며, 94℃ 4분, 94℃ 30초/60℃ 30초/72℃ 50초 35 cycle, 72℃ 5분, 4℃에서 반응을 종결하였다.

2-2. 계통발생학적 분석

확보한 유전자의 계통발생학적 분석을 위해, NCBI의 Gene Bank에 등재되어 있는 척추동물(사람, 쥐, 소 및 기타 어류)의 세 유전자에 대한 아미노산 정보를 수집하였다. 이후 MEGA 5.0 프로그램을 이용해 아미노산 염기서열을 비교분석하였다.

2-3. Reverse transcription PCR에 의한 mRNA 발현조사

2-3-1. 실험어

실험어 *A. melanopus* 30마리를 200 L 원형수조(34 psu; 13L:11D; 26.5℃)에서 5일간 적응시켰다. 실험 당일 15 psu가 되도록 담수를 첨가하였으며, 0시간 제인 SW구를 대조구로 4, 8, 24, 48, 144시간마다 5마리씩 샘플링을 하였다.

2-3-2. RT-PCR

DNase가 처리된 total RNA는 NanoDrop(ND-1000, USA)으로 정량한 후, 0.5 µg의 RNA를 template로 하여 cDNA를 합성하였다. 그리고 HiQ-PCR Mix를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다. 개체별 RT-PCR 산물의 대조구로 *A. melanopus*의 β -actin 유전자(GeneBank accession no. JF273495)를 이용하였다. 각 시료 및 β -actin의 RT-PCR 산물에 대한 상대정량은 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 Gel-Doc(Bio-Rad, USA)으로 영상 촬영하였으며, quantitative-one 프로그램을 이용하여 밴드밀도를 분석하였다.

2-4. 통계분석

실험결과의 자료값은 mean±S.E.로 나타내었다. SPSS(ver. 17)를 이용하여 자료값의 정규성 및 등분산성 가정을 만족하는 지를 조사하였다. 두 조건을 만족하는 경우, 모수적인 방법인 one way-ANOVA를 실시하였으며, Tukey's

multiple range test로 95% 신뢰수준에서 유의차 유무를 검정하였다($P < 0.05$). 두 조건을 만족하지 않을 경우, 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하였고, Tukey test using ranks로 유의성을 검정하였다.

3. 결과

3-1. PRL, AVT, IT 유전자 염기서열

3-1-1. pro-PRL

A. melanopus PRL의 유전자는 5개의 exon으로 이루어져 있다. Exon I, II, III, IV는 각각 14, 38, 36, 61개의 아미노산을 암호화하고 있고, exon V는 정지코돈인 TAA와 함께 63개의 아미노산을 암호화하고 있다. Exon-intron junction은 table 12과 같다. PRL full cDNA는 Fig. 14에서 보는 바와 같이, 212개의 아미노산 open reading frame(ORF)으로서, 24개의 신호 펩타이드와 188개의 mature 아미노산으로 이루어졌다.

3-1-2. prepro-AVT

A. melanopus AVT의 유전자는 3개의 exon으로 이루어져 있다. Exon I, II는 각각 40, 68개의 아미노산을 암호화하고 있고, exon III는 정지코돈인 TGA와 함께 45개의 아미노산을 암호화하고 있다. Exon-intron junction은 table 13과 같다. *A. melanopus*의 prepro-AVT full cDNA는 Fig. 15과 같이 19개 아미노산의 신호 펩타이드, 9개 아미노산의 AVT, 125개의 Neurophysin 으로 총 153개의 아미노산으로 이루어져 있다.

3-1-3. prepro-IT

A. melanopus AVT의 유전자는 3개의 exon으로 이루어져 있다. Exon I, II는 각각 40, 68개의 아미노산을 암호화하고 있고, exon III는 정지코돈인 TGA와 함께 48의 아미노산을 암호화하고 있다. Exon-intron junction은 table 14

Table 12. Genomic organization of *Amphiprion melanopus* prolactin gene

Exon	Exon size (bp)	cDNA position	Exon-intron junctions	Intron	Intron size (bp)
I	120	1-44	...gag ATGGCTCA CCTGACAG gt gagatg	1	784
II	113	4-157	ttctct ag TGTTGTAC GGGAGCTG gt cagtgt	2	241
III	108	158-265	tcctcc ag GACTCTCA AAGTGTCAG gt aagtta	3	320
IV	183	266-448	tcctcc ag GAGTCAGA CTGGGAAG gt gtgcaa	4	99
V	192	449-639	cctccc ag ATGGGTCC TGTGCTAA...		

Exon sequences are in upper case letters an intron sequences in lower case letters. Start and stop codons are boxed.

Table 13. Genomic organization of *Amphiprion melanopus* arginine vasotocin gene

Exon	Exon size (bp)	cDNA position	Exon-intron junctions	Intron	Intron size (bp)
I	120	1-120	...gcgATGCATCA TCAGACAGgtgaggac	1	886
II	205	121-325	tcttccagTGCATGCC CAGCTCTGgtacagtc	2	122
III	137	326-462	cctgtcagAGGGCTGT AGTACTGA...		

Exon sequences are in upper case letters an intron sequences in lower case letters. Start and stop codons are boxed.

Table 14. Genomic organization of *Amphiprion melanopus* isotocin gene

Exon	Exon size (bp)	cDNA position	Exon-intron junctions	Intron	Intron size (bp)
I	120	1-120	...gagATGACCGG TGC GGAAG gt aagctg	1	321
II	205	121-325	tctctcc ag TGCATGCC TGATGCAG gt tagaac	2	491
III	146	326-471	tgccac ag AGAGCTGC ACCAATGA...		

Exon sequences are in upper case letters an intron sequences in lower case letters. Start and stop codons are boxed.

multiple range test로 95% 신뢰수준에서 유의차 유무를 검정하였다($P < 0.05$). 두 조건을 만족하지 않을 경우, 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하였고, Tukey test using ranks로 유의성을 검정하였다.

3-2. 계통발생학적 비교

3-2-1. pro-PRL

*A. melanopus*의 PRL 아미노산 서열을 BLAST 과정을 통하여 GenBank에 보고된 다른 어종 PRL과의 유사성을 검색하였으며, 그 결과를 Fig. 14에 나타내었다. *A. melanopus* PRL 아미노산 서열은 orange-spotted grouper PRL (*Epinephelus coioides*, AAO11695)과 가장 높은 상동성(83%)을 보였으며, three spot gourami PRL (*Trichogaster trichopterus*, AAX09323)과는 81%, 감성돔 PRL (*Acanthopagrus schlegelii*, AAX21764)과는 80%, 무지개송어 PRL (*Oncorhynchus mykiss*, NP_001118205)과는 70%, 자주복 PRL (*Takifugu rubripes*, NP_001072092)과는 72%의 상동성을 나타내었다. 그리고 조류인 닭 PRL (*Gallus gallus*, AAG01026)와는 39%, 인간 PRL (CAA38264, *Homo sapiens*)과는 38%의 상동성을 나타내었다.

3-2-2. prepro-AVT

A. melanopus AVT의 아미노산 염기서열은 Fig. 15에서 보는 바와 같다. *A. melanopus* AVT 아미노산 서열은 orange-spotted grouper AVT (*Epinephelus coioides*, AAO11695)와 88%의 가장 높은 상동성을 보였으며, European flounder AVT (*Platichthys flesus*, BAA98140)와는 85%, Chinese wrasse AVT (*Halichoeres tenuispinis*, ABB90896)과는 84%, 자주복 AVT (*Takifugu rubripes*, AAB37480)와는 81%의 상동성을 나타내었다. 그리고 포유류인 Prairie vole AVT (*Microtus ochrogaster*, AAG01026)와는 58%, 인간 AVT (AAB86629, *Homo sapiens*)과는 54%의 상동성을 나타내었다.

```

1 ATGGCTCAGAGAAGAACCAATGGAAGCAAAGTCTCCTGACAGTGTTGTACGTGGTGGCA 20
  M A Q R R T N G S K L L L T V L Y V V A
61 GCGTGTAAGCTGTTCCCATCAGTGACCTCCTGGACCGAGCCTCTCAGCGCTCTGACAGA 120
  A C K A V P I S D L L D R A S Q R S D R
121 CTGCACTCCCTCAGCAGGATGCTCACCCGGGAGCTGGACTCTCATTTCCCTCCGATAGGC 180
  L H S L S T M L T R E L D S H F P P I G
181 AGAATGATCATGCCTCGCCCTGCGATGTGCCACACCTCCTCTCTGCAGACGCCAATGAC 240
  R M I M P R P A M C H T S S L Q T P N D
241 AAGGAACAAGCTCTGCAAGTGTGAGTGTGACCTGCTGTCTTTGGCTCGCTCCCTGCTC 300
  K E Q A L Q V S E S D L L S L A R S L L
301 CGGGCCTGGGTGGACCCCTGCTGGTCCTGTCTCCTCTGCTAACACCCTGCCTCACCCG 360
  R A W V D P L L V L S S S A N T L P H P
361 GCCCAGAACAGCATCTCCAACAAGATCCAGGAGCTGCGGGAGCACTCCAAGACCCTGGGA 420
  A Q N S I S N K I Q E L R E H S K T L G
421 GACGGCCTGAACATACTGTCTGGGAAGATGGGTCCGGCTGCTCAGACCATGTCCCTGCTC 480
  D G L N I L S G K M G P A A Q T M S L L
481 CCCTACAGAGGAGGCAATGATCTCGGCCAGGACAAGATCTCCAAACTGATCAACTCCAG 540
  P Y R G G N D L G Q D K I S K L I N F Q
541 TTCCTGCTGTCCTGCTTTCGCCGGGACTCCACAAGATTGACAGCTTCCTGAAAGTCCTG 600
  F L L S C F R R D S H K I D S F L K V L
601 CGCTGCCGGGCGGCAAAGATGCAGCCTGAGATGTGCTAA
  R C R A A K M Q P E M C -

```

Fig. 14. Structure of pro-prolactin cDNA isolated from *Amphiprion melanopus*. The signal peptide is boxed.

1 ATGCATCACTCCTTGTTCCCATGTGCGTCCTGGGACTTCTTGCCCTTTCCTCTGCCTGC 20
 M H H S L F P M C V L G L L A L S S A C
 _____ Signal peptide _____
 61 TACATCCAGAACTGCCCCCGAGGAGGGAAGCGAGCGCTGCCGGATACTGGGATCAGACAG 120
 Y I Q N C P R G G K R A L P D T G I R Q
 _____ AVT _____ Neurophysin _____
 121 TGCATGCCCTGTGGCCCGGAGACAGGGGCGCTGCTTCGGCCCACTATCTGCTGTGGG 180
 C M P C G P G D R G R C F G P S I C C G

 181 GAGGGTCTCGGCTGCCTGCTGGGCTCCCCAGAAACAGCTCACTGTGTGGAGGAGAACTAC 240
 E G L G C L L G S P E T A H C V E E N Y

 241 CTGCTGACTCCCTGCCAGGCAGGAGGACGAOCCTGCGGATCTGAGGGAGGACGCTGCGCT 300
 L L T P C Q A G G R P C G S E G G R C A

 301 GCTTCAGGACTCTGCTGCAGCTCTGAGGGCTGTGTGGTGGACTCTGACTGCCTAGGGGAG 360
 A S G L C C S S E G C V V D S D C L G E

 361 ACAGAGAACACAGATCCAGCTCACGGCTCTGCCAGGAGTTCACCAACAGACCTGCTGCTG 420
 T E N T D P A H G S A R S S P T D L L L

 421 CGTCTGCTGCATGTGGCCACGAGAGGACAGAATGAGTACTGA
 R L L H V A T R G Q N E Y stop codon

Fig. 15. Structure of pro-arginine vasotocin cDNA isolated from *Amphiprion melanopus*.

3-2-3. prepro-IT

*A. melanopus*의 IT의 경우, 아미노산 서열은 Fig. 19에서 보는 바와 같다. Chinese wrasse IT (*Halichoeres tenuispinis*, ADB28875)와 가장 높은 상동성(88%)을 보였으며, European flounder IT (*Platichthys flesus*, BAA98141)와는 85%, 자주복 IT (*Takifugu rubripes*, AAC60289)와는 79%, chum salmon IT (*O. keta*, BAD12146)와는 73%, cherry salmon IT (*Oncorhynchus masou*, BAA01738)와는 62%, 그리고 *A. melanopus* AVT (AEB00559)와는 70% 상동성을 나타내었다.

3-3. PRL, AVT, IT mRNA 발현비교

*A. melanopus*를 해수에서 15 psu의 환경으로 전환시킨 후 시간별로 시료를 확보하고 PRL 발현을 조사하였다(Fig. 20). 모든 실험구에서 PRL mRNA의 발현을 확인 할 수 있었다. 특히, 24h구의 PRL mRNA 발현이 SW구보다 유의하게 높았다. 그러나 48h구와 144h구는 8h구와 비슷한 수준으로 감소하였다. AVT와 IT는 시간이 경과함에 따라 발현정도가 증가하는 경향을 보였으며, 두 유전자 모두 144시간째에 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 21, 22).

4. 고 찰

Prolactin은 성장호르몬과 같은 펩타이드호르몬 분류군에 속하며 경골어류가 담수적응을 하는 데 중요한 호르몬으로 알려져 있다. 어류의 PRL은 23~24개 아미노산의 신호펩타이드를 가지는 호르몬 전구물질로부터 합성되며, 본 연구에서는 *A. melanopus*의 PRL이 24개의 신호펩타이드와 함께 188개 아미노산으로 이루어져 있는 pro-hormone임을 확인할 수 있었다. 이 펩타이드에는 4개의 시스테인 잔기가 포함되어져 있는 데, 4개의 시스테인은 2개의 이황화결합을 형성하는 것으로 여겨진다. 포유류의 PRL에는 3개의 이황화결합이 각각

1 ATGACCGAGCTGCTGTGCCCATCTGCTTTCTTTTCTTCTGTCTGTATGCTCAGCCTGT 20
 M T G A A V P I C F L F L L S V C S A C
 _____ Signal peptide _____
 61 TACATCTCCAAGTGTCTATTGGTGGGAAGAGGTCCATCATAGATGCACCACTGCGGAAG 120
 Y I S N C P I G G K R S I I D A P L R K
 _____ IT _____ Neurophysin _____
 121 TGCATGCCCTGTGGCCCCGAGACAGGGGCGCTGCTTCGGCCCCAGTATCTGCTGTGGG 180
 C M P C G P G D R G R C F G P S I C C G
 181 CTGCTGACTCCCTGCCAGGCAGGAGGACGTCCCTGCGGATCTGAGGGAGGACGCTGCGCT 240
 L L T P C Q A G G R P C G S E G G R C A
 241 GCTTCAGGACTCTGCTGTGATGCAGAGAGCTGCACCACAGACCAGTCCTGCCTCATCGAG 300
 A S G L C C D A E S C T T D Q S C L I E
 301 GAGGAAGGAGACGACCAAAGCAGCCAATTGGAAGGAGTGACCCCGGTGACATCATCCTC 360
 E E G D D Q S S Q F E G S D P G D I I L
 361 AGGTTCTGCTGCTGGCTGGCCACACTTCTCCTCACCAGATCCACCAATGA
 R F L H L A G H T S P H R I H Q -

Fig. 16. Structure of pro-isotocin cDNA isolated from *Amphiprion melanopus*.

<i>Amphiprion melanopus</i>	-----MAQRRTGSKLLTLVLYVVAACK-AVPISDLLDRASQRSDRLHSLSTMLTREL	52
<i>Epinephelus coioides</i>	HSD.N...M...M...S-...N.....T.SHD.	52
<i>Trichogaster trichopterus</i>	G....VFVA...MA.V.G-..HV.....K.....T..Q.M	52
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	H.E.....FI...CM...G-.....T.....T..QD.	52
<i>Takifugu rubripes</i>	H.KPGDIL..V...CM..TARGT.ST.....V.EH..MI.....I.SQD.	53
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	R.-SQ.T..H.A..CL.VS.H-.IGL...ME.....K.....S..KD.	51
<i>Gallus gallus</i>	MSNRGASLKGFLAVLLVSNLLTKEGVTSLPICPIGVSNCQ.SLGE.F...VKL.HYI.Y..SEIFN.F	70
<i>Homo sapiens</i>	-----MKG-SLLLLVSNLLLCQ.-VAPLPICPGG.ARCQ.TLR..F...VVL.HYI.N..SEMFS.F	61
<i>Amphiprion melanopus</i>	DSHFPPIGRMIMPRPAMCHTSSLQTPNDKEQALQVSESDLLSLARSLLRWVDPILLVSSSANTLPHPAQ	122
<i>Epinephelus coioides</i>	.FN.....A....S.....S.....Q..A...V...T.....	122
<i>Trichogaster trichopterus</i>	LS.AF....S.....M.....QS.....V...S.....	122
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	NN.I..V.W.M...ST.....L.....Q..Q..V...N...S.V..S.	122
<i>Takifugu rubripes</i>	..QL.V...LL...S.....M.....I.K.....H..A....F..T..M...QL..	123
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	M..VM....S.....K.....K...NE..I.....L..N....L...E.P....SN	121
<i>Gallus gallus</i>	.ERYAQGRGF.TKAVNG.....T..E.....Q.IHHE...N.VVG...S.N...IH.A.EVQRIKEAP-	139
<i>Homo sapiens</i>	.KRYTHGRGF.TKAINS.....A..E.....Q.MNQK.F...IV..I..S.NE..YH.VIEVRGMQEAP-	130
<i>Amphiprion melanopus</i>	NSISNKIQELQEHSTLGDGLNLSGKMGPAQTMSLLPYRGNDLGQDK--ISKLINFQFLSCFRDS	190
<i>Epinephelus coioides</i>	ST.....T.S....D.....LI.S.....I...R--...V..N.....	190
<i>Trichogaster trichopterus</i>	S.....T.D....D.....E..AI.M.....I...R--..T..A..H.....	190
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	S.....R.....S....D.....E..AI.S.....S..I.E.S--...T..H.....	190
<i>Takifugu rubripes</i>	S.V.....KQ..Q.....DR..Q...AI.S...S.....--...LH.....	191
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	GD..S..R...DY..S....D.MVN....SS.YI.SI.FK..-...N...-T.R...H..M.....	188
<i>Gallus gallus</i>	DT.LW.AV.IE.QN.R.LE.MEKIV.RVHSGDAGNEIYSHWD.LPSL.LADED.R.FA.YN..H.L....	209
<i>Homo sapiens</i>	EA.LS.AV.IE.QT.R.LE.MELIVSQVH.ETKENEIY.VWS.LPSL.MADEE.R.SAYN..H.L....	200
<i>Amphiprion melanopus</i>	HKIDSFLKVLRCRAAKMQPEMC	212
<i>Epinephelus coioides</i>	LR....	212
<i>Trichogaster trichopterus</i>	I...L.	212
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	L....	212
<i>Takifugu rubripes</i>	M.N.V....	213
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	T..R..A.	210
<i>Gallus gallus</i>	NY....K..LIHDSNC--	229
<i>Homo sapiens</i>	NY..L.K...IHNHNC--	220

Fig. 17. Comparison of pro-prolactin amino acid sequences from *Amphiprion melanopus* with those of *Epinephelus coioides*, *Trichogaster trichopterus*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Takifugu rubripes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Gallus gallus*, and *Homo sapiens*. Dots indicate amino acids residues conserved among the species.

Amphiprion melanopus ----MHSLFPMCVLG-LLALSSACYIQNCPRGGKRALPDTGIRQCMPCGPGDRGRCFGPSPICCGEGLGC 65
Epinephelus coioides ----.P..M..L....-T.....E.....S..... 65
Platichthys flesus ----.P..M..L....-F.....G..... 65
Halichoeres tenuispinis ----.P..VI..L...I.....E..L.....R.K.....N..... 66
Takifugu rubripes ----.PQCALLLSL...-.....E.....S..R.....N....A... 65
Oncorhynchus keta ----.P..TLLL..I...-F.....Q.....T.....Q.H..... 65
Microtus ochrogaster MLAR.LN.TLSA.F.S-...FT....F.....M..MEL...L.....Q.....N...ADE... 69
Homo sapiens ----.PDTML.A.F.-...F.....MS.LEL...L.....K.....ADE... 65

Amphiprion melanopus LLGSPETAHCVEENYLLTPCQAGGRPCGSEGGRCASGLCCSSEGCVVSDC----LGETENTIDPAHGSA 131
Epinephelus coioidesN..S.M..P.-----D..AS..... 131
Platichthys flesusM.....NP.S.A.....A.I.AS..G..AG 131
Halichoeres tenuispinisV..N..S.A.....M.AS.Q.DS.. 132
Takifugu rubripes .M.....R.AG.....V.....N..S.A.....SLE.GDS.. 131
Oncorhynchus keta WM.....R.F....P....T.....DA....P.V..D..S..L.P.....S.SRYHS..DH.. 131
Microtus ochrogaster FV.TA.ALR.Q....PS...S.QK.....A.I...D.S..S.PE.REDF.RL.SARE.NN.TQ 138
Homo sapiens FV.TA.ALR.Q....PS...S.QKA.....F.V..ND.S..TEPE.REVFHRRARAS.RSNATQ 134

Amphiprion melanopus RS---SPTDLLRLHVA-TRQNEY----- 153
Epinephelus coioides G....AE..M.....T..... 153
Platichthys flesus G....AA.....T-A..T..... 153
Halichoeres tenuispinis G....AE.....T..... 154
Takifugu rubripes D....E.....MS-S...S..... 153
Oncorhynchus keta GATSD..GE.....F-...S..KQ---- 158
Microtus ochrogaster LDG--PARA.....QM.G..ESVDSAKPRVY 168
Homo sapiens LDG--PAGA.....VQL.GAPEPF.PAQPDAY 164

Fig. 18. Comparison of prepro-arginine vasotocin amino acid sequences obtained from *Amphiprion melanopus* with those of *Epinephelus coioides*, *Platichthys flesus*, *Halichoeres tenuispinis*, *Takifugu rubripes*, *Oncorhynchus keta*, *Microtus ochrogaster*, and *Homo sapiens*. Dots indicate amino acids residues conserved among the species.


```

Amphiprion melanopus      --MTGAAMP-ICFLFLSVCSACYISNCPIGGKRSIIDAPLRKCMPCGPGDRGRCFGPSICCGEGLGCLL 67
Halichoeres tenuispinis  ---...S.S-V.L.....M...Q...S.....F. 67
Platichthys flesus       ---...S-V.L...VFL.....M.....S.....G..... 67
Takifugu rubripes        ---...T.IS-V.L.....M...Q...S.....G....SF...M 67
Oncorhynchus keta        ---...S-V.L.YA.....M...Q...S....EQ.....KDV..WM 67
Oncorhynchus masou       MA.F.TS.SAL.L.....T.....ALAF.S...S.....N.....M..YV 70
A. melanopus's AVT       --.HHSLF.-M.V.G..ALS.....Q...R....ALP.TGI.Q..... 67

Amphiprion melanopus      GSPETAHCVEENYLTPCQAGGRPCGSEGGRCASGLCCDAESCITTDQSCLIEEGDDQSSQFEGSDPGD 137
Halichoeres tenuispinis  .....L.....V...S.....MD..S..PT....G.... 137
Platichthys flesus       .....H.....D.E..TG.L.G..S. 137
Takifugu rubripes        ....S.R.A.....L..S.....M.....S....ERG.L.D...S.. 137
Oncorhynchus keta        .....M....P...V.....DTR...SP.V...S.G.SA...FA....N.IG.S...NSA. 137
Oncorhynchus masou       ....A.G.....PS..EV...V....E....P.I...V.G.SI....TE.D.AEYI.QSVSS.HGH. 140
A. melanopus's AVT       .....SS.G.VV.SD..G.T.NT.PAHGSAR.S.T. 137

Amphiprion melanopus      IILRFLHLAGHTSPHRIHQ 156
Halichoeres tenuispinis  ....L.....V.. 156
Platichthys flesus       ..F.L...V..A...QS.. 156
Takifugu rubripes        V..KL.R...L...QT.- 155
Oncorhynchus keta        V...L....D..P...V.. 156
Oncorhynchus masou       LLMKL.NMIS..P...V.K 159
A. melanopus's AVT       LL..L..V.TRGQNEY--- 153

```

Fig. 19. Comparison of prepro-isotocin amino acid sequences obtained from *Amphiprion melanopus* with those of *Epinephelus coioides*, *Trichogaster trichopterus*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Takifugu rubripes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Gallus gallus* and *Homo sapiens*. Dots indicate amino acids residues conserved among the species.

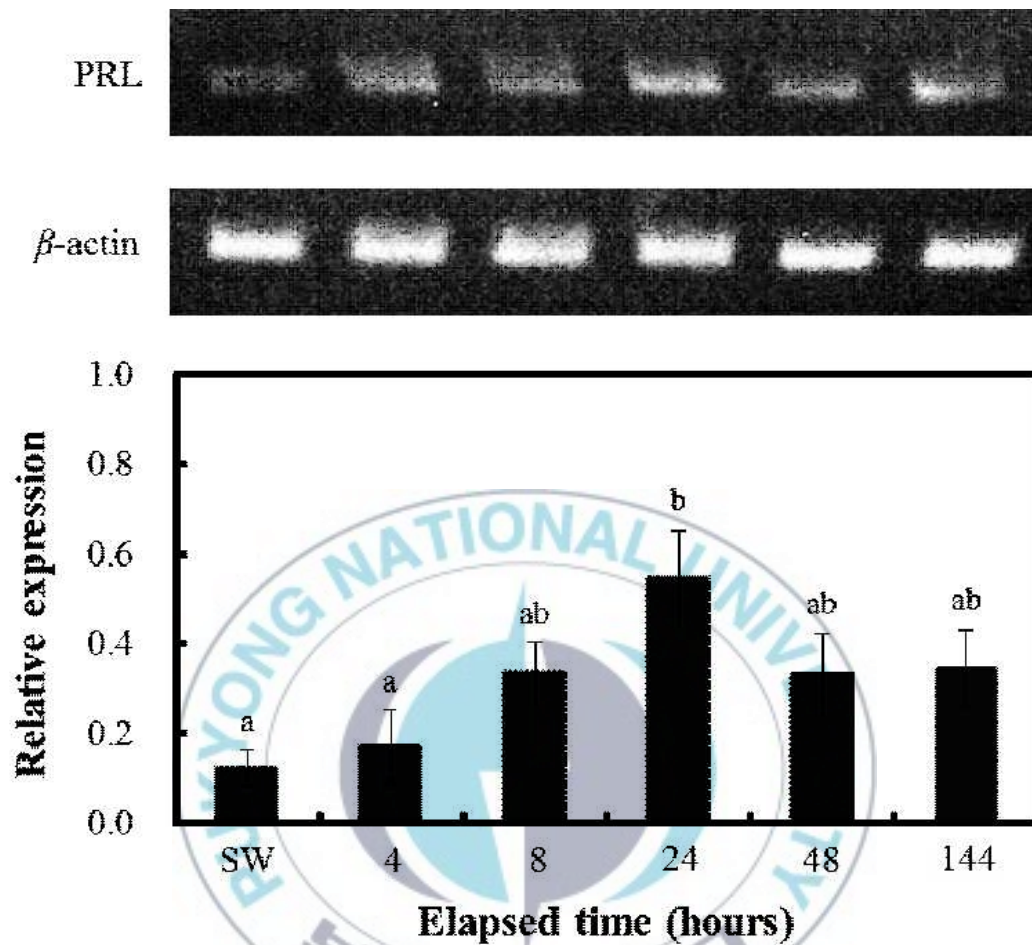


Fig. 20. RT-PCR analysis of transcript encoding prolactin in *Amphiprion melanopus* adapted to water with 15 psu for 0, 4, 8, 24, 48, and 144-hour. 0.5 microgram of total RNA prepared from pituitary was reverse transcribed and amplified using *A. melanopus* PRL-specific primer. The pituitary PRL of *A. melanopus* was analyzed by RT-PCR. The expression of β -actin mRNA was evaluated in each RT reaction product as a control. The expression of each tissue was normalized with respect to the β -actin signal and expressed as relative expression level. Each value represents mean $\pm$ S.E. (n=4). Different letters indicate significant difference (P<0.05). SW: seawater.

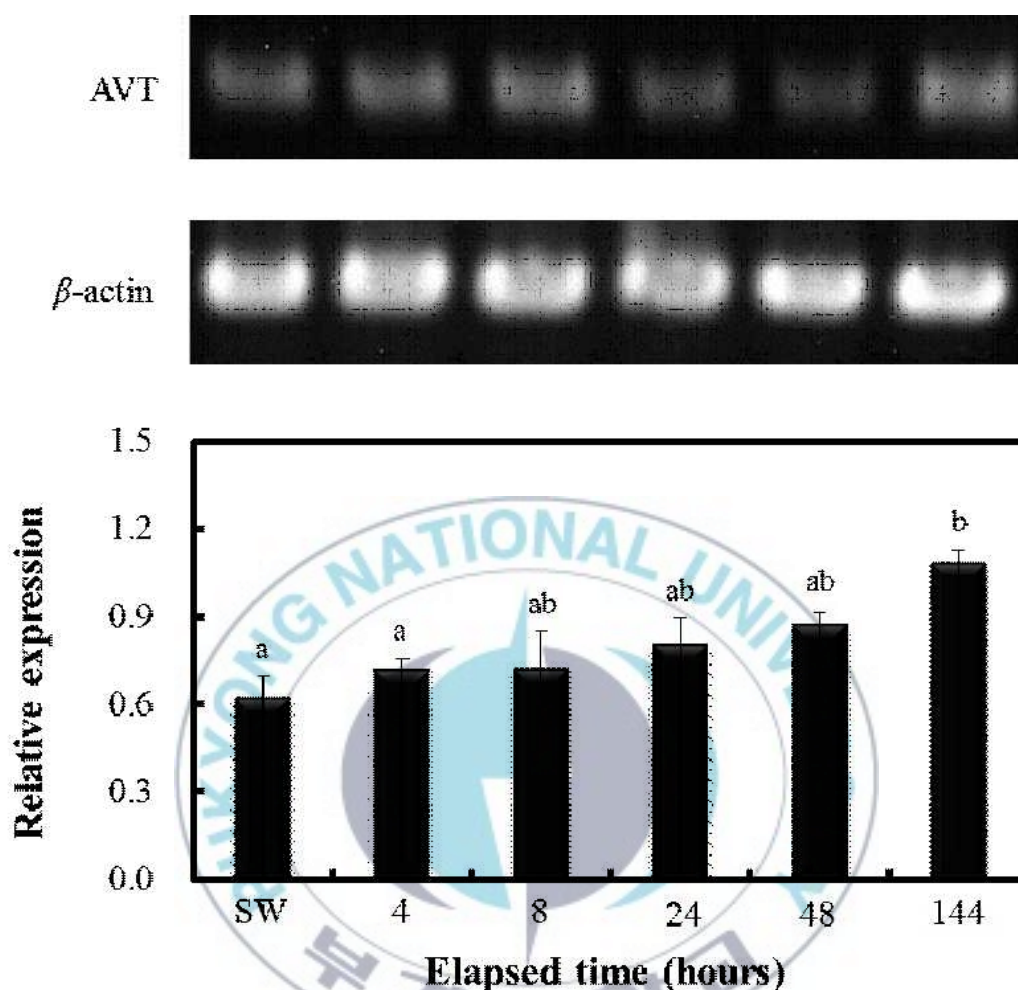


Fig. 21. RT-PCR analysis of transcript encoding arginine vasotocin in *Amphiprion melanopus* adapted to 15 psu for 0, 4, 8, 24, 48, 144-hour. 0.5 microgram of total RNA prepared from pituitary was reverse transcribed and amplified using *A. melanopus* PRL-specific primer. The pituitary PRL of *A. melanopus* was analyzed by RT-PCR. The expression of β -actin mRNA was evaluated in each RT reaction product as a control. The expression of each tissue was normalized with respect to the β -actin signal and expressed as relative expression level. Each value represents mean $\pm$ S.E. (n=4). Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). SW: seawater.

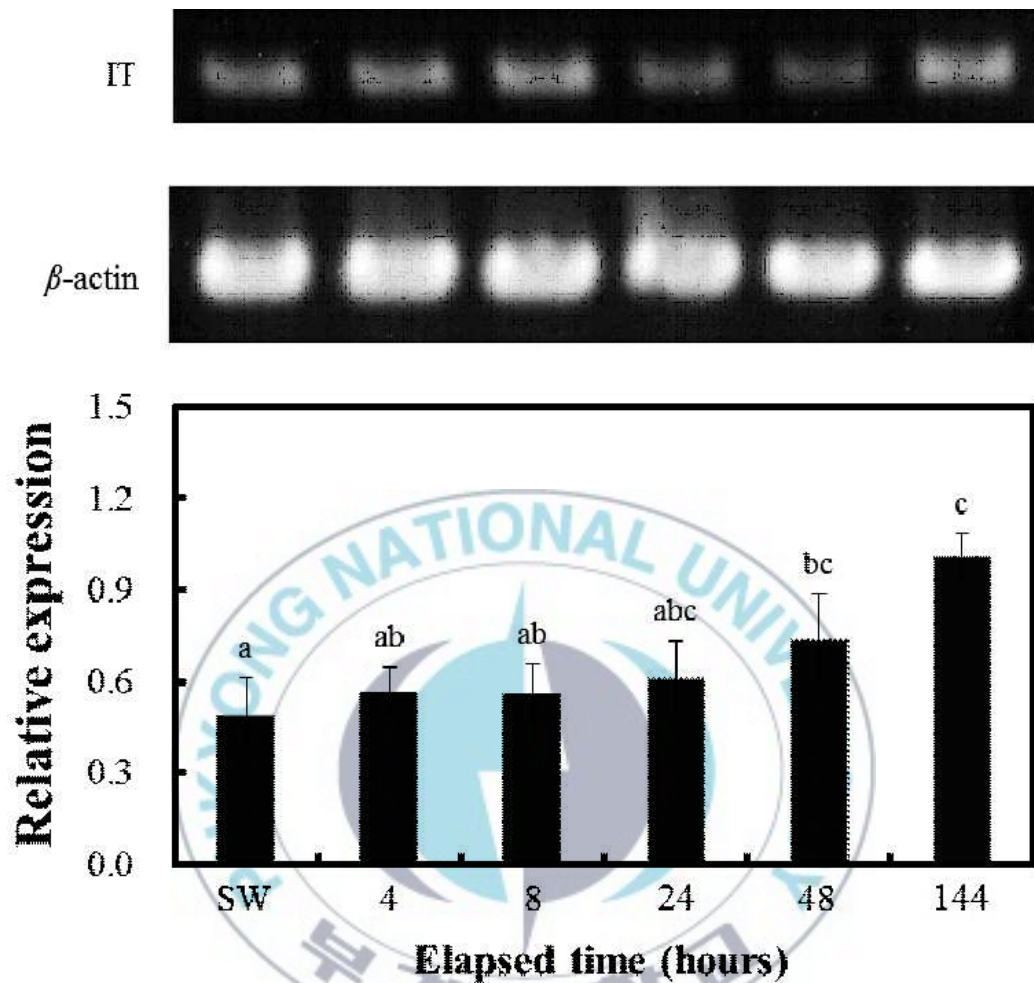


Fig. 22. RT-PCR analysis of transcript encoding isotocin in *Amphiprion melanopus* adapted to 15 psu for 0, 4, 8, 24, 48, 144-hour. 0.5 microgram of total RNA prepared from pituitary was reverse transcribed and amplified using *A. melanopus* PRL-specific primer. The pituitary PRL of *A. melanopus* was analyzed by RT-PCR. The expression of β -actin mRNA was evaluated in each RT reaction product as a control. The expression of each tissue was normalized with respect to the β -actin signal and expressed as relative expression level. Each value represents mean $\pm$ S.E. (n=4). Different letters indicate significant difference (P<0.05). SW: seawater.

N-터미널, 가운데, C-터미널에 위치하고 있는 반면, 어류는 N-터미널 지점에 12~14개의 아미노산이 빠져있기 때문에 N-터미널 영역에는 이황화결합이 없다. Manzon(2002)에 따르면, 경골어류의 N-터미널 영역에서 이황화결합의 상실은 아마도 삼투압조절 호르몬으로서의 중추적인 역할과 연관이 있을 것으로 예상하고 있다. 이는 N-터미널의 이황화결합이 제거가 된 양의 PRL을 어류에게 투여했을 때, 어류의 삼투압조절이 크게 향상되었다는 사실이 이 견해를 뒷받침해 준다.

본 연구에서 *A. melanopus*는 해수에서 15 psu로 염분이 바뀌고 나서 24시간에 PRL발현이 가장 높았다. 해수에서 사육 중인 틸라피아에 비해 담수에 적응한 틸라피아의 뇌하수체 PRL발현과 혈장 PRL농도가 상승했다는 보고가 있다(Seale et al., 2002; Riley et al., 2003). 또한, 대서양연어 *Salmo salar*와 자주복 *T. rubripes*을 해수에서 낮은 염분으로 옮겼을 때 PRL mRNA의 발현이 상승한다고 보고된 결과는 본 연구와 일치한다(Martin et al., 1999; Lee et al., 2006). 어체는 자신의 삼투질 농도 보다 낮은 저장액에 노출되면, PRL mRNA의 발현을 증가시키며, 이로 인한 혈중 PRL 상승은 아가미, 신장, 장과 같은 삼투압조절 기관을 표적으로 하여 Na^+ , Cl^- 유출 및 물의 유입을 억제하는데, Na^+/K^+ -ATPase 활성의 조절 등 다양한 삼투압조절 작용을 촉진하는 것으로 생각된다. 그러나 48시간 이후에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 이것은 아마도 *A. melanopus*가 15 psu에 적응하여 체내외의 삼투압이 같아졌거나 체내의 생리학적 상태가 15 psu 환경에 적응하게 되었기 때문에 PRL의 발현이 약해졌을 것으로 사료된다. 어류의 PRL의 목표기관은 아가미, 신장 창자, 방광, 피부와 같은 삼투압조절기관이다(Manzon, 2002).

본 실험에서 15 psu로 전환시킨 후, *A. melanopus*의 AVT와 IT 모두 시간이 경과됨에 따라 증가하였다. 경골어류에 VT를 투여하면 요의 양이 증가하

는 하며, 육상동물과는 반대로 이노작용을 하기 때문에 저삼투압 환경에 대한 적응에 관여할 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 AVT와 IT가 144시간째 대조구보다 높은 발현도가 나타난 것은 아마도 15 psu가 등장상태라기 보다 비교적 저삼투환경인 것으로 해석할 수 있을 것이다. 그러나 담수적응 호르몬인 PRL은 24시간 이후로 발현을 하지 않았다. 뱀장어와 넙치류의 경우, 담수에서 해수로 이동했을 때, 혈장 AVT는 증가하며, 산란을 위해 강근처의 해안가에 도착한 chum salmon이 담수로 이동했을 때 AVT mRNA는 감소하였다 (Balment et al., 1993; Warne et al., 2005), 이와 달리, 무지개 송어의 경우, 담수에서 80% 해수로 이동한 후에, 시상하부의 AVT mRNA는 감소하였다. IT에서도 AVT와 유사한 경향을 보였으며(Chester Jones et al., 1969; Hyodo and Urano, 1991; Hiraoka et al., 1996). 이와 같이 어류의 VT와 IT는 물, 전해질 대사와의 관계가 어중에 따라서 특이적인 양상을 보인다. 따라서 장기간 저염분 사육에 따른 AVT와 IT에 대한 추가연구가 필요하다.

본 연구를 통해 담수적응호르몬인 PRL이 *A. melanopus*에서도 존재하며, 염분이 낮아짐에 따라 PRL이 발현을 확인되었다. 그러므로 *A. melanopus*는 15 psu 수준의 저염분 환경에서도 사육이 가능한 어종으로 생각된다.

VII. 저염분 사육에 따른 생리·생화학적 조사

1. 서 설

동물의 체액 중 이온조성은 삼투질농도가 해수와 거의 동등한 먹장어를 제외하면, 현존하는 대부분의 경골어류는 서식환경에 관계없이 해수의 1/4~1/2 정도로 유지한다. 예를 들면, 해수어는 체내의 삼투질농도보다 체외 삼투질농도가 높기 때문에, 다량의 해수를 마셔서 장에서 수분을 흡수하고 아가미와 신장을 통해서 Na^+ 과 Cl^- 등의 이온을 체외로 배출시킨다. 반면, 광염성 어류는 외부의 염분이 변하더라도 체내 항상성을 위해 삼투압을 조절한다. 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*, 강도다리 *Platichthys stellatus*, 농어 *Lateolabrax japonicus* 등과 같은 기수성 어류는 바닷물에서 살다가도 염분이 낮은 저염분 환경으로 이동하는 것으로 알려져 있다. 특히, 감성돔의 경우는 완전 담수에서도 생존이 가능한 것으로 밝혀졌다. 그러나 염분변화 적응하는 능력은 어종에 따라 차이가 있다. *A. melanopus*는 열대성 어류로 동남아시아와 같은 열대지역의 산호초 지역에서 서식한다. 열대지역의 기후적 특징은 건기와 우기로서, 특히, 우기 동안에 내리는 비는 육지와 가깝고 수심이 낮은 산호지역의 염분을 저하시킨다. 그러므로 이런 환경에서 오랫동안 적응해온 *A. melanopus*는 저염분 환경에 적응할 수 있을 것으로 예상된다.

주요 삼투압조절 기관인 아가미의 상피세포는 물고기의 외부환경과 내부체액의 경계부위로서 아가미의 생리학적 기능에 있어서 중요한 역할을 한다. 아가미의 상피세포는 크게 pavement cell(PVCs)과 mitochondrion-rich cells(MRCs)로 이루어져있다. PVCs은 아가미 새엽표면의 대부분을 덮고 있으며, 아가미의 가스교환에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Laurent and Dunel, 1980; Laurent, 1984; Wilson and Laurent, 2002). 아가미의 생리학

적 기능 중 수동적 역할을 하는 pavement cell과 달리, MRCs에는 Na^+/K^+ -ATPase가 존재해 체내의 NaCl을 능동적으로 체외로 배출시킨다. MRCs의 apical membrane은 오목한 형태로서 외부환경에 노출된다 (Karnaky et al., 1976; Karnaky, 1986). 해수에서 서식하는 Killifish *Fundulus heteroclitus*, Cichlid *Sarotherodon mossambicus*, long-jaw mudsucker *gillichthys mirabilis*의 아가미에는 MRCs가 고도로 밀집되어 있다. 담수어의 MRCs는 미세구조적인 특징에 있어서 해수어의 MRCs와 유사하지만, 해수어의 MRCs가 accessory cell과 multicellular complexes와 연계되어 있다는 점에서 차이점이 있다. 담수어의 MRCs는 아가미 상피세포의 PVCs에서 단독적으로 나타나며, 이온의 누출을 억제하기 위해서 주변 PVCs 또는 다른 MRCs와 함께 다사 세포간 연결(multistranded intercellular junctions)을 형성한다.

물고기가 새로운 환경에 적응하는 데 있어서 아가미 염류세포에 존재하는 Na^+/K^+ -ATPase는 중요하다. 염분변화에 의한 아가미의 Na^+/K^+ -ATPase는 두 가지 형태로 나타난다. 첫째로, 소하성 어종의 경우, Na^+/K^+ -ATPase 활성이 연속적으로 증가한다(McCormick, 1995). 두 번째는 일부 광염성 어류에서 Na^+/K^+ -ATPase 활성이 염분에 따라서 U자 형태를 보이는 것이다. 즉, 기수 환경에서 아가미 Na^+/K^+ -ATPase 활성은 감소하는 경향을 보이지만, 고염분 또는 저염분 환경에서는 높은 경향을 보인다(Laiz-Carrión et al, 2005).

VI장에서는 PRL, AVT, IT 유전자 발현을 통하여 *A. melanopus*의 저염분 환경 적응 가능성을 확인하였다. 본 연구에서는 저염분환경의 *A. melanopus*를 대상으로 삼투압조절 기관인 아가미와 아가미 Na^+/K^+ -ATPase 그리고 혈액 분석을 통하여 삼투압 조절 능력을 조직학 및 생리·생화학적으로 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험어 및 실험구

A. melanopus 30마리를 200L 원형수조(34 psu; 13L:11D; 26.5℃)에서 5일간 적응시켰다. 실험 당일 15 psu가 되도록 담수를 첨가한 후, 0시간째인 SW구를 대조군으로 시간별(4, 8, 24h 및 144h)로 5마리씩 샘플링을 하였다. 단, Na^+/K^+ -ATPase 활성은 48h구를 추가하였다. 모든 실험은 2반복으로 실시하였다.

2-2. 아가미의 조직상

2-2-1. 주사전자현미경 관찰

절취한 아가미를 2.5% glutaraldehyde 용액(4℃)에서 2시간동안 1차 고정을 하였다. 1차 고정 후, PBS로 10분간 세척하고 1% osmium tetroxide (OsO_4) (4℃)에서 2시간동안 2차 고정을 하였다. 고정이 끝난 재료는 PBS로 다시 세척하여 ethanol 단계별로 50%에서 100%까지 15분씩 탈수를 하였다. 탈수 후, 시료를 critical point dryer에서 건조시켰다. 그리고 ion sputter를 이용하여 gold palladium-coating(15~20 nm)후 주사전자현미경으로 관찰하였다.

2-2-2. 투과전자현미경 관찰

1, 2차 고정후 탈수는 주사전자현미경과 동일하다. 탈수 후 propylene oxide 와 epon 혼합물에 넣어 Epon 812로 포매하였다. 0.5 μm 로 절편된 시료를 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 결정한 다음, 다시 70 nm 두께로 절편하였다. 이후 uranylacetat와 leadcitrate 용액으로 이중 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

2-3. Na^+/K^+ -ATPase 활성

Na^+/K^+ -ATPase 활성은 Lin et al. (2006)의 방법을 수정하여 실시하였다. 아가미 새엽 4개를 새궁으로부터 분리하여 100ul ice-cold SEI buffer(150

mM sucrose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH 7.3)에 넣어서 분석 전까지 -77°C 에 보관하였다. 냉동된 새엽을 서서히 녹인 후, 25 μL SEID(0.5g deoxycholate/100mL SEI)를 넣어 7~8초간 분쇄시켰다. 원심분리(5000g, 30 초)후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. ATPase/GTPase Assay Kit (DATG-200, QuantiChrom, USA)의 사용법을 따라 P_i 의 농도를 측정하였다.

2-4. 혈액의 채취 및 분석

실험어로부터 혈액을 채취하기 전에 공급한 먹이가 어체의 혈액성상에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 채혈 24시간 전부터 실험어를 절식시켰다. 각 실험구에서 3마리(2반복)씩 무작위로 선정하였으며, heparin sodium으로 처리된 주사기(1mL)로 미부혈관으로부터 혈액을 채취하여 pooled sampling을 하였다. 채취한 혈액은 10분간 13000 rpm으로 4°C 에서 원심분리 후, 혈장을 분리하여 -77°C 에 보관하였다. 혈장 Na^+ , K^+ , Cl^- , 글루코스, AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase)와 혈장 삼투질 농도는 각각 Biochemistry Autoanalyzer(Hitach 7180, Hitach Co., Japan)로 Vapor Pressure Osmometer(Vapro 5520, WECOR Co, USA)로 분석하였다.

2-5. 통계분석

실험결과의 자료값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 로 나타내었다. SPSS(ver. 17)를 이용하여 자료값의 정규성 및 등분산성 가정을 만족하는지를 조사하였다. 두 조건을 만족하는 경우, 모수적인 방법인 one way-ANOVA를 실시하였으며, Tukey's multiple range test로 95%신뢰수준에서 유의차 유무를 검정하였다($P < 0.05$). 두 조건을 만족하지 않을 경우, 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하였고, Tukey test using ranks로 유의성을 검정하였다.

3. 결 과

3-1. 아가미의 조직상

주사현미경관찰 결과, 해수 *A. melanopus* 아가미의 표면은 반원형태의 패어 있는 모습이었다. 반면에 15 psu의 새변 표면은 대체로 평평한 형태(Fig. 22, A, B)였으며, TEM을 통한 조직상 결과, 해수 아가미는 염류세포의 apical crypt와 그 주변에 핵과 미토콘드리아가 관찰되었다. 15 psu의 아가미는 apical crypt가 닫혀져있는 조직상이 보였고 그 위는 pavement cell이 덮고 있는 형상이었다(Fig. 22, C, D).

3-2. 아가미 Na^+/K^+ ATPase 활성

해수의 Na^+/K^+ ATPase 활성은 $0.46 \pm 0.1 \mu\text{mol Pi/mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 이었으나 15 psu로 이동 후, 4, 8, 24h구에서 각각 0.99 ± 0.2 , 0.83 ± 0.1 , $0.91 \pm 0.2 \mu\text{mol Pi/mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 특히, 4h구와 24h구는 대조구와 유의차를 보였다. 그러나 48, 144h구는 각각 0.45 ± 0.1 , $0.55 \pm 0.1 \mu\text{mol Pi/mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 대조구와 비슷한 수준이었다(Fig. 23).

3-3. 혈장 Na^+ , K^+ , Cl^- 및 삼투질 농도

해수에서 15 psu로 이동 후, 시간경과에 따른 혈장 Na^+ , K^+ , Cl^- 및 삼투질 농도는 Table 15와 같다. 혈장 Na^+ 의 농도의 경우, SW구는 $205 \pm 3.9 \text{ mEq/L}$ 였으나 15 psu의 4, 8, 24h구에서는 각각 172 ± 3.8 , 170 ± 3.9 , $175 \pm 3.3 \text{ mEq/L}$ 로 감소하였다. 그러나 144h구는 $192 \pm 2.2 \text{ mEq/L}$ 로 대조구보다 상대적으로 낮은 수치였지만 4, 8, 24h구보다 높았다. 혈장 K^+ 의 농도의 경우, SW구는 $5.4 \pm 0.4 \text{ mEq/L}$ 로 5.8 ± 0.1 , $5.3 \pm 0.2 \text{ mEq/L}$ 였던 4, 8h구와 비슷한 수준이었다. 그러나 24, 144h구는 각각 4.8 ± 0.1 , $4.9 \pm 0.3 \text{ mEq/L}$ 로 낮아지는 경향을 보였다. 혈장 Cl^- 의 경우, SW구는 $189.1 \pm 1.0 \text{ mEq/L}$ 였으나, 4, 8, 24h구는 각각 159.6 ± 3.6 , 156.2 ± 4.2 , $158.2 \pm 2.2 \text{ mEq/L}$ 로 다소 감소하는 경향을 보였다. 그러나 144h구는

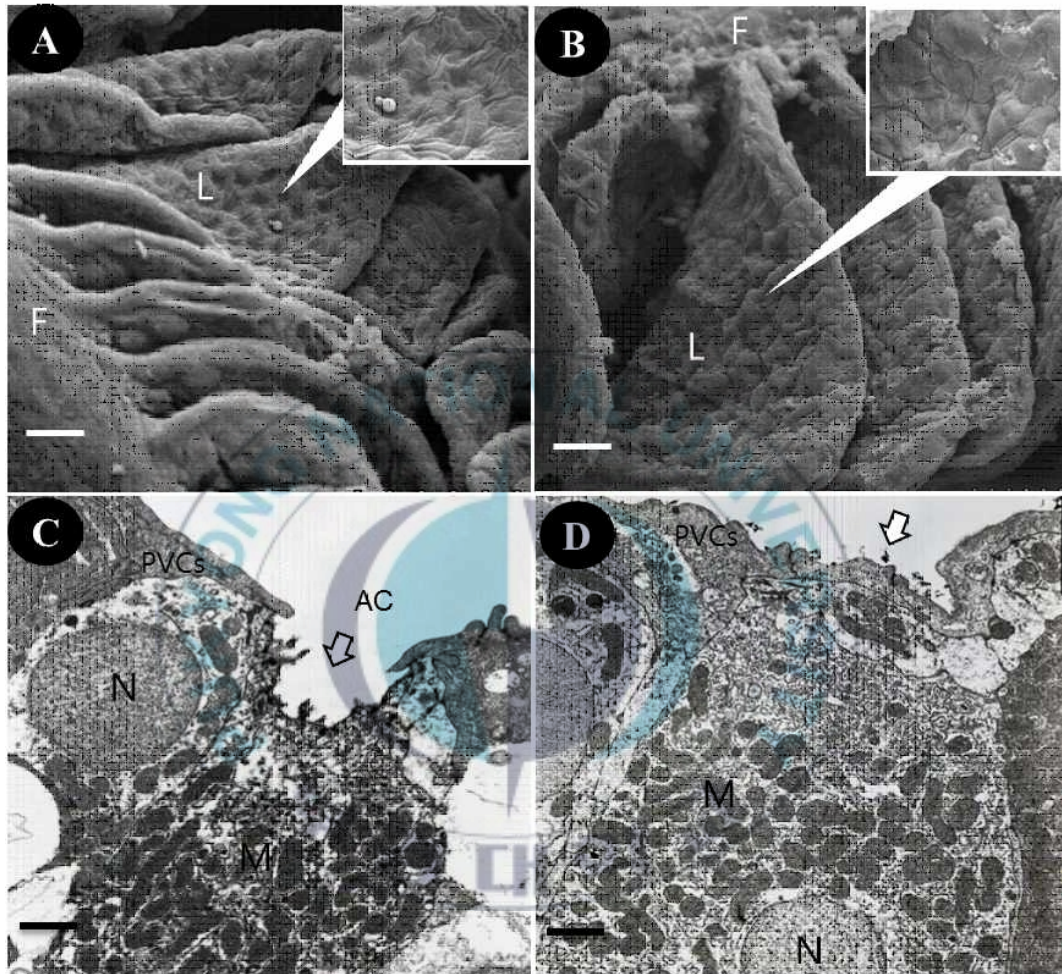


Fig. 22. Scanning electron micrographs (SEM) and transmission electron micrographs (TEM) of gill lamella of *Amphiprion melanopus* transferred to 15 psu from seawater. A: seawater-SEM, B: 15 psu-SEM, C: seawater-TEM, D: 15 psu-TEM. AC: apical crypt, F: filament, L: lamella M: mitochondria, N: nucleus, PVCs: pavement cell, Bar: A-B: 20 μ m, C-D: 2 μ m.

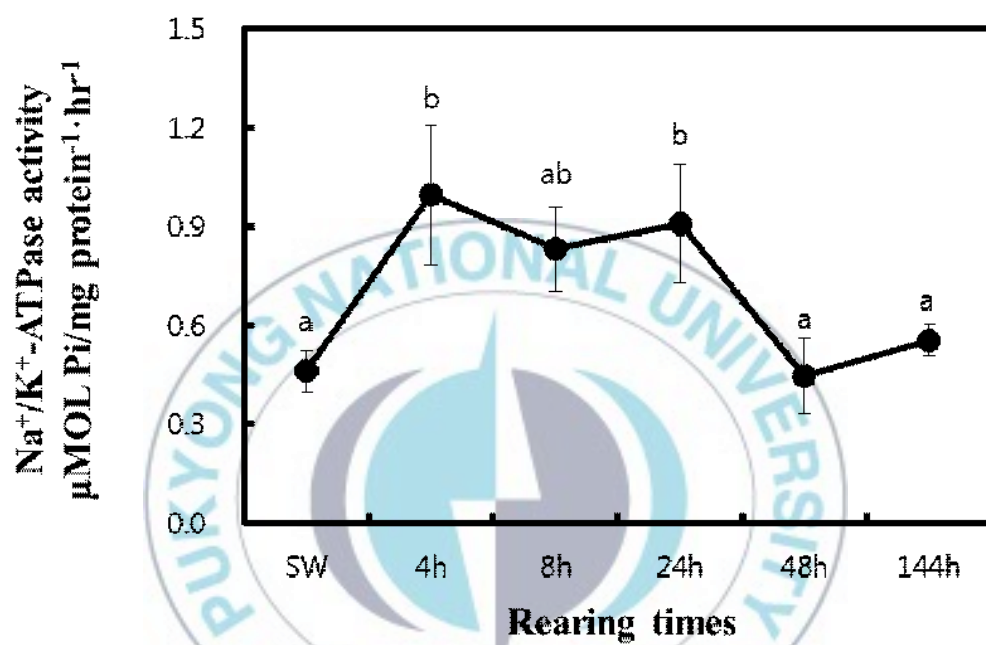


Fig. 23. Gill Na⁺/K⁺-ATPase activity of *Amphiprion melanopus* transferring to 15 psu from seawater. Values are mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant difference (P<0.05).

Table 15. Levels of plasma Na^+ , K^+ , Cl^- and osmolality in *Amphiprion melanopus* upon its adaptation to 15 psu water

Elapsed time (hours)	Na^+ (mEq/L)	K^+ (mEq/L)	Cl^- (mEq/L)	Osmolality (mOsm/kg)
SW	205±3.9	5.4±0.4	189.1±1.0	379.0±1.0
4	172±3.8	5.8±0.1	159.6±3.6	312.5±5.5
8	170±3.9	5.3±0.2	156.2±4.2	313.0±3.0
24	175±3.3	4.8±0.1	158.2±2.2	331.5±2.5
144	192±2.2	4.9±0.3	174.1±2.1	351.5±0.5

Values are mean±S.E. (n=6).

174.1±2.1 mEq/L로 다시 증가하는 경향을 보였으나 SW구보다 낮은 수치였다. 혈장 삼투질 농도는 SW구가 379.0±1.0 mOsm/kg였고 4, 8h구는 각각 312.5±5.5, 331.5±2.5 mOsm/kg로 다소 감소하는 경향을 보였다. 그러나 24h, 144h구는 각각 331.5±2.5, 351.5±0.5 mOsm/kg였다. 이는 4, 8h구보다 상대적으로 높지만 대조구보다는 상대적으로 낮았다.

3-4. Glucose, AST, ALT 및 총 단백질

해수에서 15 psu로 이동 후 시간경과에 따른 혈장 glucose, AST, ALT 및 총 단백질의 변화는 Table 16과 같다. Glucose의 경우, SW구가 44.1±4.1 mg/dL였던 것이 4, 8h구에서 각각 31.1±0.9, 26.3±1.3 mg/dL로 감소하는 경향을 보였다. 24h구는 42.6±1.4 mg/dL로 다시 대조구 수준으로 회복하는 경향을 보였으나 144h구에서는 32.7±0.4 mg/dL로 다시 감소하였다. AST의 경우, SW구가 247.6±1.4 IU/L였다. 4h구는 349.2±1.2 IU/L로 대조구보다 높은 수치였으나 8, 24h구가 각각 205.7±5.3, 112.7±1.3 IU/L로 4h구보다 낮아지는 경향을 보였다. 144h구는 305.2±0.8 IU/L로 대조구보다 높은 수치였다. ALT의 경우, SW, 4h구는 각각 40.7±0.6, 40.6±0.4 IU/L로 비슷했지만 8, 24h구는 각각 32.7±0.6, 21.5±0.5 IU/L로 감소하였으며, 144h구는 45.6±0.6 IU/L로 가장 높은 수치를 보였다. 총 단백질의 경우, SW구는 2.1±0.1 g/dL였지만, 4, 8, 24h구는 1.4±0.1, 1.5±0.1, 1.4±0.1 g/dL로 감소하였으나, 144h구는 2.0±0.1 g/dL로 대조구 수준으로 회복하였다.

4. 고 찰

주사전자현미경의 조직상에서 해수 새변의 표면은 오목한 형태를 취한 반면, 15 psu에서는 상대적으로 평평한 형태이다. 일반적으로 MRCs의 apical membrane은 평면이거나 주변 PVCs의 위로 돌출되어있는 형태이다. 왜냐하면

Table 16. Levels of plasma glucose, AST, ALT and total protein in *Amphiprion melanopus* upon its transfer to 15 psu water

Elapsed time (hours)	Glucose (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Total protein (g/dL)
SW	44.1±4.1	247.6±1.4	40.7±0.6	2.1±0.1
4	31.1±0.9	349.2±1.2	40.6±0.4	1.4±0.1
8	26.3±1.3	205.7±5.3	32.7±0.6	1.5±0.1
24	42.6±1.4	112.7±1.3	21.5±0.5	1.4±0.0
144	32.7±0.4	305.2±0.8	45.6±0.6	2.0±0.1

Values are mean±S.E. (n=6). SW: seawater. AST: aspartate aminotransferase
ALT: alanine aminotransferase.

다양한 형태의 미세융모(microvilli)가 PVCs의 주변에 존재하기 때문이다 (Perry et al, 1992; Perry, 1997). 그러나 본 연구에서는 미세융모를 관찰할 수 없었다. 투과 전자현미경의 조직상에서 염류세포의 apical crypt가 단혀있는 형상을 확인 할 수 있다. 특히, MRCs의 apical membrane은 다사 세포간 연결 PVCs와 접합되어 있는 모습이였다. 그러므로 *A. melanopus*는 저염분 환경에 따른 삼투압 현상으로 인해 발생하는 체내 이온의 누출을 최대한 방지하고자 아기미의 조직학적 변화를 일으킨 것으로 보인다. 광염성 어류인 Killifish *F. heteroclitus*를 저염분 환경에 순치한 실험에서도 이와 동일한 결과가 나타났다(Kato et al., 2003). 해산 경골어류에서 염류세포의 주요 기능은 Na^+ 과 Cl^- 배출에 의한 삼투압조절이다. 염류세포는 많은 미토콘드리아를 함유하고 있어서 Na^+/K^+ -ATPase의 작용에 필요한 에너지를 공급하는 역할을 한다. 체내로부터 이온 배출에 대한 기작은 4가지 주요 수송체와 채널에 의해 이루어진다. 1) apical crypt에 위치한 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator 타입의 Cl^- 채널, 2) 기저부의 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter, 3) 기저부의 Na^+/K^+ -ATPase, 4) 기저부의 K^+ 채널이다.

해수에서 15 psu로 염분을 낮추고 4시간에서 24시간 동안 Na^+/K^+ -ATPase 활성은 증가하는 경향을 보였지만, 48시간부터는 다시 감소하여 대조구 수준으로 돌아왔다. 염분변화 후 초기에 Na^+/K^+ -ATPase 증가는 급격한 염분변화에 따른 일시적인 현상으로 보이며, gilthead sea bream *Sparus auratus*에서도 같은 경향이 나타났다(Laiz-carrión et al., 2005). *F. heteroclitus*나 *Chelon labrosus*, *Dicentrarchus labrax*와 같은 광염성어류의 Na^+/K^+ -ATPase 활성은 저염분 또는 고염분 환경에서 높은 반면, 기수환경에서는 낮은 경향을 보인다 (Towle et al., 1977; Gallis et al., 1979; Jensen et al., 1998). 본 연구에서 4시간째 일시적으로 증가한 것은 담수 유입으로 인한 일시적인 반응으로 추측된

다. 뱀장어나 연어의 회유, 내만에서 감성돔, killifish의 이동은 급격한 염분변화를 겪게 되는 원인이므로 염분 변화에 광염성 어류는 빠른 적응능력이 필요하다. 일부 어류의 아가미 상피세포에서 염분변화를 감지하는 osmoreceptor가 존재한다는 보고가 있다(Perry et al., 1992; Zadunaisky et al, 1995).

본 실험의 *A. melanopus*의 삼투질 농도는 15 psu로 전환된 후 4시간째부터 감소하는 경향을 보였다. 일반적으로 해수어는 환경수의 삼투질 농도가 체내보다 높으면, 삼투압에 의해 체내의 수분이 외부로 빠져나가게 되는 현상을 겪게 된다. 그러므로 어류는 체내의 삼투질 농도를 일정하게 유지하기 위하여 외부의 해수를 다시 섭취하고 신장에서 이온을 여과하여 수분을 보충한다. 그리고 아가미와 오줌을 통해 여과된 이온을 체외로 배출하는 저삼투압조절(hypo-osmoregulation)을 하게 된다. 이와 반대로 담수어는 체내의 이온이 체외로 빠져나가므로 체외로부터 물을 흡수하여 신장에서 이온을 재흡수하여 보충하고 묽은 오줌을 배출함으로써 고삼투압조절(hyper-osmoregulation)을 한다. 본 연구에서는 해수에서 15 psu로 옮긴 후, 4, 8, 24시간째에 Na^+ , K^+ , Cl^- 및 삼투질 농도는 대조구에 비해 낮았지만, 144시간째에 대조구 수준으로 회복되었다. *A. melanopus*는 담수어가 겪는 고삼투압조절을 한 것으로 생각된다. 본 실험에서 해수를 15 psu로 염분을 낮추는 방법은 계산에 의해 일정량의 해수를 배출시키고 담수를 15분 동안 바로 추가하였다. 아마도 급격히 유입된 담수는 해수와 섞이기 전에 각 실험어에게 자극을 주었을 것이며, 어체는 충분히 섞이지 않은 담수와 접촉으로 인해 고삼투압조절로의 전환이 늦어진 것으로 생각된다. 광염성 어류에서 염분에 따라 U형태를 나타내는 Na^+/K^+ -ATPase 활성이 4시간 쯤 급격히 증가한 것으로부터 이와 같은 예상할 수 있게 한다. 이후에 각 지표들이 대조구 수준으로 회복한 것을 통해서, 수 시간 또는 수 일 이내에 삼투압조절기구의 전환이 일어남으로써 원래

대로의 수준으로 회복하는 것으로 추측된다. 해수에서 저염분으로 옮긴 sea bream, 장기간 담수에서 사육한 감성돔의 연구결과(Mancera et al., 1993; Min et al., 2005)를 통해 한달 이내에 이온 및 삼투질 농도가 원래의 수준으로 돌아온다는 결과가 이를 뒷받침 해주고 있다.

스트레스 지표로서 사용되어온 glucose, AST, ALT, total protein은 어체의 건강도 생리활성을 평가하는 데에도 이용된다(Wedemeyer and McLeay, 1981; Davis and Parker, 1990). 본 연구에서는 4시간째 AST가 증가하는 것을 제외하고 각 지표가 대조군보다 비슷하거나 낮은 수치를 보였다. 급격한 염분변화는 어체에 많은 스트레스를 제공함과 동시에 삼투압조절 능력을 감소시킨다. 반면, 어류의 체내의 삼투질 농도와 환경수의 삼투질 농도가 등장상태일 경우, 어류의 성장이 향상될 수 있다. 해수에서 서식하는 광염성 어류의 경우, 10-20 psu에서 성장이 빨랐다(Bœf and Payan, 2001).

본 연구의 예비실험에서 7 psu 이하에서는 폐사하는 것으로 나타났으나 그 이상의 저염분 환경에서 적응할 수 있는 삼투압조절능력을 갖는 것으로 보인다. 그러므로 염분별 생리학적 조사를 통해 *A. melanopus*의 등장환경에 대한 추가 연구가 필요하다.

VIII. 종합고찰

28종의 clownfish는 형태적 특징에 따라 6개의 complex로 구분된다: Percula complex (2종), Tomato complex (5종), Skunk complex (6종), Clarkii complex (11종), Saddleback complex (3종), Maroon complex (1종). Clownfish류의 번식학적 특징은 어중에 관계없이 비슷한 경향을 나타낸다. 일반적으로 clownfish류를 포함한 열대성 어류는 연중산란을 한다. 수온이 연중 일정한 열대지역이나 수조환경에서 연중산란을 한다는 것은 환경조건이 안정적이라는 것을 의미한다. 자연에서 서식하는 *A. melanopus*은 19.8회/연, 1.6회/월 산란을 하였으며, 본 연구의 수조환경에서 사육된 *A. melanopus*은 18.5회/연, 1.7회/월로 비슷했다. 열대지역에 서식하는 clownfish류의 산란주기는 월령과 밀접한 관련이 있다. *A. melanopus*의 산란은 달의 모양이 상현과 하현일 때 일어나거나 보름달이 뜨는 6일 전이나 그 후를 기점으로 일어난다. 이와 같은 산란시기에 의해 알이 부화하는 시점과 산호초 주변에 높은 조류가 발생하는 시점을 같게 됨으로써, 초승달과 보름달이 뜰 때 사리로 인한 강한 조류가 부화한 자어를 고루 퍼져나가도록 하는 것으로 예상되고 있다. 수조환경에서도 월령 조건을 제거하더라도 정상적인 산란이 이루어진다. 그러나 어미에 따라 산란일이 모두 다르게 나타났다. 이와 같은 경향은 외부 환경자극보다 물고기 자신에 내재하는 연주기 리듬에 의해서 영향을 받았을 것으로 생각된다. 자연산 *A. melanopus*는 200~400개/회 알을 산란했으며(Ross, 1978), 인공산의 경우, 172~339개/회였다(Hoff, 1996). 반면에, 본 연구에서는 800~1180개/회였다. 이러한 차이는 어미의 크기에 따른 것으로 추측된다. 그러므로 큰 어미를 확보하고 월평균 2회 산란을 한다고 가정하면, 연간 약 2만 마리를 생산할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 월 최대 4회 산란을 하였다.

수컷의 egg-fanning 행동은 수정란에 신성한 물을 공급하고, 주변의 이물질
을 제거하는 것으로 판단된다. 특히, 부화 당일 그 횟수는 급격하게 증가한다.
Egg-fanning 행동의 특징은 지느러미를 이용하여 수류를 일으키는 것으로써,
본 연구에서 고안된 회전 수류형 장치가 부화당일 수컷의 행동을 대신 해 줄
수 있을 것으로 예상된다. 특히, 부화판의 개수를 늘릴 수가 있으므로 대량부
화를 시도해볼 수 있을 것이다. 그리고 부화 당일에만 이 장치를 이용하는 것
이 아니라 수정 후 회전 수류형 장치로 부화판을 바로 옮김으로써, 수컷의 알
관리행동을 완전 대체할 수 있는 지에 대한 연구도 필요하다. 현장에서 일부
어미들의 경우, 7일간의 알 관리기간 동안 알을 먹거나 제거하는 행동을 보이
기도 한다. 이러한 행동은 어미의 영양적 문제, 스트레스 그리고 습관적 행동
으로 추측되며, 결국, 생산성을 감소시키게 된다. 장시간 동안 수정란에 미치
는 요인으로 수류의 주기, 물교환 및 미생물 제거 등이 존재하기 때문에 이와
관련된 추가연구가 필요하다고 생각한다.

관상어는 성장보다는 체색과 같은 미적인 측면에 의해 그 가치가 결정된다.
그러나 현재 인공적으로 번식되는 해수 관상어의 초기 성장을 위해 식용 어류
양식에서 이용하는 rotifer와 Artemia와 같은 먹이생물을 공급하고 있다. 그러나
관상어는 식용어와 달리 작은 크기에도 상품으로 판매될 수 있기 때문에 초기
에 체색발현에 대한 먹이개발이 시급하다. 본 연구에서 이용된 *T. japonicus*를
공급한 실험구는 육안관찰이나 CMYK분석에서 월등하게 진한 체색을 보였다.
이러한 요각류는 단백질, 고도 불포화 지방산 등을 함유하고 있어서 자치어의
건강도에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

일반적으로 갑상선호르몬은 어류의 변태와 성장에 직접 관여하는 것으로 알
려졌지만, 본 연구를 통해 체색 발달에도 관여를 할 것으로 예상된다. *A.*
*ocellaris*를 대상으로 갑상선호르몬 처리에 따른 실험에서 흰 줄무늬가 완전히

제거되었다. 현재 미국과 유럽의 일부 업체에서는 온 몸에 흰 줄무늬 퍼져나가 있는 형태의 *A. ocellaris*를 시중에 고가의 가격에 판매하고 있다. 그 방법은 공개하고 있지 않지만, 유전적, 영양적 또는 호르몬 처리를 통한 내분비적 방법 등이 이용되었을 것으로 예상된다. 그러나 이와 관련된 국내 연구는 매우 미흡한 실정이므로 앞으로 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서는 CMYK 수치를 통한 체색분석법을 최초로 시도하였다. 색차계는 어체의 절대적인 수치를 확인할 수 있지만, 그 부피가 커서 자치어와 같은 작은 어류의 특정 부위를 측정하기 어렵고, 측정을 위해서 센서를 몸체에 밀착시켜야 하기 때문에 측정과정에서 어체에 스트레스를 유발시킬 수 있다. 그러므로 동일한 환경조건에서만 촬영을 한다면, 고가의 색차계를 이용한 방법보다도 유용하게 어체의 체색을 비교분석할 수 있을 것으로 사료된다.

어류에 있어 염분은 대사활동, 삼투압조절 및 생체리듬 등에 영향을 주기 때문에 연어과 같은 회유성 어류 및 기수지역에 서식하는 광염성 어류의 생활사에 있어서 매우 중요한 요인으로 작용한다. 따라서 염분에 대한 어류의 내성 및 적응기구 등을 구명하기 위하여 광염성 어류를 대상으로 이들의 삼투압조절에 대한 많은 연구들이 수행되고 있다. 최근에는 일부 해수어를 염분이 30 psu이상의 일반 해수보다 10~15 psu의 낮은 염분에서 사육할 때, 그 성장이 빠르다는 연구결과들이 croaker *Micropogonias furnieri*, sea bream *S. aurata*, tilapia *O. aureus*, turbot *Scophthalmus maximus* 등에서 보고되고 있다(Aristizabla, 1992; Suresh and Lin, 1992; Woo and Kelly, 1995; Gaumet et al., 1995). Clownfish 류의 염분과 관련된 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구결과 *A. melanopus*는 15 psu에서도 생존하였다. 그리고 담수적응호르몬을 잘 알려져 있는 prolactin 유전자의 구조를 밝혔고, 15 psu 적응 후 24시간 췌 발현정도가 높아진 것을 확인하였다. 뱀장어 등과 같이 prolactin 없이도 담수에 적응할 수 있는 종도 있지

만, 지금까지 연구된 모든 광염성 어류를 높은 삼투압 환경에서 낮은 삼투압 환경으로 옮기면 혈액 중의 prolactin 농도가 상승하고, 역방향으로 옮기면 저하한다. *A. melanopus*의 삼투압조절 능력을 확인하기 위해서는 생존가능 염분범위를 조사하고 그에 따른 생리학적 반응에 대한 연구가 필요하다. 그리고 기수사육을 통한 성장향상을 이루기 위해서 등장염분에 대한 추가 연구도 필요하다.

Prolactin은 염류세포의 수, 형태, 분포에 직접적인 영향을 주는 것으로 보인다. *O. mossambicus*와 *S. aurata* 아가미의 염류세포에서 prolactin receptor가 확인되었다. 본 연구에서도 아가미의 전자현미경적 관찰 결과, 15 psu의 아가미와 해수의 아가미는 형태적 차이가 있었다. 아가미 Na^+/K^+ -ATPase에 대한 prolactin의 영향은 불분명하다. Prolactin이 Na^+/K^+ -ATPase 활성을 감소시키는지 (Sakamoto et al., 1997; Shepherd et al., 1997; Kelly et al., 1999), 증가시키는지 (Boeuf et al., 1994; Leena and Oommen, 2000), 또는 어떠한 영향도 미치지 않는지 (Madsen et al., 1995; Eckert et al., 2001)에 대한 연구보고가 있다. 본 연구에서는 prolactin은 24시간째에 높은 발현을 보였고, Na^+/K^+ -ATPase 활성은 24시간 이후부터 감소하는 경향을 나타내었다. 삼투질 농도의 경우도 마찬가지로 24시간부터 증가하다가 144시간째에는 대조구 수준으로 돌아왔다.

Prolactin외에 담수적응호르몬으로 arginine vasotocin과 isotocin이 있다. 두 호르몬 모두 어종, 염분범위에 따라 다르게 나타나기 때문에 삼투압 조절에 관여에 대해서는 아직 불확실하다. 이것은 각 호르몬의 수용체가 삼투압 조절기관에 존재하는 지를 추가 조사함으로써 두 호르몬의 삼투압 조절 관여에 대하여 밝힐 수 있을 것이다.

요 약

1. 산란주기와 번식행동

Amphiprion melanopus 어미 네 쌍(A, B, C 및 D)을 수온, 염분 및 광주기가 일정하게 유지되는 환경에서 1,675일 동안 사육하였다. 사육일 동안 총 산란횟수는 최소 38회에서 최대 127회, 연간 산란횟수는 최소 12.6회에서 25.4회였으며, 월간 산란횟수는 1.4회에서 2.3회였다. 월간 최대·최소 산란횟수는 각각 4회, 0회였다. 4쌍 모두 특정 휴지기를 제외하고 연중산란을 하였다. A와 B는 각각 6개월, 5개월의 휴지기가 있었던 반면, C와 D는 각각 6개월, 8개월의 휴지기가 있었으며 간헐적으로 나타났다. 월령이 차단되고 수온, 염분, 및 광주기가 일정한 환경에서 *A. melanopus*의 산란은 개체의 연주기들을 따르는 것으로 보인다.

*A. melanopus*의 산란행동은 4단계로 구분된다. 1) 부화판과 주위 청소, 2) 암컷의 산란관으로 부터의 점액질 점착, 3) 산란 및 수정, 4) 수컷에 의한 수정란 관리. Clownfish류는 산란전에 항문에서 산란관이 돌출된다. 본 실험에서는 산란 전에 암컷이 자신의 산란관에서 점액질을 부화판에 점착시키는 모습이 10~15분 동안 관찰되었다. 암수의 산란 및 수정은 50~60분이 소요되었다. 수컷은 egg-fanning을 하여 수정란 관리하였으며, 부화일이 가까워질수록 그 횟수가 증가하는 경향을 보였다.

2. 난발생, 자치어발달

수정란은 타원형의 침성부착란으로 불투명한 색이었으며, 장경 2.37 ± 0.09 mm, 단경 0.94 ± 0.91 mm였다. 난황에는 다양한 크기의 많은 유구가 보였다. 상실기는 수정 후 9시간째에 일어났으며, 19.3시간에는 배반엽이 난황의 절반

을 덮었다. 46시간이 지나고 나서 머리에서 안포와 이포가 형성되었고 수정 후 57.0시간째에는 꼬리가 난황과 분리되었고, 근절은 24~25개가 되었다. 70.0시간이 경과하고 나서 심장형성과 함께 심장박동이 관찰되었으며 분당 심장박동수는 160.0회였다. 부화까지 180시간 소요되었고 부화율은 89.5%였다. 소등 후 1.5시간에서 2시간 사이에 부화하였다.

갯 부화한 자어(3.5 ± 0.3 mm)는 대부분 난황을 흡수한 상태였고 몸은 투명했다. 부화 후 5일째 자어는 체색이 검게 변해있었고, 9일째 머리 윗부분과 등지느러미부근에서 흰색 줄무늬가 나타나기 시작했다. 부화 후 15~20일째 자어의 체색은 검게 변했으며, 머리와 몸 중간 부위의 흰 줄무늬도 선명했다. 25일째가 지나면서 꼬리지느러미에도 흰 줄무늬가 나타나기 시작했고, 부화 후 30일째 자어의 입 주변과 각 지느러미는 주황색으로 선명했으며, 등지느러미와 꼬리지느러미의 흰 줄무늬는 사라지기 시작했다. 부화 후 60일째 자어의 몸 전체의 색깔은 진한 고동색에서 적갈색으로 변해 있었다. 90일째 자어의 3개 흰 줄무늬 중 머리 줄무늬만이 남아 있었다.

갯 부화한 자어를 20일 동안 세 가지 형태의 먹이를 공급하고 생존율을 조사한 결과, rotifer, *Artemia* nauplii 그리고 영양강화 *Artemia*를 공급한 실험구의 생존율이 78.3%로 가장 높았다. 그러나 rotifer만 공급한 실험구는 실험 종료 전에 전량 폐사하였는데, 부화 후 9~10일 사이에 가장 많은 폐사개체가 발생하였다. 이 시기는 9일째 흰 줄무늬가 발생하는 시점과 같다는 점에서 보면, 체색발달과 함께 변태과정에 필요한 충분한 에너지원이 공급되어야 한다는 것을 시사한다.

3. 인공 부화장치 개발

Clownfish 수정란의 효율적인 부화를 위하여 에어레이션형, 스프레이형, 회

전 수류형 부화장치를 이용하여 *A. melanopus*, *A. ocellaris*, *A. polymnus* 그리고 *Premnas biaculeatus*의 부화율을 조사하였다. 그 결과, 4어종 모두 회전 수류형에서의 부화율이 85%이상으로 가장 높았다. 에어레이션형과 스프레이형은 각각 60.5%, 74.4%였다. 부화율이 가장 높았던 회전 수류형을 대상으로 부화판의 개수를 2, 3, 5개를 각 부화장치에 넣어 부화율을 조사한 결과, 각각 87.3%, 81.8%, 82.0%로 2개의 부화판을 넣었을 경우, 비교적 높은 부화율을 나타내었다. 그러나 부화판을 2개 이상 넣더라도 부화율이 80%이상이었으므로 실제 생산량으로 보았을 때 5개의 부화판이 더 많은 양의 수정란을 부화시킬 수 있을 것으로 예상된다.

4. 체색변태에 미치는 먹이종류와 갑상선호르몬(T_3)의 영향

먹이생물에 따른 실험은 부화 후 10일째 자어를 대상으로 EA(only enriched *Artemia*)구, ATenriched *Artemia* + *Tigriopus japonicus*, TJ(only *T. japonicus*)으로 구분하여 7일간 실시하였다. 갑상선호르몬 실험의 경우, 부화 후 7일째 자어를 0, 2, 4 및 6 ppm의 농도로 1시간 동안 침지하여 10일간 사육하였다. 그리고 체색 농도에 대한 분석은 photoshop (Adobe, USA)의 CMYK 분석법을 이용하였다. 체색분석 부위는 입 주변, 머리의 흰 줄무늬, 몸 중앙, 등지느러미 그리고 꼬리지느러미였다.

먹이생물에 따른 성장결과에서 AT구는 11.3 ± 0.7 mm으로 가장 빠른 성장을 보였지만, 10.9 ± 0.8 mm인 TJ구와 유의한 차이가 없었다. EA구는 10.2 ± 0.8 mm였다. CMYK분석 결과, TJ구의 입 주변과 등지느러미는 각각 $81.8 \pm 3.5\%$, $75.8 \pm 6.7\%$ 로 가장 높은 magenta 수치를 보였다. 등지느러미에서도 TJ구가 $94.8 \pm 4.3\%$ 로 가장 높은 yellow 수치를 나타냈다. 갑상선호르몬 처리에 따른 성장은 4 ppm구가 11.4 ± 0.4 mm로 가장 빠른 성장을 보였던 반면 6 ppm구는

10.2±0.5 mm로 가장 느린 성장을 보였다. 등지느러미의 CMYK 분석 결과, 2 ppm구와 4 ppm구의 yellow 수치는 각각 92.8±3.5%, 93.8±4.0%였고, magenta 수치는 67.4±5.3%, 56.0±8.4%로 대조구보다 높은 경향을 보였다. 꼬리지느러미의 경우, 4 ppm구에서 magenta와 yellow 수치가 각각 73.6±3.6%, 99.8±0.2%로 다른 실험구에 비해 가장 높았지만 2 ppm구와 유의차가 없었다. 본 실험을 통해 먹이생물인 *T. japonicus*와 호르몬인 T₃를 이용하여 성장과 체색 향상을 확인할 수 있었다. 그리고 자치어와 같은 작은 개체의 체색 분석을 위해 photoshop의 CMYK 분석방법은 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

5. Prolactin, arginine vasotocin 및 isotocin 유전자 클로닝 및 저염분 환경에 의한 유전자 발현

*A. melanopus*의 pro-PRL, prepro-AVT, prepro-IT cDNA의 구조를 밝혔다. PRL 전구체는 212개의 아미노산으로 이루어져 있었고 그 중 24개의 아미노산은 신호 펩타이드, 188개의 아미노산은 mature 단백질로 되어 있었다. AVT full cDNA는 총 153개의 아미노산으로 이루어져 있었으며, 신호펩타이드는 19개, mature AVT는 9개, Neurophysin은 125개의 아미노산으로 이루어져 있었다. IT는 총 156개의 아미노산으로 이루어져 있었고, 19개의 신호펩타이드, 9개의 IT, 128개의 Neurophysin으로 이루어져 있었다. *A. melanopus*를 15 psu로 염분을 감소시킨 후, 0, 4, 8, 24, 48h 그리고 144h에 뇌와 뇌하수체를 분리하여 세 유전자의 발현을 조사한 결과, PRL은 24h구에서 가장 높은 발현을 보였다. 48h과 144구는 다소 감소하는 경향을 보였다. AVT와 IT 모두 48h구와 144h구에서 대조구에 비해 발현도가 증가하는 경향을 보였다.

6. 저염분 사육에 따른 생리·생화학적 조사

*A. melanopus*를 15 psu로 염분을 감소시킨 후 아가미를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 해수의 아가미 표면은 매우 고르지 않았지만, 15 psu의 아가미 표면은 평평한 형태였다. 특히, 투과 전자현미경을 통한 관찰의 경우, 해수 아가미에는 염류세포의 바깥 표면에 apical crypt가 관찰된 반면, 15 psu 아가미의 염류세포에는 apical crypt가 관찰되지 않았다. 또한, 아가미의 표면이 pavement cell에 의해 외부환경과 차단되어 있는 형태였다. 시간별 혈장 Na^+ , K^+ , Cl^- 및 osmolality은 4, 8, 24시간째에 대조구에 비해 낮은 경향을 보였지만 144시간째에는 세 실험군보다 높았다. 스트레스 지표인 glucose, AST, ALT의 경우, 4시간 째 AST를 제외하고 대조군 보다 낮았지만 144시간째는 다시 증가하는 경향을 보였다. 아가미의 Na^+/K^+ -ATPase 활성은 15 psu로 전환된 후 4h, 8h, 24h구에서 활성이 증가되었다. 특히, 4h와 24h구에서 SW구와 유의차가 있었다. 그러나 48h와 144h구는 SW구의 수준과 비슷한 경향을 보였다. 그러므로 PRL의 발현, Na^+/K^+ -ATPase 활성의 변화, 아가미의 조직학적 변화 그리고 삼투질 농도의 유지를 통해 *A. melanopus*은 15 psu 환경에서도 생존할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 보인다. 그러나 AVT와 IT가 144h에도 증가하는 경향을 보였고, 다소 높은 수치의 AST, 그리고 삼투질 농도가 다소 낮은 경향을 보인 점은 15 psu 환경이 *A. melanopus*에게 등장환경이기 보다 저장환경에 가까울 수도 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

석사 1학년 때에 처음 연구실 문을 두드리 석사, 박사과정을 거치는 동안 5년이 넘는 시간이 흘렀습니다. 이 기간 동안 항상 논리적 사고와 학문적 소양을 가질 수 있도록 이끌어주시고, 이 논문이 완성될 수 있도록 지도해 주신 장영진 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 실험과 논문에 대해 지도해 주신 남윤권 교수님께 진심으로 감사드립니다. 특히 멀리 강릉에서 내려오셔서 심사를 맡아주시고 많은 조언을 아끼지 않으신 강릉대학교에 손영창 교수님과 국립수산물과학원의 강덕영 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

학부 및 대학원 과정동안 학문적 가르침과 인생의 바른 길을 찾을 수 있도록 가르쳐주신 조재운 교수님, 허성범 교수님, 배승철 교수님, 김창훈 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 비록 많은 이야기를 나눌 시간을 없었지만 관상어 이야기에 귀 기울여 주신 공승표 교수님께도 감사드립니다. 연구실 선배로서 언제나 따뜻한 격려와 위로를 아끼지 않으신 선문대학교 권준영 교수님과 국립수산물과학원의 임한규 박사님께 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전합니다. 또한 항상 먼발치에서 저를 지켜보면서 좋은 논문을 쓸 수 있도록 조언을 아끼지 않으신 국립수산물과학원의 김태익 박사님, 이정용 박사님, 김성희 사무관님께도 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 석사 때부터 선배로서 또는 친구로서 그리고 이제는 학자로서 같은 길을 걷게 될 국립수산물과학원의 정민환 박사님께도 감사의 말을 전합니다.

논문실험을 수행함에 있어 힘든 일, 껴는 일 마다하지 않고 실험을 도와준 변식생리학 연구실의 김영수, 정종균, 김기태, 박준형님께 감사를 드립니다. 그리고 실험을 위해 수많은 물고기를 해부하고 샘플링하는데 도와주고 실험진행

에 불편함이 없도록 신경써주신 분자생화학 연구실의 강경묘, 김초원, 최미진, 황인철님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁜 와중에도 실험분석과 조인을 아낌없이 해주신 LMO 연구소의 이상윤님, 한국해양대학교의 김나나님께도 감사드립니다. 또한, 대학원 과정동안 생활하는 데 불편없도록 신경써주신 최수희 선생님과 강경립 선생님께도 감사를 드립니다. 실험 중 힘들 때 종종 격려해 주었던 대학원 유일한 동갑내기인 사료영양 연구소의 배준형 박사님께 감사드립니다. 그리고 위트 있는 유머로 사람을 즐겁게 해는 최오성님과 지금은 일본에서 즐기세포 연구를 하고 있는 이승기님께도 감사의 마음을 전합니다.

5년이 넘는 긴 시간 동안 공부하는 데 공부에만 전념해 줄 수 있도록 아낌없이 지원해주신 아버님, 그리고 저의 정신적 지주이신 어머님께 감사의 마음을 전하며, 두 분의 건강을 진심으로 기원합니다. 그리고 서울에서 직장생활로 바쁜 와중에도 술 한잔 기울여주면서 격려의 말을 아끼지 않았던 큰형 노도철님과 작은형 노준형님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

제가 지금까지 공부하는 데 있어서 빼 놓을 수 없는 두 분이 계십니다. 분자생화학 연구실의 김종명 교수님과 국립수산물품질관리원의 민병화 박사님께 죄송하고 또 감사드립니다. 앞으로 가르쳐주신 것들을 토대로 기대에 어긋나지 않는 학자가 되도록 하겠습니다. 끝으로 본 연구를 위해 아낌없이 자신을 희생해준 cinnamon clownfish들에게 이 영광을 돌리겠습니다.

이 논문의 실험은 한국학술진흥재단의 2006년 문제해결형인력양성지원사업의 지원으로 실행되었습니다.

참고 문헌

- Alava, V.R., Gomes, L.A.O., 1989. Breeding marine aquarium animals: the anemonefish. Naga, ICLARM Quarterly 12, 12-13.
- Allen, G.R., 1975 Anemonefishes: their classification and biology. TFH. Neptune City.
- Amer, S., Brown, J.A., 1995. Glomerular actions of arginine vasotocin in the in situ perfused trout kidney, Am. J. Physiol. 269, 775 - 780.
- Aristizabal Abud, E.O., 1992. Effects of salinity and weight on routine metabolism in the juvenile croaker *Micropogonias furnieri*. J. Fish Biol. 40, 471-472.
- Avella., M.A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Mradonna, F., Carnevali, O., 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. Aquaculture. 273, 87-95.
- Balment, R.J., Warne, J.M., Tierney, M., Hazon, N., 1993. Arginine vasotocin and fish osmoregulation. Fish Physiol. Biochem. 11, 189-194.
- Bertschy, A., 1979. Essais de reproduction en aquarium d'*Amphiprion ocellaris* Cuv *Pomacentrides*. Rev. Fr. Aquariol. 6, 91-94.
- Bell, L.J., 1976. Notes on the nesting success and fecundity of anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima, Japan. Jap. J. Ichthyol. 22, 207-211.
- Bern, H.A., 1983. Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. Am. Zool. 23, 663-671.
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O., McCormick, S.D., 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 167, 77-85.

- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- Bøuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth. *Comp. Biochem. Physiology* 130C, 411–423.
- Boeuf, G., Marc, A.M., Prunet, P., Le Bail, P.Y., Smal, J., 1994. Stimulation of parr-smolt transformation by hormonal treatment in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture* 121, 195–208.
- Calado, R. 2006. Marine ornamental species from European waters: A valuable overlooked resource or a future threat for the conservation of marine ecosystems *Sci. Mar.* 70, 389–398.
- Jones, C, Chan, D.K.O., Rankin, J.C., 1969. Renal function in the European eel *Anguilla anguilla* effects of the caudal neurosecretory system, corpuscles of Stannius, neurohypophysial peptides and vasoactive substances, *J. Endocrinol.* 43, 21–31.
- Clarke, W.C., Bern, H.A., 1980. Comparative endocrinology of prolactin. In: “Hormonal Proteins and Peptides” Academic Press, New York. 8, p.105–197.
- Clement, S.E., Lichtenbert, J.H., Kohler, C.C., 2001. Stripping Clowns: Induced meristic changes in common clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Bulletin. de l’Institut océanographique, Monaco*, n°spécial 20, fascicule 1.
- Chester Jones, I., Chan, D.K.O., Rankin, J.C., 1969. Renal function in the European eel *Anguilla anguilla* effects of the caudal neurosecretory

- system, corpuscles of Stannius, neurohypophysial peptides and vasoactive substances. J. Endocrinol. 43, 21-31.
- Davis, K.B., Parker, N.C., 1990. Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91, 349-358.
- Doneen, B.A., Bewley, T.A., Li, C.H., 1979. Studies on prolactin. Selective reduction of the disulfide bonds of the ovine hormone. Biochemistry 18, 4851-4860.
- Duston, J., Bromage N., 1986. Photoperiodic mechanisms and rhythms of reproduction in the female rainbow trout. Fish Physiol. Biochem. 2, 35-51.
- Eckert, S.M., Yada, T., Shepherd, B.S., Stetson, M.H., Hirano, T., Grau, E.G., 2001. Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 122, 270-286.
- Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organism in the larval rearing of halibut larvae *Hippoglossus hippoglossus* with special emphasis on the nutritional value. Aquaculture 227, 191-210.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. Aquaculture 249, 231-243.
- Freeman, M.E., Kanyiscka, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. Physiol. Rev. 80, 1524-1585.
- Fuji, R., 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigment Cell Res. 13, 300-310.

- Gallis, J.L., Laserre, P., Belloc F., 1979. Freshwater adaptation in the euryhaline teleost *Chelon labrosus*. I. Effects of adaptation, prolactin, cortisol and actinomicyn D on plasma osmotic balance and Na^+/K^+ -ATPase in gill and kidney. Gen. Comp. Endocrinol. 38, 1-10.
- Gaumet, F., Boeuf, G., Le Roux, A., Mayer-Gostan, N., 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. J. Fish Biol. 47, 865-876.
- Gordon, A.K., Bok, A.W., 2001. Frequency and periodicity of spawning in the clownfish *Amphiprion akallopisos* under aquarium conditions. Aquarium Sciences and Conservation 3, 301-313.
- Henderson W., Wales N.A.M., 1974. Renal diuresis and antidiuresis after injections of arginine vasotocin in the fresh water eel *Anguilla anguilla*. J. Endocrinol. 61, 487 - 500.
- Hansen, B.L., Hansen, G.N., 1982. Immunocytochemical demonstration of somatotropin-like and prolactin-like activity in the brain of *Calamoichthys calabaricus* (*Actinopterygii*). Cell Tiss. Res. 222, 615-627.
- Hiraoka, S., Hyodo, S., Kubokawa, K., Ando, H., Urano, A., 1996. Effects of osmotic stimulation on expression of neurohypophysial hormone genes in pre-spawning chum salmon. Zool. Sci. 13, 737-745.
- Hyodo, S., Urano, A., 1991. Changes in expression of provasotocin and proisotocin genes during adaptation to hyper- and hypo-osmotic environments in rainbow trout. J. Comp. Physiol. B 161, 549-556.
- Hoff, F.H., 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. Aquaculture Consultants Inc. 1st Edit. p.119-131.

- Imaoka, T., Matsuda, M., Mori, T., 2000. Extrapituitary expression of the prolactin gene in the goldfish, African clawed frog and mouse. *Zool. Sci.* 17, 791-796.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na^+/K^+ -ATPase in the gills of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282, 290-300.
- Juhl, T. 1992. Commercial breeding of anemonefishes. *Seascope*. 9, p.1-4.
- Kahan, D. 1980. Mass cultivation of food organisms in hatcheries-problems and proposed solutions. Symposium on Coastal Aquaculture Cochin India.
- Kang, D.Y., Chang, Y.J. 1996. Effects of dietary 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) on growth and survival rate in juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Aquacult.* 9, 215-222.
- Karnaky, K.J. Jr., 1986. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. *Am. Zool.* 26, 209-224.
- Karnaky, K.J. Jr., Kinter L.B., Kinter W.B., Stirling CE., 1976. Teleost chloride cell. II. Autoradiographic localization of gill Na^+/K^+ -ATPase in killifish *Fundulus heteroclitus* adapted to low and high salinity environments. *J. Cell Biol.* 70, 157-177.
- Katoh, F., Kaneko, T. 2003. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established "time-differential double fluorescent staining"

- technique. J. Exp. Biol. 206, 4113–4123.
- Katoh, F., Hyodo, S., Kaneko, T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. J. Exp. Biol. 206, 793–803.
- Kelly, S.P., Chow, I.N.K., Woo, N.Y.S., 1999. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost *Sparus sarba*. Gen. Comp. Endocrinol. 113, 9–22.
- Kelsh, R.N., 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Res. 17, 326–336.
- Kim, J.S., Choi, Y.U., Rho, S., Yoon Y.S., Jung, M.M., Song, Y.B., Lee, C.H., Lee Y.D., 2007. Spawning behavior, egg and larvae developments of maroon clownfish *Premnas biaculeatus*. J. Aquacult. 20, 96–105.
- Kim, Y.O., Jo, J.Y., Oh, S.Y., 2008. Effects of dietary *Spirulina*, *Chlorella*, and astaxanthin on the body color of red- and white-colored carp, *Cyprinus carpio*. J. Kor. Fish Soc. 41,193–200.
- Kim, S.R., Hur, S.B., 2007. Spawning, hatching and larval growth of red and black clownfish *Amphiprion melanopus*. J. Aquacult. 20, 239–247.
- Laiz-Carrión, R., Guerreiro P.M., Fuentes, J., Canario, A.V.M., Río M.P.M.D., Mancera, J.M., 2005. Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream *Sparus auratus*. J. Exp. Biol., 303A, p. 563–576.
- Laurent, P., 1984. Gill internal morphology. In: Fish Physiology, edited by Hoar WS and Randall DJ. Orlando, FL: Academic, p.73–183.
- Laurent, P., Dunel, S., 1980. Morphology of gill epithelia in fish. Am. J.

- Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 238, 147-159.
- Leatherland, J.F., 1987. Thyroid hormones and reproduction. In: Norries DO Jones RE. editor, hormones and production in fishes, amphibian and reptile. New York Plenum Press p. 411-431.
- Lee, K.M., Kaneko, T., Aida, K., 2006. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. Gen. Comp. Endocrinol. 146, 318-328.
- Leena, S., Oommen, O.V., 2000. Hormonal control on enzymes of osmoregulation in a teleost *Anabas testudineus* (Bloch): An in vivo and in vitro study. Endocr. Res. 26, 169-287.
- Lim L.C., 2005. Emerging trends and challenges to the global ornamental aquatic industry, Meeting Abstract, World Aquaculture, p. 481.
- Madsen, S.S., Jensen, M.K., Nohr, J., Kristiansen, K., 1995. Expression of Na^+/K^+ -ATPase in the brown trout *Salmo trutta*: In vivo modulation by hormones and seawater. Am. J. Physiol. 269, 1339-1345.
- Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Bern, H.A., 1997. Prolactin antagonises seawater acclimation in the anadromous striped bass *Morone saxatilis*. In: "Advances in Comparative Endocrinology" (S. Kawashima and S. Kikuyama, Eds.), Vol. 2, pp.1011-1015.
- McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. In: Wood CM, Shuttleworth TJ, editors. Fish physiology. Vol. 14. San Diego, CA: Academic Press. p.285-315.
- Maetz, J., Bourguet, J., Lahlou, B., Hourdry, J., 1964. Peptides neurohypophysiales et osmoregulation chez *Carassius auratus*, Gen.

- Comp. Endocrinol. 4, 508 - 522.
- Mancera, J.M., Perez-Figares J.M., Fernandez-Llebrez P., 1993. Osmoregulatory responses to abrupt salinity changes in the euryhaline gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comp. Biochem. Physiol. A. 106, 245-250.
- Manzon, L.A., 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. Gen. Comp. Endocrinol. 55, 269-274.
- Martin, S.A.M., Youngson, A.F., Ferguson¹, A., 1999. Atlantic salmon *Salmo salar* prolactin cDNA sequence and its mRNA expression after transfer of fish between salinities. Fish Physiol. Biochem. 20, 351-359.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, A., Semmens, G., Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanoid copepods as live feeds in aquaculture. Aquaculture 223:89-106.
- Min, B.H., Kim, B.K., Hur, J.W., Bang, I.C., Byun, S.K., Choi, C.Y., Chang, Y.J. 2003. Physiological responses during freshwater acclimation of seawater-cultured black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. Korean J. Ichthyol. 15(4), 224-231.
- Min, B.H., Choi, C.Y., Chang, Y.J., 2005. Comparison of physiological conditions on black porgy *Acanthopagrus schlegeli* acclimated and reared in freshwater and seawater. J. Aquaculture 18, 37-44.
- Moyer, J.T., 1980. Influence of temperate waters on the behavior of the tropical anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima, Japan. Japanese J. Ichthyol. 23, 23-32.
- Nery, L.E.M., Castrucci, A.M.L., 1997. Pigment cell signalling for physiological color change. Comp. Biochem. Physiology 118A, 1135-1144.

- Ochi, H., 1985. Temporal patterns of breeding and larval settlement in a temperate population of the tropical anemonefish *Amphiprion clarkii*. Jap. J. Ichthyol. 32, 248-257.
- Olivier, K. 2001. The Ornamental Fish Market. GLOBEFISH Research programme, Rome FAO, 67, 1-99.
- Olivier, K, 2003. World trade in ornamental species. In: Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation (Cato, J.C., and C.L. Brown, Eds.). Ames, Iowa: Iowa State Press p.49-63.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, F., Carnevali, O., 2003. Coral reef fish breeding: the secrets of each species. Aquaculture 224, 69-78.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M., Carnevali, O., 2005. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. Aquaculture 250, 175-182.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L., Carnevali, O., 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. Aquaculture 255, 480-487.
- Olivotto, I., Capriottoi, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O., 2008. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. Aquaculture 274, 347-352.
- Pang, P.K.T., 1983, Evolution of control of epithelial transport in vertebrates, J. Exp. Biol. 106, 283-299.

- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- Perry, S.F., Goss, G.G., Laurent, P., 1992. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.* 70, 1775-1786.
- Pickford, G.E., Phillips, J.G., 1959. Prolactin, a factor in promoting survival of hypophysectomized killifish in fresh water. *science*, 130, 454-455.
- Prang, G., 2007. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of brazilian freshwater ornamentals to the UK market. *Uakari*, 3, 7-51.
- Rawls, J.F., Mellgren, E.M., Johnson, S.L., 2001. How the zebrafish gets its stripes. *Dev. Biol.* 240, 301-314.
- Rho, S., 2006. Studies on the development of aquacultural technical in marine ornamental fish culture: III. Contents and results of conduct in research and development. *MLTM* p.44-143.
- Richardson, D.L., Harrison, P.L., Harriott, V.J., 1997. Timing of spawning and fecundity of a tropical and subtropical anemonefish (Pomacentridae: *Amphiprion*) on a high latitude reef on the east coast of Australia. *Mar. Ecol. Pro. Ser.* 156, 175-181.
- Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., 2003. Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and prolactin in the Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136(4), 647-655.
- Ross, R.M., 1978. Reproductive behavior of the anemonefish *Amphiprion*

- melanopus* on Guam Copeia. 103–107.
- Rubec, P.J., Cruz, F., Pratt, V., Oellers, R., McCullough, B., Lallo, F., 2001. Cyanide-free net-caught fish for the marine aquarium trade. *Aquarium. Sci. Conserv.* 3, 37–51.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman, N.H.III., Bern, H.A., Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 95–101.
- Santos, C.R.A., Brinca, L., Ingleton, P.M., Power, D.M., 1999. Cloning, expression, and tissue localization of prolactin in adult sea bream *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 57–66.
- Schreiber, A., Specker, J., 1999. Early larval development metamorphosis in the summer flounder: Change in percent whole-body water content and effects of altered thyroid status. *J. Fish Biol.* 55, 148–157.
- Seale, A.P., Riley L.G., Leedom T.A., Kajimura S., Doros R.M., Hirano T., Grau E.G., 2002. Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapi pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 91–101.
- Shepherd, B.S., Sakamoto, T., Nishioka, R.S., Richman, N.H.III., Mori, I., Madsen, S.S., Chen, T.T., Hirano, T., Bern, H.A., Grau, E.G., 1997. Somatotropic actions of the homologous growth hormone and prolactins in the euryhaline teleost, the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, p.2068–2072.
- Stottrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in

- marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231-248.
- Suresh, A.V., Lin, C.K., 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture* 106, 201-226.
- Suzuki, K., Takamatsu, S., 1989. Saltwater fishes reproduction. Midori Shobo, Tokyo, p.32-71.
- Tanaka, Y., Katayama, T., Simpson, K.L., Chicheester, C.O., 1976. The biosynthesis of astaxanthin-XIX. The distribution of α -doradexanthin and the metabolism of carotenoids in goldfish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 4, 885.
- Towle, D.W., Gilman, M.E., Hempel, J.D., 1977. Rapid modulation of gill Na^+/K^+ -ATPase activity during acclimation of the killfish *Fundulus heteroclitus* to salinity change. *J. Exp. Zool.* 202, 179-186.
- Villaplana, M., Garcia Ayala, A., chaves Pozo, E., and Aulleiro, B., 2000. Identification of mammosomatotropes, growth hormone cells and prolactin cells in the pituitary gland of the gilthead sea bream *Sparus aurata* L., Teleostei using light immunocytochemical methods: an ontogenetic study. *Anat. Embryol*, 202, 421-429.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T., 2003. From Ocean to Aquarium. UNEP-WCMC, United Kingdom, p.34-36.
- Warne, J.M., Bond, H., Weybourne, E., Sahajpal, V., Lu, W., Balment, R.J., 2005. Altered plasma and pituitary arginine vasotocin and hypothalamic provasotocin expression in flounder *Platichthys flesus* following hypertonic challenge and distribution of vasotocin receptors within the kidney. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 240-247.

- Wedemeyer, G.A., McLeay, D.J., 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (ed), Academic Press, London, p.247-275.
- Wilkerson, J.D., 1998. Clownfishes: A guide their captive care, breeding & natural history. T.F.H. Publications Inc p. 21-54.
- Wilson, J.M., Laurent, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. J. Exp. Zool. 293, 192-213.
- Wittenrich, M.L., 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. TFH Publications p.88-151.
- Wittington, R.J., Chong, R., 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. Prev. Vet. Med. 81, 92-116.
- Woo, N.Y.S., Kelly, S.P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. Aquaculture. 135, 229-238.
- Wood, E., 2001. Global advances in conservation and management of marine ornamental resources. Aquarium Sci. Conserv. 3, 65-77.
- Wright, G.M., 1986. Immunocytochemical demonstration of growth hormone, prolactin and somatostatin-like immunoreactivities in the brain of larval, young adult and upstream migrant adult sea lamprey *Petromyzon marinus*. Cell Tissue Res. 246, 23-31.
- Yamano, K., 2005. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. JAQ 39(3), 161-168.
- Yoon, Y.S., Rho, S., Choi, Y.U., Kim, J.S., Lee, Y.D., 2005. Saddleback

- clownfish *Amphiprion polymnus* 1) Spawning, egg development and larvae culture. J. Aquacult. 18, 107-114.
- Yu, J.M., Lee, S.M., 1995. Marine fishes around Cheju island. Jeju-do Office of Edti Jeju p. 248.
- Zadunaisky, J.A., Cardona, S., Au, L., Roberts, D.M., Fisher, E., Lowenstein, B., Cragoe, E.J. Jr., Spring, K.R., 1995. Chloride transport activation by plasma osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. J. Membr. Biol. 143, 207-217.
- Ziemann, D.A., 2001. The potential for the restoration of marine ornamental fish populations through hatchery releases. Aquarium Sci. Conserv. 3, 107-117.
- 노섬, 노경언, 주해성, 신상옥, 오주택, 2009. 수산중소벤처기업 기술개발지원사업 최종 보고서 - 해수 관상어 품종다양화와 산업화연구. 한국해양수산기술진흥원 p. 1-51.