

인위적으로 성숙시킨 뱀장어 *Anguilla japonica* 성숙란의 생화학적 과숙 특징

권오남*, 아다찌 신지
북해도대학 대학원수산과학연구원

Biochemical Overripeness Characterization of Artificially Matured Japanese Eel *Anguilla japonica* Egg

O-Nam Kwon* and Shinji Adachi

Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Japan, 041-8611

This study clarified biochemical overripeness characterization of ovulated eggs of *Anguilla japonica* and suggested a method maintained overripeness after ovulation for high hatching rates. In matured Japanese eel eggs, the relationships between fertilization rate and hatching rate, and fertilization and survival rates were measured. DNA contents showed the significantly low 0.653 pg/ug protein in 20% downward hatching rate trial with decrease of hatching rate ($P < 0.05$), whereas RNA/DNA ratio showed the significantly high 1.058 in 20% downward hatching rate trial ($P < 0.05$). And activities of total alkaline protease and ACPase according to the hatching rate groups did not show the significant difference ($P > 0.05$). The protein contents were assayed the significantly high 186.16 ug/mg protein in 20% downward hatching rate trial ($P < 0.05$). However, the overripened eggs had lowed hatching rate, because of stimulate the overripening of normal matured eggs due to the continuous supplement of protein (vitellogenin). We suggested that need to reduce supplement speed or interception of vitellogenin produced in live for prevent overripeness of matured eggs after ovulation

Key words: *Anguilla japonica*, Japanese eel, Matured eggs, Overripened eggs, Hatching rate

서 론

일반적인 어류 미수정란의 발달은 난황형성기, 핵이동기 및 핵막붕괴 단계를 거쳐 수정 가능한 난이 된다. 그렇지만 뱀장어 *Anguilla japonica*는 사육환경에서 초기 난황형성 단계 이상으로의 발달이 이루어지지 않는 것으로 알려져 있으나, 호르몬 처리에 의해 난의 성숙과 인위적인 배란이 가능함이 밝혀진 바 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1974). 이 연구 이후 뱀장어는 사육환경에서 암컷으로의 성전환 유도(Tachiki et al., 1997; Tanaka et al., 2000), 난 성숙단계에서의 갑상선 호르몬 변화(Lokman et al., 2001, 2002; Matsubara et al., 2003, 2005), 연어 뇌하수체추출물 주사에 의한 난의 성숙과 배란유도(Yamauchi and Yamamoto, 1982; Pedersen, 2004) 등이 연구되어 있다. 이러한 결과를 바탕으로 Tanaka et al. (2003)은 인위 배란을 통해 얻어진 뱀장어의 수정란에서 *leptocephalus*의 생산에 성공했다. 그렇지만 초기 부화 자어의 낮은 생존율은 지금까지도 해결하지 못하고 있다. 자어의 낮은 생존율의 원인으로 여러 가지를 생각

할 수 있지만, 번식학적 측면, 친어사육에서 영양적인 측면 그리고 난 발달 단계에서 세포질의 변화를 들 수 있다. 번식학적 측면에서는 난의 부화율과 직접적으로 관련이 되어 있는 미수정란 내 각종 갑상선호르몬의 변화를 확인하였다(Shin et al., 2001). 그리고 영양적인 측면에서는 아직 연구결과가 부족하기는 하지만, Furuita et al. (2006, 2007)의 연구를 통해서 n-3, n-6 계 고도불포화지방산의 함량이 난질 및 부화율과 관련이 있음이 밝혀졌다.

그리고 수정 여부를 판단할 수 있는 난의 부상 여부에 따른 생화학적 차이는 난 내 유리아미노산과 수분이 증가하는 특징이 있는 것으로 보고되었다(Seoka et al., 2003). 난의 최종 성숙 단계에서 정상란은 단백질분해효소의 활동으로 유리아미노산 함량이 증가하고, 수정 후 난막에 있는 표층포의 붕괴로 인해 수정막 내부의 수분이 증가된다. 따라서 이들의 연구는 정상란과 미숙란을 구분 짓는 기준으로 활용하기에 유용하다. 그렇지만 인위적으로 성숙시킨 뱀장어 난의 큰 문제 중 하나는 난소로부터 배란된 성숙란의 체강 내 과숙이지만, 이들은 과숙에 따른 난의 변화에 대해서는 언급하기 힘든 결과를 가지고 있다.

*Corresponding author: onamkwon@yahoo.com

본 연구에서는 인위적으로 성숙시킨 뱀장어로부터 얻은 배란란 중 미숙란을 배제한 정상란과 과숙란을 이용하여, 부화율 저하에 따른 생화학적 변화를 핵산, 단백질과 인산 분해효소 활성 및 단백질 함량의 변화를 이용하여 비교하였다.

재료 및 방법

부화율에 따른 생화학적 특성을 핵산, 단백질과 인산 분해효소 활성 및 단백질 함량을 비교하기 위한 뱀장어 정상란과 과숙란은 북해도대학 수산학부에서 2006년 12월부터 2007년 3월 사이에 배란된 알 중 정상란과 과숙란으로 판단되는 17 마리에서 얻은 미수정란을 이용하였다.

각각의 배란란은 난 2g 당 1mL의 보존 정자를 이용하여 수정시켰으며, 96 well culture plate 2개에 각각의 한 마리에서 나온 수정시킨 알 192개를 각 칸당 한 개씩 수용하여 23°C 배양기에 보관하였다. 그리고 수정률, 부화율, 3, 10일 후 생존율은 Seoka et al. (2003)의 방법에 따라 계산하였다. -80°C에 보관된 배란란의 일부를 무게측정과 함께 균질화하여 핵산 분석용 시료를 얻었다. 남은 균질액은 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 total alkaline protease (TAP), ACPase 활성 및 단백질 함량을 위한 상등액을 얻었다. 핵산분석은 RNA와 DNA로 나누어 Fukuda et al. (1986)와 Peragóna et al. (2001)의 방법에 의해 분석되었으며, TAP, ACPase 활성과 단백질 함량은 각각 Kunitz (1947), Bessey et al. (1946) 및 Bradford (1976)의 방법에 따라 분석되었다. 각각의 난에 대한 분석은 3~4회 반복하여 분석하였다. 각각의 경향을 보기 위해서 각 배란란의 부화율을 기준으로 60%이상, 60%미만에서 20%초과 및 20% 이하로 나누어 평균으로 비교하였다.

수정률에 대한 부화율, 3일과 10일 간의 생존율과의 관계는 직선회귀방정식으로 유의성($P < 0.05$)을 검정하였으며, 부화율에 따른 핵산과 가수분해효소 및 단백질 량은 one-way ANOVA test를 실시하고, Duncan (1955)의 다중검정으로 처리, 평균 간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계처리는 유의확률 95% 범위에서 SPSS 프로그램(Ver. 14.0)을 이용하여 분석하였다.

결 과

부화율에 따른 생화학적 특성을 조사하기 위해 사용된 뱀장어 성숙란의 수정률과의 관계는 $Y = 0.7954X + 32.448$ ($R^2 = 0.8176$, $P = 6.35E-7$)로 나타났다(Fig. 1). 그리고 부화 후 3일의 생존율과 수정률과의 관계는 $Y = 1.0241X - 26.401$ ($R^2 = 0.8121$, $P = 5.95E-27$)로, 그리고 10일 후의 생존율과 수정률과의 관계는 $Y = 0.9314X - 24.814$ ($R^2 = 0.7619$, $P = 7.33E-14$)로 나타났다.

부화율에 따른 RNA 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았으며($P > 0.05$), DNA 함량은 부화율의 감소와 함께 감소하여 20% 이하의 부화율에서 유의적으로 가장 낮은 0.653 pg/ug protein을 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2). 그리고 이들의 비는 부화율이 20% 이하의 난에서 1.058로 유의적으로 가장 높은 비를 보였다($P < 0.05$).

부화율에 따른 TAP, ACPase 및 단백질 함량은 TAP 활성은 20% 이하의 미수정란에서 가장 낮은 3.035 U/ug protein의 활성을 보였지만 모든 부화율 범위에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$)(Fig. 3). 그리고 ACPase 또한 부화율에 따른 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$). 단백질 함량에 있어서는 60% 이상의 부화율에서 유의적으로 가장 낮은 146.84 ug/mg eggs의 함량을 보였으며, 20% 이하의 부화율을 보인 난 들에서 유의적으로 가장 높은 186.16 ug/mg eggs의 함량을 보였다($P < 0.05$).

고 찰

어류 난의 발달은 난황형성기, 핵이동기 및 핵막붕괴기를 거쳐 수정 가능한 성숙난이 된다. 하지만 뱀장어는 초기 난황형성기 이후 인위적인 사육환경에서 난의 성숙이 이루어지지 않는데, 이것은 뱀장어 *Anguilla japonica*의 성숙된 알을 안정적으로 확보하는데 하나의 문제점으로 되어 있다. Yamamoto and Yamauchi (1974)에 의해 사육환경에서 뱀장어 성체에 호르몬 주입을 통해 난의 발달과 성숙유도가 가능한 것이 밝혀졌고, 이후 번식학적 측면에서 뱀장어의 성숙난 확보를 위한 다양한 연구가 이루어져 왔다. 특히 Lokman et al. (2001, 2002), Matsubara et al. (2003, 2005) 등의 연구에 의해 난 발달 동안

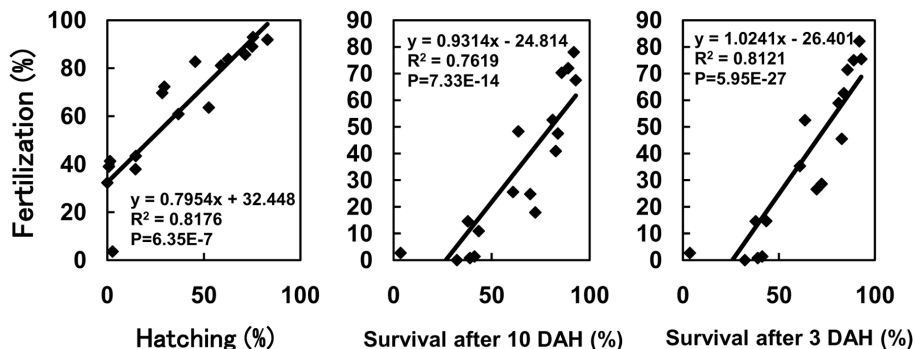


Fig. 1. Relationship between fertilization rate and hatching rate, and fertilization and survival rate after 3, 10 DAH of unfertilized eggs of Japanese eel *Anguilla japonica*.

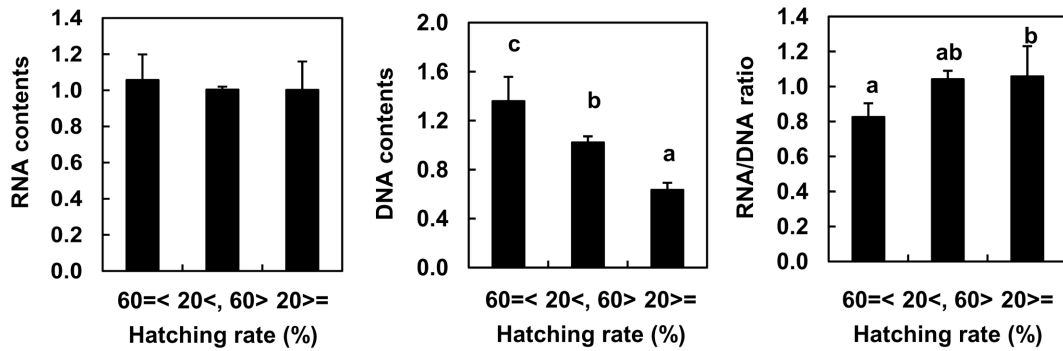


Fig. 2. Nucleic acids contents (pg/ug protein) of unfertilized eggs of Japanese eel *Anguilla japonica* on the different hatching rates.

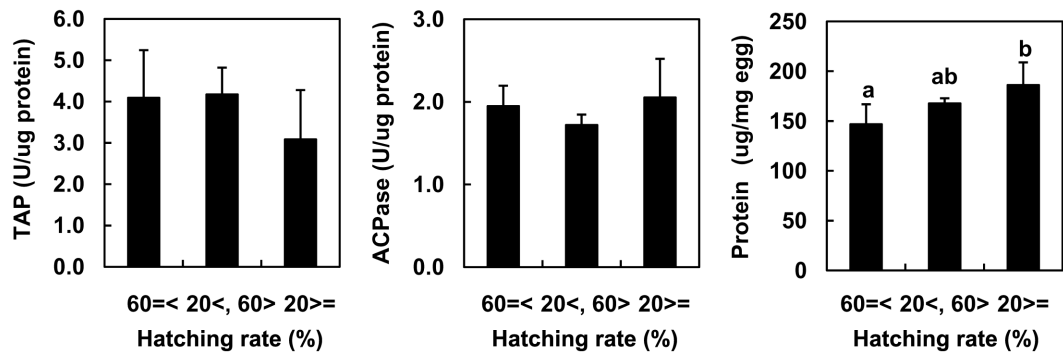


Fig. 3. Total alkaline protease (TAP), ACPase activity and protein contents of unfertilized eggs of Japanese eel *Anguilla japonica* on the different hatching rates.

갑상선 호르몬의 양적 변화가 확인 되었으며, Fruita et al. (2007) 은 친어 사육 동안 공급된 사료의 영양조건에 따라 낮은 부화율이었지만, 부화율의 차이를 확인하였다. 그리고 Seoka et al. (2003)은 수정 후 부상란과 침강란의 생화학적 특성을 밝혀 수정되지 않는 성숙란이 발달과정에서부터 문제가 있다는 것을 밝혔다. 이와 같은 성숙단계에서의 문제는 간에서 생성된 난황단백질(vitellogenin)의 공급부족, 유구형성의 이상을 들 수 있다. 그렇지만, 이 같은 발달과정에서 일어나는 문제는 호르몬 조절의 문제로 인식되고 있기 때문에, 보다 번식학적인 연구가 남아있다.

또한 난 발달에서 후기 난황형성기의 특징은 일시적인 pH 하강과 이후 상승으로 단백질 분해효소에 의해 지금까지 간으로부터 공급된 난황단백질인 vitellogenin이 분해된다. 이로 인해 난 내 분자량이 작은 유리아미노산 함량의 증가로 mole 농도가 증가하고, 수정 준비를 하게 된다. 이 때 높아진 mole 농도에 의한 삼투현상으로 외부에서 수분을 흡수하게 된다. 결국 최종 성숙단계에서 효소의 전환과 충분한 단백질 분해효소의 작용이 없다면, 난 내 mole 농도의 상승도 없을 것이고, 최종성숙을 위한 수분 흡수 또한 없을 것이다. 결국 수정 불가능한 난이 만들어 지게 된다. 하지만 아직 이 효소 전환의 메커니즘은 현상만이 밝혀졌을 뿐 구체적인 원리는 밝혀지지 않고 있다. 또한 수정 후에는 난막에 있는 표층포에서 수분이 방출되어 단단한 수정막을 형성하며, 난막과 수정막 사이에 투명한 위란강

을 형성해서 다정수정과 수정 후의 난을 보호하기 위한 현상을 보인다. 그렇지만 이 수정 단계에서 표층포의 미봉괴로 위란강으로의 수분공급이 되지 않아서 수정된 난을 보호하지 못하고 수분이 방출된 난 보다 비중이 크게 되어 침강해서 정상 발달을 하지 못하는 상태에 이르게 된다.

그렇지만 이와 같은 미성숙란에서 정상 성숙란까지의 문제는 대부분 번식학적, 가수분해 효소학적 문제로 해결된다. 하지만 정상란의 장기 보존이나 수정 불가능한 과숙란의 원인에 대한 고찰은 많은 부분에서 해결되지 않고 있으며(Ohta et al., 1996), 단지 체강 내에서 과숙되는 것을 막기 위해 배란 유도 호르몬인 DHP의 주사 후 뱀장어 난의 최적 채취 시간을 실험에 의해 알 수 있게 된 것 뿐이다. 본 연구에서의 결과를 보면 수정률은 부화율, 자어의 3, 10일 후 생존율들과 비례하는 경향을 보였다. 그리고 살아있는 단일 세포에는 DNA 함량이 일정하지만, 부화율이 낮아짐과 함께 유의적으로 낮아졌다. 결국 과숙되는 과정에서 세포가 단지 수정력만이 줄어드는 것이 아니라, 자체의 생명력이 줄어들어 죽어버린다는 것을 보여주고 있다. 유의적인 차이가 없는 RNA 함량과 부화율의 상승과 함께 감소하는 RNA/DNA 비는 난에서의 다른 연구 보고가 없기 때문에 비교 설명은 할 수 없지만, 단백질 합성량의 지표로 할 수 있는 RNA 함량을 본다면, 단일 세포인 미수정란에서의 단백질 합성 보다는 외부로부터 공급되는 단계이기 때문에 일정할 수

밖에 없으며, 일정한 RNA 함량과 감소하는 DNA 함량에 의해 이들의 비는 부화율과 반대로 증가하는 것으로 판단된다.

또한 정상란의 성숙과정에서 단백질 분해효소에 의한 lipovitellin의 분해로 난 내 mole 농도가 증가하지만, 본 연구에서 사용된 과숙란에서는 단백질 분해효소의 활성과 생명력의 기준이 될 수 있는 것으로 알려진 ACPase의 활성은 부화율에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 최종 성숙 이후 이 단백질 분해효소의 활성이 감소했거나, pH 8에서 활성을 보이는 효소가 아닌 다른 pH역에서 활성을 보이는 가수분해 효소일 가능성이 높다. 근육 내 자가분해효소인 cathepsin에 의한 단백질의 분해에 의해 Seoka et al. (2003)에서와 같이 유리아미노산 함량이 늘었을 가능성을 설명하고 있다. 이 두 효소가 변하지 않은 것은 DNA 함량이 줄었던 것과 같이 설명을 하자면, 효소는 몇 시간 내에 갑자기 사라지는 것이 아니기 때문에 세포가 죽었다더라도 정상란일 때까지 생성되거나 공급된 효소의 양이 유지되어 각 성분을 유리화하고 있는 것으로 판단된다. 과숙과정에서 다른 어종에서는 aspartate aminotransferase의 활성이 높아지는 것으로 보고되었으며 (Lahnsteiner, 2000; Lahnsteiner et al., 2001), 최근 Sago (2008)에 의하면 뱀장어 성숙란의 과숙과정에서 ATPase가 출현하는 것을 보고하여 체강 내 배란된 알의 과숙에 대한 메커니즘이 빠른 시일 내에 밝혀 질 것으로 판단된다.

그러나 배란 후 체강에서의 과숙과정이 진행됨에 따라 단백질 함량은 계속해서 증가한다. 현재 일본에서의 뱀장어 채란에는 1주일에 한번씩 연어뇌하수체추출물(SPE)의 주사와 함께 채란 가능한 개체에 최종 SPE 주사 후, DHP 주사 전 SPE의 주사를 한번 더 하는 작업을 하고 있다. 이것은 SPE의 주사를 통해 난으로의 vitellogenin의 공급을 보다 많이 해 주기 위한 것으로 다소 미숙한 뱀장어 난을 정상란으로 만들기 위한 좋은 방법으로 채택되어 왔다. 그렇지만 인위적으로 속도를 빨리 하기 위한 이 방법이 체강 내 잔류시간이 길었던 과숙란에게는 결국 단백질의 과잉 공급의 결과를 가져 온 것으로 판단된다.

결국 한번 더 SPE 주사를 해줌으로써 체강 내 정상란에 과잉 공급된 단백질로 인해 세포가 죽게 된 것으로 판단된다. 이로 인해 Sago (2008)에 의한 과숙란에서 만 나타나는 자가분해효소의 출현으로 결국 DNA 파괴로 인한 세포의 괴멸로 이어지게 되었다. 한번 더 SPE 주사를 해주는 것은 연구자 자신의 번거로움을 덜어주고 빠른 배란을 목적으로 해왔기 때문에, 뱀장어 친어와 난의 상태를 고려한다면 속도를 다소 늦추어서 검경을 통해 자주 배란란의 상태를 확인해 가면서 뱀장어 채란을 하는 것이 보다 안정적으로 정상란을 확보하는 방법인 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 인위적으로 배란시킨 뱀장어 *Anguilla japonica* 배

란란의 과숙특징을 생화학적으로 밝히고, 과숙을 방지하기 위한 하나의 방법을 제시하였다.

사용된 뱀장어 성숙란의 수정률과 부화율, 부화 후 3, 10일 후 생존율과의 관계는 $Y=0.7954X+32.448$ ($R^2=0.8176$, $P=6.35E-7$), $Y=1.0241X-26.401$ ($R^2=0.8121$, $P=5.95E-27$) 및 $Y=0.9314X-24.814$ ($R^2=0.7619$, $P=7.33E-14$)였다. DNA 함량은 부화율의 감소와 함께 20% 이하의 부화율을 보이는 배란란에서 유의적으로 가장 낮은 0.653 pg/ug protein을 보였다 ($P<0.05$). 그리고 이들의 비는 부화율이 20% 이하의 난에서 1.058로 유의적으로 가장 높은 비를 보였다($P<0.05$). 또한 부화율에 따른 total alkaline protease와 ACPase 활성은 모든 부화율 범위에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 단백질 함량은 부화율 20% 이하 배란란에서 유의적으로 가장 높은 186.16 ug/mg eggs의 함량을 보였다($P<0.05$).

따라서 뱀장어의 과숙란은 지속적인 단백질의 공급으로 정상란의 과숙화를 촉진하여 부화율이 저하된다. 결국 세포는 과숙으로 인해서 죽었기 때문에, 간에서 생성된 난황단백질의 공급을 차단하거나 공급속도를 늦추어서 복강 내 배란 후 과숙을 방지해야 할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Bessey, O. A., O. H. Lowry and M. J. Brock, 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum. *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Fukuda M, Y. Yano, H. Nakano and M. Sugiyama, 1986. Protein and nucleic acid changes during early developmental stages of Cresthead flounder. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52, 951-955.
- Furuita, H., K. Hori, H. Suzuki, T. Sugita and T. Yamamoto, 2007. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 267, 55-61.
- Furuita, H., T. Unuma, K. Nomura, H. Tanaka, K. Okuzawa, T. Sugita and T. Yamamoto, 2006. Lipid and fatty acid composition of eggs producing larvae with high survival rate in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. Fish Biol.*, 69, 1178-1189.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30, 291-310.
- Lahnstriner, F., 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiol. Biochem.*, 23, 107-118.
- Lahnstriner, F., B. Urbanyi, A. Horvath and T. Weismann, 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture*, 195, 331-352.

- Lokman, P. M., B. Harris, M. Kusakabe, D. E. Kime, R. W. Schulz, S. Adachi and G. Young, 2002. 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 129, 1–12.
- Lokman, P. M., R. T. Wass, H. C. Suter, S. G. Scott, K. F. Judge and G. Young, 2001. Changes in steroid hormone profiles and ovarian histology during salmonine pituitary-induced vitellogenesis and ovulation in female New Zealand longfinned eels, *Anguilla dieffenbachia* Gray. *J. Exp. Zool.*, 289, 119–129.
- Matsubara, H., P. M. Lokman, Y. Kazeto, S. Adachi and K. Yamauchi, 2005. Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 243, 393–402.
- Matsubara, M., P. M. Lokman, A. Senaha, Y. Kazeto, S. Ijiri, A. Kambergawa, T. Hirai, G. Young, T. Todo, S. Adachi and K. Yamauchi, 2003. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 353–354.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose, 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 139, 291–301.
- Pedersen, B. H., 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla Anguilla*. *Aquaculture*, 237, 461–473.
- Peragóna J., J. B. Barroso, L. García-Salguero, M. Higuera and J. A. Lupiáñez, 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *Internation. J. Biochem. Cell Biol.*, 22, 1227–1238.
- Sago, K., 2008. Searching of new molecular marker protein for egg quality estimation. Master Thesis, Hokkaido University, Japan, 86 pp. (in Japanese)
- Seoka, M., S. Yamada, Y. Iwata, T. Yanagisawa, T. Nakagawa and H. Kumai, 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 216, 355–362.
- Shin, D., X. Qu, Y. Ozaki, S. Adachi and K. Yamauchi, 2001. Artificial elevation of thyroid hormone levels in eggs of Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto, K. Yamauchi (eds.), *Proceedings of the international symposium on advances in eel biology*. Tokyo, pp. 216–218.
- Tachiki, H., T. Nakagawa, K. Tamura and K. Hirose, 1997. Effects of oral administration of estradiol-17 β to young on gonadal sex and growth of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*, 45, 61–66. (in Japanese)
- Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, T. Unuma and K. Nomura, 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 493–497.
- Tanaka, H. T., H. Ohta and H. Kagawa, 2000. Development of techniques for artificial induction of maturation and rearing of Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66, 623–626. (in Japanese)
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, 251, 220–222.
- Yamauchi, K. and K. Yamamoto, 1982. Experiments on artificial maturation and fertilization of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). (in) C. J. Richter and G. J. Th. Goos (eds.), *Reproductive physiology of Fish*. Pudoc, Wageningen, pp. 185–189.

원고접수 : 2008년 6월 13일

심사완료 : 2008년 8월 8일

수정본 수리 : 2008년 8월 10일