

Cinnamon Clownfish *Amphiprion melanopus*의 난발생과 자치어 변태에 미치는 먹이생물과 갑상선호르몬의 영향

노경언¹ · 노섬² · 민병화³ · 장영진^{1,*}

¹부경대학교 대학원 수산생물학과, ²한국해수관상어센터, ³동해수산연구소

Egg Development and Effects of Livefood and Thyroid Hormone on the *Amphiprion melanopus* Larvae

Gyeong Eon Noh¹, Sum Rho², Byung Hwa Min³ and Young Jin Chang^{1,*}

¹Dept. of Fisheries Biology, Graduate School, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Corea, Center of Ornamental Reefs and Aquariums, Jeju 690-974, Korea

³Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 210-861, Korea

ABSTRACT : The aim of this study was to investigate the egg development and the color change of *Amphiprion melanopus*, by the live food and thyroid hormone. After fertilizing, it took 168 h until hatching. The size of hatching larvae were 3.5 ± 0.3 mm, and some individuals had small yolk sac. As reaching the particular age, they underwent the color change (metamorphosis) - Days after hatching (DAH) 10: black, DAH 15~20: the 3 white stripes appear, DAH 30: the dorsal & the caudal white stripe begin to disappear. DAH 90: body color become red and orange, adult: cinnamon body color and a white stripe on head. - The group fed enriched *Artemia* with *Tigriopus japonicus* grew the faster than with only *Artemia*. The fin coloration of the one fed the only *T. japonicus* has a vivid red and orange color. T₃-treated group (4 ppm) grew the faster than the others (0, 2, 6 ppm). The size of the 6 ppm group was the smallest. The results suggest *T. japonicus* can be used as a supplement with rotifer and *Artemia* for the juvenile development and coloration. T₃ is considered to be involved in the metamorphosis and color formation of *Amphiprion* sp.

Key words : *Amphiprion melanopus*, Ornamental fish, Coloration, *Tigriopus japonicus*, Thyroid hormone.

요 약 : *Amphiprion melanopus*의 난발생과 자치어의 형태학적 발달에 대한 기초 조사와 함께, 먹이생물과 갑상선호르몬이 자치어의 성장과 체색에 미치는 영향을 조사하였다. 수정 후, 부화까지 총 168시간이 소요되었다. 갓 부화 자어의 크기는 평균 3.5 ± 0.3 mm였으며, 대부분의 자어는 부화 후 경과일 수에 따라 체색 변화(변태)를 나타내었다; DAH(days after hatching) 10: 체색 흑화, DAH 15~20: 3개의 흰 줄무늬 출현, DAH 30: 등과 꼬리지느러미의 흰 줄무늬가 사라지기 시작, DAH 90: 체색 주황색; 성어: 체색은 진한 계피색이며 머리에만 흰 줄무늬 남음. *Artemia*와 *T. japonicus*를 함께 공급한 실험구의 성장은 *Artemia*만 공급한 실험구보다 빨랐다. *T. japonicus* 만을 공급한 실험구의 지느러미 체색은 진하고 선명한 주황색이었다. 갑상선호르몬을 처리한 4 ppm구의 성장이 다른 실험구(0, 2, 6 ppm)보다 빨랐고 6 ppm구가 가장 느렸다. 본 연구의 결과, 주요 먹이생물로 알려져 있는 *Artemia*와 함께 *T. japonicus*를 공급함으로써 *A. melanopus*의 성장과 체색을 개선시킬 수 있었고, 갑상선호르몬 또한 변태 및 체색 형성에 직접적으로 관여할 것으로 사료된다.

서 론

동물의 체색은 일반적으로 외피에 존재하는 색소세포에 의

해 결정된다. 포유류는 오직 한 종류의 색소세포, melanocyte (흑색, 갈색, 적색 또는 황색)만을 가지고 있다. 반면, 어류의 경우, 6종류의 색소세포가 존재한다(Kelsh, 2004; Fujii, 2000); melanophores(흑색), xanthophores(황색), erythrophores(적색), iridophores(무지갯빛), leucophores(흰색), cyanophores

* 교신저자: 부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교 대학원 수산생물학과. (우) 608-737, (전) 051-629-5915, E-mail: yjchang@pknu.ac.kr

(청색). 어류의 체색변화는 장기간 지속적인 형태학적 체색 변화와 외부자극(주변색, 온도, 사회적 변화 등)에 따른 일시적인 반응으로서 체색변화의 두 가지로 구분된다(Nery & Castrucci, 1997). 어류의 색소세포는 발생 초기에 신경관(neural tube)을 따라 발달되는 neural crest cell이 분화되어 최종 위치로 이동을 하게 된다(Rawls et al., 2001). 색소세포가 자신의 위치로 이동하더라도 각각의 체색을 발현시키기 위해서는 색소원이 필요하다. Carotenoids는 어류의 체색을 붉게 하는 대표적인 색소원으로서, 섭취하는 carotenoids의 종류와 어체 내 대사특이성에 의해 체색이 결정되며, 이로 인해 생체내에서 astaxanthin을 생성할 수 있는 어류와 생성할 수 없는 어류로 구분한다(Tanaka et al., 1976). 그러나 구체적인 경로에 대해서 보다 많은 연구가 필요하다.

전 세계 어류의 양식에 있어서 초기 자어를 위한 먹이로 rotifer(*Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis*)와 *Artemia nauplii*가 이용되는데, 이는 고밀도 대량 생산이 가능하기 때문이다. 그러나 영양학적 측면에서 자어 성장에 필요한 불포화 지방산 등이 부족하여 최적의 성장 향상을 기대하기 어렵다(Kahan 1980; Olivotto et al., 2003; Faulk & Holt, 2005). 이러한 문제를 해결하기 위하여, 먹이생물인 요각류의 이용이 제안되고 있다. 요각류는 단백질, 고도 불포화지방산 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(Fleeger, 2005). 그러나 *T. japonicus*가 astaxanthin을 함유하고 있다는 것은 잘 알려져 있지만, 어류의 체색에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

갑상선호르몬(thyroid hormone)은 고등동물에 있어서 발달, 기초 대사, 항상성 유지 등 다양한 생리학적 기능을 하며, 하등동물인 양서류의 경우, 변태촉진 호르몬(metamorphosis-inducing hormone)으로서 잘 알려져 있다. 어류에 대한 갑상선호르몬의 영향에 대한 많은 연구들 중 중요한 사실은 높은 농도의 갑상선호르몬이 알에 존재하고, 자어-치어-성어로의 발달에 관여한다는 점이다. Summer flounder *Paralichthys dentatus*의 변태, 연어류의 은화(smoltification)에 대한 연구가 이와 관련이 있다(Schreiber & Specker, 1999; Yamano, 2005; Björnsson et al., 2011). 즉, 형태적 변화뿐만 아니라 체색 변화에도 갑상선호르몬이 관여할 것으로 예상된다.

Clownfish류(*Amphiprion* sp., *Premnas* sp.)는 농어목, 자리돔과에 속하며, 인도네시아, 호주 및 서태평양에 분포하는 열대성 어종으로 해수 관상어로 더 잘 알려져 있다. 그리고 자치어기에는 변태를 하는 것으로 알려져 있다. 자어기의 특징은 큰 입과 눈, 일직선의 창자, 미발달된 지느러미, 부레 및 비늘 그리고 투명한 체색이지만, 부화 후 7~10일 사이에 변태가 일어나면서 비늘이 생기고, 지느러미가 뚜렷해지며, 부레가 완벽하게 기능을 하게 된다. 창자는 소화의 흡수와 효율을 높이기 위해 회선상의 모양이 된다. 특히, 체색 변화가 일어나는 데, 어중에 따라 몸에 1~3개의 흰 줄무늬가 생기는 것이 특징이다(Bertschy, 1979; Hoff, 1996).

Clownfish류를 포함한 산호초 지역에 사는 해수 열대어들은 대부분 그 체색이 화려하면서 아름다워서 관상어 산업의 대부분을 차지한다. 최근에 와서 세계 관상어 산업이 성장함에 따라 많은 해수 관상어종이 과잉 포획되고 있으며, 이로 인해 일부 어종은 멸종 위기에 처하고 있는 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로써 환경 친화적인 식용 양식기술의 도입이 제안되고 있다(Moorhead & Zeng, 2010).

따라서 본 연구에서는 clownfish류 중 *A. melanopus*를 대상으로 초기 발달 조사를 통해 해수 관상어 인공번식을 위한 기초 정보를 제공하고, 또한 자어의 변태과정에서 *T. japonicus*와 외인성 갑상선호르몬이 각각 체색 발달과 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

본 실험에서 사용된 수정란과 자치어는 제주도 한국해수 관상어센터에서 지원을 받았다. 먹이생물과 갑상선호르몬에 따른 실험은 각각 부화 후 10일째 자어(8.2±0.6 mm)와 7일째 자어(7.3±0.3 mm)를 이용하였다. 자치어 사육 조건은 수온, 염분 및 광주기 각각 27.0±0.9°C, 31.5±1.0 psu, 14L:10D였다.

2. 난발생과 자치어 발달

난발생 관찰은 어미의 산란 및 수정 후, 수정란이 부착된 알판을 자체 제작한 인공부화장치로 옮겨 7일간 두면서 관찰하였다. 수온, 염분 및 광주기는 각각 28.8±1.0°C, 32 psu, 12L:12D로 유지하였다. 난발생 관찰 시간은 수정 후부터 경과시까지 30분 간격, 2일째부터는 3시간 간격으로 부화시까지

지 관찰하였다. 자치어 발달은 각각 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 일째에 10마리씩 선발하여 MS-222로 마취 후 버니어캘리퍼스를 이용해 크기를 측정하였고, 입체현미경(DV4, Zeiss)과 디지털 카메라(D300, Nikon, Japan)를 이용하여 형태를 관찰하였다.

3. 체색 비교

체색변화 조사를 위해서 직접 제작한 아크릴 케이스(10×1.5×10 cm)에 치어를 넣고, 디지털 카메라(D300, Nikon)로 촬영하였다. 카메라 조건은 다음과 같다; 초점거리 55 mm; 노출시간 1/200 sec; 조리개 f/8.0; 노출모드 spot. 일정한 광량을 위해 플래쉬(SB-800, Japan)로 이용하여 TTL(Through The Lens) 모드로 촬영하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 어체의 특정 부위(1: 입 주변, 2: 첫 번째 흰 줄무늬, 3: 몸 중간, 4: 등지느러미, 5: 꼬리지느러미)를 선정하여 사진 편집 프로그램(photoshop CS5, Adobe)을 이용하여 CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Black)를 측정하였다.

4. 먹이생물에 따른 성장

실험구는 영양 강화 *Artemia* sp.구(EA), *Tigriopus japonicus*구(TJ) 그리고 영양 강화 *Artemia* sp.와 *T. japonicus*를 1:1로 혼합 투여한 구(AT)로 나누었고, 실험어 10마리를 10 ℓ 플라스틱 원형 수조에서 7일간 사육하였다. *Artemia*는 DHA Selco(INVE, Belgium)로 영양 강화하였다. 각 실험구에 공급한 먹이량은 4~5개체/ml였으며, 2시간 간격으로 먹이를 확인하여 부족한 만큼 보충해 주었다. 수온, 염분 및 광주기는 27.0±0.5°C, 32 psu, 13L:11D였다. 실험 개시 시 10

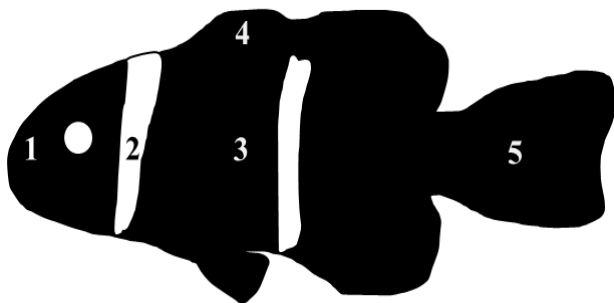


Fig. 1. Positions for color comparison. 1: Around a mouth, 2: First white strip, 3: Middle body, 4: Dorsal fin, 5: Caudal fin.

일째 자어의 크기는 20마리를 무작위로 선발하여 평균값으로 정하였고, 실험 종료 후, 10마리씩 개체별 전장크기를 측정하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

5. 갑상선호르몬 처리에 따른 성장

갑상선호르몬(3,5,3'-triiodo-L-thyronine salt, Sigma, USA)을 0, 2, 4, 6 ppm의 실험구로 나누었다. 실험어 10마리를 각 농도별로 1시간씩 침지한 후, 10 ℓ 플라스틱 원형 수조에서 10일간 사육하였다. 수온, 염분 및 광주기는 각각 26.5±1.0°C, 32 psu, 13L:11D로 유지하였다. 먹이 공급은 EA와 TJ를 1:1로 혼합해서 공급하였고, 2반복 실시하였다.

6. 통계분석

실험결과와 자료값은 mean±S.E.로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램(ver. 18.0)을 사용하여 one way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다(P<0.05).

결 과

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. 2). 수정 후 1시간째에 배반이 형성되었고, 1.6시간이 지나서 2세포기로 이행하였다. 3시간이 경과하면서 제 2난황이 일어나 4세포기로 되었고, 수정 후 4.1시간째에 8세포기를 형성하였다. 32세포기, 64세포기, 상실기는 수정 후 각각 5.1시간, 6.5시간, 7.6시간, 9시간째에 관찰되었다. 포배기는 수정 후 10.8시간째에 형성되었고, 배반엽이 커지기 시작하였다. 수정 후 19.3시간째에 낭배기에 도달하였고 배반엽이 난황의 절반을 덮었다. 수정 후 24.8시간이 지나서 배반엽이 난황의 대부분을 덮었고, 수정 후 26.6시간이 지난 후에 배체가 출현하였다. 수정 후 46시간이 지나서 머리에 안포와 이포가 형성되었다. 이후로 부착사 쪽으로 향해있던 머리가 반대쪽으로 이동하였고, 14~15개의 근절이 관찰되었다. 수정 후 57시간째에는 꼬리가 난황과 분리되었고, 근절부위에서도 흑색소포가 관찰되었다. 이때 근절은 24~25개였다. 70시간이 경과 후 심장형성과 함께 심장박동이 관찰되었

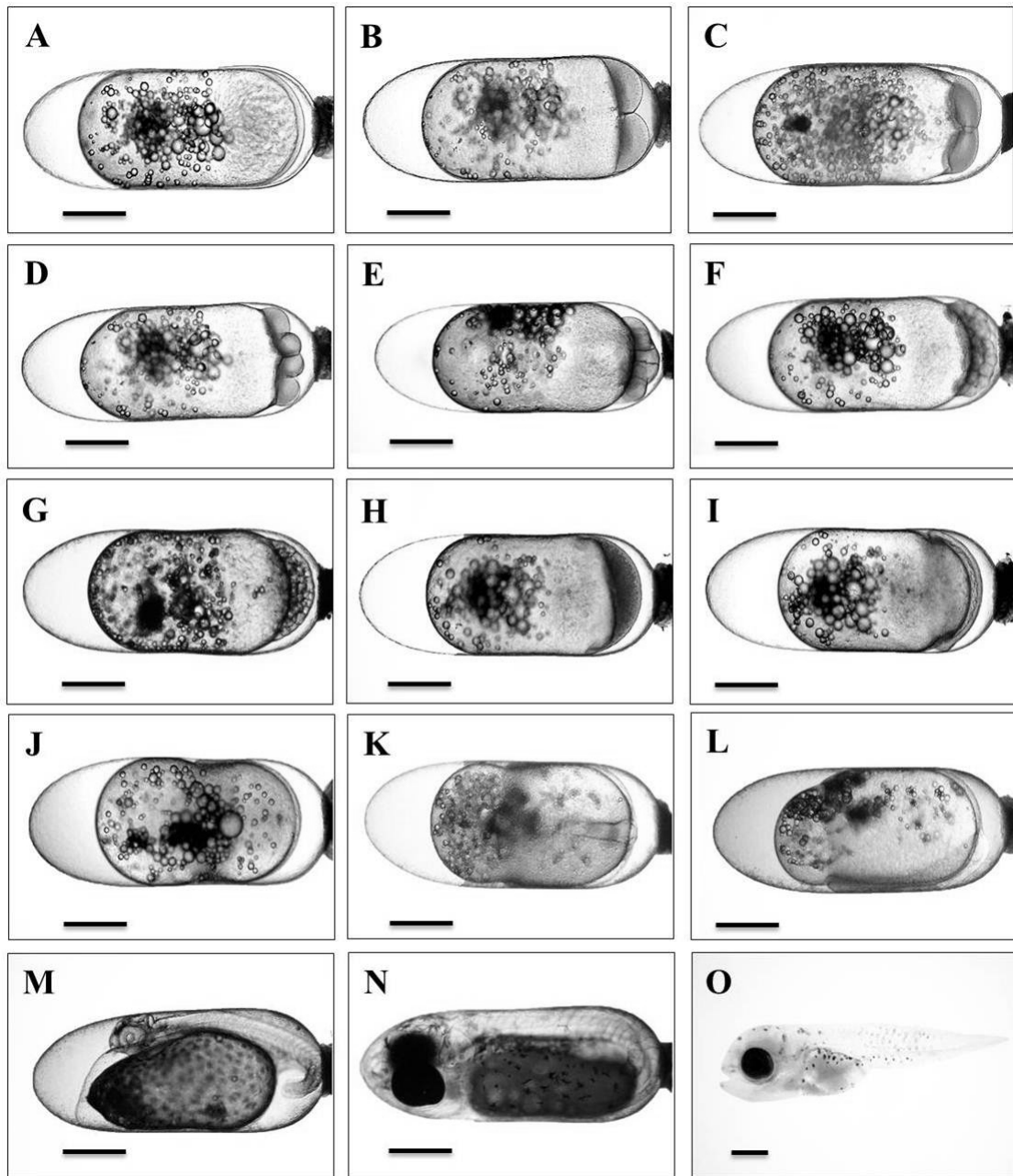


Fig. 2. Embryonic development of *Amphiprion melanopus*. A: fertilized egg; B: 2-cell; C: 4-cell; D: 8-cell; E: 32-cell; F: 64-cell; G: morula; H: blastula; I: gastrula; J: blastodisc covering of yolk; K: embryo formation; L: lens and ear vesicle formation; M: heart beating; N: embryo before hatching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

다. 분당 심장 박동수는 160회/분으로 꼬리의 움직임도 관찰되었다. 수정 후 120시간째에는 혈액의 움직임과 근질의 일부 마디에서 황색소포가 관찰되었다. 이후는 부화 직전의 상

태로서 배체가 난대를 완전히 채웠으며 안구는 완전히 흑화되었다. 부화까지 소요된 시간은 수정 후 180시간이었으며, 소등 후 1.5시간~2시간 사이에 부화하였다(Table 1).

Table 1. Embryonic development of *Amphiprion melanopus*

Developmental stage	Time after fertilization (hours)
Fertilized egg	0.0
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

2. 자치어 발달

갓 부화한 자어의 전장은 3.5±0.3 mm로서, 대부분 난황을 흡수한 상태였다(Fig. 3). 흑색색소포는 주로 두부의 위쪽 그리고 복부와 척추 사이를 따라 분포했으며, 등, 꼬리, 복부에

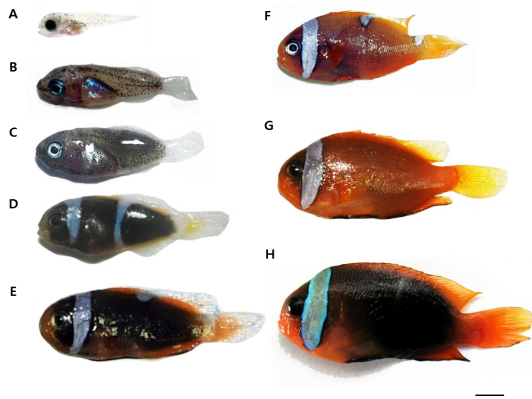


Fig. 3. Color development of larval and juvenile *Amphiprion melanopus*. A: hatching larva (3.5±0.3 mm); B: 5 days after hatching (5.8±0.3 mm), C: 10 days after hatching (8.3±0.3 mm), D: 15 days after hatching (10.1±0.2 mm), E: 30 days after hatching (1.2±0.3 cm), F: 60 days after hatching (2.3±0.4 cm), 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).

부분적으로 옅은 흑색색소포가 관찰되었다. 또한, 눈과 입 주변에는 황색색소포가 분포하였다. 부화 후 5일째와 10일째 자어의 전장은 각각 5.8±0.3 mm, 8.3±0.3 mm였으며, 흑색색소포가 몸 전체에 발달해 있었다. 특히 부화 후 9일째부터 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 전체가 진한 고동색이었다. 특히, 대부분 자어의 머리와 등에는 흰 줄무늬가 선명하게 나타났다. 부화 후 20일이 지나면서 꼬리지느러미에도 흰 줄무늬가 나타나기 시작했다. 부화 후 30일째 자어(13.1±0.4 mm)의 입 주변과 각 지느러미는 주황색으로 선명했으며, 등지느러미와 꼬리지느러미의 흰 줄무늬가 사라지기 시작했다. 부화 후 60일째 자어(23.0±0.3 mm)는 몸 전체의 색깔이 진한 고동색에서 적갈색으로 변해 있었다. 부화 후 90일째 자어(41.0±0.3 mm)는 3개의 흰 줄무늬 중 머리 줄무늬만이 남아 있었다. 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. 먹이생물에 따른 성장 및 체색 발달

먹이생물에 따른 성장은 Fig. 4에서 보는 바와 같이, AT 구가 11.3±0.7 mm로 성장이 가장 빨랐으나, 10.9±0.8 mm인 TJ

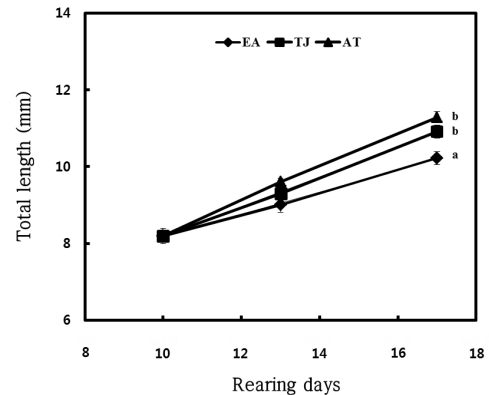


Fig. 4. Total length of the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) fed the different live foods. Values are mean±S.E. (n=30). Different letters indicate significant difference (P<0.05). EA: enriched *Artemia*; AT: enriched *Artemia* +*T. japonicus*; TJ: *T. japonicus*, DAH: days after hatching.

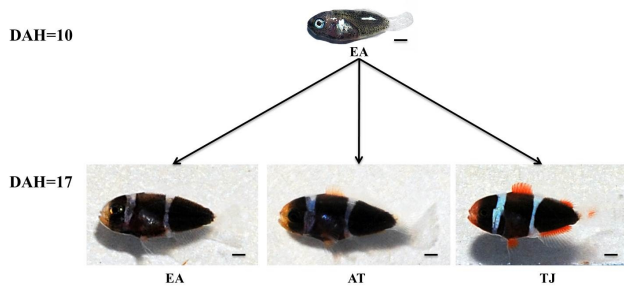


Fig. 5. Comparison of body coloration in the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) fed different livefood. EA: enriched *Artemia*; AT: enriched *Artemia*+*T. japonicus*; TJ: *T. japonicus*. DAH: days after hatching. Bar=1 mm.

구와 유의한 차이가 없었다. 대조구인 EA구는 10.2 ± 0.8 mm로 성장이 가장 느렸다. 체색 발달에 있어서 TJ구의 입 주변, 등지느러미, 배지느러미, 뒷지느러미, 꼬리지느러미는 뚜렷한 주황색을 나타내었을 뿐만 아니라, 머리와 가슴의 흰 줄무늬도 선명하였다. AT구의 경우, 입 주변, 등지느러미, 배지느러미는 옅은 주황색이었고, 머리와 가슴의 흰 줄무늬는 다소 불투명하였다. 반면에, EA구의 각 지느러미는 완전히 투명했으며, 머리와 가슴의 흰 줄무늬는 AT구와 유사하였다(Fig. 5).

Fig. 1의 기준에 따른 CMYK 분석 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 입 주변 magenta 수치는 TJ구가 $81.8 \pm 3.5\%$

Table 2. Comparison of coloration in juvenile *Amphiprion melanopus* fed 3 types live food

Group	Around mouth			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	45.0±4.7 ^a	57.6±4.2 ^a	84.0±5.5 ^a	36.6±11.4 ^a
AT	50.0±9.8 ^a	62.0±2.3 ^a	83.4±8.4 ^a	34.4± 4.9 ^a
TG	33.6±3.1 ^a	81.8±3.5 ^b	95.4±3.6 ^a	40.8± 7.3 ^a
Group	First white strip			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	81.6±2.7 ^b	73.2± 4.7 ^b	40.2±10.5 ^b	44.6±13.4 ^b
AT	82.6±5.2 ^b	76.0± 4.5 ^b	41.8± 7.2 ^b	36.4±11.7 ^b
TG	60.6±8.3 ^a	27.4±14.8 ^a	5.4± 3.1 ^a	0.6± 0.6 ^a
Group	Middle body			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	75.0±0.3 ^a	67.8±0.4 ^a	65.8±0.5 ^a	86.8±0.4 ^a
AT	73.6±0.9 ^a	67.8±0.5 ^a	66.0±0.8 ^a	85.0±0.6 ^a
TG	74.6±0.4 ^a	68.2±0.5 ^a	66.2±0.6 ^a	87.6±0.7 ^a
Group	Dorsal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	7.2±4.5 ^a	14.4±6.2 ^a	26.2±13.3 ^a	0.6±0.6 ^a
AT	5.4±2.4 ^a	6.4±2.7 ^a	14.4± 6.4 ^a	0.0±0.0 ^a
TG	19.2±4.3 ^b	75.8±6.7 ^b	94.8± 4.3 ^b	13.2±8.2 ^a
Group	Caudal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
EA	5.2±2.8 ^a	4.6± 2.0 ^a	1.2± 1.0 ^a	0.0± 0.0 ^a
AT	6.8±1.9 ^a	6.8± 2.4 ^a	8.2± 4.1 ^a	0.0± 0.0 ^a
TG	14.6±7.2 ^a	37.4±15.2 ^a	44.2±20.0 ^a	11.6±10.6 ^a

AT: enriched *Artemia*+*T. japonicus*, EA: enriched *Artemia*, TJ: *T. japonicus*, Values are mean±S.E. (n=20). Different letters indicate significant difference (P<0.05).

로 각각 57.6±4.2%, 62.0±2.3%인 EA구와 AT구 보다 유의하게 높았다. 흰 줄무늬의 black 수치는 TG구가 0.6±0.6%로 각각 44.6±13.4%, 36.4±11.7%인 EA구와 AT구에 비해 유의하게 낮았다. 몸 중간의 경우, CMYK는 실험구간에 차이가 없었다. 등지느러미는 TG구의 CMY가 각각 19.2±4.3%, 75.8±6.7%, 94.8±4.3%로 EA구와 AT구 보다 유의하게 높았다. 꼬리지느러미의 경우, 각 실험구 간의 유의차는 없었다.

4. 갑상선호르몬 처리에 따른 성장 및 체색 발달

갑상선호르몬 처리에 따른 자치어의 성장은 Fig. 6에서 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 간의 유의차는 없었다. 반면, 6 ppm구는 10.2±0.5 mm로 성장이 가장 느렸다. 9일 째, 모든 갑상선호르몬 처리구는 입 주변과 흰 줄무늬의 체색 발달에 있어서 0 ppm구보다 빨랐다. 특히, 부화 후 10일 째의 6 ppm구는 입 주변과 첫 번째 줄무늬가 선명한 반면, 0 ppm구는 희미했다. 17일째에 모든 갑상선호르몬 처리구의 체색은 0 ppm구에 비해 월등하게 선명했다. 특히, 실험구의 등지느러미를 포함한 각 지느러미는 진한 주황색을 나타낸 반면, 대조구는 옅은

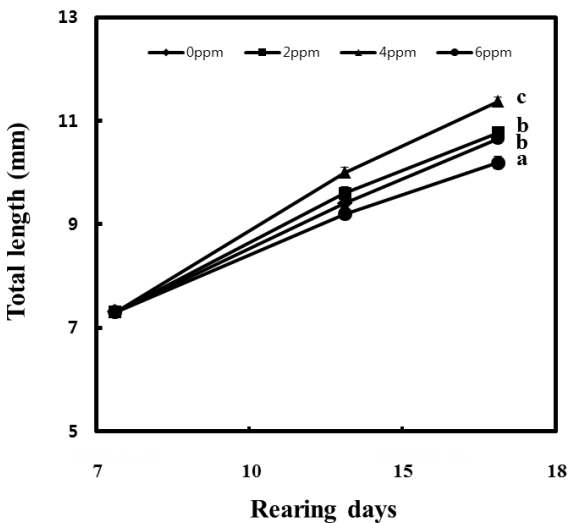


Fig. 6. Total length of the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH=17) treated with T₃ (0, 2, 4, 6 ppm). Values are mean± S.E. (n=20). Different letters indicate significant difference (P<0.05). DAH: days after hatching.

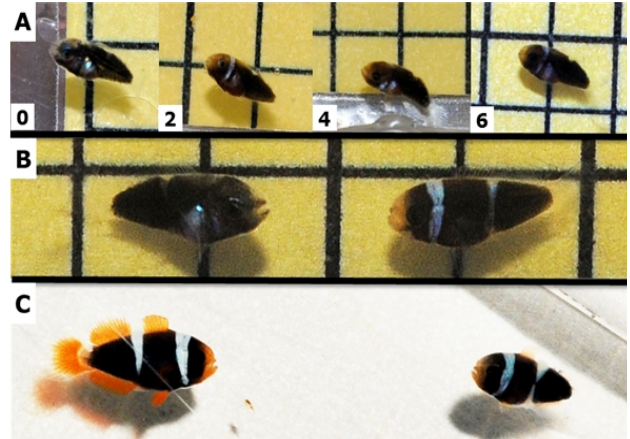


Fig. 7. Comparison of body coloration in the juvenile *Amphiprion melanopus* (DAH 9, 10, 17) treated with several T₃ concentrations. A: DAH 9 (0: 0 ppm, 2: 2 ppm, 4: 4 ppm, 6: 6 ppm), B: DAH 10 (left: 0 ppm, right: 6 ppm), C: DAH 17 (left: 4 ppm, right: 0 ppm), DAH: days after hatching.

주황색이었다(Fig. 7).

CMYK 분석 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 입 주변의 cyan 수치는 0 ppm구가 32.8±2.6%로 다른 실험구에 비해 가장 높았다. Magenta 수치는 4 ppm구가 73.0± 1.7%로 가장 높았으나, 0 ppm구와 2 ppm구의 유의차는 없었다. 반면에 6 ppm구는 60.6±5.9%로 가장 낮았다. 흰 줄무늬와 몸 중간의 CMYK는 각 실험구간에 유의차가 없었다. 등지느러미의 경우, 2 ppm구와 4 ppm구의 magenta 수치는 각각 67.4±5.3%, 56.0±8.4%였고 yellow 수치는 각각 92.8±3.5%, 93.8±4.0%로 다른 두 실험구보다 높았다. 꼬리지느러미의 경우, 4 ppm구의 magenta 수치는 73.6±3.6%로 가장 높았다. 그러나 49.6±7.3%인 2 ppm구와는 유의적 차이가 없었다. Yellow 수치에서도 4 ppm구가 99.8±0.2%로 가장 높았으나, 72.8±10.8%인 2 ppm구와 유의한 차이는 없었다.

고 찰

본 연구에서 *A. melanopus*의 수정란은 부화까지 7일이 소요되었다. 이전 보고에서 자연에서 서식하는 *A. melanopus*의 수정란은 7~8일째에 부화한다고 보고된바 있으나 수온 및 염분과 같은 환경조건이 제시되지 않았다(Ross, 1978).

Table 3. Comparison of coloration in juvenile *Amphiprion melanopus* treated with T₃

Group (ppm)	Around mouth			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	32.8±2.8 ^b	60.6±5.9 ^{ab}	82.4±8.1 ^a	19.0±6.2 ^a
2	31.4±3.6 ^a	68.0±4.7 ^b	91.2±4.6 ^a	27.8±9.6 ^a
4	24.8±3.1 ^a	73.0±1.7 ^b	99.4±0.4 ^a	17.4±5.7 ^a
6	27.8±2.7 ^a	53.0±3.8 ^a	86.8±7.4 ^a	9.4±4.1 ^a
Group (ppm)	First white strip			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	50.4±6.5 ^a	23.6±11.5 ^a	28.4±10.1 ^a	12.6±12.1 ^a
2	49.6±4.4 ^a	17.2± 7.1 ^a	16.0± 4.9 ^a	0.6± 0.6 ^a
4	40.8±5.2 ^a	17.6± 5.4 ^a	18.6± 4.7 ^a	0.4± 0.4 ^a
6	40.0±4.1 ^a	14.0± 4.4 ^a	18.6± 3.3 ^a	0.2± 0.2 ^a
Group (ppm)	Middle body			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	73.6±0.6 ^a	67.6±0.4 ^a	66.2±1.6 ^a	81.0±4.0 ^a
2	69.8±2.3 ^a	67.2±0.4 ^a	68.6±1.4 ^a	83.8±1.3 ^a
4	73.0±1.3 ^a	67.6±0.4 ^a	66.6±0.5 ^a	85.6±1.5 ^a
6	72.4±0.7 ^a	67.2±0.4 ^a	67.2±0.5 ^a	84.0±1.0 ^a
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 ^a
2	8.4±3.9 ^a	67.4±5.3 ^{cd}	92.8± 3.5 ^b	3.0±2.8 ^a
4	4.6±1.3 ^a	56.0±8.4 ^{bc}	93.8± 4.0 ^b	0.6±0.4 ^a
6	8.0±1.3 ^a	24.8±3.1 ^a	62.0± 7.3 ^a	0.0±0.0 ^a
Group (ppm)	Caudal fin			
	Cyan (%)	Magenta (%)	Yellow (%)	Black (%)
0	3.8±1.7 ^a	20.4±13.3 ^a	33.2±18.1 ^a	0.0±0.0 ^a
2	12.4±3.5 ^a	49.6± 7.3 ^{bc}	72.8±10.8 ^{ab}	2.4±1.5 ^a
4	3.6±1.0 ^a	73.6± 3.6 ^{cd}	99.8± 0.2 ^{bc}	0.8±0.2 ^a
6	9.2±3.3 ^a	25.8± 8.3 ^{ab}	51.8±15.1 ^a	0.0±0.0 ^a

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

수정 후 부화일은 어종에 따라 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, *A. frenatus*, *A. melanopus*는 9일째 부화를 한다. 30℃일 경우, *A. melanopus*의 수정란은 7일째 부화하며, 부화율도 높았다 (Kim & Hur, 2007). 본 연구에서도 28℃ 이상 유지하였고 부화까지 7일이 소요되었다. 온도 유지는 *A. ocellaris*의 부

화에 직접적인 관련이 있다. 수온 조건을 각각 26, 27, 28℃로 하였을 때 부화날짜는 10일, 9일, 8일로 단축되었다. 그러므로 *A. melanopus* 수정란의 수온을 높이면 부화일을 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 수정란의 부화는 수온뿐만 아니라 어미의 건강, 난질, 알의 초기 색깔, 수질에도 영향을 받는다(Juhl, 1992; Hoff, 1996). *A. melanopus*의 수정란은 타원형이었고, 장경 2.3± 0.1 mm이었다. 이는 2.3~

2.5 mm인 *A. polymnus*와 비슷한 크기였다. 비록 *A. frenatus* 2.6~2.9 mm보다는 작지만, *A. ocellaris* 2.2~2.4 mm, *A. sandaracinos* 1.9~2.1 mm, *A. perideraion* 2.0~2.1 mm, 그리고 *Premnas biaculeatus* 1.9~2.0 mm보다 크기 때문에 clownfish류 중에서 비교적 대형란에 포함되었다. Clownfish류의 산란 직후 알 색깔은 종에 따라 다르다. *A. ocellaris*는 주황색, *A. clarkii*는 주황색 또는 노란색, *A. frenatus*는 붉은색, *A. perideraion*는 분홍색, 그리고 *P. biaculeatus*는 선홍색이다. Clownfish의 난발생과정은 어종에 따라 시간적 차이를 보일 뿐 전체적으로 비슷한 양상을 보인다(Hoff, 1996).

Kim & Hur(2007)에 따르면, *A. melanopus*는 부화 후 16일째까지 변태가 거의 완료되어 바다에 정착하며, 거의 완벽한 어미의 특징을 갖춘다고 하였다. 그러나 *A. melanopus* 성어의 특징은 머리에만 흰 줄무늬를 갖는다. 본 연구 결과, 16~20일째는 몸에 3개의 흰 줄무늬가 나타나고, 이후에 등과 꼬리 줄무늬가 다시 사라져 부화 후 90일이 지나야 실제 성어에 가까운 모습에 도달하게 되었다. *A. ocellaris*의 경우, 14~30일째 3개의 흰 줄무늬가 완전히 발달하게 되며, 이후 꼬리지느러미에 검은 체색이 발달하여 63~80일째 완벽한 성어의 모습을 갖춘다. *A. polymnus*의 경우, 부화 후 13일째 3개의 흰 줄무늬가 나타나며, 부화 후 45일째 성어의 모습에 도달한다. 그러나 스트레스는 자어의 체색 발달에 영향을 준다. 특히, 흰 줄무늬가 중간에 끊기거나 점의 형태로 발달되는 “mis-baring”이 생긴다. 비정상적인 변태과정에 의해 생긴 mis-bar를 갖고 있는 *A. clarkii*는 그 상태로 성장을 한다. 이것은 유전적 원인보다는 영양적·내분비적 문제로 사료된다(Hoff, 1996; Celement et al., 2001).

본 연구의 먹이생물에 따른 성장실험 결과 TJ구와 AT구가 EA구보다 성장이 빨랐다. *A. clarkii*의 경우, rotifer나 *Artemia* 공급시 harpacticoid copepods 혼합 공급할 때 빠른 성장을 보였다. 이와 같은 경향은 turbot 자어에서도 보고되었다(Stottrup & Norsker, 1997). *A. ocellaris*에게 HUFAR로 영양 강화를 시킨 먹이생물을 공급했을 때 IGF (insulin-like growth factor) 유전자 발현이 증가한 반면, MSTN (myostatin) 유전자 발현이 감소했다. *A. clarkii*에게 copepods를 공급한 결과 같은 결과를 얻었다. 이것은 copepod가 자어에게 필요한 불포화 지방산의 공급원으로서 이용될 수 있음을 시사한다(Olivotto et al., 2008).

어류의 체색(색도) 조사는 색차계를 이용하여 백색도(light-

ness), 적색도(redness) 및 황색도(yellow)를 측정한다(Kim et al., 2008). 그러나 색차계는 그 부피가 커서 자치어와 같은 작은 어류의 특정 부위의 체색을 측정하기 어렵다. 또한, 측정을 위해서는 센서를 몸체에 밀착시켜야 하기 때문에 측정과정에서 스트레스를 유발시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 먹이 및 갑상선호르몬 처리에 따른 치어의 체색 비교를 위하여 모든 실험어를 동일한 조건(노출, 촬영거리 등)에서 촬영하였다. 그리고 사진 편집프로그램으로 잘 알려진 포토샵을 이용하여 CMYK 분석을 하였다. CMYK는 인쇄 시스템에서 사용되는 색 표시 모델의 하나이다. CMYK 분석에서 TG구의 입 주변과 등지느러미의 magenta 및 yellow 수치가 EA구와 AT구에 비해 유의하게 높았다. 그러므로 *T. japonicus*가 함유하고 있는 astaxanthin 성분이 어체의 체색에 관여하는 것으로 예상된다. 그리고 첫 번째 흰 줄무늬의 경우, TG구의 CMYK 수치 모두 낮게 나왔는데, 이것은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 다른 실험구와 비교해서 흰색 줄무늬가 선명하였기 때문에 검은색을 나타내는 K 수치가 낮게 나온 것으로 보인다. EA구와 AT구에서 흰색 줄무늬의 CMY 수치가 비교적 높게 나온 것은 몸 중간의 CMYK가 전체적으로 높게 나온 것으로 유추해 볼 수 있을 것 같다. 육안으로는 어두운 적갈색(고동색)이지만 CMYK 수치는 60% 이상이었다. 즉 적갈색이 CMY 수치가 혼합되어서 나온 것이라면, 흰 줄무늬의 CMY 수치가 높게 나왔다는 것은 흰색 줄무늬가 미발달 상태라서 적갈색이 더 발달해 있는 것으로 볼 수 있을 것이다. 그러므로 *Tigriopus* sp.은 더욱 붉고 선명한 체색을 유도시킬 수 있을 것으로 사료되며 특히, 관상어용 먹이로서 그 유용성이 크다고 볼 수 있다.

T₃ 처리 실험에서 4 ppm구는 0 ppm구에 비해 빠른 성장을 보였다. 17일째에 0 ppm구의 각 지느러미 색깔은 모두 투명했지만, 4 ppm구는 진한 적색이었다. 이것은 20~23일째 치어의 체색 발달과 동일한 것으로써 갑상선호르몬이 변태 및 체색 발달에 관여했다는 것을 암시한다. 그러나 6 ppm구는 성장속도가 가장 늦었다. 갑상선호르몬은 척추동물의 정상적인 발달과 성장에 중요하다(Leatherland, 1987). 감성돔 치어에게 고농도의 T₃ 처리는 성장을 억제시켰고, 전장과 체중의 성장을 위한 최적 농도는 10 ppm이었다(Kang & Chang, 1996). 이것은 어종, 연령, 크기 및 어체 상태에 따라 최적의 농도가 다르다는 것을 의미한다. 또한, *A. ocellaris*에게 갑상선호르몬 처리한 결과 흰 줄무늬가 없거나 기형적인

형태로 발달하였다(Clement et al., 2001). 그러므로 *Amphiprion* 속의 변태 과정시 갑상선호르몬이 직·간접적으로 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 연구를 통해서 *A. melanopus*의 난발생 및 자치어발달에 대한 기초정보를 확인하였다. 그리고 요각류인 copepods는 성장 및 체색에 우수한 효과가 있으므로 rotifer와 *Artemia*로 한정되어 있던 먹이생물의 대체 공급원으로서 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 갑상선호르몬 처리를 통해 성장 및 체색 발달을 향상시켰다. 그러나 다양한 종류의 copepods를 이용해서 체색 공급원으로서 최적의 먹이생물을 선정하는 연구가 필요할 것이며, 동물의 체색 발달과 있어서 갑상선호르몬에 대한 역할 및 최적 농도에 대한 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2007년 한국학술진흥재단의 문제해결형 인력양성지원 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

인용문헌

- Bertschy A (1979) Essais de reproduction en aquarium d'*Amphiprion ocellaris* Cuv (*Pomacentrides*). Rev Fr Aquariol 6(3):91-94.
- Björnsson BT, Stefansson SO, McCormick SD (2011) Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen Comp Endocrinol 167:77-85.
- Clement SE, Lichtenbert JH, Kohler CC (2001) Stripping Clowns: Induced meristic changes in common clownfish (*Amphiprion ocellaris*). Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco, n°spécial 20, fascicule 1.
- Evjemo JO, Reitan KI, Olsen Y (2003) Copepods as live food organism in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. Aquaculture 227:191-210.
- Faulk CK, Holt GJ (2005) Advances in rearing cobia (*Rachycentron canadum*) larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. Aquaculture 249:231-243.
- Fleeger JW (2005). The potential to mass-culture harpacticoid copepod for use as food for larval fish. In: Copepods in Aquaculture. O'Bryen and NH Marcus eds Blackwell Publishing Oxford UK pp11-24.
- Fuji R (2000) The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigment Cell Res 13:300-310.
- Hoff FH (1996) Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. Aquaculture Consultants Inc 1st Edit pp119-131.
- Juhl T (1992) Commercial breeding of anemonefishes. Seascop 9:1-4.
- Kang DY, Chang YJ (1996) Effects of dietary 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃) on growth and survival rate in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). J Aquacult 9:215-222.
- Kahan D (1980) Mass cultivation of food organisms in hatcheries-problems and proposed solutions. Symposium on Coastal Aquaculture Cochin India.
- Kelsh RN (2004) Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Res 17:326-336.
- Kim SR, Hur SB (2007) Spawning, hatching and larval growth of red and black clownfish *Amphiprion melanopus*. J Aquacult 20:239-247.
- Kim YO, Jo JY, Oh SY (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.
- Leatherland JF (1987) Throid hormones and reproduction. In: Norries DO Jones RE. editor, Hormones and Production in Fishes, Amphibian and Reptile. New York Plenum Press pp411-431.
- McKinnon AD, Duggan S, Nichols PD, Rimmer A, Semmens G, Robino B (2003) The potential of tropical paracalanoid copepods as live feeds in aquaculture. Aquaculture 223: 89-106.
- Moorhead JA, Zeng C (2010) Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: A review. Rev Fish Sci 18:315-343.
- Nery LEM, Castrucci AML (1997) Pigment cell signalling

- for physiological color change. *Comp Biochem Physiology* 118A:1135-1144.
- 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, Capriottoi F, Buttino I, Avella AM, 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.
- Rawls JF, Mellgren EM, Johnson SL(2001) How the zebrafish gets its stripes. *Dev Biol* 240:301-314.
- Stottrup JG, Norsker NH (1997) Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155: 231-248.
- 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.
- Tanaka Y, Katayama T, Simpson KL, Chichester CO (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.
- Yamano K (2005) The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *JAQ* 39(3): 161-168.

(Received 12 April 2011, Received in revised form 20 May 2011, Accepted 11 June 2011)