

## 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*와 자바리, *E. bruneus*의 정자동결보존에 관한 연구

김효근<sup>1</sup> · 김수철<sup>2</sup> · 김두용<sup>3</sup> · 김정우<sup>4</sup> · 고강희<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 수산해양대학 양식생물학

<sup>2</sup>전남대학교 공학대학 바이오전자메디컬공학

<sup>3</sup>전라남도 해양수산과학원

<sup>4</sup>서남대학교 의과대학 해부학교실

## Studies on Cryopreservation of Sperm in Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* and Kelp grouper, *E. bruneus*

Hyo Gun Kim<sup>1</sup>, Soo Chel Kim<sup>2</sup>, Doo Yong Kim<sup>3</sup>, Jung Woo Kim<sup>4</sup>, Kang Hee Kho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Fisheries Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

<sup>2</sup>Department of Biomedical and Electronic Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

<sup>3</sup>Department of Fisheries Technology Research, Ocean and Fisheries Science Institute, Wando-Gun 59116, Korea

<sup>4</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, Seonam University, Namwon 55724, Korea

### Corresponding Author

Kang Hee Kho

Department of Fisheries Science,  
Chonnam National University, Yeosu  
59626, Korea

E-mail : kkh@chonnam.ac.kr

Received : March 14, 2017

Revised : March 30, 2017

Accepted : April 18, 2017

본 연구의 목적은 능성어와 자바리의 정자동결을 위한 간편한 실험법개발이다. 희석제와 동해 방지제가 정자동결에 미치는 효과를 파악하고자 운동성성과 생존율을 조사하였다. 동결실험에서 300 mM glucose와 15% dimethylsulfoxide (DMSO)를 희석제와 동해방지제로 각각 사용하였다. 동결실험결과, 능성어 정자는 동결 5개월 후 60% 이상의 운동성을 보였고, 자바리 정자는 동결 5개월후 90% 이상의 운동성을 보였다.

The purpose of this research is to develop the simple freezing method for sperm cryopreservation in the Sevenband grouper and Kelp grouper. The motility and survival rate were checked to investigate the effects of diluent and cryoprotectant on sperm cryopreservation. In cryopreservation experiments, 300 mM glucose and 15% dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as a diluent and a cryoprotectant, respectively. As a results of cryopreservation, the motility rate of Sevenband grouper was found to be more than 90%, and that of Kelp grouper was found to be more that 60% in sperm 5 months after cryopreservation.

**Keywords:** Sevenband grouper(능성어), Kelp grouper(자바리), Sperm(정자), Cryopreservation (동결보존), Motility(운동성)

### 서 론

동물을 대상으로 한 정자보존에 관한 연구는 20세기 중반부터 시작되어, 수십 년이 경과한 현재에는 동물뿐만 아니라 시험관 아기 시술 등과 같이 인간의 불임을 해소하기 위한 방법으로도 발전하였다.

축산 분야에서의 정자보존 기술은 경제적 산업적 중요성 때문

에 일찍부터 개발되어 세계적으로 널리 이용되고 있다. 그것은 선택교배를 가능하게 하여 우수한 품종을 개발할 수 있다는 점, 필요 시 인공수정에 의해 언제든지 필요한 개체를 확보할 수 있다는 점과, 순종의 보급을 확대할 수 있다는 점, 정자은행 운영으로 많은 종들의 정자를 보존할 수 있다는 점 등이다. 최근에는 정자보존 기술이 멸종 위기에 처해 있는 동물의 종 보존에도 중요한 역할을 하고 있다.

해양수산생물 분야에서도 어류정자의 액상보존에 관해서 Barrett (1950)이 연어류의 정자를 0°C에서 보존하였을 때 며칠동안 생존했다는 결과를 얻은 이후, 최근까지 꾸준히 연구되고 있다(Jang, 1997). 어류는 암컷과 수컷이 성숙 시기가 다르기 때문에 정자와 난자가 서로 다른 시기에 방출되어 수정률이 감소하게 된다(Lim et al., 1997). 이러한 측면에서 정자동결보존 기술의 개발·확립은 그 효율을 높여 주는 역할을 한다. 게다가 난의 양에 맞게 조절을 할 수가 있으며 한 해 보관으로 끝나는 게 아니라 장기간 보관도 가능하기 때문에 이를 이용하여 안정적인 종묘 생산을 개발할 수 있을 것이다. 또한, 종묘 생산 시 문제가 되는 정자의 공급 부족에 따른 어려움을 해결하고 수컷의 사육 관리에 필요한 경비 및 노력의 절감, 우량형질을 가진 어류의 선택적 교배 가능, 마지막으로 정자은행 확립에 따른 우량종의 유전형질 보존 등에 대한 기대효과가 있다.

그러나 이러한 동결보존 방법에 관한 연구는 국내 수산생물이 1,000여종이 넘음에도 불구하고 극히 일부 어종에 대해서만 진행되어왔다. 이렇게 일부 어종에 대해서만 연구가 이루어진 이유는 육상 생물에 비하여 기초 자료 및 생활사의 인위 관리가 어렵다는 점과 계통 보존의 방법 개발이 어렵다는 점에서 그 이유를 찾을 수 있다. 이러한 점에서 해양 생물의 정자동결보존 연구가 시급하다고 볼 수 있다.

최근 바리와 어류는 세계적으로 20여 종이 양식, 연간 4만4,000t 가량 생산되고 있을 뿐만 아니라 중국 소비시장 규모가 3조 5,000억 원으로 추정될 만큼 그 시장가치가 높아 지난 2011년 농림축산식품부에서도 바리과의 대표 어류인 능성어를 10대 수출 전략 품목의 하나로 선정하기도 하였다. 이러한 이유로 전남 및 경남, 제주도 등의 지자체 뿐만 아니라 민간 배양 업체에서도 수정란의 생산과 보급, 그리고 종묘 생산과 방류를 통한 능성어의 생산량 확대에 총력을 기울이고 있다.

그러나 능성어류는 자성선속형 자동동체 어류로서 생후 7년 내지 9년 이상이 되어야 비로소 암컷에서 수컷으로 성전환을 한다. 그렇기 때문에 능성어류의 수컷을 확보하기 위해서는 장기간의 시간이 필요할뿐더러 경제적으로도 많은 비용이 발생하게 된다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 수컷을 확보하여 정자를 보존하는 것이 무엇보다 절실한 실정이다(Kim et al., 1997).

국내에서 해양어류 바리과의 정자동결보존과 관련된 선행 연구를 살펴보면 자바리, *Epinephelus bruneus*에 관한 연구(Oh, 2006)와 홍바리, *Epinephelus fasciatus*에 관한 연구(Joo, 2012) 등이 있지만, 여전히 바리와 어류에 관한 연구는 턱없이 부족한 실정이다.

이러한 능성어류의 정자동결보존에 관한 연구는 인공 종묘 생산 시의 정자 부족 현상 해소, 수컷의 사육 관리에 필요한 경비와 노력 절감, 선발육종의 활용 등, 경제적·산업적 측면에서 큰 기여를 할 수 있다.

본 연구는 바리과의 대표어종인 능성어와 자바리의 정자동결보존 실험으로 정자동결 전·후의 운동성과 생존율을 확인하고, 그

결과를 근거로 양식현장에서 비교적 간단히 적용할 수 있는 안정적인 기술을 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 채집

전라남도 여수시 삼산면 거문도 동도리 인근 가두리 양식장에서 양성중인 능성어와 자바리의 정액을 채취하였다. 생후 7년 이상 8 kg 이상 무게의 수컷 능성어, 7년 이상 7 kg 이상 무게의 수컷 자바리를 마취제(2-phenolxyethanol)를 넣은 수조에서 약욕법으로 마취 후 HCG(human chorionic gonadotropin, 어류산란유도제)를 주사하여 48시간 경과 후 생식공 주변을 손으로 압박하여 정액이 흘러나오면 주사기를 이용하여 정액을 채취하였다. 채취한 정액을 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 넣어 아이스박스에 보관하고, 채집 후 선박과 차량을 이용하여 전남대학교 여수캠퍼스 생리학 실험실로 운반한 후 인공해수(artificial seawater, ASW: 423.00 mM NaCl, 9.00 mM KCl, 22.94 mM MgCl<sub>2</sub>, 9.27 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.114 mM NaHCO<sub>3</sub>)를 정자활성액으로 사용하여 정자의 운동성을 평가하였다.

### 2. 희석액과 동해방지제

희석액에 따른 능성어와 자바리 정자의 동결보존 효과를 관찰하기 위해, 희석액은 300 mM glucose, 동해방지제는 15% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였고, 정액과의 희석액의 혼합 비율은 3:1로 하였다. 혼합된 각 정액을 straw에 주입한 후 평형시간 10분을 가진 다음 액체질소 표면으로부터 5 cm 높이에서 20분간 액체질소증기(-70~-80°C)를 이용하여 1차동결하였다. 1차동결 후 즉시 straw를 액체질소(-196°C)에 침지시켜 2차 동결한 후 액체질소통에 보관하였다. 동결 1시간 후, 5개월 후 액체질소에 동결보존했던 정액을 20°C의 온열기에 넣어 해동시켜 각각의 정자 운동성과 생존율을 확인하였다. 이 실험에 대한 간략한 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

1차, 2차 동결 처리를 하는 2단계 동결법은 동결 과정에서 정자 안의 수분이 얼게 되어 결정 현상을 나타내고, 그로 인해 정자세포가 얼음 결정에 의해 손상을 입게 되는 동결손상이 일어난다. 이러한 동결손상을 방지해 주는 것이 동해방지제인데 세포 내에 들어가 수분과 치환하게 되고 그로 인해 안정적인 정자동결이 이루어지게 된다.

### 3. 정자의 생존율 측정

동결 후 온탕기 20°C에서 해동한 정자의 생존율은 5% Eosin과 10% Nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966)염색액을 이용하였다. 소량의 해동된 정액과 5% Eosin, 10% Nigrosin을 1:2 비율로 혼합

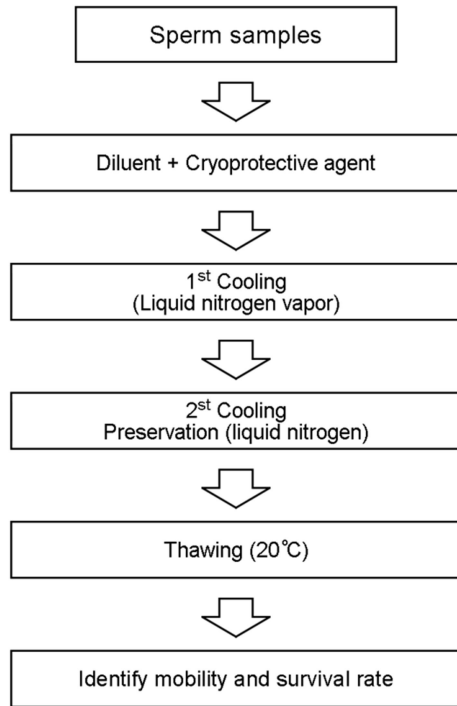


Fig. 1. Schematic diagram of sperm cryopreservation process.

하여 잘 섞어준 후, 슬라이드 글라스로 가볍게 표면을 밀어 준 다음 45°C의 즉시 온열기로 건조시켜서 생존율을 3회 반복 관찰하여 백분율로 나타내었다. 염색된 슬라이드 글라스는 광학현미경(Nikon, ECLIPSE E600, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, 관찰 시 흰색으로 나온 점 모양이 생존된 정자이며 붉은 점 모양이 죽은 정자이다. 이것은 정자가 살아있을 때에는 세포질이 알칼리성을 나타내고, 죽게 되면 세포질이 산성을 나타내게 되므로 5% Eosin과 10% Nigrosin이 산성을 염색하므로 죽은 정자가 붉은색으로 염색된다.

#### 4. 정자의 운동성 측정

동결 후 해동된 정자의 운동성을 측정하기 위하여 능성어와 자바리의 정자에 운동성을 부여하는 역할을 하는 ASW(인공해수)를 이용하여 정자를 활성화시켰다. 해동정자를 200배 확대 후 슬라이드 상에서 운동성을 평가하였고 3회 반복하였다. 운동성 평가는 생존율과 마찬가지로 광학현미경(Nikon, ECLIPSE E600, Japan)에 연결된 카메라로 동영상 촬영 후 분석하였다.

## 결 과

### 1. 능성어 정자의 운동성 및 생존율

300 mM glucose와 15% DMSO를 각각 희석액과 동해방지제로 사용하여 능성어의 정자동결보존 실험을 진행한 후 능성어 정자의 운동성 및 생존율을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같았다.

능성어 정자의 운동성은 300 mM glucose와 15% DMSO에서 동결전에 평균 80%로 가장 높은 운동성을 보였고 동결 한 시간 후에는 평균 70%, 그리고 동결 5개월 후에는 60%의 운동성을 보였다. 생존율은 동결전에 약 94%로 가장 높았고, 동결 한 시간 후에는 92%, 동결 5개월 후에는 90%로 높은 생존율 값이 지속적으로 유지되었다.

### 2. 자바리 정자의 운동성 및 생존율

300 mM glucose와 15% DMSO를 각각 희석액과 동해방지제로 사용하여 자바리의 정자동결보존 실험을 진행한 후 자바리 정자의 운동성 및 생존율을 관찰한 결과는 Fig. 3와 같았다.

자바리 정자의 운동성은 300 mM glucose와 15% DMSO에서 동결전에 100%의 운동성을 보였고, 동결 한 시간 후에는 96%, 동결 5개월 후에는 95%로 높았다. 생존율 측정 결과는 동결전에 99%로 가장 높았고 동결 한 시간 후에는 약 99%, 동결 5개월 후에는 약 98%로 높은 생존율이 지속적으로 유지되었다.

## 고 찰

정자동결보존 기술은 육상동물의 여러 종에 대해 많은 실험이 진행되었고, 그것을 통해 인간의 불임해소는 물론 주요 육상동물의 종 보존 및 산업에 이용되고 있다(Ansah et al., 1980; Donoghue and Wishart, 2000; Friedler et al., 2002; Hauser et al., 2005). 최근에는 수산동물에서도 유용한 양식 종의 산업적 활용뿐만 아니라, 기후변화로 환경이 변함에 따라 멸종 위기 종에 대한 정자보존에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다(Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993; Billard et al., 2004; DeGraaf and Berlinsky, 2004; Lim et al., 2005).

어류 정자동결보존에는 삼투질 농도, 희석액, 동해방지제, 동결 속도, 해동 속도 등이 동결보존 후, 해동 후 정자의 운동성 및 생존율에 영향을 끼친다. 이 중에서 희석액의 종류와 농도는 정자동결보존 실험에서 첫 번째 과정의 중요한 요인이며, 종에 따라 차이가 있다(Kho, 2014). 그것은 담수어류와 해수어류의 혈장내 세포의 삼투질 농도가 다르기 때문으로, 어종에 따라 적정 희석액을 써야 한다. 그 희석액이 가져야 할 중요한 조건은 정자의 운동성을 억제시키며 운동에너지인 ATP를 최소한으로 줄이는데 있으며(Lim et al., 2005), 주로 인공해수, Hanks's solution (Hanks and Wallace,

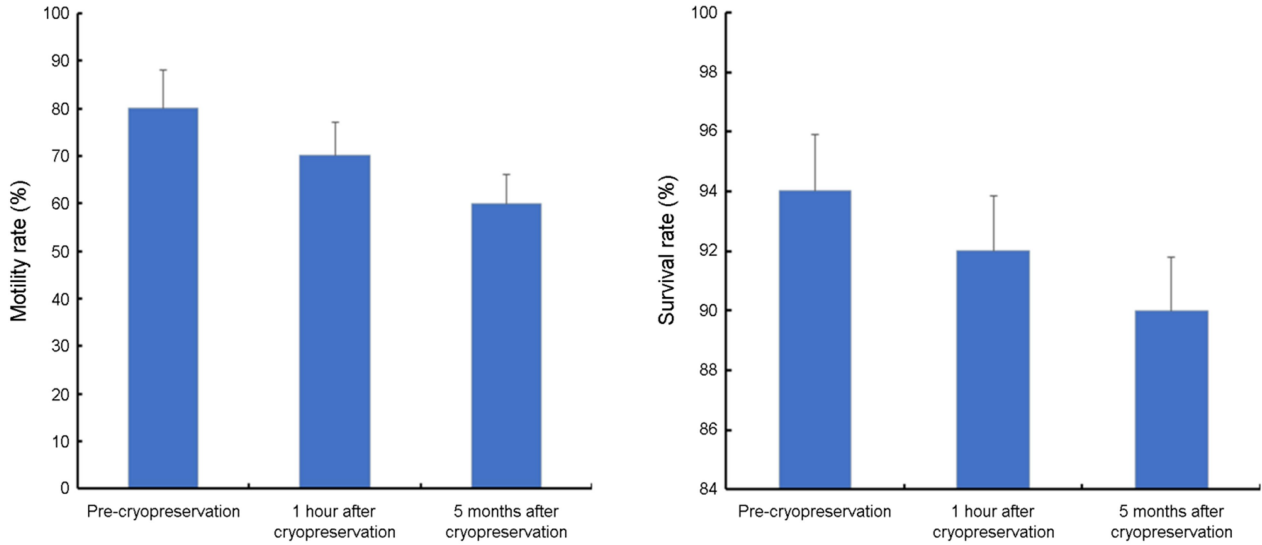


Fig. 2. Effect of diluent on motility and survival rate in the sperm cryopreservation of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*.

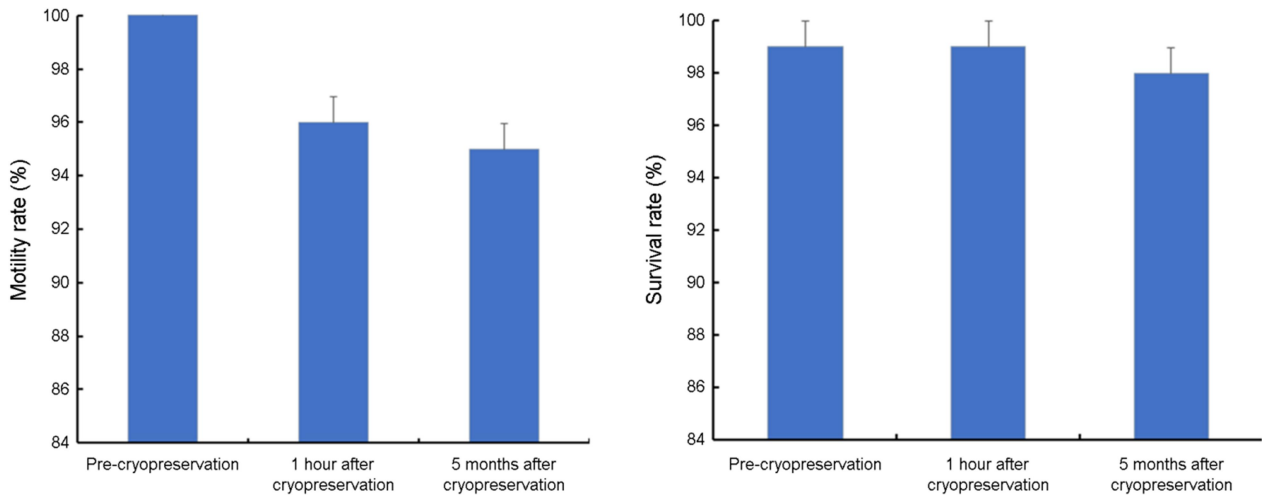


Fig. 3. Effect of diluent on motility and survival rate in the sperm cryopreservation of kelp grouper, *Epinephelus bruneus*.

1949), Ringer's solution (Ringer, 1883), Erdhal and Graham solution (Erdhal and Graham, 1984) 등이 이용되고 있다.

본 연구에서는 능성어와 자바리의 정자가 동결 전·후 운동성 및 생존율을 조사해본 결과, 300 mM glucose에서 높은 운동성 및 생존율이 나타났다. 이는 삼투질 농도와 관련이 있다(Lim et al., 2005). 실제 해수와 달리 능성어 혈장내 삼투질 농도 395 mOsm/l 이고(Song, 2004), 희석액의 삼투질 농도의 경우 300~400 mOsm/l 정도의 수치를 나타내는데 본 실험에서 희석액으로 사용했던 300 mM glucose로 삼투질 농도는 300 mOsm/l으로 추정되며 능

성어와 자바리의 정장과 희석액이 비슷한 삼투질 농도이기 때문에 보존효과가 좋았던 것으로 사료된다.

정자동결보존 실험시 주로 사용되는 동해방지제는 glycerol, DMSO와 methanol이 사용되고 있다(Gwo and Arnold, 1992; Lim and Chang, 1998; Zhang et al., 2003).

Black grouper에서 DMSO 20%를 사용했을 때 glycerol이나 methanol을 사용했을 때 보다 동결 후 정자 운동성이 활발했다(Gwo, 1993). 이처럼 본 실험에서도 DMSO를 사용하였는데, DMSO의 장점으로 해산어류의 세포내 투과속도가 빠르고, 정자의 활성

화에 적은 영향을 미치는 것으로 사료된다(Dreanno et al., 1997; Zhang et al., 2003).

자바리의 경우 DMSO 농도(5%, 7.5%, 10%)에서 정자동결후 해동된 정자에서의 수정률과 부화율에 있어 각 농도에 따른 유의차는 없었고, 정상개체의 발생률은 동결보존실험에 사용하지 않은 신선 정자와 동결정자의 각각 정상 개체 발생율은 98.4%와 97.8~95.9%로 나타났다(Oh, 2006). 한편 홍바리는 동해방지제 DMSO와 희석액 5.0%와 10.0% glucose를 사용하는 것이 홍바리 정자동결보존에 적합한 것으로 판단하고 있다(Joo, 2012). 이매패류인 피조개(*Scapharca broughtonii*) 정자동결보존 희석액은 150 mM NaCl, 300 mM glucose 등 보다 Ringer's solution이 적합하였고, 동해방지제는 DMSO 10%가 적합하였다(Rha et al., 2010). 그리고 연체동물인 북방전복의 정자동결실험에서 2.5% DMSO에서 운동성이 40.0±2.9% 전후 내외로 나타났다(Kang, 2016). 본 실험에서 진행한 능성어와 자바리 정자의 동결보존시 사용한 동해방지제 DMSO의 15% 농도에서 높은 운동성과 생존율을 보였다.

본 실험에서 능성어와 자바리 정자의 운동성 및 생존율이 희석액 300 mM glucose와 동해방지제 15% DMSO에서 5개월 동안 90%이상 지속되는 것을 확인하였다. 동결정자를 이용한 능성어와 자바리의 중요생산의 가능성을 알아보기 위하여 수정률, 부화율 조사 등의 추가 연구가 필요하다.

## 요 약

본 연구는 바리과 어류인 능성어와 자바리의 정자동결보존에 관한 연구의 일환으로서, 양식현장에서 적용할 수 있는 비교적 간단한 동결보존방법의 개발을 목적으로 적절한 희석액과 동해방지제 및 해동방법으로 정자동결후의 운동성과 생존율을 확인하고, 그 기술의 안정성에 대한 자료를 제공하려는 것이다. 능성어(Sevenband grouper, *E. septemfasciatus*)와 자바리(Kelp grouper, *E. bruneus*) 정자의 동결전, 동결 1시간 후, 동결 5개월 후에 해동정자의 운동성 및 생존율에 대한 실험을 진행하였다. 희석액 0.3 M glucose와 동해방지제로 사용한 15% DMSO에서 동결 후 온탕기 20°C에서 해동한 정자의 운동성 및 생존율이 동결보존 5개월 동안 90% 이상 지속됨을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2015 중소기업청 산학연협력 기술개발사업 과제수행의 결과로 연구 수행을 위한 실험어 및 실험 환경 관리에 도움을 주신 정석수산 이연숙 대표님께 감사드립니다.

## 참고문헌

Ansah GA, Crober DC, Buckland RB, Seftonand AE, Kennedy BW.

1980. Artificial insemination of individually caged broiler breeders. 1. Reproductive performance of males relation to age and strain of females. Poultry Sci 59: 428-437.
- Barret I. 1950. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. J Fish Res Bd Can 8: 125-133.
- Billard R, Cosson J, Noveiri SB, Pourkazemi M. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquacult 236: 1-9.
- Blom E. 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil Steril 1: 176-177.
- Chao NH, Chen HP, Liao IC. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. Aquacult 5: 389-406.
- DeGraaf JD, Berlinsky DL. 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquacult 234: 527-540.
- Donoghue AM, Wishart GJ. 2000. Storage of poultry semen. Anim Prprod Sci 62: 213-232.
- Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y, Billard R. 1997. Cryopreservation of turbot spermatozoa. Theriogenol 48: 589-603.
- Erdhal AW, Erdahl DA, Gragham EF. 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. Aquacult 43: 341-350.
- Fribourgh JH. 1966. The application of a differential staining method to 10w-temperature studies on goldfish spermatozoa. Prog Fish Cult 28: 227-231.
- Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-El R. 2002. Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. Hum Reprod 17: 3114-3121.
- Gwo JC, Arnold CR. 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: Evaluation of morphological changes. J Exp Zool 264: 444-453.
- Gwo JC. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. Theriogenol 39: 1331-1342.
- Hanks JH, Wallace RE. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration. Proc Soc Exp Biol Med 71: 196-200.
- Hara S, Canto JT, Almendras JME. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. Aquacult 28: 339-346.
- Hauser R, Yogev L, Amit A, Yavetz H, Botchan A, Azem F, Ben-Yosef D. 2005. Severe hypospermatogenesis in cases of *nonobstructive azoospermia* should we use fresh or frozen testicular spermatozoa. J Androl 26: 772-778.

- Jang YJ. 1997. Semen characteristics and sperm preservation of puffer fish, *Takifugu rubripes*. Master degree thesis, Pukyong Nat'l Univ, Busan. pp 1-3.
- Joo HS. 2012. Characteristics of reproductive physiology in blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. Ph D thesis, Jeju Nat'l Univ, Jeju. pp 82-83.
- Kang SW. 2016. Sperm cryopreservation of *Haliotis discus hannai*. Master degree thesis, Mokpo Nat'l Univ, Mokpo. pp 10-26.
- Kho KH. 2014. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. Bull Fish Sci Inst Chonnam Nat'l Univ 22: 1-4.
- Kim BH, Kim KM, Lee YD, Song CB, Rho S. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. 1. The effect of hCG on ovulation induction. J Aquacult 10: 55-61.
- Lim HK, Kho KH, Chang YJ. 1997. Effect of diluents on the short-term storage of sperm in Black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. J Kor Fish Soc 30: 211-215.
- Lim HK, Chang YJ. 1998. Effect of diluents and cryoprotectants on cryopreservation of black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) sperm. J Aquacult 11: 67-75.
- Lim HK, An CM, Son MH, Park MW, Park YJ. 2005. Effect of diluents for cold storage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm. J Kor Fish Soc 38: 232-238.
- McNiven MA, Gallant RK, Richardson GF. 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. Aquacult 109: 71-82.
- Oh SR. 2006. Seed production of longtooth Grouper, *Epinephelus bruneus* with induced sex reversal and maturation. Ph D thesis, Jeju Nat'l Univ, Jeju. pp 1-31.
- Rha SJ, Han KH, Choi MR, Kho KH. 2010. Cryopreservation of *Scapharca broughtonii* (Schrenck) sperm. Kor J Malacol 26: 255-260.
- Ringer S. 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J Physiol 4: 29-42.
- Song YB. 2004. Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ph D thesis, Jeju Nat'l Univ, Jeju. pp 120.
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J, Chen SL. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with practical methodology. Theriogenol 60: 989-996.