

넙치 전 암컷 집단 생산을 위한 연구

I. 자성발생성 이배체 유도 및 성장

김 윤 · 김경길 · 방인철 · 이종관

국립수산진흥원 어류양식과

Studies on the Production of All-Female Populations of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

I. Induction of Gynogenetic Diploid and Its Growth

Yoon KIM, Kyung-Kil KIM, In-Chul BANG, and Jong-Kwan LEE

Fish Culture Division, National Fisheries Research & Development Agency, Yangsan-gun, Kyongsangnam-do 626-900, Korea

ABSTRACT

Gynogenetic diploid of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were induced by cold shock to fertilized eggs with red seabream, *Paragus major* sperm that had been genetically inactivated with 4,800 ergs/mm² ultraviolet (UV) rays. Cold shock to the eggs at 2 °C for 45 minutes proved to be optimum condition to retain the second polar body. At this treatment, hatching rates of normal fry obtained were more than 33.8%. No different growth rates were observed up to 200 days after hatching between control and gynogenetic diploid offsprings. However, body weights of gynogenetic diploids were significantly heavier than that of control 300 days after hatching (p < 0.05). A proportion of female in gynogenetic diploid was significantly higher than that in the control (p < 0.01).

서 론

넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 분류학적으로 가자미목 (Order Pleuronectida)의 넙치과 (Family Bothidae)에 속하는 어류로서 우리 나라 전 연안, 일본 및 중국해 연안에 널리 분포하고 있다 (鄭 1977). 본 종은 성장이 빠르며 질병에도 비교적 강하고 경제적 가치가 높아 양식에 의한 생산량이 계속 증가되어 1991년도 양식 생산량은 1,905톤으로 전체 해산어 양식의 46.2%를 점하고 있다 (농림수산부 1992). 우리 나라의 넙치에 대한 양식은 초기에는 국립수산진흥원을 중심으로 인공 종묘 생산 기술이 개발되어 왔으나 (閔 1987), 최근 양식 기술의 보편화로 어민들이 종묘 생산부터 양성까지의 완전 양식이 가능하게 되었다. 그러나 과도한 설비와 인건비 및 사료비의 급상승으로 생산

성이 점차 낮아지고 있으므로 넙치 양식의 생산성을 높이기 위한 연구가 절실히 요구된다. 따라서 암컷이 수컷보다 성장이 빠른 특성을 이용하여 넙치의 전 암컷 집단을 유도할 목적으로 먼저 염색체 조작에 의한 자성발생성 이배체 넙치의 유도에 관한 연구가 필요하다.

어류의 염색체 조작에 의한 자성발생성 이배체 유도는 Hertwig effect를 이용한 것으로 Purdom (1969)이 방사선 조사에 의한 자성발생성 유도법을 pleuronectes에서 성공함으로써 그 가능성을 제시하였다. 또한, 자외선에 의한 정자의 불활성화는 Thorgaard et al. (1981)과 Onozato and Yamaha (1983)에 의하여 확립되어 잉어 (Nagy et al. 1978), 미꾸라지 (Suzuki et al. 1985a), 무지개송어 (Chourrout 1984), 참돔 (Sugama et al. 1990), 초어 (Stanley 1976) 및 연어류 (Onozato 1984) 등 다수의 어종에서 자성발생성 이배체가 유도되었다. 이때 배수화를 위한 물리적인 처리 방법은 저온 처리 (Lincoln et al. 1974), 고온 처리 (Chourrout and Quillet 1980) 및 수압 처리 (Chourrout 1984; Onozato 1984) 등이 있으나 넙치와 참돔에서는 저온 처리가 효과가 있는 것으로 알려졌다 (Tabata 1991a; Sugama et al. 1990).

한편, 넙치의 유전 육종에 관련된 연구를 보면 암수에 따른 성장의 차이 (Tabata 1991a), 성분화 (Tanaka 1987), 3배체 유도 (Tabata 1991a) 및 호르몬 처리에 의한 생리적 성전환 (Tanaka 1988) 등의 보고가 있다.

따라서, 본 연구는 이들의 연구를 기초로 하여 우리 나라에서 양식 대상으로 가장 중요한 넙치 암컷 집단의 생산을 위한 연구의 일환으로, 먼저 유전적으로 불활성화된 참돔 정자를 넙치의 난과 인공 수정시켜 암컷의 유전 인자만을 가지는 자성발생성 이배체 넙치를 유도하는데 필요한 유도 조건인 구멍과 생산된 자성발생성 이배체 넙치의 성장, 생존율 및 성비를 대조군과 비교하여 궁극적으로 전 암컷 집단의 유도에 의한 생산량 극대화의 기초 자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험은 1991년 4월 23일부터 1992년 2월 15일까지 국립수산진흥원 사육실에서 실시하였다.

1. 재 료

실험어는 국립수산진흥원 실내 사육 수조 (φ3.5 m × 높이 1.5 m)에서 사육 중이던 4~5년생 양식산 넙치의 암컷과 수컷, 그리고 5~6년생 참돔 (*Pagrus major*) 수컷을 이용하였다.

2. 방 법

2-1. Hertwig effect

성숙된 참돔 수컷의 복부를 눌러 정자를 얻은 후 ringer 액으로 50배 희석시켰다. 희석된 정액은 1개의 샬레당 (φ:90 mm) 0.5 ml씩 분주하여 자외선 조사 장치하에서 교반하면서 0~8,000 ergs/mm² (40 ergs/mm²/sec)의 자외선을 조사하였다. 조사된 참돔 정자는 성숙된 넙치 어미로부터 얻은 난과 인공 수정시켰으며, 수정란은 18℃로 유지된 부화조에서 관리하면서 수정율, 생존율 및 반수체 유도를 조사하였다.

2-2. 제 2극체 방출 억제를 위한 적정 수온 조사

4,800 ergs/mm²로 불활성화 시킨 참돔 희석 정자와 성숙된 넙치 난을 인공 수정 시킨 후 제 2극체 방출 억제를 위한 적정 처리 수온을 알기 위하여 수정후 3분부터 0, 2 및 4℃에서 각각 45분간

처리한 후 부화시까지 18℃로 관리하면서 수정율과 부화율을 조사하였다.

2-3. 자성발생성 이배체 넙치의 사육

4,800 ergs/mm²의 자외선으로 불활성화 시킨 참돔 정자와 성숙된 넙치 난을 인공 수정시켜 수정 후 3분부터 수온 2℃에서 45분 동안 제 2극체 방출을 억제하여 유도된 자성발생성 이배체 넙치의 자어를 0.5톤 polycarbonate 수조에서 사육하였다. 먹이는 부화 직후 소량의 해산 chlorella를 사육수에 혼합하였고, 부화후 3일째 부터는 rotifer를 공급하였으며, 성장함에 따라 알테미아 유생과 배합 사료를 공급하였다. 사육수의 관리는 배합 사료 공급 이전에는 지수식으로 그 이후부터는 일부 환수와 유수식으로 하였다. 실험 기간 동안의 사육 수온은 18~26℃, 용존 산소는 4.5~6.5 ppm 이었으며, 배설물은 수시로 제거하였다

2-4. 성비

성분화가 완료된 이후의 시기인 부화 후 300일째에 30마리씩 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's fluid로 고정시키고, paraffin으로 embedding 하여 5μm 두께로 절단한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색을 하였다. 암수의 판정은 현미경으로 검정하여 구분하였다.

2-5. 성장도와 생존율

부화후 40, 60, 80, 100, 200 및 300일째에 성장도를 조사하였다. 성장도는 조사시 마다 30마리씩 마취시켜 전장과 체중을 각각 0.1cm, 1mg까지 측정하였다. 유의차 검정은 Student's t-test와 x²-test로 하였으며, 생존율 조사를 위하여 매일 죽은 개체를 계수하였다.

결 과

1. Hertwig Effect

자외선 조사량에 따른 참돔 정자의 불활성화를 알기 위하여 부화 직전의 생존율을 조사하였다. 대조군의 생존율은 53% 였으나, 자외선을 조사한 경우 100~800 ergs/mm² 범위에서는 조사량이 증가할수록 생존율이 낮아져 800 ergs/mm² 에서 생존율이 0.6%로 가장 낮았다. 그러나 자외선 조사량이 1,600 ergs/mm² 이상에서는 다시 생존율이 높아져 2,400~8,000 ergs/mm² 범위에서는 대조군과 거의 유사한 생존율을 보였다. 반수체 유도율은 자외선 조사량에 따라 증가하여 800 ergs/mm² 이상의 조건에서 100% 였다 (Fig. 1).

4,800 ergs/mm²의 자외선을 조사한 처리군 및 대조군에 있어서 부화 직전의 배체형성난을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 처리군의 배체형성난은 100% 반수체 증후군으로서 기형이 였으나 대조군의 난은 정상이었다.

2. 제 2극체 방출 억제를 위한 적정 수온

유도된 자성발생성 반수체의 배수화를 위하여 4,800 ergs/mm²의 자외선으로 불활성화된 참돔 정자와 넙치의 난을 인공 수정시켜 수정 후 3분부터 0, 2 및 4℃로 각각 45분간 저온 처리한 결과, 배체 형성율은 4℃에서 77.4%로 나타나 가장 좋았으며, 정상 부화율은 2℃에서 42.7%로 가장 높았고 4℃에서는 28.9%로 가장 낮게 나타났다 (Table 1).

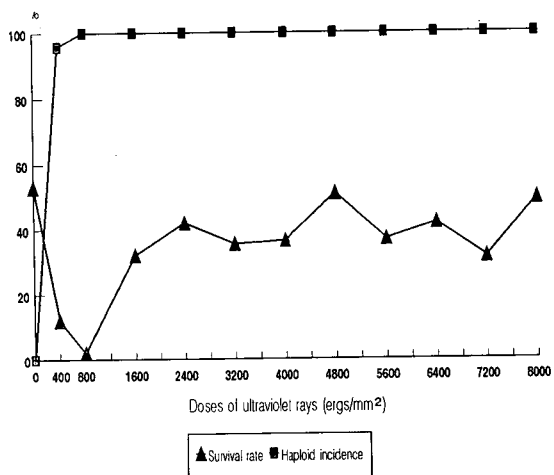


Fig. 1. Effect of UV irradiation doses on survival rate and haploid incidence of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* eggs fertilized with sperm from red seabream, *Pagrus major*.

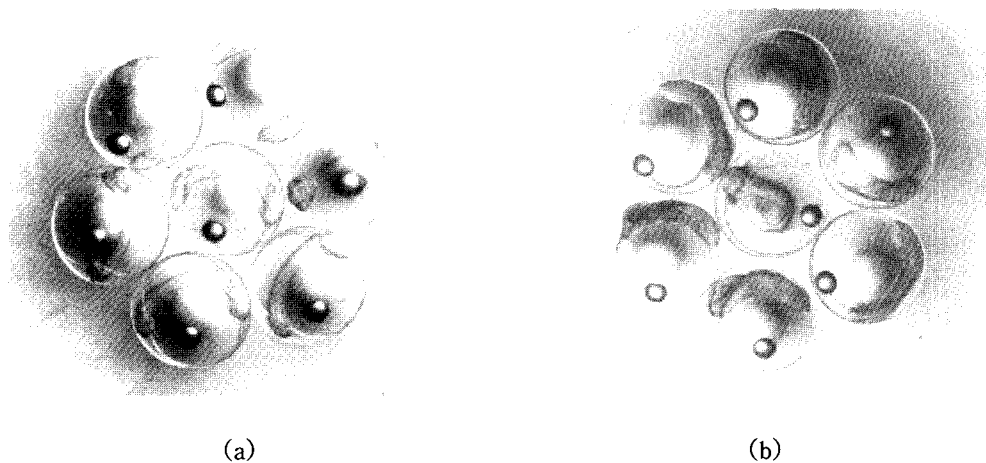


Fig. 2. Comparison of eyed embryos of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* control (a) and haploid (b).

Table 1. Effects of cold shock on the fertilized eggs of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* to retain the second polar body for the induction of gynogenetic diploid

No. of floating eggs	Temperature (°C)	Survival rate of embryos (%)	Hatching rate (%)
2,000	0	63.8	36.4
2,000	2	73.6	42.7
2,000	4	77.4	28.9

3. 자성발생성 이배체 넙치의 수정과 부화율

본 실험에서 유도된 자성발생성 이배체의 평균 수정율은 36.8%, 평균 부화율은 39.1%로 대조군의 38.5%와 41.7%에 비하여 낮았다 (Table 2).

Table 2. Fertilization and hatching rates of control and gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Female number	Fertilization rate (%)		Hatching rate (%)	
	Control	Gynogenetic diploid	Control	Gynogenetic diploid
1	39.5	42.3	37.2	33.8
2	36.8	34.6	40.5	38.9
3	39.2	33.5	47.3	44.5
Mean	38.5	36.8	41.7	39.1

4. 자성발생성 이배체 넙치의 성비

부화 후 300 일째에 조사한 암컷 비율은 Table 3에서 보는 바와 같이 자성발생성 이배체가 92.1%로 대조군의 43.6%에 비하여 높은 유도율을 보였다 ($P < 0.01$).

Table 3. Sex ratios of control and gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Tank number	Treatment	No. of fish examined	No. of female	No. of male	Female (%)
1	Control	27	11	16	40.7
	Gynogenetic diploid	29	27	2	93.1
2	Control	30	13	17	43.3
	Gynogenetic diploid	30	28	2	93.3
3	Control	30	14	16	46.7
	Gynogenetic diploid	30	27	3	90.0
Mean	Control				43.6
	Gynogenetic diploid				92.1

5. 자성발생성 이배체 넙치의 성장과 생존율

유도된 자성발생성 이배체의 성장과 생존율을 알기 위하여 부화후 40, 60, 80, 100, 200 및 300 일째 전장, 체중 및 생존율을 조사한 결과는 Table 4 및 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 부화 후 100 일째의 성장은 대조군과 처리군에서 큰 차이를 보이지 않았다. 부화 후 200 일째의 체중 성장은 자성발생성 이배체가 108.43 ± 5.59 g, 대조군이 111.47 ± 5.65 g 였으며 이때의 생존율은 각각 44.5%, 46.3%로 대조군이 성장과 생존율에서 약간 양호하였으나 유의차는 인정되지 않았다 ($P > 0.05$). 그러나 실험 종료일인 부화 후 300 일째는 자성발생성 이배체의 체중이 240.07 ± 9.84 g으로 대조군의 211.10 ± 10.5 g에 비하여 성장이 유의적으로 양호하였으나 ($P < 0.05$), 생존율은 차이가 없이 나타났다.

Table 4. Total lengths and body weights (mean \pm SE) of control and gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Days after hatching	Total length (cm)		Body weight (g)	
	Control	Gynogenetic diploid	Control	Gynogenetic diploid
40	1.45 \pm 0.03	1.26 \pm 0.02	0.032 \pm 0.002	0.027 \pm 0.002
60	5.33 \pm 0.11	5.19 \pm 0.12	1.41 \pm 0.08	1.28 \pm 0.06
80	8.79 \pm 0.14	8.61 \pm 0.10	6.58 \pm 0.25	5.94 \pm 0.22
100	11.37 \pm 0.09	11.22 \pm 0.09	14.09 \pm 0.51	13.48 \pm 0.42
200	22.54 \pm 0.30	21.17 \pm 0.33	111.47 \pm 5.65	108.43 \pm 5.59
300	26.75 \pm 0.55	27.71 \pm 0.44	211.10 \pm 10.5*	240.07 \pm 9.84*

*p < 0.05

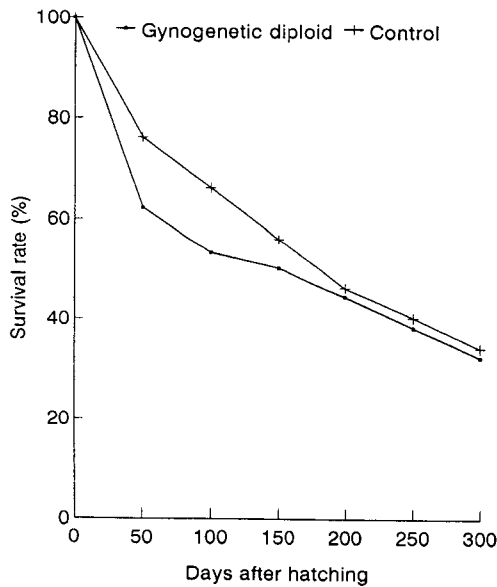


Fig. 3. Comparison of survival rate between control and gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

고 찰

참돔의 정자를 회색하여 자외선을 조사한 결과, 800 ergs/mm²에서 생존율이 0.6%로 가장 낮은 값을 보였을 뿐만 아니라 이들의 부화 자어는 100% 반수체로 명확한 Hertwig 효과가 확인되어, 800 ergs/mm² 이상의 자외선을 조사하면 참돔 정자는 완전히 유전적으로 불활성화가 되는 것으로 나타났다. 여타 어종의 경우 생존율이 가장 낮은 값을 나타내는 자외선 조사량을 보면 무지개송어는 600 ergs/mm² (Onozato and Yamaha 1983), 은어는 1,600~3,200 ergs/mm² (Taniguchi et al. 1988), 문치

가자미는 110 ergs/mm² (田畑 等 1985) 및 넙치는 600~1,380 ergs/mm² (Tabata 1991a)로 종마다 차이가 있으나, 대체적으로 담수어에 비하여 해산어의 정자 불활성에 필요한 자외선 조사량은 낮은 것으로 보고되고 있다. 이는 아마도 genome size의 차이에 의한 것으로 사료되나 앞으로 이를 입증할 수 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

제 2극체 방출 억제를 위한 방법에는 저온 처리, 고온 처리 및 수압 처리 등의 물리적인 방법이 있으나, 본 실험에서는 저온 처리 방법을 사용하였다. 넙치의 경우 처리 수온은 2℃에서 정상 부화율이 42.7%로 가장 양호하였으나, 0℃와 4℃의 저온 처리도 제 2극체 방출 억제가 가능한 것으로 나타났으며 (Table 1), 또한 저온 (0~4℃) 처리 시간도 45 분간으로 충분하였다. 이러한 결과는 Tabata (1991a)의 연구와 일치하였다. 최초 저온 처리 시작 시각은 저온 처리전까지의 수온과 관계가 있으며 본 실험 조건인 18℃에서는 수정 3분 이내면 충분하다고 판단되었으나 Tabata (1991a)는 수온 13.4~14.5℃의 경우 수정 5분 이내에만 저온 처리하면 제 2극체 방출 억제가 가능하다고 보고한 바 있다.

유도된 자성발생성 이배체의 성은 연어과 어류 (Onozato and Yamaha 1983), 미꾸라지 (Suzuki et al. 1985a, b), 백련어 (Mirza and Shelton 1988)에서 모두 암컷이었다. 그러나 감성가자미 (Purdom 1969), 금붕어 (Oshiro 1987)에서는 수컷이 나타나며 넙치에서도 수컷이 출현하여 전 암컷 생산에 의문이 제기된 바 있다 (Tabata 1991a). Tabata (1991b)는 넙치의 성결정 기작에 대한 연구에서 자성발생성 이배체가 대조군에 비하여 암컷의 비율이 높을 뿐 아니라 성분화 시기 동안 여성 호르몬 (estradiol-17β)에 의하여 대조군 보다 쉽게 암컷으로 유도됨으로써, 넙치의 유전적 성결정 기작을 male heterogamety (XX; XY)로 추정하였으나 성분화시의 환경 요인이 성결정에 영향을 미칠 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 유도된 자성발생성 이배체 암컷의 비율이 92.1%로 수컷이 7.9% 나타났다. 이것은 넙치의 성이 단순한 male heterogamety에 의한 성결정 기작이 아닐 가능성을 제시한다. 또한 Conover and Fleisher (1986)는 *Menidia menidia*의 성이 자치어기의 사육 수온에 따라 변한다고 하였다. 즉 난에서 전장 30 mm까지의 기간 동안에 사육 수온을 달리하여 사육한 결과, 저 수온에서 암컷의 비율이 높다고 보고한 바 있어 앞으로 이에 대한 많은 연구가 수반되어야 한다고 생각된다.

넙치의 성장은 부화 후 8 개월부터 암수의 성장 차이가 나타나기 시작하여 13 개월째의 경우 암컷이 수컷 체중의 1.8 배, 30 개월째에는 2~3 배가 된다 (Tabata 1991a). 본 실험에서 유도된 자성발생성 이배체 넙치를 사육한 결과, 자성발생성 이배체가 대조군에 비하여 수정율과 부화율이 약간 낮았고, 부화후 100 일째 까지의 성장과 생존율에 있어서도 역시 낮은 값을 보였다. 이러한 현상은 자성발생성 이배체가 유전적으로 불안정하여 초기의 성장과 생존율에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 그러나 부화후 300 일째에는 자성발생성 이배체의 체중 성장이 대조군에 비하여 오히려 양호하였다 (Table 4). 이것은 본 실험에서 유도된 자성발생성 이배체의 암컷 비율이 대조군에 비하여 월등히 높으므로 암컷이 수컷에 비하여 성장이 빠른 특성에 기인한 것으로 생각된다.

따라서, 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위해서는 유전적 성결정 기작의 구명과 동시에 수온과 pH 등 환경 요인이 성결정 기작에 미치는 영향과 자성발생성 이배체에 남성 호르몬을 처리하여 자성발생성 이배체 수컷의 유도 및 유도된 자성발생성 이배체 수컷과 정상 넙치 암컷과의 교배에 의한 자손 검정 (progeny test)의 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

넙치 양식의 생산성을 높이는 방법의 일환으로 수컷에 비해 성장이 빠른 암컷만의 생산을 위하여 먼저 참돔 정자를 이용한 자성발생성 이배체의 유도 조건, 성장, 생존율 및 성비를 조사하였다. 그 결과 자성발생성 이배체 넙치는 4,800 ergs/mm²의 자외선으로 불활성화 시킨 참돔 정자와 성숙된 넙치 난을 인공 수정시켜 수정 후 3분부터 수온 2℃에서 45분 동안 제 2극체 방출의 억제에 의하여 유도되었다. 유도된 자성발생성 이배체의 성장과 생존율은 부화후 200일째 까지는 대조군과 유의차가 없었으나, 부화후 300일째는 자성발생성 이배체의 성장이 대조군보다 양호하였다. 또한 자성발생성 이배체의 암컷 비율은 92.1%로 대조군의 43.6%에 비하여 월등히 높았다.

참 고 문 헌

- Chourrout, D. and E. Quillet. 1980. Induced gynogenesis in rainbow trout: sex and survival of progenies production of all-female population. *Ther. Appl. Genet.* 63:201~205.
- Chourrout, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36:111~126.
- Conover, D. O. and M. H. Fleisher. 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:514~520.
- Lincoln, R. F., D. Aulstad and A. Grammeltvedt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture* 4:287~297.
- Mirza, J. A. and W. L. Shelton. 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture* 68:1~14.
- Nagy, A., K. Rajiki, L. Horvath and V. Csany. 1978. Investigation on carp, *Cyprinus carpio*, gynogenesis. *J. Fish Biol.* 13:215~224.
- Onozato, H. 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture* 43:91~97.
- Onozato, H. and E. Yamaha. 1983. Induction of gynogenesis with ultraviolet rays in four species of salmoniforms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49 (5):693~699.
- Oshiro, T. 1987. Sex ratios of diploid gynogenetic progeny derived from five different females of gold fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(10):1899.
- Purdom, C. E. 1969. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity* 24:431~444.
- Stanley, J. G. 1976. Production of hybrid, androgenetic, and gynogenetic grass carp and carp. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105:10~16.
- Sugama, K., N. Taniguchi, S. Seki, H. Nabeshima, and Y. Hasegawa. 1990. Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56 (9):1427~1433.
- Suzuki, R., T. Nakanishi, and T. Oshiro. 1985a. Survival, growth and sterility of induced

- triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi 51(6):889~894.
- Suzuki, R., T. Oshiro and T. Nakanishi. 1985b. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture 48: 45~55.
- Tabata, K. 1991a. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*. Bull. Hyogo Pref. Fish. Exp. Stn. 28:1~134.
- Tabata, K. 1991b. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi 57(5):845~850.
- Tanaka, H. 1987. Gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 11:7~19.
- Tanaka, H. 1988. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 13:17~23.
- Taniguchi, N., S. Seki and J. Fukai. 1988. Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. Nippon Suisan Gakkaishi 54 (9):1483~1491.
- Thorgaard, G. H., M. E. Jazwin and A. R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 110:546~550.
- 田畑和男・中村一彦・五利江重昭. 1985. マコガレイの雌性發生誘起. 兵庫水試研報 23:43~47.
- 鄭文基. 1977. 韓國魚圖譜. 一志社, 서울, pp. 557~560.
- 閔炳晝. 1987. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 種苗生産에 關한 研究. 釜山水産大學 博士學位 請求論文. 175 pp.
- 농림수산부. 1992. 농림수산통계연보. 동양문화, 서울, 492 pp.