

## 넙치 전 암컷 집단 생산을 위한 연구 II. 성전환된 자성발생성 2배체 수컷의 자손 검정

방인철 · 김경길\* · 김 윤\* · 김종현\*\*

국립수산진흥원 남해수산연구소 증식과 · \*국립수산진흥원 유전육종과

\*\*국립수산진흥원 남해수산연구소 거제수산종묘배양장

### Studies on the Production of All-Female Populations of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* II. Progeny Test from Sex-Reversed Gynogenetic Diploid Male

In-Chul Bang, Kyung-Kil Kim\*, Yoon Kim\* and Jong-Hyun Kim\*\*

*Aquaculture Division, South Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Agency (NFRDA), Yeosu, Chonnam 550-120, Korea*

*\*Genetics and Breeding Division, NFRDA, Kijang-gun, Pusan 626-900, Korea*

*\*\*Koje Hachery, South Sea Fisheries Research Institute, NFRDA, Koje, Kyounghnam 656-840, Korea*

A study was carried out to test sex ratio of the progeny that were induced by the artificial fertilization between normal female and gynogenetic diploid eggs and sex-reversed gynogenetic diploid male sperm. Sex reversed gynogenetic diploid males were produced successfully in gynogenetic diploid female by immersion treatment with 17 $\alpha$ -methyltestosterone at the concentration of 10 ppb from 13.5 $\pm$ 0.22 mm to 57.6 $\pm$ 5.1 mm in total length. In F<sub>1</sub> progeny test, matings between normal females and sex-reversed gynogenetic males were not produced all female, but matings between gynogenetic diploid females and sex-reversed gynogenetic males were produced all female populations in six out of eight groups and two lots produced 96.9% and 95% female. These data showed that all-female populations were produced by crossing between gynogenetic diploid female and sex reversed gynogenetic diploid male.

Key words : Gynogenetic diploid male, Progeny test, All-female population

### 서 론

자성발생성 2배체 유도는 수컷 유전 물질의 관여없이 암컷 유전 물질만으로 생존력이 있는 개체를 생산함으로써 짧은 시간 내에 순계를 확립함은 물론, 그 종의 성결정 기구가 암컷 동형 접합(female homogamety)일 경우 전 암컷

집단을 유도할 수 있어 암수간의 경제성에 차이가 나는 종의 암컷만의 양식을 위해 이용되어 왔다 (Chourrout and Quillet, 1982).

유도된 자성발생성 2배체의 일부를 인위적으로 성 전환 시킨 자성발생성 2배체 수컷의 자손 검정을 통해 그 종의 성결정 기구를 구명하고(Scott et al., 1989; Mair et al., 1991; Trombka and Avtalion,

본 논문은 국립수산진흥원 수산 시험 연구 사업비에 의해 수행되었음.

1993), 전 암컷 집단을 생산하고자 하는 연구가 무지개송어(Johnstone et al., 1979; Okada et al., 1979; Kavumpurath and Pandian, 1993), Atlantic salmon (Johnstone and Youngson, 1984) 및 silver carp (Mirza and Shelton, 1988) 등을 대상으로 수행된 바 있다.

넙치는 암컷의 성장이 수컷에 비해 월등히 빨라 (原田 等, 1983; 中本 小野山, 1985), 실제 양식 산업에 있어서는 전 암컷 집단(all-female population) 만을 사육하는 것이 매우 중요하다(Tabata, 1991b; 金 等, 1993). 따라서 넙치의 암컷 집단만을 생산하기 위한 방법으로는 자성발생성 2배체를 유도하거나 자성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환을 유도하는 방법, 그리고 성전환된 수컷의 단순 교배를 통한 방법 등이 있다. 그 중 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체는 일본과 우리 나라에서 유도된 바 있으나(田畑 等, 1986; 田畑·五利, 1987, 1988, 1989; 金 等, 1993) 처리에 많은 시간을 필요로 하고 대량 생산이 어려운 단점이 있다. 자성호르몬 처리에 의한 전 암컷 집단 생산은 본 종의 경우 생리학적 성전환을 위해서는 종묘생산 시기에 약 2개월간 호르몬을 처리해야 하며(Tanaka, 1988; 房 等, 1995), 호르몬이 자연수계로 유출되는 환경 오염 문제가 잠재되어 있다(Gall, 1983). 그러므로 전 암컷 집단을 생산하기 위해서 우선 성전환된 자성발생성 수컷을 유도한 후 암컷과의 단순 교배만으로 간단하게 생산할 수 있는 방법이 필요하다(Tabata, 1989, 1991a; 房 等, 1995).

본 연구에서는 우선 자성발생성 2배체를 대량 생산하고 그 중 일부를 남성 호르몬으로 성전환시켜 자성발생성 수컷을 유도하였다. 이렇게 얻어진 자성발생성 수컷이 전 암컷 집단을 생산할 수 있는지의 여부를 알기 위해 성숙한 보통 암컷 및 자성발생성 2배체 암컷과의 교배를 통해 자손 검정을 실시하였고, 이를 기초로 하여 향후 전 암컷 종묘를 대량 생산하는데 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 자성발생성 2배체 유도

UV 4,800 erg/mm<sup>2</sup>의 조건으로 참돔 정자를 불활성화 시킨 정자와 성숙된 넙치 난을 인공수정시켜 수정 3분 후부터 2°C에서 45분간 저온 처리하여 자성발생성 2배체를 대량 유도하였다(金 等 1993).

### 2. 호르몬 처리에 의한 자성발생성 수컷 유도

자성발생성 2배체를 자성발생성 수컷으로 성전환하기 위하여 房 等(1995)의 방법에 따라 부화 후 45일(전장 13.5±0.22 mm)부터 107일(전장 57.6±5.1 mm) 62일간 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)을 에탄올에 녹인 다음 사육수에 섞어 호르몬의 최종 농도가 10 ppb 되도록 침지 처리(immersion)하였다.

### 3. 성장 조사

자성발생성 2배체 및 성전환된 자성발생성 수컷의 성장을 비교하기 위하여 부화 후 200일과 300일째에 30마리씩 마취시켜 전장과 체중을 각각 0.1 cm, 0.1 g 단위까지 측정하였다.

### 4. 자손 검정

실험에 사용된 친어는 1991년에 유도되어 실내에서 성숙시킨 보통 암컷 2마리와 자성발생성 2배체의 암컷 4마리, 그리고 성전환된 자성발생성 수컷 8마리였다. 자성발생성 수컷의 개체별 식별을 위하여 개체마다 고유의 번호가 내장된 전자식 tag 센서를 어체의 등근육 내에 삽입하였다. 인공수정은 보통 암컷과 자성발생성 수컷 교배군은 보통 암컷으로부터 얻은 난을 pooling하여 자성발생성 수컷 6마리의 정액을 각각 채취하여 수정시킨 6그룹이었고, 자성발생성 2배체와 자성발생성 수컷 교배군은 자성발생성 2배체 암컷들의 난을 pooling하여 자성발생성 수컷 8마리의 정액 각각에 수정하는 방법으로 하였다. 대조군으로는 보통 넙치 암수 1마리씩을 이용하여 인공

수정시켰다. 부화된 넙치 자어의 사육은 0.3톤 FRP 수조에서 사육하였고, 먹이는 부화 후 3 일째부터 rotifer를 공급하였으며 성장함에 따라 *Artemia nauplius*, 배합사료 및 모이스트 펠렛을 공급하였다. 실험기간 동안의 사육 수온은 18~28 °C였다.

### 5. 성비 분석

자성발생성 2배체, 가짜 수컷 및 가짜 수컷의 progeny 실험군의 성비 분석을 위하여 암수 구별이 쉬운 부화 후 200일째에 조직학적 방법으로 조사하였다. 조직 표본 제작은 실험어의 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's 용액에 고정한 후, paraffin 절편법에 따라 5µm 두께로 절단한 후 Harris's hematoxylin과 eosin-phro-xine으로 비교 염색을 하였다. 암, 수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였다.

### 6. 통계처리

실험결과의 유의성 검증을 위하여 성장은 Student's t-test로, 성비는  $\chi^2$ -test로 실시하였다.

## 결 과

### 1. 자성발생성 2배체와 자성발생성 수컷의 성비 및 성장

#### 1-1. 성비

부화 후 200일째 자성발생성 2배체 및 자성발생성 2배체로부터 유도된 자성발생성 수컷의 생식소 조직은 Fig. 1과 같다. 분석된 자성발생성 2배체 30마리 모두 암컷으로 판명되어 100%의 암컷 유도율을 나타내었고, 유도된 자성발생성 수컷은 분석된 30마리 모두 수컷으로 나타나 본 연구에서 이용된 10 ppb의 17 $\alpha$ -methyltestosterone 용액에 침지 처리한 성전환 방법이 매우 효과적임이 입증되었다(Table 1).

#### 1-2. 성장

자성발생성 2배체와 자성발생성 수컷의 성장

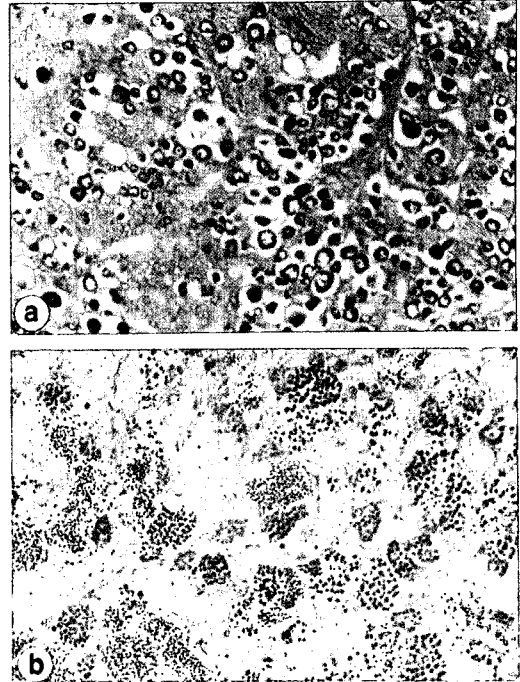


Fig. 1. Transverse sections of ovary of gynogenetic diploid female (a) and testis of sex-reversed gynogenetic diploid male (b) at 200 days after hatching ( $\times 100$ ).

을 부화 후 200일째 및 300일째에 측정된 결과는 Table 2와 같다. 200일째까지는 자성발생성 수컷의 전장 및

체중 모두에서 자성발생성 2배체보다 빠른 성장을 보였으나 300일째에는 자성발생성 2배체의 성장이 빨랐다.

### 2. 자손 검정

자성발생성 수컷의 자손 검정을 위해 부화 후 200일째 채취된 실험군의 생식소 조직 표본은 암수 구별이 용이하였으며(Fig. 2) 그 결과는 Table 3과 같다. 대조군의 성비는 분석된 18마리 중 암컷 13마리와 수컷 7마리로 나타나 수컷에 대한 암컷의 비율은 66.7%로 나타났다. 보통 암컷과 자성발생성 수컷의 교배군(6개 실험군)에서는 기대된 전 암컷 집단은 생산되지 않았고 오히려 수컷의 비율이 높게 나타나 평균 암컷

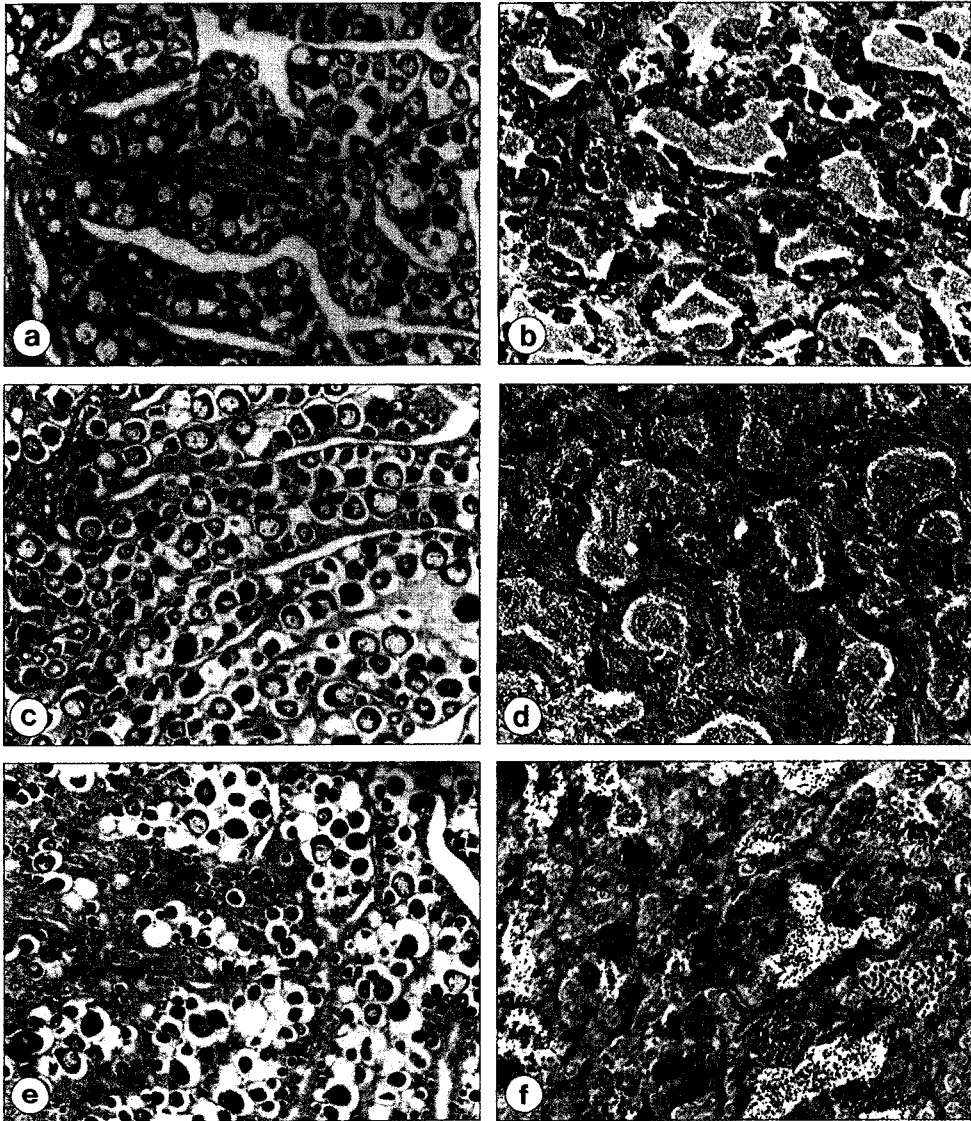


Fig. 2. Transverse sections of gonads of experimental fishes at 200 days after hatching. Ovary (a) and testis (b) of progenies between normal female and male. Ovary (c) and testis (d) of progenies between normal female and sex-reversed gynogenetic male. Ovary (e) and testis (f) of progenies between gynogenetic female and sex-reversed gynogenetic male. Magnifying power is  $\times 100$ .

비는 37.4%였다. 그러나 자성발생성 2배체 암컷과 자성발생성 수컷의 교배군은 8개 실험군중 6개 실험군이 분석된 개체 모두 암컷으로 나타났다. 그러나 2개 실험군에서는 1마리씩의 수컷이 나타나 각각 96.5%와 95%의 암컷 비율을 나

타내어 전체의 평균 암컷 유도율은 99%였다. 한편 동일한 성전환된 자성발생성 수컷 친어(tag No. 19254B 및 230D36)를 이용하여 보통 암컷과 교배시킨 자손의 경우 54.5%의 암컷이 유도되었으나, 자성발생성 2배체 암컷 친어와 교배시

Table 1. Sex ratios of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic diploid male

Treatment	No. of examined	No. of female	No. of male	Female (%)
Gynogenetic 2n	30	30	0	100
Sex-reversed gynogenetic male	30	0	30	0

Table 2. Total length and body weight of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic male in 200 and 300 days after hatching (mean±S. E.)

Treatment	200 days after hatching		300 days after hatching	
	Total length (cm)	Body weight (g)	Total length (cm)	Body weight (g)
Gynogenetic 2n	21.2±0.3	108.4± 5.6	27.7±0.4	240.1± 5.6
Sex-reversed gynogenetic male	22.5±1.7	131.5±30.9	26.8±3/2	211.1±61.3

Table 3. Progeny test induced between normal female and male, normal female and sex-reversed gynogenetic male, gynogenetic diploid female and sex-reversed gynogenetic male

Treatment	Tag number of Sex-reversed gynogenetic male	No. of examined	No. of female	No. of male	Female (%)
Control	—	18	13	7	66.0*
Normal ♀ ×	3A2762	10	5	5	50.0*
	234C28	19	6	13	31.6*
	226F65	13	5	8	38.5*
Sex-reversed gynogenetic male	191B04	9	3	6	33.3*
	19254B	11	6	5	54.5*
	230D36	30	5	25	16.7
	Mean				37.4
	226F48	71	71	0	100
	191807	12	12	0	100
Gynogenetic 2n ♀ ×	23596D	27	27	0	100
	192708	32	31	1	96.9
	230D36	20	19	1	95.0
Sex-reversed gynogenetic male	19254B	16	16	0	100
	226F65	10	10	0	100
	192B06	20	20	0	100
	Mean				99.9

\* Sex ratios not significantly different from expected 1 : 1 ratio ( $\chi^2 : P > 0.05$ ).

켜 얻어진 자손의 암컷비는 각각 100%와 95%를 나타내었다.

### 고찰

어류의 성은 성 유전자(sex gene)에 의하여 결정되며, 성의 분화는 이들 유전자의 지배하에 발생 과정 중 결정된다(Yamazaki, 1983). 본

연구 결과 대량으로 유도된 자성발생성 2배체의 암컷 유도율이 100%였고, 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 수컷의 자손 검정 결과 전 암컷 집단이 유도되어 넙치의 성결정 기구는 기본적으로 female homogamety임을 확인할 수 있었다. 그러나 金等(1993)은 유도된 자성발생성 2배체가 92.1%의 암컷임을 보고하였고, Tabata (1991a)는 유도된 자성발생성 2배체의 암컷 유

도율이 0~100%로 다양함을 보고하였다. 또한 본 연구에서 사용한 가짜 수컷과 정상 넙치 암컷을 교배하였을 때 오히려 수컷의 성비가 오히려 높게 나타났고, 더욱이 자성발생성 2배체 암컷과 교배하였을 때도 1%의 수컷이 유도되는 결과 등으로 미루어 볼 때 넙치의 성결정 양식은 매우 복잡한 형태를 가진다고 볼 수 있다. *Oreochromis aureus*의 경우 가짜 암컷(pseudofemale, ZZ) 및 정상 암컷(ZW)과 수컷(ZZ)의 교배하였을 때 낮은 수컷율(각각 68~80% 및 28~30%)을 보고한 바 있다(Melard, 1995). Melard (1995)는 이러한 결과를 상염색체 상의 열성 유전자(f)가 주된 성결정 인자(Z 또는 W)에 영향을 미쳐, 인자형이 ZZff일 경우 암컷으로 발현한다고 고찰하였다. 따라서 본 종의 명확한 성 결정 기구를 구명하기 위해서는 mitotic gynogenetic diploid를 유도하여 성전환 시킨 자성발생성 수컷의 자손 검정을 행하여야 할 필요가 있고, 100% 암컷이 유도되었던 친어의 유전자 분석이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구 결과(99%)는 Tabata (1991b)가 자성발생성 수컷을 이용하여 90.3%의 암컷 집단을 유도한 것보다는 우수한 결과로 나타났다.

또한, 성결정에 대한 환경의 영향으로는 Conover and Fleisher (1986)가 *Menidia menidia*의 성 결정에 수온이 큰 영향을 미친다고 보고하였고, Rubin (1985)은 cichlids와 peocillid의 성비가 pH에 따라 변한다고 하였다. 더욱이 본 종의 종묘 생산시기에 사육 수온을 달리하였을 때 그 성비 온도도에 따라 다르다는 사실(미발표 자료)로 볼 때 넙치의 경우 복잡한 성결정 기구를 구명하기 위해서는 환경적인 요인에 대하여도 함께 연구되어야 할 것이다. 따라서 넙치의 성의 발현에 영향을 미치는 요인으로 유전적 요인뿐만 아니라 환경 요인이 게재될 가능성도 충분히 있을 것으로 보여진다.

넙치는 부화 후 8개월부터 암수의 성장 차이가 나타나기 시작하여 13개월 쯤에 암컷이 수컷에 비해 1.8배, 30개월 쯤에는 2~3배가 된다. 본

연구에서 자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 수컷의 성장 조사 결과 200일째의 성장은 성전환된 자성발생성 수컷의 성장이 자성발생성 2배체보다 높은 값을 나타내고 있으나 300일째에는 자성발생성 2배체의 성장이 빨랐다. Tabata (1991a)는 이러한 이유로 어류의 성전환에 이용되는 steroid hormone의 residual effect로 인해 호르몬 처리군의 성장이 무처리군보다 약간 빨라진다고 보고하고 있고(김 등 1988; 房等 1995), 본 연구의 결과도 초기에 호르몬을 처리한 pseudomale 실험군의 초기성장이 자성발생성 2배체보다 빨랐을 것으로 생각된다.

한편 성전환된 자성발생성 수컷의 생식 능력이 있어 생식소 외부 형태가 정상 넙치 수컷의 그것과 크게 다르지 않았고 F<sub>1</sub>을 생산하는데 전혀 문제가 없었으며, 더욱이 자손 검정 결과에서 전 암컷 집단이 유도됨으로써 본 연구의 자성발생성 2배체 및 자성발생성 수컷의 유도는 성공적이었음을 시사한다.

지금까지의 결과로 볼 때 앞으로 전 암컷 넙치를 단순 교배에 의해 대량으로 생산하기 위해서는 우선 자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 수컷의 친어를 대량으로 확보하여 자연 산란되는 수정란을 이용하여야 할 것이다.

## 요 약

본 연구는 성전환된 자성발생성 2배체 수컷의 정액을 보통 암컷 및 자성발생성 2배체 암컷의 성숙란에 인공수정시킨 후 자손의 성비를 분석하였다. 자성발생성 수컷의 유도는 자성발생성 2배체를 전장 13.5 mm에서 57.6 mm까지 62일간 17 $\alpha$ -methyltestosterone 10 ppb의 농도로 침지 처리하여 유도하였다. 자손 검정 결과, 보통 암컷과 자성발생성 수컷 교배군의 암컷 유도율은 평균 37.4%로 낮게 나타났다. 그러나 자성발생성 2배체 암컷과 자성발생성 수컷 교배군에서는 8개 실험군 중 6개 실험군에서 100% 암컷이 유도되었고 2개 실험군에서는 96.9% 및 95% 암컷이

유도되어, 전체 99%의 암컷 유도율을 나타내었다. 이러한 결과는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷이 정상적인 생식 기능을 통해 교배되어 전 암컷 집단을 생산할 수 있음을 시사한다.

### 참 고 문 헌

- Chourrout, D. and E. Quillet, 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout : sex and survival of progenies. Production of all-triploid population. *Theor. Appl. Genet.*, 63 : 201-205.
- Conover, D. O. and M. H. Fleisher, 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in Atlantic silverside, *Menidia menidia*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43 : 514-520.
- Gall, A. E., 1983. Genetics of fish : A summary of discussion. *Aquaculture*, 33 : 383-394.
- Johnstone, R. and A. F. Youngson, 1984. The progeny of sex-reversed female Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture*, 37 : 179-182.
- Johnstone, R., T. H. Simpson, A. F. Youngson and C. Whitehead, 1979. Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture*, 18 : 13-19.
- Kavumpurath S. and T. J. Pandian, 1993. Production of a YY female guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture*, 119 : 183-189.
- Mair, G. C., A. G. Scott, D. J. Penman, J. A. Beardmore and D. O. F. Skibinski, 1991. Sex determination in the genus *Oreochromis*. I. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *Oreochromis (L.)*. *Theor. Appl. Genet.*, 82 : 144-152.
- Melard, C., 1995. Production of a high percentage of male offspring with 17 $\beta$ -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I. Estrogen sex-reversal and production of F<sub>2</sub> pseudofemales. *Aquaculture*, 130 : 25-34.
- Mirza, J. and W. L. Shelton, 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture*, 68 : 1-14.
- Okada, H. H. Matumoto and F. Yamazaki, 1979. Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45 : 413-419.
- Rubin, D. A., 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poecillid (Teleostei). *Copeia*, 1985 : 233-235.
- Scott, A. G., D. J. Penman, J. A. Beardmore and D. O. F. Skibinski, 1989. The 'YY' supermale in *Oreochromis niloticus (L.)*. and its potential in aquaculture. *Aquaculture*, 78 : 237-251.
- Tabata, K., 1989. Artificial feminization of hiramе *Paralichthys olivaceus* by administration of 17 $\beta$ -estradiol, and estimation of stage of sexual differentiation. *Bull. Hyogo Pref. Fish. Exp. Stn.*, 26 : 19-36.
- Tabata, K., 1991a. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hiramе *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 hiramе *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkishi*, 57 : 845-850.
- Tanaka, H., 1988. Effects of estradiol-17 $\beta$  on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, 13 : 17-23.
- Trombka D. and R. Avtalion, 1993. Sex determination in tilapia-A review. *Bamidgeh*, 45 : 26-37.
- 김동수·방인철·김인배, 1988. 나일틸라피아의 성분화와 호르몬에 의한 성전환. *한국양식학회지*, 1 : 53-66.
- 金潤·金庚吉·房仁哲·李種寬, 1993. 넙치 全 암컷 集團의 生産을 위한 研究. I. 雌性發生性 2倍體 誘導 및 成長. *韓國養殖學會誌*, 6 : 285-293.
- 房仁哲·金潤·金庚吉·李種寬, 1995. 넙치 全 암컷 集團의 生産을 위한 研究. I. 호르몬 處理에 의한 生理學的 性轉換. *水振研究報告*, 49 : 49-57.
- 原田輝雄·村田 修·宮下 盛·小田誠二·清水清和·上野紘一, 1983. 養殖ヒラメ의 雌雄による 成長度의 相違について. 昭和58年度日本水産學會春期大會講演.

田畑和男 · 五利江重昭, 1987. 低温ショックによるヒラメの雌性發生2倍體誘起におよぼす有效水温範圍について, 兵庫水試研報, 25: 33-35.

田畑和男 · 五利江重昭, 1988. 同一水槽内飼育による雌性發生2倍體と正常發生ヒラメの成長比較. 日水誌, 54: 1143-1147.

田畑和男 · 五利江重昭, 1989. 第2極體放出阻止型雌

性發生2倍體 年ヒラメの分離飼育における飼育特性. 兵庫水試研報, 26: 37-47.

田畑和男 · 五利江重昭 · 中村一彦, 1986. 紫外線によるヒラメの雌性發生2倍體の誘起條件. 日水誌, 52: 1901-1904.

中本幸一 · 小野山 弘, 1985. 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について. 兵庫水試研報, 23: 57-61.