

스테로이드 호르몬 침지에 의한 넙치의 성전환

방인철 · 김경길* · 김 윤*

국립수산진흥원 남해수산연구소 증식과

*국립수산진흥원 유전육종과

Sex Reversal of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) by Immersion in a Solution of Steroid Hormones

In Chul Bang, Kyung-Kil Kim* and Yoon Kim*

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

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

The effects of various concentrations of 17 β -methyltestosterone (MT) or 17 β -estradiol (E₂) on sex reversal, survival and growth rates of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were investigated. MT and E₂ were treated to juvenile flounder for 60 days from 30 (total length : 14.5 mm) to 90 (TL : 10.41~11.17 mm) days after hatching. Fish were treated with 0, 1, 10 and 100 ppb of MT or E₂ in the rearing water for 2 hours per day.

At the time of 200 days after hatching, fish were sampled to examine sex ratio. One hundred ppb of MT produced 100% male, however 1 and 10 ppm MT produced 72.5 and 87.2% males. One, 10 and 100 ppb of E₂ produced 75.5, 91.9 and 97.2% females, respectively. Survival and growth rates of each experimental group at the end treatment were not significantly different from those of the control (P>0.05).

Key words : Sex reversal, Immersion, Steroid hormones, *Paralichthys olivaceus*

서 론

넙치는 암컷이 수컷보다 월등히 빨리 성장하므로(原田 等, 1983 ; 中本 小野山, 1985), 전 암컷 집단(all-female population)을 사육하는 것은 경제적으로 많은 이익을 얻을 수 있다(田畑, 1991 ; 방 등, 1995). 전 암컷 집단을 생산하기 위한 방법은 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체를 유도하는 방법, 성 호르몬 처리에 의한 생리학적인 성전환을 유도하는 방법 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과 자성발생성 2배체 암컷과의 단순 교배에 의한 방법으로 나눌 수 있다. 그 중 자성발생성 2배체는 일본과 우리 나라에

서 성공적으로 유도된 바 있으나(田畑 等, 1986 ; 田畑 · 五利江, 1986, 1987, 1988 ; 김 등, 1993a & b), 성숙된 알을 대량으로 확보하여 처리해야 하므로 대량 생산이 어려우며, 처리 과정이 매우 복잡할 뿐만아니라 친어에 따라 암컷 생산 비율이 크게 차이나는 문제점을 가지고 있다(田畑, 1991). 단순 교배에 의해 암컷만을 생산하는 방법은 전 암컷을 생산하는 성전환 수컷 친어가 확보되어 있으면 매우 간편한 방법이지만 일반 어민이 이용하기에는 아직 많은 시간을 필요로 한다(김 등, 1994 ; 방 등, 1996). 그러나 생리학적인 성전환은 종묘생산 시기에 약 2개월간 호르몬을 처리함으로써 100%의 암컷만을 생산할 수 있어(田畑,

1989; 방 등, 1995) 단순 교배 방법보다는 일반 양식 어민이 손쉽게 이용할 수 있는 방법이다.

어류의 성전환은 Yamamoto (1953)가 *medaka* (*Oryzias latipes*)를 재료로 최초로 생리학적인 성전환을 유도한 후 주로 관상어, 틸라피아 및 연어과 어류에 집중적으로 시도되어 왔다. 현재까지 개발된 성전환 유도법은 지용성 캡슐에 호르몬을 섞어 어체 근육에로의 삽입법(implantation method)과 사료에 호르몬을 섞어 먹이는 경구 투여법(feeding method) 및 사육수에 호르몬을 희석 처리하는 침지법(immersion method) 등이 이용되고 있다. 그 중 침지법은 일반적으로 24시간 동안 호르몬이 녹아 있는 사육수 내에서 대상 어류를 처리하여야 하므로 사육수 관리 등 어려움이 있어, 이를 약간 개량하여 호르몬 처리 기간 중 매일 2시간 정도로 단시간 침지하거나 부화 직후 자어에 단시간 처리하여 높은 성전환율을 유도한 결과들을 보고하고 있다 (Donaldson and Hunter, 1982; Hunter et al., 1986; Pandian and Varadaraj, 1987; Varadaraj, 1990; 노, 1995).

따라서 본 연구는 일반 양식 어민이 이용하기에 편리한 성전환 처리 방법을 개발하기 위하여 매일 2시간 동안 침지 처리하여 성전환 유도율, 성장 및 생존율을 대조군과 비교하였고, 차후 가짜 수컷의 생산을 위해 음성 호르몬에 의한 성전환 결과도 함께 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험어는 우리 나라 연안에서 채집되어 국립 수산진흥원 거제수산종묘배양장에서 양성중이던 성숙한 친어로부터 자연산란에 의해 수거된 수정란을 이용하여 부화된 자어를 이용하였다.

2. 성전환 처리

17 α -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)

와 17 β -estradiol (E₂; Sigma, USA) 100 mg을 각각 에탄올 100 ml에 녹여 stock solution을 제조한 다음, 일정 비율로 사육수에 섞어 각 호르몬의 최종 농도가 0, 1, 10 및 100 ppb가 되도록 하여 방 등(1995)의 방법에 따라 부화 후 30일(전장 1.35 cm)부터 90일 까지(전장 10~13 cm) 2개월간 매일 2시간동안 침지 처리하였다. 사육 방법은 유수식으로 하였고, 호르몬 처리 중에는 aeration을 강하게하여 수조 내 농도별 환경수가 고루 분포하고 수중의 용존산소가 부족하지 않게 하였다. 처리는 50 l 용량의 사각 플라스틱 수조에 그물가두리(40 cm×25 cm×25 cm)를 이용하였으며, 성전환 처리 후부터 실험 종료 시까지는 1톤 용량의 FRP 수조에서 사육하였다. 실험 기간 중의 사육 수온은 18~20℃를 유지하였다.

3. 성전환 유도율 분석

생식소를 조직학적 방법으로 쉽게 확인할 수 있는 시기인 부화 후 200일째에 성전환 유도율을 분석하였다. 각 개체별로 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 슬라이드에 압착 표본을 만든 다음 현미경으로 검경하여 암수를 구분하거나, 생식소의 일부를 파라핀 상비에 의한 조직학적 방법으로 검경하는 두가지 방법을 함께 사용하였다.

4. 성장 및 생존율

처리 종료시(부화 후 90일째)에 성장 및 생존율을 조사하였다. 성장은 조사시 마다 처리군 당 30마리씩 lidocaine-HCl을 사용하여 마취시켜 전장과 체중을 0.01 cm, 0.01 g 단위까지 각각 측정하였다.

5. 통계처리

실험결과에의 성장은 Student t-test로 평균간의 유의성을 검정하였으며, 성비는 χ^2 -test를 실시하였다.

결 과

1. 성전환

부화 후 200일째의 생식소 조직을 슬라이드에 압착하여 현미경으로 관찰한 결과 암수는 쉽게 구별되었고(Figs. 1a & 1b), 이와 병행하여 조직학적 방법으로 분석한 개체의 성비는 압착법에 의한 성비 분석 결과와 일치하였다(Figs. 1c & 1d).

조직학적 분석을 통한 성전환 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 대조군의 성비는 암컷이 53.3%, 수컷이 46.7%로 나타나 거의 1:1의 성비를 보였다. MT 처리군의 경우 1 및 10 ppb 처리군에서 72.5%, 87.2%의 수컷이 유도되었고, 특히 가장 높은 농도인 100 ppb 처리군에서는 100%의 수컷이 유도되었다. 이러한 결과로 볼 때 호르몬 농도가 높아질수록 수컷의 비율이 높게 나타나는 농도 의존성을 보였다. E₂ 처리군에 있어서도 MT 처리군과 마찬가지로 암컷 비율은 호르몬 처리군에서 현저하게 높아져 1 ppm 처리군이 75.5%, 10 ppm 처리군이 91.9%, 그리고 100 ppm 처리군에서는 97.2%의 높은 암컷 비율을 나타내어 농도 증가에 따라 암컷 비율이 높게 나타났다.

2. 생존율 및 성장

호르몬 처리 종료시(부화 후 90일)의 생존율 및 성장 결과를 Table 2에 나타내었다. 생존율

은 대조군이 80%, MT 처리군이 72~75%로 대조군보다 낮게 나타났으나 유의한 차이는 없었고, E₂ 처리군의 경우 81.4~88.6%의 생존율을 보여 대조군보다 약간 높은 생존율을 나타내었다.

처리종료시의 성장에 있어서 처리군의 전장은 10.23~11.71 cm로 대조군의 전장 10.97 cm와 큰 차이를 보이지 않았고, 체중도 역시 처리군의 체중은 10.45~12.67 g으로 대조군의 체중 12.58 g에 비해 약간 작았으나 유의한 차이는 없었다(P>0.05). 따라서 처리 종료시의 호르몬 종류와 농도에 따른 처리군과 대조군간의 성장차는 나타나지 않았다.

고 찰

성 호르몬의 단시간 침지로 어류의 성전환을 유도한 연구 결과로 Hunter et al. (1986)은 coho salmon과 chinook salmon 부화 자어를 200~1,600 µg/l의 농도로 2시간 동안 처리하여 66~96%의 암컷을 유도하였고, 노(1995)는 부화 12일 된 nile tilapia 자어를 24시간 동안 MT 500 ppb로 침지 처리하여 85.2%의 수컷을 유도하였다. 또한 Goetz et al. (1979)과 Donaldson and Hunter (1982)는 coho salmon의 발안난부터 먹이불임 시기까지 침지 처리와 경구 투여를 병행하여 94~100%의 암컷을 유도한 바 있다. Pandian and Varadaraj (1987), Vara-

Table 1. Effects of various concentrations of 17 β -methyltestosterone (MT) and 17 β -estradiol (E₂) in the rearing water on sex reversal of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Treatment	Hormone dose*	No. of fish examined	No. of males (%)	No. of females (%)
Control	0	60	28 (46.7) ^a	32 (53.3) ^a
MT	1	51	37 (72.5) ^b	14 (27.5) ^b
MT	10	39	34 (87.2) ^b	5 (12.8) ^b
MT	100	43	43 (100.0) ^b	0 (0.0) ^b
E ₂	1	49	12 (24.5) ^b	37 (75.5) ^b
E ₂	10	55	5 (9.1) ^b	50 (91.9) ^b
E ₂	100	36	1 (2.8) ^b	35 (97.2) ^b

Values in same column having the equal superscripts are not significantly different (P>0.05).

* µg/l in rearing water for 2 hrs per day

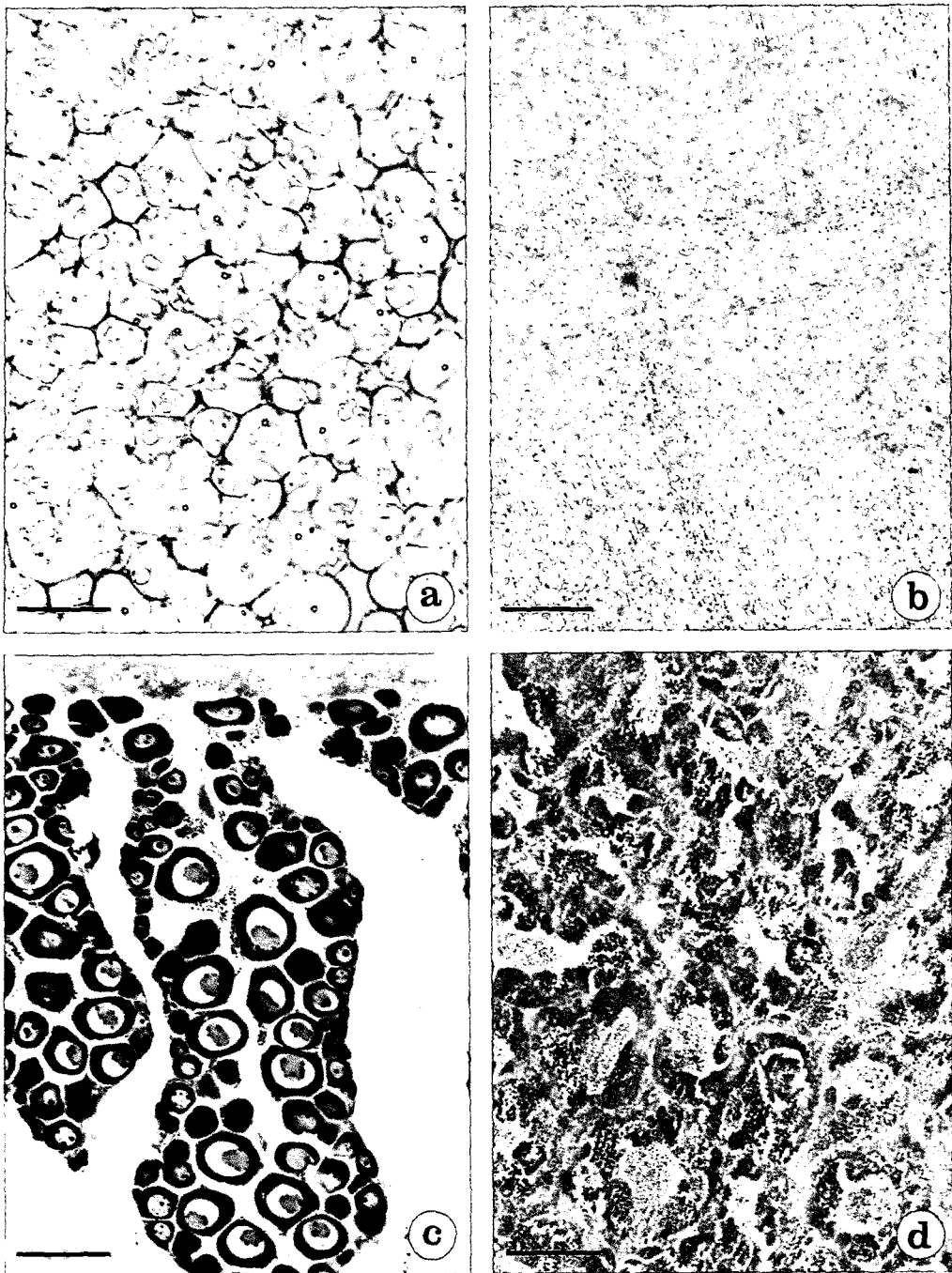


Fig. 1. Gonads of experimental fishes at 200 days after hatching. Squash preparation of the ovary (a) and testis (b). Transverse section of the ovary (c) and testis (d). Scale bar indicate 100 μ m.

Table 2. Effects of various concentrations of 17 α -methyltestosterone (MT) or 17 β -estradiol (E₂) in the rearing water on survival, total length and body weight of olive flounder at the end of treatment period

Treatment	Hormone dose*	Survival (%)	Total length (cm)	Body weight (g)
Control	0	80.0	10.97 \pm 0.73 ^a	12.58 \pm 2.60 ^a
MT	1	73.6	10.84 \pm 0.70 ^a	11.94 \pm 2.58 ^a
MT	10	75.0	10.94 \pm 0.93 ^a	10.87 \pm 2.85 ^a
MT	100	72.0	10.41 \pm 0.72 ^a	10.45 \pm 2.41 ^a
E ₂	1	88.6	10.98 \pm 0.76 ^a	12.17 \pm 2.58 ^a
E ₂	10	83.6	10.23 \pm 0.82 ^a	12.67 \pm 2.68 ^a
E ₂	100	81.4	11.17 \pm 0.75 ^a	12.45 \pm 2.64 ^a

Values in same column having the equal superscripts are not significantly different (P>0.05).

* μ g/l in rearing water for 2 hrs per day.

daraj and Pandian (1987) 그리고 Varadaraj (1990)는 nile tilapia를 대상으로 부화 10일된 자어를 5 μ g/l 농도의 MT에 10일간 침지 처리하여 100%의 수컷을 유도하였음을 보고하였다. 넙치의 경우 방 등(1995)은 스테로이드 호르몬을 60일간 침지 처리하여 100% 암·수를 유도한 바 있다. 본 연구 결과에서도 Table 1에 나타나듯이 60일간 매일 2시간씩 침지 처리하여 MT 처리군에서 100%의 수컷을 그리고 E₂ 처리군에서는 97.2%의 암컷을 유도하여 기존의 24시간 침지 처리 결과와 비교하였을 때 성전환 유도율에 있어서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

호르몬 처리시 최적 처리 농도는 종마다 다르다 (Yamazaki, 1983). 특히 고농도로 처리시 MT의 경우 aromatase에 의한 자성화 현상(Goudie et al., 1983)이 나타나며, E₂의 경우 생식소 이상 개체(田畑, 1989) 또는 낮은 생존율과 함께 척추 이상의 기형어(高橋, 1981; 방 등, 1995)가 나타남을 보고하였으나 본 연구 결과 위와 같은 어떠한 증상도 나타나지 않았다. 또 처리 종류시의 생존율을 보면 Tanaka (1988)은 6~24%의 생존율을 보고하였고, 방 등(1995)은 경구 투여시 40.5~68.5% 및 침지 처리시 60.5~78.5%의 생존율을 보고하였으나 본 연구에서는 모든 실험군이 72.0~88.6%로 이전의 연구보다는 월등히 높게 나타났는데 이는 실험실 내에서의 종묘 생산 방법이 확립된 결과일 것으로 생각된다.

따라서 본 성전환 처리 방법은 이전의 24시간 침지 처리방법과 비교할 때 생존율 및 성장이 훨씬 좋을뿐만 아니라 성전환 유도율에도 큰 차이가 없어 매우 효과적인 방법으로 생각된다. 그러나 E₂ 처리군에서 100% 암컷을 유도하지 못하였으므로 (Table 1) 앞으로 본 연구에서 설정한 최대 농도인 100 ppb보다 고농도로 처리하여 최적 농도를 구하는 것이 바람직할 것이다. 호르몬 처리에 의한 성장 효과를 보면 전장파 체중 모두에서 대조군과 처리군간에는 유의한 차이가 없었다. 그러나, 고농도의 MT 처리군은 여타 처리군보다 낮은 체중 성장을 보였는데 이는 암수에 따른 성장차라기 보다는 호르몬에 의한 영향 때문으로 생각된다.

본 종의 성전환 유도시 처리기간이 종묘생산 시기와 중복되므로 24시간 침지 처리를 하는 것은 현재의 종묘생산 방법으로 볼 때 수질관리에 많은 어려움이 있을 것으로 보여 24시간 침지 처리와 비교하여 성전환율이 큰 차이가 없고, 성장 및 생존율이 좋은 단시간 침지법을 이용하는 것이 효과적일 것으로 평가되었다. 그리고 단순교배에 의한 전 암컷 수정란을 이용한 전 암컷 종묘 생산 방법은 아직 친어 확보가 이루어지지 않은 양식 어민이 이용하기에는 어려움이 있으므로 본 연구 방법을 이용하여 2개월간 매일 2시간씩 침지 처리를 함으로써 암컷 종묘를 대량으로 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

넙치의 전 암컷 집단 생산을 위한 연구의 일환으로 실제 양식 어민이 손쉽게 이용할 수 있는 성전환 처리방법을 개발하고자, 부화 후 30 일째부터 90일까지 60일간 17 α -methyltestosterone (MT)과 estradiol-17 β (E₂)을 1~100 ppb로 매일 2시간 동안 침지하여 성전환을 유도하였다. 부화 후 200일째의 실험군의 성비는 대조군에서 수컷이 46.7%로 나타나 암수비가 거의 1:1이었으나, MT에 의한 수컷 유도율은 1 ppb 처리군이 72.5%, 그리고 10 ppb 처리군이 87.2%로 나타났고, 특히 100 ppb 처리군의 경우 100%로 나타났다. E₂에 의한 암컷 유도율은 1 ppb 처리군에서 75.5%, 10 ppb 처리군에서 91.9%였고, 가장 높은 농도인 100 ppb에서는 97.2%로 나타났다. 호르몬 농도에 따른 각 처리군별 생존율 및 성장은 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

참고문헌

- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter, 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39 : 99-110.
- Goetz, F. W., E. M. Donaldson, G. A. Hunter and H. M. Dye, 1979. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 17 : 267-278.
- Goudie, C. A., B. D. Render, B. A. Simco and K. B. Davis, 1983. Feminization of channel catfish by oral administration of steroid sex hormones. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112 : 670-672.
- Hunter, G. A., I. I. Solar, I. J. Baker and E. M. Donaldson, 1986. Feminization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion of alevins in a solution of estradiol-17 β . *Aquaculture*, 53 : 295-302.
- Pandian, T. J. and K. Varadaraj, 1987. Techniques to regulate sex ratio and breeding in tilapia. *Curr. Sci.*, 56 : 337-343.
- Tanaka, H., 1988. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, 13 : 17-23.
- Varadaraj, K., 1990. Production of monosex male *Oreochromis mossambicus* (Peters) by administering 19-nore-tosterone acetate. *Aqua. Fish. Manage.*, 21 : 133-135.
- Varadaraj, K. and T. J. Pandian, 1987. Masculinization of *Oreochromis mossambicus* by administration of 17-methyl-5-androsten-3-17-diol through rearing water. *Curr. Sci.*, 56 : 412-413.
- Yamamoto, T., 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.*, 123 : 571-594.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33 : 329-354.
- 김동수·김종현·조재윤·문영봉·조기재, 1993a. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 자성발생 이배체 유도. *한국유전학회지*, 15 : 179-186.
- 김동수·문영봉·정창화·김봉석·이영돈, 1994. 전 암컷 2배체 및 3배체 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생산. *한국양식학회지*, 7 : 159-164.
- 김 윤·김경길·방인철·이종관, 1993b. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연구. I. 자성발생 이배체 유도 및 성장. *한국양식학회지*, 6 : 285-293.
- 노충환, 1995. 17 α -Methyltestosterone의 침적법에 의한 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 성전환. 부산수산대학교 석사학위 청구논문.
- 방인철·김 윤·김경길·이종관, 1995. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연구. II. 호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환. *수진연구보고*, 49 : 49-57.
- 방인철·김경길·김 윤·김종현, 1996. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연구. III. 성전환된 자성발생 2배체 수컷의 자손 검정. *한국양식학회지*, 9 : 125-132.
- 高橋裕哉, 1981. 性分化と性轉換-魚類 兩生類, ホルモンと生殖(日本比較内分泌學會編). 學會出版センター, 東京, pp. 23-58.
- 原田輝雄·村田 修·宮下 盛·小田誠二·清水清和·上野絃一, 1983. 養殖ヒラメの雌雄による成長度の相違について. 昭和58年度日本水産學會春季大會講演.

- 田畑和男, 1989. β エストラジオールによるヒラメの人為的雄化と性分化時期の推定. 兵庫水試 研報, 26: 19-36.
- 田畑和男, 1991. ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28: 1-134.
- 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発生2倍體誘起におよぼす有効水温範囲について, 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発生2倍體と正常発生ヒラメの成長比較. 日本誌, 54: 1143-1147.
- 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発生2倍體の誘起條件. 日本誌, 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.