

성스테로이드 호르몬과 고수온 처리가 조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 성분화에 미치는 영향

이치훈 · 나오수 · 여인규* · 백혜지** · 이영돈
제주대학교 해양연구소, *제주대학교 해양생산과학부, **국립수산진흥원

Effects of Sex Steroid Hormones and High Temperature on Sex Differentiation in Black Rockfish, *Sebastes schlegeli*

Chi Hoon LEE, Oh Soo NA, In Kyu YEO*
Hea Ja BAEK** and Young Don LEE

Marine Research Institute, Cheju National University, Cheju-do 695-810, Korea

*Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju-do 695-810, Korea

**National Fisheries Research and Development Institute, Kijanggun, Pusan, 619-900, Korea

This study investigated the effects of estradiol-17 β (E₂), 17 α -methyltestosterone (MT) and high temperature (WT) on gonadal sex differentiation in black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Fish were reared to oral administration of E₂ at nominal concentrations of 20, 40 and 60 μ g/g diet, and MT at nominal concentration of 20 and 50 μ g/g diet from 56 days to 77 days after parturition. In the treatment of WT, water temperature of the breeding tanks ranged 27.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C more than 10 $^{\circ}$ C approximately, in comparison to the control and other experimental group. In the process of sex differentiation until 56 days after parturition, gonads were composed of mostly gonial cells, sexually undifferentiated. In contrast, 128 days after parturition, the ovaries were composed of ovarian cavity and lamellae, and oogonia and perinucleolus oocytes were distributed in the lamellae of ovary, and the testes were composed of a number of seminiferous tubule, and spermatogonia were distributed in the seminiferous tubule, and also melanophore scattered in the matrix layer of testis. In the sex ratio, more females than male were observed from E₂ treatment groups when compared to the control, but more males than females were observed from MT and WT treatment groups when compared to the control. In the results of the present study, the concentration and kinds of the sex steroid hormones, and also the rearing high temperature caused to the factor of sex determination in the process of sex differentiation of black rockfish.

Key words: *Sebastes schlegeli*, Sex differentiation, Estradiol-17 β , 17 α -methyltestosterone, High temperature.

서 론

어류의 성결정은 크게 유전적인 성결정과 생리적인 성결정 그리고 환경적인 성결정으로 나누어 생각해 볼 수 있다. 유전적인 성결정은 이형 성염색체에 의하여, 생리적인 성결정은 성스테로이드 호르몬에 의하여 이루어진다. 그리고 환경적인 성결정은 수온, pH, 사육밀도 및 영양상태 등 외부환경요인에 의하여 유도된다 (Yamazaki, 1983; Abucay et al., 1999). 그러나, 최근에 들어 Polychlorinated biphenyls (PCBs), Nonylphenol, Bisphenol 및 Dioxin 등 내분비계 장애물질 (endocrine disrupter chemicals, EDC)에 노출되었을 때에도 어류의 성결정에 영향이 미친다는 연구가 보고되고 있다 (Howell et al., 1980; Gray and Metcalf, 1997). 그리고 최근 들어 EDC가 수생생물의 번식과 성의 연속성에 미치는 영향을 분석하기 위해, 어류의 성분화에 관한 연구들이 진행되고 있는 실정이다 (Na, 1999).

어류의 성은 유전자 조작에 의해 조절이 가능하나 성염색체가 형태적으로 구별될 수 있는 종은 한정되어 있고 (Ojima, 1989), 또한 성스테로이드 호르몬의 종류와 농도 그리고 사육 수온 등은 성결정을 좌우하는 요인이 된다 (Lee et al., 1994).

따라서, 이 연구는 성적으로 미분화된 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 치어에 내분비 요인으로서 성스테로이드 호르몬인 estradiol-17 β (E₂)와 17 α -methyltestosterone (MT)의 경구투여 그리고 환경요

인으로서 고수온 처리를 하여 성분화에 미치는 영향을 번식 생물학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 사육

이 연구에 사용된 조피볼락 치어는 제주대학교 해양연구소에서 사육중인 조피볼락 암컷 어미 (체중, 2.2~2.9 kg)에서 1998년 2월 19일에 출산된 자어로서, 원뿔형 중앙 배수 장치를 한 FRP 원형 수조 (ϕ 300 \times 90 cm)에서 사육하였으며, 먹이는 rotifer, *Artemia nauplii* 및 배합사료를 성장 단계에 따라 조절하여 공급하였다. 실험어는 출산 후 46일에 100 l (60 \times 30 cm) 원형수조로 옮겨 10일간 예비 사육하였고, 예비 사육기간 중 체형이 비정상적인 개체와 성장차이가 뚜렷한 개체를 선별 제거하였다. 실험어는 출산 후 56일에 100 l (ϕ 60 \times 30 cm) 원형수조에 실험구 당 100마리씩 수용하여 72일간 사육하였고, 사육기간중 사육수온은 14.0~17.5 $^{\circ}$ C였다. 각각의 실험은 2회 반복 수행하였다.

2. 성스테로이드 호르몬과 고수온 처리

성스테로이드 호르몬과 고수온 처리시키는 Lee et al. (1996)의 성분화 결과를 참고하여 성분화가 일어나기 전 출산 후 56일 (전장 2.71 \pm 0.30 cm, 체중 0.28 \pm 0.07 g)부터 출산 후 77일 (전장 5.09

± 0.41 cm, 체중 1.87 ± 0.42 g)까지 21일간이었다. 성스테로이드 호르몬은 E₂ (Sigma, USA)와 MT (Sigma, USA)을 사용하였다. E₂ 처리구에서는 각각 20, 40, 60 $\mu\text{g/g}$ diet 농도로 경구 투여하였다. MT 처리구에서는 각각 20, 50 $\mu\text{g/g}$ diet 농도로 경구 투여하였다. 호르몬 투여 방법은 실험구별로 호르몬을 99.9% ethyl alcohol (Hayman Ltd., U.K.) 10 ml에 용해한 후 사료에 흡착시켜 약 1시간 냉건시킨 후 냉장 보관하면서 공급하였다. 대조구는 사료에 호르몬을 첨가하지 않은 동일량의 ethyl alcohol만을 흡착시켜 공급하였다. 실험 사료 공급은 실험구별로 하루 13~15g씩 일주일에 100g을 공급하였고, 3주간 행하였다. 그 후에는 실험구별로 동일량의 일반 시판용 사료를 공급하였다. 고수온 사육 처리구에서는 수온 변화에 대한 스트레스를 최소화하기 위해 처리 개시 이틀 전부터 사육 수온을 시간당 1~2°C씩 전기히터 (1 kw)로 서서히 조절하여 $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 사육하였다. 고수온 처리종료 후 6월 26일 (출산 후 128일)까지 수온 $14.0 \sim 17.5^\circ\text{C}$ 로 계속 사육하였다.

3. 성비분석

모든 실험어의 암수구별은 출산 후 128일된 개체의 생식소에 대한 조직학적 관찰에 의하였고, 이 결과로 성비를 분석하였다. 생식소는 조직학적 관찰을 위해 Bouin 액으로 고정시켰고, 자동조직파라핀유도기 (Richertjung, Histokinett 2000)를 이용하여 파라핀 유도과정을 거쳐 5 μm 로 절편을 만든 후 Hansen's haematoxyline과 0.5% eosin에 비교 염색하였다. 암수는 생물현미경 (Carl Zeiss, HBO 50)을 이용, 생식세포를 관찰하여 구분하였고, 성비는 이론적인 암수 1:1의 비율로부터 χ^2 -test (Yate's Correction)를 실시하였다.

결 과

1. 원시생식소의 형성

출산 후 56일된 전장 2.71 ± 0.30 cm, 체중 0.28 ± 0.07 g 개체들의 생식소는 후복막 쪽에 원시생식소 (primitive gonad)를 형성하고 있었다 (Fig. 1-A). 그리고 이 원시생식소는 체세포 무리와 원시생식소 기질의 섬유성 간층 사이에서 분포하는 직경 $11.3 \sim 13.8 \mu\text{m}$ 크기의 생식원세포 (gonial cell)들로 구성되어 있었다 (Fig. 1-B).

2. 생식소의 외부형태

출산 후 128일된 전장 8.60 ± 0.45 cm, 체중 9.80 ± 1.43 g 개체들의 생식소를 절취하여 처리구와 대조구를 비교하였을 때, 생식소의 외부형태가 기형인 개체들은 없었고, 흑색색소가 침착된 생식소와 침착 안된 생식소로 구분되었다. 생식소를 조직학적으로 관찰한 결과, 흑색색소가 침착된 것은 정소, 흑색색소가 없는 것은 난소로 분화되어 육안으로 암수의 식별이 가능하였다 (Fig. 1-C).

3. 성스테로이드 호르몬과 고수온 처리에 의한 성분화

1) 생식소발달

출산 후 128일된 전장 8.60 ± 0.45 cm, 체중 9.80 ± 1.43 g 개체들의 생식소를 조직학적으로 관찰한 결과 처리구와 대조구의 생식소

발달양상이 유사하였다. 정소는 많은 정세관으로 이루어졌고, 이들 세관 내에는 $10.0 \sim 13.5 \mu\text{m}$ 의 정원세포들이 무리를 지어 분포하고 있다. 그리고 정소의 수질층과 기부에는 흑색 색소들이 드문드문 분포하고 있다 (Fig. 1-D). 난소는 난소강 형성과 함께 난소박판이 여러 개로 분기하여 발달하고 있으며, 이들 난소박판의 융기부에는 $10 \mu\text{m}$ 내외의 난원세포 무리들과 난경 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 의 주변인기 단계의 초기 난모세포들이 분포하고 있었다 (Fig. 1-E).

2) 성스테로이드 호르몬 처리

성스테로이드 호르몬 처리에 의한 성비 결과는 Table 1과 같다. 대조구는 암컷과 수컷의 성비가 1:1.07로 이론적인 암수 1:1의 성비와 유의차가 없었다 ($P > 0.05$). 반면에, E₂ 20, 40 및 60 $\mu\text{g/g}$ diet 처리구에서 암수 성비는 각각 3:1, 5:1, 11:1였고, 이론적인 암수 1:1의 성비에 대한 χ^2 test 결과 모든 처리구에서 유의하게 나타났다 ($P < 0.001$). 그리고 암컷의 비율은 호르몬의 처리농도가 증가할수록 높게 나타났다. MT 20, 50 $\mu\text{g/g}$ diet 처리구는 전 개체가 수컷으로 분화되었고, 호르몬 처리농도에 따른 성비의 차이는 없었다.

3) 고수온 처리

고수온 처리에 의한 성비 결과는 Table 1과 같다. 17.5°C 에서 사육한 대조구는 이론적인 암수 1:1의 성비와 유의차가 없었다 ($P > 0.05$). 반면에, 고수온 처리구에서의 암수의 성비는 1:19로 수컷의 출현이 높았다 ($P < 0.001$).

고 찰

성스테로이드 호르몬은 크게 생체내 대사계에 존재하는 천연호르몬과 생체내 대사계에 존재하지 않는 합성호르몬 두 가지로 알려져 있으며, 많은 연구자들이 합성호르몬이 천연호르몬보다 강한 성전환 효과를 보인다고 보고하고 있다 (Hishida and Kawamoto, 1970; Yamamoto and Onitake, 1975). 웅성호르몬 중 MT는 수컷 유도자 (male inducer)로 널리 사용되어 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나, 고농도의 MT 처리시 aromatase에 의해 자성화 현상이 나타난다는 연구도 보고되고 있다 (Goudie et al., 1983). Nakamura (1975)는 *Tilapia mossambica*에 1,000 $\mu\text{g/g}$ 의 고농도로 MT를 처리한 경우 100% 수컷이 유도되지 않았고, 반면에 50 $\mu\text{g/g}$ 의 저농도로 MT를 처리한 경우 100% 수컷이 유도되었다고 보고하였다. 이 연구에서도 조피볼락을 대상으로 MT 20과 50 $\mu\text{g/g}$ diet의 농도로 경구 투여하였을 때, 처리구 전 개체가 수컷으로 유도되었다. 그러나 Hackmann and Reinboth (1974)은 *Hemihaplochromis multicolor*에 11-ketotestosterone을 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/l}$ 의 저농도로 침적 처리하였을 때, 생식소의 웅성화가 일어나지 않았다고 보고하였다. 이처럼 연구 결과의 차이가 보이는 이유는 호르몬의 종류, 처리 방법 및 처리 농도 또는 종 특이적인 차이에 의한 것으로 생각된다.

그리고 E₂를 처리하여 자성화를 유도한 연구에서는 *Salvelinus fontinalis*에 20 mg/kg diet 농도로 경구 투여한 결과 100% 암컷이 유도되었으며 (Johnstone et al., 1978), Kim et al. (1993)은 부화

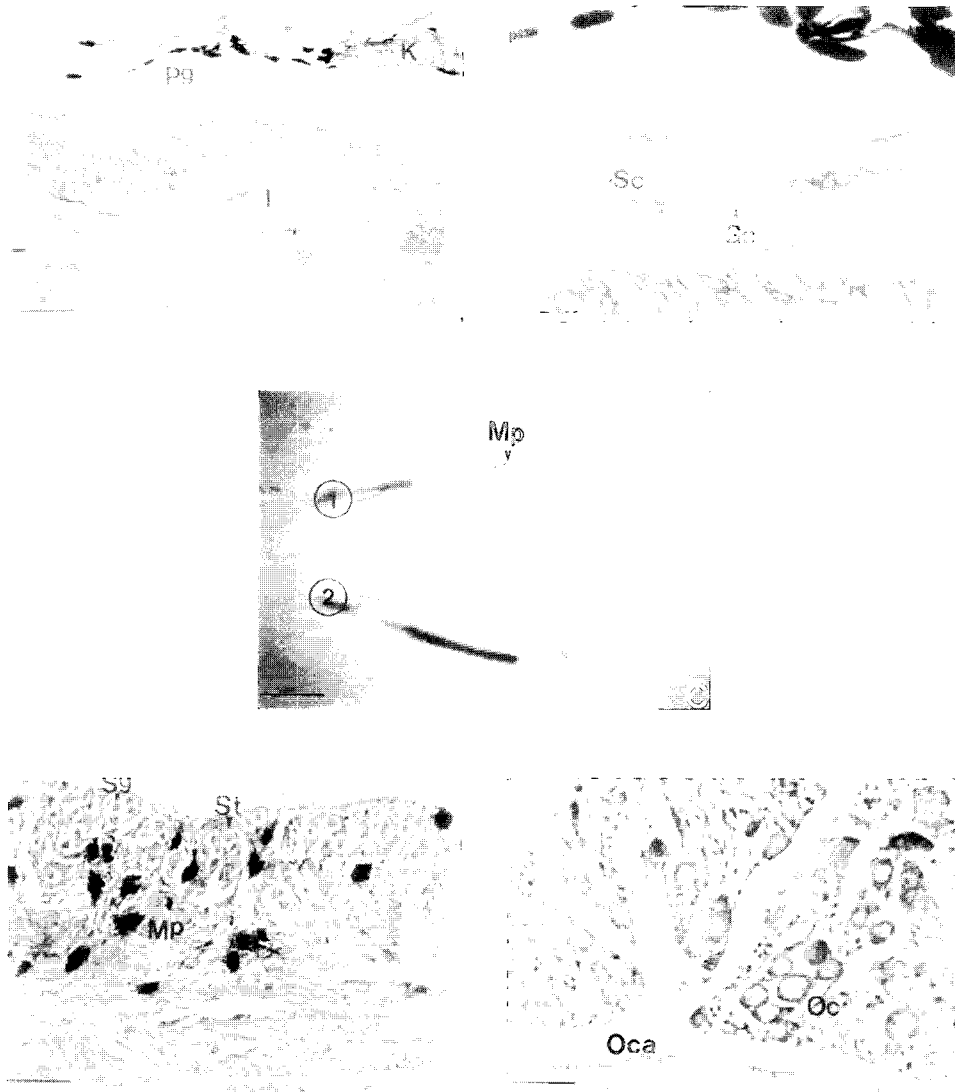


Fig. 1. Sagittal section and external appearance gonad of the black rockfish, *S. schlegeli*.

(A) The larva, 56 days after parturition. The clubbed primitive gonad (Pg) was located in the rear of kidney (K) and intestine (I). Scale bar=100 μ m. (B) Primitive gonad in the same section as above mentioned. The primitive gonad was composed of gonia cells (Gc) and somatic cells (Sc). Scale bar=25 μ m. (C) The juvenile, 128 days after parturition. External appearance of gonad (①; testis, ②; ovary), the exterior of testis was covered with melanophore (Mp). Scale bar=1.7 mm. (D) The juvenile, 128 days after parturition. Testis was composed of a number of spermatogonia (Sg) and seminiferous tubules (St), the melanophore (Mp) was scattered through testis. Scale bar=25 μ m. (E) The juvenile, 128 days after parturition. Ovary was composed of early growing oocytes (Oc) and ovarian cavity (Oca). Scale bar=25 μ m.

후 7일된 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 자어에 30일간 E₂를 60, 120, 240 및 480 mg/kg diet의 농도로 경구 투여하였을 때, 90% 이상의 높은 암컷 비율을 보였고, 특히 480 mg/kg diet의 농도에서는 조사된 모든 어류가 암컷으로 나타났다. 이 연구에서도 조피볼락을 대상으로 E₂를 20, 40 및 60 μ g/g diet의 농도로 경구 투여한 결과 암컷이 각각 75.0, 83.3 및 91.7%로 Kim et al. (1993)의 연구와 마찬가지로 호르몬의 농도가 증가할수록 암컷비가 높게

나타났다.

어류의 성결정에 영향을 미치는 외부 환경요인 중 수온에 관한 연구로 자성발생 넘치, *Paralichthys olivaceus*를 부화 후 30일부터 90일까지 사육 수온을 24, 27°C로 조절하였을 때, 24°C에서는 86.6%, 27°C에서는 90.0% 수컷으로 전환되었다 (Lee et al., 1994). 특히 pejerrey, *Odonthestes bonariensis*의 경우 성분화의 임계시기에 저수온 혹은 고수온으로 사육한 결과, 각각 100% 암컷과 수컷이

Table 1. Effect of oral administration of sex steroid hormones and rearing temperature on sex differentiation of the black rockfish, *S. schlegeli*

Experimental tank #	No. of fish treated	No. of fish survived	No. of fish examined	ovary	testis	% female	% male
Control	200	171	60	29	31	48.4	51.6
E ₂ 20 ppm	200	164	60	45	15	75.0*	25.0
E ₂ 40 ppm	200	170	60	50	10	83.0*	17.0
E ₂ 60 ppm	200	171	60	55	5	91.7*	8.3
MT 20 ppm	200	164	60	—	60	—	100*
MT 50 ppm	200	174	60	—	60	—	100*
Rearing temperature (27°C)	200	164	60	3	57	5.0	95.0*

*Percentage of females and males followed by an asterisk differ significantly from the theoretical 1 : 1 sex ratio (χ^2 with Yate's correction. 1 d.f., $P < 0.001$)

Control and sex steroid hormone groups of water temperature ranged 14.0~17.5°C

생산되었다 (Strüssmann et al., 1996). 그리고 Atlantic silverside, *Menidia menidia*에서도 알에서부터 전장 30 mm까지 수온조건을 달리하여 사육한 결과 저수온 사육시 암컷비가 높고, 역으로 고수온 사육시 수컷비가 높은 결과를 보였다 (Conover and Fleisher, 1986). 이 연구에서도 출산 후 56일부터 77일까지 조피볼락을 대상으로 27.0±0.5°C 사육한 결과, 95.0% 수컷이 유도되었다. Hunter and Donaldson (1983)은 이러한 이유를 고수온 처리와 같은 외부환경의 쇼크가 정상적인 성분화의 발달을 방해하거나 호르몬의 활성이나 호르몬의 구조에 영향을 미쳐 성비의 차가 나는 것이라고 추정하고 있다. 그러나 Strüssmann et al. (1996)은 *Patagonina hatcheri*를 18, 21 및 25°C로 사육하였을 때 성비가 정확히 1 : 1의 비율은 보이지 않았지만, 각 처리구마다 유의차가 없다고 보고하고 있어, 어류의 성결정인 환경적인 요인에 의해서 성결정에 영향을 받는 어종도 있는 반면에, 내적인 요인들에 의해서 성결정이 되는 어종도 있다는 것을 시사하고 있다.

따라서, 어류의 성결정 기구를 정확히 밝히기 위해 환경요인과 성스테로이드 호르몬이 미분화 생식소에 미치는 대사 생리에 관한 더 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

요 약

조피볼락, *S. schlegeli* 치어에 estradiol-17 β (E₂)와 17 α -methyl-testosterone (MT) 그리고 고수온을 처리하여 성분화에 미치는 영향을 조사하였다.

실험어는 출산 후 56일부터 72일까지 E₂ 20, 40, 60 μ g/g diet 농도로 경구투여 하였고, MT는 20, 50 μ g/g diet 농도로 경구투여 하였다. 고수온 처리는 대조구 그리고 호르몬 처리구와 비교하여 약 10°C 이상인 27.0±0.5°C로 사육하였다. 출산 후 56일까지 성분화 과정에서, 생식소는 대부분 생식원세포로 구성되어 있어 성적으로 미분화 단계였다. 그러나 출산후 128일째에, 난소는 난소강과 난소박판으로 구성되어 있고, 난원세포와 주변인기난모세포는 난소박판에 분포하고 있다. 그리고 정소는 많은 정세관으로 이루어졌고, 이들 세관내에는 정원세포들이 무리를 지어 분포하고 있고 또한 색소포들이 정소의 수질층과 기부에 드문드문 분포하고 있다.

성비에 있어, 대조구와 비교하였을 때 모든 E₂ 처리구는 더 많은 암컷이 관찰되었고, 반면에, 모든 MT 처리구와 고수온 처리구에서는 더 많은 수컷이 관찰되었다. 이러한 결과들에서, 성스테로이드 호르몬의 농도와 종류 그리고 고수온 사육이 조피볼락의 성분화 과정에 있어서 성결정에 영향을 주고 있다고 볼 수 있다.

참 고 문 헌

- Abucay, J.S., G.C. Mair, D.O.F. Skibinski and J.A. Beardmore. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 173, 219~234.
- 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.
- 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.
- Gray, M.A. and C.D. Metcalf. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka, *Oryzias latipes* exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1082~1086.
- Hackmann, E. and R. Reinboth. 1974. Delimitation of the critical stage of hormoneinfluenced sex differentiation in *Hemihaplochromis multicolor* (Hilgendorf) (Cichlidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 22, 42~53.
- Hishida, T. and N. Kawamoto. 1970. Androgenic and male-inducing effects of 11-ketotestosterone on a teleost, the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.*, 173, 279~283.
- Howell, W.M., D.A. Black and S.A. Bortone. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia*, 4, 676~681.
- Hunter, D.A. and E.M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: *Fish Physiology* (Hoar et al., eds.), Vol. IX (B), pp. 203~303. Academic Press, New York.
- Johnstone, R., T.H. Simpson and A.F. Walker. 1978. Sex reversal in salmonid culture. Part III. The reproduction and performance of all-female populations of brook trout. *Aquaculture*, 18, 242~252.
- Kim, D.S., J.Y. Jo and I.C. Bang. 1993. Effects of 17 β -estradiol on the

- sex reversal of nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Aquicult., 6 (2), 125~132 (In Korean).
- Lee, Y.D., S. Rho, H.B. Go and D.S. Kim. 1994. Sexuality of oliver flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Mar. Res. Inst. Cheju. Nat. Univ., 18, 85~92 (In Korean).
- Lee, Y.D., S. Rho, Y.J. Chang, H.J. Baek and C.M. An. 1996. Sex differentiation of rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. Korean Fish. Soc., 29(1), 44~50 (In Korean).
- Na, O.S. 1999. Effects of sex differentiation, fertility and reproductive output in songsari, *Orizias latipes* exposed to bisphenol A (BPA). M.S. Thesis Cheju Nat. Univ. Korea. 34pp.
- Nakamura, M. 1975. Dosage-dependent changes in the effects of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 26, 99~108.
- Ojima, Y. 1989. Fish cytogenetics. Suikosha Press, Tokyo, Japan. pp. 50~64 (In Japanese).
- Strüssmann, C.A., S. Moriyama, E.F. Hanke, I.C. Calsina-Cota and F. Takashima. 1996. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontheistes bonariensis*. J. Fish. Biol., 48, 634~651.
- Yamamoto, T. and K. Onitake. 1975. A preliminary note on methyl-androstenediol induced XX male and reduction of anal fin-rays the medaka, *Oryzias latipes*. Proc. Jpn. Acad., 51, 136~139.
- Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture, 33, 329~354.

2000년 7월 15일 접수

2000년 9월 2일 수리