ISSN : 1225-9918
*Journal of Life Science* **2010** Vol. 20. No. 12. 1902~1905 DOI : 10.5352/JLS.2010.20.12.1902

- Note -

# Production of All-Female using Sex-Reversal Gynogenetic Diploid in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

Cheul Ho Lee, Dae-Jung Kim[1]*, Chang Hwa Jeong[2], Gyeong Cheol Choi[3], Chae Sung Lee and Dong Soo Kim[4]

*Cold-Water Fish Research Center, National Fisheries Research & Development Institute (NFRDI), Gangwon-do 215-821, Korea*
*[1]Inland Aquaculture Research Center, NFRDI, Kyeongsangnam-do, Changwon 645-806, Korea*
*[2]Binex, Inc. Busan 608-807, Korea*
*[3]Chungcheongbuk-do Inland Fisheries Research Institute, Chungcheongbuk-do 380-250, Korea*
*[4]Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Received September 6, 2010 / Accepted October 7, 2010

This study was conducted to increase the efficiency of farming practice in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sex reversal and chromosome-set manipulation techniques. Induction of sex-reversed gynogenetic diploid rainbow trout males and mass production of all-female rainbow trout by genetic sex reversal was performed. Phenotypic males in the gynogenetic diploid group were induced successfully by dietary administration of 5 mg of 17 alpha-methyltestosterone per kg diet for 82 days. All females were produced by crossing between normal female and sex-reversed gynogenetic diploid male rainbow trout.

**Key words** : Gynogenetic diploid, sex-reversal, all-female rainbow trout, 17 alpha-methyltestosterone

## 서 론

자성발생2배체는 수컷의 유전 형질을 불활성화시킨 후 암컷의 유전 형질 만으로 생존력 있는 개체를 생산하는 방법이며, 암컷 동형접합인 경우에는 단성집단 생산이 가능하고 유전적으로 열성화된 부분을 보완하면서 순계를 확립하기 위해 사용되는 유전 육종학적 방법의 하나이다[2]. 이러한 유전 육종학적 방법을 이용하여 자성발생성 개체와 성전환된 자성발생성 개체간의 교배를 통해 잉어 품종 개량 프로그램을 개발하였고[1], 또한 자성발생성 개체만을 이용한 잉어 품종 개량에 관한 연구를 보고 하였다[11].

한편 국내에서도 담수어류 위주로 자성발생성2배체 생산과 성전환 연구가 이루어져 왔으며[5,6,7], 특히 무지개송어를 대상으로 성전환 기법과 배수체 기술을 이용한 전 암컷 생산과 전 암컷 3배체 생산에 관한 연구를 수행 하였다[3,6]. 그러나 이러한 연구 결과들은 전 암컷 무지개송어 생산을 위해 1차적으로 생리학적 성전환에 의한 가짜 수컷 비율이 50%로 낮고 성별로 구분해야 하는 어려움이 있으며, 또한 산업적 규모의 전 암컷 수정란 대량 생산을 위한 실질적 적용사례도 극히 드물다. 따라서 이러한 단점을 해결하기 위해서는 자성발생2배체의 성전환이 필요하며, 이러한 개체들은 이론상 100%에 가까운 가짜 수컷을 유도할 수 있어 산업적 유용성은 높다고 할 수 있다.

***Corresponding author**
Tel : +82-55-540-2723, Fax : +82-55-546-6292
E-mail : djkim4128@nfrdi.go.kr

본 연구에서는 전 암컷 무지개송어의 대량 생산에 의한 생산성 향상 목적으로 동형 접합형 자성발생2배체를 유도한 후, 성전환에 의한 자성 발생형 가짜 수컷을 유도하여 전 암컷 무지개송어를 생산하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 자성발생 2배체의 성전환 유도 실험

#### 호르몬 처리

무지개송어의 경우 성분화 현상이 나타나기 시작하는 난황흡수 직후[6] 부터 배합사료(우성사료, 제우스 1C) 1 kg당 5 mg의 17 alpha-methyltestosterone (MT, Tokyo Kasei Co., Japan)을 골고루 흡착시켜 건냉암소에 보관하면서 공급하였다.

#### 자어 사육 및 성장도 조사

2005년도에 생산된 자성발생2배체 자어는 사육 수온을 10°C로 유지하면서 난황흡수 직후부터 최적의 성전환율을 나타내는 적산수온 800°C가 되는 약 2개월간 MT처리 배합사료를 공급하였다. 또한 2006년도에 생산된 자성발생2배체 자어도 전 년도 연구 결과를 토대로 적산수온 800°C가 되는 약 2.5개월간 MT처리 배합사료를 공급하였다. MT처리 배합사료를 공급 후, 일반 배합사료(우성사료, 제우스 1C)를 공급하며 사육하였다. 사육 6개월째 생식소를 적출후 광학현미경으로 압착법(squash method) [3]에 의한 성별을 판별하여 성전환율을 산출하였다.

자성발생 2배체 성전환 수컷(가짜 수컷)을 이용한 전 암컷 대량생산 실험

**실험어**

실험에 사용한 수컷(평균 전장 46.5±3.8 cm, 평균 체중 1,317±352.9 g)은 2005년 자성 발생 2배체 성전환 가짜 수컷을 친어로 사용하였고, 암컷(평균 전장 57.3±5.0 cm, 평균 체중 2,934±1,058.3 g)은 개인양어장에서 사육한 2003년산 친어를 사용하였다.

**인공 수정**

자성발생2배체 성전환 수컷(가짜수컷)은 압착법으로 정액을 채취할 수 없어 해부하여 정소를 적출 후 현미경 하에서 정자 활력을 검사하였다. 정자 활력은 현장에서 간편하게 이용되는 방법을 채택하여[3], 슬라이드그라스에 정액 한방울을 적하한 후 물을 첨가하여 정자 운동의 개시에서 활력이 없어질 때까지의 시간을 측정하여 정자 운동 시간이 가장 긴 개체를 선택하였다. 이러한 개체의 정소는 멸균시킨 칼로 세절하여 200 μm 뮬러거즈로 여과 한 정액에 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 또한 배란중인 암컷 복부를 압박하여 알을 채란하여 일반적인 방법[3,6]에 따라 인공 수정하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Student´s *t*-test와 two-way ANOVA로 유의성 검정을 실시하였다.

## 결 과

자성발생 2배체의 성장율 및 성전환율 조사

무지개송어 생식소의 압착법에 의한 성별 분석은 현미경 상에서 정소는 결체 조직이 뚜렷이 발달하여 있는 모습을 나타내었으며(Fig. 1a), 난소는 난모세포가 확연히 관찰되어 암수 구별이 용이하였다(Fig. 1b).

이러한 성별 분석법을 토대로 2005년과 2006년에 MT 처리한 자성발생2배체 가짜수컷의 성전환 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 2005년 처리한 자성발생2배체 가짜수컷 성전환 개체 30마리 중 24마리(80%)에서 정세포가 뚜렷하게 관찰되었고, 난모세포가 관찰된 것은 5마리(16.7%), 비정상적으로 성전환(중성)된 것은 1마리(3.3%)였다. 또한, 2006년에 처리한 실험 결과에서는 성전환 수컷 비율이 96.7%로 매우 높게 나타났다.

한편 MT처리 기간 및 이후 일반 배합 사료로 사육중인 MT 처리 개체와 대조구 간의 뚜렷한 성장차이는 나타나지 않았다(data not shown).

자성발생 2배체 성전환 수컷(가짜 수컷)을 이용한 전 암컷 대량생산

**자성발생 2배체 성전환 수컷(가짜 수컷) 친어의 외부 형태 및 해부학적 특징**

무지개송어의 수컷은 성숙기에 도달하면 입주위의 하악이 상악 위로 겹치게되는 외부 형태학적 변화를 나타내는데, 성전환된 가짜 수컷은 하악이 약하게 구부러져 쉽게 식별되지 않아 세밀한 관찰이 필요하였다. 또한 복강을 절개한 해부학적 소견은 가짜수컷의 정소가 난소와 유사한 모양으로 흰 빛깔을 띤 것은 성숙된 정자가 가득하였으나, 미성숙 상태의 정소는 빛깔이 회색으로 쉽게 성숙여부가 판단되었다(data not shown).

한편, 성전환 수컷(가짜수컷)의 정소는 일반적인 난소의 형태로 형성 되어 있었으며, 수정관의 발달은 보이지 않는 전형

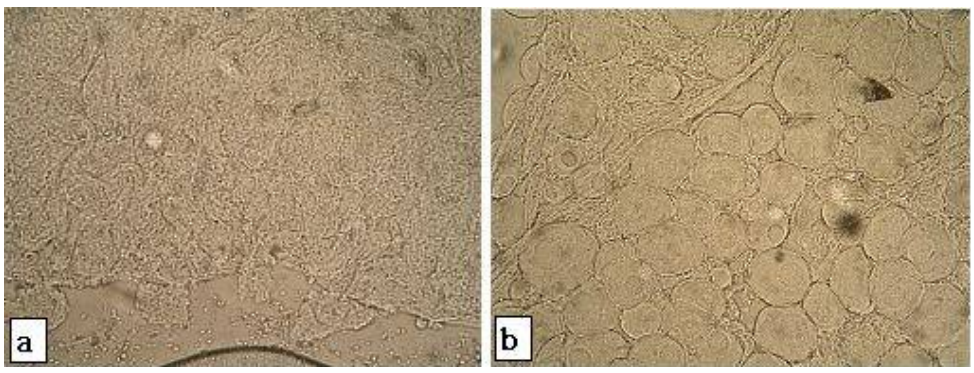


Fig. 1. Squash preparation of the gonads from 6 month old sex-reverse gynogenetic diploid and control rainbow trout. X100, a: Sex-reversed male, b: female

Table 1. Sex ratio of gynogenetic diploid rainbow trout treated with 17á-methyltestosterone

| Year | Exp. fish number | Sex reversed male (△XX) | Female | Inter-sex |
|---|---|---|---|---|
| 2005 | 30 | 80% (24) | 16.7% (5) | 3.3% (1) |
| 2006 | 30 | 96.7% (29) | 3.3% (1) | - |

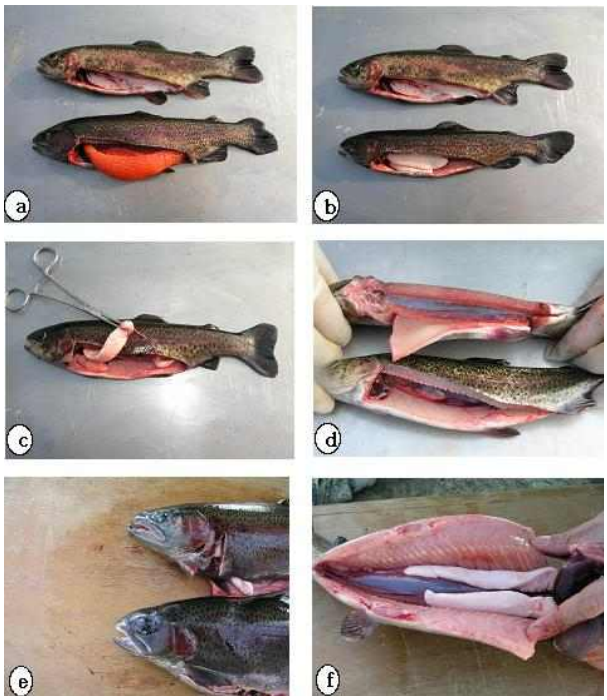

Fig. 2. External morphology of sex-reversed gynogenetic diploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. a: Normal male and female, b: Normal male and sex-reversed male, c: Malformed male d: Malformed female, e: Morphology of Sex-reversed male and normal female head, f: Matured sex-reversed male gonad.

적인 성전환 개체의 특징이 나타났다. 관찰된 성전환 개체들의 생식소의 기형적 발달을 Fig. 2에 나타내었으며, 이들 생식소의 기형적 발달은 성성숙이 전혀 나타나지 않는 개체, 일부 흔적만을 보이는 개체 및 생식소의 한쪽씩이 다르게 발달하는 개체로 나타났다. 그러나 정상적으로 성성숙이 진행되고 있는 성전환 수컷 무지개송어 친어의 정자 활력 시간은 평균 63초로 나타났다(data not shown).

**자성발생 2배체 성전환 수컷(가짜 수컷) 정액을 이용한 전 암컷 유도율 조사**

발안난 관리는 G수산에서 원통형 부화기를 이용하여 12월 12일 적산수온 237°C에서 수동으로 검란작업을 하였으며, 그 이후 부화상으로 옮겨 12월 21일경에 부화가 완료되었다. 이때의 발안율은 55.7%, 부화량은 97,850마리가 부화되어 부화율은 52.9%를 나타내었다(Table 2).

한편, 부화된 97,850마리 자어를 정상적으로 4개월 사육후 압착법에 의한 성별을 조사한 결과를Table 3에 나타내었다. 그 결과 사육 4개월 후 평균전장 6.9±0.61 cm, 평균체중 3.6±0.96 g으로 성장하였으며, 그 중 치어 30마리를 표본 조사하여 생식소를 적출하여 분석한 결과 30마리 모두 100% 암컷만이 관찰되었다.

## 고 찰

본 연구는 수입에 의존하고 있는 무지개 송어의 전 암컷 집단의 국내 생산을 위하여 양식 산업현장에서 보다 쉽게 적용할 수 있는 전 암컷 무지개 송어의 대량생산 방법을 확립하고자 하였다. 본 연구 결과 무지개 송어 자성발생 2배체의 성전환 수컷(가짜 수컷)을 이용한 전 암컷 생산 연구 결과는 타 어종인 연어과 어류, 미꾸라지 및 백련어[9,10,12] 등에서 보고된 결과와 마찬 가지로 전 암컷으로 유도되었다.

본 연구에서 자성발생 2배체의 성전환시 MT처리군과 대조군의 초기 성장은 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 성전환율은 80% (2005년 결과)와 96.7% (2006년 결과)로 산업적 이용 가능한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 초어[2], 미꾸라지[12], 차넬메기[13] 등 결과에서도 호르몬 미처리 대조구와 비교해서 초기 성장율의 유의적인 차이가 없던지 혹은 다소 감소한다는 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 이러한 이유는 고온처리에 의한 배수화 유도시 염색체 전좌 등에 의한 현상으로 나타나는 것은 아닌지 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 한편 자성발생 2배체의 성전환 수컷(가짜수컷) 생산을 위한 2005년과 2006년 연구 결과 성전환율 차이가 나타났으며, 이러한 차이는 유전학적으로 완전한 암컷의 형질을 가진 개체인 자성발생 2배체의 성전환시 기존의 처리 농도와 기간에 대한 고찰이 요구되며, 또한 사료 섭이율 차이에 따라 전체 호르몬 투여량의 차이에 기인한 것으로 추측되나, 향후 성전환을 위한 호르몬 투여 방법의 개선 방법 연구를 통하여 검토하여야 할 것이다.

본 연구에서 자성발생 2배체의 성전환 수컷 친어의 정자 활력도는 타 연구 결과인 정상 무지개송어 친어의 정자[4] 혹

Table 2. Survival rates of all-female rainbow trout at each developmental stages

| Date | Source of embryos | No. of eggs obtained | Rate of eye-stage (%) | Hatching rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| Nov. 21. 2006 | G-farm | 185,000 | 103,000 (55.7) | 97,850 (52.9) |

Table 3. Sex ratio of rainbow trout progeny produced from the cross between normal female and sex-reversed male

| Date | Size | | Sex ratio | | Rate of female (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Length (cm) | Weight (g) | ♀ | ♂ | |
| May. 3. 2007 | 6.9±0.61 | 3.6±0.96 | 30 | 0 | 100 |

은 자성발생 2배체의 성전환 수컷 친어의 정자[6]와는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 가짜 수컷의 정자가 활동성이 없는 경우는 정자의 성숙이 완전히 이루어지지 않았을 때 채취한 정자는 활성이 일어나지 않았으며, 또한 가짜 수컷의 경우 외형적인 몸 형태와 하악 구조는 암컷과 구별이 쉽지 않아 미성숙 가짜 수컷의 선별에 대한 연구가 뒤따라야 할 것이다. 한편, 성숙된 가짜 수컷 정소의 형태는 난소와 유사한 형태로 이는 성전환된 개체들의 전형적인 생식소 수준임을 보여준다[8]. 또한 가짜 수컷 정소의 색깔이 흰색이었을 때 정자의 활력이 좋았으며 회색을 띤 개체에서는 정자의 활력이 없어 성숙 개체를 판단하는 기준으로 작용할 수 있었다.

성전환 수컷(가짜 수컷)의 정자와 정상 암컷의 난을 인공수정시키면 여기서 생산되는 전 개체가 암컷이 됨을 실험적으로 입증하였고[4], 본 연구에서는 이러한 실험적 결과를 토대로 국내 대규모 무지개송어 양식 현장에 적용하기 위해 수정난, 발안난 및 부화자어 관리는 일반 양식장 현장 규모로 사육관리 하였고, 전장 6~7 cm가 될 때 생식소를 적출하여 현미경하(×100)에서 생식소 압착법에 의한 초기생식소의 조직학적 분석결과 난모세포가 뚜렷한 100%의 암컷이 확인되어 산업적인 이용이 가능하였다. 향후 본 연구의 결과를 토대로 무지개송어 양식산업에 활용한다면 매년 막대한 외화의 유출을 막을 수 있을 뿐만 아니라 국내 양식 환경에 적합한 전 암컷 송어 종묘를 대량으로 보급할 수 있으리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산과학원(RP-2010-AQ-094)의 지원에 수행되었습니다.

## References

1. Bakos, J. and S. Gorda. 1995. Genetic improvement of commcn carp strains using intraspecific hybridization. *Aquaculture* **129**, 183-186.
2. Cassani, J. R. and W. E. Caton. 1986. Growth comparisons of diploid and triploid grass carp under varying condtions. *Prg. Fish-cult.* **48**, 184-187.
3. Jeong, C. H., J. H. Ahn, B. S. Kim, and D. S. Kim. 1995. Mass Production of All-Female Triploid Eggs in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) During the Fall Season by Chromosome Manipulation. *J. Aquaculture* **8**, 141-148.
4. Johnstone, R., T. H. Simpson, A. F. Younson, and C. Whitehead. 1979. Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture* **18**, 13-19.
5. Kim, D. S., I. C. Bang, and I. B. Kim. 1988. Sexual differentiation and androgen sex reversal on *Orechromis niloticus*. *J. Aquaculture* **1**, 53-66.
6. Kim, D. S., C. H. Jeong, and I. B. Kim. 1993. Induction of all-female triploid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Korean J. Genet.* **15**, 213-218.
7. Kim, D. S., C. H. Noh, Y. H. Choi, and Y. K. Nam. 1996. Production of supermale (YY) and superfemale (△YY) nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by sex reversal and chromosome manipulation. II. Progeny tests with supermale and superfemale nile tilapia. *J. Aquaculture* **9**, 101-106.
8. Lincoln, R. F. and V. J. Bye. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. *Fish Farm* **7**, 22-26.
9. Mirza, J. A. and W. L. Shelton. 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture* **68**, 1-14.
10. Onozato, H. and E. Yamaha. 1983. Induction of gynogenesis with ultraviolet rays in four species of salmoniforms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **49**, 693-699.
11. Sumantadinata, K. 1995. Present state of common carp (*Cyprinus carpio* L.) stocks in Indonesia. *Aquaculture* **129**, 205-209.
12. Suzuki, R., T. Oshiro, and T. Nakanishi. 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach *Misgurunus anguillicaudatus*. *Aquaculture* **48**, 45-55.
13. Wolters, W. R., G. S. Libey, and C. L. Chrisman. 1981. Induction of triploidy in channel catfish. *Trans. Am. Fish Soc.* **110**, 310-312.

---

## 초록 : 무지개송어의 자성발생2배체 성전환 수컷을 이용한 전 암컷 생산

이철호 · 김대중[1]* · 정창화[2] · 최경철[3] · 이채성 · 김동수[4]
(국립수산과학원 냉수성어류센터, [1]내수면양식연구센터, [2](주)바이넥스, [3]충북내수면연구소, [4]부경대학교)

본 연구는 무지개송어 양식 산업의 생산성 향상을 위한 일환으로 염색체공학 기법을 이용하여 전 암컷 무지개송어의 대량생산을 유도 하였다. 자성발생 2배체를 유도한 후 17 alpha-methyltestosteron으로 성전환을 성공적으로 유도하였다. 성전환된 수컷에서는 일반 암컷 모양을 띤 생식소가 형성 되었으나, 수정관의 발달은 보이지 않는 전형적인 성전환 개체의 특징을 나타내었다. 성전환된 자성발생 2배체 가짜수컷을 이용하여 정상 암컷과 단순교배로 발안율 55.7%, 부화율 52.9%의 전 암컷 집단 97,850 마리를 얻을 수 있었고, 4개월 사육 후 치어기(6~7 cm) 때의 생식소 확인 결과 100% 암컷임이 확인되었다.