

무어분 사료를 이용한 참돔(*Pagrus major*)의 선발육종 가능성에 대한 연구

김동인 · 다카쿠와 후미야키¹ · 가토 게이타로 · 와시오 요우헤이*

일본 긴키대학 수산연구소(시라하마 실험장), ¹일본 긴키대학 수산연구소(우라가미 실험장)

Possibility of Selective Breeding of Red Sea Bream *Pagrus major* Under Non-fish Meal Diet

Dong In Kim, Fumiaki Takakuwa¹, Keitaro Kato and Youhei Washio*

Aquaculture Research Institute, Kindai University, Shirahama 649-2211, Japan

¹Aquaculture Research Institute, Kindai University, Uragami 649-5145, Japan

Over the past 50 years, red sea bream *Pagrus major* has been selectively bred for more than 10 generations to improve its growth rate. However, the effect of genetic factors on growth under low- or non-fish meal diet is still unclear. Here, we analyzed 251 individuals randomly mating 21 females (dam) and 16 males (sire) to determine the difference in growth between non-fish meal (i.e., treatment group) and fish meal-based diet (i.e., control group), if any. The kinship coefficient between each group of individuals and their parents was estimated by the KING (Kinship-based Inference for GWASs) software package. The presumed parents of 74 individuals in the treatment group and 57 individuals in the control group could be effectively identified. Notably, one specific female was consistently related to high- rather than low-growth individuals in both groups. In addition, more than one parent in each group was related to either high- or low-growth individuals. Parents of both high-growth individuals in the treatment group and low-growth individuals in the control group were also identified. Although further study is required on various growth factors, this study suggests the possibility of selective breeding under non-fish meal diet.

Keywords: Selective breeding, Genetic effects, Fishmeal replacement, Kinship coefficient, Aquaculture

서론

일반적으로 어식성이 강한 어종은 배합 사료의 단백질원으로 서 어분의 의존도가 높은 것으로 알려져 있다(Suzuki, 2019). 어분은 주로 원료가 되는 대상종의 어획량이나 국제 정세에 의해서 거래 가격, 유통량, 품질에 크게 영향을 받기 때문에, 종종 예기치 못한 수급 불균형 문제가 나타나고 있다(Hua et al., 2019). 또한 어분의 원료가 되는 어종은 그 자체로서 천연 자원이기 때문에 이들의 남획은 자원의 고갈이나 해양생태계에 부정적 영향을 미칠 우려가 있다(Worm et al., 2006). 따라서 수산양식산업의 지속적인 발전을 위해서는 어분 함량을 낮춘 고단백질 대체원료 개발과 더불어 이를 기초로 하여 저어분 혹은 무어분 사료공급조건하에서도 어류의 성장을 향상시킬 수 있는 품종 개량에 관한 연구개발이 필요한 실정이다. 해산어류는 육

상동물 혹은 담수어에 비해 육식성이 강하고 단백질 요구량이 높아 사료원료 중에서 단백질원의 비율이 높기 때문에 어분을 대체할 수 있는 단백질 원료에 관련된 연구가 여러 해산어류에서 진행되어 왔다(National Research Council, 1993). 유럽농어(European bass *Dicentrarchus labrax*)에 있어서는 사료중의 어분을 식물성 단백질 혼합물로 대체함으로써 통상의 배합사료공급조건하에서 사육된 개체와 유사한 성장률이 확인되었다(Kaushik et al., 2004). 한편, 대서양 대구(Atlantic cod *Gadus morhua*)에 있어서는 밀글루텐과 대두농축단백 등의 식물성 단백질 혼합물의 함량을 50% 이상으로 공급한 개체의 성장률은 통상의 배합사료공급조건하에서 사육된 개체와 비교하여 성장률과 사료전환율이 낮아지는 경향이 나타났다(Hansen et al., 2007). 방어(yellowtail *Seriola quinqueradiata*)에 있어서는 식물성 플랑크톤 유래의 불포화 지방산과 사료유인제를 무어분

*Corresponding author: Tel: +81. 739. 42. 2625 Fax: +81. 739. 42. 2634

E-mail address: washio@kindai.ac.jp



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0212>

Korean J Fish Aquat Sci 56(2), 212-220, April 2023

Received 18 January 2023; Revised 23 February 2023; Accepted 5 April 2023

저자 직위: 김동인(박사후연구원), 다카쿠와 후미야키(전임강사), 가토 게이타로(교수), 와시오 요우헤이(전임강사)

사료에 혼합 첨가함으로써 무어분 사료공급조건하에서 빈번하게 발생했던 성장을 저하의 문제를 대폭 개선할 수 있게 되었다 (Seong et al., 2022). 우리나라 및 일본의 주요 양식어종인 참돔 (red sea bream *Pagrus major*)에 있어서는 어분의 대체원료로서 대두박, 옥수수 글루텐 가루, 미트밀 등의 식물성단백질원을 이용하여 저어분 사료의 유효성을 검토한 연구가 보고된 바 있다 (Aoki et al., 2000). 또한 어유의 대체원료로서 식물성 플랑크톤의 유효성에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있는 실정이다 (Seong et al., 2020). 이와 같이 어분을 대체할 수 있는 사료원료의 개발 및 이용성을 높이기 위한 연구가 다양한 해산어종을 대상으로 진행되어오고 있으며 최근에는 저어분 혹은 무어분 사료공급조건하에 있어서도 성장률과 사료효율을 향상시키기 위한 선발육종에 관한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다. 특히 저어분 사료공급조건하에서 2세대에 걸쳐 선발육종을 통해 생산된 붉은점산천어 (amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*)의 경우에는 선발육종 전과 비교하여 성장률과 사료효율이 대폭 향상되었다 (Yamamoto et al., 2015). 4세대에 걸쳐 선발육종에 의해 생산된 무지개 송어 (rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*)는 통상의 배합사료보다 무어분 사료공급조건하에서 고성장 계통의 생산에 성공하였으며, 이들 계통과 사료간의 교호작용 또한 확인되었다 (Overturf et al., 2013). 대서양 연어 (Atlantic salmon *Salmo salar*)에 있어서는 12세대 이상에 걸친 장기간의 선발육종을 실시한 결과, 사료 중의 어분 함유율이 30%이하인 저어분 사료공급조건하에서도 고성장 계통의 생산에 성공하였다 (Aas et al., 2019). 한편, 방어 (*S. quinquerediata*)에 있어서는 선발육종을 통한 계통간의 성장 및 사료에 따른 성장의 차이는 확인되었으나, 각 계통과 사료간의 교호작용은 확인되지 않았다 (Akita et al., 2021).

소속 연구소인 일본 긴키대학 수산연구소에서는 현재까지 참돔을 비롯하여 참다랑어 (Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*; Sawada et al., 2005), 흑점줄전갱이 (striped jack *Pseudocaranx dentex*; Harada, 1984; Harada et al., 1984), 갯방어 (greater amberjack *Seriola dumerili*; Miyashita and Kumai, 2000) 등 다양한 어종을 대상으로 전주기양식에 성공한 바 있다. 특히 참돔은 지난 반세기 이상에 걸쳐 지속적으로 선발육종 (집단 선발) 및 교배육종을 시행한 결과, 자연산 참돔에 비해 성장속도가 2배가량 빠른 계통인 긴다이 참돔®의 생산에 성공하였다 (Murata, 1997; Kato, 2002, 2023). 또한 소속 연구소에서는 선발육종 1세대에서 7세대에 이르기까지 4세 어어의 성장형질에 있어서의 세대간의 평균 실현 유전율 (realized heritability, h^2)을 분석한 결과, 이들 계통에 있어서의 유전율은 0.33으로 나타났다 (Murata et al., 1996). 특히 5세대에서 7세대에 있어서는 0.78의 높은 유전율이 나타났던 것으로 미루어 볼 때, 참돔에 있어서의 성장형질은 유전적 영향을 강하게 받고 있음이 확인되었다 (Murata et al., 1996). 다만 이들 선발계통은 냉동 정어리를 사용한 생사료 혹은 어분이 다량 함유된 통상의 배합사료 공급

조건하에서 선발육종을 실시해왔기 때문에 저어분 혹은 무어분 사료의 공급조건하에 있어서는 고성장 계통의 생산이 가능할지에 대해서는 명확하게 알려진 바가 없다. 이에 소속 연구소에서는 과거 수년간 저어분 혹은 무어분 사료만으로도 고성장이 가능한 계통을 생산하기 위한 선발육종 연구를 수차례 시도해 왔으나 대상어의 세대 교체 간의 기간 (수정란이 성장 및 성숙에 따라 배우자를 배출할 수 있게 될 때까지의 기간)과 해당 형질의 고정 및 충분한 계통의 확보까지 막대한 노력과 비용이 요구되는 등의 현실적인 문제로 인해 주목할 만한 성과를 내지 못하고 있는 실정이다 (Murata, 1997; Kato, 2002).

본 연구에서는 긴다이 참돔®을 대상으로 무어분 사료공급조건하에서 이들의 성장에 미치는 유전적 영향을 차세대 염기서열 분석 (next-generation sequencing, NGS)에 기반한 유전체 분석 방법을 사용함으로써 어분 함유율이 낮은 사료에 있어서도 고성장 계통의 생산 및 이용가능성을 검토하기 위한 기초자료를 제공하는 것을 목표로 수행되었다. 구체적으로는 긴다이 참돔®의 복수의 어미집단으로부터 자연산란법에 의해 얻어진 개체를 대상으로 통상의 배합사료와 무어분 사료의 공급조건하에서 36주간 사육실험을 통해 각 개체들의 성장에 관련된 데이터를 수집하였다. 이후, MIG-seq (multiplexed ISSR Genotyping by sequencing; Suyama and Matsuki, 2015)을 통해 얻어진 단일 염기 변이 (single nucleotide variant, SNV)를 토대로 혈연계수 (kinship coefficient; Manichaikul et al., 2010)를 산출함으로써 무어분 사료 공급조건하에 있어서 추정어미의 내역을 조사하고 이들의 성장에 미치는 유전적 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험어 사육관리 및 사료조성

본 연구는 소속연구소의 선행연구에서 사육한 실험어의 일부를 사용하여 연구를 수행하였다 (Takakuwa et al., 2023). 사육관리 및 사료조성에 관한 내용은 선행연구에서 자세히 기재되어 있기 때문에 본지에서는 주요 정보에 대해서만 간단히 설명하면 다음과 같다. 본 연구는 일본 긴키대학 수산양식종자센터 스사미 사업장에서 양성된 참돔 (관리 계통명, 15-B)인 암컷 21 개체 (유래집단, JS-1-15)와 수컷 16 개체 (유래집단, JS-3-15)를 어미집단으로 하고, 2020년 2월 4일 육상수조내에서의 자연산란법으로부터 얻어진 개체를 실험어집단으로 하였다. 이후, 긴키대학 수산연구소 우라카미 실험장에서 무어분 사료공급 (이하, 무어분구)과 통상 배합사료공급 (이하, 대조구)의 두 실험구로 나누어 각각의 해상 가두리 (2×2×2 m) 3개에 최초 평균체중 16.7 g의 실험어를 100개체씩 총 600개체를 수용하여 2020년 6월 3일부터 2021년 2월 8일까지 36주간 사육실험을 행했다. 일반 가두리 양식현장에서의 방식과 동일하게 실시하였으며, 사육기간 동안의 수온은 17.8–26.8°C로 평균 22.3°C였다. 사료공급은 1일 2회 (08:30, 15:00)를 주 6일로 설정하여 만복

공급하였다. 사료조성 중 무어분구와 대조구에 있어서 공급 사료의 조단백질 및 조지질 함량은 조단백질은 각각 52%, 53%, 조지질은 두 실험구 모두 15%로 동일한 조건으로 사육하였다. 사육실험 종료 후, 총 6개의 해상 가두리로부터 생존해 있던 실험어를 각각 30-40개체씩 추출하여 이들 실험어의 체중을 측정하였다. 그 결과, 무어분구 134개체, 대조구 117개체와 이들의 어미집단 중 4개체가 폐사함에 따라 최종적으로 암컷 17개체 및 수컷 16개체를 대상으로 성장에 미치는 유전적영향을 분석하였다. 본 연구는 동물의 실험에 관한 긴키대학 수산연구소의 윤리적 규정에 따라 동물의 고통을 최소화하기 위해 노력하였으며, 긴키대학 수산연구소의 동물실험 윤리위원회의 연구승인(2019-2022)을 얻은 후 실시하였다.

genomic DNA의 추출

어미집단과 각 개체로부터 가슴지느러미의 일부를 절취하여 Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)에 옮긴 후 4°C에서 조직내에 보존액이 침투되도록 24시간 동안 전처리 한 뒤, -40°C 냉동고에 동결보존하였다. 이후, 항온진탕배양기(DWMax M·BR-034P; Taitec, Saitama, Japan)를 이용하여 35°C의 조건에서 조직을 해동한 뒤, 약 5 mm 정도의 크기로 지느러미를 절취하였다. 절취된 지느러미에 남아있던 보존액을 종이타올로 가볍게 닦아내고, DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 프로토콜을 참고하여 genomic DNA를 추출하였다. genomic DNA의 농도 측정에 사용된 형광광도계는 Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 의해 농도를 측정하였다.

라이브러리 제작과 시퀀싱

본 연구에서는 MIG-seq (multiplexed inter-simple sequence repeat genotyping by sequencing)을 이용한 시퀀싱 라이브러리 제작 프로토콜(Suyama and Matsuki, 2015)을 참고하여 라이브러리를 제작하였다. 약 10 ng/μL의 농도로 준비된 genomic DNA로부터 8종류의 forward와 reverse primer를 각각 이용하여 1st PCR을 실시하였다(Suyama and Matsuki, 2015). 1st PCR 증폭을 위한 반응액은 genome DNA 1 μL, 2× multiplex PCR buffer 10 μL, primer mixture (20 μM) 3.2 μL, multiplex PCR enzyme mixture 0.1 μL, distilled water 5.7 μL로 총 20 μL로 조성하였다. 1st PCR cycling 조건은 94°C에서 1분 동안 pre-denaturation 후 94°C에서 30초간 denaturation, 38°C에서 1분간 annealing 및 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30 cycle을 진행하였고, 최종적으로 72°C에서 10분 동안 final incubation을 수행하였다. PCR 반응은 LifeECO Thermal Cycler TC-96/G/H(b)C (Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China)를 사용하였다. 1st PCR 증폭산물의 확인은 DNA-2500 Reagent Kit (Shimadzu, Kyoto, Japan)의 메뉴얼을 참고하여

자동 전기영동 장치인 MCE-202 MultiNA (Shimadzu)를 사용하였다. 이후, 각 샘플의 1st PCR 증폭산물의 말단부위에 index primer와 시퀀싱에 필요한 서열을 추가하여 tailed PCR에 의해 2nd PCR를 수행하였다(Suyama and Matsuki, 2015). 구체적으로는, 12종류의 forward와 8종류의 reverse primer로 구성된 index primer의 조합을 각 샘플마다 바꾸어 시퀀싱의 1회 런당 최대 96개 샘플을 식별할 수 있도록 했다. 2nd PCR 증폭을 위한 반응액은 template (50× 1st PCR product) 3 μL, 5× PrimeSTAR GXL buffer 3 μL, dNTP mixture (2.5 mM each) 0.08 μL, 10 pmol forward primer 1 μL, 10 pmol reverse primer 1 μL, PrimeSTAR GXL DNA polymerase 0.3 μL, distilled water 8.02 μL로 총 15 μL로 조성하였다. 2nd PCR cycling 조건은 98°C에서 10초간 denaturation 후 54°C에서 15초간 annealing 및 68°C에서 30초간 extension의 조건으로 12 cycle을 진행하였다. 2nd PCR 증폭산물을 확인은 1st PCR과 동일한 방법으로 진행하였다. 1st PCR 및 2nd PCR에서 각 라이브러리의 전기영동의 분석결과는 밀린형태(smear pattern)로 나타났으며, 이들 PCR 증폭산물에는 multiplex PCR 유래의 다양한 증폭산물이 포함된 것으로 판단하였다. 이어서, 1개의 1.5 mL 마이크로튜브에 24샘플을 각각 5 μL씩 첨가하여 혼합 라이브러리로 제작하였다. 본 연구에서는 1회 런당 96개의 샘플을 분석하였으므로, 상기의 혼합 조건으로 총 4개의 혼합 라이브러리를 제작하였다. 다음으로, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)를 사용하여 제조사의 프로토콜을 참고하여 라이브러리를 정제하였다. 이후, 각 혼합 라이브러리를 하나의 튜브에 혼합한 뒤, AMPure XP (Beckman coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여, 제조사의 프로토콜을 참고하여 라이브러리의 크기선별 정제(Size selection)를 실시하였다. 본 연구에서는 100 bp 이상의 증폭산물만을 회수할 수 있도록 설정했다. 이후, DNA-2500 Reagent Kit (Shimadzu) 및 MCE-202 MultiNA (Shimadzu)를 이용하여 전기영동을 행하여, 크기선별 정제 후의 증폭산물이 100 bp 이하의 저분자 증폭산물이 없는 것을 확인한 뒤, 4 nM의 농도로 라이브러리를 제작하였다. 각 라이브러리 제작 단계에 따른 전기영동결과의 예를 Fig. 1에 나타내었다. 시퀀싱은 Illumina사의 MiSeq platform에 따라 4 nM 농도의 DNA와 PhiX Control v3 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 섞어 혼합액을 만들고, MiSeq Reagent v3 600-cycle kit (Illumina)를 Illumina MiSeq System (Illumina) 장비를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열 데이터 분석

참돔 유전체 염기서열(<https://madai.nig.ac.jp/index.php>, unpublished data)을 reference genome으로 BWA-mem을 이용하여 각 샘플의 염기서열을 정렬하였다. 다음으로, Picard Mark-Duplicate에 의해 중복 염기서열등 duplicate영역을 제거하고, AddOrReplaceReadGroups을 이용하여 bam file을 생성하였다

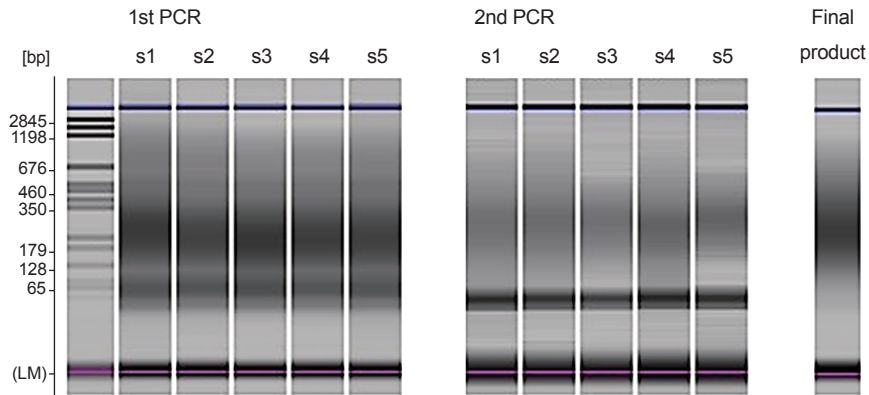


Fig. 1. Examples of electrophoresis during the library preparation for MIG-seq. The molecular scale is indicated in the left side. The left image shows the result of the 1st PCR product, the middle image shows the result of the 2nd PCR product, and the right image shows the result of the finally prepared library. The results of 5 samples (s+sample name) of the 1st and the 2nd PCR product are shown. Blue lines indicate polymer markers, red lines indicate small molecule markers. The electrophoretic images of each library were smear-like (approximately 50–1200 bp) in the 1st and 2nd PCR, and it was determined that each library contained various amplification products derived from multiplex PCR. The electrophoretic images of the final product are at approximately 100 bp or more, confirming the success of the size selection.

다. 이후, samtools mpileup을 사용하여 raw variant의 정보가 포함된 vcf file을 생성하였다. SNV는 vcftools를 이용하여 mean read depth 3, minor allele frequency 0.1, a number of alleles 2, number of missing genotypes 0의 조건으로 필터링하였고, 최종적으로 917개의 SNV를 추출하였다.

혈연계수의 산출

Vcftools software의 KING (kinship-based Inference for GWASs) software (Manichaikul et al., 2010)를 토대로 제작된 relatedness2 package를 이용하여 어미 및 개체들의 혈연계수를 산출하였다. 이후, 혈연계수의 결과를 라운드 로빈 형식의 도표로 변환하여, 실험구별 어미집단과 개체간의 혈연계수를 비교 분석하였다.

추정어미의 결정

어미로부터 유래한 각 개체들에 대한 혈연계수 상위 1개체를 추출하고, 이들의 어미와 개체간의 혈연계수 평균치를 산출하였다. 그 결과, 모자간은 0.19, 부자간은 0.18로 추정되었다. 본 연구에서는 이들 어미와 개체간의 혈연계수가 평균치보다 낮을 경우 정확한 어미를 추정할 수 없다고 판단하고 분석에서 제외하였다. 또한, 어미가 동일한 개체간의 혈연계수를 분석하여 어미와의 혈연계수가 가장 높은 개체와 어미가 동일한 다른 개체간에서 부모의 한쪽만 다른 반형매의 혈연계수 이론치인 0.125 미만의 개체에 있어서도 정확한 어미를 추정할 수 없다고 판단하고 분석에서 제외하였다.

통계처리

혈연계수의 분석에 의해 어미의 추정이 가능한 개체를 대상으

로 성장형질인 체중이 상위 30%에 해당하는 개체를 고성장 집단으로 하고, 하위 30%에 해당하는 개체를 저성장 집단으로 설정하였다. 통계처리는 각각의 집단에 해당하는 개체들의 총 개체수를 분모로 하고, 각 어미유래의 고성장 집단에 해당하는 개체수를 분자로 설정하여 기여율을 산출하였다. 이후, 각 실험구에 있어서 성장에 영향을 미치는 유전적영향을 조사하기 위해 각각의 집단에 해당하는 개체들이 특정 어미로부터 유래하였는지를 확인하기 위해 산출된 기여율을 토대로 카이제곱검정을 실시하였다. 한편, 이들의 어미가 각각의 집단 중 어느 한쪽에만 관여하고 있었을 경우, 통계적으로 검정이 불가능하기 때문에, 이 경우는 성장에 미치는 유전적 영향이 작용하고 있을 가능성이 있다고 판단하였다. 각 실험구에서 추정어미와 개체들간의 편향이 없는지를 카이제곱검정을 통하여 확인하였다. 통계분석은 js-STAR XR release 1.1.8 (<https://www.kisnet.or.jp/nappa/software/star/info/howto.htm>)에 의해 수행되었고, 통계처리의 유의성을 위험률 5% 미만으로 판정하였다.

결 과

혈연계수를 이용한 추정어미의 결정

본 연구에서는 어미인 암컷 17개체 및 수컷 16개체로부터 생존한 대조구의 117개체와 무어분구의 134개체를 대상으로 어미집단과 함께 혈연계수를 산출하였다. 이 과정에서 추정어미의 결정기준에 부합하지 않은 어미와 개체들을 분석 대상으로부터 제외하였으며 그 결과, 대조구에서는 117개체 중 57개체로부터 암컷 10개체 및 수컷 14개체의 추정어미가 결정되었다. 무어분구에서는 134개체 중 74개체로부터 암컷 8개체, 수컷 13

개체가 추정어미로 결정되었다. 각 실험구로부터 추정어미가 결정된 개체들의 평균 체중을 Table 1에 나타내었다.

고성장 및 저성장 집단에 연관된 추정어미의 내역

대조구의 57개체 중 성장의 상위 및 하위를 각각 30%로 구분한 고성장 집단 17개체와 저성장 집단 17개체를 각각 추출하여 이들과 연관된 추정어미의 내역을 조사하였다. 또한 무어분구의 74개체 중 성장의 상위 및 하위가 각각 30%인 고성장 집단 22개체와 저성장 집단 22개체를 각각 추출하여 이들과 연관된 추정어미의 내역을 조사하였다. 각 실험구로부터 성장의 상위 및 하위가 각각 30%인 고성장 집단과 저성장 집단 개체들의 평균 체중을 Table 2에 나타내었다. 또한 고성장 집단과 저성장 집단의 개체들과 연관된 추정어미의 내역을 Table 3에 나타내었다.

그 결과 추정어미가 결정된 암컷 10개체, 수컷 14개체로부터 대조구에서 고성장 집단과 저성장 집단의 추정어미는 암컷 10개체(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J), 수컷 12개체(a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l)만이 확인되었다(Table 3). 특히 암컷 A는 고성장 개체 전체의 29.4%를 차지할 만큼 높은 비율로 연관되어 있었다. 다만 암컷 A는 저성장 집단에 있어서도 높은 비율을 차지하고 있어 저성장 집단의 개체 전체의 35.2%와 연관되어 있었다(Table 3). 고성장 집단과 저성장 집단의 추정어미의 내역에 있어서는 카이제곱검정을 통해 분석한 결과, 암컷과 수컷간에서 고성장 집단과 저성장 집단의 분포에 유의한 차이가 나타났으며, 암컷 B와 E는 통계적으로 저성장 집단보다 고성장

Table 1. The body weight of progeny derived from putative parents using the KING (Kinship-based Inference for GWASs) software package (mean±SD)

Group	Number of progeny	Body weight (g)
Control	57	504.8±67.9*
Treatment	74	436.1±68.6

SD, Standard deviation. *Statistical significance between control and treatment group (t-test, $P<0.05$).

Table 2. The body weight of progeny from high- and low-growth population in each group (mean±SD)

Group	Population	Number of progeny	Body weight (g)
Control	High-growth population	17	576.5±39.4*
	Low-growth population	17	426.6±44.3
Treatment	High-growth population	22	516.0±33.9*
	Low-growth population	22	362.0±45.7

SD, Standard deviation. High-growth population, top 30% of body weight; Low-growth population, lower 30% of body weight. *Statistical significance between High- and Low-growth population (t-test, $P<0.05$).

집단에 유의한 영향이 확인되었다($P<0.05$)(Table 3). 암컷 B와 E로부터 유래한 개체들은 저성장 집단 개체수의 각각 5.8%를 차지하고 있었던 것에 대비하여, 고성장 집단에 있어서는 전체 개체수의 각각 23.6%, 17.6%를 차지하고 있었다(Table 3). 한편, 암컷 D로부터 유래한 개체들은 저성장 집단 전체 개체수의 17.6%를 차지하고 있었던 것에 대비하여, 고성장 집단에 있어서는 전체 개체수의 5.8%를 차지하였으며, 통계적으로 저성장 집단에 유의한 영향이 확인되었다($P<0.05$)(Table 3). 암컷 3개체(G, 5.8%; H, 5.8%; I, 5.8%)과 수컷 3개체(g, 17.6%; h, 5.8%; i, 5.8%)에 있어서는 저성장 집단에 한해서만 연관되어 있었다(Table 3). 반대로, 암컷 1개체(J, 5.8%)와 수컷 3개체(j, 5.8%; k, 5.8%; l, 23.6%)는 고성장 집단에 한해서만 연관되어 있었다(Table 3). 그 외의 추정어미(암컷 2개체, C, F; 수컷 6개체, a, b, c, d, e, f)에 있어서는 고성장 집단과 저성장 집단에 있어서 통계적으로 성장에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 추정되었다(Table 3).

추정어미가 결정된 암컷 8개체, 수컷 13개체 중 무어분구 그룹에서 고성장 집단과 저성장 집단의 추정어미는 암컷 8개체(A, B, C, D, E, G, H, I)와 수컷 11개체(a, b, c, d, f, g, j, k, l, m, n)만이 해당되었다(Table 3). 암컷 A와 E는 고성장 집단과 가장 많이 연관되었으며, 어느쪽도 고성장 집단 개체 전체의 27.2%를 차지하고 있었으나, 이들의 추정어미인 암컷 A와 E는 저성장 집단에 있어서도 각각 22.8%, 18.2%의 높은 비율로 연관되어 있었다(Table 3). 암컷 B로부터 유래한 개체들은 저성장 집단 전체 개체수의 4.6%를 차지하고 있었던 것에 대비하여, 고성장 집단에 있어서는 전체 개체수의 18.2%를 차지하고 있었다(Table 3). 뿐만 아니라, 암컷 B는 통계적으로 저성장 집단보다 고성장 집단에 유의한 영향이 확인되었다($P<0.05$)(Table 3). 한편, 암컷 H와 수컷 g로부터 유래한 개체들은 저성장 집단 전체 개체수의 각각 18.2%, 22.8%를 차지하고 있었던 것에 대비하여, 고성장 집단에 있어서는 전체 개체수의 각각 4.6%, 9.0%를 차지하였으며, 통계적으로 저성장 집단에 유의한 영향이 확인되었다($P<0.05$)(Table 3).

암컷 2개체(C, 22.8%; D, 4.6%)와 수컷 5개체(c, 4.6%; f, 4.6%; k, 4.6%; m, 4.6%; n, 31.8%)에 있어서는 저성장 집단에 한해서만 연관되어 있었다(Table 3). 반면, 암컷 1개체(G, 18.2%)와 수컷 2개체(a, 13.6%; l, 45.4%)는 고성장 집단에 한해서만 연관되어 있었다(Table 3). 그 외의 추정어미(암컷 1개체, I; 수컷 3개체, b, d, j)에 있어서는 고성장 집단과 저성장 집단에 있어서 통계적으로 성장에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 추정되었다(Table 3).

실험구간의 각 성장집단의 개체들에 있어서 추정어미 내역의 비교

체중에 있어서 대조구와 무어분구에서 공통으로 고성장 집단 혹은 저성장 집단과 연관된 추정어미는 암컷 8개체(A, B, C,

D, E, G, H, I)와 수컷9개체(a, b, c, d, f, g, j, k, l)가 확인되었다 (Table 3). 이 중, 암컷 B부터 유래한 개체들은, 대조구와 무어분구 모두 저성장 집단보다 고성장 집단에 유의한 영향이 확인되었다($P<0.05$)(Table 3). 암컷 G로부터 유래한 개체들에 있어서는 대조구에서는 저성장 집단에 한해서 연관되어 있었고, 저성장 집단의 5.8%를 차지하고 있었다(Table 3). 그러나, 무어분구에서는 고성장 집단에 한해서만 연관되어 있었으며, 고성장 집단의 18.2%를 차지하고 있었다(Table 3). 반대로, 수컷 k로부

터 유래한 개체들에 있어서는 대조구에서는 고성장 집단에 한해서 연관되어 있었고, 고성장 집단의 5.8%를 차지하고 있었다 (Table 3). 한편, 무어분구에 있어서의 수컷 k는 저성장 집단에 한해서만 연관되어 있었고, 저성장 집단 전체 개체수의 4.6%를 차지하고 있었다(Table 3). 또한 수컷 l로부터 유래한 개체들은 대조구와 무어분구 모두 고성장 집단에 한해서 연관되어 있었고(Table 3), 특히 무어분구에서는 고성장 집단 전체 개체의 45% 이상을 차지하고 있었다(Table 3).

Table 3. Number of high- and low-growth individuals produced by female (dam) and male (sire) parents

Parent	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	High (%)	Low (%)
Control group												
a			(2)/(2)			(1)/(0)					17.6	11.8
b	(2)/(3)*										11.8	17.6
c	(1)/(1)	(1)/(0)					(0)/(1)				11.8	11.8
d	(1)/(0)			(0)/(1)	(1)/(1)						11.8	11.8
e		(0)/(1)				(0)/(1)				(1)/(0)	5.8	11.8
f				(0)/(1)	(1)/(0)						5.8	5.8
g	(0)/(2)							(0)/(1)			0	17.6
h									(0)/(1)		0	5.8
i				(0)/(1)							0	5.8
j					(1)/(0)						5.8	0
k	(1)/(0)										5.8	0
l		(3)/(0)		(1)/(0)							23.6	0
High (%)	29.4	23.6*	11.8	5.8	17.6*	5.8	0	0	0	5.8	100	
Low (%)	35.2	5.8	11.8	17.6*	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	0		100
Treatment group												
a					(3)/(0)						13.6	0
b	(5)/(2)			(0)/(1)							22.8	13.6
c		(0)/(1)									0	4.6
d					(1)/(1)						4.6	4.6
f					(0)/(1)						0	4.6
g	(1)/(2)						(1)/(3)				9.0	22.8*
j					(1)/(1)		(0)/(1)				4.6	9.0
k	(0)/(1)										0	4.6
l		(4)/(0)			(1)/(0)	(4)/(0)		(1)/(0)			45.4	0
m					(0)/(1)						0	4.6
n			(0)/(5)					(0)/(2)			0	31.8
High (%)	27.2	18.2*	0	0	27.2	18.2	4.6	4.6	100			
Low (%)	22.8	4.6	22.8	4.6	18.2	0	18.2*	9.0		100		

Uppercase alphabets, dams; Lowercase alphabets, sires. High growth population, Top 30% of body weight; Low growth population, Lower 30% of body weight. (Numbers)/(Numbers): (Number of fish of high growth population produced from the parent)/(Number of fish of low growth population produced from the parent). High (%)= (total number of fish of high growth population produced from the parent/total number of fish of high growth population) \times 100. Low (%)= (total number of fish of low growth population produced from the parent/total number of fish of low growth population) \times 100. *Statistical significance between High- and Low-growth population (X^2 -test, $P<0.05$).

고 찰

본 연구에서는 긴다이 참돔[®]을 대상으로 성장에 영향을 미치는 유전적영향을 해석하고, 무어분 사료공급조건하에서 고성장 계통의 선발육종 가능성을 검토하기 위한 목적으로 연구를 실시하였다. 이를 위해, 본 연구에서는 차세대 염기서열분석 기반 유전체수준의 MIG-seq을 통해 얻어진 SNV를 이용하여 혈연계수를 산출하고, 각 실험구에서 고성장 또는 저성장이 확인된 개체들의 추정어미를 토대로 성장에 미치는 유전적 영향을 분석하였다.

각 사료공급과 성장에 미치는 유전적 영향

본 연구에서는 각 실험구에서 저성장 집단보다 고성장 집단에 연관된 추정어미와 고성장 집단 혹은 저성장 집단에 연관된 추정어미가 복수 확인되었다(Table 3). 참돔에 있어서 성장형질은 유전적영향을 강하게 받고 있으며(Murata et al., 1996), 이러한 경향이 본 연구의 무어분 사료의 공급조건하에 있어서도 추정어미의 내역을 통해 확인되었던 것으로 미루어 볼 때, 본 연구의 방법 및 결과에 있어서도 일정한 신뢰성을 가지고 있을 것으로 사료된다.

일반적으로 대상종의 선발육종이 진행되면, 세대를 거듭하면 할수록 집단내에 대상형질은 유전적으로 고정되어가고, 이 과정에서 대상형질에 대한 선발육종의 효과는 점진적으로 나타나는 한편, 이들 집단내에 있어서의 유전적 다양성은 저하된다(Taniguchi, 2011). 유전적 다양성이 높은 상태는 특정 종 또는 특정 집단에서 다양한 유전적 배경을 가진 개체가 많이 존재하는 상태를 의미하며, 낮은 상태는 그 반대를 의미한다. 이러한 측면에서 특정 종 또는 특정 집단의 유전적 다양성이 높으면 환경의 변화에 다양한 반응(진화 등을 포함)이 나타날 가능성 또한 높아진다. 예를 들어, 해양에 널리 분포하는 자연산 참돔의 유전적 다양성은 적어도 양식산 참돔보다는 훨씬 높다(Taniguchi, 2007).

이는 자연산 참돔이 서식하는 어느 지역의 집단 혹은 개체에 있어서는 어류 유래의 단백질원을 전혀 필요로 하지 않고 고성장의 유전능력을 가진 집단 혹은 개체(또는 그러한 변이)가 어딘가에 존재할 가능성을 의미한다. 비록 이러한 집단 혹은 개체를 자연산 참돔의 집단으로부터 확보하는 것은 현실적으로 매우 어렵지만 만약 이와 같은 집단 혹은 개체를 운 좋게 포획할 수 있다면 이론적으로는 무어분 사료공급조건하에서도 고성장 계통의 생산이 가능할 것으로 사료된다. 한편 성장형질의 지속적인 유전적 개량을 위해 생산된 긴다이 참돔[®]은 장기간에 걸쳐 소수의 집단을 대상으로 선발육종 및 교배육종을 통한 결과 산물이기 때문에 자연산 참돔에 비해 유전적 다양성이 저하되어 있으며, 이는 다양한 유전적 형질개량의 리소스로 활용될 가능성이 낮음을 의미한다(Taniguchi, 2007). 그럼에도 불구하고, 본 연구에서는 유전적 다양성이 저하된 긴다이 참돔[®]에 있어서

도 무어분 사료의 공급조건하에서 고성장 유전능력을 가진 개체가 일부 존재할 가능성이 확인되었다. 본 연구의 결과는 향후 무어분 사료공급조건하에 있어서 고성장 계통의 선발육종을 실현할 수 있는 기초연구로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

무어분 사료의 공급조건하에서의 고성장 계통의 생산

본 연구에서는 사료의 공급조건에 관계없이 고성장 계통의 생산 가능성이 있는 암컷 B와 수컷 I가 확인되었다(Table 3). 향후 이와 같은 어미를 복수 선발하게 되면, 통상의 배합사료 뿐만 아니라 무어분 사료의 공급조건하에서도 고성장 계통의 생산이 가능할 것으로 사료된다. 한편, 본 연구에서는 대조구에서는 저성장을 나타낸 개체만을 생산하고, 무어분구에서는 고성장을 나타낸 개체만을 생산하고 있던 암컷 G 또한 확인되었다(Table 3). 이는 사료의 공급조건에 따라 성장에 미치는 영향이 반대로 나타날 수 있는 어미가 긴다이 참돔[®]의 집단 내에 있어서도 다수 존재하고 있음을 의미한다. 이와 같은 어미는 무어분 사료의 공급조건하에서 고성장 계통을 생산하기 위한 후보어미로서의 이용은 가능하겠지만, 통상의 배합사료의 공급조건하에 있어서는 성장의 저해가 나타나는 등의 문제를 일으킬 수도 있기 때문에 선발육종에 있어서는 주의가 필요할 것으로 사료된다.

무어분구에서는 수컷 n유래의 개체는 저성장 집단의 30% 이상을 차지하고 있음이 확인되었다(Table 3). 이와 같이 무어분 사료의 이용 가능성이 낮은 개체를 생산하는 어미를 어미집단으로부터 배제시키는 것 또한 이후의 고성장 계통의 생산에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다. 다만 초기 선발육종의 과정에서 특정 소수 개체만을 선발하여 세대를 거듭하게 되면, 후대에서 유전적 다양성의 급격한 저하와 근교양성(근친 교배를 계속한 계통의 쇠퇴; Kijima, 1994) 등의 다양한 문제를 일으킬 가능성 또한 배제할 수 없기 때문에 본 연구를 토대로 향후 선발계통을 생산하기 위해서는 집단의 유전적 다양성 혹은 형질 고정까지의 기간을 함께 고려할 필요가 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 NGS에 기반한 유전체 분석방법을 통해 무어분 사료의 공급조건하에 있어서도 고성장 참돔 계통의 생산 가능성을 검토하기 위한 연구의 토대를 마련하였다. 본 연구에서 수행된 일련의 분석방법은 이미 소속연구소 내의 다양한 참돔 집단을 통해 진자여부의 정확성이 확인되었기 때문에(unpublished data), 본 연구의 결과에 있어서도 신뢰성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 다만 본 연구에서는 현재까지 참돔의 선발육종 연구에서 사용된 자연산란법을 통한 집단선발을 기초로 연구를 수행하였기 때문에, 고성장 및 저성장 가입가계 비율 등을 비교 분석하기 위한 측면에 있어서는 한계가 존재한다. 따라서 향후 연구에서는 본 연구에서 확인된 고성장 집단 및 저성장 집단의 추정어미를 바탕으로 인공수정법을 통해 이들 개체의 성장 및 어미내역을 비교 분석함으로써, 선발육종을 통한 계통 생산 및 재현성을 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구에 협력해주신 일본 긴키대학 수산연구소 시라하마 실험장 및 우라가미 실험장의 교직원께 감사를 표합니다. 또한, 본 연구의 실험에 도움을 주신 나시노키 히카루에게도 감사를 표합니다. 이 논문은 2021년도 일본 긴키대학 수산연구소 내부의 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Aas TS, Ytrestøyl T and Åsgård T. 2019. Utilization of feed resources in the production of atlantic salmon (*salmo salar*) in norway: An update for 2016. *Aquac Rep* 15, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>.
- Akita K, Hiruma S, Nishikawa T and Fujinami Y. 2021. Genetic parameter estimation of growth in feeding trial with low fishmeal diet in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Genet Breed Sci* 50, 27-35.
- Aoki H, Furuichi M, Watanabe K, Satoh S, Yamagata Y and Watanabe T. 2000. Use of low or non-fish meal diets for red sea bream. *Aquacult Sci* 48, 65-72. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.48.65>.
- Hansen A, Rosenlund G, Karlsen Ø, Koppe W and Hemre G. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I-Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272, 599-611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.034>.
- Harada T. 1984. Maturation and egg yield of reared striped jack *Caranx delicatissimus*. *Kinki Daigaku Suisan Kenkyujou Nenpo* 2, 143-149.
- Harada T, Murata O and Miyashita S. 1984. Artificial hatching and rearing of striped jack, *Caranx delicatissimus*. *Kinki Daigaku Suisan Kenkyujou Nenpo* 2, 151-160.
- Hua K, Cobcroft JM, Cole A, Condon K, Jerry DR, Mangott A, Praeger C, Vucko MJ, Zeng C, Zenger K and Strugnell JM. 2019. The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth* 1, 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>.
- Kato K. 2002. Studies on the breeding of the red sea bream, *Pagrus major*. Ph. D. Dissertation, Fisheries Laboratory of Kinki University, Shirahama, Japan.
- Kato K. 2023. Breeding studies on red sea bream *Pagrus major*: Mass selection to genome editing. *Fish Sci* 89, 103-119. <https://doi.org/10.1007/s12562-022-01668-0>.
- Kaushik S. J, Coves D, Dutto G and Blanc D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391-404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
- Kijima A. 1994. Subjects of study in fish genetics and breeding science. *J Anim Genet* 22, 56-64. <https://doi.org/10.5924/ab-gri1993.22.56>.
- Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS, Daly K, Sale M and Chen W. 2010. Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics* 26, 2867-2873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq559>.
- Miyashita M and Kumai E. 2000. From the site selection for aquaculture to shipping and marketing, Kampachi, *Seriola dumerili*. In: *Marine Fish Farming*. Kumai E, ed. Minato-bunsha, Tokyo, Japan, 78-88.
- Murata O, Harada T, Miyashita S, Izumi K, Maeda S, Kato K and Kumai H. 1996. Selective breeding for growth in red sea bream. *Fish Sci* 62, 845-849.
- Murata O. 1997. Studies on the breeding of cultivated marine fishes. Ph. D. Dissertation, Fisheries Laboratory of Kinki University, Shirahama, Japan.
- National Research Council. 1993. Nutrient Requirements of Fish. The National Academies Press, Washington, D.C., U.S.A.
- Overturf K, Barrows FT and Hardy RW. 2013. Effect and interaction of rainbow trout strain (*oncorhynchus mykiss*) and diet type on growth and nutrient retention. *Aquac Res* 44, 604-611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03065.x>.
- Sawada Y, Okada T, Miyashita S, Murata O and Kumai H. 2005. Completion of the pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquac Res* 36, 413-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01222.x>.
- Seong T, Kitagima R, Haga Y and Satoh S. 2020. Non-fish meal, non-fish oil diet development for red sea bream, *pagrus major*, with plant protein and graded levels of *Schizochytrium* sp.: Effect on growth and fatty acid composition. *Aquac Nutr* 26, 1173-1185. <https://doi.org/10.1111/anu.13074>.
- Seong T, Matsuyoshi J, Haga Y, Kabeya N, Kitagima R, Miyahara J, Koshiishi T and Satoh S. 2022. Utilization of microalgae *Schizochytrium* sp. in non-fish meal, non-fish oil diet for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquac Res* 53, 2042-2052. <https://doi.org/10.1111/are.15732>.
- Suyama Y and Matsuki Y. 2015. MIG-seq: An effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Sci Rep* 5, 16963. <https://doi.org/10.1038/srep16963>.
- Suzuki H. 2019. Has low fishmeal feed become popular?. In: *Changes in Fish Farming Feed in the Last 10 Years*. Aqua Net: Fisheries information magazine. Sobunsha Press, Tokyo, Japan, 22-24.
- Takakuwa F, Murashita K, Noguchi Y, Inui T, Watanabe K, Sugiyama S, Yamada S, Biswas A and Tanaka H. 2023. Effects of long-term feeding of fishmeal-free diet on growth parameters, bile acid status, and bile acid-related gene expression of yearling red sea bream *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843). *Aquaculture* 570, 739444. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739444>.

- Taniguchi N. 2007. Studies on consevation and utilization of genetic divergence in fish and shellfish population. Nippon Suisan Gakkaishi 73, 408-420. <https://doi.org/10.2331/suisan.73.408>.
- Taniguchi N. 2011. Current breeding and genetics in aquaculture and its perspective. J Anim Genet 39, 16-25. <https://doi.org/10.5924/abgri.39.16>.
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, Jackson JB, Lotze HK, Micheli F, Palumbi SR, Sala E, Selkoe KA, Stachowicz JJ and Watson R. 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. Science 314, 787-790. <https://doi.org/10.1126/science.1132294>.
- Yamamoto T, Murashita K, Matsunari H, Oku H, Furuita H, Okamoto H, Amano S and Suzuki N. 2015. Selectively bred juvenile F₂ amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* fed a low fishmeal diet exhibit growth comparable to unselected juveniles fed a fishmeal-based diet. Fish Sci 81, 83-93. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0817-8>.