

유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생식 능력 평가*

김봉석 · 문영봉* · 정창화** · 김동수** · 이영돈***

부산수산대학교 해양생물학과, *국립수산진흥원

부산수산대학교 양식학과, *제주대학교 해양연구소

Evaluation of Fertility of Artificial Induced Gynogenetic Diploid Male in *Paralichthys olivaceus**

Bong-Seok KIM, Young Bong MOON**, Chang Hwa JEONG***, Dong Soo KIM***, and Young-Don LEE****

Department of Marine Biology and ***Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

**National Fisheries Research and Development Agency, Kyoung sang nam-do 626-900, Korea

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

ABSTRACT

To evaluate the reproductive ability of gynogenetic diploid male, *Paralichthys olivaceus*, histological analysis of testis, cytological analysis of spermatozoa and fertilization test with normal eggs were studied and the results are as follow ; The gonads of gynogenetic diploid male were histologically normal, and many spermatozoa were observed in their testis. Number of spermatozoa from the control and gynogenetic diploid male were 2.58×10^9 and 2.42×10^9 cells per 1 ml of milt, respectively ($P > 0.05$). Amount of milt per kg body weight from the gynogenetic diploid male was significantly higher ($P < 0.01$) than that from the control male (8.3 ml). Size and morphology from the two experimental groups were not different ($P > 0.05$). More than 80 % of fertilization rates and hatching rates were observed when the eggs from the control were fertilized with the gynogenetic diploid male sperms.

* 본 연구는 1994년 부산수산대학교 해양산업개발연구소(RCOID) 및 교육부 학술진흥재단 대학부설 연구소의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

서 론

어류에 있어 염색체 조작을 통한 자성발생성 2배체의 유도는 순계의 확립을 통하여 단기간에 우량친어의 확보를 위해 그리고 성결정 기작이 암컷 동형 집합일 경우 전 암컷 집단을 생산하기 위해 사용되고 있다(Chourrout and Quillet 1982; Nagy and Csanyi 1984). 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 암컷의 성장이 수컷에 비해 빠르기 때문에 전 암컷 넙치의 양식이 어민의 소득 향상에 도움을 줄 수 있고, 양식시 친어로 사용되고 있는 어류의 근친 교배 방지를 위한 목적으로 이미 자성발생성 2배체 유도를 통한 유전 육종이 시도된 바 있다(Kim *et al.* 1993b; Tabata 1991; Tabata and Gorie 1988a & b). 우리 나라의 넙치 양식은 양식 기술이 확립되면서 1989년을 기점으로 급격한 생산성 향상을 이루었으며, 1991년 이후에는 양식에 의한 생산고가 어업에 의한 생산고를 웃도는 현상을 보여주고 있다(농림수산부 1993). 이러한 현상으로 나타난 생산고의 급격한 증가는 가격의 불안정성을 초래해, 동일 노력하에서 생산성 향상을 위한 우량 종묘의 생산 및 이의 필요성이 이미 대두된 바 있다(Kim *et al.* 1988). 따라서 Kim (1994)은 단순교배에 의해 수컷에 비해 성장이 빠른 전 암컷 집단을 생산할 수 있는, 성 유전자형이 XX인 자성발생성 넙치를 유도하여 학계에 보고하고 이미 국내 생명 물질 특허를 출원한 바 있다.

본 연구는 유도된 자성발생성 2배체 수컷 넙치의 산업적 유용성을 검토하기 위하여 상기 유전자가 조작된 자성발생성 2배체 수컷 넙치의 정소를 조직학적으로 분석하여 대조군과 비교하고, 생성된 정자를 세포학적으로 분석을 한 후, 일반 양식장에서 사육되고 있는 암컷 넙치의 난과 수정시켜 자성발생성 2배체 수컷 넙치의 생식 능력 및 발생 능력을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 어 류

넙치 수컷은 Kim 등(1993b)의 방법에 의해 유도된 자성발생성 2배체 넙치를 Kim (1994)의 방법을 약간 수정하여 성전환시킨 2년생 자성발생성 2배체 수컷 넙치와, 일반 수컷으로는 Kim 등(1993b)의 실험시 대조군으로 사용되었던 수컷 넙치를 실험에 사용하였다. 이들 자성발생성 2배체 수컷 넙치와 일반 수컷의 수정력 및 발생 능력 평가를 위해 사용된 일반 넙치 암컷은 제주도에 소재한 서로 다른 2 군데 양식장에서 친어로 사용되고 있던 3~5년생 개체중 성숙 어체를 선별하여 친어로 사용하였다.

2. 방 법

2-1. 생식소의 조직학적 조사

일반 수컷과 자성발생성 2배체 수컷 넙치 생식소의 조직학적 조사를 위하여 각각 5마리씩 무작위 추출, 해부한 후 생식소를 절취하여 Bouin 용액에 고정하였다. 고정된 시료는 상범인 paraffin 조직 절편법에 따라 4 μ m로 절편을 만들었다. 염색은 Harris's hematoxylin과 eosin-phroxine으로 비교염색하였고, Lee (1990)가 보고한 넙치의 생식소 발달 단계에 따라 생식소를 분석하였다.

2-2. 정자에 대한 세포학적 연구

대조군과 자성발생성 2배체 숫컷 넙치에 대하여 체중 1 kg에 대한 정액의 양을 측정하고 또 정액 1 ml 중 정자의 수를 세어 두 계통간 차이를 조사하였다. 또한 정자를 slide에 도말한 후 Giemsa 용액으로 염색하고, 광학 현미경 하에서 정자의 장경(length of head), 단경(Breadth of head) 그리고 정자의 길이(length of spermatozoa) 및 형태를 측정하였다.

2-3. 수정 및 발생능력 평가

자성발생성 2배체 숫컷으로부터 생성된 정자의 수정 능력 및 발생 능력 평가는 Park 등(1994)의 방법에 의해 상기의 두 넙치 양식장으로부터 3~5년된 암컷 친어 23마리를 선발하여 HCG를 어체 중 kg당 2,000 IU의 농도로 복강 주사하였다. 주사 2일 후 복부 압박법에 의해 채란하였고 미리 준비해 둔 정자와 수정시켜 부상을, 수정율 및 부화율을 측정하였다. 부상율은 전체 얻어진 난에 정액을 넣어 수정시킨 후 세란하고, 5분 후 부상된 난의 양을 재어 전체 얻은 난에 대한 백분율로 구하였다. 이 때 난의 수는 cc 당 1,000개로 하였다. 수정율은 세란 2시간 후 실험군당 110개씩의 난을 무작위로 4번 반복 추출하여 발생이 진행되는 난의 수를 세어 백분율로 하였다. 부화율 측정을 위해서는 수정 48시간 후 수정율과 동일한 방법에 의해 실험군당 4개의 petri dish에 각각 110개의 난을 수용하여 부화시킨 후, 부화된 자어의 수를 세어 백분율로 나타내었다.

2-4. 통계 처리

모든 자료는 Student's t-test 를 수행하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 토의

어류의 생식 능력 평가는 생식소 수준, 배우자 수준 및 접합자 수준에서 논의되어야 한다(Chevassus 1983; Yamazaki 1983). 성전환된 어류는 일반적으로 정상적인 생식능력을 갖는 것으로 보고되어 있으나, 무지개송어의 성전환된 숫컷은 생식소 및 배우자 수준에서 정상적으로 성 성숙이 이루어져 정자를 형성하지만, 정소의 형태가 비정상적이며 수정관이 발달하지 못해 접합자 수준의 불임이 보고되어 있다(Lincoln and Bye 1984; Kim *et al.* 1993a). 이에 본 연구에서는 유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 생식 능력을 평가하기 위해 생식소에 대한 조직학적 분석을 실시하였다. 그 결과 대조군 숫컷 넙치의 생식소는 수많은 정소 소엽 구조를 나타내고 있다. 이들 정소 소엽의 내강에는 변태를 마친 다수의 정자가 무리를 지어 형성되어 있어(Fig. 1a), Lee (1990)가 보고한 바와 같았다. 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 경우도 정소내에서 대조군과 동일한 발달 상태의 조직상을 보여(Fig. 1b), 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 정소 역시 정상적으로 발달함을 알 수 있다.

대조군 숫컷과 유도된 자성발생성 2배체 숫컷으로부터 얻은 정액의 양을 비교한 결과는 Table 1에 그리고 1 ml 당 정자의 수는 Table 2에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 대조군의 정액은 어체중 1 kg당 단지 8.3 ml 정도였으나 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 경우 어체중 1 kg당 20.6 ml 로 대조군에 비해 거의 2배 이상 되는 것으로 나타나 매우 통계적으로 유의하였다($P < 0.01$). 그러나 정액 1 ml 당 정자의 수는 두 군 모두 $2.4 \sim 2.6 \times 10^9$ 개로써 통계적으로 유의한 차가 나타나지 않았다.

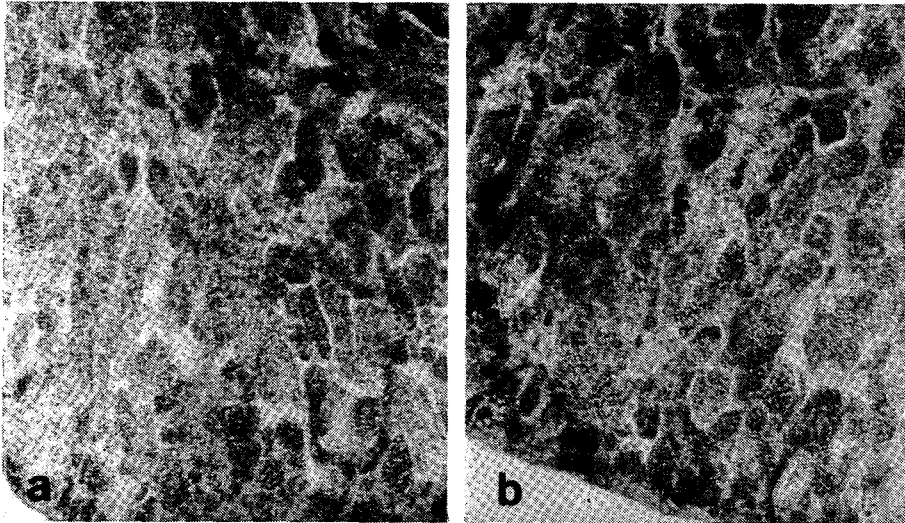


Figure 1. Transverse sections of control male and gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus* gonads: (a) control testis; (b) gynogenetic diploid male testis

($P > 0.05$). 이러한 정액 1 ml 당 정자의 수는 Scott and Baynes (1980)가 보고한 어류의 일반적인 정자의 양과 일치하였다. Table 1 과 2의 결과를 비교할 때 자성발생성 2배체 숫컷은 정액의 양이 많기 때문에 1회 사정시 많은 양의 정자를 사출시킬 수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 일반 암컷과 유도된 자성발생성 2배체 숫컷을 산란조에서 단순 교배시켜 수정율을 검토하여야 할 것이다.

광학 현미경을 이용하여 두 군간의 정자의 크기를 비교한 결과는 Table 3에 나타내었다. 두 군 모두 두부의 장, 단경 및 전체 정자의 길이에서 유의한 차가 나타나지 않았다. 또한 두 실험군간 정

Table 1. Comparisons of amount of milt per kg body weight in control and gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*

Specimen	No. of male used	Amount of milt (ml)
Control male	12	8.3 ± 5.4*
Gynogenetic diploid male	30	20.6 ± 12.9*

* Mean differs at $P < 0.01$

유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생식능력 평가

Table 2. Number of spermatozoa per 1 ml of milt in control and gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*. Means followed by different letters are significantly different (P < 0.05)

Specimen	Fish number	Number of sperms per 1 ml milt
Control male	1	1 x 10 ⁹
	2	4 x 10 ⁹
	3	3 x 10 ⁹
	4	3.5 x 10 ⁹
	5	1 x 10 ⁹
	6	3 x 10 ⁹
Mean ± S.D.		(2.58 ± 1.17) x 10 ^{9a}
Gynogenetic diploid male	1	3 x 10 ⁹
	2	3 x 10 ⁹
	3	2 x 10 ⁹
	4	1.5 x 10 ⁹
	5	1.5 x 10 ⁹
	6	3.5 x 10 ⁹
Mean ± S.D.		(2.42 ± 0.79) x 10 ^{9a}

자의 구조를 분석한 결과에 있어서도 두 군간 차이를 보이지 않아 자성발생성 2배체 숫컷은 정상 정자를 생산함을 알 수 있었다. 대부분의 경골어류의 난은 micropyle을 가지기 때문에 이들 micropyle을 가지는 어종에서는 정자의 형태가 수정에 매우 중요하다. 이러한 점을 감안할 때 (Saad *et al.* 1988), 본 연구에서 나타난 자성발생성 2배체 숫컷의 정자는 정상적인 형태를 나타내므로 산업적 이용에 아무런 문제가 없을 것으로 보인다.

Table 3. Comparisons of size differences of spermatozoa in control and gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*. Means followed by different letters are significantly different (P < 0.05)

Specimen	No. of fish used*	Length of head (μm)	Breadth of head (μm)	Length of spermatozoa (μm)
Control male	9	2.04 ± 0.13 ^a	1.83 ± 0.07 ^a	41.31 ± 3.95 ^a
Gynogenetic diploid male	9	2.01 ± 0.14 ^a	1.79 ± 0.08 ^a	41.36 ± 3.67 ^a

* Twelve spermatozoa were measured per individual fish

Table 4는 유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치와 일반 암컷을 이용하여 다양한 암, 수 비율로 난과 정자를 얻어 6회에 걸쳐 수정 능력을 조사한 결과이다. Table 4에서 보듯이 평균 63만 여개의 난을 얻어 평균 23 ml의 자성발생성 2배체 숫컷 넙치로부터 얻은 정자와 수정시킨 결과 난질이 나빠 부상율은 45% 전후였으나, 수정율 및 부화율은 모두 80% 이상으로 나타났다. Park (1994)은 넙치에 HCG 등의 호르몬을 주사할 경우 산란은 이루어지나 난질이 나빠 종묘생산시 나타나는 문제점을 이미 지적한 바 있다. 본 연구 결과도 난질의 저하로 인해 부상율은 낮았으나, 수정율과 부화율은 난질에 따라 최고 90% 까지도 나타나 자성발생성 2배체 숫컷 정자는 본 종의 부화 및 발생에 아무런 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

Table 4. Results of artificially fertilized with control female and gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*

Exp. No.	No. of eggs used	Amount of milt used (ml)	Floating rate (%)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
1	120,000 (3)*	35 (2)*	41.9	84.0	78.5
2	450,000 (3)	33 (4)	66.7	94.0	92.0
3	360,000 (3)	19 (2)	40.3	70.3	81.9
4	1,405,000 (9)	23 (5)	36.7	70.7	84.0
5	660,000 (4)	14.8 (2)	50.8	80.2	89.2
6	780,000 (9)	14.8 (4)	31.4	88.6	76.4
Mean ± SD	630,000 ± 406,000	23.3 ± 8.1	44.6 ± 11.5	81.3 ± 8.8	83.7 ± 5.5

* Number of fish used

이상의 결과 본 종에 있어 유도된 자성발생성 2배체 숫컷의 정소는 대조군의 정소와 조직학적으로 같고 정상적으로 성숙하며, 생성된 정자가 발생 능력을 갖는 것으로 나타났다. 이는 앞으로 본 실험에 사용된 자성발생성 2배체 숫컷과 양식장에서 현재 산란에 이용되고 있는 일반 암컷과의 단순교배에 의해 생산성 높은 전 암컷 난을 손쉽게 생산할 수 있음을 강력히 시사한다고 사료된다.

요 약

자성발생성 2배체 유도 기법과 물리학적 처리 방법에 의해 유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 생식 능력 평가를 위해 2년생 어류를 이용하여 정소의 조직학적 분석, 정자에 대한 세포학적 분석 그리고 양식장에서 산란에 이용되고 있는 일반 넙치 암컷의 난과 수정시켜 얻은 수정 및 발생 능력에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 정소의 조직학적 분석 결과 자성발생성 2배체 숫컷은 대조군과 마찬가지로 조직학적 차이가 없고, 정소내에서 정자 변태과정을 수행하는 것으로 나타났다.
2. 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 체중 1 kg 당 정액의 양은 20.6 ml 로써 대조군의 8.3 ml 에 비해 두 배 이상 많게 나타났다($P < 0.01$).
3. 정액 1 ml 당 정자의 수는 대조군에서 2.58×10^9 그리고 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 경우

2.42×10^9 으로 나타나 1 ml 당 정세포의 수는 두 군간 통계적으로 유의한 차가 나타나지 않았다($P > 0.05$).

4. 정자의 크기를 조사한 결과 두부의 장경, 단경 및 정자의 길이에서 모두 차이가 없는 것으로 나타났다($P > 0.05$). 또한 두 군 정자의 형태를 분석한 결과, 외형상 차이를 발견할 수 없었다.
5. 자성발생성 2배체 숫컷 넙치의 수정 및 발생능력 평가를 위해 대조군의 난을 얻어 수정시킨 결과 난질에 따라 다소 차이를 보였으나, 수정율 및 부화율 모두 80% 이상으로 나타나 성 유전자에 따른 발생 능력의 차이는 없는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Chevassus, B. 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture* 33: 245-262.
- 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.
- Kim, D. S. 1994. A simple and safe technique for masculinization of gynogenetic diploid female in *Paralichthys olivaceus*. *J. Mar. Sys.* (in printing).
- Kim, D. S., C. H. Jeong and I.-B. Kim. 1993a. Induction of all-female triploid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Korean J. Genet.* 15: 213-218.
- Kim, D. S., J. H. Kim., J.-Y. Jo, Y. B. Moon and K. C. Cho. 1993b. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Genet.* 15: 179-186.
- Kim, D. S., S. C. Cheong, S. R. Park and J. K. Lee. 1988. Cytogenetic and biochemical studies on the flatfish, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency* 42: 135-146
- Lee, Y.-D. 1990. Sex Differentiation and development of the gonad in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (TEMMINCK et SCHLEGEL). Ph. D. thesis. Natl. Fish. Univ. Pusan, Pusan 42 pp.
- Lincoln, R. F. and V. J. Bye. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. *Fish Farm.* 7: 22-26.
- Nagy, A. and V. Csanyi. 1984. A new breeding system using gynogenesis and sex-reversal for fast inbreeding in carp. *Theor. Appl. Genet.* 67: 485-490.
- Park, I.-S., H.-B. Kim, H.-J. Choi, Y.-D. Lee and H.-W. Kang. 1994. Artificial induction of spawning by human chorionic gonadotropin (HCG) or carp pituitary extract (CPE) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 7: 89-96.
- Saad, A., R. Billard, M. C. Theron and M. G. Hollebecq. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71: 133-150.
- Scott, A. P. and S. M. Baynes. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707-739.
- Tabata, K. 1991. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanism in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 845-850.
- Tabata, K. and S. Gorie. 1988a. Comparison of the growth of gynogenetic diploids with control diploids in hirame *Paralichthys olivaceus*, reared in the same tank. *Nippon Suisan*

Gakkaishi 54: 1143-1147.

Tabata, K. and S. Gorie. 1988b. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth.

Nippon Suisan Gakkaishi 54: 1867-1872.

Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329-354.

농림수산부, 1993. 농림수산통계연보. 동양문화, 서울, 492 pp.