

전 암컷 2배체 및 3배체 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생산*

김동수 · 문영봉** · 정창화 · 김봉석*** · 이영돈****

부산수산대학교 양식학과, **국립수산진흥원,
부산수산대학교 해양생물학과, *제주대학교 해양연구소

Production of All-Female Diploid and Triploid Populations in *Paralichthys olivaceus**

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

Department of Aquaculture, and ***Department of Marine Biology, 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

All-female diploid *Paralichthys olivaceus* populations were produced by the artificial fertilization with the normal eggs and gynogenetic diploid males sperms. All-female triploids were also conducted to the fertilized eggs by cold shock.

Floating, fertilization and hatching rates of the all-female diploid eggs were not significantly different from that of the diploid control eggs ($P > 0.05$). All-female triploids were also not significantly different from their diploid controls or all-female diploid groups ($P > 0.05$) in the floating and fertilization rates of eggs. However, hatching rates of all-female triploid groups were lower than that of the control ($P < 0.05$). Induction of the triploids were confirmed by the measurement of erythrocyte sizes and by the chromosome counts. The volumes of erythrocytes and nucleus of triploid were larger than those of diploids, respectively. Percent incidences of triploid were 92.6 % in this experiment. The chromosome number of diploids and triploids showed $2n=48$ and $3n=72$, respectively, and their karyotypes were consisted of all acrocentric chromosomes. The gonads of 4-month-old triploids were histologically sterile.

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

서 론

넙치는 전장이 60 cm까지 성장하는 대형어로써 성장이 빠르고 맛이 좋으며, 우리나라 및 일본 등지에서 식용으로 각광받고 있는 고급 해산 어종이다. 그러나 본 종의 어업 생산성은 1980년대 들어 급격히 감소되고 있어 적극적인 자원 조성 및 보호가 요구되며, 아울러 양식에 의한 생산성 향상이 절실히 요구되고 있다(Kim *et al.* 1988). 이에, 최근들어 종묘의 방류 등 어업 생산성의 향상을 기하고 있으나 어획에 의한 생산고는 회복 추세를 보이지 못하고 있다. 그러나, 양식에 의한 생산고는 1992년 3,000 ton 이상을 기록하는 등 급격한 증가세를 나타내고 있다(농림수산부 1993). 이러한 양식에 의한 생산고의 증가와 더불어 유전육종을 통해 단기간에 생산성을 향상시키기 위한 연구가 우리나라 뿐만 아니라 일본 등지에서 진행되고 있다(Kim *et al.* 1993, 1994; Tabata 1991; Tabata and Gorie 1988a & 1988b).

우리나라의 경우 최근 넙치 양식은 생산성 향상을 위해 고밀도 사육이 성행하고 있고, 일반적으로 700~800 g의 넙치가 헛감으로 유통되고 있으나, 대형어인 경우 단가가 높게 책정되어 거래되고 있다. 그러나, 숫컷에 비해 성장이 빠른 본 종의 암컷을 1 kg 이상의 대형어로 키우기 위해서는 필연적으로 물질대사가 급격히 증가되는 1회 이상의 산란기를 거쳐야 하는 문제점이 있다.

이에 본 연구는 Kim 등(1993) 및 Kim (1994)에 의해 유도된 자성발생성 2배체 숫컷과 양식장에서 종묘 생산에 사용되고 있는 암컷을 교배시켜 전 암컷 2배체를 생산하고, 불임어를 생산하기 위해 전 암컷 2배체 난에 저온 처리하여 전 암컷 3배체를 생산하였다.

재료 및 방법

자성발생성 2배체 숫컷은 1992년, Kim 등(1993) 및 Kim (1994)의 방법에 의거 유도하였다. 전 암컷 2배체 및 3배체의 유도를 위하여는 1993년 5월 제주대학교 해양연구소에서 사육 중인 3년생 암컷 친어 15마리로 부터 복부 압박법에 의해 난을 얻어, 자성 발생성 2배체 숫컷 넙치의 정자와 수정시켰다. 이 때, 정자를 얻기 위해 사용된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치 12마리에 대하여 어체중 kg당 1000 IU의 HCG를 주사한 후 채정하였다. 각 실험은 3회 반복 실시하였다.

3배체 유도를 위해서는 Kim 등(1994a)의 방법을 이용 수정난의 제 2극체 방출을 억제하기 위해 수정 3분 후 2 °C의 저온 처리를 45분간 실시하였다. 모든 실험군에 대한 부상율, 수정율, 부화율 측정 및 사육은 Kim 등(1993)의 방법과 동일하게 수행하였다.

유도된 2배체의 성비 분석을 위하여 부화 4개월된 개체를 대상으로 복부를 절개한 후, 생식소의 형태학적 분석을 실시하였다. 이후, 생식소 조직의 일부를 Bouin 용액에 고정, 상법인 paraffin 조직 절편법에 의해 조직학적 분석을 실시하였다. 3배체의 성비 분석은 형태학적으로는 불가능하여 전 어체를 고정한 후 복강부위를 절취, 조직학적 분석을 실시하였다.

유도된 실험군의 배수체 검정을 위해 부화 직후 자어에 대하여 Klingerman and Bloom (1977)의 방법에 의거 Solid method로 염색체 분석을 실시하였고, 어느 정도 성장한 개체들에 대해서는 신장 직접법에 의거(Kim *et al.* 1994b) 염색체 표본을 작성하여 염색체 수 및 핵형을 분석하였다. 이 때, 염색체의 분류는 Levan 등(1964)의 방법에 따랐다. 또한 유도된 배수체의 세포 및 핵의 크기 분석 및 검증은 Kim 등(1994a)의 방법에 따라 행하였으며, 각 실험군 간의 유의 차는 Duncun's multiple range test 에 의해, 그리고 성비는 χ^2 -test에 의해 통계 처리하였다.

결과 및 고찰

처리된 실험군의 부상율, 수정율 및 부화율은 Table 1 에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 부상율은 30.7~35.5% 범위로 나타났다. 또한 수정율에 있어서는 63.8~67.8% 그리고 부화율은 34.4~63.6% 범위였다. 이렇듯 부상율, 수정율 및 부화율이 낮은 이유는 암·수 교배에 의한 산란 시기를 조절하지 못하고, 성숙한 암컷으로 부터 복부 압박법에 의해 인공적으로 채란하였기 때문에 미숙난

Table 1. Comparisons of floating, fertilization and hatching rates of four experimental groups. Means followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

Experimental group	Floating rate (%)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
Normal 2N	31.8 ± 13.3 ^a	63.8 ± 6.1 ^a	62.3 ± 5.58 ^a
All-female 2N	35.5 ± 13.7 ^a	67.8 ± 12.8 ^a	63.6 ± 4.02 ^a
Normal 3N	30.7 ± 14.4 ^a	67.4 ± 11.0 ^a	36.0 ± 3.60 ^b
All-female 3N	32.6 ± 14.7 ^a	67.8 ± 6.2 ^a	34.4 ± 8.65 ^b

및 과숙란이 정상난과 함께 채란되었기 때문으로 사료된다. 이러한 호르몬에 의한 인공 산란의 문제점은 거의 모든 어종에서 나타나는 문제점으로써(Lam 1982), Park 등(1994)은 호르몬 처리에 의한 넙치의 인공산란 유도시 난의 부상율, 수정율 및 부화율이 대조군에 비하여 매우 낮음을 보고한 바 있다. 그러나, 각 실험군간의 부상율, 수정율 및 부화율을 대조군과 비교하여 통계 처리한 결과, 2배체 대조군(일반 암컷 x 일반 수컷)과 전 암컷 2배체군(일반 암컷 x 자성발생성 2배체 수컷)간 차이가 없었고($P > 0.05$), 3배체 대조군 및 전 암컷 3배체 실험군 간에도 부상율, 수정율에는 차이가 없었다($P > 0.05$). 이는 본 연구에서 나타난 낮은 부상율 및 수정율은 난질에 의한 것이며 사용된 대조군 수컷과 자성발생성 2배체 수컷 등으로 부터 얻어진 정자의 질에는 전혀 관련이 없음을 강력히 시사한다고 사료된다. 그러나, 부화율에 있어서는 2배체 대조군 및 전 암컷 2배체 군과 3배체군 및 전 암컷 3배체군간에 차이가 나타나($P < 0.05$) 여타 배수체 실험(Thorgaard 1986)에서와 마찬가지로 수정난에 대한 저온처리는 난의 생존율에 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 따라서, 앞으로 암컷과 자성발생성 2배체 수컷의 단순 교배에 의해 양질의 수정난을 얻을 수 있도록 하여야 할 것이다. 이미 무지개송어의 전 암컷 및 전 암컷 3배체는 그의 생존력이 대조군과 다를 없음이 보고된 바 있고, 무지개송어의 전 암컷 3배체는 '슈퍼송어'라는 명칭으로 판매되고 있다(Lincoln and Scott 1983; Bye and Lincoln 1986).

Table 2는 일반 암컷과 자성발생성 2배체 수컷 넙치와의 교배에서 얻어진 자손들에 대한 성비를 분석한 결과이다. 전 암컷 2배체 집단에 대하여 3회에 걸쳐 무작위로 각 실험군당 12~14마리씩 모두 38마리에 대해 성비를 분석한 결과 모두 암컷으로 나타났다. 또한 전 암컷 3배체 집단에 대하여 2회에 걸쳐 각 10마리씩 20마리에 대해 실시한 성비 분석 결과 모두 암컷이었다. 따라서, Kim 등(1993) 및 Kim (1994)의 방법에 의거, 유도된 자성 발생성 2배체 수컷은 모두 전 암컷을 효율적으로 생산함을 알 수 있었다. Tabata (1991)는 수컷 넙치에 성 호르몬을 투여하여 성전환을 유도한 후 이

들 성전환된 숫컷과 암컷 넙치를 교배시켜 최저 45%에서 최고 100%의 다양한 성비를 얻은 바 있다. 이는 아마도 자성발생성 2배체 유도시 사용된 친어가 유전적으로 순수하지 못한 때문으로 사료되나, 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 앞으로 본 연구 결과 유도된 100% 암컷의 생산 기법은 넙치의 경우 암컷이 숫컷에 비해 성장이 빠른 점을 감안할 때, 산업적 이용시 생산성 향상에 기여할 수 있으리라 사료된다.

Table 2. Sex ratios of progeny by mating with gynogenetic diploid male and normal female in *Paralichthys olivaceus*

Specimen	No. of fish observed	Sex		Percentage of female
		Female	Male	
Diploid				
Exp. I	12	12	0	100
Exp. II	14	14	0	100
Exp. III	12	12	0	100
Subtotal	38	38	0	100
Triploid				
Exp. I	10	10	0	100
Exp. II	10	10	0	100
Subtotal	20	20	0	100
Total	58	58	0	100

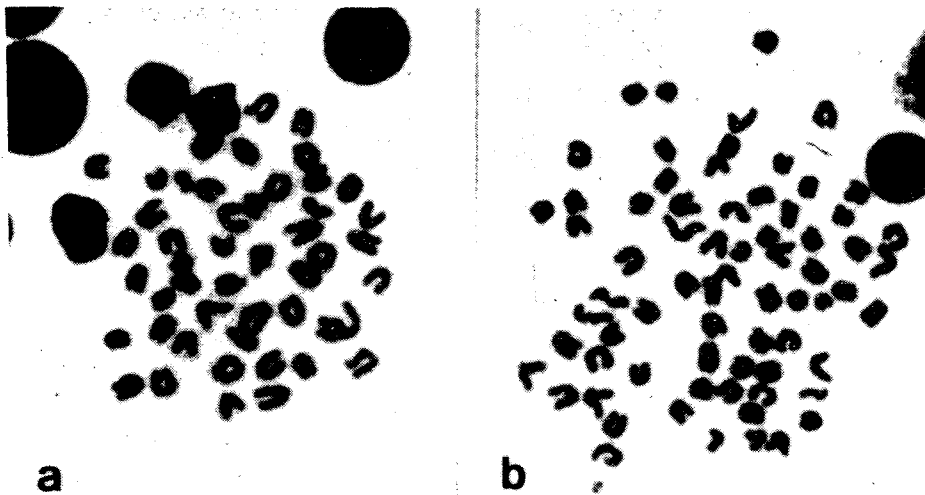


Fig. 1. Metaphase spreads of diploid female (a) and artificial triploid female (b) *Paralichthys olivaceus*.

전 암컷 2배체 및 3배체 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생산

3배체의 감증을 위해 전 암컷 2배체 및 전 암컷 3배체 집단에 대하여 염색체를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 염색체 분석 결과 약 92%의 3배체 유도율을 보였고, 전 암컷 2배체는 $2n=48$ acrocentric chromosome으로, 그리고 전 암컷 3배체는 $3n=72$ acrocentric chromosome으로 구성되어 Kim 등(1994a)의 결과와 비교시 염색체 수와 핵형이 동일하여 3배체가 성공적으로 유도되었음을 알 수 있었다. 또한, 세포 및 핵의 크기를 비교한 결과 그 부피에서 각각 1.95 및 1.96배 증가됨을 알 수 있어 Kim 등(1994a)의 보고와 같았다.

전 암컷 2배체 및 3배체 집단에 대하여 생식소 조직을 분석한 결과 전 암컷 2배체의 생식소는 수질부를 향해 난소박판이 발달하고, 피질층의 소낭상피에서는 난원 세포들의 분열 증식이 활발하고 소낭의 수질부에는 세포질의 염색성이 호염기성을 나타내는 초기성장 난모 세포가 출현하므로써 기능적인 난소로의 변화가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 2a). 그러나, 전 암컷 3배체 넙치의 생식소 내에서는 난소 박판이 여러 개로 분지하여 난소강 쪽으로 용기 발달하면서 몇 개씩의 난원 세포 집단을 가진 기본적인 난소 소낭의 형태를 구성하고 있으나, 초기 성장 난모세포들은 나타나지 않았고 난원 세포기에 머물러 있었다(Fig. 2b). 이러한 2배체와 3배체 암컷 넙치의 초기 생식소 발달 과정의 차이는 아마도 3배체 암컷의 생식소 수준의 불임(gonadic sterility)에 기인하는 것으로 생각된다. 3배체의 생식소 불임은 Purdom (1972)이 가자미의 일종에서 보고한 이래 많은 연구에서 이미 보고되고 있다(Tave 1993).

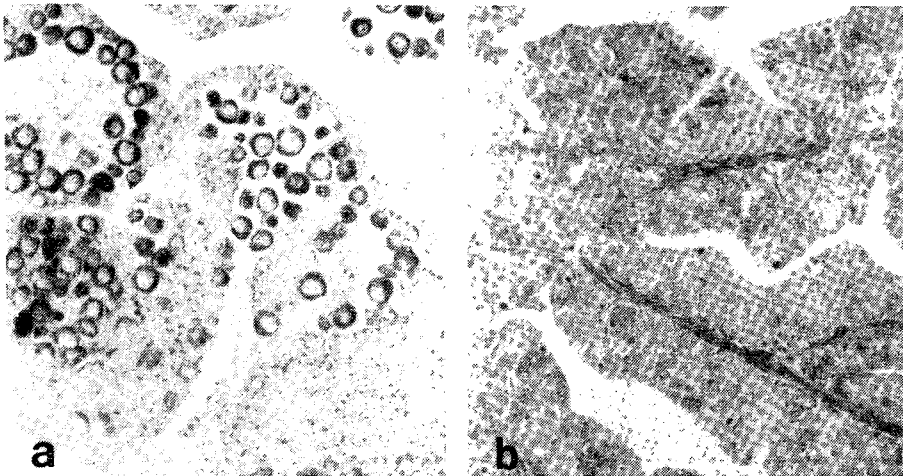


Fig. 2. Transverse sections of diploid and triploid female *Paralichthys olivaceus* gonads: (a) diploid ovary; (b) triploid ovary.

요 약

넙치 암컷과 유도된 자성발생성 2배체 숫컷 넙치를 교배시켜 넙치의 전 암컷 2배체를 생산한 후, 전 암컷 수정란에 저온처리하여 전 암컷 3배체 넙치를 생산하였다. 그 결과 부상을 및 수정율에 있어서 2배체 대조군, 전 암컷 2배체, 3배체 대조군 그리고 전 암컷 3배체군 모두에서 차이가 없었다 ($P > 0.05$). 그러나, 3배체 대조군 및 전 암컷 3배체군은 여타 실험군에 비해 부화율이 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 생식소의 조직학적 분석 결과 전 암컷 2배체 처리군 및 전 암컷 3배체 처리군의 성비

는 모두 100% 암컷이었다. 배수체 검정을 위해 세포크기 및 염색체를 분석한 결과, 세포 및 핵의 크기는 3배체가 대조군에 비해 각각 1.95 및 1.96 배 증가되었고, 염색체 수 및 핵형은 $2n=48$ 및 $3n=72$ acrocentric chromosome이었다. 생식소의 조직학적 분석 결과, 4개월된 3배체 암컷의 생식소는 전형적인 생식소 수준의 불임을 보여 주었다.

참 고 문 헌

- Bye, V. J. and R. F. Lincoln. 1986. Get rid of the males and let the female prosper. *Fish Farm.* 4: 22-24.
- 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, Y.-D. Lee and S. Rho. 1994a. Triploidy induction of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 7: 55-61.
- Kim, D. S., J. H. Kim., J.-Y. Jo, Y. B. Moon and K. C. Cho. 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Genet.* 15: 179-186.
- Kim, D. S., J.-Y. Jo and T.-Y. Lee. 1994b. Induction of triploid in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture* 120: 263-270.
- Klingerman, A. D. and S. E. Bloom. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34: 266-269.
- Lam, T. J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 111-137.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lincoln, R. F. and A. P. Scott. 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture* 30: 375-380.
- 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.
- Purdom, C. E. 1972. Induced polyploid in plaice (*Platichthys flesus*). *Heredity* 29: 11-24.
- 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.
- Tave, D. 1993. *Genetics for Fish Hatchery Managers*, 2nd edn. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 408 pp.
- Thorgaard, G. H. 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57: 57-64.
- 농림수산부, 1993. *농림수산통계연보*. 동양문화, 서울, 492 pp.