

### 3배체 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 유도에 관한 연구

김동수 · 정창화\* · 이영돈\*\* · 노섬\*\*\*

부산수산대학교 양식학과, \*부산수산대학교 해양산업개발연구소  
\*\*제주대학교 해양연구소, \*\*\*제주대학교 증식학과

### Triploidy Induction in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*\*

Dong Soo KIM, Chang Hwa JEONG, Young-Don LEE\* and Sum RHO

Department of Aquaculture, \*RCOID, National Fisheries University  
of Pusan, Pusan 608-737, Korea

\*\*Marine Research Institute, Cheju National University,  
Cheju 690-756, Korea

\*\*\*Department of Aquaculture, Cheju National University,  
Cheju 690-756, Korea

#### ABSTRACT

Triploid fish were induced successfully in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by cold shocking fertilized eggs 3 minutes post fertilization at 2°C for 45 minutes. Percent incidence of triploid was 92.6% in this treatment. Floating rate and fertilization rate of eggs were not significantly different from that of diploid controls (P>0.05).

However, hatchability and abnormal larvae of triploids were significantly different from that of diploid controls (P<0.05). Incidence of triploidy was confirmed by erythrocyte measurements and chromosome counts. The surface area of triploid erythrocytes and nucleus was 1.6 times larger than that of diploids. Diploids had 48 acrocentric chromosomes, while triploids had 72.

#### 서 론

어류에 있어서 생명 공학 기법을 통해 염색체를 조작, 생산된 3배체는 그 개체가 불임이므로 양식에 있어 생산성의 증가와 함께 자연 수계의 유전자 오염을 방지할 수 있어 여러 양식 대상종에 대하여 유도되고 있다(Thorgaard 1986 ; Kim et al. 1994).

본 연구는 1993년 부산수산대학교 해양산업개발연구소센터(RCOID) 및 교육부 학술진흥재단 대학부설 연구소 지원에 의해 수행되었음.

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 동북아 지방에서 주요 식용 어종으로 우리 나라의 경우 어업에 의한 본 종의 연간 생산량은 1987년에 3,150 톤 이던 것이 1992년에는 2,110 톤으로 해마다 감소하고 있다. 그러나 양식에 의한 생산량은 매우 급격히 증가되어 1991년 1,905 톤 에서 1992년에는 3,199 톤의 생산량을 보인 바 있다(농림수산부 1993). 그런데 넙치의 생산성 향상을 위한 유전자 조작은 일본 산에 대하여 Tabata와 Gorie (1983 a,b)와 Tabata (1991)에 의해 그리고 우리 나라의 경우 Kim (1993) 및 Kim 등(1993)에 의해 보고된 바 있다.

양식 생산된 넙치는 주로 홋감으로 소비되어 일정 크기 이상되어야 높은 가격이 형성된다. 그러나 1kg 이상의 어류를 생산하고자 할 때에는 필연적으로 1회의 산란기를 거치게 되며 육상 수조에서 사육시에는 이 시기에 수온의 증가를 수반하게 되어, 고밀도 사육시 그 관리에 있어 어려움을 겪게 된다. 따라서 본 연구에서는 성숙된 넙치가 수온 상승시 급격하게 물질 대사가 활발해져 성체의 고 밀도 사육에 있어 어려움을 주는 것을 막기 위해 불임인 3배체를 유도, 이에 대한 유전학적 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

사용된 어류는 3~5년생의 암, 수 친어들이었다. 암컷은 손으로 배를 눌러 알이 나오는 충분히 성숙된 개체들이었고, 수컷은 태반성 성선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, Sigma)을 체 중 kg당 1,000 IU의 농도로 2회 주사한 후 복부를 압박, 채정하여 수정에 사용하였다. 1회 실험시 암컷은 3~5미로 부터 난을, 그리고 수컷은 3미로 부터 정자를 얻어 실험에 사용하였다.

3배체 유도를 위하여 Kim 등(1993)의 방법을 약간 수정하여 저온 처리하였다. 즉, 제 2 극체 방출 억제제를 위해 수정 3분 후 2°C의 온도 조건하에서 45분간 저온 처리를 행하였다. 처리 후 모든 실험 군은 18°C의 부화조로 옮겨 부화시키면서 부상율, 수정율, 부화율 및 기형율을 구하였다.

유도된 3배체의 분석을 위하여는 세포 크기 및 염색체를 조사하였다. 이 때 염색체 표본은 Kim 등(1982)에 의거하였다. 즉, 염색체 수 및 핵형 분석을 위하여 부화 직후의 자어를 solid method (Klingerman and Bloom 1977)의 방법, 또는 어느 정도 성장한 개체들을 대상으로 신장 직접법에 의거, 실험군 및 대조군 각 20 마리씩을 조사하였다. 염색체 수는 현미경(1,000 X)하에서 각 개체당 10 여개의 판독 가능한 중기 분열상을 대상으로 계수하였다. 모든 실험은 5회 반복하였고 자료의 분석은 가장 나쁜 결과와 가장 좋은 두 결과를 제외한 3회의 실험 자료만을 사용하였다. 대조군과 3배체 처리군간의 유의성은 Student-t 검정에 의하였다.

## 결과 및 고찰

성숙된 암컷 넙치로 부터 인위적으로 난을 적출하여 수정시킨 결과 부상율은 26.4~27.4%로 비교적 낮게 나타나 인위적으로 알을 산란시킬 때 최적 난질의 확보에 어려움이 있는 것으로 나타났다. 수정율은 실험군 모두 60% 정도로 나타나 대조군과 처리군 간에 통계적 유의차는 없었다 ( $P>0.05$ ). 그러나 부화율에 있어서는 2배체가 58.7%인데 비해, 3배체는 42.1%로 대조군에 비해 낮았고, 기형율은 대조군이 5.4% 그리고 3배체가 13.4%로 나타났다. 이들 부화율과 기형율의 대조군과 3배체간에 통계적 유의성을 검정한 결과 3배체는 대조군과 유의차가 있는 것으로 나타나( $P<0.05$ ) 저온 처리는 넙치 자어의 부화와 초기 생존율에 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 이미 여러 종의 어류에서 다양하게 보고된 바 있다(Tave 1993). Kim 등(1994)은 이러한 결과는 각

Table 1. Floating rate of eggs, fertilization rate, hatching rate, incidence of abnormal larva and triploidy in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)\*

Exp. group	Floating rate (%)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Incidence of abnormal larva (%)	Incidence of triploidy (%)
Diploid	27.4 ± 13.8 <sup>a</sup>	58.7 ± 8.8 <sup>a</sup>	58.9 ± 9.6 <sup>a</sup>	5.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	0.0
Triploid	26.4 ± 14.6 <sup>a</sup>	50.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	42.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	13.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	92.6

\* Based on means from the data of triplicate experiments.

Means within a column superscripted with different letters are significantly different (P<0.05).

Table 2. Erythrocyte measurement of diploid and triploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Item	Size (Mean ± SD)		Ratio of means (3N : 2N)
	Diploid	Triploid	
Cell			
Major axis (µm)	9.62 ± 0.03	11.98 ± 0.17*	1.25 : 1
Minor axis (µm)	5.53 ± 0.21	6.96 ± 0.14*	1.26 : 1
Surface area (µm <sup>2</sup> )	41.73 ± 1.25	65.48 ± 1.19*	1.57 : 1
Volume (µm <sup>3</sup> )	153.91 ± 10.20	303.90 ± 10.98*	1.97 : 1
Nucleus			
Major axis (µm)	3.91 ± 0.03	5.02 ± 0.12*	1.28 : 1
Minor axis (µm)	2.88 ± 0.02	3.57 ± 0.14*	1.24 : 1
Surface area (µm <sup>2</sup> )	8.85 ± 0.09	14.07 ± 0.48*	1.59 : 1
Volume (µm <sup>3</sup> )	16.97 ± 0.27	33.52 ± 2.35*	1.98 : 1

\* Mean differs at P<0.01

Table 3. Distribution of chromosome number of diploid and triploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Exp. group	Fish number	Sex	Chromosome number										Total cell counts			
			47	48	49	50	...	70	71	72	73	74				
Diploid	1	F	1	57	2	1										61
	2	F	2	49	1											52
	3	F	1	56	1	1										59
	4	M	1	53	2	1										57
	5	M	1	57	1	1										60
	6	M	1	51		1										53
Triploid	1	F							2	1	54	1	2			62
	2	F						1	3	58	1	1	1			64
	3	F						1	1	55	2	1	1			59
	4	M						1	1	49	1	1	1			52
	5	M						1	1	58	2	1	1			62
	6	M						1	1	56	1	1	1			59

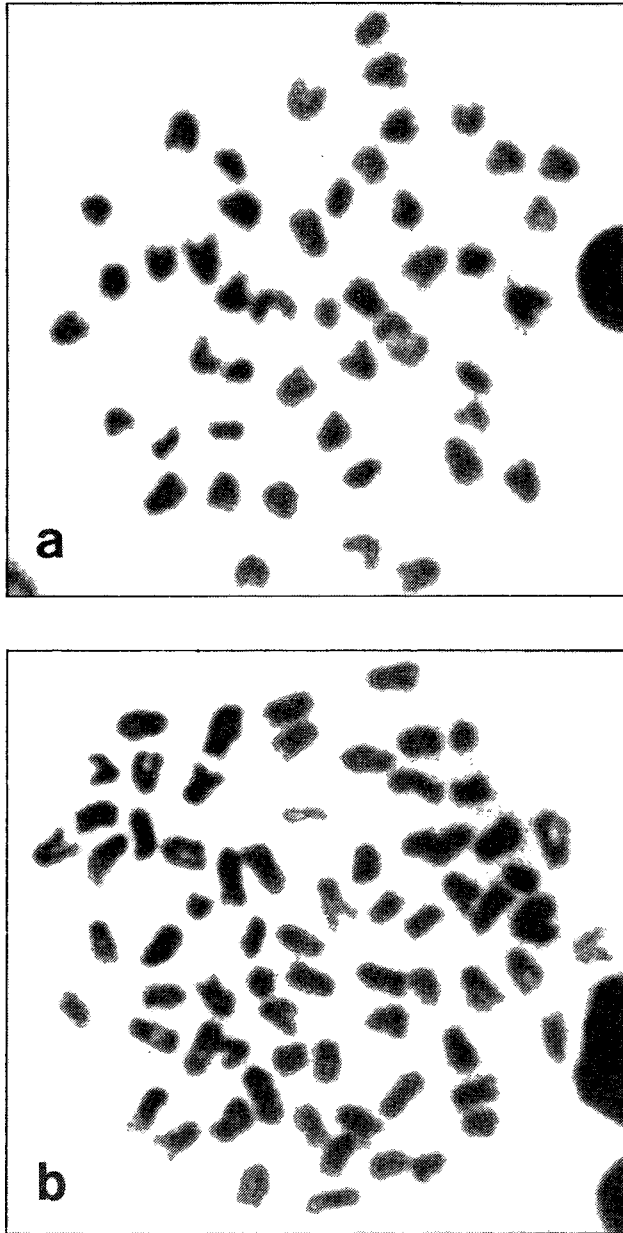


Figure 1. Metaphases of diploid (a) and triploid (b) olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Diploid showed 48 acrocentric chromosomes and triploid consisted with 72 acrocentrics.

어미로부터 얻은 난질이 좋지 않고, 균일하지 못하기 때문에 설명한 바 있다. 그러나 Wolters 등 (1982a)은 차넬메기에서, Solar 등(1984)은 무지개송어에서 처리군의 부화율이 대조군과 큰 차이를 보이지 않음을 보고한 바 있다. 앞으로 친어의 난질을 향상시키기 위한 연구 등, 넙치의 3배체 유도시 생존율을 높이기 위한 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

Table 2는 2배체와 3배체간의 적혈구 세포 및 핵의 크기를 분석한 결과이다. 적혈구 세포 및 핵 크기에 있어 장경 및 단경이 모두 1.2~1.3배 정도 증가됨이 관찰되었다. 여타 3배체 예컨대, 차넬메기(Wolters et al. 1982b)나 미꾸라지(Kim et al. 1994) 등은 본 종과는 달리 장경의 증가가 단경에 비해 뚜렷한 경향이 있음이 보고되어 있다. 더우기 본종은 그의 적혈구 세포 형태가 매우 구형에 가까워 세포 및 핵의 부피가 1.97 및 1.98 배가 증가되는 특이한 현상을 보였다. 그러나 세포의 표면적에 있어서는 3배체가 2배체의 그것에 비해 1.57~1.59 배 정확히 증가됨이 관찰되었다. 따라서 앞으로 본 종의 경우 2배체와 3배체에 대한 세포 및 핵의 크기에 대한 분석은 세포의 표면적을 측정하는 것이 매우 유용할 것으로 사료된다. 그러나 이러한 문제점들은 아마도 기존에 사용하는 공식들 [표면적= $\pi/4$ (장경) $\times$ (단경) (Sezaki and Kobayashi 1978), 부피= $4/3\pi$ (장경/2) $\times$ (단경/2)<sup>2</sup> (Lemoine and Smith 1980)]이 정확히 세포의 크기를 재는데 무리가 따르는 때문으로 사료된다. 따라서 앞으로 본종의 2배체와 3배체에 대한 정확한 DNA 함량 분석이 요구된다.

2배체 및 유도된 3배체의 염색체에 대한 결과는 Table 3 및 Figure 1에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 대조군으로 사용한 2배체 넙치의 염색체 수는  $2n=48$ 로 나타났으며 heteromorphic한 성염색체의 존재는 찾아볼 수 없었다. 따라서 일본산 넙치 (Tabata 1988a) 및 한국산 넙치에 대한 Kim 등 (1993)의 결과와 일치하였다. 또한 3배체의 경우  $3n=72$ 로 나타났으며, 대조군과 3배체 모두 핵형 분석 결과 모두 acrocentric chromosomes으로 구성되어 있었다. 이에 3배체는 모계의  $2n$  및 부계의  $n$ 으로 구성되어 정확히 3배체가 유도되었음을 알 수 있었다. 앞으로 본 연구에서 유도된 3배체의 산업성 평가를 위한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

넙치의 수정란을 수정 3분 후 2°C에서 45분간 저온 처리하여 92.6%의 빈도로 3배체를 유도하였다. 수정란의 부상을 및 수정율은 실험군 사이에 유의차가 없었다( $P>0.05$ ). 그러나 부화율과 기형율은 2배체와 3배체가 유의차가 있게 나타났다( $P<0.05$ ). 3배체를 적혈구 세포크기 측정 및 염색체 분석으로 확인한 결과 세포의 표면적에서 3배체는 2배체에 비해 1.6배 증가되었고, 2배체의 염색체수는 48개의 acrocentric인 반면 3배체는 72개의 acrocentric 염색체로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Kim, D. S., E.-H. Park and J. S. Kim, 1982. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes (Teleostomi : Siluriformes). Kor. J. Genet., 4 : 57-68.
- Kim, D. S., 1993. A simple and safe technique for masculinization of gynogenetic diploid female in *Paralichthys olivaceus*. J. Mar. Sys., (in printing).
- Kim, D. S., J. H. Kim, J.-Y. JO, Y. B. Moon and K. C. Cho, 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. Kor. J. Genet., 15 : 179-186.

- Kim, D. S., J.-Y. JO., T.-Y. Lee, 1994. Induction of triploidy 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 preparation from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34 : 266-269.
- Lemoine, H. L. Jr. and L. T. Smith, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109 : 626-631.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi, 1978. Comparasion of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44 : 851-854.
- Solar, I. I., E. M. Donaldson and G. A. Hunter, 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture*, 42 : 57-67.
- Tabata, K. and S. Gorie, 1988a. Comparasion of growth of gynogenetic diploid 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 diploid in *Paralichthys olivaceus* by suppression of 1st cleavage with special reference to their survival and growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 1867-1872.
- 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.
- Tave, D., 1993. *Genetics for Fish Hatchery Managers*, 2nd edn. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 408pp.
- Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, 57 : 57-64.
- Wolters, W. R., Libey, G. S. and C. L. Chrisman, 1982a. Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111 : 102-105.
- Wolters, W. R., Libey, G. S. and C. L. Chrisman, 1982b. Erythrocyte nuclear measurement of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.*, 20 : 253-258.
- 농림수산부, 1993. *농림수산통계연보*. 동양문화, 서울, 492 pp.