

넙치 전 암컷 집단 생산을 위한 연구 IV. 성분화 기간 중 수온에 의한 성 결정*

김경길·방인철**·김 윤

국립수산진흥원 유전육종과

**국립수산진흥원 남해수산연구소 증식과

Studies on the Production of All-Female Populations of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* IV. Sex Determination by Water Temperature During Sex Differentiation Period*

Kyung-Kil Kim, In Chul Bang** and Yoon Kim

Genetics and Breeding Division, National Fisheries Research and Development
Agency (NFRDA), Pusan 626-900, Korea

**Aquaculture Division, South Sea Fisheries Research Institute,
NFRDA, Yosu 550-120, Korea

We investigated the effects of rearing water temperatures during sex differentiation period on sex ratios in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Control and gynogenetic diploid juvenile flounder reared at water temperature of 18, 21, 24 and 27°C for 65 days from 35 to 100 days after hatching.

Fish were sampled to examine sex ratios at 195 or 260 days after hatching. Female ratios of control and gynogenetic diploid flounder declined rapidly as water temperature increased. Sex ratio of gynogenetic diploid reared at 27°C was very close to 1:1 ratio ($P < 0.01$). The survival rates of control and gynogenetic diploid reared at 27°C were different from other water temperature groups. The growth of body weight of control and gynogenetic diploid reared at 18°C were different from other water temperature groups.

Key words : Sex determination, Temperature, Sex differentiation, *Paralichthys olivaceus*

서 론

대부분의 어류는 heteromorphic sex chromosome이 존재하지 않기 때문에 염색체에 의한 암수의 구별이 불가능하다(Kirpichnikov, 1981). 따라서 유전적 성 결정(genetic sex determining : GSD) 기구를 구명하기 위하여 종간

교배(Pruginin et al., 1975), 종내 교배(Yamamoto, 1969), 역교배(Chen, 1969), 호르몬에 의한 성전환(Clemans and Inslee, 1968) 및 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체의 유도(Streisinger et al., 1981) 등이 시도된 바 있다. 그러나 암수동체성 어류인 *Rivulus marmoratus*, 북미산 Atlantic silverside, *Menidia menidia*

* 본 논문은 국립수산진흥원 수산 시험 연구 사업비에 의해 수행되었음.

및 poecillid 등의 어류에 있어서는 GSD 외에 환경 요인에 의한 성 결정(environmental sex determination; ESD) 즉, 수온(temperature dependent sex determination; TSD) 또는 pH 등이 성비에 영향을 주는 것으로 알려져 왔다(Harrington, 1971; Conover, 1984; Rubin, 1985). 그 중 *Menidia menidia*에 대해서는 자연산 조사와 실험실 사육의 결과, 저수온으로 자어를 사육할 경우 암컷 출현율이 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Conover and Kynard, 1981; Conover and Fleisher, 1986).

한편 넙치에 있어서 田畑(1991)는 친어에 따라 종묘의 성비가 크게 차이나며 또한 동일 친어 집단에 있어서도 산란시기와 성 분화 시기의 사육 수온에 따라 종묘의 성비가 다르게 나타남을 보고하였다. 또한 김 등(1993)은 자성발생성 2배체의 성비가 100% 암컷이 유도되지 않고 일부가 수컷으로 발현함을 보고하였고, 방 등(1995)은 후기 산란군에서 생산된 수정란을 이용한 성전환 실험에서 대조군의 수컷 유도율이 96.2 및 78.8%로 높게 나타남을 보고하였다. 따라서 넙치의 성 결정 기구는 female homogamety (XX-XY)의 기본적 구조를 가지면서 ESD 등에 의해 영향을 받는 polygenic system일 것으로 추정하고 있다(田畑, 1991; 방 등, 1995).

본 연구에서는 ESD 요소 중 가장 중요한 수온이 넙치의 성 결정에 어떤 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 일반 넙치를 대상으로 사육 수온에 따른 성비 차이를 조사하였고, 유도된 자성발생성 2배체를 이용하여 얻어진 결과를 확인하였다. 또한 본 종의 종묘생산시 요구되는 암컷 비율이 높으면서 생존율 및 성장이 좋은 수온 조건을 알아보기 위해 생존율 및 성장도 아울러 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

성숙한 친어로부터 자연 산란에 의해 수거된

수정란을 실험실로 수송하여 부화된 일반 넙치 자어와, 김 등(1993)의 방법에 따라 유도된 자성발생성 2배체 수정란을 부화시킨 자어를 실험에 이용하였다.

2. 수온 조절

넙치의 성 분화가 시작되는 전장 1.2 cm부터 성 분화가 완료되는 전장 12 cm (부화 후 35일~100일)까지(田中, 1987; 이, 1990) 사육 수온을 18, 21, 24 및 27±0.5℃로 조절하였다. 부화 후 30일까지의 수온은 18~19℃로 유지하였으며, 5일 동안 서서히 수온을 조절하여 부화 후 35일에 실험을 개시하였다. 실험이 종료된 이후 생식소의 조직학적 분석을 위해 모든 실험군을 수온 18~20℃로 계속 사육하였다. 사육 수조는 1톤 용량의 FRP 사각 수조를 이용하였으며, 실험은 일반 넙치 및 자성발생성 2배체를 대상으로 모두 2회 반복하여 실험하였다.

3. 성비 분석

사육 수온에 따른 성비를 분석하기 위하여 부화 후 195일과 260일에 각각의 실험어 생식소를 적출하여 paraffin 절편법에 따라 5 μm 두께로 절단한 후 Harris's hematoxylin과 eosin-phloxine B로 비교 염색을 하였다. 암수의 판정은 광학 현미경 하에서 생식 세포를 관찰하여 구분하였다.

4. 생존율 및 성장 조사

사육 수온에 따른 시험어의 생존율 및 성장을 조사하기 위하여 부화 후 60, 80 및 100일에 실험군별로 생존율을 조사하고, 각각 30마리씩 표본하여 전장과 체중을 측정하였다.

5. 통계 분석

실험 결과의 통계 처리를 위하여 성비 조사 결과는 χ^2 -test를 이용하였고, 생존율 및 성장 조사 결과는 분산 분석(ANOVA)을 이용하였다.

결 과

다(P>0.1).

1. 사육 수온에 따른 성비

일반 넙치의 사육 수온에 따른 성비 분석 결과는 Table 1과 같다. 18℃ 실험군에서는 63.4%의 암컷이 유도되었으나 27℃ 실험군은 평균 33.5%의 암컷을 보여 사육 수온이 높아짐에 따라 암컷의 비율이 낮아지는 역의 상관관계를 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(P>0.05).

한편 자성발생성 2배체 실험군은 18℃로 사육하였을 때 Table 2에서 보는 바와 같이 94.4%의 암컷을 나타내었으나 사육 수온이 높아짐에 따라 그 비율이 점차 낮아져 27℃ 사육 수온에서는 암컷비 57.6%로 암수비 1 : 1을 나타내었다(P<0.01). 그러나 사육 수온 18, 21, 24℃에서는 자성발생성 2배체 넙치의 성비에 큰 영향이 없었

2. 사육 수온에 따른 생존율

일반 넙치의 사육 수온에 따른 생존율은 Table 3과 같다. 부화 후 100일의 생존율을 보면 18℃에서 69.9%로 가장 높았으나 21℃의 65.5% 및 24℃의 67.3%와 비슷하였다(P>0.05). 그러나 27℃에서는 49.9%의 생존율을 보여 다른 실험군과 유의한 차이를 나타내었다(P<0.05).

자성발생성 2배체군의 생존율은 18℃에서 72.3%로 가장 높았으나 21℃의 70.9% 및 24℃의 71.8%와 비슷하였다(Table 4, P>0.05). 그러나 27℃에서는 58.4%의 생존율을 보여 다른 실험군과 유의한 차이를 나타내었다(P<0.05). 이상의 결과로 볼 때 사육 수온 18℃에서 24℃까지는 일반 넙치와 자성발생성 2배체 실험군의 생존율

Table 1. The effects of rearing water temperatures on sex ratios of control olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation period

Water temperature	18℃		21℃		24℃		27℃	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
No. of fish examined	30	30	30	30	30	30	30	30
No. of female	20	18	17	17	13	12	10	11
No. of male	10	12	13	13	17	18	20	19
Female (%)	66.7	60	56.7	56.7	43.3	40	33.3	36.7
Mean female (%)	63.4		56.7		41.7		33.5	
χ^2 against 1 : 1	2.65		2.13		0.87		2.74	
Probability	>0.05		>0.05		>0.05		>0.05	

Table 2. The effects of rearing water temperatures on sex ratios of gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation period

Water temperature	18℃		21℃		24℃		27℃	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
No. of fish examined	24	28	27	24	28	27	29	30
No. of female	23	26	23	21	22	21	16	18
No. of male	1	2	4	3	6	6	13	12
Female (%)	95.8	92.9	85.2	87.5	78.6	77.8	55.2	60
Mean female (%)	94.4		86.4		78.2		57.6	
χ^2 against 1 : 1	20.37		13.44		8.74		0.98	
Probability	<0.001		<0.001		<0.01		>0.05	
χ^2 100% female	0.185		0.97		1.95		10.63	
Probability	>0.5		>0.3		>0.1		<0.01	

Table 3. The effects of rearing water temperatures on survival rates of control olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation

Days after hatching	Survival rate (%)*			
	18°C	21°C	24°C	27°C
40	100	100	100	100
60	83.7	75.3	73.8	67.3
80	74.3	67.2	68.3	52.6
100	69.9 ^a	65.5 ^a	67.3 ^a	49.9 ^b

* Values in same column having the different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 4. The effects of rearing water temperatures on survival rates of gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation

Days after hatching	Survival rate (%)*			
	18°C	21°C	24°C	27°C
40	100	100	100	100
60	83.1	80.3	77.4	71.3
80	75.8	72.4	74.9	63.7
100	72.3 ^a	70.9 ^a	71.8 ^a	58.4 ^b

* Values in same row having the different superscripts are significantly different (P<0.05).

에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

3. 사육 수온에 따른 성장

일반 넙치의 사육 수온에 따른 체중 성장은 Fig. 1에 나타내었다. 사육 수온 18°C에서 평균 9.6 g으로 다른 사육 수온군과 비교시 성장이 가장 낮았으나(P>0.05), 21°C~27°C에서는 13.23~14.28 g으로 비교적 높은 성장과 함께 각 수온군간 큰 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

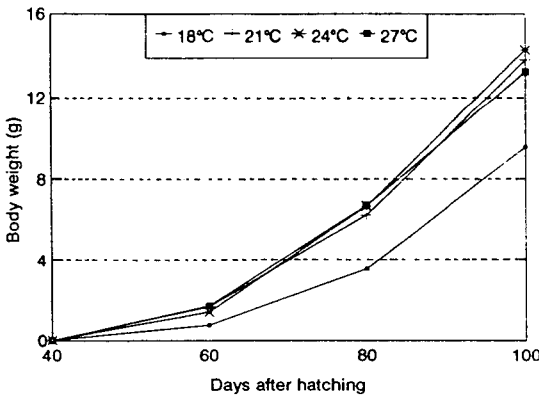


Fig. 1. The effects of rearing water temperatures on mean body weights of control diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation period.

자성발생성 2배체 실험군의 경우 Fig. 2에 나타나듯이 18°C에서 5.65 g으로 가장 느린 성장을 보인 반면, 21°C~27°C에서는 12.71~15.33 g으로 역시 비교적 빠른 성장과 함께 각 수온군간 큰 차이를 보이지 않았다(P>0.05). 이상의 결과로 볼 때 사육 수온 18°C를 제외한 21°C에서 27°C까지는 생존율에서의 결과와 마찬가지로 일반 넙치와 자성발생성 2배체 실험군의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

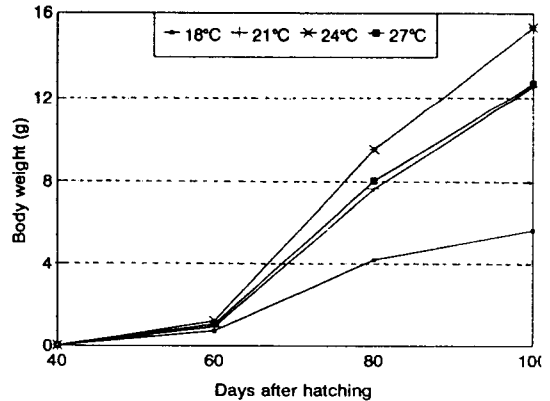


Fig. 2. The effects of rearing water temperatures on mean body weights of gynogenetic diploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus* during sex differentiation period.

고 찰

경골어류의 성 결정의 모델은 여러 가지로 제안되어 왔다. 대부분의 어류에서는 이형 성염색체 (heteromorphic sex chromosome)를 가지지 않으며 생식세포의 초기분화에 있어 heterogametic sex와의 사이에 아무런 연관이 없다는 점 등으로 조류 또는 포유류의 성 결정기구인 chromosomal inheritance (Mittwoch, 1971)가 경골어류에서는 거의 적용이 되지 않고 있다(Hunter and Donaldson, 1983). Genic inheritance and polygenic sex determination은 sex-determining genes 또는 성염색체 내에 epistatic sex gene을 가지거나 가지지 않을 경우 다 인자적 기구(Yamamoto, 1969)에 의해 성이 결정되는 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다. 그러나, 파충류의 경우는 매우 좁은 폭의 온도 범위에서도 성비가 크게 변하며, 극단적으로 높거나 낮은 온도 범위에서는 단지 한가지의 성만 유도된다고 하였다(Bull, 1980, 1983). 따라서 성 결정에 있어 유전적인 효과는 매우 약해서 단지 일정 수온 범위 내에서만 그 효과를 측정할 수 있다(Bull et al., 1982).

이러한 GSD 기구가 분명하지 않은 어류의 경우 여러 ESD 중 수온은 성 결정에 있어 가장 중요한 요소로 알려져 있으며 또한 이에 대한 많은 연구가 보고되고 있다. Beamish (1993)는 southern brook lamprey, *Ichthyomyzon gagei*의 성비가 성장, 사육 밀도, pH 및 연중 수온에 의해 영향을 받는다고 보고하였고, Volodin and Grechanov (1985)는 white bream *Blicca bjoerkna*의 경우 짧은 기간이라도 부화 수온에 차이가 있을 경우 생식소 발달율과 성비에 유의적인 차이를 보인다고 하였다. 특히 Atlantic silverside, *Menidia menidia*를 알부터 전장 30 mm까지 다른 수온에서 사육한 결과 저온 사육시 암컷비가 높고, 역으로 고온으로 사육시 수컷비가 높은 결과가 나타났다(Conover and Fleisher, 1986). 본 연구 결과에서도 사육 수온이 증가함에

따라 암컷의 비율이 일정하게 낮아지는 결과를 얻었으나(Table 1 & 2) *M. menidia* 처럼 성비가 0% 또는 100%에 치우치는 경향은 나타나지 않았다. 본 연구에서 이용한 수온보다 더욱 높거나 낮은 수온을 대상으로 실험한다면 이와 비슷한 결과를 얻을 가능성도 있으므로 이후 수온 12, 15 및 30°C에 대한 연구도 수행하여야 할 것이다. Conover and Fleisher (1986)는 수온이 성 결정에 영향을 미치는 발달 단계(temperature-sensitive period)는 성 분화 기간의 중기부터 말기에 해당된다고 하였다. 본 종의 경우 이에 대한 결과가 없어 직접 비교하기에는 무리가 있으나 산란 시기에 따라 성비가 차이 나는 점으로 미루어 자어기가 temperature-sensitive period일 가능성이 있으므로 본 종에 대한 정확한 TSD를 밝히기 위해서는 이에 대한 연구도 보충되어야 할 것이다.

Oshiro (1987)는 금붕어의 성 결정 기구를 밝히기 위한 연구에서 자성발생성 2배체 친어를 대상으로 자손의 성비를 조사한 결과 100% 수컷이 나타나는 결과를 얻었는데 이는 환경의 영향 특히, 고수온에 의해 암컷이 100% 수컷으로 변환 것으로 추정하였다. 본 연구에서도 자성발생성 2배체를 대상으로 한 실험에서 이와 비슷한 결과를 얻었으나 극단적인 경향은 나타나지 않았다(Table 2). 이러한 결과로 볼 때 넙치의 성 결정은 GSD와 TSD와의 간섭 하에 성이 조절되는 것으로 추측할 수 있는데 파충류처럼 전적으로 TSD에 의해 성이 결정되는 것이 아니고, *M. menidia*의 경우 (Conover and Heins, 1987)와 같이 GSD와 TSD와의 상호 작용에 의해 결정될 것으로 생각된다.

Sullivan and Schultz (1986)는 *Poeciliopsis lucida*에 있어 발생기간 중의 온도가 자손의 성비에 영향을 미친다고 하였다. 본 종의 경우 난 발생기간 동안 수온에 따른 성비를 실험한 결과는 없으나 친어의 산란 시기에 따라 성비가 변하는 결과(田畑, 1991; 방 등, 1995)로 볼 때 본 종에서도 난 발생기간 동안 수온이 성비에 영향을

미칠 가능성이 있으므로 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 최근 chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)의 Y-chromosomal DNA probe가 분리되어(Devlin et al., 1991), PCR에 의한 방법으로 genetic sex 판별에 유용하게 이용되고 있으므로(Devlin et al., 1994) 이에 대한 연구도 수행된다면 본 종의 GSD와 ESD와의 상호 작용을 명확히 파악할 수 있을 것이다.

일반 넙치와 자성발생성 2배체 넙치간 성장에 있어서 부화 후 80일까지는 자성발생성 2배체가 모든 수온 구간에서 약간 빠른 성장을 나타내었지만, 부화 후 100일에는 오히려 일반 넙치가 빠른 성장을 나타내었다. 이러한 결과는 두 실험군간의 유전적 차이로도 생각할 수 있으나 자성발생성 2배체의 사육환경이 80일 이후에 나빠졌을 가능성이 더 큰 것으로 생각된다.

사육 수온에 따른 생존율에 있어서 일반 넙치의 경우 수온 18, 21 및 24°C에서는 차이가 없었으나 27°C에서는 유의하게 낮아졌고, 자성발생성 2배체를 대상으로 한 실험에서도 같은 경향을 나타내었으며, 성장에 있어서도 수온 18 또는 27°C가 오히려 21 또는 24°C보다 낮은 결과를 보였으며, 더욱이 21°C 실험군이 암수비가 1:1로 나타난 결과를 고려할 때 생존율을 높이고 성장이 빠른 종묘를 생산하기 위해서는 수온 21°C 전후로 사육하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

사육 수온이 넙치의 성비에 미치는 영향을 조사하기 위해 일반 넙치 및 자성발생성 2배체 넙치 자어를 대상으로 부화 후 35일(전장 1.2'cm)부터 100일(전장 12 cm)까지 사육 수온 18, 21, 24 및 27°C로 나누어 2회 반복하여 실험하였다.

사육 수온이 높을수록 암컷의 비율은 낮게 나타나 사육 수온과 암컷 비율에 있어 역상관관계를 보였다. 자성발생성 2배체 실험군의 경우 18°C에서 94.4%의 암컷을 보인 반면 27°C에서는 57.6%로

나타나 암수비가 1:1이었다($P < 0.01$). 사육 수온에 따른 생존율은 일반 넙치 및 자성발생성 2배체 넙치 모두 18, 21, 24 및 27°C 순으로 높았으나 27°C를 제외한 나머지 실험군은 유의차가 없었으며 18°C를 제외한 나머지 실험군의 체중 성장은 유의차가 없었다($P > 0.05$).

참 고 문 헌

- Bull, J. J., 1980. Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.*, 55 : 3-21.
- Bull, J. J., R. C. Vogt and M. G. Bulmer, 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution*, 36 : 333-341.
- Bull, J. J., 1983. Evolution of sex determining mechanism. Benjamin/Cummings Pub., Menlo Park, California.
- Beamish, F. W. H., 1993. Environmental sex determination in southern brook lamprey, *Ichthyomyzon gagei*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50 : 1299-1307.
- Chen, F. Y., 1969. Preliminary studies on the sex determining mechanism of *Tilapia mossambica* Peter and *T. hornorum* Trewavas. *Verh. Ver. Theor. Angen. Limnol.*, 17 : 719-724.
- Clemens, H. P. and T. Inslee, 1968. The production of unisexual broods *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 97 : 18-21.
- Conover, D. O., 1984. Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *Amer. Nat.*, 123 : 297-313.
- Conover, D. O. and M. Fleisher, 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43 : 514-520.
- Conover, D. O. and S. Heins, 1987. The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia*. *Copeia*, 1987 : 732-743.
- Conover, D. O. and B. E. Kynard, 1981. Environmental sex determination : Interaction of temperature and genotype in a fish. *Science*, 213 : 577-579.
- Devlin, R. H., B. K. McNeil, T. D. Groves

- and E. M. Donaldson, 1991. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 481 : 606-1612.
- Devlin, R. H., B. K. McNeil, I. I. Solar and E. M. Donaldson, 1994. A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all female strains of chinook salmon. Aquaculture, 128 : 211-220.
- Harrington, R. W., 1971. How ecological and genetic factors interact to determine when self-fertilizing hermaphrodites of *Rivulus marmoratus* change into functional males, with a reappraisal of the modes of intersexuality among fish. Copeia, 1971 : 389-432.
- Hunter, G. A. and E. M. Donaldson, 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In : Fish physiology (Hoar et al., eds.), Vol. IXB, 223-303. Academic Press, New York.
- Kirpichnikov, V. S., 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag Pub. New York. 410 pp.
- Mittwoch, U., 1971. Sex determination in birds and mammals. Nature (London), 280 : 142-144.
- Oshiro, T., 1987. Sex ratios of diploid gynogenetic progeny derived from five different females of goldfish. Nippon Suisan Gakkaishi, 53 : 1899.
- Pruginin, Y., S. Rothbard, G. Wohlfarth, R. Halevy, R. Moav and G. Hulata, 1975. All male broods of *Tilapia nilotica* X *T. aurea* hybrids. Aquaculture, 6 : 11-21.
- Rubin, D. A., 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia, 1985 : 233-235.
- Streisinger, G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber and F. Singer, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature (London), 291 : 293-296.
- Sullivan, J. A. and R. J. Schultz, 1986. Genetic and environmental basis of variable sex ratios in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. Evolution, 40 : 152-158.
- Volodin, V. M. and I. G. Grechanov, 1985. Effect of temperature of gonadal development and sex ratio in the progeny of a pair of white bream *Blicca bjoerkna*. J. Ichthyol., 25 : 52-59.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In : Fish Physiology (Hoar, W. S. and D. J. Randall, eds.), Vol. 3, pp. 117-175. Academic Press, New York.
- 김 윤 · 김경길 · 방인철 · 이종관, 1993. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연구. I. 자성발생성 이배체 유도 및 성장. 한국양식학회지, 6 : 285-293.
- 방인철 · 김 윤 · 김경길 · 이종관, 1995. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연구. II. 호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환. 수진연구보고, 49 : 49-57.
- 이영돈, 1990. 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)의 성분화와 생식소 발달. 박사학위 청구논문, 부산수산대학교, 부산. 41 pp.
- 田畑和男, 1991. ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28 : 1-134.
- 田中秀樹, 1987. ヒラメの生殖線の性分化過程. 養殖研報, 11 : 7-19.