

최 종
연구보고서

전암컷 넙치 집단의 산업화

Studies on production of all-female population
in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

연구기관

국립수산진흥원



농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전암컷 넙치 집단 산업화”에 관한 연구 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12

주 관 연구 기 관 : 국립수산진흥원

총괄연구책임자 : 김 경 길

연 구 원 : 김 윤 방인철

박중연 김종현

조기채 이정호

김우진 고창순

문영봉 이종관

손송정 방극순

박두원 이상민

홍정표 박상언

황성일 탁건태

여 백

요 약 문

1. 제 목

전암컷 넙치 집단의 산업화

2. 연구개발의 목적 및 중요성

넙치는 성장이 빠르고 질병에도 비교적 강하여 해마다 양식에 의한 생산량이 증가하고 있다. 1996년도 양식 생산고는 8,861톤으로 전체 해산어류 양식 생산량의 77.7% 를 차지할 정도로 우리나라 해산어 양식에서는 대단히 중요한 어종이다. 그러나 인건비 및 사료비의 상승으로 생산성이 점차 낮아지고 있으므로, 넙치 양식의 생산성을 높이기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.

넙치는 암컷의 성장이 수컷에 비해 월등히 빨라, 실제 양식산업에 있어서 2~3년 양식시 암컷은 수컷에 비하여 1.5배~2배 정도 성장이 빠르므로 전암컷 넙치만을 사육하는 것이 매우 유리하다. 따라서 넙치의 암컷만을 생산하기 위하여 여러가지 방법이 시도되고 있다. 그 중 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체 유도에 의한 방법은 항상 100% 암컷을 유도할 수 없고 대량생산이 불가능하며, 성호르몬에 의한 생리학적 성전환 방법은 자치어에 매년 호르몬을 처리해야 하는 번거로움과 약품의 인체에 대한 유해성등의 단점을 지니고 있다. 그러므로 자성발생성 2배체(gynogenetic diploid)와 성전환된 자성발생성 2배체(sex-reversed gynogenetic diploid : 가짜수컷)를 교배시켜 전암컷 집단을 생산하는 것이 가장 효과적인 방법이다.

따라서 본연구에서는 성장이 빠른 전암컷 넙치를 산업적으로 정착시키기 위

하여 전암컷 넙치를 생산할 수 있는 자성발생성 2배체 및 가짜수컷을 생산한 후 이들 기술과 종묘를 국립수산진흥원 수산종묘배양장 및 넙치 양식인에게 보급하고자 하였다.

3. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구는 넙치의 양식 생산성 향상을 위하여 성장이 빠른 전암컷 넙치의 산업화를 위한 연구로 그 주요 연구 내용을 보면 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란 및 수정란에 대한 난질을 평가하였다. 다음으로는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷에서 생산된 전암컷 넙치를 대상으로 성장, 생존율, 유전학적 특성, 생식소 발달을 보통 넙치와 비교하였다. 또한 생산된 전암컷 넙치가 성숙 산란하여 전암컷 넙치(F_2)를 생산할 수 있는지에 관한 연구도 실시하였다. 최종적으로는 이들 연구를 토대로 전암컷 넙치를 생산할 수 있는 자성발생성 2배체의 유도 및 이를 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷의 생산에 대한 연구를 실시하였다.

4. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

가. 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷(가짜수컷)에 의한 자연산란

1) 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의한 자연산란

자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란 및 생산된 수정란의 난질 조사를 위하여 산란기간 동안의 총산란량, 부상율 및 수정율

을 조사하였다. 1996년 5월 1일부터 6월 4일까지 자연산란된 전암컷 수정란은 총 15,563,000개로 일일 산란량은 산란초기 및 말기보다 중기에 가장 많았다.

수정율은 산란기 초기 및 말기보다 중기가 양호하였으며 평균수정율은 79.9% 였다. 특히 5월 23일에서 29일(7일간) 까지는 평균 수정율이 98.6%로 대단히 양호하였다. 이상의 결과에서 전암컷 넙치 생산용 어미로 사용한 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷은 보통 넙치 처럼 실내 수조내에서 정상적으로 자연산란이 가능할 뿐만 아니라 양질의 수정란을 생산할 수 있는 것으로 판단되었다.

2) 성비

자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷으로부터 생산된 넙치를 대상으로 부화후 10개월체의 성비를 조사한 결과, 암컷의 평균 비율이 93.3% 였고 대조군인 보통 넙치는 56.7% 였다. 따라서 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷으로 부터 생산된 넙치는 암컷 비율이 대단히 높아 이하 “전암컷 넙치” 라고 하였다.

3) 전암컷 넙치 수정란 분양

울진수산종묘배양장에서 생산된 전암컷 넙치 수정란 중 수정율이 양호한 난을 수산진흥원 2개기관에 1,413,000개 및 민간인 양식장 3개소에 2,010,000개를 무상으로 시험 분양하였다.

나. 전암컷 넙치의 산업성 평가

1) 성장, 사료효율 및 생존율

전암컷 넙치 집단의 산업성을 평가하기 위하여 1995년 10월부터 1997년 7월까지 성장, 사료효율 및 생존율을 조사하였다. 실험시작시 평균전장 및 평균체중은 전암컷 넙치가 27.42 ± 0.62 cm 및 244.75 ± 2.04 g, 보통 넙치가 27.92 ± 0.58 cm 및 244.32 ± 2.34 g 이었으나 실험 종료시의 평균전장 및 평균체중은 전암컷 넙치가 50.29 ± 4.90 cm 및 1613.98 ± 22.57 g, 보통 넙치가 47.72 ± 3.04 cm 및 1286.21 ± 59.14 g

으로 전암컷 녀치의 성장이 보통 녀치에 비하여 평균전장에서는 2.87 cm, 평균체중에서는 327 g 빨랐다($P < 0.05$). 사육기간에 따른 성장의 변화를 보면 400 g(전장 30 cm) 까지는 두집단간에 뚜렷한 차이는 보이지 않았다($P > 0.05$). 그러나 체중 400 g 전후부터 전암컷 녀치는 보통 녀치에 비하여 성장의 속도가 빨라지기 시작하여 체중 800~1,000 g 부터는 뚜렷한 성장차이를 나타내었다.

사료효율을 보면 전암컷 녀치와 보통 녀치 모두 성장함에 따라 사료효율이 낮아지는 경향을 보였으며 사육수온 즉 계절에 따라서도 변화를 보였다. 녀치의 성장에 비교적 적합한 9월, 10월 및 11월에는 사료효율이 70~110% 로 대단히 양호하나 수온이 낮은 12월과 1월 및 2월에는 50~20% 로 낮았다. 일간중중을 및 일간먹이섭취율은 사료효율의 pattern과 유사하였으며 전암컷 녀치가 보통 녀치에 비하여 약간 높았다. 생존율은 두 집단간에 유사하였다.

2) 성비

본 실험에 사용된 녀치의 성비를 2회 조사한 결과 암컷의 평균 비율이 전암컷 녀치는 97.4%, 보통 녀치는 59.9% 였다.

다. 전암컷 녀치의 생식소 발달 조사

200 g 전후의 전암컷 녀치 중 암컷 생식소는 보통 녀치의 암컷 생식소보다 크기가 작고 무게도 보통 녀치의 75% 였으며 생식소의 모양 및 정상적인 난모세포의 수에 있어서도 보통 녀치에 비하여 비정상적이었다. 그러나 평균 체중 400 g 이상의 전암컷 녀치에서는 일부의 개체를 제외하고 생식소의 크기 및 난의 발달이 보통 녀치와 유사하였다.

1996년도 산란기에 두집단의 성숙상태를 조사한 결과, 보통 녀치는 대부분 완숙란으로 산란이 이루어 졌으나, 전암컷 녀치는 보통 녀치보다 성장이 빨랐음에도 불구하고 완숙란을 가진 개체가 일부분인 것으로 보아 최초로 산란이 시작되는 크기는 두집단간에 차이가 있는 것으로 판단되었다. 그러나 이듬해인 1997년도의 산란기에는 전암컷 녀치 집단도 보통 녀치처럼 정상적인 자연산란

이 이루어져 번식력에는 문제가 없는 것으로 나타났다.

라. 전암컷 넙치의 유전학적 특성 조사

1) Isozyme 분석

실험에 사용된 전암컷 넙치 및 보통 넙치에서 조사한 22종의 효소중 12개의 효소가 두집단에서 공통적으로 검출되었다. 두집단간에 뚜렷한 차이를 나타내는 유전자좌는 없었으며 IDH, CK, LDH 및 6PGD의 4종류 효소에서 변이가 관찰되었다. 그 중 두집단간을 구별하는 유전적 marker로서는 간의 IDH 효소가 가장 적절하였으며 이효소의 유전자 빈도를 이용하여 t-검정을 실시한 결과 95%의 유의 수준에서 유의차가 인정되었다. 또한 두집단에 있어서 평균이형 접합체의 기대치에 차이가 없어 유전적으로는 집단구조가 같은 것으로 판단되었다.

2) 미토콘드리아 DNA 분석

전암컷 넙치의 유전적 특징을 조사하기 위하여 미토콘드리아 DNA를 분리하고 6염기 인식의 제한효소 10종으로 절단한 절단 단편을 비교한 결과, 전암컷 넙치의 미토콘드리아 DNA 총 염기대수는 17.20 kbp로 일반적인 생물종의 미토콘드리아 DNA 크기와 거의 일치했다. 또한 조사한 10종의 제한효소 중 4종의 제한효소(*Apa* I, *Hind* III, *Pvu* II, *Sal* I)에서 변이 pattern이 관찰되었으나 보통 넙치와의 유전적 차이는 관찰되지 않았다.

3) 성장호르몬과 열충격 유전자

역전사 유전자 증폭반응(RT-PCR)을 이용하여 전암컷 넙치의 성장호르몬 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석한 결과, 전암컷 넙치의 성장호르몬 유전자의 염기서열은 보통 넙치와 동일하였다.

정상적인 온도 (20℃)에서 자라고 있는 전암컷 넙치 간세포를 높은 온도 (23, 25, 27, 30, 32, or 35℃) 에 노출하였을 때 HSP90, HSP70, HSP40 및 HSP30의 합성이 유도되었으며 이들 중 HSP70의 합성이 가장 높았다.

마. 전암컷 녀치의 자연산란

자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 생산된 전암컷 녀치가 성장하여 1997년도에는 자연산란을 하였다. 전암컷 녀치의 산란 기간은 3월 7일부터 6월 20일까지 106일간이었고, 대조군인 보통 녀치는 3월 7일부터 6월 21일까지 107일간 이었다. 총산란량은 전암컷 녀치가 40,536,000개, 보통 녀치가 38,031,600개로 전암컷 녀치가 더 많았으나 암컷 1마리당 산란수는 전암컷 녀치가 1,307,613개, 보통 녀치가 3,169,300개로 보통 녀치가 더 많았다. 산란기간 동안의 평균 부상율은 전암컷 녀치가 58.8%, 보통 녀치가 79.4% 였으며, 평균수정율은 전암컷 녀치가 86.6%, 보통 녀치가 92.3%로 부상율과 수정율 모두 보통 녀치가 양호하였다. 자연산란된 전암컷 녀치 F₂의 성비 조사 결과 암컷 비율은 92.9% 였다.

바. 자성발생성 2배체 유도 및 분석

1) 자성발생성 2배체의 유도

녀치의 난과 자외선으로 불활성화시킨 감성돔 정자를 수정시킨후 저온 자극으로 제2극체 방출을 억제하여 자성발생성 2배체를 유도하였다. 자성발생성 2배체 유도를 위한 효율적인 조건을 보면, 정자의 유전적인 불활성화를 위한 적정 자외선 조사량은 4,800 ergs/mm² 였다. 제2극체 방출 저지에 의한 배수화는 수정 3분후 1±0.5℃에서 45분간 저온처리가 가장 양호하였다.

2) 자성발생성 2배체 녀치의 수정율과 부화율

본 실험에서 유도된 자성발생성 2배체 수정란의 평균 수정율은 29.9%, 평균 부화율은 45.4%로 보통 녀치의 34.6% 와 48.5% 에 비하여 낮았다

3) 자성발생성 2배체 녀치의 성장과 생존율

유도된 자성발생성 2배체를 대상으로 성장과 생존율을 알기 위하여 부화후 40, 80 및 100일째 전장, 체중 및 생존율을 조사한 결과, 부화후 100일째까지의 성장은 자성발생성 2배체와 보통 녀치에서 큰 차이를 보이지 않았으며 생존율

도 차이가 없었다.

사. 성전환된 자성발생성 2배체 수컷 생산

1) 자성발생성 2배체를 이용한 가짜수컷 생산

자성발생성 2배체 넙치를 수컷으로 성전환시키기 위하여 부화후 46일째(전장 12.8 ± 0.23 mm)부터 106일째까지 60일간 17α -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)을 에탄올에 녹인 다음 호르몬의 최종 농도가 10 ppb 되도록 1일 8시간과 24시간 침지처리(immersion) 한 결과, 수컷으로의 성전환 유도율은 모두 100% 였다.

2) 전암컷 넙치를 이용한 가짜수컷 생산

전암컷 넙치를 수컷으로 성전환시키기 위하여 부화후 46일(전장 12.6 ± 0.28 mm)부터 106일째까지 60일간 17α -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)을 에탄올에 녹인 다음 사육수에 섞어 호르몬의 최종 농도가 10 ppb 되도록 1일 8시간 및 24시간 침지 처리(immersion)한 결과, 수컷으로의 성전환 유도율은 모두 100% 였다.

3) 분양

전암컷 넙치의 산업화를 위하여 생산된 전암컷 넙치의 암컷과 이들을 성전환시킨 전암컷 넙치 치어(전장 15~20 cm)를 수산진흥원 산하 수산종묘배양장 3개소 및 민간인 3개소에 각각 150 마리씩 시험분양하였다. 분양한 가짜수컷의 생식소 발달 상태 및 생식능력 여부를 알기 위하여 산란시기인 1997년 5월에 복부 압박법에 의하여 난과 정자를 조사한 결과, 난과 정자가 정상적인 수정란을 생산할 수 있는 것으로 확인되었다.

2. 활용계획에 대한 건의

전암컷 넙치는 보통 넙치에 비하여 성장이 양호할 뿐 아니라 실내에서 자연산란에 의한 양질의 수정란을 대량으로 생산할 수 있으므로 이들 전암컷 넙치를 어민들이 직접 양식할 경우 어민소득에 도움이 될 것으로 기대된다.

여 백

Summary

I. Title

Studies on production of all-female population in olive flounder,
Paralichthys olivaceus

II. Object and significance

1. Final objective

The final objective of this study is to produce all-female olive flounder for commercial utility.

2. Significance

Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* is one of a commercially important fish in Korea and the most favourite raw fish in market. This species has several desirable characteristics for aquaculture including high growth and high tolerance in water temperature. Many fish culturists have tried to culture this species in netcage and indoor tanks. To develop the techniques for the seedling production and rearing of olive flounder, many experiments were carried out at laboratory and in fields. Aquaculture techniques of olive flounder of this species has been rapidly developed since 1990's. Therefore aquaculture production of this species in 1996 approximated to about 8,861 M/T, which is first in mariculture fish production. However, the aquaculture of olive flounder not only causes many problem including introduction of diseases and deterioration of water quality, but it also increases production

cost in terms of labor and oil. For further high productivity of olive flounder farming, it is essential to develop techniques of all-female population which can support reasonable growth.

III. Contents of this study

For producing all-female olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by sex reversal and chromosomal manipulation techniques this study was conducted and the contents are as follows ;

- Natural spawning by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male
- Growth and survival rate of all-female olive flounder for commercial utility
- Gonad development of all-female olive flounder
- Genetic characterization of all-female olive flounder
- Natural spawning of all-female olive flounder
- Induction of gynogenetic diploid
- Induction of pseudomale by gynogenetic diploid and all-female olive flounder using steroid hormone treatment

IV. Results

1. Natural spawning by mating gynogenetic diploid female and sex-reversed gynogenetic diploid male

A study was carried out to investigate the performance traits of natural spawning in indoor tanks by mating gynogenetic diploid female with

sex-reversed gynogenetic diploid male (pseudomale : phenotypical male) in olive flounder.

All-female population was produced by natural spawning from mating 5-years-old gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male. We investigated the total number of spawned eggs, floating rate and fertilization rate of naturally spawned eggs. For the test of egg quality, we also investigated hatching rates and early survival rates by comparing that of normal olive flounder.

The natural spawning period was 32 days from May 1 to June 4. The total spawning amount was 15,563,000 eggs. The natural spawning occurred at 11-15°C water temperature. The percentage of average floating rate and fertilization rate of the spawned eggs were 80% and 79.9% respectively. Hatching rate and early survival rate of all-female population were lower than that of the normal olive flounder. Sex ratio of all-female was 93.3% female while that of the normal was 59.9% female at 300 days after hatching. The results indicates that gynogenetic diploid female and sex-reversed gynogenetic diploid male were proved to spawn good eggs naturally in indoor tank.

2. Growth and survival rate of all-female olive flounder for commercial utility

All-female olive flounder was produced by natural spawning from mating 5-years-old gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male. We investigated growth, feed efficiency, daily growth rate, daily feed intake and sex ratio of all-female population by comparing that of the normal for commercial utility.

The growth of all-female was significantly faster than that of normal olive flounder ($P < 0.05$). It was assumed that the difference of growth observed in this experiment was caused by the difference of sex ratio. Female ratio of all-female was 97.4% but that of normal was 59.9%. Feed efficiency, daily growth rate and daily feed intake of all-female population were not significant difference from that of the normal olive flounder ($P > 0.05$).

3. Gonad development of all-female olive flounder

We investigated gonad weight and development of gonad in all-female population by comparing that of the normal for detection of reproductivity. Ovary weight of all-female population (body weight : 70-400 g) was smaller than that of normal. However, ovary weight of all-female population (body weight : 400-800 g) was similar that of normal. Testis weight of all-female population (body weight : 70-800 g) was similar that of normal. During spawning season, ovary weight and development of eggs in all-female population was same that of normal olive flounder.

4. Genetic characterization of all-female olive flounder

1) Isozyme analysis

A genetic characterization and identification of the all-female and normal olive flounder were performed by examining electrophoretic pattern of isozymes. Twelves enzymes were detected in two population. Of the twelves loci, completely divergent loci was not observed in two population. The expected average heterozygosity was 0.021 in all-female and 0.019 in normal olive flounder. As the results of this study, isocitrate dehydrogenase (IDH)

may be used as useful genetic marker in two population.

2) Mitochondrial DNA analysis

In order to estimate the level of genetic variation and population structure of all-female olive flounder, mitochondrial DNA was isolated from 9 individuals, and the genetic differences between all-female and normal olive flounder were compared by the restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) cleaved by ten restriction endonucleases of six base recognition sequences. The total length of the mitochondrial DNA calculated about 17.20 kbp. Six of the enzymes examined produced a single restriction profile and four of the enzymes examined produced from 2 to 4 variant band patterns for all individuals surveyed. From these results, we concluded that the genetic characterization of all-female olive flounder was not different that of normal olive flounder

3) Growth hormone and heat shock protein

Growth hormone cDNA from all-female olive flounder was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced. Sequence analysis and alignment of GH cDNA showed the same as that of the normal olive flounder. When hepatocytes grown at normal temperatures (20°C) were exposed to the higher temperatures (23, 25, 27, 30, 32, or 35°C), HSP90, HSP70, HSP40, and HSP30 syntheses were induced. HSP70 was highly synthesized in the all-female olive flounder cells exposed to heat shock.

5. Natural spawning of all-female olive flounder

A study was carried out to investigate the performance traits natural spawning of all-female population in indoor tanks. We investigated the total

number of spawned eggs, floating rate, fertilization rate, hatching rate and early survival rate by comparing that of the normal olive flounder.

The natural spawning periods of all-female population was 106 days from March 7 to June 29. The total spawning amount was 40,536,000 eggs. The spawning of the fish occurred at 11-16°C water temperature. The percentage of average floating rate and fertilization rate of spawned eggs were 58.8% and 86.6% respectively. Hatching rate and early survival rate of all-female population were lower than that of the normal. Sex ratio of all-female (F₂) was 92.9% female while that of the normal was 53.3% female. The results indicated that all-female population produced by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male was proved to spawn good eggs naturally in indoor tank and to produce all-female offspring (F₂).

6. Induction of gynogenetic diploid

Gynogenetic diploid olive flounder were induced by cold shock to fertilized eggs with black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* sperm that had been genetically inactivated with 4,800 ergs/mm² ultraviolet (UV) rays. Cold shock to the eggs at 1±0.5°C for 45 minutes after 3 minutes fertilization proved to be optimum condition to retain the second polar body. At this treatment, hatching rate of normal fry was obtained more than 43.2%. No different growth rate was observed up to 100 days after hatching. A proportion of female in gynogenetic diploid was significantly higher than in the control (P < 0.01).

7. Induction of pseudomale by steroid hormone treatment

For the effects of 17α-methyltestosterone (MT) treatment on sex reversal,

growth and sex ratio were investigated. MT were treated to juvenile flounder of gynogenetic diploid and all-female population for 60 days from 30 days after hatching. Fish were treated with 10 ppb of MT by immersion treatment for 8 hours and 24 hours per day. At 180 days after hatching, fish were sampled to examine sex ratio, survival and growth. Sex ratios of sex-reversed gynogenetic diploid and sex-reversed all-female by immersion treatment with 10 ppb of MT were 100% male. The survival and growth of each experimental groups during hormone treatment period were lower that of control ($P < 0.01$).

여 백

Contents

List of Tables	23
List of Figures	25
Chaper I . Introduction	31
Chaper II. Natural spawning by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male	35
Section 1. Introduction	35
Section 2. Materials and methods	36
1. Rearing of mother fish and collection of spawned eggs	36
2. Total number of spawned eggs, floating rate, fertilization rate, hatching rate and early survival rate	36
3. Sex ratio	36
Section 3. Results	37
1. Total number of spawned eggs, floating rate and fertilization rate	37
2. Hatching rate and early survival rate	43
3. Sex ratio	43
Section 4. Discussion	44
Chaper III. Growth and survival rate of all-female olive flounder	49
Section 1. Introduction	49

Section 2. Materials and methods	50
1. Materials	50
2. Growth and feed efficiency	50
3. Sex ratio	51
Section 3. Results	52
1. Growth	52
2. Feed efficiency	57
3. Daily weight gain and daily feed intake	57
4. Sex ratio	57
Section 4. Discussion	61
Chaper IV. Gonad development of all-female olive flounder	65
Section 1. Introduction	65
Section 2. Materials and methods	65
1. Materials	65
2. Rearing of experimental fish	66
3. Gonad weight and development	66
Section 3. Results and discussion	66
1. Ovary weight and development	69
2. Testis weight and development	73
Chaper V. Genetic characterization of all-female olive flounder	77
Section 1. Introduction	77
1. Isozyme analysis	77
2. Mitochondrial DNA analysis	77

3. Growth hormone and heat shock protein	78
Section 2. Materials and methods	80
1. Isozyme analysis	80
2. Mitochondrial DNA analysis	81
3. Growth hormone and heat shock protein	85
Section 3. Results and discussion	88
1. Isozyme analysis	88
2. Mitochondrial DNA analysis	92
3. Growth hormone and heat shock protein	97
Chaper VI. Natural spawning of all-female olive flounder	103
Section 1. Introduction	103
Section 2. Materials and methods	104
1. Rearing of mother fish and collection of spawned eggs	104
2. Total number of spawned eggs, floating rate, fertilization rate, hatching rate and early survival rate	104
3. Sex ratio	104
Section 3. Results	105
1. Total number of spawned eggs, floating rate and fertilization rate	105
2. Hatching rate and early survival rate	108
3. Sex ratio	111
Section 4. Discussion	111
Chaper VII. Induction of gynogenetic diploid	113

Section 1. Introduction	113
Section 2. Materials and methods	114
1. Rearing of mother fish and experimental fish	114
2. Induction of gynogenetic diploid	114
3. Growth and survival rate	114
4. Sex ratio	115
Section 3. Results	115
1. Fertilization rate and hatching rate	115
2. Growth and survival rate	116
3. Sex ratio	116
Section 4. Discussion	117
Chaper VIII. Induction of pseudomale by steroid hormone treatment	121
Section 1. Introduction	121
Section 2. Materials and methods	122
1. Induction of pseudomale by steroid hormone treatment	122
2. Sex ratio	123
3. Growth and survival	123
Section 3. Results	123
1. Sex ratio	123
2. Reproductivity of sex-reversed all-female	126
3. Growth and survival	126
Section 4. Discussion	128
Chaper IX. References	131

List of Tables

Table 1.	Number of natural spawned eggs, floating rate and fertilization rate by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic male during spawning period	39
Table 2.	Hatching rates and early survival rates of all-female and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	43
Table 3.	Sex ratio of all-female and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	44
Table 4.	Composition (%) of experimental diet used to determine growth pattern of all-female and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	52
Table 5.	Growth pattern and feed efficiency of all-female and normal olive flounder during experiment period	54
Table 6.	Sex ratios of all-female and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	61
Table 7.	Gonad weight (mean \pm SD) of all-female and normal olive flounder	72
Table 8.	List of examined enzymes, tissues and electrophoretic buffer	81
Table 9.	The restriction endonucleases surveyed and their recognition sequence	84
Table 10.	Allele frequencies of all-female and normal olive flounder	89
Table 11.	Genetic variability of all-female and normal olive flounder	90
Table 12.	The comparison of NaCl concentration and tissues states on the mitochondrial DNA isolation of all-female olive flounder	93

Table 13. Estimated size (in kilobase) of cleaved fragments and restriction enzyme fragment patterns of mitochondrial DNA in all-female olive flounder	96
Table 14. Hatching rates and early survival rates of all-female (F ₂) and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	108
Table 15. Sex ratios of all-female (F ₂) and normal olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	111
Table 16. Fertilization rates and hatching rates of gynogenetic diploid and normal olive flounder	115
Table 17. Total lengths and body weights (mean ± SE) of gynogenetic diploid and normal olive flounder	116
Table 18. Sex ratios of gynogenetic diploid and normal olive flounder	117
Table 19. Sex ratios of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic diploid by hormone treatment	124
Table 20. Sex ratios of all-female and sex-reversed all-female by hormone treatment	125
Table 21. Sex ratios of all-female and sex-reversed all-female by immersion and running water treatment	125
Table 22. Total lengths and body weights (mean ± SD) of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic diploid by immersin treatment	127
Table 23. Total lengths and body weights (mean ± SD) of all-female and sex-reversed all-female by immersion treatment	127
Table 24. Total lengths and body weights (mean ± SD) of all-female and sex-reversed all-female by immersion and running water treatment	128

List of Figures

Fig. 1. The quantity of olive flounder by the fisheries catches and aquaculture	32
Fig. 2. Diagram for the production of all-female olive flounder	34
Fig. 3. Variation of water temperature during spawning period	38
Fig. 4. Number of total spawned eggs by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic male	40
Fig. 5. Floating rate of total eggs spawned by gynogenetic diploid female and sex-reversed gynogenetic diploid male	41
Fig. 6. Fertilization rate of total eggs spawned by gynogenetic diploid female and sex-reversed gynogenetic diploid male	42
Fig. 7. Average body weight of all-female and normal olive flounder for the experimental period	53
Fig. 8. Feed efficiency of all-female and normal olive flounder for experimental period	58
Fig. 9. Daily growth rate of all-female and normal olive flounder for the experimental period	59
Fig. 10. Daily feed intake of all-female and normal olive flounder for the experimental period	60
Fig. 11. Variation of gonad weight of normal olive flounder	67
Fig. 12. Variation of gonad weight of all-female olive flounder	68
Fig. 13. Relationship between body weight (70-200 g) and gonad weight of all-female olive flounder	70

Fig. 14. Relationship between body weight (200-800 g) and gonad weight of all-female and normal olive flounder	71
Fig. 15. Male gonad weight of all-female and normal olive flounder	74
Fig. 16. Basical procedure of mitochondrial DNA isolation from all-female olive flounder	83
Fig. 17. Cleavage patterns of mitochondrial DNA digested by restriction endonucleases in all-female olive flounder	95
Fig. 18. RT-PCR of cDNA growth hormone from all-female olive flounder	98
Fig. 19. Cloning of cDNA growth hormone from all-female olive flounder	99
Fig. 20. Nucleotide sequence of all-female olive flounder GH cDNA predicted amino acid sequence	100
Fig. 21. Induction of heat shock protein by heat shock of all-female olive flounder	101
Fig. 22. Variation of water temperature during spawning period in 1997	106
Fig. 23. Number of total spawned eggs of all-female olive flounder	107
Fig. 24. Floating rate of total spawned eggs of all-female olive flounder	109
Fig. 25. Fertilization rate of spawned eggs of all-female olive flounder	110

목 차

제 1 장 서 론	31
제 2 장 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의한 자연산란	35
제 1 절 서론	35
제 2 절 재료 및 방법	36
1. 친어의 사육 및 수정란 수집	36
2. 산란량, 부상을, 수정율, 부화율 및 초기생존율 조사	36
3. 성비	36
제 3 절 결 과	37
1. 자연산란량, 부상을 및 수정율	37
2. 부화율 및 초기생존율	43
3. 성비	43
제 4 절 고 찰	44
제 3 장 전암컷 낱치의 산업성 평가	49
제 1 절 서론	49
제 2 절 재료 및 방법	50
1. 재료	50
2. 성장 및 사료효율	50
3. 성비	51

제 3 절 결 과	52
1. 성장	52
2. 사료효율	57
3. 일간증중율 및 일간먹이섭취율	57
4. 성비	57
제 4 절 고 찰	61
제 4 장 전암컷 넙치의 생식소 발달	65
제 1 절 서론	65
제 2 절 재료 및 방법	65
1. 재료	65
2. 사육방법	66
3. 생식소 발달 상태 조사	66
제 3 절 결과 및 고찰	66
1. 암컷의 생식소 발달	69
2. 수컷의 생식소 발달	73
제 5 장 전암컷 넙치의 유전학적 분석	77
제 1 절 서론	77
1. Isozyme 분석	77
2. 미토콘드리아 DNA 분석	77
3. 성장호르몬 및 열충격유전자 분석	78
제 2 절 재료 및 방법	80
1. Isozyme 분석	80
2. 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 분석	81

3. 성장호르몬 및 열충격유전자 분석	85
제 3 절 결과 및 고찰	88
1. Isozyme 분석	88
2. 미토콘드리아 DNA 분석	92
3. 성장호르몬 및 열충격유전자 분석	97
제 6 장 전암컷 녀치의 자연산란	103
제 1 절 서론	103
제 2 절 재료 및 방법	104
1. 친어의 사육 및 수정란 수집	104
2. 산란량, 부상율, 수정율, 부화율 및 초기생존율 조사	104
3. 성비	104
제 3 절 결과	105
1. 자연산란량, 부상율 및 수정율	105
2. 부화율 및 초기생존율	108
3. 성비	111
제 4 절 고찰	111
제 7 장 자성발생성 2배체 유도	113
제 1 절 서론	113
제 2 절 재료 및 방법	114
1. 친어 및 자치어 사육	114
2. 자성발생성 2배체 유도	114
3. 성장 및 생존율	114
4. 성비	115

제 3 절 결 과	115
1. 수정율 및 부화율	115
2. 성장 및 생존율	116
3. 성비	116
제 4 절 고 찰	117
제 8 장 호르몬 처리에 의한 가짜수컷 생산	121
제 1 절 서론	121
제 2 절 재료 및 방법	122
1. 호르몬 처리에 의한 가짜수컷 유도	122
2. 성비	123
3. 성장 및 생존율	123
제 3 절 결 과	123
1. 성비	123
2. 생식능력	126
3. 성장 및 생존율	126
제 4 절 고 찰	128
제 9 장 참고문헌	131

제 1 장 서 론

우리나라의 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 대한 양식은 초기에는 국립수산진흥원을 중심으로 인공 종묘생산 기술이 개발되어 왔으나(민, 1987), 양식 기술의 보편화로 1980년대 중반부터 완전양식이 가능하여 현재 우리나라 전연안에서 육상의 콘크리트나 캔버스 수조 및 가두리를 이용한 기업적 양식이 이루어지고 있으며 일본에도 수출하는 주요 양식종의 하나이다.

넙치는 분류학적으로 가자미목(Pleuronectida)의 넙치과(Bothidae)에 속하는 어류로서 우리나라 전연안, 일본 및 중국의 연안에 널리 분포하고 있다(정, 1977). 본 종은 전장이 60 cm까지 성장하는 대형어로 성장이 빠르고 맛이 좋으며, 우리 나라 및 일본 등지에서 식용으로 각광받고 있는 고급 해산 어종이다. 그러나 본 종의 어획량은 1991년도에는 2,075톤, 1996년도에는 2,317톤으로 해마다 거의 일정한 수준을 유지하고 있다(해양수산부, 1997). 따라서 넙치의 생산 증대를 위해서는 종묘의 방류 등 적극적인 자원 조성 및 보호가 요구되며, 아울러 양식에 의한 생산이 요구되고 있다. 한편, 양식에 의한 넙치의 생산량은 계속 증가하여 1991년도에는 1,815톤으로 우리 나라 전체 해산어 양식의 46.5%를, 1996년도에는 8,861톤으로 77.7%를 점하고 있다(Fig. 1). 그러나 과도한 설비와 인건비 및 사료비의 급상승으로 생산성이 점차 낮아지고 있으므로 넙치 양식의 생산성을 높이기 위한 유전육종학적 연구가 우리 나라 뿐만 아니라 일본 등지에서 진행되고 있다.

넙치의 유전 육종에 관련된 연구를 보면 자연산 몇 계통에 대한 유전학적 동정(김 등, 1988)을 비롯하여 암수에 따른 성장의 차이, 성분화(田中, 1987; 이, 1990), 호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환(Tanaka, 1988), 3배체 유도(田畑, 1991), 자성발생성 2배체 유도(Tabata and Gorie, 1988a & b) 및 넙치와 범가자

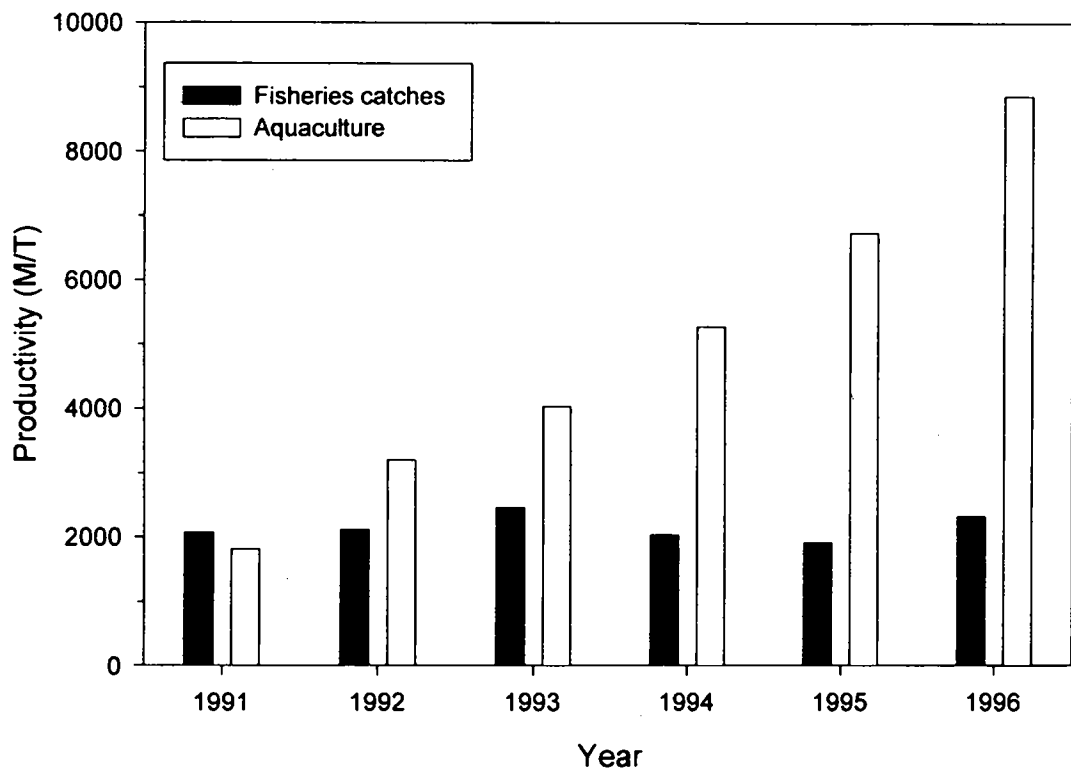


Fig. 1. The quantity of olive flounder by the fisheries catches and aquaculture.

미간 잡종의 유전학적 동정(김, 1994) 등에 대한 보고가 있다. 넙치는 암컷의 성장이 수컷에 비해 월등히 빨라(原田 等, 1983; 中本·小野山, 1985), 실제 양식산업에 있어서는 전암컷 넙치 집단(all-female population) 만을 사육하는 것이 매우 중요하다(田畑, 1991).

전암컷 집단을 생산하기 위한 방법은 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체를 유도하는 방법, 성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환을 유도하는 방법 및 자성발생성 2배체 암컷과 성전환 자성발생성 수컷과의 교배에 의한 방법으로 나눌 수 있다. 그 중 자성발생성 2배체는 일본과 우리나라에서 성공적으로 유도된 바 있으나(田畑 等, 1986; 田畑·五利江, 1987; Tabata and Gorie, 1988b; 김 등, 1993a와 b), 성숙된 난을 대량으로 확보하여 처리해야 하므로 대량 생산이 어려우며, 처리 과정이 매우 복잡할 뿐만 아니라 친어에 따라 암컷 생산 비율이 크게 차이나는 문제점을 가지고 있다(田畑, 1991). 그러나 단순 교배에 의한 방법은 전암컷을 생산할 수 있는 성전환된 자성발생성 2배체 수컷(가짜수컷) 친어가 확보되어 있으면 매우 간편한 방법이다(Fig. 2).

본 연구는 넙치를 대상으로 성장이 빠른 전암컷을 생산하기 위해서 첫째, 1991년에 유도된 자성발생성 2배체(gynogenetic diploid) 암컷과 이들을 성전환시켜 유도한 자성발생성 2배체(sex-reversed gynogenetic diploid) 수컷의 번식능력 여부 및 이들에 의하여 태어난 넙치의 전암컷 여부를 조사하였다. 둘째, 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시켜 유도한 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 생산된 전암컷 넙치에 대한 산업성 평가, 유전학적 분석, 생식소 발달 및 자연산란 여부를 조사하였다. 셋째, 전암컷 넙치를 생산할 수 있는 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시켜 유도한 자성발생성 2배체 수컷을 생산할 수 있는 기술의 보급 또는 이들의 종묘를 직접 어민에게 분양하는 과정으로 실시하였다.

제 2 장 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의한 자연산란

제 1 절 서 론

넙치는 1996년도 양식생산량이 8,861톤으로 우리나라 전체 해산어류 양식의 77.7%를 차지할 만큼 대단히 중요한 어종이다(해양수산부, 1997). 넙치의 양식 생산이 급격하게 증가한 중요한 요인은 무엇보다도 실내에서 양질의 수정란이 대량 공급된데 기인한다. 이처럼 어떤 어종이 양식 산업으로서 정착을 하기 위해서는 대상어종의 안정적인 수정란 공급이 대단히 중요하다(김·허, 1991). 넙치의 종묘생산을 위한 수정란의 확보는 자치어의 사육방법이 개발되면서 본격적으로 연구되기 시작하였다. 수정란의 확보를 위해서 1970년대에는 자연산 어미를 대상으로 복부압박법에 의한 인공수정을 사용하였으나(熊井과 中村, 1971), 1980년대에는 실내에서 사육한 어미를 이용한 자연채란에 대한 연구가 이루어진 바 있다(平村과 小林, 1979; 伊島등, 1986; 김과 허, 1991). 따라서 최근 넙치의 생산성 향상을 목적으로 연구되고 있는 전암컷 넙치의 양식을 위해서는 무엇보다도 실내에서 자연산란에 의한 전암컷 넙치 수정란의 대량확보가 필수적이며, 동시에 이들 수정란에 대한 질적인 평가도 실시되어야 한다.

이에 본 연구는 전암컷 넙치의 수정란을 대량으로 생산하기 위하여 5년생 자성발생성 2배체(gynogenetic diploid) 암컷과 이들을 성전환시켜 생산한 자성발생성 2배체(sex-reversed gynogenetic diploid) 수컷과의 자연산란 및 생산된 수정란에 대한 부화율과 초기생존율을 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 친어의 사육 및 수정란 수집

친어로 사용한 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷은 5년생이었다. 친어는 국립수산물진흥원 울진수산물종묘배양장의 실내콘크리트 수조(지름 4 m×높이 1.5 m)를 이용하여 유수식으로 관리하였으며 사육 환경은 자연조건으로 하였다. 먹이는 생사료와 시판하는 분말 사료로 만든 모이스트 펠릿을 하루에 1번씩 주었으며 산란기간동안은 2일에 1번씩 공급하였다.

자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷은 모두 16마리로 그 중 암컷은 9마리, 수컷은 7마리 였다. 자연산란된 난은 수조내의 표층수가 집난조로 유수되도록 하여 모은 후 매일 오전 10시에 수거하였다. 수거된 난은 즉시 메스실린더에 부은 후 산란량과 부상란을 측정하였다.

2. 산란량, 부상율, 수정율, 부화율 및 초기생존율 조사

일일산란량 및 부상율은 매일 수거된 난을 메스실린더에 부은 후 산란량과 부상란을 측정하여 환산하였다(1,200개/cc). 수정율은 부상난 중 200여개의 난을 무작위로 샘플하여 만능투영기(profile project) 하에서 2~4 세포기로 발생 중인 난을 계수하였으며, 부화율은 배체형성이 완료된 난에 대한 부화 개체의 백분율로 구하였다. 초기생존율은 부화후 8일째에 부화된 정상개체수 중 먹이(rotifer)를 먹고 생존한 개체수의 백분율로 계산하였다.

3. 성비

자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 부화된 넙치가 전암컷 인지를 조사하기 위하여 생식소에 의한 성비 조

사를 부화후 10개월째 실시하였다. 조사 방법은 넙치의 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's fluid로 고정시키고, paraffin으로 embedding하여 5 μ m 크기로 절단한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색을 하였다. 암수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였으며 성비의 유의차 검정은 χ^2 -test로 실시하였다.

제 3 절 결 과

1. 자연산란량, 부상율 및 수정율

자성발생성 2배체 암컷과 자성발생성 2배체 수컷에 의한 자연산란은 1996년 5월 1일부터 6월 4일까지로 32일간 이었다. 어미 사육탱크내의 수온 변화는 Fig. 3과 같이 산란기 초기인 5월 상순은 11~12 $^{\circ}$ C 였으며, 산란기 중기인 5월 중순에는 12~15 $^{\circ}$ C, 산란기 후기인 5월 하순에는 15 $^{\circ}$ C 전후였다. 산란기간중의 일일산란량, 부상률 및 수정율은 Table 1과 같다. 수정란은 총 15,563,000개로 일일 평균 산란량은 486,343개, 암컷 1마리당 평균 산란량은 1,729,222개 였다.

일일 산란량의 변화는 Fig. 4와 같이 산란기 초기와 말기 보다 산란기 중기에 최대를 보였으며 일일 최대 산란량은 산란기 중기인 5월 25일로 최고 1,440,000개 였다. 부상율은 산란기 초기와 말기보다 산란량이 많은 중기가 양호하였으며 평균 부상율은 80.0% 이고, 최대 부상율은 산란기 중기인 5월 25일로 96.7% 였다(Fig. 5).

수정율은 부상율과 같이 산란기 초기와 말기보다 산란량이 많은 중기가 85~99.6% 로 양호하였으며 평균 수정율은 79.9% 였다. 특히 5월 23일부터 29일 까지의 평균 수정율은 98.6%로 대단히 높았다(Fig. 6).

이상의 결과로 보면 전암컷 넙치 생산용 어미로 사용한 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷은 보통 넙치 친어처럼 실내 수조내에서 정상적으로 자연산란이 가능할 뿐만 아니라 양질의 수정란을 생산할 수 있는

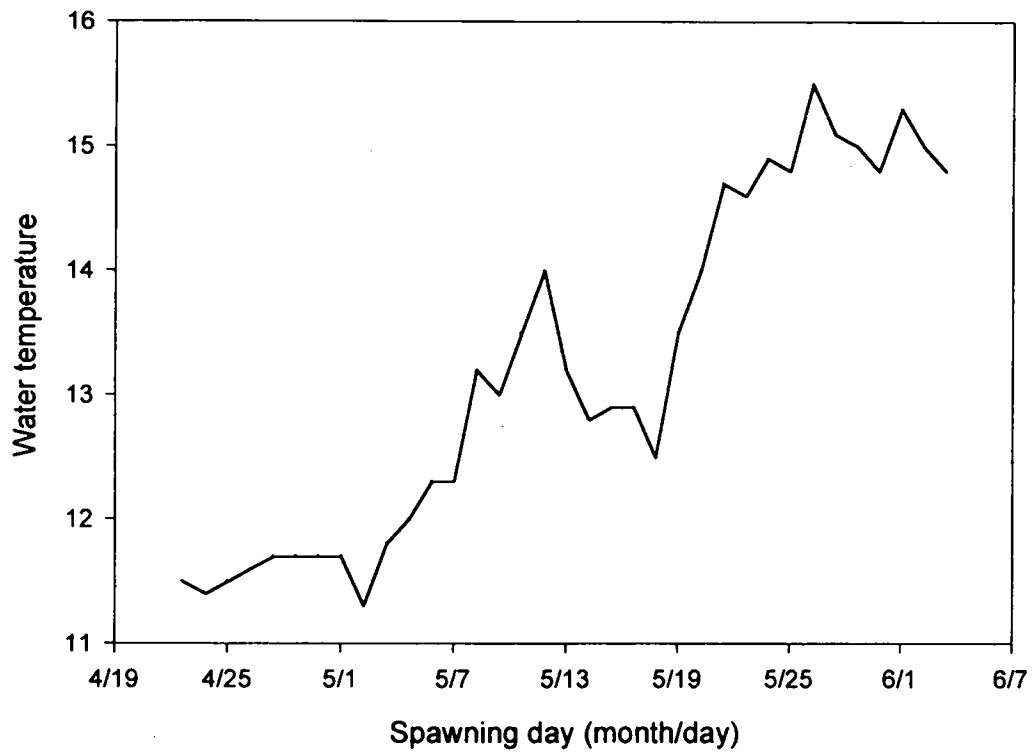


Fig. 3. Variation of water temperature during spawning period.

Table 1. Number of natural spawned eggs, floating rate and fertilization rate by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic male during spawning period

Date	Water temperature (°C)	No. of spawned eggs	Floating rate (%)	Fertilization rate (%)
1 May	11.5	58,000	62.6	42.5
2	11.4	123,000	59.8	47.5
3	11.5	145,000	65.6	48.9
4	11.6	186,000	71.5	56.4
5	11.7	198,000	69.5	49.8
6	11.7	213,000	75.6	52.6
7	11.7	216,000	77.8	40.0
8	11.7	672,000	78.6	54.6
9	11.3	216,000	72.2	72.6
10	11.8	504,000	76.2	86.0
11	12.0	288,000	75.0	76.4
12	12.3	582,000	86.6	86.5
13	12.3	672,000	89.3	91.1
14	13.2	672,000	82.1	92.8
15	13.0	840,000	85.7	95.9
16	13.5	840,000	85.7	95.6
17	14.0	768,000	78.1	99.9
18	13.2	708,000	86.4	99.6
19	12.8	420,000	65.7	86.8
20	12.9	420,000	78.5	86.2
21	12.9	384,000	81.3	87.4
22	12.5	336,000	85.7	86.0
23	13.5	768,000	81.3	98.6
24	14.0	564,000	85.1	98.5
25	14.7	1,440,000	96.7	99.5
26	14.6	552,000	95.7	99.6
27	14.9	768,000	93.8	98.1
28	14.8	276,000	78.3	98.8
29	15.5	768,000	96.9	97.2
30	15.0	642,000	93.5	98.4
31	15.1	288,000	83.3	68.7
4 Jun	14.8	36,000	66.7	55.0
Mean	13.04	486,343	80.03	79.92

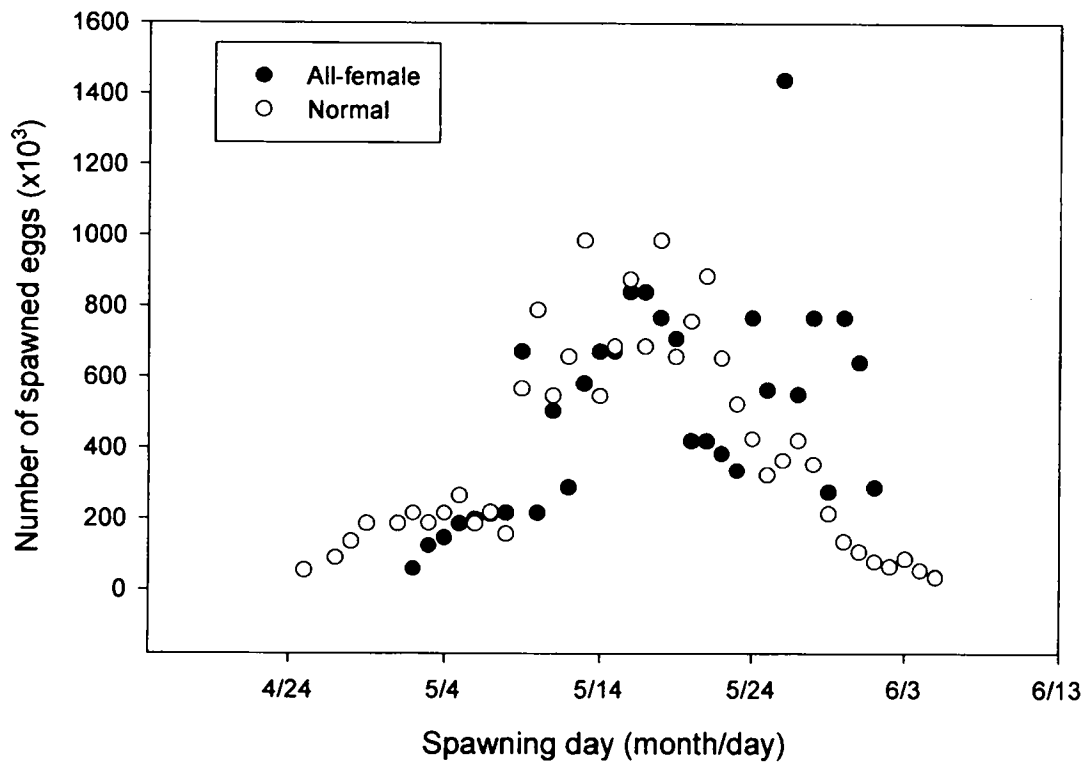


Fig. 4. Number of total spawned eggs by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male.

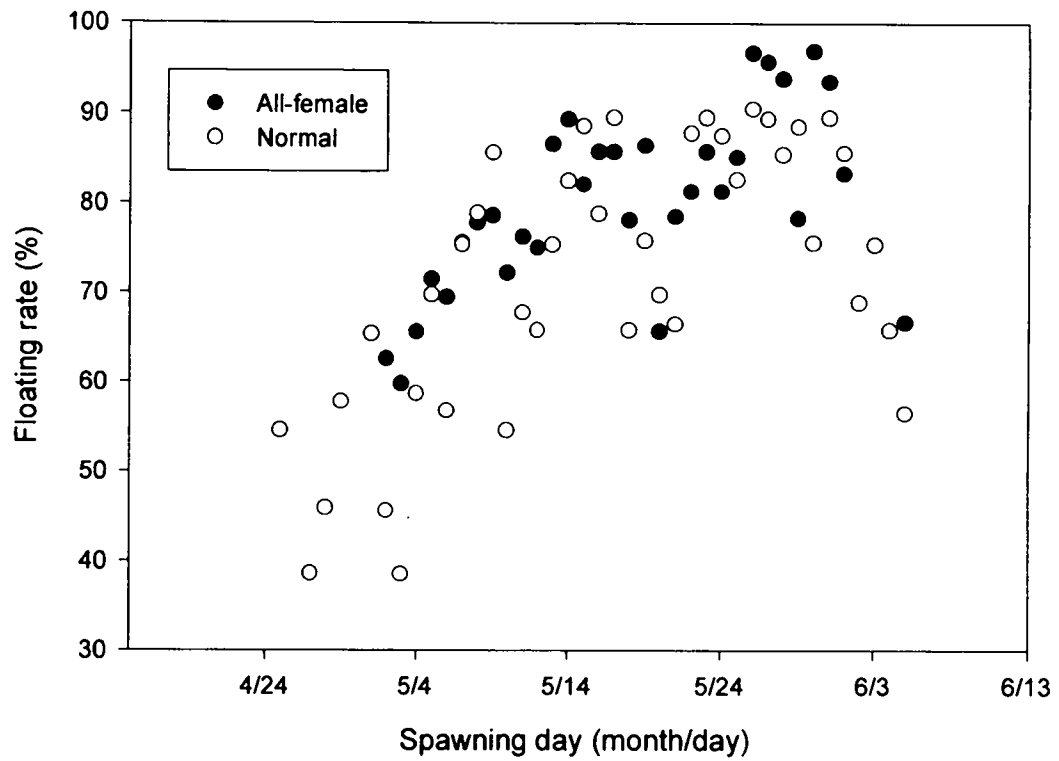


Fig. 5. Floating rate of total spawned eggs by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male.

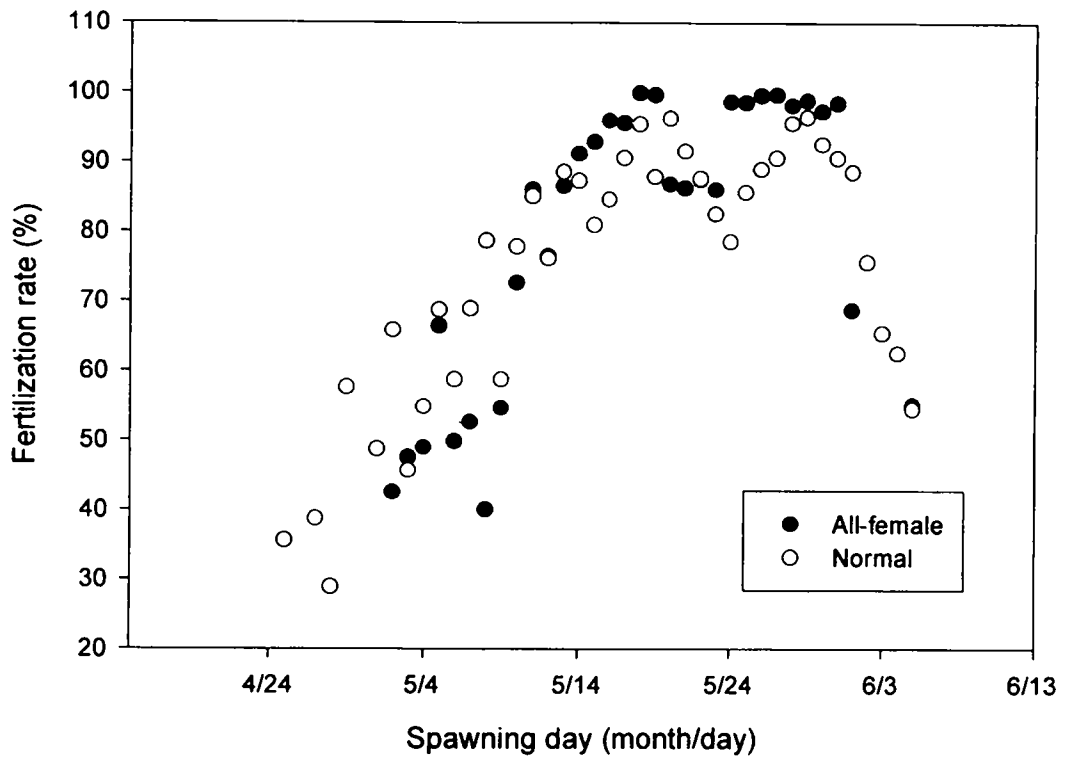


Fig. 6. Fertilization rate of total spawned eggs by mating gynogenetic diploid female with sex-reversed gynogenetic diploid male.

것으로 확인되었다.

2. 부화율 및 초기생존율

자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 생산된 넙치와 보통 넙치에 대한 부화율 및 초기생존율을 비교해 보면 Table 2와 같다. 평균 부화율은 전암컷 넙치가 82.5%, 보통 넙치가 88.0% 로 보통 넙치가 양호하였으며 ($P < 0.05$), 초기생존율의 평균값은 전암컷 넙치가 90.6%, 보통 넙치가 92.6%로 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

Table 2. Hatching rates and early survival rates of all-female and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Group	Hatching rate (%)	Early survival rate (%)
All-female	82.5±6.27 ^a	90.6 ± 2.21 ^a
Normal	88.0±5.39 ^b	92.6 ± 2.27 ^a

Values in the same column having the equal superscripts are not significantly different ($P > 0.05$).

3. 성비

부화후 10월째의 성비 조사 결과는 Table 3과 같이 암컷의 평균 비율이 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 생산된 넙치는 93.3%, 보통 넙치는 56.7% 였다. 따라서 본실험에서 전암컷 생산용 어미로 사용한 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷은 암컷 비율이 대단히 높은 넙치를 생산할 수 있는 것이 확인되었으므로 그들에 의하여 생산된 넙치를 금후 “전암컷 넙치” 라고 하였다. 또한 자성발생성 2배체 암컷 및

Table 3. Sex ratios of all-female and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Group	No. of fish examined	No. of female	No. of male	% Female
All-female	60	56	4	93.3 ^a
Normal	60	34	26	56.7 ^b

Values in the same column having the equal superscripts are not significantly different (P > 0.05).

성전환된 자성발생성 2배체 수컷을 대상으로 산란기에 생식소를 조직학적으로 조사한 결과 보통 넙치와 같이 성숙한 난모세포와 정자를 관찰할 수 있었다 (Plate 1).

제 4 절 고 찰

실내에서 어류의 자연산란은 사육수조의 크기 및 형태, 친어의 크기와 성비, 적정수용밀도 및 친어의 영양상태등과 밀접한 관계가 있다. 보통 넙치의 자연산란을 위해서 사용되고 있는 수조의 크기와 수용밀도에 대하여 平本·小林(1979)은 직경 3.7 m×1.0 m, 수용적 8 m³의 원형수조에 전장 50~70 cm의 친어 12마리(암컷 4마리, 수컷 8마리)를 1톤당 1.8~2.4 kg의 밀도로 사육하여 성공적으로 자연산란을 유도하였다. 본연구에서는 원형수조 직경 4 m×1.5 m에 평균전장 47.2~71.5 cm의 넙치 어미를 16마리(암컷 9마리, 수컷 7마리 2.8 kg/1톤) 수용함으로서 수조크기 및 수용밀도면에서 平本·小林(1979)와 유사하여 이들 조건이 산란에는 제한적 요인으로 작용하지 않았던 것으로 생각된다.

수온과 광주기가 어류의 성숙 및 산란에 미치는 영향에 대하여 넙치의 경우 伊島 등(1986)은 산란 적수온을 14~18℃, 민(1987)은 12~15℃ 라고 하였다. 본

연구에서는 인위적인 수온이나 광주기를 조절하지 않은 결과, 자연산란이 수온 11~15℃에서 이루어졌지만 수정율 및 부화율이 높은 때의 수온은 13~15℃인 것으로 나타났다. 넙치의 산란 일수에 대하여는 平本·小林(1979)은 106일간, 민(1987)은 70일간 이었다. 본연구에서는 32일간으로 산란일수가 위의 연구자들에 비하여 짧은 것으로 나타났다. 한편 산란기간중 암컷 친어 1마리의 산란량은 김·허(1991)는 2,670,000개(암컷 평균체중 3,380 g), 平本·小林(1979)은 4,040,000개(암컷의 전장 60~70 cm) 였으나 본연구에서는 1,729,222개(암컷 평균체중 2,490 g)로 적은 편이었다. 이것은 친어로 사용된 암컷의 크기가 다소 적은데 원인이 있는 것으로 사료된다.

자연산란된 난의 부상율 및 부화율은 난질을 평가하는데 있어서 중요한 요인으로 작용한다. 김·허(1991)는 부상율이 산란전기에는 47.6%, 산란중기에는 63.5%, 산란후기에는 41.8%로 전체평균은 55.3% 였으며, 부상란에 대한 수정율은 산란전기에서는 37.4%, 산란중기에서는 54.1%, 산란후기에서는 19.6%로 전체평균은 44.4% 였다.

김 등(1994)은 호르몬을 주사한 자성발생성 2배체 수컷과 보통 넙치 친어 3년생 암컷과의 인공수정에 의하여 얻은 난의 평균부상율은 35.5%, 평균수정율은 67.8%, 평균부화율은 63.6% 였다. 본연구에서는 평균부상율이 80%, 평균수정율이 79.9%로 김 등(1994)에 비하여 부상율 및 수정율이 양호한 것으로 나타나 전암컷 넙치난을 비교적 안정적으로 확보할 수 있었다. 따라서 금후 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 양질의 전암컷 수정란을 대량 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

전암컷 넙치의 성비에 관해서는 아직 정확하게 밝혀지지는 않았지만 본연구에서 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 생산된 넙치의 암컷 비율은 평균 93.3% 였다. 그러나 Tabata (1991)는 보통 넙치(♀)와 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에서 생산된 치어의 성비

를 12회 조사한 결과, 암컷 유도율이 85.4~95.7%로 비교적 높았으나 100%의 암컷 집단은 생산하지 못하였다. 또한 방 등(1996)은 보통 넙치(♀)와 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자손에 대한 성비를 조사한 결과 암컷의 비율이 16.7~55.4% 였으나 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷을 이용한 자손검정 결과 암컷의 비율이 95~100% 였다. 그러나 김 등(1994)은 보통 넙치(♀)와 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 인공수정에 의하여 얻어진 자손들의 암컷 비율은 100% 라고 하였다. 만일 넙치의 유전적인 성결정 기작이 female homogamety (XX)라고 가정하면 보통 넙치나 자성발생성 2배체 중 어느 것을 암컷 어미로 사용하여도 그 자손은 100% 암컷이 되어야 할 것으로 판단되므로 금후 이 부분에 관해서는 보다 더 정밀한 조사가 있어야 할 것으로 생각된다.



Plate 1. Transverse sections of gynogenetic diploid female (upper) and sex-reversed gynogenetic diploid male (below) at spawning season.

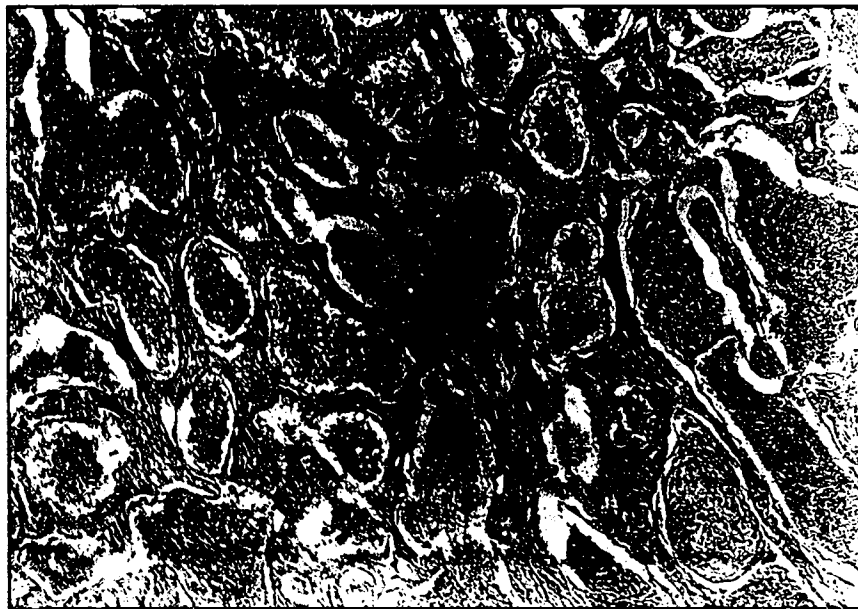
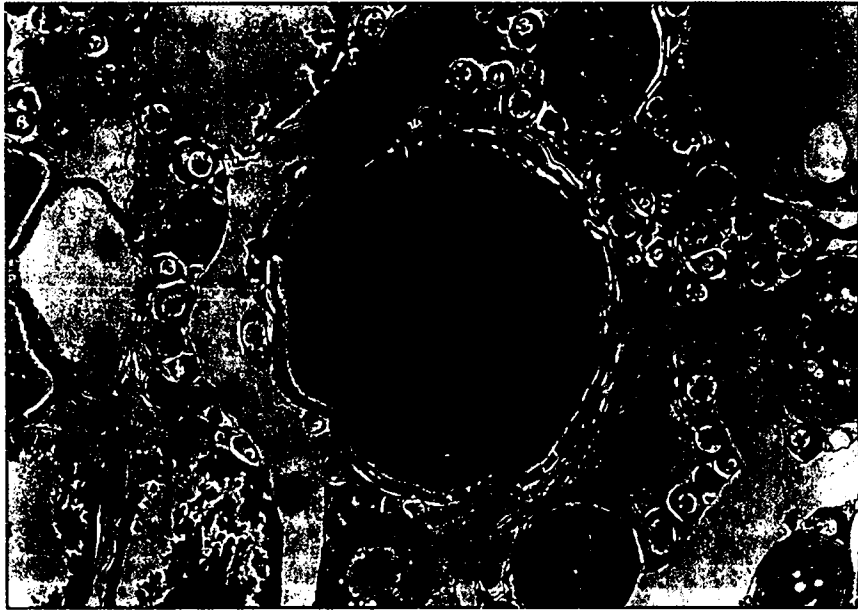


Plate 1. Transverse sections of gynogenetic diploid female (upper) and sex reversed gynogenetic diploid male (below) at spawning season.

여 백

제 3 장 전암컷 넙치의 산업성 평가

제 1 절 서 론

우리나라 해산양식 어종중 생산량이 가장 많은 넙치는 실내에서 양질의 수정란이 대량 생산됨으로써 비약적인 발전이 이루어졌다. 이처럼 어떤 어종이 양식 산업으로서 정착을 하기 위해서는 안정적인 수정란 공급이 중요할 뿐 아니라 우수한 형질을 가진 종묘의 생산기술도 양식산업에 있어서 대단히 중요하다. 일반적으로 양식에 있어 생산성 향상에 가장 중요한 요인은 성장과 생존율이다.

성장에 영향을 미치는 요인으로는 사육환경, 먹이등 외적인 요인과 유전학적으로 우수한 형질을 지속되도록 하는 연구도 대단히 중요하다. 사육환경 중에서는 수온의 영향이 대단히 커 일년중 적정수온의 지속기간이 길수록 성장에 대단히 유리하며 양식 대상어종에 적합한 사료를 만들어 공급하면 성장을 더욱 향상시킬 수 있다. 그러나 이들 외적요인은 많은 인력과 경비가 소요된다.

넙치는 암컷이 수컷보다 성장이 빠르다는 특성을 이용하여 유전학적으로 성장이 빠른 암컷만을 생산할 수 있는 기술이 개발 되었으므로 이들을 이용하여 산업적인 면에서 상품크기까지의 성장과 생존율을 조사할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 생산된 전암컷 넙치의 산업성을 평가하기 위하여 성장, 사료효율, 일간증중율, 일간섭취율 및 생존율을 대조군인 보통 넙치와 비교하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 재 료

본 실험에 사용한 전암컷 넙치는 5년생 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 생산된 것이며, 대조군인 보통 넙치는 울진수산종묘배양장 실내수조에서 자연산란된 양식산이었다.

2. 성장 및 사료효율

1994년도에 자연산란된 전암컷 넙치와 보통 넙치를 대상으로 2반복으로 실험 하였으며 실험기간은 1995년 10월부터 1997년 7월까지 22개월간 이었다. 실험 어는 실험구당 전암컷 넙치와 보통 넙치 100마리를 각각 사용하였다. 실험어의 관리는 유수식으로 하였고 실험어가 성장함에 따라 사육수조를 300 ℓ 에서 1톤 FRP 수조 및 5톤 콘크리트 수조로 옮겨 주었고, 먹이는 1일 2회(오전 10시 와 오후 4시) 만복시까지 공급하였으며 매일 공급한 먹이량을 조사하였다.

실험에 사용된 사료는 생사료(냉동 전갱이)와 시판용 분말사료(넙치 육성용) 를 1:1의 비율로 혼합한 후 moist pellet을 만들어 냉동고에 보관하였다. 비타민 과 미네랄은 시판되고 있는 제품을 사료제조시 첨가하였다. pellet의 크기는 실험어가 성장함에 따라 조정하였다. 사료의 성분 분석중 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법, 조지방은 Soxhlet 추출법(ether 추출법), 조회분은 직접회화법으로 각각 분석하였다(AOAC, 1984).

성장조사는 3개월 마다 측정하였으며, 측정 방법은 전일 1~2일간 절식 시킨 후 MS 222 (100 ppm)로 마취시켜 전장, 체장 및 체중을 조사하였으며 일간증 중율, 일간먹이섭취율 및 사료효율도 구하였다.

일간 증중율(daily weight gain)은

$$\frac{(\text{Fish weight gain} \times 100)}{[(\text{Initial fish weight} + \text{final fish weight}) \times \text{days fed} / 2]}$$

일간 먹이 섭취율(daily feed intake)은

$$\frac{(\text{Feed intake} \times 100)}{[(\text{Initial fish weight} + \text{final fish weight}) \times \text{days fed} / 2]}$$

사료효율(feed efficiency)은

$$\frac{(\text{Fish weight gain} \times 100)}{\text{Feed intake}}$$

생존율은 측정시 마다 생존마리수를 계수하여 환산하였다. 성장 결과의 유의성 검정은 Student's t-test 로 하였다.

3. 성비

본실험에 사용한 전암컷 넙치는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 생산된 넙치로 이들 넙치가 전암컷 인지를 조사하기 위하여 생식소에 의한 성비 조사를 2회 실시하였다. 1회의 조사시기 및 방법은 실험시작전으로 자연산란된 넙치와 보통 넙치의 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's fluid로 고정시키고, paraffin으로 embedding하여 5 μm 크기로 절단한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색을 하였다. 암수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였다. 2회의 조사시기는 자연산란된 넙치가 성장하여 성숙이 완료된 산란시기로 조사방법은 외관상 생식소의 발달모양 및 복부 압박에 의한 난 또는 정액을 확인하는 방법으로 암수를 판정하였다. 성비의 유의차 검정은 χ^2 -test로 실시하였다.

제 3 절 결 과

1. 성장

실험기간 동안 공급한 사료의 영양성분 조성표는 Table 4와 같다. 실험사료를 만들 때 마다 영양성분을 분석한 결과 단백질 함량은 평균 56.9% 였다.

실험기간 동안 전암컷 넙치 및 보통 넙치의 성장은 Fig. 7 및 Table 5 에서 보는 바와 같이 성장패턴은 2단계로 구분이 가능하였다. 1단계는 전암컷 넙치와 보통 넙치와의 성장에서 유의적인 차이가 없는 체중 400~500 g까지 이며, 2단계는 전암컷 넙치와 보통 넙치와의 성장에서 유의적인 차이가 시작되는 체중 400~500 g부터 상품크기까지 이다.

Table 4. Composition (%) of experimental diet used to determine growth pattern of all-female and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Ingredient	%
Commercial blinder meal	50
Frozen horse mackerel	50
Vitamin and mineral mixture	1.5
Nutrient content	
Moisture	35.5
Protein (% in dry matter)	56.9
Lipid (% in dry matter)	7.9
Ash (% in dry matter)	13.1

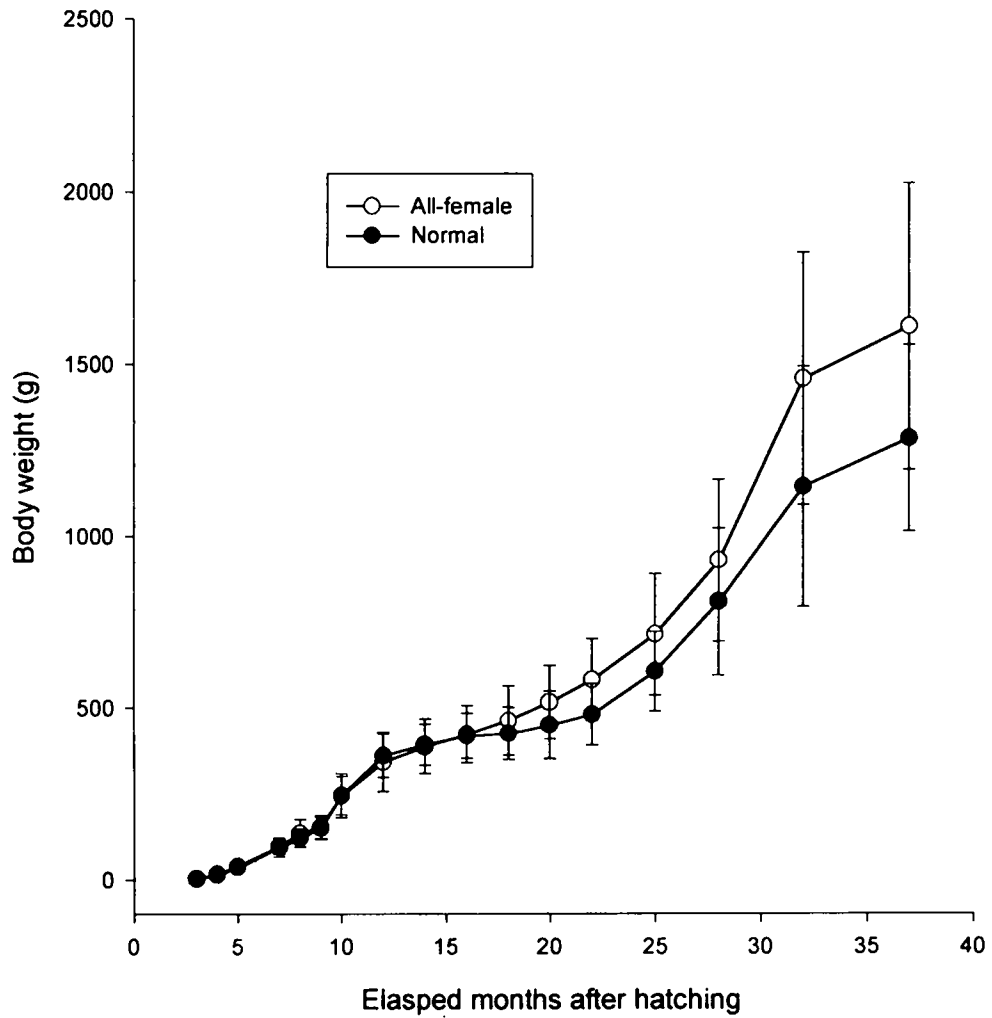


Fig. 7. Average body weight of all-female and normal olive flounder for the experimental period.

Table 5. Growth pattern and feed efficiency of all-female and normal olive flounder during experiment period

	All-female	Normal
Period-1 (95. 10. 6~96. 1. 5)		
Initial mean weight (g)	244.75	244.32
Final mean weight (g)	423.89	418.73
Weight gain (%)	73.2	71.4
Daily weight gain (%)	0.24	0.18
Feed efficiency (%)	69.47	51.59
Daily feed intake (%)	0.42	0.34
Period-2 (96. 1. 6~4. 3)		
Initial mean weight (g)	423.89	418.73
Final mean weight (g)	516.61	487.11
Weight gain (%)	21.9	14.0
Daily weight gain (%)	0.38	0.20
Feed efficiency (%)	74.52	65.01
Daily feed intake (%)	0.41	0.31
Period-3 (96. 4. 4~7. 4)		
Initial mean weight (g)	516.61	487.11
Final mean weight (g)	581.27	523.81
Weight gain (%)	12.5	7.5
Daily weight gain (%)	0.32	0.24
Feed efficiency (%)	83.7	71.0
Daily feed intake (%)	0.38	0.34

Table 5. continued

	All-female	Normal
Period-4 (96. 7. 5~10. 23)		
Initial mean weight (g)	581.27	523.81
Final mean weight (g)	932.44	810.75
Weight gain (%)	60.4	54.8
Daily weight gain (%)	0.58	0.60
Feed efficiency (%)	51.2	33.8
Daily feed intake (%)	0.32	0.30
Period-5 (96. 10. 24~97. 1. 19)		
Initial mean weight (g)	932.44	810.75
Final mean weight (g)	1462.0	1145.94
Weight gain (%)	56.8	41.3
Daily weight gain (%)	0.52	0.39
Feed efficiency (%)	51.2	33.8
Daily feed intake (%)	0.32	0.30
Period-6 (97. 1. 20~97. 4. 30)		
Initial mean weight (g)	1462.0	1145.94
Final mean weight (g)	1528.3	1198.38
Weight gain (%)	4.5	3.9
Daily weight gain (%)	0.19	0.16
Feed efficiency (%)	23.7	20.8
Daily feed intake (%)	0.18	0.14

Table 5. continued

	All-female	Normal
Period-7 (97. 5. 1~7. 31)		
Initial mean weight (g)	1528.3	1198.38
Final mean weight (g)	1613.98	1286.21
Weight gain (%)	5.6	7.3
Daily weight gain (%)	0.18	0.24
Feed efficiency (%)	31.2	35.0
Daily feed intake (%)	0.21	0.26

가. 1단계 (200 g 부터 400~500 g 까지)

실험시작시('95년 10월)의 전장 및 체중은 전암컷 녀치가 각각 27.42 ± 0.62 cm, 244.75 ± 2.04 g 였고, 보통 녀치가 27.92 ± 0.58 cm, 244.32 ± 2.34 g 였다. 사육기간에 따른 성장의 변화를 보면 실험후 3개월('96년 1월)의 평균체중이 전암컷 녀치가 423.89 ± 2.06 g, 보통 녀치가 418.73 ± 1.90 g로 두집단간에 유의차가 없었다. 따라서 400 g 전후(전장 30 cm) 까지는 두집단간에 성장의 차이는 없었다.

나. 2단계 (400~500 g 부터 1200~1600 g 까지)

실험후 3개월('96년 1월)의 평균 체중이 전암컷 녀치는 423.89 ± 2.06 g, 보통 녀치는 418.73 ± 1.90 g로 두집단간에 유의차가 없었으나 그 이후부터 전암컷 녀치가 보통 녀치보다 성장이 빨라지기 시작하여 실험후 6개월('96년 4월)의 평균 체중은 전암컷 녀치가 516.61 ± 8.52 g, 보통 녀치가 487.11 ± 8.63 g로 두집단간에 유의차가 나기 시작하였다($P < 0.05$). 이러한 차이는 성장함에 따라 점점 커져 실험종료시의 평균전장은 전암컷 녀치가 50.29 ± 4.90 cm, 보통 녀치가 47.72

± 3.04 cm, 평균체중은 전암컷 넙치가 1613.98 ± 22.57 g, 보통 넙치가 1286.21 ± 59.14 g으로 전암컷 넙치가 평균전장에서는 2.87 cm, 평균체중에서는 327 g 성장이 빨랐다($P < 0.01$).

2. 사료효율

전암컷 넙치와 보통 넙치 모두 성장함에 따라 사료효율이 낮아지는 경향을 보였지만, 사육수온 즉 계절에 따라서도 변화를 보였다. 즉 넙치의 성장에 비교적 적합한 9월, 10월 및 11월에는 사료효율이 70~110%로 대단히 양호하였으나 수온이 낮은 12월과 1월 및 2월에는 사료효율이 50~20%로 낮았다(Fig. 8). 전 실험기간동안의 평균사료효율을 보면 전암컷 넙치는 66.5%, 보통 넙치는 62.7%로 전암컷 넙치가 양호하였으나 유의차는 없었다. 사료효율을 성장과 비교해 보면 전암컷 넙치가 보통 넙치에 비하여 성장이 빨라지기 시작하는 '96년 4월부터 전암컷 넙치의 사료효율이 보통 넙치에 비하여 양호하기 시작하여 사료효율과 성장은 밀접한 관계를 보였다.

3. 일간증중율 및 일간먹이섭취율

일간증중율은 성장하면서 점차 감소하지만 사료효율의 변화와 pattern이 유사하였다. 실험기간동안 급격한 변화없이 0.1~0.6% 수준을 유지하였다(Fig. 9). 두집단간에 일일증중율을 비교하면 전암컷 집단이 약간 높은 값을 나타내었다.

일간먹이 섭취율은 일간증중율과 비슷한 패턴으로 성장함에 따라 완만하게 감소하였다(Fig. 10). 두집단간의 일간먹이 섭취율을 비교하면 전암컷 넙치가 보통 넙치보다 약간 높은 값을 보였으나 유의차는 없었다.

4. 성비

성비 조사 결과는 Table 6과 같다. 암컷의 평균 비율은 전암컷 넙치가 97.4%,

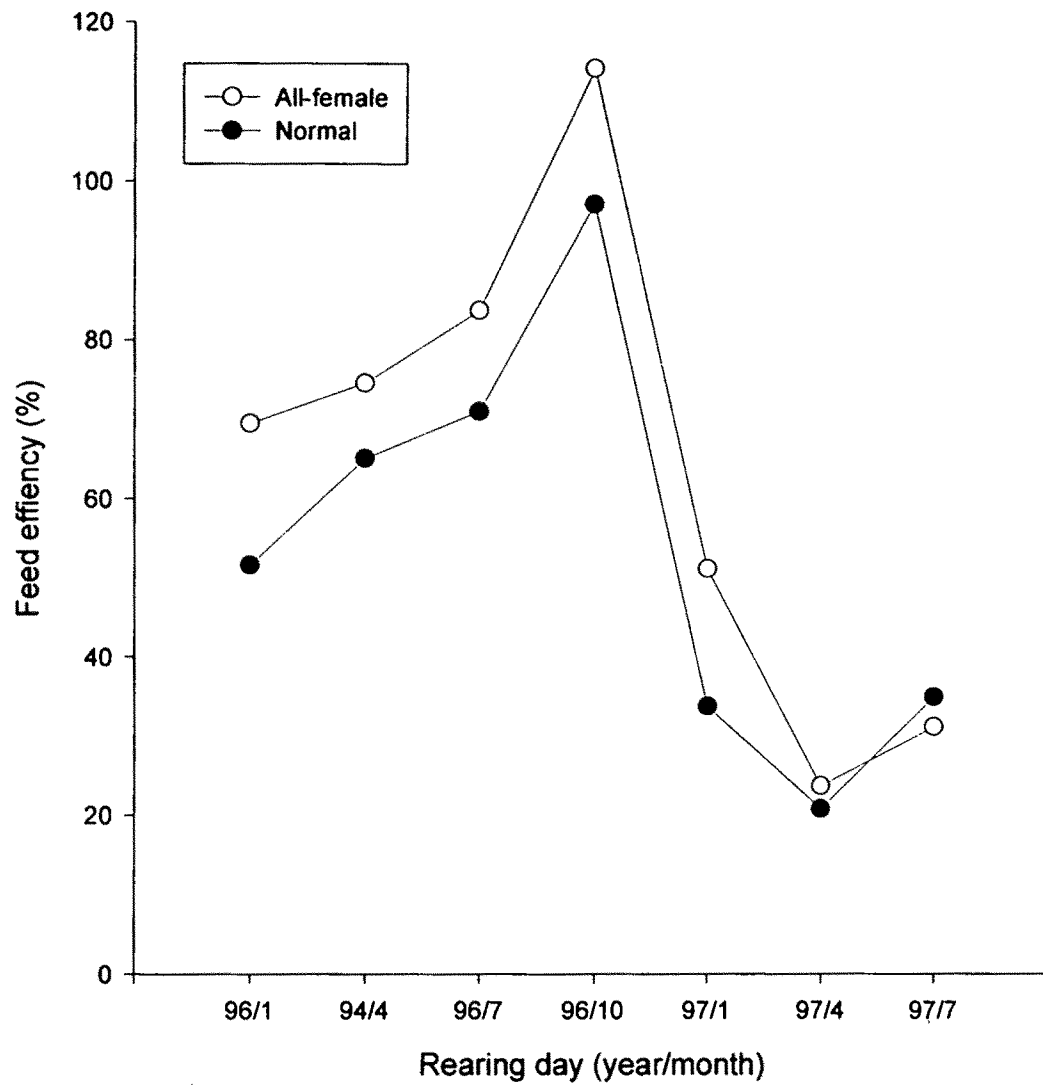


Fig. 8. Feed efficiency of all-female and normal olive flounder for experimental period.

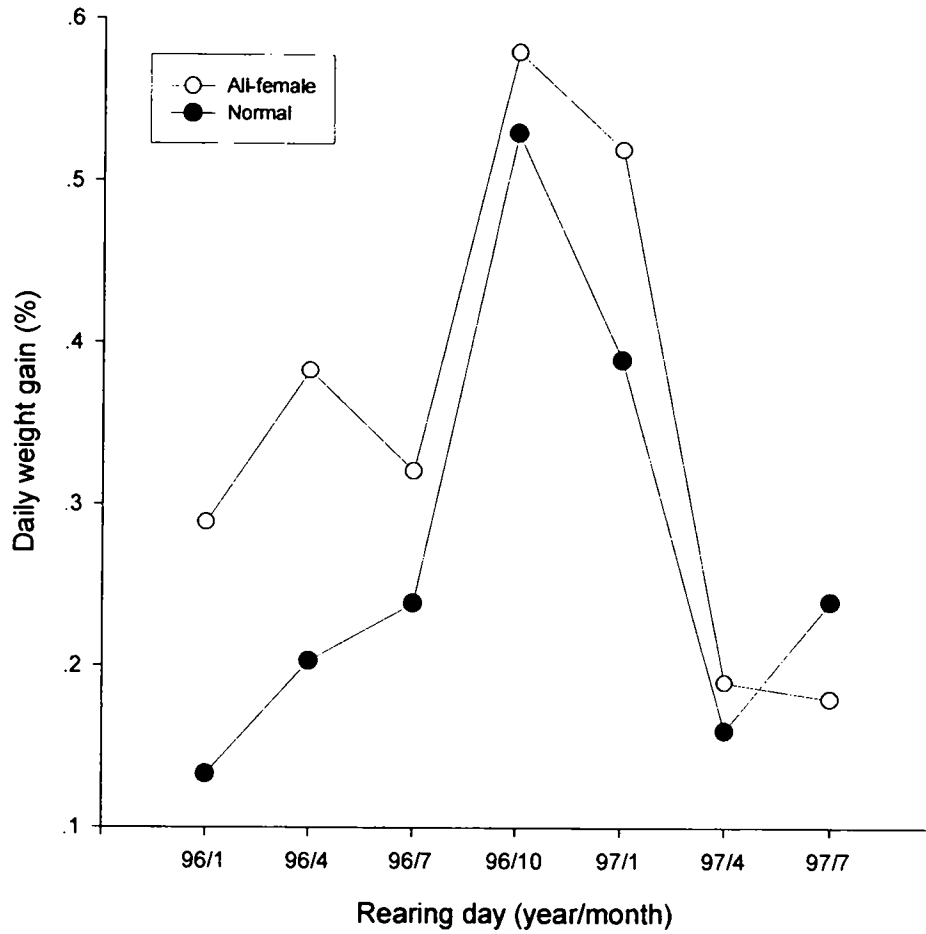


Fig. 9. Daily growth rate of all-female and normal olive flounder for the experimental period.

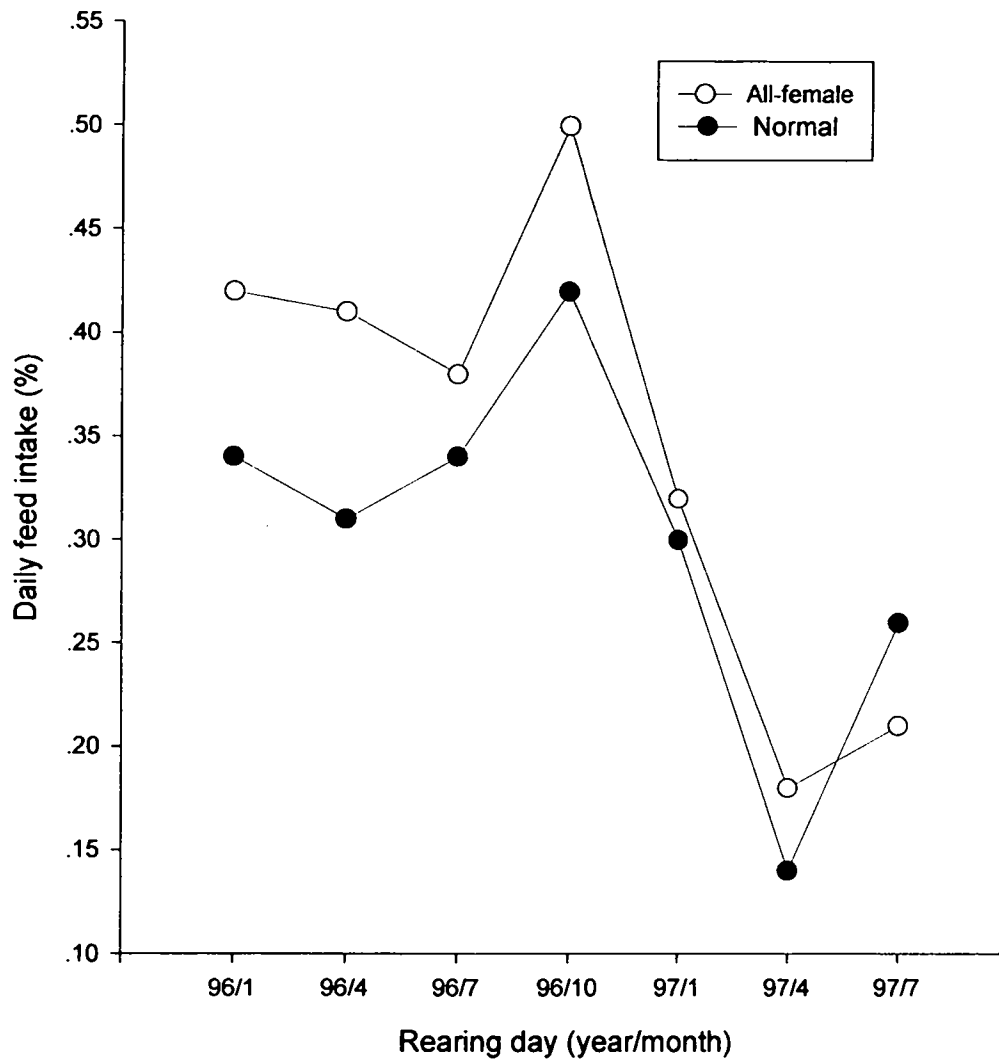


Fig. 10. Daily feed intake of all-female and normal olive flounder for the experimental period.

Table 6. Sex ratios of all-female and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

	Group	No. of fish examined	No. of female	No. of male	% Female
1st	All-female	30	30	0	100
	Normal	30	20	10	66.7
2nd	All-female	38	36	2	94.7
	Normal	32	17	15	53.1
Mean	All-female				97.4 ^a
	Normal				59.9 ^b

Values in the same column having the equal superscripts are not significantly different ($P > 0.01$).

보통 넙치가 59.9% 였다. 실험시작시의 생식소 조직표본에 의한 1회 조사에서는 전암컷 넙치는 모두 100% 암컷으로 조사되었으나, 산란기기인 2회 조사에서는 생식소의 압박에 의한 난 또는 정액의 확인에 의한 전암컷 넙치의 암컷율은 94.7% 였다.

제 4 절 고 찰

넙치의 성장은 암컷이 수컷에 비하여 월등히 빠르므로(原田 等, 1983; 中本・小野山, 1985) 전암컷 넙치의 사육은 양식 생산성 향상에 대단히 중요하다(Tabata, 1991). 전암컷 넙치의 성장을 보면 田畑(1992)은 부화후 5개월째의 체중이 전암컷 넙치가 75~98 g 보통 넙치가 69~87 g으로 두집단간에 유사하였

지만, 부화후 13개월째의 체중은 전암컷 넙치가 338~381 g 보통 넙치가 259~294 g, 부화후 23개월째의 체중은 전암컷 넙치가 400~1300 g, 보통 넙치가 350~900 g으로 전암컷 넙치의 성장이 양호하였다.

본연구에서는 실험시작시('95년 10월)의 체중은 전암컷 넙치가 244.75 ± 2.04 g, 보통 넙치가 244.32 ± 2.34 g 였으며 실험후 3개월('96년 1월)의 평균 체중이 전암컷 넙치는 423.89 ± 2.06 g, 보통 넙치는 418.73 ± 1.90 g 으로 두집단간에 유의차가 없었으나 실험후 6개월째('96년 4월)부터 두집단간에 유의차가 나기 시작하였다($P < 0.05$). 이를 田畑(1992)의 결과와 비교하면 전암컷 넙치의 성장이 보통 넙치보다 빨라지는 시점이 다소 상이하였다.

田畑·五利(1988)은 자성발생성 2배체와 보통 넙치를 동일수조내에서 부화후 221일간 사육한 결과 보통 넙치의 성장이 양호하였으며($P < 0.01$) 그 이유로 자성발생성 2배체는 유전적으로 불안정하기 때문에 동일한 먹이와 공간의 경쟁에서 보통 넙치에 비하여 경쟁력이 약한 때문이라고 기술하였다. 따라서 금후 전암컷 넙치도 보통 넙치와 동일한 수조에서 서로 경쟁시키면서 성장을 검토해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

사료효율 및 일간증중율은 성장과 관련하여 먹이의 효율성 측면에서 대단히 중요하다. 일간증중율이 성장 초기 단계에 현저히 감소하는 현상은 어체가 성장할수록 성장속도가 감소함과 동시에 어체중에 대한 사료섭취율이 낮아지고 사료의 영양소 이용율도 감소함을 의미한다. 조피볼락(이 등, 1995) 및 차넬메기(Lovell, 1994)의 경우도 어체 크기가 커짐에 따라 먹이섭취율 및 일간증중율이 감소하는 경향을 보였으며 이는 대부분의 어류에 공통되는 현상이다. 일일 증중율이 초기 단계의 어느 시기까지 급격히 감소함을 볼 때, 넙치의 경우는 치어 단계(100 g)에서 성장이 가장 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있으므로 이 기간중의 사육관리가 치어기 이후의 양성에 대단히 중요한 것으로 생각된다. 본 실험은 실험 목적상 3개월 마다 성장 조사를 위한 실험어 전체의 마취

영향 및 실험적인 규모의 사육 시설에 의한 stress 때문으로 기존의 양식장에 비하여 전반적으로 성장이 느렸으나 실제 산업적인 규모로 직접 성장비교를 하면 본실험 보다 더 나은 성장을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

여 백

제 4 장 전암컷 녀치의 생식소 발달

제 1 절 서 론

어류에서 생식세포의 생성과정은 거의 유사하지만 이들 세포의 발달에 따른 형태학적 특징은 다소 다르다. 생식주기를 해명하기 위해서는 난형성 및 정자형성 과정이 우선 조사되어야 한다. 난형성 및 정자형성에 관한 연구로는 경골어류의 난모세포 성장에 관한 세포학적 연구(Selman and Wallac, 1989), 어류의 난자 형성의 세포 및 분자생물학(Gurays, 1986), 난의 성숙과 산란(廣瀨, 1982), 생식소의 성숙과정(高野, 1974), 난소의 구조와 배우자 성숙(高野, 1989a), 정소의 구조와 배우자 형성(高橋, 1989b) 등이 있다.

생식세포의 형성과 형태학적 연구는 주로 경골어류를 중심으로 이루어졌으며 주요 연구로는 금붕어(Gupta and Yamamoto, 1971; Yamamoto and Yamazaki, 1961), 송사리(Yamamoto and Yoshioka, 1964)에서 상세히 밝혀졌다. 해산어류에서는 쏨뱅이, 황점볼락에서 연구가 이루어졌으며, 가자미류에서는 문치가지미의 생식세포 형성과정 등의 연구가 있다.

본 연구에서는 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷으로부터 태어난 전암컷 녀치의 생식소 발달을 조사하기 위하여 난소와 정소의 크기 및 발달에 관한 조사를 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

공시어는 1995년도 울진수산종묘배양장에서 자성발생성 2배체 암컷과 성전

환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 부화한 전암컷 넙치를 이용하였다. 이때 대조군으로 보통 넙치를 이용하였다.

2. 사육방법

실험어의 관리는 유수식으로 하였고 실험어가 성장함에 따라 사육수조를 300 ℓ 에서 1톤 FRP 수조 및 2톤 FRP 수조로 옮겨 주었고, 먹이는 1일 2회(오전 10시와 오후 4시) 반복시까지 공급하였다. 생식소 발달 조사를 위한 시료는 성분화가 완료된 후 조직학적으로 암수가 뚜렷하게 구별되는 크기인 체중 70 g부터 최초로 성숙하여 완숙란을 가질 수 있는 크기인 체중 800 g 까지를 대상으로 하였다. 800 g 이후의 생식소 발달은 산란시기때 복부압박법에 의하여 난과 정자의 상태를 관찰하여 조사하였다.

3. 생식소 발달 상태 조사

사육중인 넙치를 채취하여 전장과 무게를 측정하고 복부를 해부한 후 생식소의 무게를 측정하고 파라핀으로 조직표본을 만들어 관찰하였다. 조직표본의 작성은 생식소를 Bouin's fluid로 고정시키고, paraffin으로 embedding하여 5 μ m 크기로 절단한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색을 하였다. 이때 암수의 판정 및 생식소 발달 상태는 현미경으로 검경하여 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

일반적으로 보통 넙치는 체중의 증가와 함께 생식소의 무게도 증가한다(Fig. 11). 그러나 전암컷 넙치는 초기에는 체중이 증가함에도 불구하고 생식소의 무게가 거의 증가하지 않았다(Fig. 12).

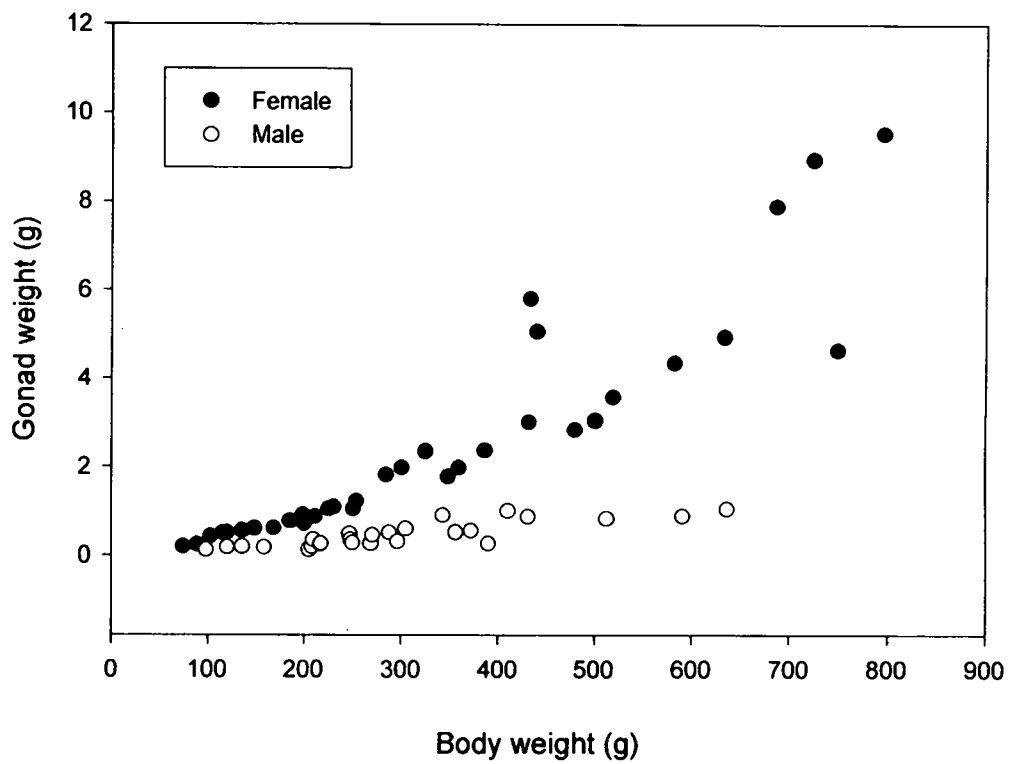


Fig. 11. Variation of gonad weight of normal olive flounder.

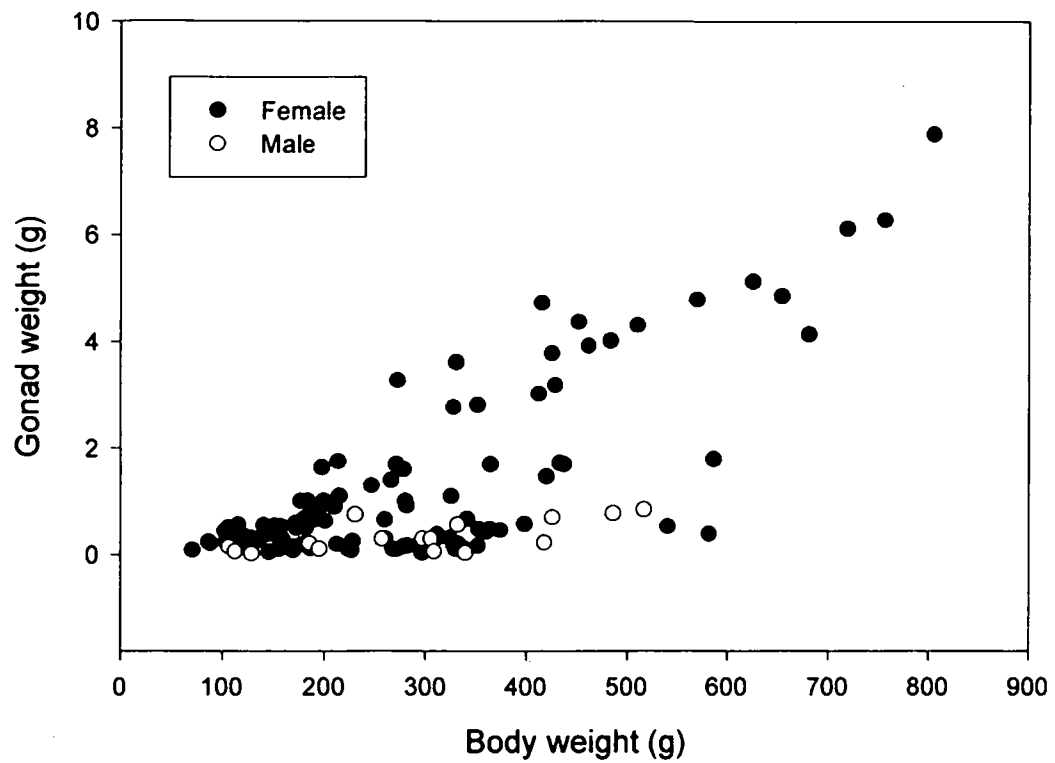


Fig. 12. Variation of gonad weight of all-female olive flounder.

1. 암컷의 생식소 발달

생식소 발달은 생식소의 크기로 보아 체중 70~200 g, 체중 200~800 g 및 체중 800 g 이상으로 구분이 가능하였다.

가. 체중 70~200 g의 전암컷 넙치

체중 70~200 g까지의 전암컷 넙치의 조사 마리수는 48마리로 모두 암컷이고 수컷은 없었다. 체중 70~200 g까지의 전암컷 넙치의 암컷 생식소 크기를 보면 평균체중이 145.2 g(범위 70.6~199.7 g)이며 생식소의 평균무게는 0.31 g(범위 0.09~1 g)였다. 보통 넙치의 암컷 생식소의 크기는 평균체중이 134.03 g(범위 74.3~199.1 g)이며 생식소의 평균무게는 0.54 g(범위 0.2~0.92 g)였다. 이들 두집단의 암컷 생식소 크기를 비교해 보면 전암컷 넙치가 보통 넙치의 57.4%였다. 특히 일부의 전암컷 넙치에서는 평균체중이 170 g(범위 150~190 g)임에도 불구하고 생식소의 평균무게는 0.12 g(범위 0.08~0.15 g)으로 보통 넙치의 22.2%에 불과하여 비정상적으로 생식소가 작았다(Fig. 13).

나. 체중 200~800 g 전암컷 넙치

체중 200~800 g까지의 전암컷 넙치의 조사 마리수는 66마리로 암컷은 58마리, 수컷은 8마리였다. 전암컷 넙치의 평균체중은 348.2 g(범위 200.9~718.9 g)이고 생식소의 평균무게는 1.39 g(범위 0.1~6.12 g)였다. 보통 넙치의 평균체중은 431.6 g(범위 200.8~795.9 g)이며 생식소의 평균무게는 3.41 g(범위 0.72~9.54 g)였다. 이들 두집단의 암컷 생식소 크기를 비교해 보면 전암컷 넙치가 보통 넙치의 40.8%였다. 체중 200~800 g의 전암컷 넙치는 생식소의 크기로 볼 때 2그룹으로 나눌 수 있었다. 첫번째 그룹은 보통 넙치와 같이 생식소가 정상적인 크기를 가지는 그룹이고, 두번째 그룹은 생식소의 크기가 비정상적으로 작은 그룹이었다(Fig. 14). 이렇게 생식소의 크기가 작은 그룹은 체중 70~200 g 전암컷 넙치 중에서 생식소의 크기가 극히 적은 군이 체중의 증가에도 불구하고

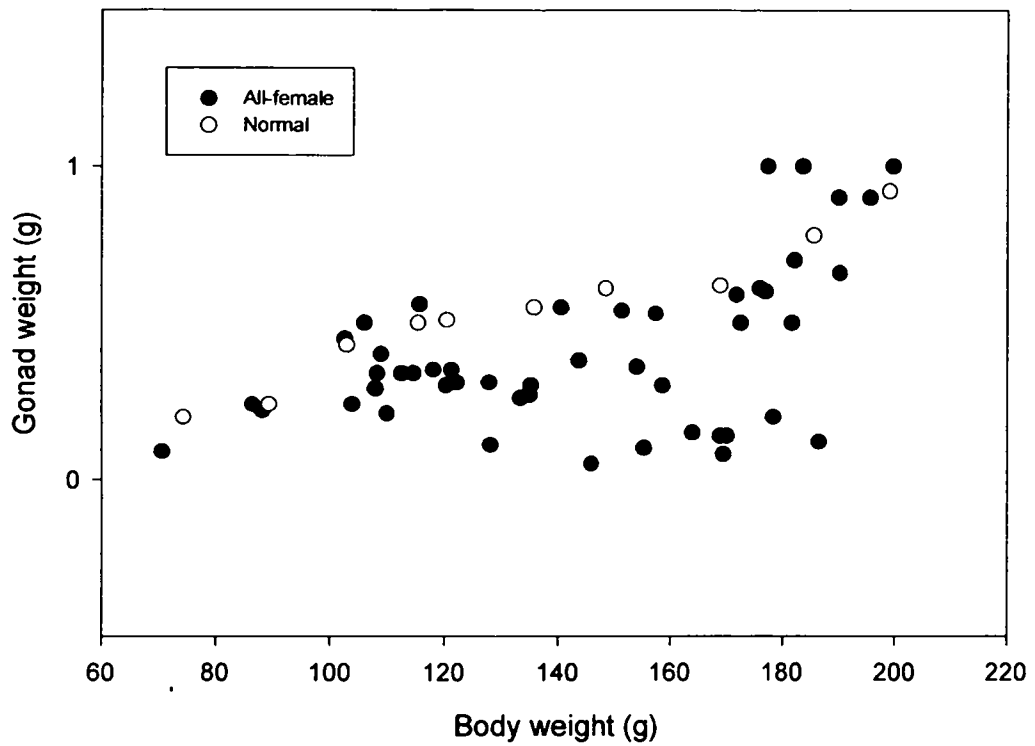


Fig. 13. Relationship between body weight (70-200 g) and gonad weight of all-female and normal olive flounder.

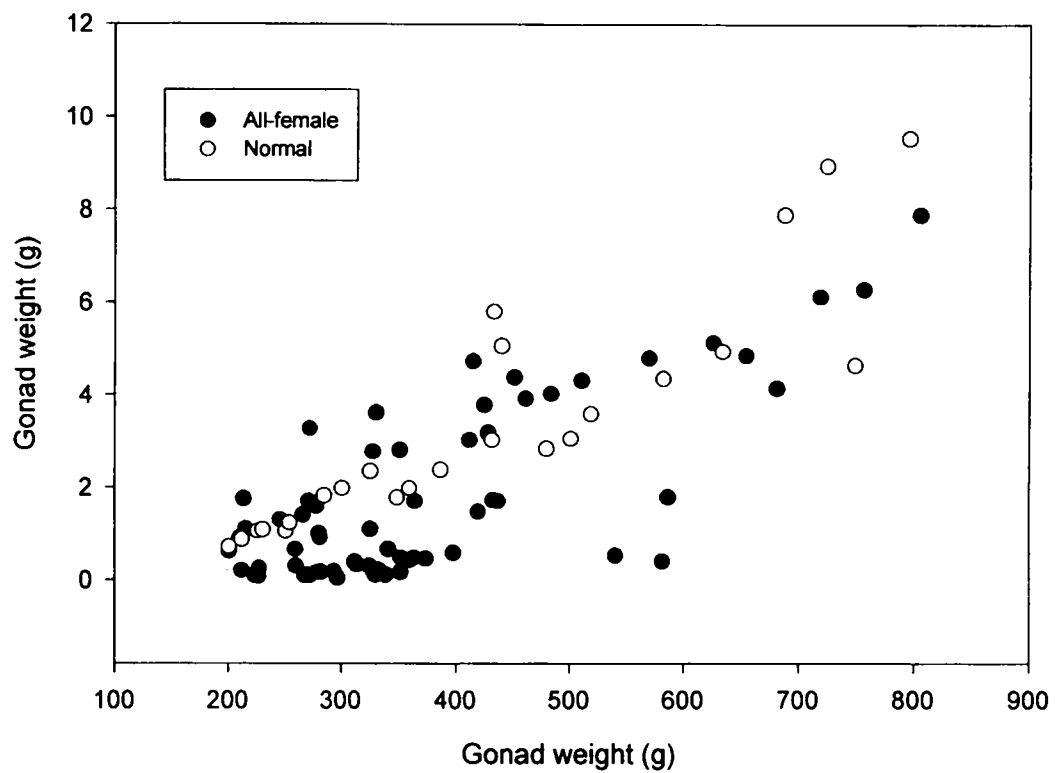


Fig. 14. Relationship between body weight (200-800 g) and gonad weight of all-female and normal olive flounder.

하고 생식소의 크기가 거의 성장이 되지 않은데 그 원인이 있는 것으로 판단되었다. 그러나 체중 400 g 이상에서는 일부의 개체를 제외한 대부분의 전암컷 녀치는 생식소의 크기가 보통 녀치와 유사하였다(Fig. 14, Table 7).

한편, 전암컷 녀치중 성장과 함께 생식소가 정상적으로 발달하지 못한 개체를 대상으로 조직학적으로 생식소를 관찰한 결과, 난소내에 부분적으로 난모세포가 발달할 뿐 보통 녀치처럼 정상적인 난모세포의 분열 증식은 볼 수 없었다(Plate 2).

Table 7. Gonad weight (mean±SD) of all-female and normal olive flounder

Body weight (g)	Gonad weight (g)	
	All-female	Normal
~ 100	0.18±0.08	0.22±0.03
100 ~ 200	0.45±0.31	0.62±0.16
200 ~ 300	0.75±0.79	1.12±0.35
300 ~ 400	0.88±1.05	2.09±0.26
400 ~ 500	3.19±1.89	4.18±1.48
500 ~ 600	2.36±2.08	3.66±0.65
600 ~ 800	5.73±1.33	7.19±2.28

다. 체중 800 g 이상의 전암컷 녀치

보통 녀치의 경우 산란기가 되면 체중 800 g 이상의 암컷은 대부분 생식소가 급격히 커지면서 복부를 압박하면 성숙난을 얻을 수 있었다. 본실험에서도 1996년도 산란기때 체중 800 g 이상의 보통 녀치는 대부분 완숙난을 가져 수정이 가능하였다. 전암컷 녀치는 체중 800 g 이상에서도 성장이 양호한 일부의

암컷만이 완숙란을 가지고 있었고 대부분의 암컷은 아직 미숙한 상태인 것으로 보아 최초로 산란이 가능한 시기는 두집단간에 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 이듬해인 1997년도의 산란기에는 전암컷 녀치도 자연산란이 이루어져 생식력에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 그러나 일부의 개체에서는 난소가 기형적으로 발달하여 산란기가 되어도 정상적인 배란을 하지 못하였다.

2. 수컷의 생식소 발달

동일한 체중에서 수컷의 생식소 크기는 일반적으로 암컷에 비하여 작을 뿐 아니라 생식소의 크기 증가도 둔하다. 본실험에서도 보통 녀치는 체중이 증가하면서 정소의 무게도 증가하지만 거의 변화 없이 평균 0.46 ± 0.29 g(범위 0.12 ~ 1.05 g)를 나타내었다. 전암컷 녀치도 체중의 증가와 함께 정소가 커지지만 크기는 0.34 ± 0.29 g(범위 0.11 ~ 0.85 g) 였다. 두실험간에 정소의 크기를 비교해 보면 암컷의 경우와 같이 체중 100~300 g에서는 보통 녀치에 비하여 생식소의 크기가 작지만 체중 400 g 이상부터는 보통 녀치의 정소와 같은 크기를 나타내었다(Fig. 15). 그러나 수컷의 생식소 무게는 산란기가 되면서 두실험군간에 차이가 없이 모두 성숙한 정자를 관찰할 수가 있었다.

한편, 전암컷 녀치 집단 중 나타난 수컷을 대상으로 조직학적으로 생식소를 관찰한 결과, 보통 녀치와 같이 분열중인 정자를 관찰할 수 있었다(Plate 3).

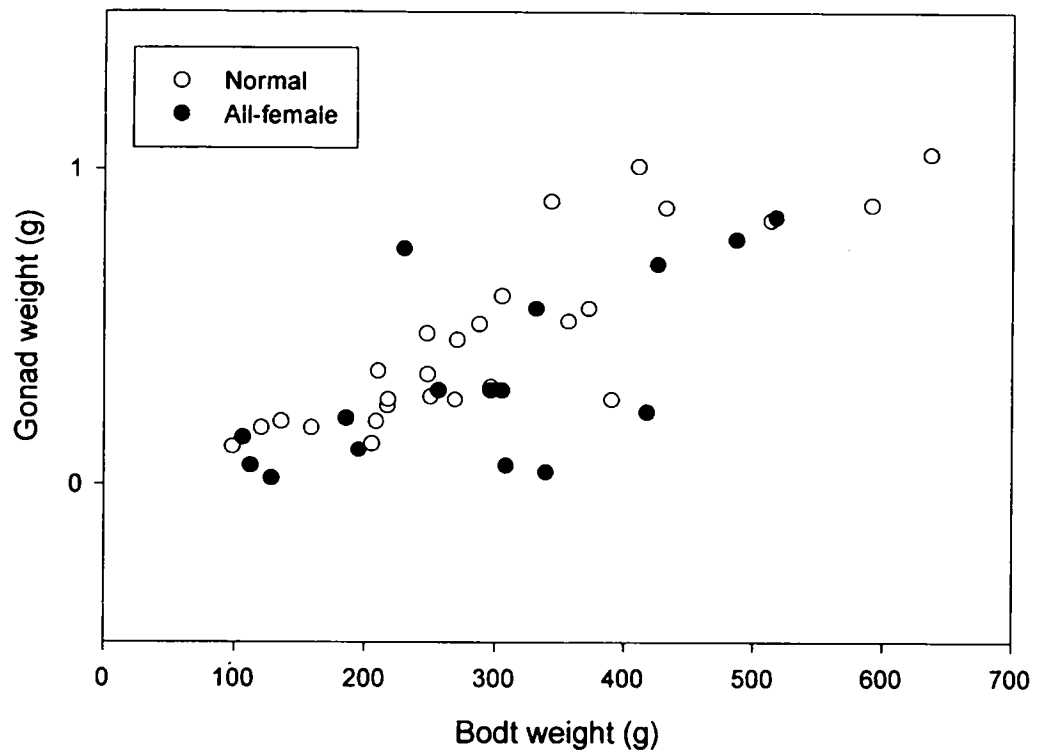


Fig. 15. Male gonad weight of all-female and normal olive flounder.

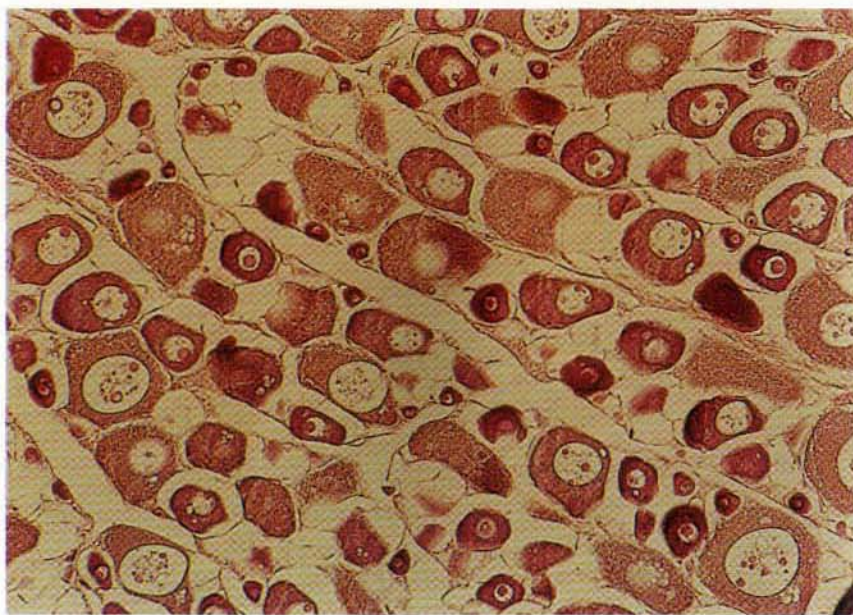
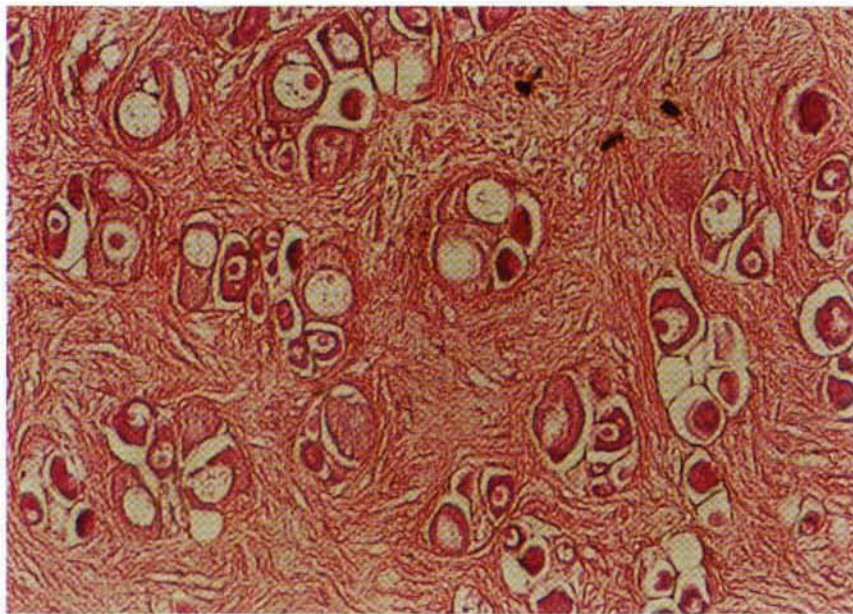


Plate 2. Transverse sections of ovary of all-female (upper) and normal olive flounder (below) at 300 days after hatching.

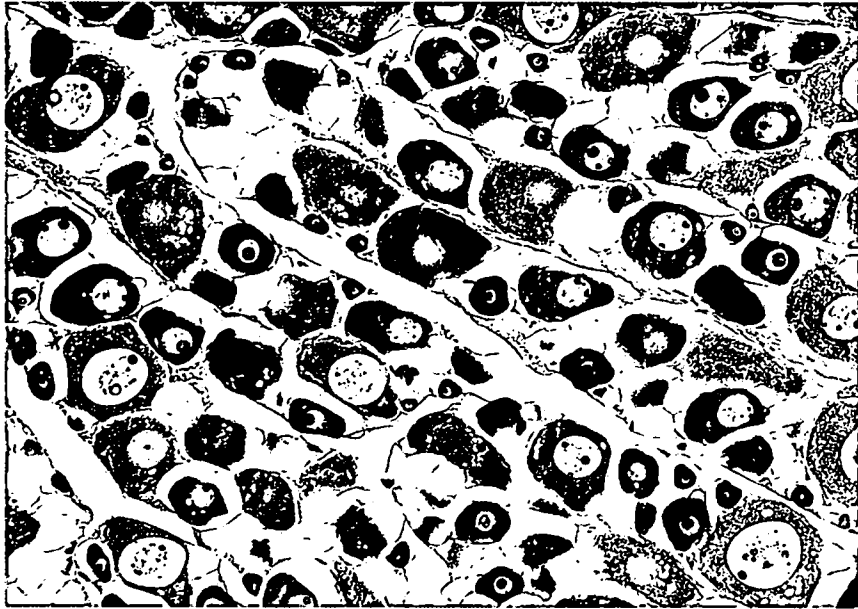
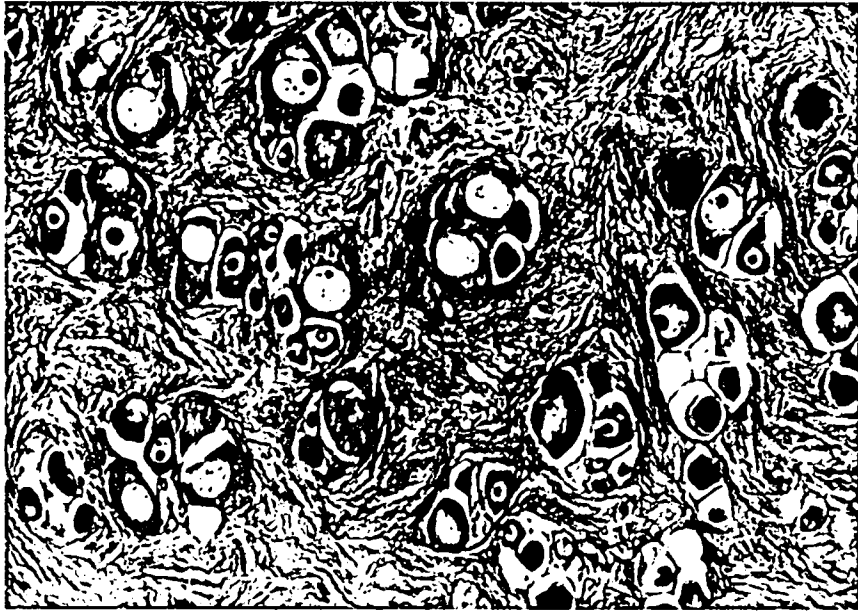


Plate 2. Transverse sections of ovary of all-female (upper) and normal olive flounder (below) at 300 days after hatching.

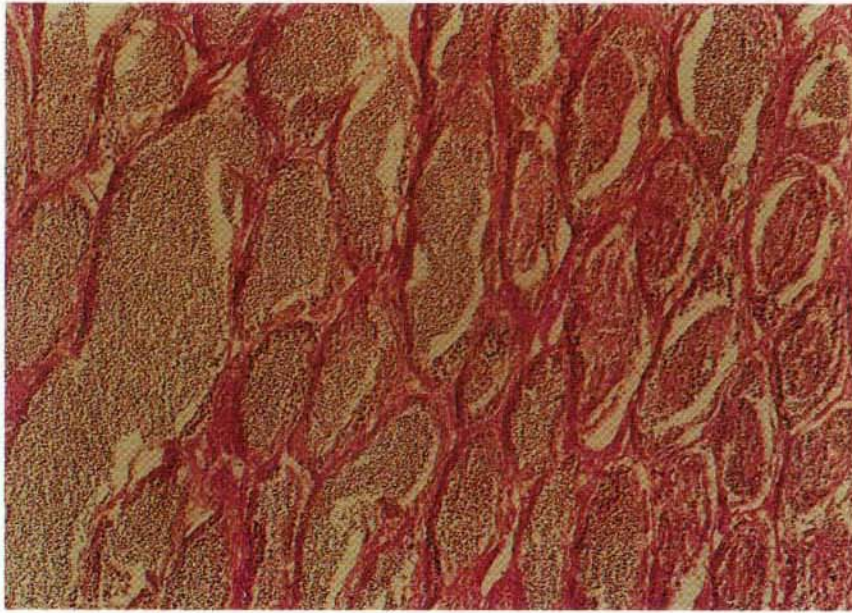
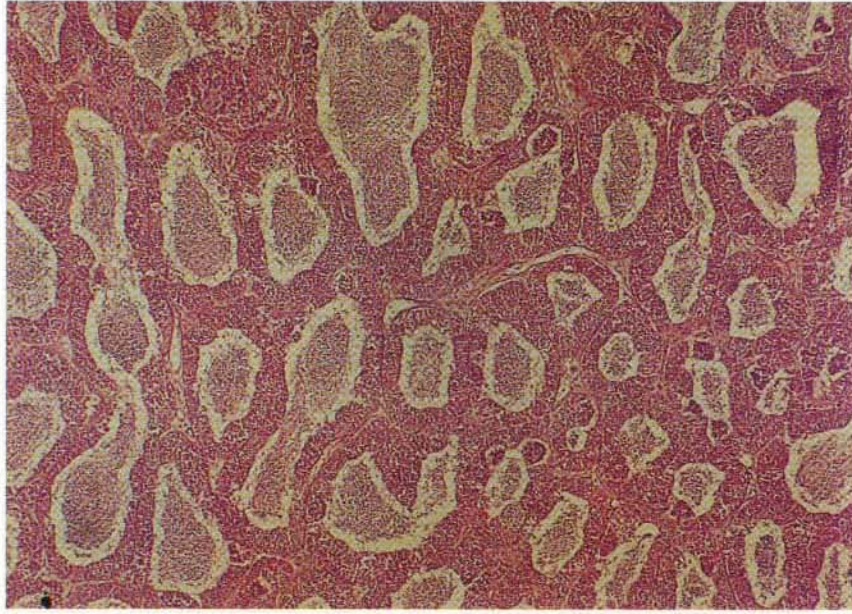


Plate 3. Transverse sections of testis of all-female (upper) and normal olive flounder (below) at 300 days after hatching.

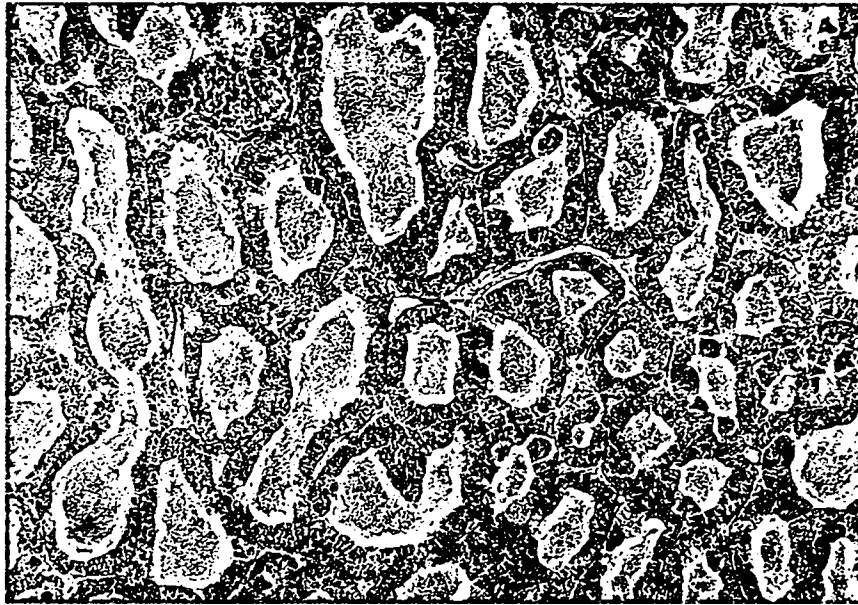


Plate 3. Transverse sections of testis of all-female (upper) and normal olive flounder (below) at 300 days after hatching.

제 5 장 전암컷 낚치의 유전학적 분석

제 1 절 서 론

1. Isozyme 분석

일반적으로 어류에 있어서 동일종의 지역집단간은 물론, 밀접한 관련성이 있는 종간에서 isozyme 동위효소에 의해 발현되는 유전자좌의 수는 동일하다고 보고되어져 있다(Kijima et al., 1986 ; Kijima et al., 1988 ; Park et al., 1990 ; Park and Kijima,1991; Park, 1992). 동일종 내의 변종이라 불리는 동포종 (sibling species)에 관한 연구는 담수에 서식하고 있는 새우류에서 많이 보고되어 있으나(Chow and Fujio, 1985, Ikeda et al., 1991, Fidhiyany et al., 1988) 어류에 대해서는 도다리, *Pleuronichthys cornutus* 2형에 관한 연구(Park et al., 1994)와 일본 및 중국산 농어의 형태 및 유전학적 차이에 관한 연구(Yokogawa and Seki, 1995) 등이 전부이다.

이에 본 연구는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 생산된 전암컷 낚치의 유전적 특성을 알기 위하여 isozyme 전기영동법을 이용하여 집단구조의 파악이 가능한가를 조사하고 보통 낚치와의 구별을 위한 유전적 marker를 확립하고자 실시하였다.

2. 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 분석

어류의 집단구조 및 유전적 특성을 파악하는 방법으로는 핵내 유전자와 핵외 유전자를 표식으로 하는 분석법이 있으나 이중 핵외 DNA를 표식으로 하는 미토콘드리아 DNA 분석법은 핵내 유전자 분석법에 의해 파악되지 않는 염기의

치환 및 교배에 의해 유전자가 혼합된 경우에도 가계판별이 가능하다는 등의 여러가지 이점에 의해 유전적 표식으로 기대를 받고 있다(Avise et al., 1986; 木島, 1991).

고등동물의 미토콘드리아 DNA는 핵내 DNA와는 달리 독립되어 있는 환상의 DNA로서 총염기대수가 16000~19000 bp 정도이며 핵내 DNA에 비해 극히 작아 취급이 간편하며 진화속도가 5~10배 정도 빠르다고 보고되어 있다(Brown et al., 1979; Ferris et al., 1983; Brown, 1983). 또한 개체내에 많은 복사가 존재하며 모계유전을 한다는 점에서 동일종의 지역집단간 및 종간의 유전적 분화를 집단유전학적, 진화학적 관점에서 연구하는 유전적 표식으로서 유효하다고 알려져 있어, 현재까지 다양한 어종에 대해 연구가 되었거나 진행되고 있는 상태이다(Berg and Ferris, 1984; Wilson et al., 1985; Avise et al., 1986; Billington and Herbert, 1988; Ohara and Mori, 1989; Bentzen et al., 1989; 林, 1990; 木島 등, 1990; Ovenden et al., 1993).

본 연구에서는 자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 2배체에 의하여 생산된 전암컷 넙치가 보통 넙치와 유전학적 차이가 있는지에 관한 지식을 얻기 위해 미토콘드리아 DNA를 분리하고 다양한 제한효소로서 절단한 절단단편의 길이 다형(RFLPs : Restriction Fragment Length Polymorphisms)을 비교 분석하였다.

3. 성장호르몬 및 열충격유전자 분석

Growth hormone (GH) (Niall et al., 1971)은 척추동물의 뇌하수체 전엽에서 분비되는 폴리펩타이드 단백질로서 성장, 단백질 합성, 지방 분해를 촉진하는 역할을 한다(Korner, 1965; Raben and Hollenberg, 1960). 특히 골격세포를 증식시켜 골격을 성장시키며, 이와 같은 GH에 의한 조직의 성장효과는 세포수가 증가함으로써 나타난다. 그러나 세포증식을 직접 촉진하는 것이 아니고 먼저

간에 작용하여 소마토스타틴(somatostatin) 이라고 하는 성장촉진인자의 생성을 유발시키고, 소마토스타틴이 세포에 직접 작용하여 세포증식을 촉진한다.

GH의 대사효과는 다양하다. 첫째로 단백질 합성을 촉진함으로써 성장을 도모한다. 둘째로 글리코겐 분해반응(glycogenesis)을 억제하고, 지방을 분해하여 에너지로 쓸 수 있도록 지방대사에 시동을 건다. 우선 GH의 영향을 받아 지방조직에서 분해된 지방산이 혈액 속으로 방출된다. 지방산은 간으로 운반되어 포도당으로 전환된 다음 다시 혈액 속으로 방출된다. 또한 GH는 근육속으로의 지방산의 투과를 촉진시키기 때문에 근육에서는 지방산을 계속 에너지원으로 이용하면서 글리코젠을 보존하도록 도와준다.

GH는 인슐린(insulin)과 상반된 기능을 가지고 있다. 인슐린의 분비가 혈당량의 상승에 의해 촉진되는 반면에 GH는 혈당량의 감소에 의해 촉진된다. 또한 포도당 대사에 대해서도 서로 상반된 효과를 나타낸다. 즉, GH는 지방산을 포도당으로 전환시킴으로써 혈당량을 증가시키는 물론 조직내로의 포도당의 흡수를 억제한다. 따라서 인슐린에 의해 일어나는 저혈당 효과에 대해 GH는 상반된 작용을 하여 전체적으로는 혈당량의 균형을 유지시킨다. GH의 농도가 혈액속에서 최고조를 이룰 때는 식사 후 3~5시간 후로서 에너지로 곧 풀어쓸 수 있는 포도당과 같은 물질이 혈액 속에서 부족되기 시작할 때이다. 중추신경계 이외의 조직에서의 GH는 해당과정을 억제하여 중추신경계가 포도당을 좀 더 효율적으로 사용하도록 보존한다.

어류의 GH는 다른 척추동물의 GH와 마찬가지로 뇌하수체에서 분비되어 개체의 성장을 촉진시키는 생리적 기능을 가진 단백질 호르몬이다. 1980년대 초반부터 쥐, 인간, 소, 돼지, 양과 같은 포유류의 GH 유전자가 분리되기 시작하였고, 최근에는 수산분야에서 GH의 산업적 유용성으로 인하여 연어(Sekine et al., 1985), 무지개송어(Agellon and Chen, 1986), 참치(Sato et al., 1988), 넙치(Momota et al., 1988a), 참돔(Momota et al., 1988b), 역돔(Rentier-Delrue et

al., 1989), 뱀장어(Saito et al., 1988)등 많은 어류에서 GH 유전자가 분리되었다.

생명체는 환경요인으로 부터 생명현상을 유지하고 생명의 연속성을 이루기 위하여 여러 단계에서 환경 요인에 대처하는 기작을 나타내고 있으며, 이중 온도 상승에 대해 heat shock protein (HSP)이라는 단백질을 만들어 온도상승에 의한 생물체의 손상을 막는다(Craig, 1985). HSP중에 모든 생물체에 conserved 하게 진화되어 온 HSP70은 온도 상승에 의한 단백질의 변성을 막아주어 생물체가 온도 내성을 가지게 하거나(Hahn and Li, 1990), 또한 단백질의 folding, assembly와 translocation에도 관여한다(Chirico et al., 1988 ; Beckman et al., 1990).

본 연구는 보통 넙치가 전암컷 넙치가 됨으로써 GH 유전자의 구조 및 발현에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 전암컷 넙치의 GH cDNA를 RT-PCR로 분리하여 염기서열을 보통 넙치의 GH와 비교 분석하였고, 또한 전암컷 넙치의 간세포를 분리하여 온도에 의한 HSP의 합성 변화도 조사하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. Isozyme 분석

본 연구의 시료인 전암컷 넙치는 1991년도에 생산한 자성발생성 2배체 암컷과 이를 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 생산된 것을 이용하였으며, 대조군은 기존 양식되고 있는 보통 넙치를 사용하였다.

Isozyme 분석을 위한 조직은 전암컷 넙치를 해부하여 간, 근육 및 눈을 적출하여 -80°C 에 냉동 보관한 후 분석시 해동하여 사용하였다. 전분 겔 전기영동에 의해 검출된 효소 및 조직은 Table 8에 나타내었으며 isozyme 효소의 염색은 Kijima et al. (1988), Park et al. (1990) 및 Shaklee and Keenan (1986)의 방

Table 8. List of examined enzymes, tissues and electrophoretic buffer

Enzyme (abbreviation)	Used tissue	Buffer*
Aspartate aminotransferase (AAT)	muscle, liver	T-C
Alcohol dehydrogenase (ADH)	liver	T-C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	liver	T-C
α -Glycerophosphate dehydrogenase (α GPD)	muscle	T-C
Glucophosphate isomerase (GPI)	muscle, liver	T-C
Isocitrate dehydrogenase (IDH)	liver	T-C
Leucine aminopeptidase (LAP)	muscle	T-C
Lactate dehydrogenase (LDH)	muscle, eye	T-C
Malate dehydrogenase (MDH)	muscle	T-C
Mannose-6-phosphate isomerase (MPI)	muscle, liver	T-C
6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD)	liver	T-C
Phosphoglucomutase (PGM)	muscle	T-C

*Tris-citrate (pH 7.0).

법을 병행하여 사용하였다. 한편, 유전자좌 및 대립유전자의 추정은 Shaklee et al. (1990)의 방법에 따랐다.

2. 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 분석

1) 재료

실험에 사용한 전암컷 넙치는 자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 2배체에 의하여 생산된 것을 사용하였으며 비교 분석용으로 양식하고 있는 보통 넙치를 사용하였다.

2) 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 분리

조직으로부터 미토콘드리아 DNA를 분리하는 과정을 Fig. 16에 나타내었다. 먼저 각 표본 개체로부터 간(liver) 또는 난(egg)의 조직을 채취한 뒤 혈액 및 불순물을 제거하기 위하여 0.25 M sucrose 용액으로 3회 이상 세정하고 30 ml의 0.25 M sucrose-TEK (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA·2Na, 1.5% KCl) 완충용액과 함께 ice-water에서 냉각하면서 세포를 마쇄하여 균질화시킨 뒤 원심분리하여 상층액만을 취하고 재원심분리를 행하여 미토콘드리아 분핵을 침전으로서 분리하였다.

미토콘드리아 분핵에서 DNA를 분리하기 위하여 원심분리하여 얻어진 침전물에 TEK 용액과 nonidet (P-40)을 첨가하여 최대 볼륨이 4.5 ml가 되게 한 뒤 0°C 에서 미토콘드리아 막을 용해시키고 계속해서 0.4 N NaOH를 첨가하여 용액을 alkaline화 시켰다. 이어서 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 용액을 첨가후 0°C에서 1시간 동안 정치하여 용액을 중성화시킨 뒤 3 M sodium acetate를 첨가하여 고분자의 단백질, RNA 및 nonidet (P-40) 복합체를 제거하기 위하여 원심분리하였다. 계속해서 상층액에 용해되어 있는 저분자 및 수용성 단백질을 제거하기 위하여 등량의 phenol-TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA·2Na, pH 8.0) 용액을 첨가하여 5분간 강력하게 혼합한 뒤 실온에서 원심분리 하였으며 이와같은 조작을 3회 반복하였다. 다음으로 잔유 phenol을 제거하기 위하여 등량의 chloroform을 첨가하여 원심분리하였으며 이 조작도 3회 반복하였다. chloroform 처리후 상층액을 micropipet으로 채취한 뒤 1/10량의 3 M sodium acetate 및 2배량의 냉각 ethanol을 넣어 5회정도 부드럽게 섞은 뒤 -20°C에서 overnight 시켰다. 이것을 원심분리하여 mtDNA 침전을 회수하고 95% ethanol로서 세정한 뒤 건조시켰다. 건조된 mtDNA에 TE 용액을 적당량 첨가하여 완전히 용해시킨 뒤 제한효소 처리용 sample로 사용했으며 실험전까지 4°C에서 보관하였다.

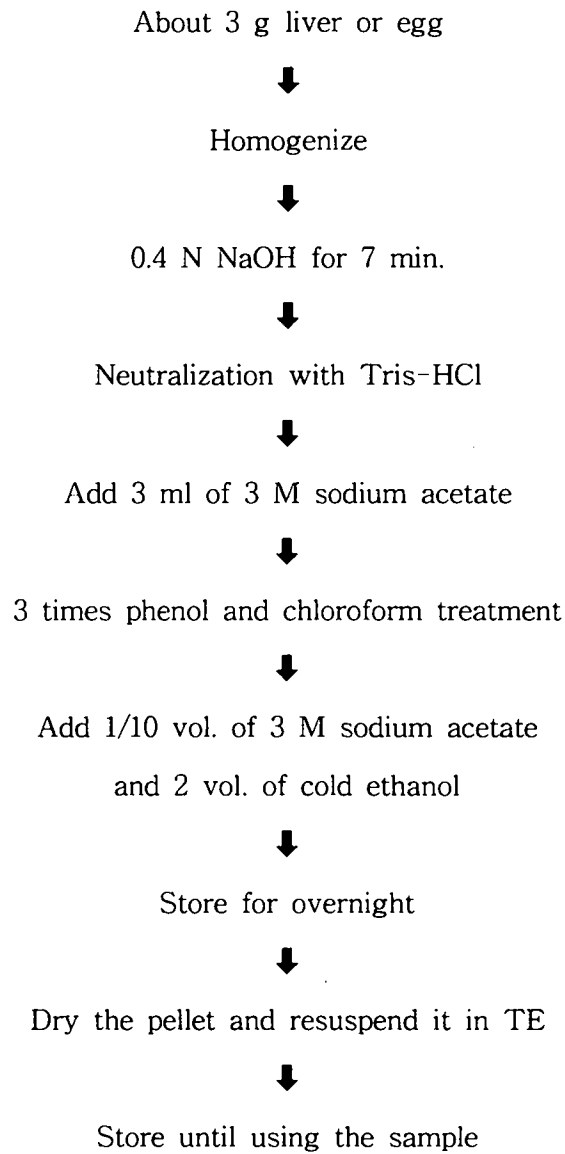


Fig. 16. Basic procedure of mitochondrial DNA isolation from all-female olive flounder.

3) 제한효소처리

본 연구에 사용된 10종의 제한효소 종류 및 그들의 인식 배열을 Table 9에 나타내었다. 전암컷 넙치의 조직으로부터 추출한 미토콘드리아 DNA를 제한 효소로서 절단시키기 위해 4°C에서 보존한 미토콘드리아 DNA sample 50 µl에 초순수 증류수 35 µl, 제한효소 반응 완충액 10 µl, RNase 4 µl 및 제한효소 1 µl를 혼합하여 waterbath에서 37°C로 7시간 반응시켰다. 반응 후 1/10 volume의 sodium acetate와 2 volume의 cold ethanol을 첨가하여 -20°C에서 overnight 시킨 후 원심분리하여 mtDNA 침전을 회수하고 95% ethanol로 세정한 뒤 건조시켰다. 계속해서 건조된 mtDNA 침전에 TE 15 µl와 40% sucrose-BPB (Bromophenol blue) 염색액 10 µl를 혼합하여 전기영동용 sample로 사용하였다.

Table 9. The restriction endonucleases surveyed and their recognition sequence

Endonucleases	Recognition sequence	Endonucleases	Recognition sequence
<i>Apa</i> I	GGGCC↓C	<i>Pst</i> I	CTGCA↓G
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC	<i>Pvu</i> II	CAG↓CTG
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC	<i>Sal</i> I	G↓TCGAC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	<i>Sma</i> I	CCC↓GGG
<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C	<i>Xba</i> I	T↓CTAGA

↓: Cleavage point.

4) Agarose gel 전기영동

0.7% agarose gel의 작성은 70 ml TBE (89 mM Tris, 89 mM Borate, 2.5

mM EDTA·2Na) 용액에 agarose를 첨가하여 가열용해시키고 1% Et-Br (Ethidium Bromide) 용액을 첨가하여 실온에서 고형화시켰다. 고형화된 gel의 comb에 준비된 전기영동용 sample을 주입하고 submarine type의 전기영동 장치(Takara HE-13) 에서 전기영동을 행하였다(80V, 4hr.). 전기영동 후 gel을 UV transilluminator 위에서 사진촬영을 행하였다.

5) 제한효소에 의한 mtDNA의 총 염기대수 추정

agarose gel 상에 나타난 전암컷 넙치의 mtDNA 절단 단편의 총 염기대수를 추정하기 위하여 절단단편의 염기 대수가 판명되어 있는 *Hind* III에 의해 소화된 λ DNA를 size marker로서 사용하여 각 제한효소로서 소화시킨 sample과 동일 gel 상에서 전기영동을 행하여 비교하였다. 비교 방법은 반대수 graph 용지에 *Hind* III에 의해 소화된 λ DNA의 소화단편을 원점으로 부터 측정한 이동거리와 이미 알려져 있는 절단단편의 크기를 plot하여 검량선을 작성하고 이를 기준으로 한 뒤 샘플의 절단단편의 이동거리를 검량선에 일치시켜 염기대수를 추정하였다.

3. 성장호르몬 및 열충격유전자 분석

1) 재료

실험에 사용한 전암컷 넙치는 자성발생성 2배체와 성전환된 자성발생성 2배체에 의하여 생산된 것을 사용하였으며 비교 분석용으로 양식하고 있는 보통 넙치를 사용하였다.

2) 전암컷 넙치로부터 total RNA 분리

전암컷 넙치의 뇌하수체로부터 total RNA를 분리하기 위하여 TRI ZOL reagent (GIBCO BRL)을 사용하였다. 분리된 뇌하수체를 1ml의 TRI ZOL reagent내에서 homogenization을 한 후 상온에서 5분간 방치한다. 그 다음 0.2

ml의 chloroform을 첨가하고 15초간 흔들어 준 후 상온에서 2~3분 방치한다. 4 °C, 15000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층을 새 tube에 옮기고 여기에 0.5 ml isopropyl alcohol을 첨가한다. 그 다음 10분간 상온에서 방치하고 4 °C, 15000 rpm에서 원심분리하면 tube 바닥에 침전물이 생기는데 이 침전물이 total RNA이다. Total RNA 침전물을 75% ethanol로 간단하게 씻어주고 상온에서 5~10분간 말려준 후 적정량의 2차 증류수로 total RNA를 녹인다.

3) First strand cDNA 합성

전암컷 넙치 total RNA 1 μg 과 GSP 1 2.5pmoles를 DEPC-D.W로 총 15.5 μl 로 섞은 다음 70°C, 10분 후 ice에서 1분간 식혀준다. 2.5 μl 의 10×PCR buffer, 2.5 μl 의 25 mM MgCl₂, 2.5 μl 의 10 mM dNTP mix, 2.5 μl 의 0.1M DTT, 1 μl 의 SuperScript II RT (reverse transcriptase)를 RNA sample에 첨가한 다음 42°C, 50분간 반응시키고, 70°C, 15분간 방치함으로써 반응을 끝낸다. 그 다음 1 μl 의 RNase mix를 첨가한 후 37°C, 30분간 반응시키고 간단히 원심분리 후 -20°C에 보관한다.

4) 전암컷 넙치 growth hormone cDNA의 분리

Full-length growth hormone cDNA를 분리하기 위하여 전암컷 넙치의 growth hormone 유전자(The Journal of Biological Chemistry 264, 312-316)의 5'과 3' 말단 염기서열을 기초로 primer fGH1 (5'-ACACTGAAGAACTGAA-CC-3'), fGH2 (5'-ATGAACAGAGTCATCCTC-3')와 fGH3 (5'-GACTGAA-TGAAATCTTTATTTGC-3')를 제작하였다. 넙치 mRNA를 cDNA로 역전사한 다음 전암컷 넙치의 full-length growth hormone cDNA를 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 순서로 30 cycle의 PCR 반응을 수행한다. 증폭된 DNA 단편은 gel로부터 분리하여 T-vector에 cloning 한다.

5) DNA 염기서열 결정과 분석

DNA sequencing은 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit (ABI)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination method로 수행한다. DNA sequence analysis는 DNASIS program (Hitachi)을 이용하였다.

6) 전암컷 넙치에서 간세포 분리

간세포를 two-step hepatic perfusion 방법을 변형하여 분리하였다. 전암컷 넙치를 0.01% p-aminobenzoate로 마취한 후, 간을 분리하여 Ca^{2+} -free buffer solution (110 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM, 25 mM $NaHCO_3$, 0.5 mM EDTA, 5 mM D-glucose, and 0.2 mg/ml heparin)에 10분간 담근 후 Ca^{2+} -collagenase buffer (110 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM, 25 mM $NaHCO_3$, 2.5 mM $CaCl_2$, 5 mM D-glucose, and 0.05 - 0.1% collagenase)에 옮긴다. 간을 편셋으로 잘게 분리한 후 collagenase perfusion buffer에서 천천히 shaking하면서 15분간 3번 반복으로 분해한다. 분해된 간조직을 500 rpm에서 4분간 원심분리하고 침전물을 Leibovitz's L-15 medium로 다시 용해한다. 간세포 Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin 에서 용해하여 $20 \pm 0.1^\circ C$ 에서 배양하였다.

7) 열충격, metabolic labeling 및 sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

$20^\circ C$ 에서 배양하고 있는 간세포를 $23^\circ C$, $25^\circ C$, $27^\circ C$, $30^\circ C$, $32^\circ C$, $35^\circ C$ 에서 2시간동안 heat shock을 주면서 [^{35}S]-methionine ($62 \mu Ci/ml$) 으로 labeling한 후, phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척하고 $2 \times$ Laemmli sample buffer (LSB)에서 용해하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하기 위해 단백질을 $100^\circ C$ 에서 3분간 boiling 하였다. SDS-PAGE는 Laemmli (1970) 방법에 따라 12.5% polyacrylamide gel에서 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Isozyme 분석

1) Isozyme 효소의 유전자좌

실험에 사용된 전암컷 넙치 및 보통 넙치에서 조사한 22종의 효소중 12개의 효소에서 유전자좌가 공통적으로 검출되었다. 12개의 효소중 1개의 zone으로 나타나 1개의 유전자좌로 추정된 효소는 6개(ACP, ADH, α GPD, IDH, 6PGD, PGM)였다. 2개의 zone으로 나타나 2개의 유전자좌로 추정된 효소는 AAT, MPI등 2개의 효소였으며, 3개의 zone으로 3개의 유전자좌로 추정된 효소는 LDH와 GPI였다. 4개의 zone으로 4개의 유전자좌로 추정된 효소는 CK, MDH였다. 이중에서 CK, IDH, LDH 및 6PGD의 4종류 효소에서 변이가 관찰되었으나 두집단간에 뚜렷한 차이를 나타내는 유전자좌는 없었다.

전암컷 넙치와 보통 넙치를 구별하는 유전적 marker로서는 간의 IDH 효소가 가장 적절 하였으며 이효소의 유전자 빈도를 이용하여 t-검정을 실시한 결과 95%의 유의 수준에서 유의차가 인정되었다.

2) 유전적 차이

전암컷 넙치 및 보통 넙치에서 나타난 대립유전자의 빈도를 Table 10에 나타내었다. 조사된 24개의 유전자좌 중 2개이상의 대립유전자를 가진 유전자좌가 전암컷 넙치에서는 3개, 보통 넙치에서는 2개가 관찰되어 두집단이 거의 유사한 수를 나타내었다. 한편 24개의 유전자좌 중 두집단에 있어서 주 대립유전자의 위치가 다른 분기 유전자좌(divergent loci) 및 완전 분기 유전자좌(complete divergent loci)는 없었다.

Table 10. Allele frequencies of all-female and normal olive flounder

Enzyme	Locus	Allele	All-female	Normal
CK	<i>CK-1</i>	A	1.000	1.000
		2	1.000	1.000
		3	0.042	1.000
		4	0.958	0
LDH	<i>LDH-1</i>	A	1.000	1.000
		2	1.000	0.931
		3	0	0.069
GPI	<i>GPI-1</i>	A	1.000	1.000
		2	1.000	1.000
		3	1.000	1.000
AAT	<i>AAT-1</i>	A	1.000	1.000
		2	1.000	1.000
IHD	<i>IDH</i>	A	0.264	0.792
		B	0.736	0.208
MPI	<i>MPI-1</i>	A	1.000	1.000
		2	0	0
PGM	<i>PGM</i>	A	1.000	1.000
MDH	<i>MDH-1</i>	A	1.000	1.000
		2	1.000	1.000
		3	1.000	1.000
		4	1.000	1.000
ADH	<i>ADH</i>	A	1.000	1.000
6PGD	<i>6PGD</i>	A	1.000	1.000
		A	1.000	1.000
ACP	<i>ACP</i>	A	0.986	1.000
aGPD	<i>aGPD</i>	B	0.014	0
Average	He		0.021	0.019

전암컷 넙치와 보통 넙치에서 나타난 유전적 변이는 Table 11과 같다. 두 집단에서 변이 유전자(P ;주대립유전자의 빈도가 0.95 이상)의 비율은 전암컷 넙치가 0.042, 보통 넙치가 0.038로 전암컷 넙치가 높았으며, 다형변이 유전자좌(P* ; 주대립유전자의 유전자 빈도가 0.95 이하)는 각각 0.083과 0.083으로 두 집단이 같았다. 또한 이들 2형의 변이 유전자좌를 합친 총유전적 변이(P+P*)는 전암컷 넙치가 0.125, 보통 넙치가 0.121로 나타나 전체적인 변이 보유량은 전암컷 넙치가 높았다. 한편 유전자 빈도로부터 구한 평균 이형접합체율(average heterozygosity)의 기대치는 전암컷이 0.021, 보통이 0.019로 두 집단간의 변이성은 유사하였다.

Table 11. Genetic variability in all-female and normal olive flounder

	All-female	Normal
P ^a	0.042	0.038
P ^b	0.083	0.083
P+P ^c	0.125	0.121
He ^d	0.021	0.019
A/L ^e	1.5	1.5

^a; Proportion of variant loci.

^b; Proportion of polymorphic loci.

^c; Proportion of variant loci including polymorphic loci.

^d; Average heterozygosity.

^e; Average number of alleles per locus.

일반적으로 어류에 있어서 동일종의 지역집단간은 물론, 밀접한 관련성이 있는 종간에서도 isozyme 동위효소에 의해 발현되는 유전자좌의 수는 동일하다

고 보고되어져 있다(Kijima et al., 1986 ; Kijima et al., 1988 ; Park et al., 1990 ; Park and Kijima, 1991; Park, 1992).

종이나 집단 유전적 변이성 및 분화를 연구하기 위한 방법의 하나로서 isozyme 효소 전기영동법이 가장 많이 이용되고 있으며, isozyme 전기영동법에 의해 측정되는 유전적 변이성 및 유전적 분화의 정도는 평균 이형접합체율과 Nei의 유전적 거리(D; genetic distance)가 이용되고 있다. 집단유전학에서 유전적 거리의 개념은 종간 및 종내에 있어서 그들의 생태적 환경, 번식조건 및 인위적 조절에 의한 양식화 등에 의해 크게 좌우되는 경우가 있다(Park et al., 1990; Park and Kijima, 1991). Nei (1975)는 많은 동물종의 유전적 거리를 조사하여 종간에는 1.0, 아종간에는 0.1, 종내의 지방 품종간에는 0.01이라는 평균값을 보고하였다. 해산어류에 관해서는 Fujio (1984)가 10목 103종의 어류로부터 조사한 결과 동속 이종간에서는 평균 0.388임을 보고하였다.

종의 분화는 그들이 가지고 있는 분기유전자좌의 존재여부로서 보다 명확하게 구분할 수 있다고 보고되어 있으며(Fujio, 1984; Fidhiany et al., 1988; Park et al., 1990; Park and Kijima, 1991; Ikeda et al., 1991; Park, 1992), 특히 Park (1992)은 isozyme 유전자좌에 의한 유전적 거리와 분기유전자좌의 비율을 2대립 유전자 모델을 이용하여 구한 결과, 종의 유전적 분화의 경우 종내는 유전자 빈도의 차에 의해서, 종간은 분기유전자좌의 존재에 의해 특징지어 진다고 보고하였다.

본 연구에서는 24개의 유전자좌 중 두집단에 있어서 주 대립유전자의 위치가 다른 분기 유전자좌(divergent loci) 및 완전 분기 유전자좌(complete divergent loci)는 없었으며 총 유전적 변이보유량은 전암컷 낚치가 약간 높았다. 유전자 빈도로부터 구한 평균 이형접합체율(average heterozygosity)의 기대치는 전암컷이 0.021, 보통이 0.019로 평균 이형접합체율의 기대치에 차이가 없어 두집단간은 유전적으로 집단구조가 같은 것으로 추측되었다.

2. 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 분석

해산어류의 미토콘드리아 DNA 분리의 경우 담수어류에서 개발된 Alkaline 처리법(木島 등, 1990; 木島, 1991) 을 적용할 수 있는지를 검토하기 위하여 homogenize용 완충용액의 적정염분 농도 및 egg 와 liver의 조직상태에 의한 mtDNA 회수량과 정제도를 비교하였다. 그 결과 해산어류의 mtDNA 분리는 egg와 liver 모두 신선한 조직보다는 동결한 조직에서 출현 band의 판정이 용이했으며 동결조직에서도 egg 쪽이 liver보다 회수량이 많아 band의 판정이 쉬웠다(Table 12). 또한 homogenize용 완충 용액중의 염분 농도는 실험구에 관계없이 담수어에서 개발된 농도로 충분함을 알 수 있었다. 한편, 조직의 상태에 따른 미토콘드리아 DNA 회수량은 木島(1991)의 연구에서 보고된 내용과는 달리 냉동한 조직이 신선한 조직보다 DNA 검출이 용이하다는 결과를 나타낸 것은 다량으로 함유되어 있는 지방성분이 DNA 추출에 장애요인으로 작용한 것으로 추정되었다. 따라서, 넙치류의 경우 미토콘드리아 DNA를 추출하고자 할 때에는 반드시 사용하고자 하는 조직을 급속 냉동시켜 지방성분을 변성, 제거시켜주어야 할 것이라고 판단되었다. 전암컷 넙치에 있어서 총 10종의 6염기 인식 제한효소를 사용하여 절단된 미토콘드리아 DNA 단편을 조사한 결과, *BamH* I, *Eco* RI, *Pst* I, *Sma* I, *Xba* I, *Kpn* I 의 6 제한효소에서는 1개의 band만이 출현하여 제한부위의 유무는 인정되지 않았다. 한편 나머지 4 제한효소 (*Apa* I, *Hind* III, *Sal* I, *Pvu* II)에서는 적어도 2개 이상의 복수밴드를 나타내었으며 이들의 전기영동 band pattern은 Fig. 17에 나타내었다. 전암컷 넙치의 mtDNA 절단 단편수를 2개 이상의 복수 band로 나타난 제한효소로서 band pattern을 살펴보면 제한효소 *Apa* I 에서는 A type이 6개, B type 이 7개의 band를, *Hind* III 에서는 A type이 6개, B type이 5개의 band를, *Pvu* II에서는 A type이 4개, B type이 5개, C, D type이 3개의 band를, *Sal* I에서는 A type이 4개, B type이 3개의 band를 나타내었으며 이들 4종류의 제한효소에서는 다양

한 변이가 관찰되어 보통 넙치와 비교한 결과 동일한 band pattern을 나타내었다(Table 13).

Table 12. The comparison of NaCl concentration and tissue states on the mitochondrial DNA isolation of all-female olive flounder

NaCl conc.	Egg		Liver	
	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	Detection	Detection	Detection	Detection
0 M	-	++	-	+
0.1M	-	++	-	+
0.2M	-	++	-	+
0.3M	-	++	-	+
0.4M	-	++	-	+
0.5M	-	++	-	+

++ Clearly detected.

+ Detectable but weak.

- Undetectable.

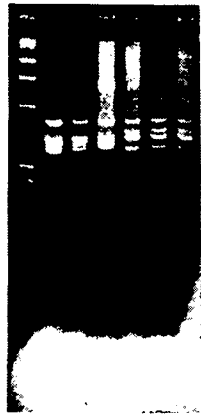
이러한 결과는 본 연구에서 사용한 전암컷 넙치의 개체수가 적어서 인지 혹은 실질적으로 인위조작에 의해 생산된 전암컷 넙치가 단순한 성의 전환만을 나타내고 유전자에는 영향을 미치지 않기 때문인지는 명확히 추정할 수가 없었다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 차후 다량의 샘플을 조사하거나 특정 영역의 증폭에 의한 염기서열 분석 등의 지속적인 연구가 필요할 것으로 추정된다.

조사한 10종의 제한효소 중에서 2개 이상의 band pattern을 나타낸 4종의 제한효소의 절단단편으로 추정된 전암컷 넙치의 mtDNA 총 염기대수는 17.20

kbp로 나타났다(Table 13). 본연구에서 조사된 전암컷 넙치의 총 염기대수를 다른 어종과 비교해 보면 *Galaxias truttaceus*가 16.23 kbp (Ovenden and White, 1990), *Coregonus artedii*가 16.95 kbp (Bernatchez and Dodson, 1990), *Oncorhynchus mykiss*가 16.5 kbp (Thomas et al., 1986), *Salmo gairdneri*가 15.56 kbp (Palva and Palva, 1987), *Clupea harengus*가 16.73 kbp (Schweigert and Withler, 1990), *Gradus morhua*가 16.5 kbp (Johansen et al., 1990) 등으로 대부분의 어종과 동일한 크기를 나타내었다

전암컷 넙치의 mtDNA에서 2개 이상의 복수 band를 나타낸 전 제한효소로부터 염기대수를 추정하고 이들을 평균으로 나타낸 것은 각 효소에 의해 나타난 염기대수의 오차를 최소화하는데 목적이 있었다. 이러한 사실을 고려해 볼 때 가능한 많은 제한효소 및 보다 많은 절단단편을 나타내는 4염기 인식 제한효소를 실험에 사용하는 것이 정확한 총 염기대수를 추정하는데 보다 효과적이라 판단된다.

이상의 결과를 종합해서 전암컷 넙치의 유전적 특징에 대하여 살펴보면 전암컷 넙치는 유전적으로 보통 넙치와 차이가 없는 것으로 추정된다. 따라서 전암컷 넙치의 생산에 있어서 친어의 선택이 우량종묘의 생산에 있어서 중요한 요소로서 작용할 가능성이 있으며 또한 우수한 유전형질을 지속적으로 보유하기 위해서는 번식에 관여하는 친어의 수 및 집단 선택등도 중요시 되어야 할 것으로 판단되어 진다.



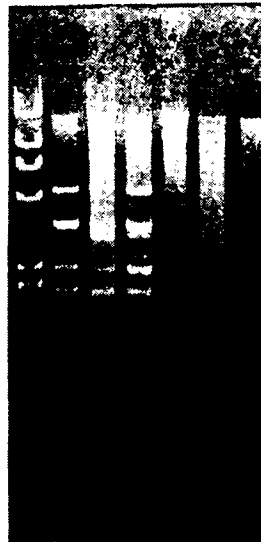
Hind III



Pvu II



Sal I



Apa I

Fig. 17. Cleavage patterns of mitochondrial DNA digested by restriction endonucleases in all-female olive flounder.

Table 13. Estimated size (in kilobase) of cleaved fragments and restriction enzyme fragment patterns of mitochondrial DNA in all-female olive flounder. For each endonuclease, the patten "A" represents the most common one observed

<i>Apa</i> I		<i>Bam</i> H I	<i>Eco</i> R I	<i>Hind</i> III		<i>Kpn</i> I
A	B	A	A	A	B	A
8.10	6.55	17.20	17.20	4.06	6.00	17.20
3.14	3.14			3.36	4.06	
2.57	2.57			3.15	3.36	
1.76	1.76			3.00	3.15	
1.25	1.55			2.90	0.63	
0.58	1.25			0.63		
	0.58					
17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20

<i>Pvu</i> II				<i>Pst</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Xba</i> I	
A	B	C	D	A	A	A	B	A
13.10	13.10	15.10	13.30	17.20	17.20	8.76	8.76	17.20
2.00	1.18	1.18	2.10			3.86	5.62	
1.18	1.03	0.92	1.80			2.82	2.82	
0.92	0.97					1.76		
	0.92							
17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20	17.20

3. 성장호르몬 및 열충격 유전자 분석

1) 전암컷 넙치 growth hormone cDNA의 RT-PCR

Full-length growth hormone cDNA를 분리하기 위하여 전암컷 넙치의 growth hormone 유전자의 5'과 3' 말단 염기서열을 기초로 제작한 primer fGH1 (5'-ACACTGAAGAAGACTGAACC-3'), fGH2 (5'-ATGAACAGAGTC-ATCCTC-3')와 fGH3 (5'-GACTGAATGAAATCTTTATTTGC-3')를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 18에서 보는 바와 같이 약 0.8 kb와 0.9 kb의 PCR product를 각각 얻을 수 있었는데, 이는 보통 넙치 growth hormone cDNA와 동일한 크기임을 알 수 있었다.

2) 전암컷넙치 growth hormone cDNA의 분리

RT-PCR로 얻어진 PCR product중 fGH과 fGH3를 이용하여 얻어진 PCR product를 agarose gel로부터 분리하여 T-vector에 cloning (Fig. 19) 하고 DNA sequencing 하였다. 그 결과 전암컷 넙치 growth hormone 유전자의 염기서열은 Fig. 20과 같이 보통 넙치 growth hormone 유전자의 염기서열과 100% 동일한 것으로 나타났는데, 이것은 양식넙치를 인공적으로 전암컷화 시킴으로써 성장 촉진을 유도하더라도 성장호르몬 유전자에는 전혀 영향을 미치지 않음을 의미한다.

3) 전암컷 넙치의 heat shock에 의한 heat shock protein 발현 조사

전암컷 넙치의 간에서 간세포를 분리하여 배양한 후 여러온도 (20, 23, 25, 27, 30, 32, 35℃)에서 heat shock을 준 다음 [³⁵S]-methionine으로 labeling하여 새로 합성되는 단백질을 SDS-전기영동으로 단백질 발현 pattern을 조사하였다. 온도가 증가함에 따라 heat shock protein 90, 70, 40 (HSP90, HSP70, HSP40)의 합성이 증가하였고, 이중 HSP70의 합성이 가장 뚜렷하였다. 이것은 다른 종의 heat shock protein 70 발현과 거의 유사한 것으로 보아 이 단백질(HSP70)은 종간에 잘 보존되어 진화하였음을 암시한다(Fig. 21).

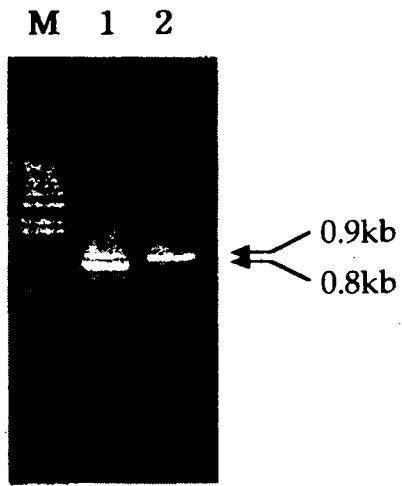


Fig. 18. RT-PCR of cDNA growth hormone from all-female olive flounder.

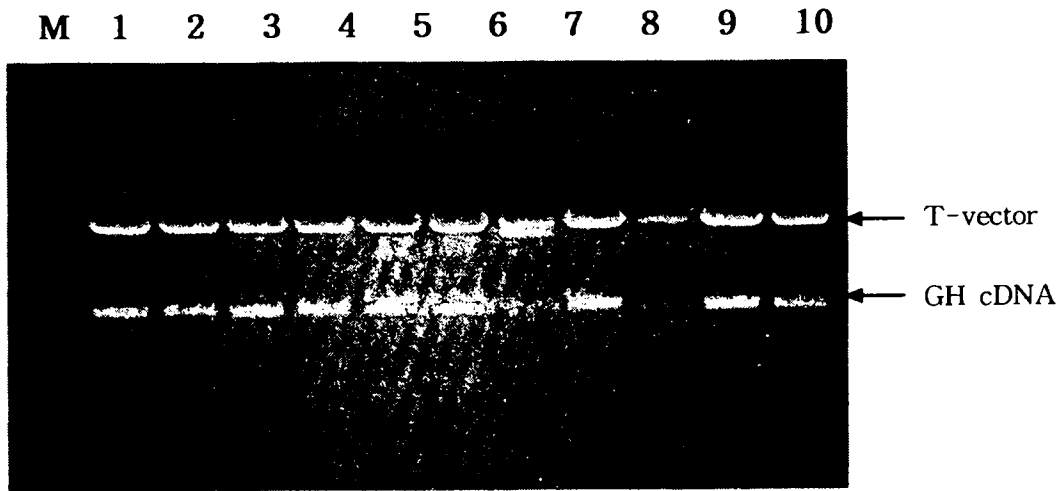


Fig. 19. Cloning of cDNA growth hormone from all-female olive flounder.

5' ¹ACACTGAAGAAGCTGAACCCAGTACCTGAACCTGAACCTGAACCCAGAATCTGAACCTGAACCCAGAACCTGAAC

72
CAGAACCAGCC ATG AAC AGA CTC ATC CTC CTG CTG TCA GTC ATG TGT GTG GGC GTG TCC TCT
Met Asn Arg Val Ile Leu Leu Leu Ser Val Met Cys Val Gly Val Ser Ser
(-17) -1

134
CAG CCA ATC ACA GAG AAC CAG CGC CTG TTC ATC GCT GTT GGT GGA GTT CAG TAT CTT
Gln Pro Ile Thr Glu Asn Gln Arg Leu Phe Ser Ile Ala Val Gly Arg Val Ser Leu
1 (-1) (1) 20

194
CAC CTG GTT GCT AAG AAA CTC TTC AGT GAC TTT GAG AAC TCA CTA CAG TTG GAG GAT CAA
His Leu Val Ala Lys Lys Leu Phe Ser Asp Phe Glu Asn Ser Leu Gln Leu Glu Asp Gln
40

254
CGT CTT CTC AAC AAA ATC GCT TCA AAA GAA TTT TGT CAT TCA GAT AAT TTC TTG AGT CCG
Arg Leu Leu Asn Lys Ile Ala Ser Lys Glu Phe Cys His Ser Asp Asn Phe Leu Ser Pro
60

314
ATC GAC AAA CAC GAG ACA CAA GGC AGC TCA GTT CAG AAG CTT TTA TCG GTC TCT TAT CGA
Ile Asp Lys His Glu Thr Gln Gly Ser Ser Val Gln Lys Leu Leu Ser Val Ser Tyr Arg
80

374
TTG ATT GAG TCC TGG GAG TTT TTC AGT CGC TTC CTG GTC GCA AGT TTT GCT GTG AGG ACC
Leu Ile Glu Ser Trp Glu Phe Phe Ser Arg Phe Leu Val Ala Ser Phe Ala Val Arg Thr
100

434
CAG GTT ACA TCC AAA CTG TCA GAA CTG AAG ATG GGT CTC CTG AAG CTG ATA GAG GCC AAT
Gln Val Thr Ser Lys Leu Ser Glu Leu Lys Met Gly Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ala Asn
120

494
CAG GAT GGA GCA GGT GGA TTC TCT GAG AGT TCG GTG CTC CAG CTC ACG CCG TAT GGA AAC
Gln Asp Gly Ala Gly Gly Phe Ser Glu Ser Ser Val Leu Gln Leu Thr Pro Tyr Gly Asn
140

554
TCT GAA CTG TTC GCC TGC TTT AAG AAG CAT ATG CAC AAG GTG GAC ACG TAC CTG ACC GTG
Ser Glu Leu Phe Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys Val Glu Thr Tyr Leu Thr Val
160

614
GCC AAA TGC CGA CTC TTT CCA GAA GCT AAC TGC ACC CTG TAG CCCC GCCTCTCCGCCAAGAGTA
Ala Lys Cys Arg Leu Phe Pro Glu Ala Asn Cys The Leu
(171)

679
CC TCCCGCAGATGACATATGCATTCTGTGCCCGACCCCTGTGGTTGCCGAGTCTGACTAGCATTAAATGTTAG

758
CATCTGTTGGTTCTGCATTCCACCTGATGTCATTGTGATGTCATACTGTCAGCAAATAAAGATTTCAATTCAGTCA
A 834

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

Fig. 20. Nucleotide sequence of all-female flounder GH cDNA and predicted amino acid sequence.

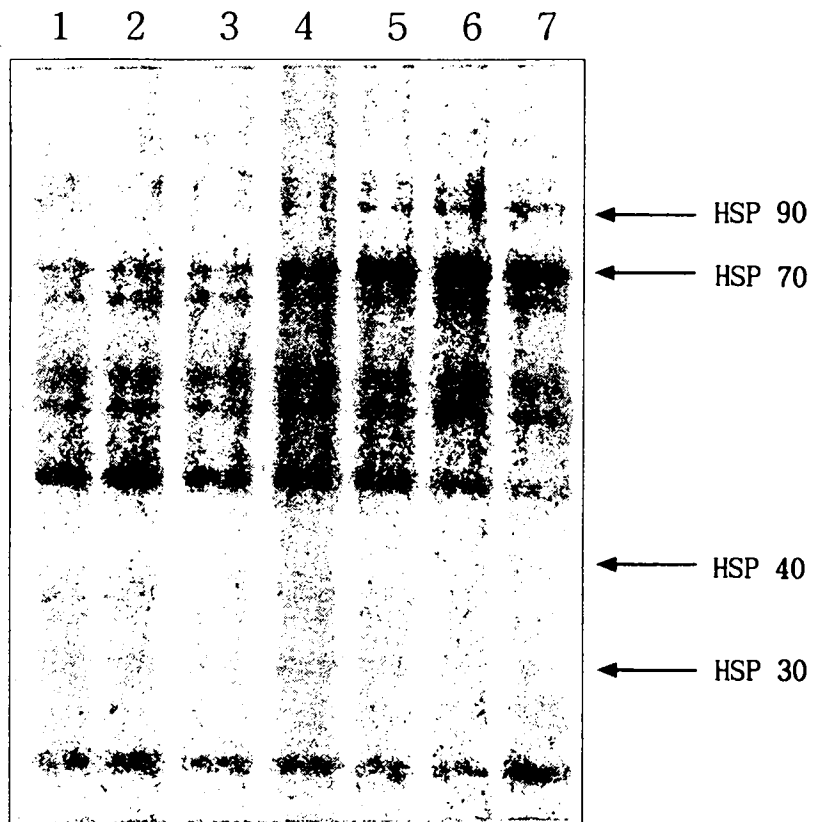


Fig. 21. Induction of heat shock protein by heat shock of all-female flounder

여 백

제 6 장 전암컷 넙치의 자연산란

제 1 절 서 론

우리나라의 넙치에 대한 양식은 최근 양식기술의 보편화로 어민들이 종묘생산부터 양성까지의 완전양식이 가능하게 되었다. 그러나 인건비 및 사료비의 급상승으로 생산성이 점차 낮아지고 있으므로 넙치 양식의 생산성을 높이기 위한 연구가 절실히 요구된다. 따라서 암컷이 수컷보다 성장이 빠른 특성을 이용하여 전암컷 넙치를 유도할 필요성이 제기되었다.

따라서 최근 넙치의 생산성 향상을 목적으로 연구되고 있는 전암컷 넙치의 양식을 위해서는 무엇보다도 실내에서 자연산란에 의한 전암컷 수정란의 대량 확보가 필수적이며, 동시에 이들 수정란에 대한 질적 평가도 대단히 중요하다. 본과제에서는 1차년도에 이미 전암컷 넙치를 양식산업으로 정착시키기 위한 연구의 일환으로 5년생 자성발생성 2배체(gynogenetic diploid) 암컷과 이들을 성전환시켜 생산한 자성발생성 2배체(sex-reversed gynogenetic diploid) 수컷과의 자연산란에 의한 전암컷 넙치 수정란의 생산 및 이들 수정란에 대한 난질을 조사한 바 있었다.

이에 본연구에서 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시켜 생산한 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 태어난 전암컷 넙치가 실내수조에서 성숙하여 자연산란에 의한 전암컷 넙치 F₂의 생산이 가능한지를 조사함과 동시에 이들의 산란량 및 난질에 대한 조사를 실시하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 친어의 사육 및 수정란 수집

친어는 자성발생성 2배체 암컷과 이들을 성전환시킨 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 태어난 전암컷 넙치로 3년생이며, 대조군인 보통 넙치는 3년생으로 양식산이었다. 이들 친어의 사육은 국립수산진흥원 실내콘크리트 사각수조(3.5 m × 3.5 m)를 이용하여 유수식으로 하였으며 사육환경은 자연조건으로 하였다. 먹이는 생사료와 시판하는 분말 사료로 만든 모이스트 펠릿을 하루에 1번씩 주었으며 산란기간동안은 2일에 1번씩 공급하였다.

친어로 사용한 전암컷 넙치는 모두 33마리로 그 중 암컷은 31마리, 수컷은 2마리 였고, 보통 넙치는 총 18마리로 그 중 암컷은 12마리, 수컷은 6마리 였다. 자연산란된 난은 수조내의 표층수가 집난조로 유수되도록 하여 집난조에 모은 후 매일 오전 10시에 수거하였다. 수거된 난은 즉시 메스실린더에 부은 후 산란량과 부상량을 측정하였다.

2. 산란량, 부상율, 수정율, 부화율 및 초기생존율 조사

일일산란량 및 부상율은 수거된 난을 메스실린더에 부은 후 산란량과 부상량을 측정하여 환산하였다(1,200개/cc). 수정율은 부상난 중 200여개의 난을 무작위로 샘플하여 만능투영기(profile project) 하에서 2~4 세포기로 발생 중인 난을 계수하였으며, 부화율은 배체형성이 완료된 난에 대한 부화 개체의 백분율로 구하였다. 초기생존율은 부화후 8일째에 부화된 정상개체수 중 먹이(rotifer)를 먹고 생존한 개체수의 백분율로 계산하였다.

3. 성비

전암컷 넙치(F₂) 및 보통 넙치의 성비를 알기 위하여 생식소에 의한 조사를

실시하였다. 조사시기 및 방법은 부화후 6개월째 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's 용액으로 고정시키고, paraffin으로 embadding 하여 마이크로톰을 이용 5 μm 크기로 잘라 Hematoxylin-Eosin 으로 염색을 하였다. 암수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였다.

제 3 절 결 과

1. 자연산란량, 부상율 및 수정율

전암컷 넙치의 자연산란 기간은 1997년 3월 7일부터 6월 20일까지로 106일간 이었고, 보통 넙치의 자연산란 기간은 1997년 3월 7일부터 6월 21일까지로 107일간 이었다. 어미 사육탱크내의 수온 변화는 Fig. 22와 같이 산란기 초기인 3월 초순 및 중기에는 11 $^{\circ}\text{C}$ 전후였으며, 산란기중기인 3월 하순부터 5월 하순까지는 12~15 $^{\circ}\text{C}$, 산란기후기인 6월에는 15 $^{\circ}\text{C}$ 전후였다.

산란기간중 전암컷 넙치의 총산란량은 40,536,000개로 일일 평균 산란량은 378,841개, 암컷 1마리당 평균 산란량은 1,307,613개 였다. 보통 넙치의 총산란수는 38,031,600개로 일일 평균 산란량은 355,435개, 암컷 1마리당 평균 산란량은 3,169,300개 였다. 이들 두집단을 비교해 보면 총산란수 및 일일 평균산란수는 유사하였으나 암컷 1마리당 평균 산란량은 보통 넙치가 전암컷 넙치에 비하여 2.4배 많았다.

일일 산란량의 변화는 Fig. 23과 같다. 일일 산란량의 변화를 보면 산란기 초기와 말기 보다 산란기 중기가 높았다. 일일 최대 산란량은 전암컷 넙치가 산란기 중기인 4월 5일로 960,000개 였고 보통 넙치는 5월 5일로 660,000개 였다. 부상율은 산란기 초기와 말기보다 산란량이 많은 중기가 양호하였으며 전암컷 넙치의 평균 부상율은 $58.8 \pm 2.0\%$, 최대 부상율은 산란기 중기인 3월 21일로 95.5% 였고, 보통 넙치의 평균 부상율은 $79.4 \pm 1.7\%$, 최대 부상율은 산란기 중

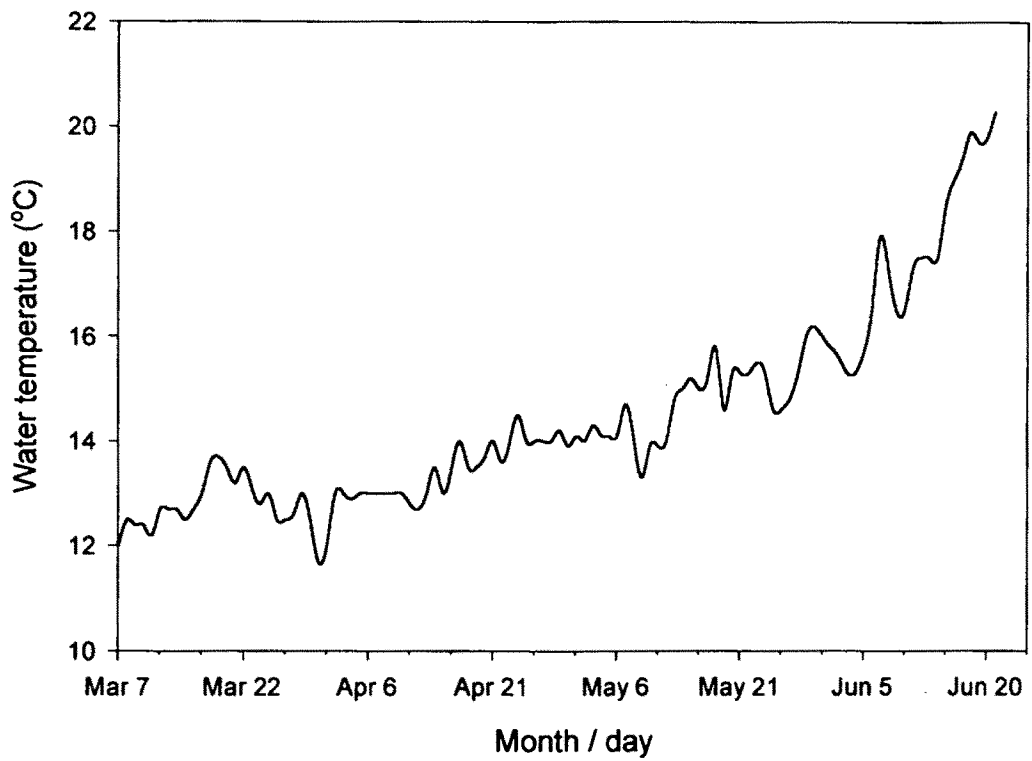


Fig. 22. Variation of water temperature during spawning period in 1997.

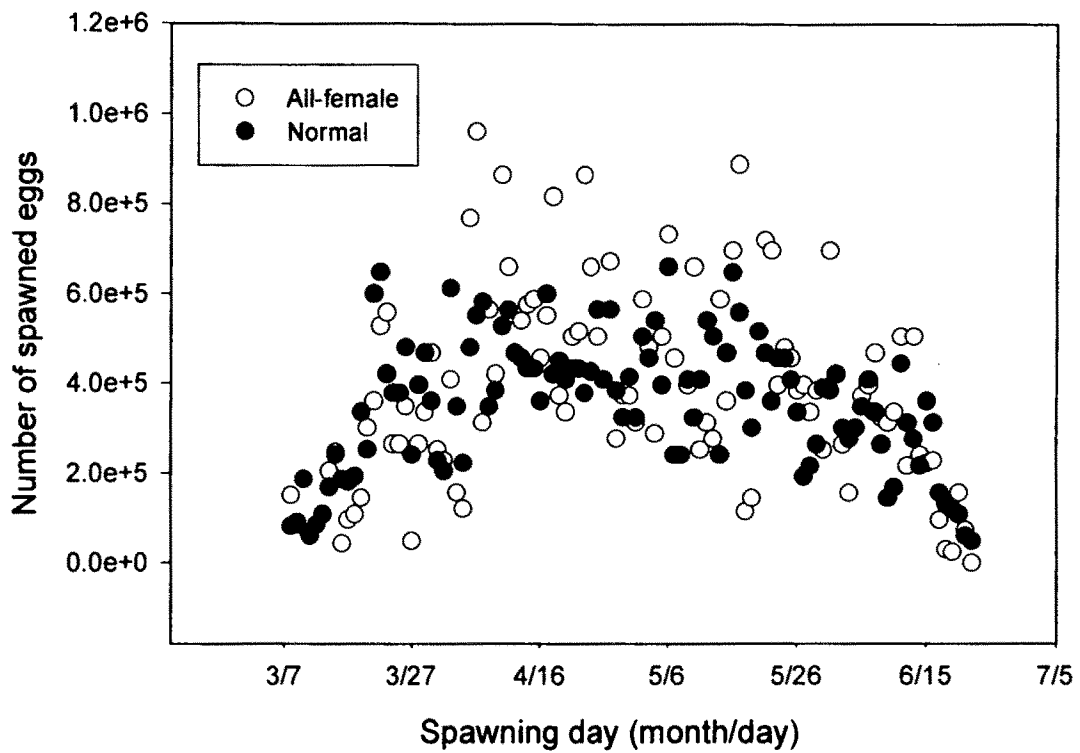


Fig. 23. Number of total spawned eggs of all-female olive flounder.

기인 3월 27일과 3월 29일로 100% 였다(Fig. 24).

수정율은 부상율과 달리 산란기간 동안 내내 양호하였다. 전암컷 넙치의 평균 수정율은 $86.6 \pm 9.1\%$, 보통 넙치는 $92.3 \pm 8.4\%$ 였으며 전암컷 넙치 및 보통 넙치의 수정율은 대단히 양호하여 산란기동안 몇일을 제외하고는 거의 80% 이상 이었다(Fig. 25).

이상의 결과로 보면 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷에 의하여 태어난 전암컷 넙치는 실내 수조내에서 정상적으로 자연산란이 가능할 뿐만 아니라 양질의 수정란을 생산할 수 있는 것으로 확인되었다.

2. 부화율 및 초기생존율

자연산란된 전암컷 넙치 및 보통 넙치의 부화율 및 초기생존율을 비교해 보면 Table 14와 같다. 평균 부화율은 전암컷 넙치가 84.5%, 보통 넙치가 86% 로 보통 넙치가 양호하였으며 ($P < 0.05$), 초기생존율의 평균값은 전암컷 넙치가 91.5%, 보통 넙치가 92.6% 로 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

Table 14. Hatching rates and early survival rates of all-female (F_2) and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Group	Hatching rate (%)	Early survival rate (%)
All-female (F_2)	84.5 ± 4.27	91.5 ± 1.86
Normal	86.0 ± 5.39	92.6 ± 1.27

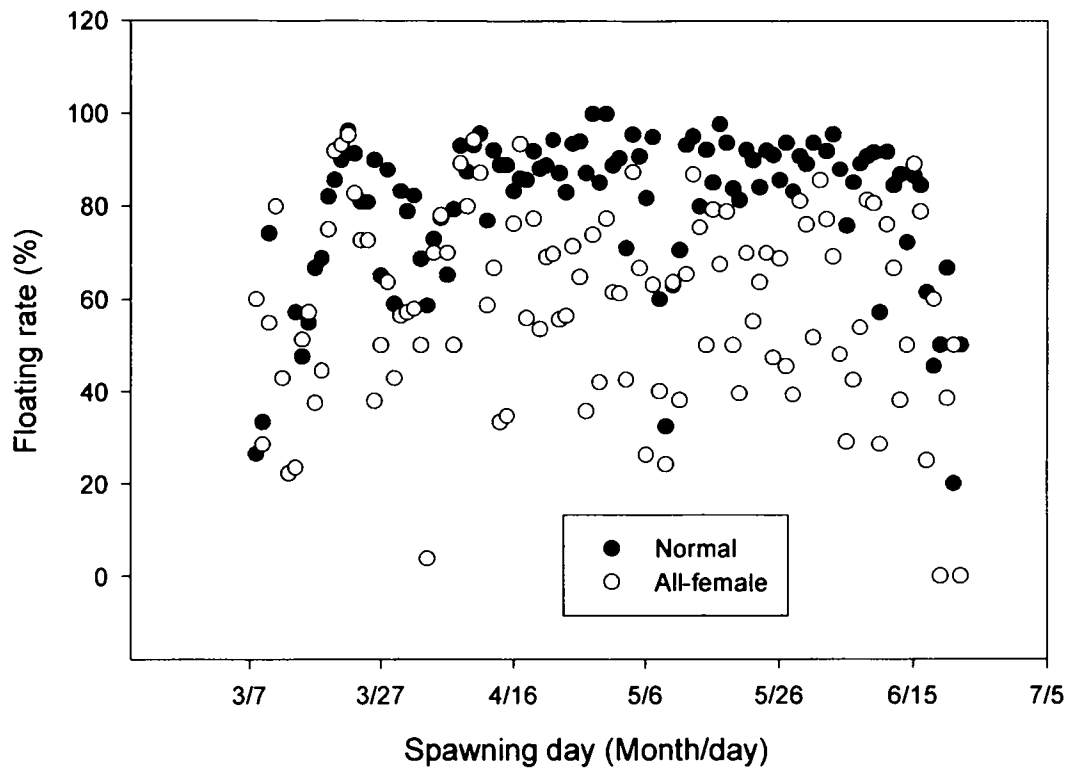


Fig. 24. Floating rate of total spawned eggs of all-female olive flounder.

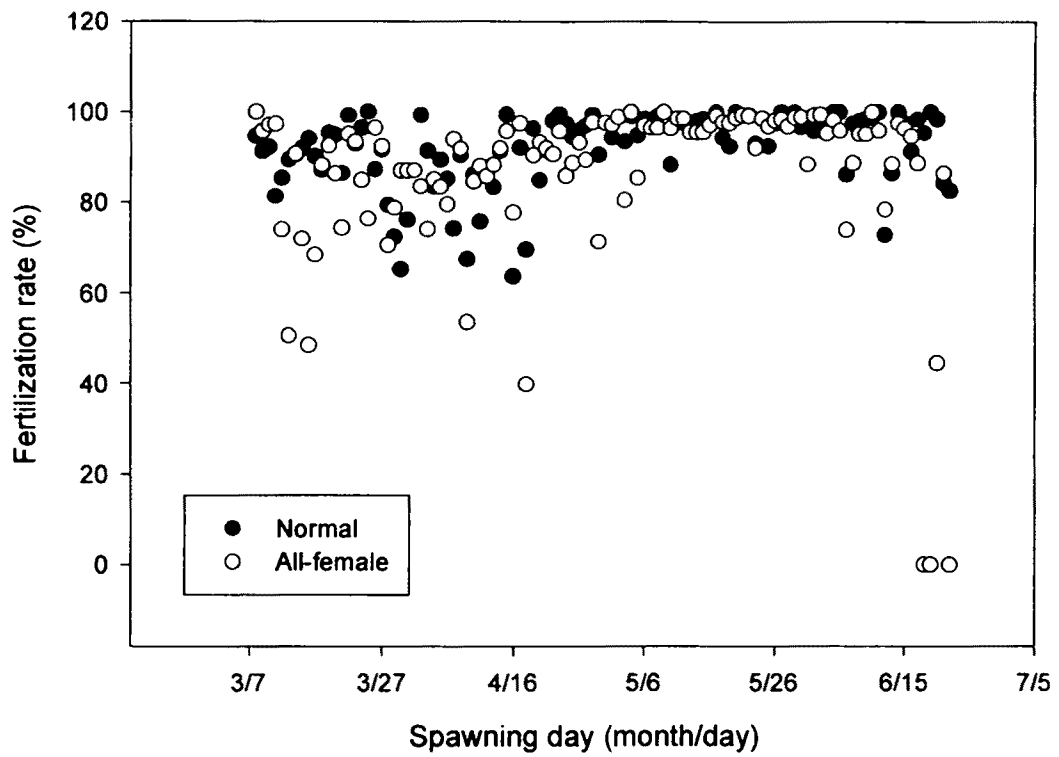


Fig. 25. Fertilization rate of spawned eggs of all-female olive flounder.

3. 성비

부화후 6개월째 성비를 조사한 결과는 Table 15와 같이 암컷의 평균 비율이 전암컷 낱치는 92.9%, 보통 낱치는 53.3% 였다. 따라서 자성발생성 2배체 암컷 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷으로 부터 생산된 전암컷 낱치는 다음 세대에서 전암컷 낱치(F₂)의 생산이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

Table 15. Sex ratios of all-female (F₂) and normal olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Group	No. of fish examined	No. of female	No. of male	% Female
All-female (F ₂)	28	26	2	92.9
Normal	30	16	14	53.3

Values in the same column having the equal superscripts are not significantly different ($P > 0.05$).

제 4 절 고 찰

넙치의 산란 일수에 대하여는 平本·小林(1979)은 106일간, 민(1987)은 70일간 이었다. 본연구에서 전암컷 넙치의 산란일수는 106일간으로 많은 양의 수정란을 생산할 수 있는 가능성이 보였다.

한편 산란기간중 암컷 친어 1마리의 산란량은 김·허(1991)는 2,670,000개(암컷 평균체중 3,380 g), 平本·小林(1979)은 4,040,000개(암컷의 전장 60~70 cm) 였으나 본연구에서는 1,307,613개(암컷 평균체중 1,578 g)로 적은 편이었다. 이것은 친어로 사용된 암컷의 크기가 적은데 원인이 있는 것으로 사료된다.

자연산란된 난의 부상을 및 부화율은 난질을 평가하는데 있어서 중요한 요인

으로 작용한다. 김·허(1991)는 부상율이 산란전기에는 47.6%, 산란중기에는 63.5%, 산란후기에는 41.8%로 전체평균은 55.3% 였으며, 부상란에 대한 수정율은 산란전기에서는 37.4%, 산란중기에서는 54.1%, 산란후기에서는 19.6%로 전체평균은 44.4% 였다.

김 등(1994)은 호르몬을 주사한 자성발생성2배체 수컷과 보통 넙치 친어 3년생 암컷과의 인공수정에 의하여 얻은 난의 평균부상율은 35.5%, 수정율은 67.8%, 부화율은 63.6% 였다. 본연구에서는 전암컷 넙치의 평균부상율이 58.8%로 보통넙치에 비하여 대단히 낮았다. 이러한 이유는 어미로 사용한 전암컷 넙치 33마리 중 수컷은 단 2마리뿐으로 암컷이 수컷에 비하여 마리수가 지극히 적은데 원인이 있었던 것으로 추측된다. 전암컷 넙치의 평균수정율은 86.6%로 김 등(1994)에 비하여 양호한 것으로 금후 자성발생성 2배체 및 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의한 양질의 전암컷 수정란을 대량으로 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

전암컷 넙치(F_2)의 성비에 관해서는 아직 정확하게 밝혀지지는 않았지만 전암컷 넙치에 의하여 생산된 전암컷 넙치(F_2)의 성비는 92.9% 였다. 따라서 전암컷 넙치는 암컷의 비율이 높은 전암컷 넙치 F_2 를 재생산할 수 있는 것이 확인 되었으므로 금후 전암컷 넙치(F_2)의 성장 및 생존율에 대한 연구가 수행되어야 할것으로 생각된다.

제 7 장 자성발생성 2배체 유도

제 1 절 서 론

자성발생성 2배체 유도는 수컷 유전 물질의 관여없이 암컷 유전 물질만으로 생존력이 있는 개체를 생산함으로써 짧은 시간 내에 순계를 확립함은 물론, 그 종의 성결정 기구가 암컷 동형 접합일 경우 전암컷 집단을 유도할 수 있어 암수간의 경제성에 차이가 있는 어종에서 많은 연구가 이루어지고 있다.

어류의 염색체 조작에 의한 자성발생성 이배체 유도는 Hertwig effect를 이용한 것으로 Purdom (1969)이 방사선 조사에 의한 자성발생성 유도법을 pleuronectes에서 성공함으로써 그 가능성을 제시하였다. 또한, 자외선에 의한 정자의 불활성화는 Thorgaard et al. (1981)과 Onozato and Yamaha (1983)에 의하여 확립되어 잉어(Nagy et al., 1978), 미꾸라지(Suzuki et al., 1985a), 무지개송어(Chourrout, 1984), 참돔(Sugama et al., 1990), 초어(Stanley, 1976) 및 연어류(Onozato, 1984) 등 다수의 어종에서 자성발생성 2배체가 유도되었다. 이때 배수화를 위한 물리적인 처리 방법은 저온처리(Lincoln et al., 1974), 고온처리(Chourrout and Quillet, 1980) 및 수압처리(Chourrout, 1984; Onozato, 1984) 등이 있으나 넙치와 참돔에서는 저온처리가 효과가 있는 것으로 알려졌다(Tabata, 1991; Sugama et al., 1990).

따라서, 본 연구는 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 자연산란에 의하여 부화된 넙치가 전암컷일 뿐아니라 성장도 양호한 것으로 확인되었으므로 어민에게 전암컷 생산용 종묘를 공급할 목적으로 유전적으로 불활성화된 감성돔 정자를 넙치의 난과 인공수정시켜 암컷의 유전인자만을 가지는 자성발생성 2배체 넙치의 유도 방법 및 유도된 자성발생성 2배체 넙

치의 성장, 생존율 및 성비를 보통 넙치와 비교하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 친어 및 자치어 사육

실험어는 실내 탱크(3.5 m × 3.5 m × 1.5 m)에서 사육중이던 4~5년생 양식산 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 암컷과 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*) 수컷을 이용하였다. 유도된 자성발생성 2배체 넙치의 자어는 0.3톤 투명 FRP 수조에서 사육하였다. 먹이는 부화직후 소량의 해산 *Chlorella*를 사육수에 혼합하였고, 부화후 3일째 부터는 rotifer를 공급하였으며, 성장함에 따라 *Artemia* 유생과 배합사료를 공급하였다. 사육수의 관리는 배합사료 공급 이전에는 지수식으로 그 이후부터는 일부 환수와 유수식으로 하였다. 배설물은 수시로 제거하였다.

2. 자성발생성 2배체 유도

4,800 ergs/mm²로 불활성화 시킨 감성돔 희석 정자와 성숙된 넙치 알을 인공 수정 시킨 후 배수화를 위한 제2극체 방출 억제를 위하여 수정후 3분부터 1±0.5°C 에서 45분간 처리하여 자성발생성 2배체를 유도하였다.

3. 성장 및 생존율

부화후 60, 80 및 100일째에 성장도를 조사하였다. 성장도는 조사시 마다 30마리씩 마취시켜 전장과 체중을 각각 0.1 cm, 1 mg까지 측정하였다. 실험군간의 성장의 유의차 검정을 위하여 Student's t-test를 실시하였다. 생존율 조사를 위하여 매일 죽은 개체를 계수하여 환산하였다.

4. 성비

성분화가 완료된 이후의 시기인 부화후 6개월째 넙치의 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin 용액으로 고정시키고, 파라핀으로 포매하여 5 μ m 크기로 절단한 후 Harris's hematoxylin과 eosin-phloxine으로 이중 염색하였다. 암수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였다.

제 3 절 결 과

1. 수정율 및 부화율

본 실험에서 유도된 자성발생성 2배체의 수정율 및 부화율은 Table 16과 같다. 자성발생성 2배체의 평균 수정률은 29.9%, 평균 부화율은 45.4 % 으로 보통 넙치의 34.6% 와 48.5% 에 비하여 낮았다($P>0.05$). 한편, 자성발생성 2배체 유도 중 배수화가 되지 못한 난은 배체가 정상적으로 발달하지 못하여 부화직후 모두 폐사하였다(Plate 4).

Table 16. Fertilization rates and hatching rates of gynogenetic diploid and normal olive flounder

	Fertilization rate (%)		Hatching rate (%)	
	Gynogenetic diploid	Normal	Gynogenetic diploid	Normal
1st	31.2	33.7	47.5	46.8
2nd	28.6	35.4	43.2	50.2
Mean	29.9	34.6	45.4	48.5

2. 성장 및 생존율

유도된 자성발생성 2배체의 성장과 생존율을 알기 위하여 부화후 40, 80 및 100 일째 전장, 체중 및 생존율을 조사한 결과는 Table 17에서 보는 바와 같다. 부화후 100일째까지의 체중 성장은 자성발생성 2배체가 5.94 ± 0.52 g, 보통 넙치가 5.03 ± 0.53 g 였으며 이때의 생존율은 각각 32.4%, 35.2% 로 대조군이 성장과 생존율에서 약간 양호하였으나 유의차는 인정되지 않았다($P > 0.05$).

Table 17. Total lengths and body weights (mean \pm SE) of gynogenetic diploid and normal olive flounder

Days after hatching	Total length (cm)		Body weight (g)	
	Gynogenetic diploid	Normal	Gynogenetic diploid	Normal
40	1.38 ± 0.02	1.39 ± 0.02	0.031 ± 0.001	0.032 ± 0.002
80	7.59 ± 0.12	7.87 ± 0.08	3.13 ± 0.27	3.04 ± 0.21
100	10.92 ± 0.10	11.20 ± 0.12	5.94 ± 0.52	5.03 ± 0.53

3. 성비

부화후 6개월째에 조사한 암컷 비율은 Table 18에서 보는 바와 같이 자성발생성 2배체가 91.7% 로 보통 넙치의 50%에 비하여 높은 암컷 유도율을 보였다 ($P < 0.01$).

Table 18. Sex ratios of gynogenetic diploid and normal olive flounder

	Group	No. of fish examined	No. of female	No. of male	% Female
1st	Gynogenetic diploid	30	28	2	93.3
	Normal	30	16	14	53.3
2nd	Gynogenetic diploid	30	27	3	90.0
	Normal	30	14	16	46.7
Mean	Gynogenetic diploid				91.7
	Normal				50.0

제 4 절 고 찰

어류에 있어서 정자를 불활성화 시키는 방법은 일반적으로 자외선을 많이 이용한다. 감성돔의 정자를 희석하여 4,800 ergs/mm² 자외선을 조사한 결과 완전히 유전적으로 불활성화(inactivation)가 되는 것으로 나타났다.

제 2극체 방출억제를 위한 방법에는 저온처리, 고온처리 및 수압처리 등의 물리적인 방법이 있으나 본 실험에서 저온처리 방법을 사용하였다. 넙치의 경우 1±0.5℃에서 45분간 처리한 결과 정상적인 2배체가 유도되는 것으로 보아 적정 조건이라고 생각된다. 최초 저온처리 시작 시각은 저온 처리시까지의 수온과 관계가 있으며 본 실험 조건인 18℃에서는 수정 3분 이내면 충분하다고 판단되었으나 田畑 (1991)는 수온 13.4~14.5℃의 경우 수정 5분 이내에만 저온 처리하면 제 2극체 방출 억제가 가능하다고 보고한 바 있다.

어류의 성은 성유전자(sex gene)에 의하여 결정되며, 성의 분화는 이들 유전자의 지배하에 발생 과정중 결정된다(Yamazaki, 1983). 유도된 자성발생성 2배

체의 성은 연어과 어류(Onozato and Yamaha, 1983), 미꾸라지(Suzuki et al., 1985a & b), 백련어(Mirza and Shelton, 1988)에서 모두 암컷이었다. 그러나 감성가자미(Purdom, 1969), 금붕어(Oshiro, 1987)에서는 수컷이 나타나며 넙치에서도 수컷이 출현하여 전암컷 생산에 의문이 제기된 바 있다(田畑, 1991). Tabata (1991)는 넙치의 성결정 기작에 대한 연구에서 자성발생성 2배체가 대조군에 비하여 암컷의 비율이 높을 뿐 아니라 성분화 시기 동안 여성호르몬(E₂)에 의하여 쉽게 암컷으로 유도됨으로써, 넙치의 유전적 성결정 기작을 암컷 동형접합(XX-XY)으로 추정하였으나 성분화시의 환경요인이 성결정에 영향을 미칠 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 유도된 자성발생성 2배체 암컷의 비율이 91.7%로 수컷이 8.3% 나타났다. 이것은 넙치의 성이 단순한 암컷 동형접합에 의한 성결정 기작이 아닐 가능성을 제시한다.

Conover and Fleisher (1986)는 *Menidia menidia*의 성이 자치어기의 사육수온에 따라 변한다고 하였다. 즉 난에서 전장 30 mm 까지의 기간 동안에 사육수온을 달리하여 사육한 결과 저수온에서 암컷이 비율이 높다고 보고한 바 있어 앞으로 이에 대한 많은 연구가 수반되어야 한다고 생각된다.

넙치의 성장은 부화후 8개월부터 암수의 성장 차이가 나타나기 시작하여 13개월째의 경우 암컷이 수컷 체중의 1.8배, 30개월째에는 2~3배가 된다(原田 등, 1983). 본 실험에서 유도된 자성발생성 2배체 넙치를 사육한 결과, 자성발생성 2배체가 대조군인 보통 넙치에 비하여 수정율과 부화율이 약간 낮았고, 부화후 100일째 까지의 성장과 생존율에 있어서도 역시 낮은 값을 보였다. 이러한 현상은 자성발생성 2배체가 유전적으로 불안정하여 초기의 성장과 생존율에 영향을 미친 것으로 생각된다.

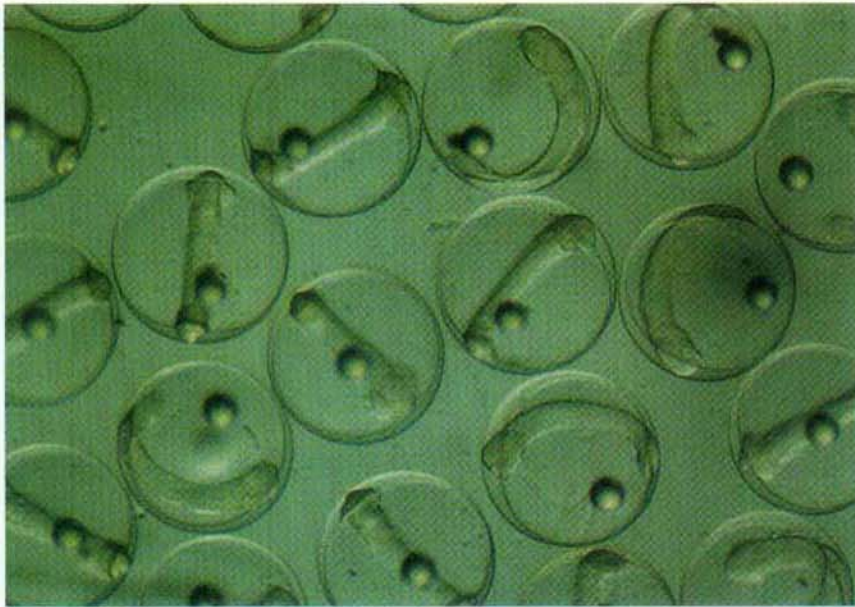


Plate 4. Comparison of eyed embryos of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* gynogenetic diploid (upper) and gynogenetic haploid (below).

여 백

제 8 장 호르몬 처리에 의한 가짜수컷 생산

제 1 절 서 론

어류의 성전환에 대해서는 Yamamoto (1953)가 medaka (*Oryzias latipes*)를 이용하여 최초로 생리학적 성전환을 유도한 후 암수에 따른 성장, 체색, 모양 및 성숙 시기 등이 차이가 많이 나서 단성 집단만을 사육하는 것이 경제적으로 유리한 종 즉, 틸라피아(Anonymous, 1979; Berger and Rothbard, 1987; Clemens and Inslee, 1968; Guerrero, 1975; Jo, 1988; Nakamura and Iwahashi, 1982), 잉어(Nagy et al., 1981), 연어과 어류(Jalabert et al., 1975; Johnstone et al., 1978; Okada, 1973; Simpson et al., 1976) 및 넙치를 대상으로 연구되어 왔다.

넙치의 암컷 집단만을 생산하기 위한 방법으로는 자성발생성 2배체를 유도하거나 자성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환을 유도하는 방법, 가짜수컷과의 단순 교배를 통한 방법 등이 있다. 그 중 염색체 조작에 의한 자성발생성 2배체는 일본과 우리나라에서 유도된 바 있으나(Kim et al. 1993a, b; 田畑 等, 1986; 田畑·五利, 1987, 1988, 1989) 처리에 많은 시간을 필요로 하고 대량 생산이 어려운 단점이 있다.

자성호르몬 처리에 의한 전암컷 넙치의 생산은 생리학적 성전환을 위해 종묘 생산 시기에 약 2개월간 호르몬을 처리해야 하며(Tanaka, 1988; 방 등, 1995), 호르몬이 자연수계로 유출되는 환경 오염 문제가 잠재되어 있다(Gall, 1983). 그러므로 전암컷 넙치를 생산하기 위해서 유전적으로는 암컷이면서 생리적으로는 수컷인 가짜 수컷(pseudomale)을 유도한 후 암컷과의 단순 교배만으로 간단하게 생산할 수 있는 방법이 가능하므로 가짜수컷을 생산하여 어민에게 보급함으로써 어민들이 쉽게 전암컷 넙치를 사육할 수가 있다.

따라서 본 연구에서는 우선 자성발생성 2배체를 대상으로 남성호르몬을 처리하여 가짜 수컷을 유도하였다. 또한 자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 교배에 의하여 태어난 전암컷 넙치를 대상으로 남성호르몬을 처리하여 가짜수컷도 유도하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 호르몬 처리에 의한 가짜 수컷 유도

가. 자성발생성 2배체 이용

유도된 자성발생성 2배체를 가짜수컷으로 성전환하기 위하여 부화후 46일(전장 1.28 ± 0.23 cm)부터 106일째까지 60일간 17α -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)을 에탄올에 녹인 다음 사육수에 섞어 호르몬의 최종 농도가 10 ppb 되도록 침지처리(immersion)하였다. 침지처리 시간은 1일 8시간 및 24시간이었다.

나. 전암컷 넙치 이용

자성발생성 2배체 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷으로 부터 부화된 전암컷 넙치를 수컷으로 성전환시키기 위하여 2가지 방법으로 실험하였다.

1) 침지처리

부화후 46일째(전장 1.28 ± 0.23 cm)부터 106일째까지 60일간 17α -methyltestosterone (MT; Sigma, USA)을 에탄올에 녹인 다음 사육수에 섞어 호르몬의 최종 농도가 10 ppb 되도록 침지처리(immersion) 하였다. 침지처리 시간은 1일 8시간 및 24시간이었다.

2) 침지처리와 유수식처리

부화후 35일째 (전장 1.25 ± 0.27 cm) 부터 65일째까지의 30일간은 17α -methyltestosterone을 에탄올에 녹인 다음 사육수에 섞어 호르몬의 최종 농도

가 10 ppb 되도록 침지처리(immersion) 하였고, 부화후 66일째부터 95일째까지 (전장 6.49 ± 0.39 cm)의 30일간은 17 α -methyltestosterone을 에탄올에 녹인 다음 10 ppb의 농도로 1일 2회전 유수식으로 처리하였다.

2. 성비

남성호르몬을 처리한 자성발생성 2배체 및 전암컷 넙치를 대상으로 수컷으로의 성전환 유도율을 알기 위하여 성비를 조사하였다. 성비 분석 방법은 암수 구별이 쉬운 부화후 6개월째에 조직학적 방법으로 조사하였다. 조직 표본 제작은 실험어의 복부를 절개한 후 생식소를 채취하여 Bouin's fluid로 고정시키고, paraffin으로 embedding하여 5 μ m 두께로 절단한 후 Harris's hematoxylin과 eosin-phroxine으로 염색을 하였다. 암 수의 판정은 현미경으로 검경하여 구분하였다.

3. 성장 및 생존율

호르몬 처리 기간동안의 성장을 비교하기 위하여 호르몬 처리 전날과 최종 호르몬 처리 다음날 전장 및 체중을 조사하였다. 조사 방법은 시료를 마취시켜 전장과 체중을 0.1 cm, 0.1 g 단위까지 각각 측정하였다. 생존율은 호르몬 처리 기간동안 매일 죽은 개체수를 환산하여 구하였다. 실험결과의 유의성 검정을 위하여 성장은 Student's t-test로, 성비는 χ^2 -test로 실시하였다.

제 3 절 결 과

1. 성비

가. 성전환된 자성발생성 2배체

성전환시킨 자성발생성 2배체의 성비를 알기 위해 부화후 6개월째에 생식소

의 조직 절편 표본을 만들어 현미경으로 관찰하였다. 자성발생성 2배체로부터 수컷으로의 유도율은 8시간 처리와 24시간 처리구 모두 100%로 본연구에서 이용된 10 ppb의 17 α -methyltestosterone을 침지처리한 방법이 매우 효과적이었다(Table 19).

Table 19. Sex ratios of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic diploid

Group	Treatment	No. of examined	No. of female	No. of male	% Male
Gynogenetic diploid		30	28	2	6.7
Sex-reversed gynogenetic diploid	8hr	30	0	30	100
	24hr	30	0	30	100

나. 성전환된 전암컷 넙치

성전환된 전암컷 넙치의 성비를 알기 위해 부화후 6개월째 생식소의 조직 절편 표본을 만들어 현미경으로 관찰하였다.

1) 침지처리

전암컷 넙치를 이용하여 침지처리법으로 성전환 시킨 결과 수컷으로의 유도율은 8시간 처리와 24시간 처리구 모두 100% 수컷으로 조사되었다(Table 20).

Table 20. Sex ratios of all-female and sex-reversed all-female

Group	Immersion	No. of examined	No. of female	No. of male	% Male
All-female		30	30	0	0
Sex-reversed all-female	8hr	30	0	30	100
	24hr	30	0	30	100

2) 침지처리와 유수식처리

전암컷 넙치를 이용하여 침지처리와 유수식 처리법으로 성전환 시킨 결과 수컷으로의 유도율은 26.7%로 대단히 낮았다(Table 21).

Table 21. Sex ratios of all-female and sex-reversed all-female by immersion and running water treatment

Group	No. of examined	No. of female	No. of male	% Male
All-female	30	30	0	0
Sex-reversed all-female	200	146	54	26.7

2. 생식능력

전암컷 넙치 및 성전환시킨 전암컷 넙치의 번식능력을 알아보기 위하여 산란 시기인 1997년 5월에 복부 압박법에 의하여 난과 정자를 조사한 결과, 난과 정자가 정상인 것으로 확인되어 금후 전암컷 생산용 친어로의 사용이 가능한 것으로 판단되어 이들을 어미로 사용하여 교배시키면 전암컷 넙치 F₂를 생산할 수 있는 것으로 나타났다.

3. 성장 및 생존율

가. 성전환된 자성발생성 2배체

성전환된 자성발생성 2배체 성장을 알기 위하여 호르몬 처리 전후로 측정된 결과는 Table 22와 같다. 호르몬 처리 종료 시점에서 전장 및 체중은 대조군인 자성발생성 2배체가 각각 7.56 ± 1.19 cm, 3.68 ± 1.58 g 으로 호르몬 처리군보다 빠른 성장을 보였다. 호르몬 처리군에서도 8시간 처리구가 전장 6.51 ± 0.91 cm, 체중 2.35 ± 0.85 g 으로 24시간 처리구의 6.21 ± 1.10 cm, 2.08 ± 0.93 g 보다 성장이 양호하였다. 생존율은 대조군이 92.1%, 8시간처리구가 88.6%, 24시간처리구가 86.5%로 처리군이 대조군보다 낮았으며 처리군에서는 24시간 처리군이 8시간 처리군보다 생존율이 낮았다.

나. 성전환된 전암컷 넙치

1) 침지처리

성전환된 전암컷 넙치의 성장을 알기 위하여 처리 전후로 성장을 측정한 결과는 Table 23과 같다. 호르몬 처리 종료 시점에서의 전장 및 체중은 대조군인 전암컷 넙치가 각각 7.27 ± 0.98 cm, 3.19 ± 1.07 g 으로 호르몬 처리군보다 빠른 성장을 보였다. 호르몬 처리군에서는 8시간 처리구의 전장 및 체중이 7.15 ± 1.01 cm, 2.84 ± 1.06 g 으로 24시간 처리구의 6.10 ± 0.89 cm, 1.89 ± 0.72 g 보다

Table 22. Total lengths and body weights of gynogenetic diploid and sex-reversed gynogenetic diploid by immersion treatment

Group	Immersion	Initial		Final	
		Total length (cm)	Body weight (g)	Total length (cm)	Body weight (g)
Gynogenetic diploid		1.28±0.23	0.03±0.002	7.56±1.19	3.68±1.58
Sex-reversed gynogenetic diploid	8hr	1.28±0.23	0.03±0.002	6.51±0.91	2.35±0.85
	24hr	1.28±0.23	0.03±0.002	6.21±1.10	2.08±0.93

Table 23. Total lengths and body weights of all-female and sex-reversed all-female by immersion treatment

Group	Immersion	Initial		Final	
		Total length (cm)	Body weight (g)	Total length (cm)	Body weight (g)
All-female		1.26±0.28	0.029±0.001	7.27±0.98	3.19±1.07
Sex-reversed all-female	8hr	1.26±0.28	0.029±0.001	7.15±1.01	2.84±1.06
	24hr	1.26±0.28	0.029±0.001	6.10±0.89	1.89±0.72

성장이 양호하였다. 생존율은 대조군이 80.2%, 8시간 처리구가 75.7%, 24시간 처리구가 73.4%로 처리군의 생존율이 대조군보다 낮았으며 처리군에서도 24시간 처리군이 8시간 처리군보다 생존율이 낮았다.

2) 침지처리 및 유수식처리

침지처리 및 유수식처리로 성전환시킨 전암컷 넙치의 성장은 Table 24와 같다. 호르몬 처리 종료 시점에서의 전장 및 체중은 대조군인 전암컷 넙치가 각각 7.12 ± 0.58 cm, 2.72 ± 1.08 g 으로 호르몬 처리군의 6.49 ± 0.40 cm, 2.37 ± 0.83 g 보다 성장이 양호하였다. 생존율은 대조군이 81.5%로 처리군의 74.6% 보다 높았다.

Table 24. Total lengths and body weights of all-female and sex-reversed all-female by immersion and running water treatment

Group	Initial		Final	
	Total length (cm)	Body weight (g)	Total length (cm)	Body weight (g)
All-female	1.25 ± 0.27	0.028 ± 0.001	7.12 ± 0.58	2.72 ± 1.08
Sex-reversed all-female	1.25 ± 0.27	0.028 ± 0.001	6.49 ± 0.40	2.37 ± 0.83

제 4 절 고 찰

어류의 생리학적 성전환을 위해서는 각 종간의 서로 다른 점을 감안하여 성 호르몬의 종류, 농도 및 그 투여 방법을 달리하여야 한다(Hunter and Donaldson, 1983; Yamazaki, 1983). 고농도로 처리시 MT의 경우 aromatase 효소에

의한 자성화 현상 (Goudie et al., 1983)이 나타나며, E₂의 경우 생식소 이상 개체 (Tanaka, 1988) 또는 낮은 생존율과 함께 척추 이상의 기형어(高橋, 1981; 방 등, 1995)가 나타난다.

성 호르몬의 단시간 침지 효과로 노(1995)는 부화후 12일된 나일틸라피아 자어를 24시간 동안 MT 500 ppb로 침지처리하여 85.2%의 수컷을 유도하였다. 또한 Pandian and Varadaraj (1987), Varadaraj and Pandian (1987) 그리고 Varadaraj (1990)는 나일틸라피아를 대상으로 부화후 10일된 자어를 5 $\mu\text{g}/\text{l}$ 농도의 MT에 10일간 침지처리하여 100%의 수컷을 유도하였음을 보고하였다. 넙치의 경우 60일간의 침지처리를 통해 100% 암수를 유도한 바 있다(방 등, 1995). 본 연구 결과에서도 60일간 매일 8시간 및 24시간씩 침지 처리하여 100%의 수컷을 유도하였다.

처리 종료시의 생존율을 보면 Tanaka (1988)는 6~24%의 생존율을 보고하였고, 방 등(1995)은 경구 투여시 40.5~68.5% 및 침지처리시 60.5~78.5%의 생존율을 보고하였으나, 8시간 및 24시간 침지처리시 모든 처리군의 생존율이 73.4~88.6%로 이전의 연구보다는 높게 나타났는데 이러한 결과로 볼 때 본 실험에 사용한 방법이 여타 방법보다 좋은 방법으로 생각된다. 특히 8시간 처리구는 24시간 처리구보다 성장이나 생존율에서 양호하여 매우 효과적인 방법으로 생각된다.

본 종의 성전환 유도시 처리기간이 종묘생산 시기와 중복되므로 24시간 침지처리를 하는 것은 현재의 종묘생산 방법으로 볼 때 수질관리에 많은 어려움이 있을 것으로 보여 24시간 침지처리와 비교하여 성전환율이 큰 차이가 없고, 성장 및 생존율이 좋은 단시간 침지법을 이용하는 것이 효과적인 것으로 평가되었다.

전암컷 넙치 및 성전환시킨 전암컷 넙치는 산란시기에 난과 정자가 정상인 것으로 확인되어 수정이 가능하였으므로 이들을 어미로 사용하여 교배시키면

전암컷 녀치 F_2 를 생산할 수 있는 것으로 나타났으므로 금후 계속하여 전암컷
녀치 F_2 를 생산할 수 있을 것으로 예상된다.

제 9 장 참고문헌

- AOAC. 1984. Official methods of analysis of the association of official analytical chemicals, 14th edition. Arlington. AV, 1141 pp.
- Agellon, L. B. and T. T. Chen. 1986. Rainbow trout growth hormone : molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA, 5 : 463-471.
- Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders and L. S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels : population genetic consequences of an unusual life history pattern. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 4350-4354.
- Beckman, R. P., L. A. Mizzen and W. J. Welch. 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science, 248 : 850-854.
- Bentzen, P., C. B. Gregoon and C. L. William. 1989. Mitochondrial DNA polymorphism, population structure, and life history variation in American shad (*Alose sapidissima*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46 : 1446-1454.
- Berg, W. J. and S. D. Ferris. 1984. Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondrial DNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41 : 1041-1047.
- Berger, A. and S. Rothbard. 1987. Androgen induced sex-reversal of red tilapia fry stocked in cages within ponds. Bamidgeh, 39 : 49-57.
- Bernatchez, L. and J. J. Dodson. 1990. Mitochondrial DNA variation among anadromous population of cisco (*Coregonus artedii*) as revealed by

- restriction analysis. Can. J. Fish. Aquat. sci., 47 : 533-543.
- Billington, N. and P. D. N. Hebert. 1988. Mitochondrial DNA variation in Great Lakes Walleye (*Stizostedion Vitreum*) populations. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45 : 643-654.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. "Evolution of genes and proteins" eds. M. Nei and R. K. Koehn, sinauer Sanderland, Mass. pp. 62-88.
- Brown, W. M., George, Jr. and A. C. Willson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 1967-1971.
- Chirico, W. J., M. G. Waters and G. Blobel. 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsome. Nature, 333 : 805-810.
- Chourrout, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids and hetero-zygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture, 36 : 111-126.
- Chourrout, D. and E. Quillet. 1980. Induced gynogenesis in rainbow trout : sex and survival of progenies production of all-female population. Ther. Appl. Genet., 63 : 201-205.
- Chow, S. and Y. Fujio. 1985. Biochemical evidence of two types in the fresh water shrimp *Palaemon paucidens* inhabiting the same water system. Nippon Suisan Gakkaishi, 51 : 1451-1460.
- Clemens, H. P. and T. Inslee. 1968. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex reversed with methyltestosterone. Trans. Am.

- Fish. Soc., 97 : 18~21.
- Conover, D. O. and M. H. Fleisher. 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in Atlantic silverside, *Menidia menidia*, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43 : 514~520.
- Craig, E. A. 1985. The heat shock response. CRC Crit Rev Biochem., 18 : 239-280.
- Ferris, S. D., R. D. Sage, C-M. Huang, J. T. Nielsen, U. Ritte and A. C. Wilson. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Genetics, 80 : 2290-2294.
- Fidhiyany, L., A. Kijima and Y. Fujio. 1988. Genetic divergence between two types in *Palaeman paucidens*. Tohoku J. Agr. Res., 39 : 39-45.
- Fujio, Y. 1984. Study on genetic characteristics of fish and shellfishes in isozyme analysis. Nosuisho Tokubetsu Shiken, pp.65.
- Gall, A. E. 1983. Genetics of fish: A summary of discussion. Aquaculture, 33 : 383~394.
- Goudie, C. A., B. D. Render, B. A. Simco and K. B. Davis. 1983. Feminization of channel catfish by oral administration of steroid sex hormones. Trans. Am. Fish. Soc., 112 : 670~672.
- Guerrero, R. D. 1975. Use of androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans. Am. Fish. Soc., 104 : 342~348.
- Gupta, N. N. and K. Yamamoto. 1971. Electron microscope study on the fine structure changes in the oocyte of goldfish, *Carassius auratus*, during yark formation stage. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 22 : 187-205.
- Guraya, S. S. 1986. The Cell and Molecular Biology for Fish Oogenesis. Karger, 184 p

- Hahn, G. M. and G. C. Li. 1990. Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. In: Stress proteins in Biology and Medicine. Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (eds.). Cold Spring Harbor, New York : Spring Harbor Laboratory Press, pp. 79-100.
- Hunter, D. A. and E. M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. Fish Physiology, Vol. IX (B), (Hoar W. S., D. Randall and E. M. Donaldson). Academic Press, New York, p. 223 ~303.
- Ikeda, M., A. Kijima and Y. Fujio. 1991. Genetic divergence between two subspecies in *Parutya compressa* (Decapoda ; Atyidae). Nippon Suisan Gakkaishi, 58 : 819-824.
- Jalabert, B., R. Billard and B. Chevassus. 1975. Preliminary experiments on sex control in trout: Production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 15 : 19~28.
- Jo, J.-Y. 1988. Effects of 17α -methyltestosterone on diet of sex reversal, growth, body composition and gonadosomatic indices of *Tilapia aurea* and on sex reversal and growth of *T. nilotica*. Ph. D. Thesis, Auburn Univ., Alabama.
- Johansen, S., P. H. Guddal and T. Johansen. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Nucleic Acid. Res. 18, 411-419.
- Johnstone, R., T. H. Simpson and A. F. Youngson. 1978. Sex reversal in salmonid culture. Aquaculture, 13 : 115~134.
- Kijima, A., N. Taniguchi and A. Ochiai. 1988. Genetic divergernce and

- morphological difference between the spotted and common mackerel. Japan. J. Ichthyol., 33 : 151-161.
- Kijima, A., N. Taniguchi and A. Ochiai. 1986. Genetic divergence and relationship among fifteen species of genera *Trachurus*, *Decapterus*, *Selar* and *Selaroides*. Japan. J. Ichthyol., 33 : 167-175.
- Korner, A. 1965. Nucleotide sequence of cDNA encoding the pregrowth hormone of red sea bream (*Pagrus major*). Recent Prog. Horm., 21 : 75-89.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
- Lincoln R. F., D. Aulstad and A. Grammeltvedt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. Aquaculture, 4 : 287~297.
- Lovell, R. T. 1994. Development in nutrition and feeding freshwater fish. Proceeding of FOID, '94 The Third International Conference on Fisheries and Ocean Industrial Development for Productivity Enhancement of the Coastal Waters, pp 155-190.
- Mirza J. A. and W. L. Shelton. 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. Aquaculture, 68 : 1~14.
- Momota, H., R. Kosugi, H. Ohgai, A. Hara and H. Ishioka. 1988a. Amino acid sequence of flounder growth hormone deduced from a cDNA sequence. Nucleic Acids Res., 16 : 10362 p.
- Momota, H., R. Kosugi, H. Hiramatsu, H. Ohgai, A. Hara and H. Ishioka. 1988b Nucleic Acids Res., 16 : 3107 p.
- Nagy A., K. Rajiki, L. Horvath and V. Csany. 1978. Investigation on carp,

- Cyprinus carpio*, gynogenesis. J. Fish Biol., 13 : 215~224.
- Nagy, A., M. Bercsenyi and V. Csanyi. 1981. Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38 : 725~728.
- Nakamura, M. and M. Iwahashi. 1982. Studies on the practical masculinization in *Tilapia mossambica* by the oral administration of androgen. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48 : 763~769.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetic and evolution. north-holland, Amsterdam and New York, 288 p.
- Niall, H. D., M. L. Hogan, R. Saver, I. Y. Rosenblum and F. C. Greenwood. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones : evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 68 : 866-869.
- Okada, H. 1973. Studies on sex differentiation of Salmonidae-I, Effects of estrogen on sex differentiation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus* Gibbons). Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery, 28 : 11~21.
- Onozato H. 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. Aquaculture, 43 : 91~97.
- Onozato H. and E. Yamaha. 1983. Induction of gynogenesis with ultraviolet rays in four species of salmoniforms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49 : 693~699.
- Ohara, I. and K. Mori. 1989. Cloning and Characterization of Mitochondrial DNA from the Japanese Oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 16 : 89-99.
- Oshiro, T. 1987. Sex ratios of diploid gynogenetic progeny derived from five

- different females of goldfish. Nippon Suisan Gakkaishi, 53 : 1899 p.
- Ovenden, J. R., and R. W. G. White. 1990. Mitochondrial and allozyme of uncipient speciation in a landlocked population of *Galaxias truttaceus* (Pisces: Galaxiidae). Genetics, 124 : 701-716.
- Ovenden, J. R., R. Bywater and R. W. G. White. 1993. Mitochondrial DNA nucleotide sequence variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) brown trout (*S. trutta*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) from Tasmania, Australia. Aquaculture, 114 : 217-227.
- Palva. T. K., and E. T. Palva. 1987. Restriction site polymorphism in mitochondrial DNA of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. stocks in Finland. Aquaculture, 67 : 283-289.
- Pandian, T. J. and K. Varadaraj. 1987. Techniques to regulate sex ratio and breeding in tilapia. Curr. Sci., 56 : 337~343.
- Park, J. Y., A. Kijima and Y. Fujio. 1990. Genetic differentiation and variability between and within brown sole and marbled sole in the genus *Limanda*. Tohoku J. Agr. Res., 41 : 9-23.
- Park, J. Y. and A. Kijima. 1991. Genetic variability and differentiation within and between stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and the starry flounder (*Platichthys stellatus*). Tohoku J. Agr. Res., 41 : 69-81.
- Park, J. Y. 1992. The inter-species difference of isozyme gene and mitochondrial DNA in Pleuronectid. Ph. D. Dissertaiton. Tohoku University, Japan, pp. 133.
- Park, J. Y., A. Kijima and Y. J. Kang. 1994. Genetic divergence of two types finespotted flounder, *Pleurontichthys cornutus*, distributed in the Japan

- sea area. Bull. Kor. Fish. Soc., 27 : 306-313.
- Purdom, C. E. 1969. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. Heredity, 24 : 431~444.
- Raben, M. S. and C. H. Hollenberg. 1960. Ciba Found. Endocrinolo., 13 : 89-101.
- Rentier-Delrue, F., D. Swennen, J. C. Philippart, C. L'hoir, M. Lio, O. Benrubi and J. A. Martial. 1989. Molecular cloning and abaracterization of two forms of trout growth hormone cDNA : expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. DNA, 8 : 271-278.
- Saito, A., S. Sekine, Y. Komatsu, M. Sato, T. Hirano and S. Itoh. 1988. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and it's expression in *Escherichia coli*. Gene, 73 : 545-551.
- Sato, N., K. Watanabe, K. Murata, M. Sakaguchi, Y. Kariya, S. Kimura, M. Nonaka and A. Kimura. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. Biochemi. Biophys. Acta, 949 : 35-42.
- Schweigert, J. F. and R. E. Withler. 1990. Genetic differntialtion of pacific herring based on enzyme electrophoresis and mitochondrial DNA analysis. Am. Fish. Soc. Symp., 7 : 459-469.
- Sekine, S., T. Mizukami, T. Nishi, Y. Kuwana, A. Saito, M. Sato, S. Itoh and H. Kawauchi. 1985. Cloning and sequence of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Sci. USA., 82 : 4306-4310.
- Selman, K. and R. A. Wallace. 1989. Celluar aspects of oocyte growth in teleostes. Zool. Sci., 6 : 211-231.

- Shaklee, J. B. and C. P. Keenan. 1986. A practical laboratory guide to the techniques and methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. CSIRO marine laboratories, CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 59.
- Shaklee, J. B., F. W. Alendorf, D. C. Morizot and G. S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 119 : 2-15.
- Simpson, T. H., R. Johnstone and A. F. Youngson. 1976. Sex reversal in salmonids. *Int. Counc. Explor. Sea CM/E*, 48 : 6 p.
- Stanley, J. G. 1976. Production of hybrid, androgenetic, and gynogenetic grass carp and carp. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 105 : 10-16.
- Sugama K., N. Taniguchi, S. Seki, H. Nabeshima and Y. Hasegawa. 1990. Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 : 1427~1433.
- Suzuki, R., T. Nakanishi and T. Oshiro. 1985a. Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguilicaudatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51 : 889~894.
- Suzuki R., T. Oshiro and T. Nakanishi. 1985b. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach *Misgurnus anguilicaudatus*. *Aquaculture*, 48 : 45~55.
- Tabata K. 1991. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms 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 hirame *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage reference to their survival and growth. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 : 1867~1872.
- Tanaka, H. 1988. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 13 : 17~23.
- Thomas, W. K., R. E. Withler, and A. T. Reckeubach. 1986. Mitochondrial DNA analysis of pacific Salmonid evolution. Can. J. Zool., 64 : 1058-1064.
- Thorgaard G. H., M. E. Jazwin and A. R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc., 110 : 546~550.
- Varadaraj, K. and T. J. Pandian. 1987. Masculinization of *Oreochromis mossambicus* by administration of 17-methyl-5-androsten-3-17-diol through rearing water. Current Science, 56 : 412~413.
- Varadaraj, K. 1990. Production of monosex male *Oreochromis mossambicus* (Peters) by administering 19-noretisterone acetate. Aquaculture and Fisheries Management, 21 : 133~135.
- Wilson G. M., W. K. Thomas and A. T. Beckenbach. 1985. Intra- and Inter-specific mitochondrial DNA sequence divergence in salmo: rainbow, steelhead, and cutthroat trouts. Can. J. Zool., 63 : 2088-2094.
- Yamamoto, T. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool., 123 : 571~594.
- Yamamoto, K. and F. Yamazaki. 1961. Rhythum of development in the

- oocyte of the goldfish, *Carassius auratus*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 12 : 93-110.
- Yamamoto, K. and H. Yoshioka. 1964. Rhythm of development in the oocyte of the medaka, *Orizyas latipes*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 15 : 5-19.
- Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture, 33 : 329~354.
- Yokogawa, K. and S. Seki. 1995. Morphological and genetic differences between Japanese and Chinese sea bass of the genus *Lateolabrax*. Japan.J. Ichthyol., 41 : 437-445.
- 김경길. 1994. 넙치와 범가자미의 잡종에 대한 세포 유전학적 및 분자생물학적 연구. 부산수산대학교 박사학위 청구논문. 110 pp.
- 김동수 · 정성채 · 박승렬 · 이종관. 1988. 넙치에 대한 세포유전학적 및 유전생화학적 연구. 수진연구보고, 42 : 135~142.
- 김동수 · 김종현 · 조재운 · 문영봉 · 조기채. 1993a. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 자성발생성 이배체 유도. 한국유전학회지, 15 : 179~186.
- 김동수 · 문영봉 · 정창화 · 김봉석 · 이영돈. 1994. 전암컷 2배체 및 3배체 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생산. 한국양식학회지, 7(3) : 159-164.
- 김 윤 · 허성범. 1991. 수온과 광주기 조절에 의한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 산란유도. 한국양식학회지, 4(2) : 85-95.
- 김 윤 · 김경길 · 방인철 · 이종관. 1993b. 넙치 전암컷 집단 생산을 위한 연구 I. 자성발생성 이배체 유도 및 성장. 한국양식학회지, 6(4) : 285-293.
- 노충환. 1995. 17 α -methyltestosterone의 침적법에 의한 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 성전환. 부산수산대학교 석사학위 청구논문.
- 민병서. 1987. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 종묘생산에 관한 연구. 부산수산

- 대학 박사학위 청구논문. 175 pp.
- 방인철 · 김 윤 · 김경길 · 이종관. 1995. 넙치 전암컷 집단의 생산을 위한 연구.
 II. 호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환. 수진연구보고, 49 : 49~57.
- 방인철 · 김경길 · 김 윤 · 김종현. 1996. 넙치 전 암컷 집단의 생산을 위한 연
 구 III. 성전환된 자성발생성 2배체 수컷의 자손 검정. 한국양식학회지,
 9(2) : 125- 132.
- 이영돈. 1990. 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)의 성분화
 와 생식소 발달. 박사학위 청구논문, 부산수산대학교, 부산, 41 pp.
- 이종윤 · 이상민 · 전임기. 1995. 조피볼락의 배합사료 개발을 위한 대조사료
 효과 : 생사료 및 moist pellet과의 비교. 한국양식학회지, 8(4) : 261-269.
- 정문기. 1977. 한국어도보. 일지사, 서울, pp. 557~560.
- 해양수산부, 1997. 해양수산통계연보. 해양수산부, pp 1000~1054.
- 廣瀬慶二. 1982. 4. 卵の成熟と産卵, 魚介類の成熟・産卵の制御(日本水産學會
 編). 恒星社厚生閣, 東京, pp 50-63.
- 高橋裕哉 1981. 性分化と性轉換-魚類·兩生類, ホルモンと生殖(日本比較内分泌
 學會編). 學會出版センター, 東京, pp. 23~58.
- 高野和側. 1974. 3. 生殖腺の形成過程, 魚類の成熟と産卵(日本水産學會編). 恒星
 社 厚生閣, 東京, 18-30.
- 高野和則. 1989a. 精巢の構造と配偶者形成, 水族繁殖學(降島史夫,羽生 功 編),
 綠書房, 東京, 35-64.
- 高野和則. 1989b. 卵巢の構造と配偶者形成, 水族繁殖學(降島史夫,羽生 功 編),
 綠書房, 東京, 3-34.
- 熊井輝雄 · 中村元二. 1971. 養殖ヒラメ1年魚からの採卵と子魚飼育. 1971年度日
 本水産 學會秋季講演要旨集, 1-2.
- 木島明博. 1991. ミトコンドリアDNAによる魚介類の集團解析および育種への應

- 用.水産育種, 16 : 9-17.
- 木島明博・谷口順彦・坂東喜久・雄向井龍男. 1990. アルカリ処理法によるウナギ, コイ, アユのミトコンドリア DNA (mtDNA)の単離と塩基代数の推定. 水産育種, 15 : 51-57.
- 原田輝雄・村田修・宮下盛・小田誠二・清水清和・上野紘一. 1983. 養殖ヒラメの雌雄による成長度の相違について. 昭和58年度日本水産學會春期大會講演.
- 伊島時郎・阿部登志勝・平川京三郎・鳥島嘉明. 1986. 長日処理によるヒラメの早期採卵. 栽培技研, 15(1) : 57-62.
- 林 純一. 1990. 高等動物のミトコンドリアDNAとその生理的役割. 蛋白質核酸酵素, 35(3) : 252 -254.
- 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, pp. 134.
- 田畑和男. 1992. ヒラメの雌性發生性轉換雄と通常雄との交配により作出した子孫個體群の飼育特性. 兵庫水試研報, 30 : 25-35.
- 田畑和男・五利江重昭・中村一彦. 1986. 紫外線によるヒラメの雌性發生2倍體の誘起條件. 日水誌, 52 : 1901~1904.
- 田畑和男・五利江重昭. 1987. 低溫ショックによるヒラメの雌性發生2倍體誘起におよぼす有効水溫範圍について. 兵庫水試研報, 25 : 33~35.
- 田畑和男・五利江重昭. 1988. 同一水曹内飼育による雌性發生2倍體と正常發生ヒラメの成長比較. 日水誌, 54(7) : 1143-1147.
- 田中秀樹. 1987. ヒラメの生殖腺の性分化過程. 養殖研報, 11 : 7~19.
- 中本幸一・小野山弘. 1985. 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について. 兵庫水試研報, 23 : 57~61.
- 平本義春・小林啓二. 1979. ヒラメ種苗生産について. 栽培技研, 8(1) : 41-51.