



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수산학석사 학위논문

전수컷 자성발생성 킹넵치 생산



2016년 2월

부경대학교 글로벌수산대학원

양식학과

강 경 립



수산학석사 학위논문

전수컷 자성발생성 킹넙치 생산

지도교수 남 윤 권

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함

2016년 2월

부경대학교 글로벌수산대학원

양식학과

강 경 립

이 논문을 강경림의 수산학석사 학위논문으로
인준함

2015년 12월



주 심 이 학 박사 김 동 수

위 원 농 학 박사 공 승 표

위 원 수 산 학 박사 남 윤 권



목 차

목차	I
표 목차(List of Tables)	III
그림 목차(List of Figures)	IV
영문요지(Abstract)	VI
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험어	3
2. 방법	3
2-1. 킹넵치의 세포유전학적 분석	3
2-1-1. DNA 함량 분석	3
2-1-2. 적혈구 세포 및 핵의 크기 측정	3
2-1-3. 염색체 수 분석	3
2-1-4. Nuclear organizer regions (NORs) 분석	4
2-2. 자성발생성 2배체 유도	4
2-2-1. 정자의 불활성화 및 저온처리	4
2-2-2. 후기 발생배체 및 부화자어 관찰	4
2-2-3. 후기 배체 발생 관찰 및 초기생존율 분석	5
2-2-4. 자성발생성 2배체의 세포유전학적 분석	5

2-3. 자성발생성 2배체 킹넵치 집단의 성전환 유도	5
2-3-1. 융성화 호르몬을 첨가한 사료의 제조	5
2-3-2. 성전환을 위한 수온 조절 및 호르몬 첨가 사료 공급	5
2-3-3. 생식소의 조직학적 관찰	6
III. 결과	7
1. 킹넵치의 세포유전학적 특성	7
1-1. DNA 함량 분석	7
1-2. 적혈구의 세포 및 핵의 크기	9
1-3. 염색체 수 분석	11
1-4. 킹넵치의 Ag-NORs 분석	13
2. 자성발생성 2배체 유도	14
2-1. 자성발생성 2배체 유도 조건 확인	14
2-2. 후기 발생배체 관찰 및 초기생존율 분석	16
2-3. 세포유전학적 분석	18
3. 자성발생성 2배체 킹넵치 집단의 성전환 유도	20
3-1. 생식소의 조직학적 관찰	20
IV. 고찰	21
V. 요약	25
감사의 글	26
참고문헌	27

표 목차(List of Tables)

Table 1. DNA contents of *Paralichthys olivaceus* determined by flow cytometry 8

Table 2. Comparison of cell and nuclear sizes of *Paralichthys olivaceus* 10

Table 3. Survival embryo and inductivity of gynogenetic diploid in gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus* 16

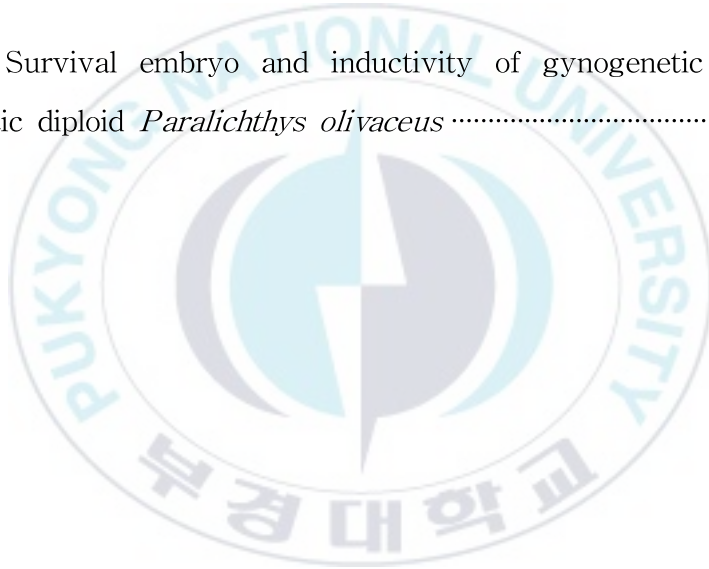


그림 목차(List of Figures)

Fig. 1. Flow cytometric histograms for DNA content in <i>Paralichthys olivaceus</i>	7
Fig. 2. Photographs of erythrocytes of <i>Paralichthys olivaceus</i>	9
Fig. 3. Mitotic index of <i>Paralichthys olivaceus</i>	11
Fig. 4. Metaphase of <i>Paralichthys olivaceus</i>	12
Fig. 5. Metaphase(a) and Silver-stained metaphases(b) of <i>Paralichthys olivaceus</i>	13
Fig. 6. External morphology of embryonic development and just-hatched larva of gynogenetic diploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	14
Fig. 7. Flow cytometric histograms for DNA content in gynogenetic diploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	15
Fig. 8. Embryonic Development of gynogenetic diploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	17
Fig. 9. Flow cytometric histograms for DNA content in diploid control(a) and gynogenetic diploid(b) <i>Paralichthys olivaceus</i>	18

Fig. 10. Photographs of metaphase(a) and erythrocytes(b) of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*. 19

Fig. 11. Gonads of sex-reserved gynogenetic diploid males at 6 months after hatching. 20



Production of gynogenetic male in KingNupchi strain of olive flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

Kyung Lim Kang

Department of Aquaculture
Graduate School of Global Fisheries
Pukyong National University

Abstract

Gynogenetic diploid male (XX male) in KingNupchi strain of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* was induced for producing all-female triploid populations.

A cytogenetic analysis on KingNupchi used in this study showed that its DNA contents were 0.71 ± 0.03 pg/haploid cell, which is just the same that of typical olive flounder. The nuclear surface area and volume on erythrocyte were estimated at $6.83 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$ and $10.97 \pm 1.14 \mu\text{m}^3$, respectively. Also, the chromosome number of the KingNupchi strain showed $2n=48$. The chromosome nucleolar organizer regions (NORs) were placed in the short arm of the largest acrocentric chromosome pairs.

Gynogenetic diploids were induced by cold shock (2°C for 45 minutes from 3 min after insemination) to fertilized egg with genetically inactivated sperm ($4,000\text{--}4,500 \text{ erg/mm}^2$ of UV).

To produce gynogenetic diploid male (XX), feeding treatment containing 17α -methyltestosterone ($1 \mu\text{g/g}$) and high water temperature treatment (25°C) were applied for 40 days from the 37th day after hatching. In order to examine sex ratios, histological analysis were conducted on 12 fish six

months after hatching. Their gonads showed that fully matured spermatozoa were observed in their testes.



I. 서론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목 넙치과에 속하고 한국, 일본 중국을 포함하는 아시아에서 양식되는 중요한 어류 중 하나이다(Zheng & Sun, 2011). 본 종은 풍미 및 조직감이 뛰어나 횡감용으로 이용되어지는 대표적인 백색어류이다(Yoon et al., 2015). 국립수산물과학원 육종연구센터는 넙치 양식산업의 생산성 및 경제성 향상을 위해 2004년부터 넙치 선발육종 연구를 수행하여 2011년 속성장 육종 넙치를 개발하고 킹넙치(KingNupchi)로 명명한 바 있다.

넙치는 암컷의 성장이 수컷에 비해 빨라 넙치 양식 산업의 경제성 향상을 위해 전암컷 집단을 생산하기 위한 방법으로 첫째, 자성발생성 2배체 유도 방법 둘째, 자성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환 방법 셋째, 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 교배에 의한 방법이 알려져 있다(Bang et al., 1996). 이 중 자성발생성 2배체 유도 방법은 대량생산이 어렵고, 자성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환은 발암물질인 에스트로겐 계통의 성호르몬 사용으로 인해 어체 내 여성호르몬이 축적되며 주위 수계 환경을 오염시키는 문제점이 있는 것으로 보고되어 있다(Kim et al., 1993b; Gall, 1983). 이에 전암컷 집단을 대량 생산하기 위해 성전환된 자성발생성 2배체 수컷(pseudo-male)과 대조군 암컷과의 교배에 의한 방법이 가장 적합한 것으로 알려져 있다(Tabata, 1991a). 이에 Kim et al. (1993b)은 국내산 넙치의 전암컷 집단 생산을 위해 유전적으로 불활성화된 참돔 정자와 넙치 암컷과의 교배를 통해 자성발생성 2배체를 유도한 바 있고, Kim et al. (1993a)은 감성돔 정자를 자외선으로 불활성화시킨 후, 정상 넙치 난과 수정시켜 자성발생성 2배체를 유도한 바 있다.

자성발생성 2배체의 전수컷 생산을 위해 Kim et al. (1996)은 부화 후

35일부터 65일간 27℃의 고수온 처리하여 42.4%의 수컷을 유도한 바 있고, Bang et al. (1996)은 부화 후 30일부터 60일간 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) 100 ppb 농도로 침지 처리하여 100% 수컷으로 유도한 후 전암컷 집단을 생산한 바 있다. 그러나 Jeong et al. (1996)은 환경에 영향을 주지 않는 대한민국 특허 제 10-1996-0039105호에 의거 26℃의 고수온 처리 및 사육 밀도 조절을 통해 전수컷 자성발생성 넙치를 생산한 후 이들의 정자와 대조군의 난을 수정하여 전암컷 2배체와 3배체 집단을 성공적으로 생산한 바 있다.

이에 본 연구는 선발육종을 통해 생산된 킹넙치(KingNupchi) 불임 종묘의 수출을 위한 Golden Seed Project 사업의 일환으로 전암컷 3배체 집단을 생산하기 위해, 그 첫단계로 자성발생성 킹넙치 2배체를 유도한 후 웅성화 호르몬과 고수온 처리 방법을 병용하여 전수컷 자성발생성 킹넙치를 생산함으로써 전암컷 3배체를 대량생산할 수 있는 XX 수컷을 확보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

본 실험에 사용된 넙치는 국립수산물과학원 육종연구센터에서 선발육종 기법을 통하여 생산된 킹넙치(KingNupchi) 2가계(G3 및 G5)를 사용하였다.

2. 방법

2-1. 킹넙치의 세포유전학적 분석

2-1-1. DNA 함량 분석

킹넙치의 꼬리지느러미를 균질기로 세포를 파쇄한 후, Jung et al. (2014)의 방법론에 따라 핵막 제거 및 염색 과정을 수행하였다. 염색된 시료들은 PartecPA-II flow cytometry (Partec Co., Münster, Germany)를 이용 분석하였다.

2-1-2. 적혈구 세포 및 핵의 크기 측정

킹넙치의 미부정맥으로부터 혈액을 채취한 뒤, 슬라이드 글라스에 도말 하여, 100% 에탄올에서 고정한 다음, sorenson buffer로 희석한 5% Giemsa 염색용액에 10분간 염색하였다. 킹넙치 한 개체 당 10개 이상의 적혈구 세포와 핵의 장경과 단경을 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan)하에서 micrometer를 사용하여 400배의 배율로 측정하였다. 표면적은 $\text{장경} \times \text{단경} \times \pi / 4$, 부피는 $4(\text{장경}/2) \times (\text{단경}/2)^2 \times \pi / 3$ 의 공식에 의하여 계산하였다.

2-1-3. 염색체 수 분석

킹넙치에 colchicine을 5-10 $\mu\text{g/g}$ 체중의 용량으로 복강 주사하여 4시간

동안 방치한 후, 신장을 적출 세절하여 상온에서 저장액(0.075 M KCl)에 10분간 처리하고 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸쳐 15분씩 고정하였다. 슬라이드 표본은 공기건조법으로 작성하였고, 5% Giemsa 용액에 15분간 염색하여 광학현미경에서 중기 염색체 상을 관찰하였다.

2-1-4. Nuclear organizer regions (NORs) 분석

킹넵치의 염색체 슬라이드 표본에 2% gelatin 용액과 50% silver nitrate 용액을 혼합하여 떨어뜨리고 57℃의 슬라이드 건조기에서 발색 반응을 수행하였다. 발색반응이 완료된 슬라이드는 증류수로 세척한 뒤 광학현미경으로 NORs 위치를 확인하였다.

2-2. 자성발생성 2배체 유도

2-2-1. 정자의 불활성화 및 저온처리

킹넵치 정자의 유전적 불활성화를 위해서 4,000-4,500 erg/mm²의 자외선을 정자에 조사하고 이들과 정상 난자를 습식법으로 인공수정하였다. 수정란의 제 2극체 방출 억제를 위해 수정 3분후 2℃에서 45분간 저수온 자극 처리를 한 뒤, 16±1℃의 수온에서 부화시켰다.

2-2-2. 후기 발생배체 및 부화자어 관찰

킹넵치 정자를 이용한 자성발생성 2배체 처리군의 후기 발생 배체 및 부화자어를 해부현미경(AZ100; Nikon Co., Japan)을 이용하여 관찰하고, 이에 부착된 디지털 카메라(DS-R1; Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다.

2-2-3. 후기 배체 발생 관찰 및 초기생존율 분석

자성발생성 2배체 처리군은 $16\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 부화수조에서 발생을 유도하였으며, 대조군과 처리군에서 5 cc의 알을 확보하여 초기생존율을 확인하였다.

2-2-4. 자성발생성 2배체의 세포유전학적 분석

DNA 함량은 자성발생성 이배체 처리군의 부화자어를 대상으로 분석하였으며, 적혈구 핵의 크기 측정 및 염색체 수 분석은 부화 후 6개월된 개체를 대상으로 분석하였다. 이들 분석은 킹넵치 세포유전학적 분석 방법과 동일하게 수행되었다.

2-3. 자성발생성 2배체 킹넵치 집단의 성전환 유도

2-3-1. 웅성화 호르몬을 첨가한 사료의 제조

넵치 양어사료(Marubeni nisshin Co., Japan)에 웅성화 호르몬 17 α -methyltestosterone(17 α -MT)을 첨가하여 성전환 유도용 사료를 제조하였다. 사료 100 g당 17 α -MT 50 μL (2,000 $\mu\text{g/mL}$)를 100% 에탄올(Merk. USA)에 희석하여 분무기로 골고루 분무하였으며 이들은 그늘진 곳에서 완전히 건조시킨 후 사용되었다.

2-3-2. 성전환을 위한 수온 조절 및 호르몬 첨가 사료 공급

웅성화 호르몬이 첨가된 사료를 매일 5회씩 반복으로 40일간 공급하였다. 성분화가 일어나는 시점인 부화 후 37일부터 호르몬 사료의 공급 이외에 추가로 고수온 처리를 실시하였다. 부화 후 1개월부터 사육수 온도를 매일 1°C 씩 7일간 상승시켜 25°C 의 수온에서 40일간 처리하였다.

2-3-3. 생식소의 조직학적 관찰

성전환을 분석을 위해 부화 후 6개월 된 자성발생성 2배체 처리군 12 개체를 무작위로 채집하여 조직학적 분석을 실시하였다. 이들 12개체로부터 생식소를 적출하여 4% formaldehyde에 고정한 뒤, 파라핀 절편법에 따라 표본을 작성하였다. 표본은 6 μm 의 두께로 연속 절편하여, hematoxylin과 eosin으로 염색한 후, 광학현미경하에서 검경하였고, 광학현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 킹넙치의 세포유전학적 특성

1-1. DNA 함량 분석

미꾸라지의 꼬리지느러미(1.4 pg/haploid cell)를 대조군으로 사용하여 킹넙치의 DNA 함량을 분석한 결과, 일반 넙치와 동일하게 세포 당 DNA 함량은 0.71 ± 0.03 pg/haploid cell로 나타났다(Fig. 1, Table 1).

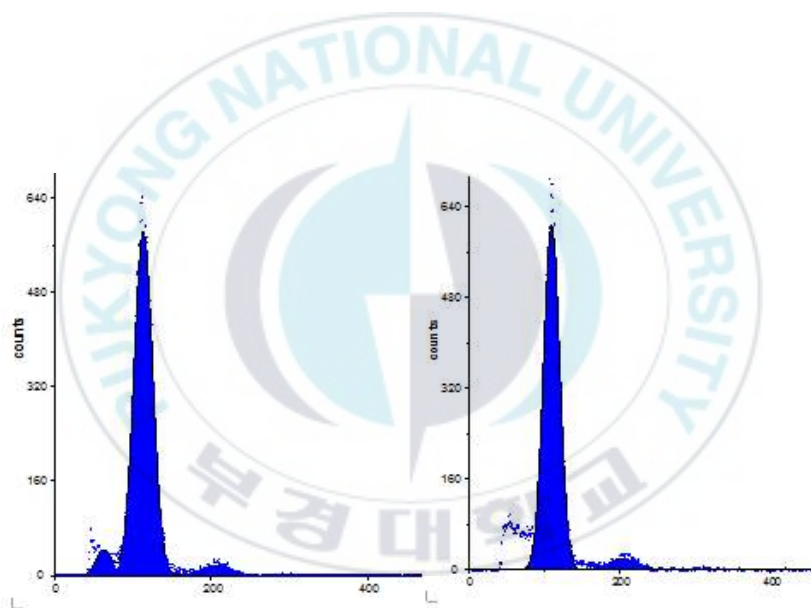


Fig. 1. Flow cytometric histograms for DNA content in *Paralichthys olivaceus*.

Table 1. DNA contents of *Paralichthys olivaceus* determined by flow cytometry

Fish No.	Channel value of mean	C-value
Con*	220.29	1.4
1	113.64	0.72
2	111.04	0.71
3	105.51	0.67
4	116.7	0.74
A/V	111.72	0.71±0.03

* *Misgurnus mizolepis* (from Park et al., 1999)

1-2. 적혈구의 세포 및 핵의 크기

킹넙치 적혈구의 세포 장경은 $9.03 \pm 0.24 \mu\text{m}$, 단경은 $4.43 \pm 0.08 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 각각 $31.39 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$ 및 $92.71 \pm 3.60 \mu\text{m}^3$ 으로 관찰되었다(Fig. 2, Table 3). 또한 적혈구의 핵의 장경은 $3.62 \pm 0.14 \mu\text{m}$, 단경은 $2.40 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 $6.83 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$ 및 $10.97 \pm 1.14 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었다(Fig. 2, Table 2).

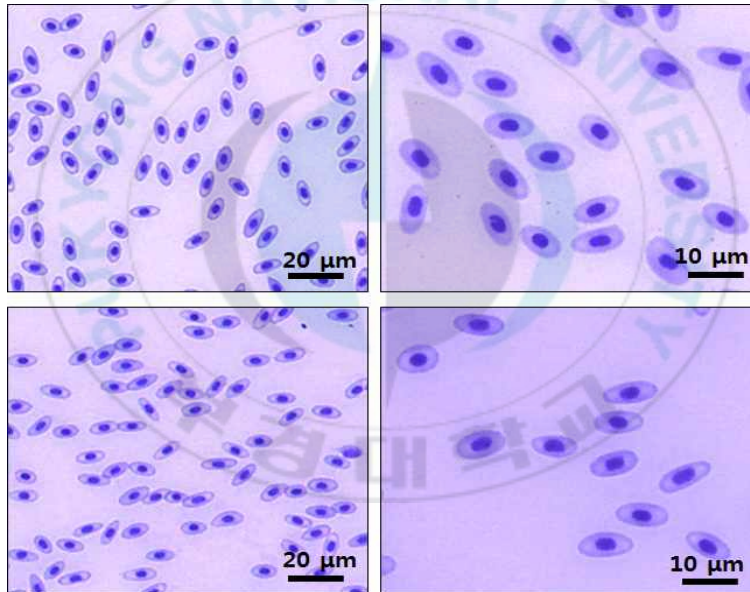


Fig. 2. Photographs of erythrocytes of *Paralichthys olivaceus*

Table 2. Comparison of cell and nuclear sizes of *Paralichthys olivaceus*

	Cell	Nucleus
Major axis(μm)	9.03 ± 0.24	3.62 ± 0.14
Minor axis(μm)	4.43 ± 0.08	2.40 ± 0.11
Surface area(μm^2)	31.39 ± 0.90	6.83 ± 0.44
Volume(μm^3)	92.71 ± 3.60	10.97 ± 1.14

1-3. 염색체 수 분석

킹넙치의 mitotic index는 매우 높게 나타났고(Fig. 3), 킹넙치 염색체 수는 $2n=48$ 개로 나타났다(Fig. 4).

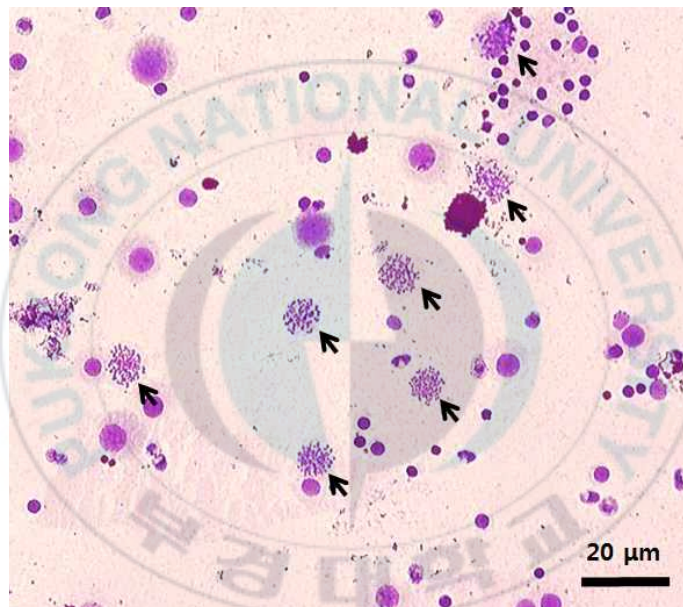


Fig. 3. Mitotic index of *Paralichthys olivaceus*



Fig. 4. Metaphase of *Paralichthys olivaceus*

1-4. 킹넙치의 Ag-NORs 분석

킹넙치의 Ag-NORs 분석 결과, 24쌍의 차단부 염색체(acrocentric chromosome) 중 가장 크기가 큰 한 쌍의 차단부 염색체의 장완 중간 부위가 NOR positive로 확인되었고, 암·수간 및 개체간의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 5).

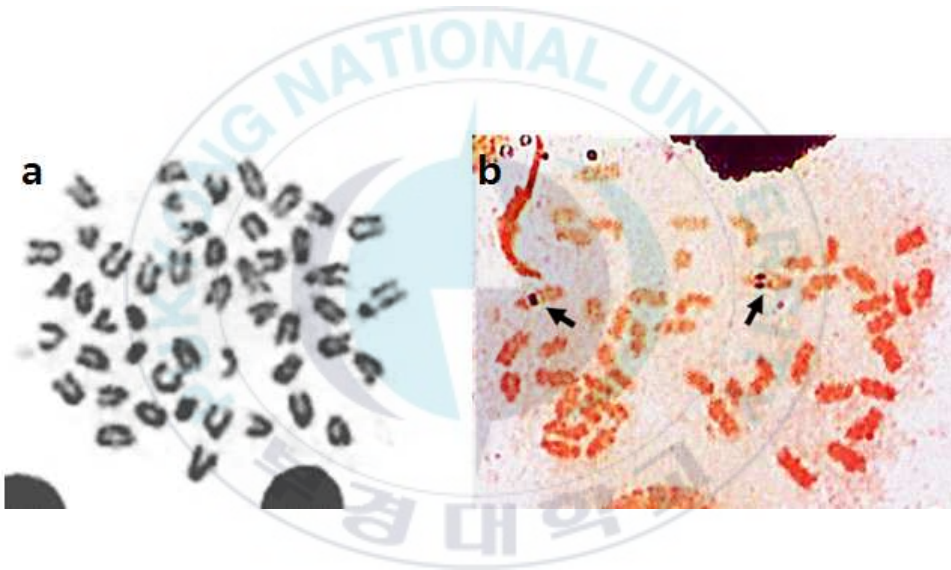


Fig. 5. Metaphase(a) and Silver-stained metaphases(b) of *Paralichthys olivaceus*. Arrows indicate silver-stained NORs signal.

2. 자성발생성 2배체 유도

2-1. 자성발생성 2배체 유도 조건 확인

유도 조건을 확인을 위해 자성발생성 2배체를 처리한 결과, 수정 4일째에 195알이 생존하였고, 수정 5일째에 170미가 부화하였다(Fig. 6). 이들 부화한 자어 중 108미를 대상으로 8회에 걸쳐 DNA 함량을 분석한 결과, 대조군 2배체 넙치와 동일(0.71 pg/haploid cell)한 것으로 확인되었다(Fig. 7).



Fig. 6. External morphology of embryonic development and just-hatched larva of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*.

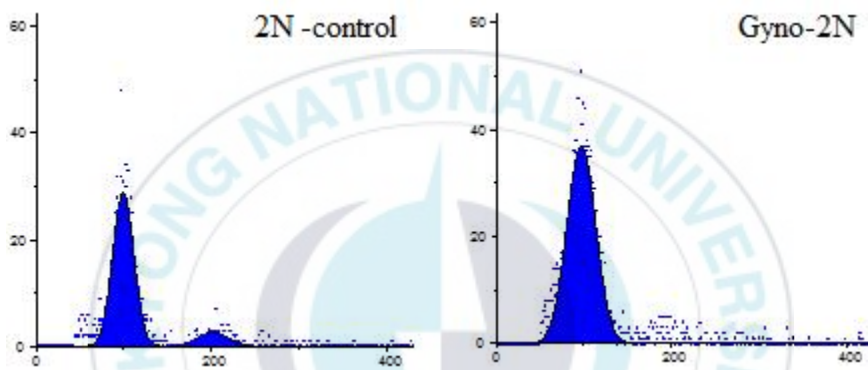


Fig. 7. Flow cytometric histograms for DNA content in gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*.

2-2. 후기 발생배체 관찰 및 초기생존율 분석

자성발생성 2배체 처리군 수정 5시간 후 발생 및 부상율을 확인한 결과, 반수체 및 2배체 대조군의 부상란은 각각 2.3 cc (3,220알) 및 4 cc (5,600알)로 관찰되었고, 자성발생성 2배체 처리군의 부상란은 2.6 cc (3,640알)로 관찰되었다(table 3). 수정 46-48시간 후 자성발생성 2배체의 발생을 관찰한 결과, 부상란은 총 717알로 확인되었고, 이 중 반수체 증후군의 형태로 발생하는 배체는 96알, 2배체 형태로 정상 발생하는 배체는 621알로 관찰되었다(Table 3, Fig. 8).

Table 3. Survival embryo and inductivity of gynogenetic diploid in gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*.

Exp. group	No. of floating egg in Cleavage stage	Segmentation stage		Inductivity (%)
		Diploid	Haploid	
Haploid control	3,220	69	321	82.3
Diploid control	5,600	3,500	-	-
Gynogenetic diploid	3,640	621	96	86.6

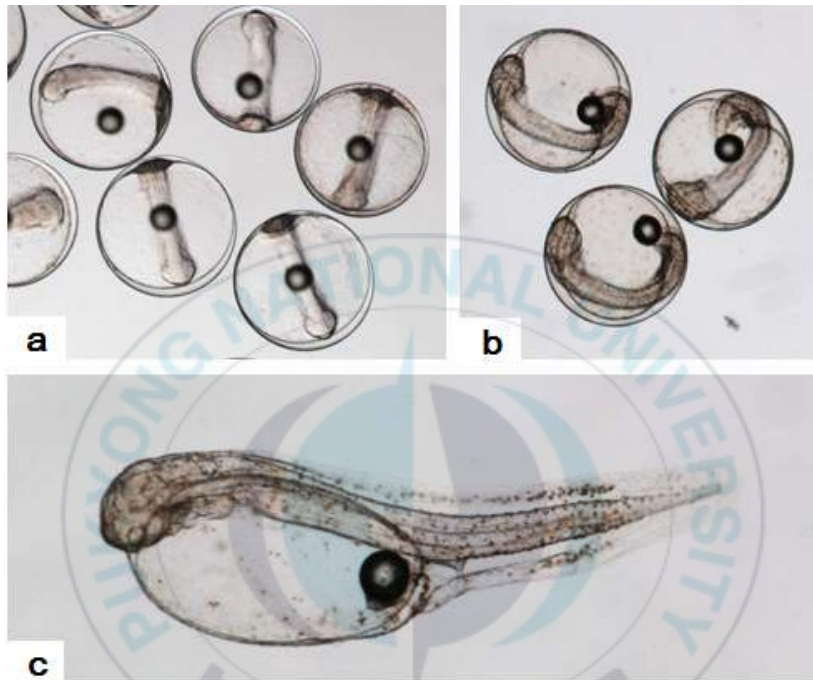


Fig. 8. Embryonic Development of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*.

2-3. 세포유전학적 분석

자성발생성 2배체 처리 4개월 후, 12개체에 대한 세포유전학적 분석을 수행한 결과, DNA 함량은 0.71 pg/haploid cell로 나타나 대조군 녀치와 동일한 것으로 확인되었다(Fig. 9). 또한 염색체 수는 $2n=48$ 개로 확인되었고, 적혈구 핵의 장경 및 단경은 $3.54\pm0.43\ \mu\text{m}$ 및 $2.35\pm0.24\ \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 $6.4\pm1.0\ \mu\text{m}^2$ 및 $10.1\pm2.3\ \mu\text{m}^3$ 으로 관찰되어 대조군 녀치와 동일한 것으로 확인되었다(Fig. 10).

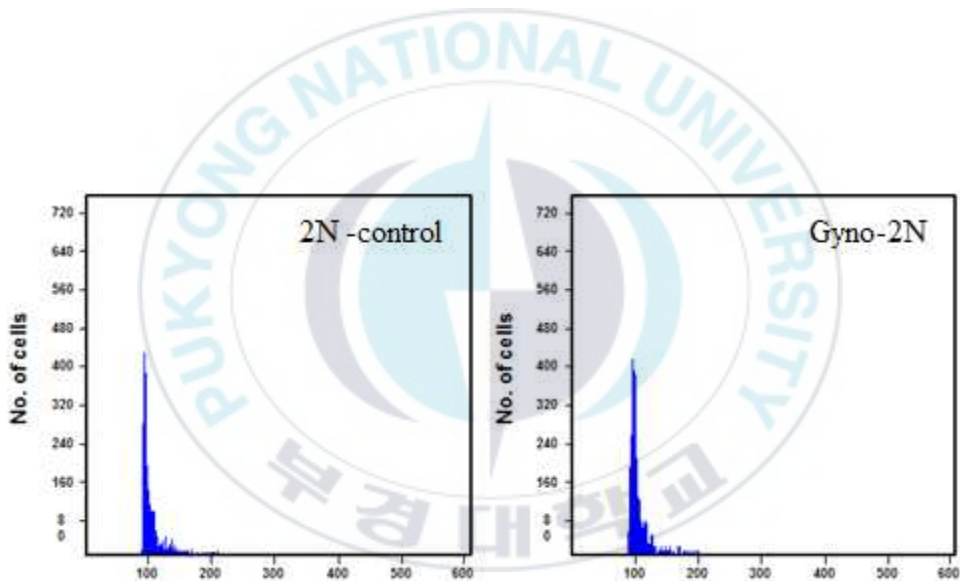


Fig. 9. Flow cytometric histograms for DNA content in diploid control(a) and gynogenetic diploid(b) *Paralichthys olivaceus*.

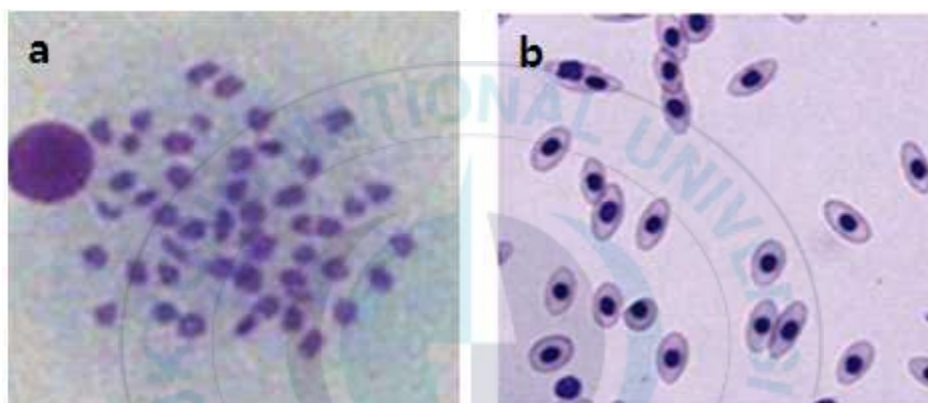


Fig. 10. Photographs of metaphase(a) and erythrocytes(b) of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*.

3. 자성발생성 2배체 킹넙치 집단 의 성 전환 유도

3-1. 생식소의 조직학적 관찰

성 전환 개체의 정소는 외형상으로 일반 넙치 수컷과 그 차이가 관찰되지 않았으며 유백색의 외형을 띄었다. 정소 조직 내에 성숙 정자들이 존재하는 것이 확인되었다(Fig. 11).

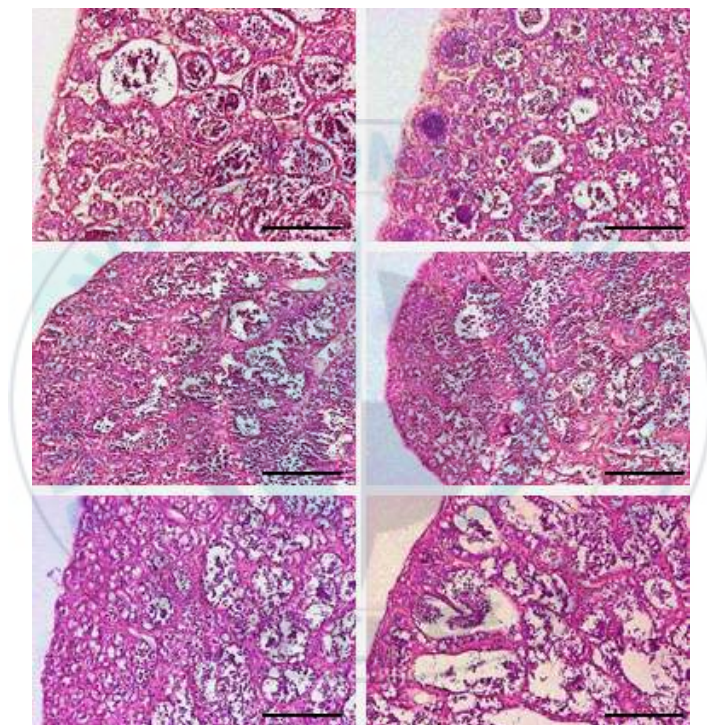


Fig. 11. Gonads of sex-reserved gynogenetic diploid males at 6 months after hatching. All scale bars indicate 50 μm.

IV. 고 찰

킹넙치는 선발육종 연구를 통해 개발된 속성장 육종 넙치로서 이들을 이용한 전수컷 자성발생성 2배체 생산하였다. 킹넙치의 세포유전학적 분석 결과, Flow cytometry를 이용한 DNA 함량은 0.71 ± 0.03 pg/haploid cell로 나타났고(Table 2), 이는 이미 보고되어 있는 넙치의 DNA 함량 (0.71 pg/haploid cell; Animal genome size database, 2014)과 동일한 것으로 확인되었다. DNA 함량은 종에 따라 고유하고, 비교적 쉽고 간단한 방법론으로 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있어 종 고유의 특성을 분석하는데 많이 사용되고 있다(Aldridge et al., 1990; Byrappa, 2003). 따라서 본 결과는 앞으로 유도될 전암컷 3배체 넙치의 DNA 함량 분석에 대조군으로 사용이 가능한 것으로 나타났다.

세포의 크기는 Genome size에 따라 변화가 나타나기 때문에 어류 적혈구의 세포 및 핵의 크기 측정법은 배수성 분석 및 잡종의 세포 유전학적 특징을 확인하는데 사용되고 있다(Sezaki, 1970; Benfey, 1989). 킹넙치의 적혈구 세포의 표면적 및 부피는 $31.39 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$ 및 $92.71 \pm 3.60 \mu\text{m}^3$, 핵의 표면적 및 부피는 $6.83 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$ 및 $10.97 \pm 1.14 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되었다. 그러나 이는 Kim et al. (1994)이 보고한 국내산 넙치 2배체의 세포 및 핵의 크기 측정 결과보다 약간 작은 것으로 나타났으나, 통계적 유의성은 없는 것으로 확인되었다.

NORs (nucleolar organizer regions)는 ribosomal RNA를 encode하는 ribosomal gene을 담고 있는 것으로, 세포의 분화 과정에서 염색체의 분열 상태에 따라서 종, 개체 및 세포 간 다양한 변이가 있는 것으로 보고 된 바 있다(Gall and Pardeu, 1969; Dobigny et al., 2002). NORs를 확인하기 위한 분석방법은 C banding, *in situ* hybridization, Ag-NORs,

CPD(Combined PI-DAPI staining) 방법 등이 있다(Sumner, 1972; Evans et al., 1974; Andras, 2000). 그 중 Ag-NORs법은 NORs의 특이 단백질 부위 및 이들의 활성도를 나타내는 방법론으로(Phillips and Ihssen, 1985), 킹넵치의 Ag-NORs 분석 결과, 가장 크기가 큰 한쌍의 차단부 염색체의 장완 중간부위에서 확인되었고, 개체간 그 크기에서 heteromorphism이 관찰되었으나, 암·수간 차이는 없었다.

자성발생성 2배체는 유전물질이 불활성화된 정자와 정상 난자를 수정하고, 수정란의 저온자극을 통해 제 2극체 방출을 억제함으로써 수컷 유전물질 없이 암컷 유전 물질만으로 개체를 생산하는 방법이다(Hulata, 2001). 이를 통해 순계를 확립이 가능하며, 암컷의 경제성이 높은 종의 경우 전암컷 집단을 유도 할 수 있어 양식 산업에도 유용하게 이용되는 방법이다(Chourrout and Quillet, 1982; Bang et al., 1996). 정자의 유전적 불활성화를 위해 이온화 및 비이온화 방사선이 이용되고 있으며(Thorgaard, 1983), 정자 불활성화를 위해 필요한 자외선 조사량은 종마다 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1993). 넵치 정자를 불활성화 하기 위해 적정 자외선량을 Tabata와 Gorie (1988)는 $4,800 \text{ erg/mm}^2$ 로 보고한 바 있고, Kim et al. (1993a)은 감성돔 정자의 경우 $4,200 \text{ erg/mm}^2$ 으로 또한 Kim et al. (1993b)은 $2,400\text{--}8,000 \text{ erg/mm}^2$ 농도로 참돔의 정자를 불활성화 시킨 바 있다. 본 연구에서는 킹넵치 정자에 자외선 $4,000\text{--}4,500 \text{ erg/mm}^2$ 을 조사한 결과 성공적으로 자성발생성 반수체가 유도됨이 확인되어 킹넵치의 정자를 불활성화 시키는데 이용이 가능한 것으로 나타났다. 본 연구에서 적정 정자의 불활성화를 위한 자외선 농도를 조사하기 위해 이용한 반수체의 유도율 분석은 반수체 증후군이 부종, 왜소증, 소두증 및 소안구 등과 같은 이형적인 특징이 관찰되므로 매우 효과적인 방법론임이 알려져 있다(Araki, 2001; Luo and Li, 2003).

본 연구에서는 유전적으로 불활성화된 정자와 정상 난을 수정한 뒤 3분 후 2℃에서 45분간 저수온 자극을 수행한 결과, 자성발생성 2배체가 유도되었음을 확인하였다. 수정란의 제 2극체 방출 억제를 위한 저온처리를 Tabata (1991b)는 0℃에서 45분간 처리한 바 있고, Kim et al. (1993a)은 2℃에서 45분간 처리한 바 있으며, Kim et al. (1993b)은 0℃, 2℃, 4℃에서 45분간 저온 처리하여 성공적인 자성발생성 2배체를 유도한 바 있다.

대부분의 어류는 성염색체를 가지고 있지 않기 때문에 조류 또는 포유류의 성결정기구인 chromosomal inheritance가 경골어류에서는 거의 적용이 되지 않고 있다(Hunter and Donaldson, 1983). 이에 어류의 경우에 유전적 성 결정(genetic sex determining; GSD) 외에 수온, 사육밀도 및 pH 등과 같은 환경요인에 의한 성결정(enviromental sex determination; ESD) 요인이 중요한 요소로 알려져 있다(Rubin, 1985). Bang et al. (1995)과 Kim et al. (1996)은 넙치의 성결정은 GSD를 기본적으로 가지면서 수온과 같은 ESD에 의한 영향을 받는 시스템을 가진다고 보고한 바 있다. 생리학적 성전환 기법은 호르몬을 어체 근육에 삽입하는 삽입법, 사료에 호르몬을 섞어 먹이는 경구 투여법 및 호르몬을 사육수에 녹여 사육하는 침지법이 주로 사용된다(Bang et al., 1996). 이러한 생리학적 성전환 기법은 호르몬의 종류, 농도, 처리시작 시간 및 처리기간 등의 요인이 중요하게 작용한다(Pandian and Sheela, 1995). 이에 본 연구에서는 17 α -methyltestosterone(17 α -MT) 첨가 사료(1 μ g/g)를 부화 후 37일부터 40일간 경구 투여하였으며, 이와 동시에 대한민국 특허 제 10-1996-0039105호의 방법론을 기초로 동일 기간 동안 25℃의 수온에서 고수온 처리하고, 자성발생성 2배체 성전환 처리군을 부화 6개월째 생식소의 조직학적 분석을 수행한 결과 성전환율이 100%로 확인되었다. Bang et al. (1996)은 국내산 넙치를 17 α -methyltestosterone(17 α -MT) 100 ppb 농도로 침지 처리하여 전수컷으로

유도한 바 있고, Kim et al. (1996)은 부화 후 35일부터 65일간 27℃의 고수온 처리하여 단 42.4%의 수컷만을 유도한 바 있다. 따라서 상기 처리방법들과 비교시 본 성전환 처리방법은 환경오염을 최소화하기 위해 저농도의 호르몬을 사용하며, 생존율에 영향을 미치지 않는 수온을 사용함으로 추후 양식 산업에 쉽게 사용 가능할 것으로 생각된다.

앞으로 유도된 전수컷 자성발생성 2배체 킹넙치를 이용하여 전암컷 3배체 집단을 대량 생산할 수 있을 것으로 사료된다.



V. 요약

본 연구는 전암컷 3배체 집단을 생산하기 위해 전수컷 자성발생성 킹넵치를 유도하였다. 킹넵치의 세포유전학적 특성을 분석한 결과, DNA 함량은 0.71 pg/haploid cell로 나타났고, 적혈구의 핵의 장경 및 단경은 $3.62 \pm 0.14 \mu\text{m}$ 및 $2.40 \pm 0.11 \mu\text{m}$, 표면적 및 부피는 $6.83 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$ 및 $10.97 \pm 1.14 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었다. 또한 킹넵치의 염색체는 일반 넵치와 동일하게 $2n=48$ 개로 확인되었고, Ag-NORs 분석에서 24쌍의 차단부 염색체(acrocentric chromosome) 중 가장 크기가 큰 한쌍의 차단부 염색체의 장완 중간부위가 NOR positive로 확인되었으며, 암·수간 및 개체간의 차이는 나타나지 않았다.

자성발생성 2배체는 자외선 조사법($4,000\text{--}4,500 \text{ erg/mm}^2$)을 이용하여 유전적 불활성화된 정자와 정상 난을 인공수정한 뒤, 수정란을 2°C 에서 45분간 저수온 처리함으로써 생산되었다. 수정 후 46-48시간 후, 자성발생성 2배체 처리군의 부상란 717알 중 정상적인 난발생을 하는 배체는 621알, 반수체 특징을 가지는 배체는 96알로 약 86.6%의 유도율을 보이는 것으로 확인되었다. 자성발생성 2배체 처리군의 DNA 함량 및 염색체 수는 대조군과 동일하게 0.71 pg/haploid cell 및 $2n=48$ 개로 관찰되었으며, 적혈구 핵의 표면적 및 부피는 $6.4 \pm 1.0 \mu\text{m}^2$ 및 $10.1 \pm 2.3 \mu\text{m}^3$ 으로 나타났다.

전수컷 자성발생성 2배체 생산을 위해 부화 후 37일부터 40일간 웅성화 호르몬 첨가사료(17 α -methyltestosterone 1 $\mu\text{g/g}$) 공급과 고수온 처리(25°C)를 수행하였고, 이들의 성전환 여부를 확인하기 위해 부화 후 6개월 된 12개체를 무작위로 채집하여 조직학적 분석을 실시한 결과, 정소는 외형상으로 일반 넵치 수컷과 차이가 관찰되지 않았고, 정소 조직 내에 성숙한 정자들이 존재하는 것이 확인되었다. 앞으로 유도된 전수컷 자성발생성 2배체 킹넵치를 이용하여 전암컷 3배체 집단을 대량 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 지도를 해주시고 학문적 사고를 가르쳐 주신 김동수 교수님, 남윤권 교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 논문을 심사해주신 공승표 교수님께 진심으로 감사드립니다. 배움의 과정동안 많이 가르쳐 주시고 따뜻한 격려 해주신 장영진 교수님, 조재운 교수님, 허성범 교수님, 배승철 교수님, 김창훈 교수님 그리고 김종명 교수님께 감사드립니다.

학위 과정 중 많은 도움을 주신 정효선님, 김연경 박사님께 감사의 마음을 전합니다. 학부생때부터 애정어린 조언과 격려를 해주신 민병화 박사님, 노경언 박사님께 깊은 감사를 드리며, 관심가지고 지켜봐주시는 임한규 교수님, 장운정 박사님, 김문진 선배님 감사합니다. 그리고 따뜻한 마음으로 저를 아껴주시는 선배님들과 후배님들께 진심으로 감사의 말씀을 전합니다. 힘이 되어주는 지선, 은진, 수희, 화정, 다혜와 박봉영님, 김미은님 그리고 기도해주는 사랑방 식구들 고맙습니다.

뒤늦게 대학원에 진학한 딸을 깊은 사랑으로 믿어주신 부모님, 학업을 응원해주시고 수업때마다 아이를 돌봐주신 시어머님과 하늘에서 지켜보실 시아버님 그리고 양가 식구들께 깊은 감사를 드립니다. 항상 곁에서 힘이 되어주는 남편 이구현님과 우리 딸 세은, 아주 많이 사랑하고 고맙습니다. 끝으로 부족한 저를 무한한 사랑으로 이끌어주시는 하나님께 감사드립니다.

참고문헌

- 김동수. 자성발생성 2배체 넙치 전수컷 집단 의 생산 방법. 특허출원 제 10-1996-0039105호, 1998.
- Aldridge FJ, Marston RQ and Shireman JV, 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluoremetric analysis. Aquaculture 87, 121-131.
- Andras SC, Harman TPV, Alexander J, McBride R, Marshall JA, Power JB, Cocking EC and Davey MR, 2000. Combined PI-DAPI staining(CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. Chrom Res 8, 387-391.
- Animal Genome Size Database, 2014. Vertebrates-Fishes haploid C-value. Retrieved from <http://www.genomesize.com> on March 27.
- Araki K, Okamoto H, Graveson AC, Nakayama and Nagoya H. 2001. Analysis of haploid development based on expression patterns of developmental genes in the medaka, *Oryzias latipes*. Develop Growth Differ 43, 591-599.
- Bang IC, Kim KK and Kim Y. 1996. Sex reversal of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by immersion in a solution of steroid hormones. J Aquaculture 9, 279-285.
- Bang IC, Kim KK, Kim Y, Kim JH. 1996. Studies on the production of all-female populations of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* II. progeny test from sex-reversed gynogenetic diploid male. J Aquaculture 9, 125-132.

- Benfey TJ. 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Can Tech Rep Fish Aquat Sci 1682, 33.
- Byrappa V. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. Curt Opin Genet Devel 13, 588-592.
- Chevassus B. 1983. Hybridization in fish. Aquaculture 33, 245-262.
- Chiarell AB and Capanna E. 1973. Check list of fish chromosomes. In: Cytotaxonomy and vertebrate evolution. Academic press. New York. U.S.A., 206-232.
- Chourrout D and Quillet E. 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies production of all-triploid populations. Theor Appl Genet 63, 201-205.
- Derenzini M. 2000. The AgNORs. Micron 31, 117-120.
- Dobigny G, Costaz CO, Bonillo C and Volobouev V. 2002. Ag-NORs are not always true NORs: new evidence in mammals. Cytogenet Genome Res 98, 75-77.
- Evans H, Buckland R and Pardue M. 1974. Location of the genes coding 18S and 28S ribosomalRNA in the human genome. Chromosoma 48, 405-426.
- Gall AE. 1983. Genetics of fish: A summary of discussion. Aquaculture 33, 383-394.
- Gall JG and Pardue ML. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. Proc Natl Acad Sci USA 64, 600-604.
- Gold J. 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American Cyprinid fishes.

- Copeia 232, 5-11.
- Hulata G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111, 155-173,
- Jung HS, KimYK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2014. Cytogenetic analysis of starry flounder, *Platichthys stellatus* from Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 47, 431-434.
- Jeong CH, Moon YB, Park IS and Kim DS. 1996. F₂ production of gynogenetic diploid in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquaculture* 9, 287-291.
- Kim KK, Bang IC and Kim Y. 1996. Studies on the production of all-female populations of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* IV. sex determination by water temperature during sex differentiation period. *J Aquaculture* 9, 429-435.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB and Cho KC. 1993(a). Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Gene & Genomics* 48, 179-186.
- Kim DS, Jeong CH, Lee YD and Rho S. 1994. Triploidy induction in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Aquaculture* 7, 55-61.
- Kim Y, Kim KK, Bang IC and Lee JK. 1993(b). Studies on the production of all-female populations of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* I. induction of gynogenetic diploid and its growth. *J Aquaculture* 6, 285-293.
- Luo C and Li B. 2003. Diploid-dependent regulation of gene expression: a genetic cause of abnormal development in fish haploid embryos. *Heredity* 90, 405-409.

- Mellink C, Bosma A and Haan N. 1994. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas* 120, 141-149.
- Min BH, Kim HC, Lee JH, Noh JK, An HS, Park CJ, Choi SJ and Myeong JI. 2010. Comparison of growth parameters in selected and unselected strains of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Kor J Fish Aquat Sci* 43, 457-461.
- Oh KS, Lee HJ, Sung DW and Lee EH. 1988. Comparison of nitrogenous extractives amino acids in wild and cultured bastard. *Korean J Food Sci Technol* 20, 873-877.
- Pandian TJ and Sheela SG. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.
- Park IS, Kim CH and Kim DS. 1999. Karyotypes and cellular DNA contents of two species in the genus, *Lateolabrax* from Korea. *Fish Sci* 65, 488-489.
- Phillips RB and Ihssen PE, 1985. Chromosome banding in salmonid fishes; nucleolar organizer regions in *salmo* and *salvelinus*. *Can J Genet Cytol* 27, 433-440.
- Rubin DA. 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 233-235.
- Sezaki H. 1970. Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature* 226, 651-652.
- Shin SH, Sung KH and Chung CH. 2013. Physicochemical changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* muscle by iced water pre-treatment. *Korean J Food Sci Technol* 45, 700-707.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centrometric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75, 304-306.

- Tabata K. 1991(a). Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*. Bull Hyogo Pref Fish Exp Stn 28, 1-134.
- Tabata K. 1991(b). 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 Gorie S. 1988. Comparison of the growth of gynogenetic diploids with control diploids in Hirame *Paralichthys olivaceus* reared in the same tank (Canadian translation of fisheries and aquatic sciences). Nippon Suisan Gakkaishi 54, 1143-1147.
- Tanaka H. 1988. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull Natl Res Inst Aquacult 13, 17-23.
- Thorgaard GH. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar WH, Randall DJ, Donaldson EM. eds. Fish Physiology Vol. IXB. Academic Press. New York. U.S.A., pp. 405-434.
- Yoon MJ, Lee JD, Park SY, Kwon SJ, Kong CS, Choi JD, Joo JC and Kim JG. 2015. Processing and quality properties of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* balls product. Korean J Fish Aquat Sci 48, 411-416.
- Zheng WJ and Sun L. 2011. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol 30, 638-645.