



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](#)

수산학박사 학위논문

전암컷 3배체 넙치 생산



2018년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

정효선

수산학박사 학위논문

전암컷 3배체 넙치 생산

지도교수 김 동 수

이 논문을 수산학 박사 학위논문으로 제출함

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

정 호 선

정효선의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2018년 2월 23일

위원장	수산학박사	남윤권	
위원	수산학박사	방인철	
위원	수산학박사	노충환	
위원	이학박사	노재구	
위원	이학박사	김동수	

Production of All-Female Triploid in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Hyo Sun Jung

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The olive flounder *Paralichthys olivaceus* is one of the most economically important marine fishes in Korea. Sterility protects somatic growth, survival, and flesh quality from the negative effects of sexual maturation. Due to these advantages, all-female triploid of *P. olivaceus* was induced by sex reversal and chromosomal set manipulation techniques.

Cytogenetic analysis was conducted to obtain basic information for the chromosome manipulation of olive flounder and starry flounder, *Platichthys stellatus*. The nuclear surface area and volume of the erythrocyte were $7.60 \pm 0.93 \mu\text{m}^2$ and $12.80 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$ in starry flounder and $8.56 \pm 0.82 \mu\text{m}^2$ and $16.76 \pm 2.50 \mu\text{m}^3$ in olive flounder, respectively. The haploid DNA content of starry flounder was 0.66 pg/haploid cell, which corresponds to 93% of olive flounder (0.71 pg/haploid cell). A karyotype analysis was also carried out with the species through conventional staining and Ag-NOR banding techniques. It consisted of 48 acrocentric chromosomes and inter-sex or intra-individual polymorphism was not detected in olive flounder and starry flounder. The chromosome nucleolar organizer regions (NORs) of olive flounder and starry flounder appeared on the short arm of the largest acrocentric chromosome pairs and in the terminal position of the short arm of the

smallest acrocentric pairs, respectively.

This study investigated the characteristics of embryonic and abnormal organ development of gynogenetic haploid in olive flounder by comparing the development of eggs and tissues in haploid and diploid individuals. After the mid-blastula transition, abnormal development was observed in haploid fish, including delayed epiboly and malformation of the germ ring and embryonic body. In haploid flounder, Kupffer's vesicles were irregularly shaped and of variable size compared to diploids. The embryonic body of haploids was shorter and broader than that of diploids and the tail length and size were variable. Most haploid embryos failed to hatch and the few larvae that did so survived for less than 6 hours. The histological analysis of haploid larvae revealed deformed development in diverse organs, including the eyes, otic vesicles, notochord, and neural tube. These results may relate to an abnormality in the axial system of haploid larvae. This study confirmed that the abnormalities of haploid olive flounder were similar to the reported characteristics of haploid syndrome. The abnormalities are caused by delayed epiboly and involution and deformity of Kupffer's vesicle during embryonic development.

Gynogenetic diploid were induced in *P. olivaceus* through the application of cold shocks to eggs inseminated with sperm that had been genetically inactivated by ultraviolet rays. Embryos inseminated with sperm were irradiated with 5,400 erg/mm² ultraviolet rays, and showed a 100% incidence of haploid syndrome. Fertilized eggs were treated with cold shock (2°C) for 45 minutes to block the second polar body. In the cytogenetic studies, no difference was found between the induced gynogenetic diploids and the normal diploid controls.

To produce gynogenetic diploid males (XX), a feeding treatment containing 17 α -methyltestosterone (1 μ g/g) and a higher water temperature treatment (2

5°C) than the one used for the control group were applied for 40 days from the 37th day after hatching. The gonad of a 6-month-old gynogenetic diploid male (XX) revealed fully matured spermatozoa in the testes. Moreover, in the F1 progeny test, matings between normal females and gynogenetic diploid males (XX) produced all-female offspring successfully.

All-female triploid in *P. olivaceus* was induced by cold-shocking eggs fertilized with gynogenetic diploid male *P. olivaceus* (XX), 3 minutes post-fertilization at 2°C for 45 minutes. Triploid was confirmed by erythrocyte measurement (nuclear volume, $29.15 \pm 2.10 \mu\text{m}^3$), flow cytometry ($2.14 \pm 0.03 \text{ pg/cell}$), chromosome count ($3N=72$), Ag-NOR banding, and silver staining.

The present study investigated the characteristics of induced all-female triploidy in *P. olivaceus*. A comparative analysis of cell cycles, hematological characteristics, embryogenesis, and histological characteristics in the gonads were analyzed in diploid and induced-triploid *P. olivaceus*. No significant differences were found among diploid, all female triploid and triploid in terms of embryonic development and immune ability (scuticocidal activity and bacteriocidal activity). Cell cycles were significantly different in the percentage of each cell cycle fraction between diploid and induced triploid *P. olivaceus*. The S-phase fraction of the diploid group ($4.8 \pm 1.4\%$) was higher than that of induced-triploid group (9.7 ± 3.4 and $9.9 \pm 1.7\%$) and the G2+M-fraction of the diploid group ($31.2 \pm 2.8\%$) was lower than that of the induced-triploid group ($22.5 \pm 1.7\%$ and $23.3 \pm 2.1\%$). The differences were statistically significant in the G1-phase fraction.

This study also aimed to compare the hematological features of diploid (2N), all-female triploid (AF 3N), and triploid (3N) *P. olivaceus* for the assessment of the ability of triploid olive flounder to withstand sub-optimal culture conditions. Triploid olive flounder had lower numbers of red blood cells (RBC: $4.60 \pm 0.39 \text{ cells/pL}$ in 2n, $2.53 \pm 0.37 \text{ cells/pL}$ in AF 3N and

2.49±0.44 cells/pL in 3n) but they were of a larger size (Mean corpuscular volume [MCV]: 50.93±6.22 fL in 2n 79.70±1.7 fL in AF3N and 80.41±1.02 fL in 3n). However, the decrease in RBC was not compensated by the increase in MCV, and triploidy therefore decreased the haematocrit (Hct: 23.0±2.7% in 2n, 20.6±1.7% in AF3N and 19.5±2.5% in 3n). In contrast, total blood haemoglobin concentration (Hb: 50.53±7.88 g/L in 2n, 58.93±11.20 g/L in AF3N and 58.72±9.86 g/L in 3n), mean corpuscular hemoglobin (MCH: 11.05±0.98 pg in 2n, 24.12±2.29 pg in AF3N and 24.22±3.44 pg in 3n), and MCH concentration (MCHC: 0.22±0.01 pg/fL in 2n, 0.29±0.06 pg/fL in AF3N and 0.30±0.04 pg/fL in 3n) were higher in the triploid group than in diploid flounder. Triploidy-associated changes in haematological features, as determined in the present study, are essential when evaluating the feasibility of triploid olive flounder for intensive aquaculture systems in which unfavorable situations may occur.

Early gonad development in diploid and triploid *P. olivaceus* were carried out using a histological method. Histological analysis of the gonads showed clear differences between the diploid and triploid groups. The ovaries of diploid females had primary growth oocytes (TL 10–20 cm) or early secondary growth oocytes (TL 20–25 cm). However, all ovaries of the triploid group appeared to be filled with considerable number of oogonia (TL 10–25 cm), and a few chromatin nucleolus oocytes (TL 20–25 cm). Even though diploid and triploid testes at TL 10–15 cm attained a similar degree of development consisting of spermatogonia, small gonad sizes in triploid males from TL 15–25 cm were observed compared to the diploid counterparts. Whereas normal spermatids and sperm were present in the testes of the diploid olive flounder, spermatocytes and abnormal sperm were visible in the testes of triploid males at this stage.

목 차

영문요약 (Abstract)	I
목차 (Content)	V
표목차 (List of Tables)	X
그림목차 (List of Figures)	XII
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어	4
1-1. 실험어	4
1-2. 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석	4
1-2-1. 적혈구 계측	4
1-2-2. DNA 함량 분석	4
1-2-3. 염색체 수 및 핵형 분석	5
1-2-4. Nucleolus organizer region (NORs) 분석	5
2. 자성발생성 반수체 유도	5
2-1. 반수체 유도	5
2-2. 반수체 DNA 함량 분석	6
2-3. 반수체 넙치의 난발생 및 부화자어 형태 비교	6
2-4. 반수체 넙치의 조직학적 분석	7

3. 자성발생성 2배체 유도	7
3-1. 강도다리 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도	7
3-1-1. 강도다리 정자의 확보	7
3-1-2. 자성발생성 2배체 유도	7
3-1-3. 유도율	8
3-2. 넙치 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도	8
3-2-1. 자성발생성 2배체 유도	8
3-2-2. 유도율	8
3-3. 자성발생성 2배체 집단 유도	9
3-3-1. 넙치 정자의 유적적 불활성화	9
3-3-2. 자성발생성 2배체 집단 유도	9
3-3-3. 세포유전학적 분석	9
4. 자성발생성 2배체 수컷 유도	10
4-1. 성전환 유도	10
4-2. 생식소의 조직학적 분석	10
4-3. 자손 검정	10
4-4. 자성발생성 2배체 수컷의 가계별 특성 분석	11
4-4-1. microsatellite 분석에 따른 가계 분석	11
4-4-2. 생존 및 성장	11
4-4-3. 외형	11
4-4-4. 질병저항성	11
가. Scuticocidal activity	12
나. Bacteriocidal activity	12
다. Lymphocystis activity	13
4-4-5. 생식 및 생존능력	13

가. 정자 농도	13
나. 수정 및 발생능력	13
5. 전암컷 3배체 유도	13
5-1. 인공 체정 유도	13
5-2. 전암컷 3배체 유도	14
5-3. 세포유전학적 분석	15
5-4. 난발생	15
5-5. 세포 주기	15
5-6. 혈액학적 분석	16
5-7. 질병 저항성	16
5-7-1. Scuticocidal activity	16
5-7-2. Bacteriocidal activity	17
5-8. 생식소 조직학적 분석	17
III. 결과	18
1. 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석	18
1-1. 적혈구 계측	18
1-2. DNA 함량 분석	18
1-3. 염색체 수 및 핵형 분석	18
1-4. Nucleolus organizer region (NORs) 분석	23
2. 자성발생성 반수체 유도	23
2-1. 반수체 DNA 함량 분석	23
2-2. 반수체 넙치의 난발생	23
2-3. 반수체 넙치의 부화자어 형태 분석	28
2-4. 반수체 넙치의 조직학적 분석	33

3. 자성발생성 2배체 유도	36
3-1. 강도다리 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도	36
3-1-1. 강도다리 정자의 확보	36
3-1-2. 자성발생성 2배체 유도율 분석	36
3-2. 넙치 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도	36
3-2-1. 자성발생성 2배체 유도율 분석	36
3-3. 자성발생성 2배체 집단 유도	40
3-3-1. 넙치 정자의 유전적 불활성화	40
3-3-2. 자성발생성 2배체 집단의 세포유전학적 분석	40
4. 자성발생성 2배체 수컷 유도	40
4-1. 생식소의 조직학적 분석	40
4-2. 자손 검정	45
4-3. 자성발생성 2배체 수컷의 가계별 특성 분석	45
4-3-1. 생존 및 성장	45
4-3-2. 외형	45
4-3-3. 질병저항성	51
가. Scuticocidal activity	51
나. Bacteriocidal activity	51
다. Lymphocystis activity	51
4-3-4. 생식 및 생존능력	55
가. 정자 농도	55
나. 수정 및 발생 능력	55
5. 전암컷 3배체 유도	55
5-1. 인공 채정 유도	55

5-2. 세포유전학적 분석	59
5-3. 난발생	62
5-4. 세포 주기	62
5-5. 혈액학적 분석	62
5-6. 질병 저항성 평가	68
5-6-1. Scuticocidal activity	68
5-6-2. Bacteriocidal activity	68
5-7. 생식소 조직학적 분석	68
 IV. 고찰	 77
국문요약	88
감사의 글	91
참고문헌	92



표 목차(List of Tables)

Table 1. Comparison of cell and nuclear sizes of <i>Paralichthys olivaceus</i> and <i>Platichthys stellatus</i>	19
Table 2. Genome size of <i>Paralichthys olivaceus</i> and <i>Platichthys stellatus</i> determined by flow cytometry	20
Table 3. Stage of embryonic development in diploid and haploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	26
Table 4. Effect of ultraviolet irradiation dose on haploid incidence of <i>Paralichthys olivaceus</i>	41
Table 5. Erythrocyte measurement of gynogenetic diploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	42
Table 6. Progeny test results of control and sex-reversed gynogenetic diploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	47
Table 7. Survival rates of five strains of 28-month-old gynogenetic diploid male in <i>Paralichthys olivaceus</i>	48
Table 8. Growth of five strains of 22-month-old gynogenetic diploid male in <i>Paralichthys olivaceus</i>	49
Table 9. Number of fish with lymphocystis disease (LD) in five strains of gynogenetic diploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	54
Table 10. Number of spermatozoa per 1 ml of milt in five strains of gynogenetic diploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	56
Table 11. Early survival and growth (total length at 1-month-old) of 5 experimental groups.	57
Table 12. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp	

pituitary extract (CP) in gynogenetic diploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	58
Table 13. Erythrocyte measurement of diploid and all-female triploid in <i>Paralichthys olivaceus</i>	60
Table 14. Embryonic development of diploid and all-female triploid <i>Paralichthys olivaceus</i> at different water temperatures	63
Table 15. Relationship of cell cycle phase fraction of experimental groups in <i>Paralichthys olivaceus</i>	65
Table 16. Haematological indices in diploid, triploid and all-female triploid of <i>Paralichthys olivaceus</i>	67
Table 17. Comparisons of size of differences of spermatozoa in diploid and triploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	75

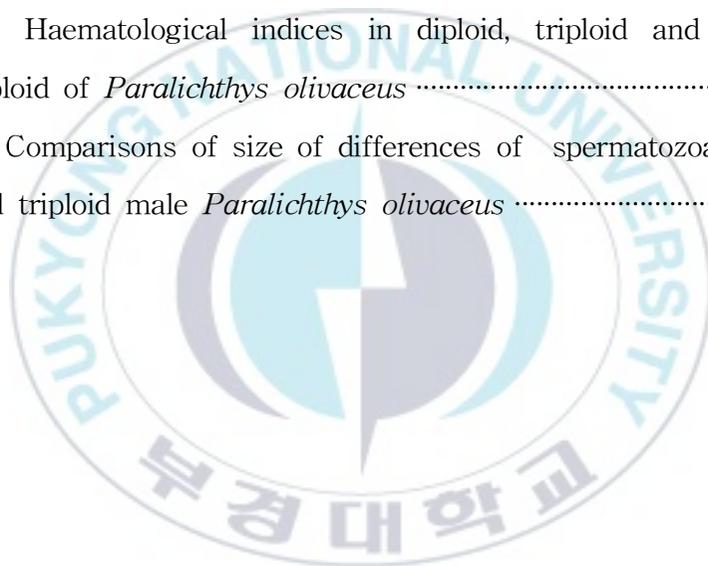


그림 목차(List of Figures)

Fig. 1. Metaphase of female (a) and male (b) <i>Paralichthys olivaceus</i> ···	21
Fig. 2. Metaphase and idiogram of female (a & c) and male (b & d) <i>Platichthys stellatus</i> . Arrows indicate chromosomes with the largest short arm.	22
Fig. 3. Silver-stained metaphases of female and male in <i>Paralichthys olivaceus</i> (a, b) and <i>Platichthys stellatus</i> (c, d), respectively. Arrows indicate silver-stained NORs signal.	24
Fig. 4. Flow cytometric histograms for DNA content in diploid (2N) and haploid (N) <i>Paralichthys olivaceus</i>	25
Fig. 5. External morphology of embryonic shield stage and 40 - 45% epiboly stage in diploid (a-d) and haploid (e-f) <i>Paralichthys olivaceus</i>	27
Fig. 6. Morphology of embryonic body in 80 - 90% epiboly stage of diploid (a-c) and haploid (d-f) <i>Paralichthys olivaceus</i>	29
Fig. 7. Appearance and disappearance of Kupffer's vesicle in diploid (a,c) and haploid (b,d) <i>Paralichthys olivaceus</i>	30
Fig. 8. Extension of tail bud in diploid (a, c, e) and haploid (b, d, f) <i>Paralichthys olivaceus</i>	31
Fig. 9. The shape and length of tail in Just-hatched larva of diploid (a) and haploid (b, c) <i>Paralichthys olivaceus</i>	32
Fig. 10. Histological cross sections of head region in diploid and haploid <i>Paralichthys olivaceus</i> at hatching stage.	34

Fig. 11. Microphotography and histological section of diploid and haploid <i>Paralichthys olivaceus</i> at hatching stage.	35
Fig. 12. Transverse sections of male gonad in <i>Platichthys stellatus</i> . Scale bars indicate 100 μ m.	37
Fig. 13. Flow cytometric histograms of DNA contents of <i>Paralichthys olivaceus</i> (a) and gynogenetic diploid (b) and allotriploid (c) of female <i>Paralichthys olivaceus</i> and male <i>Platichthys stellatus</i>	38
Fig. 14. Flow cytometric histograms of DNA contents of control (a), gynogenetic diploid (b) and triploid (c) of <i>Paralichthys olivaceus</i> . ..	39
Fig. 15. Photographs of erythrocytes of control (a) and gynogenetic diploid (b) <i>Paralichthys olivaceus</i> . A scale bar indicates 25 μ m.	43
Fig. 16. Flow cytometric histograms for DNA contents of control (a) and gynogenetic diploid (b) <i>Paralichthys olivaceus</i> . Metaphase (c) and silver-stained metaphases (d) of gynogenetic diploid <i>Paralichthys olivaceus</i> . Arrows indicate silver-stained NORs signal.	44
Fig. 17. Transverse sections of sex-reversed gynogenetic diploid male <i>Paralichthys olivaceus</i>	46
Fig. 18. External morphology of five strains of gynogenetic diploid male in <i>Paralichthys olivaceus</i>	50
Fig. 19. Scuticocidal activity of sera collected from five strains of gynogenetic diploid male in <i>Paralichthys olivaceus</i>	52
Fig. 20. Bacteriocidal activity of sera collected from five strains of	

gynogenetic diploid male in <i>Paralichthys olivaceus</i>	53
Fig. 21. Cytogenetic analysis of all-female triploid of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	61
Fig. 22. External morphology of embryonic development in all-female triploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	64
Fig. 23. DNA histogram of diploid (a), triploid (b) and all-female triploid (c) in <i>Paralichthys olivaceus</i> . blue, G0/G1; red, S; green; G2+M.	66
Fig. 24. Scuticocidal activity of sera collected from diploid, triploid and all-female triploid <i>Paralichthys olivaceus</i>	69
Fig. 25. Bacteriocidal activity of sera collected from diploid, triploid and all-female triploid in <i>Paralichthys olivaceus</i>	70
Fig 26. Transverse sections of diploid (a-d) and triploid (e-h) <i>Paralichthys olivaceus</i> ovary.	71
Fig 27. Transverse sections of gonad of all-female triploid in <i>Paralichthys olivaceus</i>	72
Fig 28. Transverse sections of diploid (a) and triploid (b) <i>Paralichthys olivaceus</i> testis. Total length 24 cm.	73
Fig 29. Histological analysis of spermatozoa in diploid (a) and triploid (b, c and d) male <i>Paralichthys olivaceus</i>	76

I. 서론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 넙치과(Paralichthyidae)에 속하며 한국, 일본 및 중국을 포함하는 동북아시아 및 중남미에서 양식대상종으로 각광받고 있다(Zheng and Sun, 2011). 본 종은 우리나라 종묘생산 기술이 확보된 1980년대부터 주요 양식 어종으로 자리 잡은 이후 점차 양식생산량이 증대되어 현재 우리나라 연간 어류 생산량의 약 50%를 차지하는 대표적인 양식대상종이며(Jeong et al., 2009; Park et al., 2012). 국립수산물품질관리원에서는 2004년부터 유전자 표지를 이용한 분자육종과 선발육종기법을 접목하여 생산한 ‘킹넙치(KingNupchi)’를 어민에게 보급하고 있다(NFRDI, 2013).

양식 어종들 중 일부는 암컷이 수컷보다 빠른 성장을 보이고, 성숙기를 거치면서 낮은 성장률과 높은 폐사율을 보이는 경우가 있다(Tiwary et al., 2004; Luo et al., 2011). 이에 양식 산업의 경제적인 손실을 줄이기 위해 전암컷의 유도 및 불임개체를 생산하기 위한 연구가 다양한 종에서 이루어져 왔다(Piferrer et al., 2000; Xu et al., 2015). 본 종 또한 암컷이 수컷보다 빨리 성장하고, 상품크기에 도달하기 전 산란기를 거치게 되는 문제점이 있어 전암컷 및 불임 넙치의 생산이 중요시 된다(Kim et al., 1994; Fan et al., 2014).

전암컷 집단을 생산하기 위한 방법으로 첫째, 자성발생성 2배체 유도 방법 둘째, 자성호르몬 처리에 의한 생리학적 성전환 방법 셋째, 자성발생성 2배체 유도법과 수컷 성전환 기법을 융합한 성전환된 자성발생성 2배체 수컷과의 교배에 의한 방법이 알려져 있다(Bang, 1996). 자성발생성 2배체 유도 방법은 대량생산이 어렵고, 호르몬 처리법은 암컷 유도에 필요한 비용이 높고, 100% 암컷의 유도가 어려우며, 발암물질로 알려진 에스

트로젠 계통의 호르몬이 어체 내 축적될 수 있어 식용으로써 인체 위해성 및 주위 수계환경으로 스테로이드 호르몬 오염 가능성 등의 문제가 있다 (Kim et al., 1993b; Pandian et al., 1995; Luo et al., 2011). 이에 전암컷 집단의 대량생산은 자성발생성 2배체 수컷과 암컷의 단순교배를 통한 방법이 가장 효율적인 것으로 보고되고 있다(Wu et al., 1990; Tabata, 1991a).

자성발생성 2배체는 수컷의 유전물질없이 암컷의 유전물질로만으로 개체를 생산하는 것으로 동형접합체를 유도함으로써 우량 유전 형질을 가진 암컷의 순계 확립을 위한 육종기술으로써(Arai, 2001; Xu et al., 2015), 암컷 동형 접합성(female homogamety, XX female) 종의 경우 자성발생성 암컷을 성전환 시킴으로써 생산된 자성발생성 2배체 수컷과 암컷을 교배시킴으로써 전암컷 집단을 생산할 수 있다(Hulata, 2001; Jung et al., 2014).

자성발생성 2배체는 방사선 조사에 의해 유전적으로 불활성화된 정자와 정상 난자를 수정시킨 후 수온 및 압력 처리에 의해 제2극체 방출을 억제하거나(meiotic gynogenesis) 제1난할을 억제함으로써(mitotic gynogenesis) 유도된다(Tvedt et al., 2006). 제 1난할 억제에 의해 생산된 자성발생성 2배체들은 완전한 동형접합성이 유도됨으로써 이후 단 한번의 자성 또는 웅성발생성 유도기법에 의해 클론을 확보할 수 있으나 생존율이 매우 낮아 산업적 이용에 어려움이 있다(Felip et al., 2001). 이에 제 2극체 방출 억제에 의한 자성발생성 2배체를 중심으로 철갑상어 (*Acipenser ruthenus*), Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*), Turbot (*Scophthalmus maximus*) 및 Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) 등에서 자성발생성 2배체가 생산된 바 있고(Fopp-Bayat et al., 2007; Morgan et al., 2006; Piferrer et al., 2004; Tvedt et al. 2006), 넙치의 경우 자외선 조사에 의해 불활성화 된 감성돔 또는 참돔 정자와

넙치 난을 수정함으로써 자성발생성 2배체가 유도된 바 있다(Kim et al., 1993a; Kim et al., 1993b).

유도된 자성발생성 2배체는 전암컷 넙치의 대량생산을 위해 수컷으로 성전환이 필요하다. 넙치는 성염색체를 가지고 있지 않아 Jeong et al. (1996)은 대한민국 특허 제 10-1996-0039105호에 의거 26℃의 고수온 처리 및 사육 밀도 조절을 통해 전수컷 자성발생성 넙치를 생산한 바 있고, (Bang, 1996)은 환경에 영향을 주지 않는 호르몬 처리에 의해 성전환을 유도한 바 있다.

3배체는 불임의 특성을 가짐으로써 성숙에 이용되는 에너지를 체성장에 에너지로 전환시킴으로써 성적 성숙을 막고 성장 및 생존율을 증대함으로써 중요 어종의 생산성을 높이기 위해 이용되며, 특정 종의 불균형적인 증가 조절, 유전자변형어류의 자연 수계 유출 방지 및 유전자 오염 방지 등의 생태계 교란을 막기 위한 방법으로도 이용되고 있다(Thorgaard, 1986; Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004; Hernández-Urcera et al., 2012). 국내에서 횡감으로 주로 소비되는 넙치는 1 kg 이상의 크기에서 높은 가격이 형성되기 때문에 필연적으로 1회의 산란기를 거치게 되므로 산란기의 식욕감퇴, 사료효율 감소, 육질저하 및 산란 후의 사망 등을 방지하기 위해 불임의 특성을 가지는 전 암컷 3배체의 생산이 중요하다.

이에 본 연구에서는 넙치 전 암컷 3배체를 유도하기 위해서 국립수산과학원 육종연구센터에서 선발육종기법을 통하여 생산된 킹넙치 (KingNupchi) 암컷을 이용하여 5가계의 자성발생성 2배체를 유도하고, 이들을 성전환시켜 자성발생성 2배체 수컷을 생산하고, 이들 중 가장 우수한 가계를 선발, 전암컷 3배체를 유도한 후 세포유전학적 특성, 생식소 성숙 여부, 세포 주기, 혈액학적 특징 및 질병저항성 등에 대해 조사함으로써 킹넙치 전암컷 3배체의 산업적 가치를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

1-1. 실험어

본 연구에서 사용된 넙치와 강도다리(*Platichthys stellatus*)는 국립수산과학원 육종연구센터에서 선발육종기법에 의해 생산된 킹넙치(KingNupchi)와 거제도 민간양식장과 부산시 남천동 수산시장에서 구입한 어체중 350-500 g의 강도다리가 사용되었다.

1-2. 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석

1-2-1. 적혈구 계측

적혈구의 세포와 핵 크기를 측정하기 위해 넙치와 강도다리의 미병부 미부정맥으로부터 말초혈액을 각각 채취한 후 슬라이드에 도말하여 95% ethanol에서 5분간 고정한 다음 5% Giemsa 염색 용액에서 15분간 염색하였다. 적혈구 세포와 핵의 장경(a) 및 단경(b)은 광학현미경에서 micrometer로 측정하였고, 표면적은 $(a) \cdot (b) \cdot \pi / 4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978), 부피는 $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \cdot \pi / 3$ (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였다.

1-2-2. DNA 함량 분석

DNA 함량을 분석하기 위해 flow cytometry를 수행하였다. 넙치와 강도다리의 꼬리지느러미를 각각 면도칼로 세절한 후 nucleic extraction buffer (Partec, Germany)을 250 μ L 넣고 20분간 암실에서 반응시킨 뒤, staining buffer (Partec, Germany)를 1 mL 첨가하여 암실에서 1시간 동안 반응하였다. 염색한 시료를 30 μ m 필터로 거른 뒤 PartecPA-II

flowcytometer (Partec, Germany)로 DNA 함량을 측정하였다.

1-2-3. 염색체 수 및 핵형 분석

넙치와 강도다리의 염색체 수 판별 및 핵형 분석을 위해 신장직접법 (Kim et al., 1982)을 이용하였다. 실험군에 colchicine을 5-10 $\mu\text{g/g}$ 체중의 용량으로 복강 주사하고 4-5시간 방치한 후 신장을 적출 세절한 후 상온에서 저장액(0.075 M KCl)에 처리하고 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸쳐 고정하였다. 슬라이드 표본은 공기건 조법으로 작성되었으며, 작성된 슬라이드 표본은 5% Giemsa 염색 용액에 15분간 염색하여 광학현미경 (Eclipse E400; Nikon Co., Japan)에서 중기 염색체 상을 관찰하였다. 각 슬라이드 당 10여개의 판독 가능한 염색체 중기 분열상을 대상으로 계수하였으며, 분열상이 뚜렷한 시료는 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(MoticampPro 205A; Motic Co., China)로 촬영하였다.

1-2-4. Nucleolus organizer region (NORs) 분석

넙치와 강도다리의 염색체 NORs를 분석하기 위해 상기의 중기염색체 분석법에 따라 작성된 슬라이드 표본을 silver staining (Goodpasture and Bloom, 1975)을 수행한 후, 광학현미경 (Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 으로 염색체상의 NORs를 관찰하였고, 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(MoticampPro 205A; Motic Co., China)로 촬영하였다.

2. 자성발생성 반수체 유도

2-1. 반수체 유도

자성발생성 반수체 유도에 사용된 넙치는 국립수산과학원 육종연구센터

터에서 선발육종기법을 통하여 생산된 킹넵치(KingNupchi)를 사용하였고, 복부 압박법으로 암컷 7미와 수컷 3미로부터 확보된 난과 정자를 실험에 사용하였다. 반수체(haploid)는 자외선 조사에 의해 유전적으로 불활성화된 정자와 정상 난자를 수정함으로써 유도되었다. Kim et al. (1993a)과 Yamamoto (1999)에서 보고된 자외선 조사량을 바탕으로, 넵치 정자의 완벽한 유전적 불활성화를 위해 5,400 ergs/mm²의 자외선을 조사한 후 습식법으로 인공 수정시킨 뒤, 18±1℃의 부화수조에서 발생을 유도하였다.

2-2. 반수체 DNA 함량 분석

유도된 반수체의 DNA 함량 분석을 위하여 flow cytometry를 수행하였다. 반수체 증후군(haploid syndrome)의 형태를 가지고 있는 자어 10미를 모아 균질기로 세포를 파쇄한 후, Nucleic extraction buffer (Partec, Germany)와 staining buffer (Partec, Germany)를 이용하여 단일세포 분리 및 염색 과정을 수행하였다. 염색된 시료들은 PA II flow cytometry (Partec Co., Münster, Germany)으로 분석하였으며, 넵치 이배체 자어를 대조군으로 사용하였다.

2-3. 반수체 넵치의 난발생 및 부화자어 형태 비교

넵치 반수체 및 이배체 배아는 18±1℃의 수온에서 부화시켰고, 해부현미경(AZ100; Nikon Co., Japan)과 이에 부착된 디지털 카메라(DS-Ril; Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰과 촬영을 하였다. 각 발생 단계는 Kimmel et al. (1995)의 배발생 단계를 기준으로 정하였고, 수정된 개체의 90% 이상이 동일한 단계에 도달하였을 시기를 기준으로 각 발생단계별 소요 시간과 특징을 기록하였다.

2-4. 반수체 넙치의 조직학적 분석

반수체의 특이적인 기관 발생을 관찰하기 위해 부화 자어의 조직을 분석하였다. 형태학적으로 반수체 증후군의 형태를 가지고 있는 자어를 4% formaldehyde에 고정한 뒤, 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 파라핀을 이용한 포매 과정을 수행하였다. 준비된 표본은 6 μm 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색을 한 후, 광학현미경 (Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 검경하였고, 이배체와 비교하여 특이적인 조직상은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(MoticampPro 205A; Motic Co., China)로 촬영하였다.

3. 자성발생성 2배체 유도

3-1. 강도다리 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도

3-1-1. 강도다리 정자 확보

강도다리 수컷으로부터 정자를 채취하기 전 이들의 성숙도를 확인하기 위해서 정소를 적출하여 4% formaldehyde에 고정한 뒤, 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 파라핀을 이용한 포매 과정을 통해 표본을 준비하였고, 6 μm 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색 후 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 성숙도 여부를 확인하였다. 또한 성숙한 강도다리 수컷으로부터 정자를 채취하기 위하여 hCG (human chorionic gonadotropin; DAESUNG microbiological labs. Co. Ltd., Korea) 600 IU/100g과 잉어뇌하수체(carp pituitary; Argent, USA) 10 mg/kg 농도로 주사한 뒤, 12시간 이후에 복부압박법으로 정자를 확보하였다.

3-1-2. 자성발생성 2배체 유도

강도다리 정자를 유전적으로 불활성화 시키기 위해서 $4,500 \text{ erg/mm}^2$ 의 자외선을 조사 한 뒤, 정상 넙치 난과 습식법으로 인공수정 하였고, 제 2극체 방출 억제를 위해 Kim et al. (1994) 방법에 의거하여 수정 3분 후 2°C 의 온도 조건하에서 45분간 저온 처리 하였다. 수정란은 $18\pm 1^\circ\text{C}$ 의 부화수조에서 발생을 유도하였다.

3-1-3. 유도율

강도다리 정자를 이용한 자성발생성 2배체 처리군의 유도율 확인을 위해 부화자어 36미를 대상으로 유세포 분석기를 이용한 DNA 함량을 분석하였다. Nucleic extraction buffer (Partec, Germany)와 staining buffer (Partec, Germany)를 이용하여 단일세포 분리 및 염색과정을 수행한 뒤, PartecPA-II flowcytometer (Partec, Germany)로 DNA 함량을 측정하였다. 이 때 DNA 함량 분석 대조군은 넙치 꼬리지느러미를 사용하였다.

3-2. 넙치 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도

3-2-1. 자성발생성 2배체 유도

넙치 정자를 유전적으로 불활성화 시키기 위해서 Kim et al. (1993a) 과 Yamamoto (1999)에서 보고된 자외선 조사량을 바탕으로, $4,500 \text{ erg/mm}^2$ 의 자외선을 조사 한 뒤, 정상 넙치 난과 습식법으로 인공수정 하였다. 제 2극체 방출 억제를 위해 Kim et al. (1994) 방법에 의거하여 수정 3분 후 2°C 의 온도 조건하에서 45분간 저온 처리 하였다. 수정란은 $18\pm 1^\circ\text{C}$ 의 부화수조에서 발생을 유도하였다.

3-2-2. 유도율

넙치 정자를 이용한 자성발생성 2배체 처리군의 유도율 확인을 위해

부화자어 107미를 대상으로 유세포 분석기를 이용한 DNA 함량을 분석하였다. 상기의 강도다리 정자를 이용한 자성발생성 2배체 유도율 분석과 동일한 방법으로 DNA 함량을 측정하였다. 이 때 DNA 함량 분석 대조군은 넙치 꼬리지느러미를 사용하였다.

3-3. 자성발생성 2배체 집단 유도

3-3-1. 넙치 정자의 유전적 불활성화

넙치 정자의 유전적 불활성화 효율을 높이기 위해서 넙치 정자를 3,600, 5,400, 8,100, 10,800 및 13,500 erg/mm^2 의 자외선 처리 후 정상 넙치 난과 인공수정한 뒤, 반수체 유도율을 조사하였다. 반수체 유도율은 각 UV 처리 조건별 부화 직전의 난발생 특징이 반수체 증후군을 보이는 개체수를 확인함으로써 도출하였다.

3-3-2. 자성발생성 2배체 집단 유도

자성발생성 2배체 집단 유도에 사용된 넙치 정자와 난은 국립수산물학원의 킹넙치 암컷 5미와 수컷 2미로부터 복부압박법에 의해 채란과 채정하였다. 확보된 정자의 유전적 불활성화를 위해 5,400 erg/mm^2 의 자외선을 조사한 뒤, 370cc의 정상 난과 습식법으로 인공수정하였고, 제 2극체 방출 억제를 위해 수정 3분 후 2°C의 온도 조건하에서 45분간 저온 처리 하였다.

유도된 자성발생성 2배체 집단은 부화 직전 3톤 수조에 20cc의 수정란을 입식하여 부화를 유도하였고 15-17°C로 유지하면서 부화후 3일째부터 로티퍼를 공급하였으며, 성장에 따라 Artemia와 배합사료를 공급하였다.

3-3-3. 세포유전학적 분석

자성발생성 2배체 처리군의 세포유전학적 분석을 위해 6개월령 개체를 대상으로 DNA 함량, 적혈구 계측, 염색체 분석 및 염색체의 NORs 분석을 수행하였고, 이들 분석방법은 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석과 동일한 방법으로 수행되었다.

4. 자성발생성 2배체 수컷 유도

4-1. 성전환 유도

대한민국 특허 제 10-1996-0039105호와 Kang (2016)의 성전환 유도 방법에 의거한 웅성화 호르몬(17 α -methyltestosterone) 첨가 사료 공급법 및 수온 조절법을 사용하여 자성발생성 2배체 수컷으로 성전환을 유도하였다.

4-2. 생식소의 조직학적 분석

자성발생성 2배체 성전환 처리군 12미로부터 생식소를 적출하여 4% formaldehyde에 고정하였다. 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수처리하였고, 파라핀을 이용하여 포매한 뒤, 6 μ m 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색 후 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 성전환 여부를 관찰하였다.

4-3. 자손 검정

자성발생성 2배체 수컷을 이용한 전암컷 집단 유도 여부를 확인하기 위해 넙치 암컷의 난과 자성발생성 2배체 수컷으로부터 확보된 정자를 인공수정하였다. 부화된 자어는 1톤 수조에서 15-17 $^{\circ}$ C로 유지하여 사육하였고, 부화 후 3일째부터 로티퍼를 공급하였으며, 성장에 따라 Artemia와 배합사료를 공급하였다. 1개월령 41미로부터 DNA를 확보하였고, 국립수

산과학원의 real time PCR을 이용한 성판별 분석법에 의해 성비를 분석하였다. 대조군으로 넙치 암컷과 수컷에 의해 수정된 부화 자어 35미를 분석하였으며, 자성발생성 2배체 수컷의 정자에 대한 유전자형 또한 분석하였다.

4-4. 자성발생성 2배체 수컷 가계별 특성 분석

4-4-1. microsatellite 분석에 따른 가계 분석

자성발생성 2배체 수컷 처리군은 개체별 식별을 위해서 각 개체마다 고유 번호가 내장된 전자 tag를 어체의 등근육 내에 삽입하였다. 각 개체들에서 확보된 꼬리지느러미로부터 DNA를 추출하고 microsatellite 분석을 통해 자성발생성 2배체 유도에 사용된 5마리의 암컷 유전자형과 비교 분석하였다. 이때 분석은 국립수산과학원의 넙치 친자확인 분석 방법에 따라 분석 수행되었다.

4-4-2. 생존 및 성장

자성발생성 2배체 수컷 5가계의 성장 및 생존율을 4개월령, 9개월령, 11개월령, 17개월령, 22개월령 및 28개월령에 확인하였다. 성장은 전장 및 체중을 측정하였고, 이들 측정치를 바탕으로 비만도(체중/(전장)³*1000)를 도출하였다.

4-4-3. 외형

자성발생성 2배체 수컷 유도군의 각 가계별 특이적인 외형을 확인하고자 9개월령 개체들을 대상으로 외형 특성을 관찰하였다.

4-4-4. 질병저항성

가. Scuticocidal activity

스쿠티카증에 걸린 넙치의 뇌에서 스쿠티카충 (*Miamiensis avidus*)을 무균적으로 분리한 후 penicillin (100 U/ml, Sigma), streptomycin (100 µg/ml, Sigma) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)에서 배양한 *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells을 먹이로 하여 20°C에서 배양하였다.

혈청의 질병저항성은 96-well flat-bottomed plate를 이용하여 수행하였고, 자성발생성 2배체 수컷 각 개체로부터 분리한 혈청을 Hank's balanced salt solution (HBSS)를 이용해 1/2 - 1/128 로 단계희석하였다. 여기에 1×10^2 의 스쿠티카충(*Miamiensis avidus*)을 단계희석한 혈청과 동량의 volume으로 넣은 후 1, 3, 8 시간째 혈청의 스쿠티카충 살충력을 현미경을 이용하여 분석하였다. 각 혈청의 스쿠티카충 살충 titer는 스쿠티카충이 100% lysis 되었거나 혹은 움직임이 전혀 없는 상태를 최종 titer로 정하여 그 희석배수의 역수를 최종 scuticocidal activity로 사용하였다. Scuticocidal activity 분석은 총 3회 수행되어, 각 회차별 분석은 각각 27, 28 및 29개월령에 수행되었다.

나. Bacteriocidal activity

에드워드증 증상을 보이는 넙치에서 분리한 *Edwardsiella tarda* BH1을 이용하여 28개월령 자성발생성 2배체 수컷의 질병저항성을 분석하였다. 1.5% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth에서 배양한 *E. tarda*를 OD600에서 1.0으로 맞춘 후 100배 희석하여 자성발생성 2배체 수컷 각 개체로부터 분리한 혈청을 *Edwardsiella tarda* BH1 균액과 1:1로 섞어 30°C에서 1시간 반응 후 단계 희석하여 10 µl 씩 LB agar plate에 dropping 하였고, 27°C에서 24시간 배양 후 자란 colony의 수를 계산하

여 총 균수를 계산하였다.

다. Lymphocystis activity

자성발생성 2배체 수컷의 각 가계별 Lymphocystis에 대한 질병저항성을 확인하고자 17개월령 개체들을 대상으로 Lymphocystis 증상의 심화 정도에 따라 각 가계별로 4 집단으로 분류하였다. 비감염 집단은 0점, 나머지 3개 감염 집단들은 감염 정도에 따라 1-3점으로 평가하여 각 가계별 Lymphocystis 감염 개체 및 감염 정도를 확인하였다.

4-4-5. 생식 및 생존능력

가. 정자 농도

자성발생성 이배체 수컷의 생식능력을 확인하기 위해 각 가계별로 건강하고 성장 형질이 뛰어난 개체를 4미씩 선발하여 이들 개체들로부터 정액을 확보하여 정자의 농도 및 양을 측정하였다.

나. 수정 및 발생 능력

자성발생성 2배체 수컷의 생식능력을 확인하기 위해 각 가계별 성장 형질이 좋은 개체 4미로부터 확보한 정액을 넙치 난과 독립적으로 인공 수정하였다. 각 가계별로 18cc의 난을 사용하여 수정하였고, 처리 후 2, 3일째에 부상율을 확인하였다. 부화직전 5가계의 생존란을 1톤 수조에 입식하여 1개월간 15-17℃로 유지하여 사육하였고, 성장에 따라 로티퍼, 알테미아 및 배합사료를 공급하였다. 1개월령 생존 개체 197미를 대상으로 전장 측정 및 microsatellite 분석을 수행하여 자성발생성 2배체 수컷 가계의 1개월령 생존율 및 자어크기를 확인하였다.

5. 전암컷 3배체 유도

5-1. 인공 채정 유도

전 암컷 킹넙치 3배체를 생산하기 위해 유도된 자성발생성 2배체 수컷으로부터 언제든지 양질의 정자를 대량으로 확보하기 위해 태반성 성선 자극 호르몬 (HCG, human chorionic gonadotropin) 및 잉어 뇌하수체(CP, carp pituitary extract)을 이용한 인공 채정 유도 실험을 수행하였다. HCG (DAESUNG microbiological labs. Co. Ltd., Korea) 주입군은 1, 2 및 4 IU/g, CP (Argent, USA) 주입군은 25, 50 및 100 mg/kg 농도로 주입하였으며. HCG와 CP 동시 주입군은 'HCG 1 IU/g + CP 25 mg/kg', 'HCG 2 IU/g + CP 50 mg/kg' 및 'HCG 4 IU/g + CP 100 mg/kg' 농도로 주입하여 정액의 양을 비교하였고 이들의 대조군으로 호르몬 미처리군과 PBS 0.1cc 주입군이 사용되었다. 각 호르몬은 농도별로 자성발생성 2배체 수컷 3미씩 24시간 간격으로 총 3회 주입하여, 호르몬 주입 24 시간 후에 확보되는 정액 양을 비교하였다.

5-2. 전암컷 3배체 유도

자성발생성 2배체 수컷 Z1-0219 가계로부터 확보된 정자와 일반 넙치 난을 수정한 후 제 2극체 방출 억제를 위해 수정 3분 후 2℃에서 45분간 저온처리를 하였다. 또한 전암컷 3배체 처리군의 대조군으로 일반 넙치 난과 정자를 이용하여 3배체를 유도하였다. 유도된 전암컷 3배체 및 3배체 처리군은 16±1℃에서 난발생을 유도하였고, 부화 직전 단계의 수정란을 400 L 수조에 입식하여 19±1℃에서 부화를 유도하였고, 부화 30일까지 동일 수조에서 300-400 L/day으로 환수하여 사육하였으며, 부화 31일부터 3 t 수조에서 180 L/hour으로 환수하여 사육하였다. 먹이는 부화 후 3일째부터 로티퍼를 공급하였으며, 성장에 따라 Artemia와 배합사료를 공급하였다.

5-3. 세포유전학적 분석

3배체 처리군의 세포유전학적 분석을 위해 DNA 함량, 적혈구 계측, 염색체 분석 및 염색체의 NORs 분석을 수행하였고, 이들 분석방법은 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석과 동일한 방법으로 수행되었다. 또한 세포의 NORs 분석은 지느러미 조직을 이용하여 Ko et al. (2016)의 방법론에 따라 수행되었다.

5-4. 난발생

전암컷 3배체의 난발생은 $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 수온에서 발생을 유도하였고, 해부현미경(AZI100; Nikon Co., Japan)과 이에 부착된 디지털 카메라(DS-Ril; Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰과 촬영을 하였다. Kimmel et al. (1995) 및 Jung et al. (2015)의 난발생 단계를 기준으로 관찰하였고, 저온처리가 끝난 시기를 0시(time 0)로 하였으며, 수정란의 90% 이상이 동일한 단계에 도달하는 시기를 기준으로 각 발생단계별 소요 시간과 특징을 기록하였다. 수온별 난발생 속도를 조사하기 위해 각 실험군의 수정란들을 10, 14 및 18°C 의 부화조에서 발생을 유도하였다.

5-5. 세포 주기

2배체, 3배체 및 전암컷 3배체 각 8미로부터 헤파린을 처리한 주사기로 혈액을 확보한 뒤, 70% 에탄올로 고정처리하였다. 고정된 혈액세포를 PBS로 1회 세척한 후 Muse™ Cell cycle reagent (EMD Millipore Corp. Billerica, MA, USA)를 첨가하여 암조건에서 염색하고 Muse™ Cell Analyzer (Merck-Millipore, Germany)를 이용하여 G1기(휴지기), S기(DNA 합성단계) 및 G2+M기(유사분열기)의 세포 주기를 분석하였다.

5-6. 혈액학적 분석

2배체, 3배체 및 전암컷 3배체 각 8미로부터 헤파린을 처리한 주사기로 혈액을 확보하여 RBC (red blood cell count, 적혈구 수), Hct (hematocrit, 적혈구 용적률), MCV (평균 적혈구 용적), Hb (hemoglobin, 혈색소), MCH (평균 적혈구 혈색소량) 및 MCHC (적혈구 혈색소 농도)를 측정하였다. RBC는 혈구측정기(hemocytometer)로 광학현미경 하에서 계수하였고, Ht는 Ht 모세관을 이용하여 microhematocrit centrifuge로 원심분리 후 RBC 비율을 확인하였다. Hb 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 시안메트헤모글로빈(cyanmethemoglobin) 방법론으로 전처리 후 540nm에서 흡광도를 측정하였고, MCV, MCH 및 MCHC은 아래의 식에 의해 도출하였다.

$$\text{Hct} = \text{MCV (fL)} \times \text{RBC (cell/L)}$$

$$\text{MCH} = \text{Hb (g/L)} / \text{RBC (cell/L)}$$

$$\text{MCHC} = \text{MCH (pg)} / \text{MCV (fL)}$$

5-7. 질병 저항성

5-7-1. Scuticocidal activity

넙치 2배체, 3배체 및 전암컷 3배체의 Scuticocidal activity를 분석하기 위해 각 실험군당 6-9미의 개체로부터 확보한 혈청을 Hank's balanced salt solution (HBSS)를 이용해 1/2 - 1/128 로 단계희석하고, 1×10^2 의 스쿠티카충(*Miamiensis avidus*)을 단계희석한 혈청과 동량의 volume으로 넣은 후 1, 3 시간째 혈청의 스쿠티카충 살충력을 현미경을 이용하여 분석하였다. 각 혈청의 스쿠티카충 살충 titer는 스쿠티카충이 100% lysis 되었거나 혹은 움직임이 전혀 없는 상태를 최종 titer로 정하

여 그 희석배수의 역수를 최종 scuticidal activity로 사용하였다.

5-7-2. Bacteriocidal activity

넙치 2배체, 3배체 및 전암컷 3배체의 bacteriocidal activity를 분석하기 위해서 각 실험군당 6-9미로부터 확보한 혈청을 *E. tarda* BH1 균액과 1:1로 섞어 30℃에서 1시간 반응 후 단계 희석하여 10 μ l 씩 LB agar plate에 dropping 하였고, 27℃에서 24시간 배양 후 자란 colony의 수를 계산하여 총 균수를 계산하였다.

5-8. 생식소 조직학적 분석

3배체의 생식소 발달을 통해 불임여부를 확인하기 위해서 전장 10-15cm, 15-17.5cm, 17.5-20cm 및 20-25cm의 2배체 암컷과 수컷, 3배체 및 전암컷 3배체의 생식소를 각각 적출하여 4% formaldehyde에 고정하였다. 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 포매하고, 6 μ m 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 생식소 발달을 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 넙치와 강도다리의 세포유전학적 분석

1-1. 적혈구 계측

넙치 적혈구 세포 장축은 $9.59 \pm 0.49 \mu\text{m}$, 단축은 $5.32 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 였고, 표면적은 $40.02 \pm 4.54 \mu\text{m}^2$, 부피는 $143.98 \pm 31.26 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었다. 적혈구 핵의 장축 및 단축은 각각 $3.73 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 및 $2.89 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 였고 표면적 및 부피는 $8.56 \pm 0.82 \mu\text{m}^2$ 및 $16.76 \pm 2.50 \mu\text{m}^3$ 으로 관찰되었다(Table 1).

강도다리의 경우 적혈구 세포 장축은 $8.12 \pm 1.15 \mu\text{m}$, 단축은 $5.60 \pm 0.63 \mu\text{m}$, 표면적은 $35.58 \pm 6.01 \mu\text{m}^2$, 부피는 $134.07 \pm 34.36 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었고. 적혈구 핵의 장축 및 단축은 $3.88 \pm 0.71 \mu\text{m}$ 및 $2.53 \pm 0.25 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 $7.60 \pm 0.93 \mu\text{m}^2$ 및 $12.80 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되었다(Table 1).

1-2. DNA 함량 분석

미꾸라지의 꼬리지느러미($1.4 \text{ pg/haploid cell}$)를 대조군으로 하여 넙치와 강도다리의 DNA 함량을 측정된 결과, 넙치는 $0.71 \text{ pg/haploid cell}$, 강도다리는 $0.66 \text{ pg/haploid cell}$ 로 확인되었다(Table 2).

1-3. 염색체 수 및 핵형 분석

넙치와 강도다리의 암컷 및 수컷의 중기분열상을 분석한 결과, 두 종 모두 염색체 수는 $2n=48$ 그리고 핵형은 차단부 염색체(acrocentric chromosome) 24쌍으로 구성되어 있었다(Fig 1a, 2a-2b). 또한 두 종 모두 암·수간 염색체수의 차이는 없었으며, 개체간 및 세포간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다(Fig. 1b, 2c-2d).

Table 1. Comparison of cell and nuclear sizes of *Paralichthys olivaceus* and *Platichthys stellatus*

	Cell	Nucleus
<i>Paralichthys olivaceus</i>		
Major axis (μm)	9.59 \pm 0.49	3.73 \pm 0.21
Minor axis (μm)	5.32 \pm 0.5	2.89 \pm 0.21
Surface area (μm^2)	40.02 \pm 4.54	8.56 \pm 0.82
Volume (μm^3)	143.98 \pm 31.26	16.76 \pm 2.50
<i>Platichthys stellatus</i>		
Major axis (μm)	8.12 \pm 1.15	3.88 \pm 0.71
Minor axis (μm)	5.60 \pm 0.63	2.53 \pm 0.25
Surface area (μm^2)	35.58 \pm 6.01	7.60 \pm 0.93
Volume (μm^3)	134.07 \pm 34.36	12.80 \pm 1.75

Table 2. Genome size of *Paralichthys olivaceus* and *Platichthys stellatus* determined by flow cytometry

Specis	Fish No.	Channel value of mean	C/V	C-value (pg/haploid cell)
<i>Misgurnus mizolepis</i>		220.29	25.44	1.4*
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1	113.64	10.47	
	2	111.04	9.59	
	3	105.51	16.42	
	4	116.7	7.7	
	Mean	111.72±4.74		0.71
<i>Platichthys stellatus</i>	1	101.71	10.44	
	2	102.25	11.21	
	3	100.32	13.88	
	4	111.12	9.31	
	Mean	103.85±4.91		0.66

*Park et al. (1999)

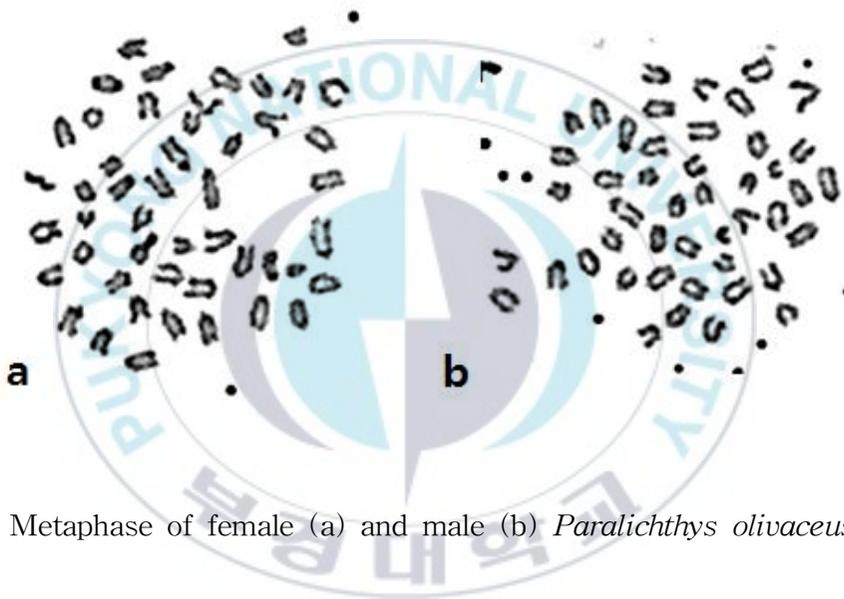


Fig. 1. Metaphase of female (a) and male (b) *Paralichthys olivaceus*.

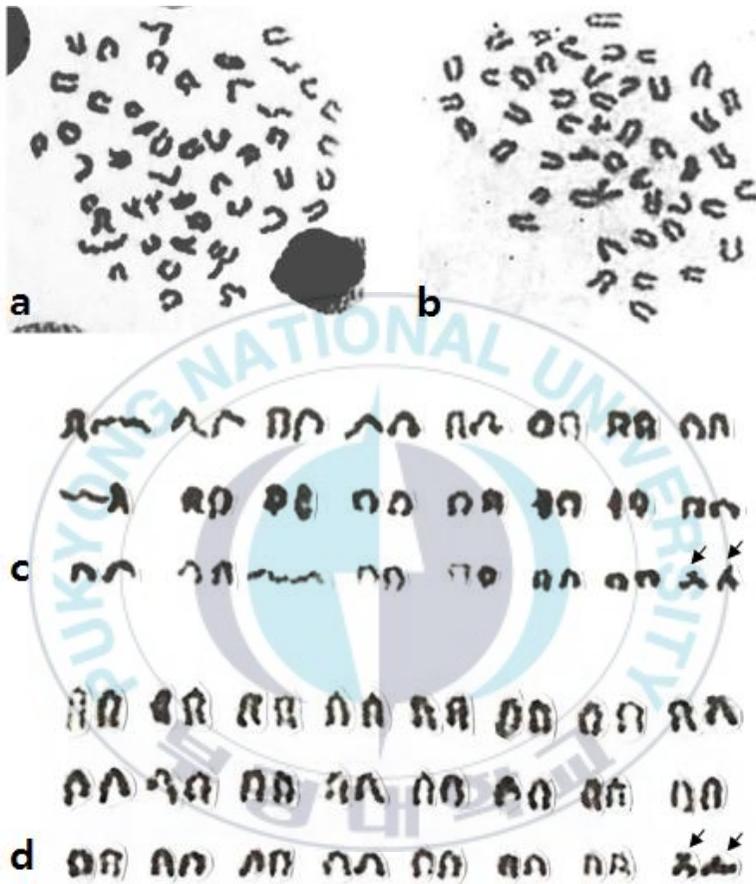


Fig. 2. Metaphase and idiogram of female (a & c) and male (b & d) *Platichthys stellatus*. Arrows indicate chromosomes with the largest short arm.

1-4. Nucleolus organizer region (NORs) 분석

넙치는 24 쌍의 차단부 염색체 중 가장 크기가 큰 한 쌍의 차단부 염색체의 장완 중간부위가 진하게 염색되어 해당부분이 인 형성 부위인 것으로 확인되었고, 암·수간 및 개체간의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3a, 3b). 반면에 강도다리는 암수 모두 가장 작은 1쌍의 차단부 염색체의 단완 부위가 인 형성 부위인 것으로 확인되었고(Fig. 3c, 3d), 넙치와 동일하게 암·수간 및 개체간의 차이는 나타나지 않았다.

2. 자성발생성 반수체 유도

2-1. 반수체 DNA 함량 분석

이배체 넙치를 대조군으로 하여 측정한 결과, 이배체 부화 자어의 DNA 함량은 1.42 ± 0.02 pg/cell으로 확인되었고, 반수체는 0.71 ± 0.01 pg/cell으로 확인되었다(Fig. 4). 이는 이배체 넙치의 DNA 함량의 50%에 해당하는 것으로 성공적으로 반수체가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

2-2. 반수체 넙치의 난발생

유도된 반수체 넙치의 배발생을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 2 세포기에서 128 세포기에 해당하는 난할 및 초기 포배기 동안은 반수체와 이배체의 발생 시기 및 형태가 동일한 것으로 관찰되었다. 128 세포기 이후부터 반수체의 발생시간이 이배체에 비해 점차 느려져 30% 피포기에 도달하는 시간이 이배체는 수정 후 12시간이었으나 반수체는 13시간이 경과되었다. 이후 이배체는 수정 13시간 후 최초로 배환(germ ring)이 관찰되었고, 반수체 배아에서는 이배체 배아보다 1시간 늦게(수정 14시간 후) 관찰되었고, 이때 반수체 배환의 형태는 이배체에 비하여 세포군의 이동이 늦어 두껍게 형성되는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 따라서

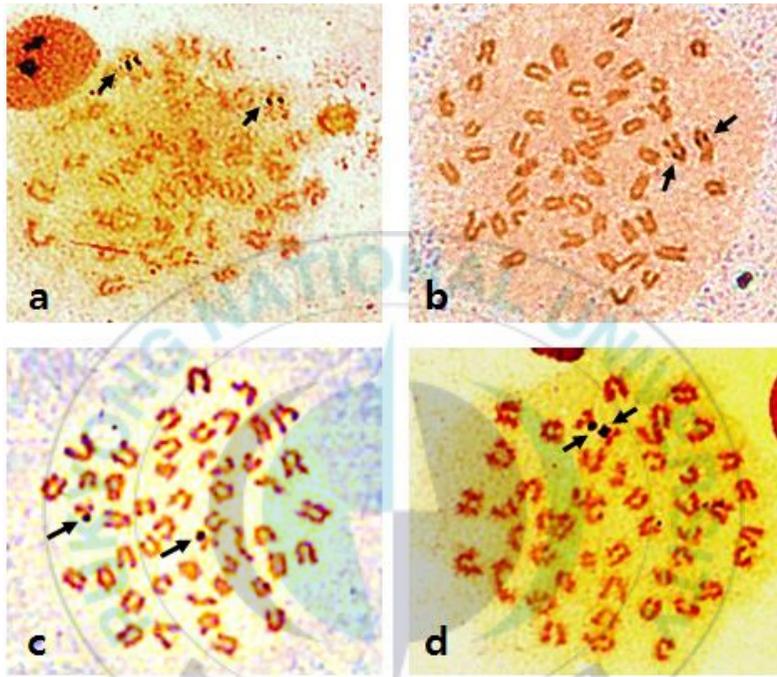


Fig. 3. Silver-stained metaphases of female and male in *Paralichthys olivaceus* (a, b) and *Platichthys stellatus* (c, d), respectively. Arrows indicate silver-stained NORs signal.

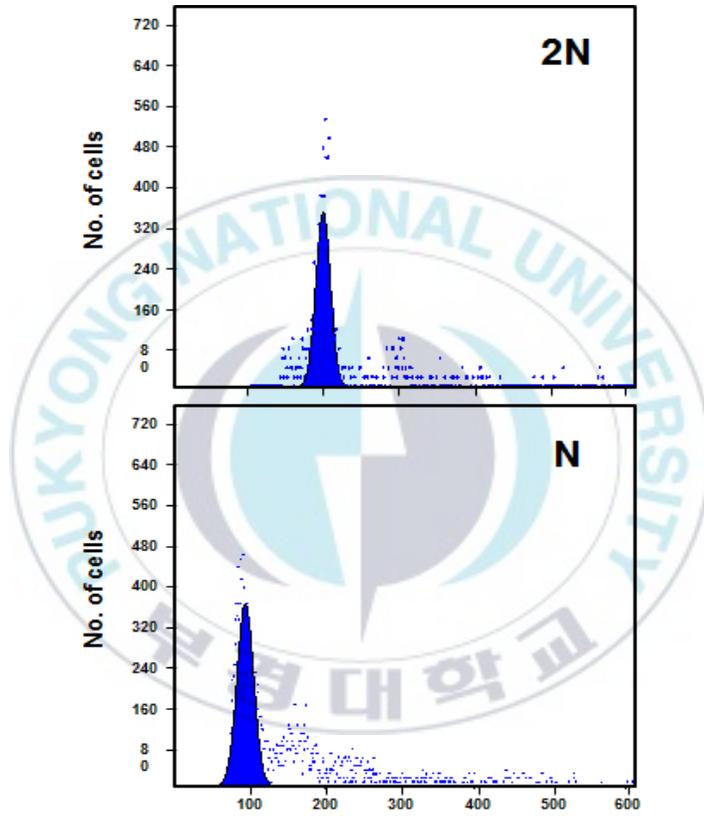


Fig. 4. Flow cytometric histograms for DNA content in diploid (2N) and haploid (N) *Paralichthys olivaceus*.

Table 3. Stage of embryonic development in diploid and haploid *Paralichthys olivaceus*

Stages	Diploid		Haploid	
	Hours after fertilization at 18±1°C	Corresponding figure	Hours after fertilization at 18±1°C	Corresponding figure
Cleavage period				
2 cells	1.5 h	-	1.5 h	-
4 cells	2.0 h	-	2.0 h	-
8 cells	2.6 h	-	2.6 h	-
16 cells	3.3 h	-	3.3 h	-
32 cells	4.3 h	-	4.3 h	-
64 cells	5.3 h	-	5.3 h	-
Blastula period				
128 cells	6.3 h	-	6.3 h	-
30% epiboly	12.0 h	-	13.0 h	-
Gastrula period				
Germ ring	13.0 h	-	14.0 h	-
Embryonic shield	14.0 h	Fig. 2a, c	15.0 h	Fig. 2b, d
40-45% epiboly	16.0 h	Fig. 3a, c	17.0 h	Fig. 3b, d
80% epiboly	20.0 h	Fig. 4a	21.0 h	Fig. 4b
90% epiboly	22.0 h	Fig. 4c, e	24.0 h	Fig. 4d, e
Segmentation period				
Kupffer's vesicle appearance	26.0 - 27.0 h	Fig. 5a	27.0 - 28.0 h	Fig. 5b
Kupffer's vesicle disappearance	34.0 - 36.0 h	Fig. 5c	34.0 - 36.0 h	Fig. 5d
Hatching period				
Hatching	55.0 h	Fig. 7a	55.0 h	Fig. 7b

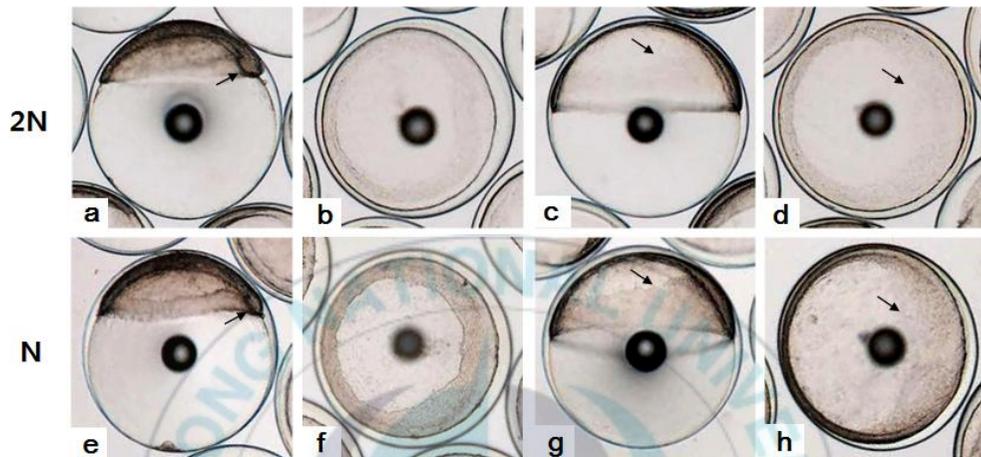


Fig. 5. External morphology of embryonic shield stage and 40 - 45% epiboly stage in diploid (a-d) and haploid (e-f) *Paralichthys olivaceus*. a, b: face view (a) and animal view (b) of embryonic shield stage in diploid at 14 hrs after fertilization. c, d: face view (c) and animal view (d) of 40 - 45% epiboly stage in diploid at 16 hrs after fertilization. e, f: face view (e) and animal view (f) of embryonic shield stage in haploid at 15 hrs after fertilization. Embryonic shield, arrow. g, h: face view (g) and animal view (h) of 40 - 45% epiboly stage in haploid at 17hrs after fertilization. Germ ring, arrow.

피포기가 진행될수록 이배체의 배환은 점차 열어지는 반면 반수체는 피포 형성 속도가 이배체에 비하여 점차 더 지연되어 90% 피포기에 도달하기 위해 반수체는 2시간이상 더 소요되었다(Table 4, Fig. 5). 배체 (embryonic body)의 형성은 이배체 배아의 경우 80% 피포 형성 단계에서 두부 형태가 나타나기 시작하여 90% 피포 형성단계에 도달하면 뚜렷한 배체가 형성되나, 반수체 배아는 90% 피포 형성 단계에 도달해야 비로소 비정상적인 형태의 짧은 배체가 넓게 형성되는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6).

Kupffer's vesicle은 반수체 배아에서 이배체보다 한시간 늦은 수정 후 27-28시간에 관찰되었으나, 사라지는 시기는 거의 동일하여 이배체 배아에 비해 적은 시간 동안만 존재하는 것으로 확인되었다(Table 3). 반수체 배아에서 Kupffer's vesicles은 이배체 배아와 동일한 위치인 꼬리썩(tail bud)에서 형성이 되지만, 그 형태와 크기가 개체에 따라 불규칙적으로 발달하는 것으로 관찰되었다(Fig. 7). 꼬리는 Kupffer's vesicles이 이형적으로 형성됨으로써 발생과정 중 신장하지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig. 8). 그러나 Kupffer's vesicle이 소실된 후 배체가 부화하기까지 두 실험군간 발생 시간의 차이는 관찰되지 않아 최초의 부화는 반수체와 이배체 모두 수정 후 55시간으로 동일하였다(Table 3).

2-3. 반수체 녀치의 부화자어 형태 분석

이배체 및 반수체 부화율은 각각 80.0 ± 9.4 % 및 6.9 ± 3.0 %로 나타났다. 반수체 부화 자어의 형태는 개체에 따른 차이가 존재하나 대부분 꼬리가 제대로 발달하지 못하였고, 몸체의 길이와 넓이가 이배체에 비하여 짧고, 넓은 것으로 관찰되었다(Figs. 8, 9). 반수체 처리군 1,000 알 중 꼬리 및 몸체가 기형적으로 발생한 개체는 962개로

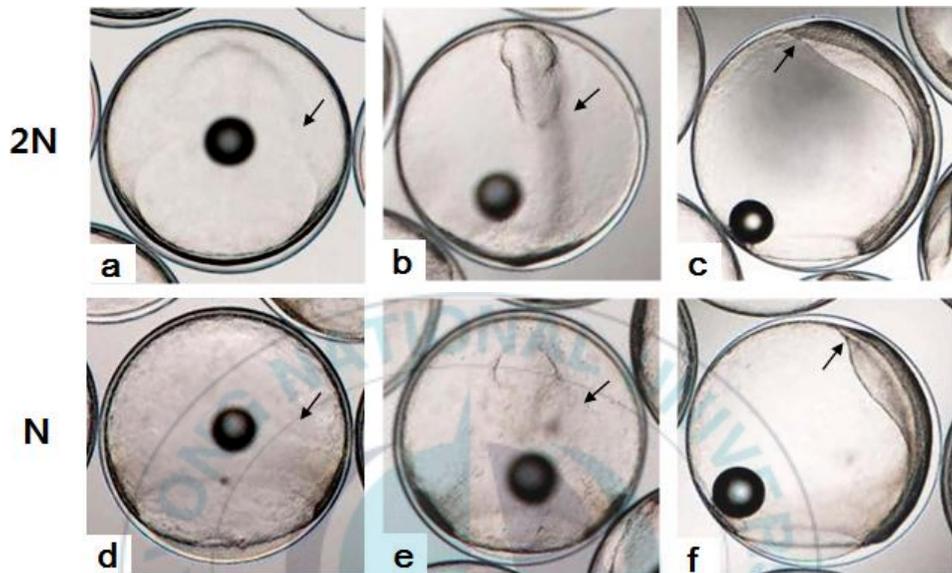


Fig. 6. Morphology of embryonic body in 80 - 90% epiboly stage of diploid (a-c) and haploid (d-f) *Paralichthys olivaceus*. a: Ventral view of 80% epiboly stage in diploid at 20 hrs after fertilization. b, c: Ventral view (b) and left side view (c) of 90% epiboly stage in diploid at 21 hrs after fertilization. d: ventral view of 80% epiboly stage in haploid at 21 hrs after fertilization. e, f: Ventral view (e) and left side view (f) of 90% epiboly stage in haploid at 24 hrs after fertilization. Embryonic body, arrow.

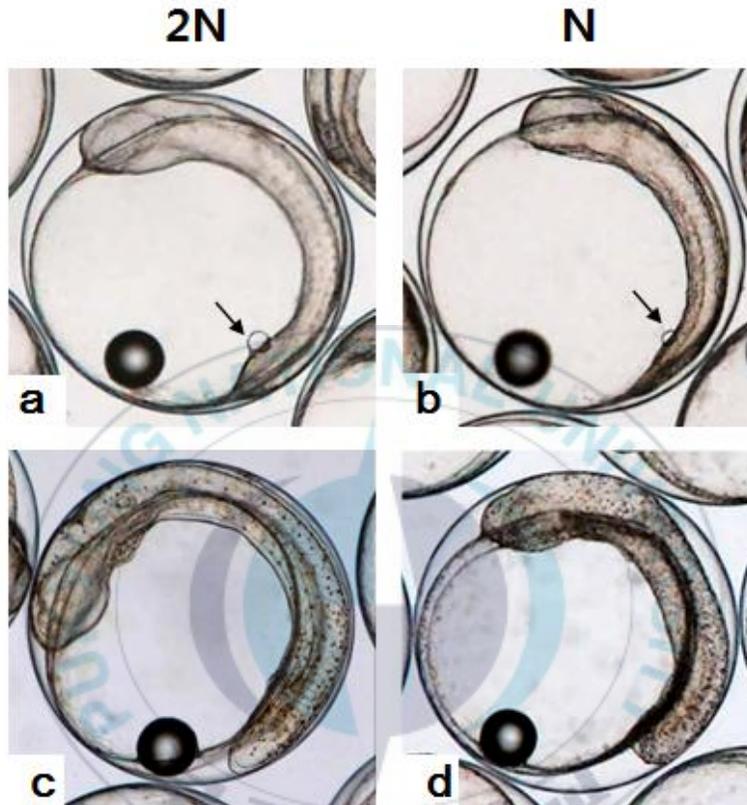


Fig. 7. Appearance and disappearance of Kupffer's vesicle in diploid (a,c) and haploid (b,d) *Paralichthys olivaceus*. a: Appearance of Kupffer's vesicle (arrow) in diploid at 25 hrs after fertilization. b: Appearance of Kupffer's vesicle (arrow) in haploid at 26 hrs after fertilization. c, d: Disappearance of Kupffer's vesicle in diploid (c) and haploid (d) at 34 - 36 hrs after fertilization. Kupffer's vesicle, arrow.

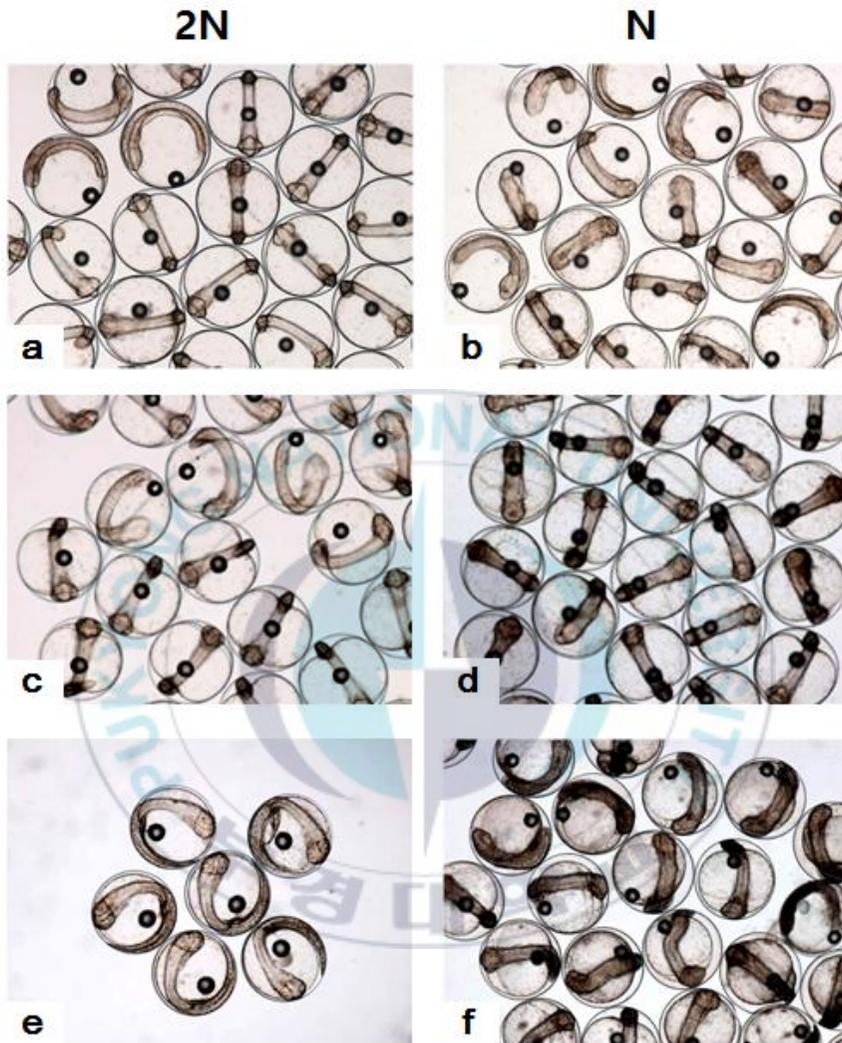


Fig. 8. Extension of tail bud in diploid (a, c, e) and haploid (b, d, f) *Paralichthys olivaceus*. a, b: The diploid (a) and haploid (b) embryo at 34 hrs after fertilization. c, d: The diploid (c) and haploid (d) embryo at 42 hrs after fertilization. e, f: The diploid (e) and haploid (f) embryo at at 54 hrs after fertilization.

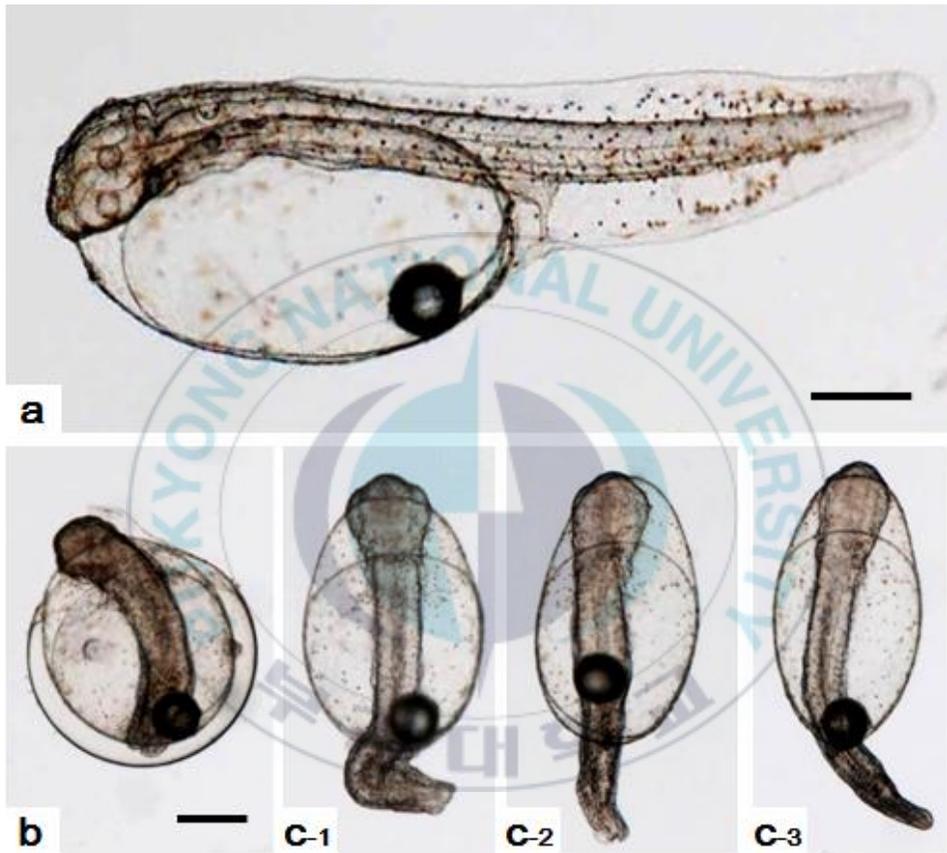


Fig. 9. The shape and length of tail in Just-hatched larva of diploid (a) and haploid (b, c) *Paralichthys olivaceus*. Scale bars indicate 0.25 mm

그 중 꼬리가 발달되지 못한 개체(Fig. 9b)는 903미, 꼬리가 일부 형성은 되었으나 발달되지 못한 개체(Fig. 9c)는 59미로 확인되었다. 이들 중 꼬리가 전혀 발달되지 못한 개체들은 부화를 하지 못하고 죽는 것으로 관찰되었으며, 꼬리가 이형적으로 발생된 개체는 부화는 가능하였으나 부화 후 6시간 이내에 모두 폐사하였다.

2-4. 반수체 녀치의 조직학적 분석

반수체 각 기관들의 형태학적 특징을 관찰하고자 부화 자어의 횡단면 및 종단면에 대한 조직분석을 수행하였고 그 결과는 Fig. 10 및 Fig. 11과 같다. 수정체(lens)와 신경 망막(neural retina)이 정상적으로 발달된 눈이 분명하게 형성되어 있는 이배체 자어와는 달리, 반수체 자어는 수정체와 신경 망막이 불분명하고, 양쪽 눈이 비대칭적인 위치에서 형성되는 것으로 확인되었다(Fig. 10a, 10b). 또한 귀소포(otic vesicles)의 경우, 이배체에서는 양쪽에 각각 한 개씩 위치하였으나(Fig. 10c), 반수체에서는 비정상적인 비대칭 형태와 개체별 1-2개로 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 10d).

신경관(neural tube)은 이배체 부화자어의 경우 신경관의 내부공간이 생성되지 않은 형태인 neural rod형태로 발달 하는 것으로 확인되었으나(Fig. 10e), 반수체에서는 구형의 형태조차 띄지 않는 neural keel의 형태로 관찰되어 신경 기관의 발생 지연현상이 관찰되었다(Fig. 10f). 또한 반수체에서 장(intestine)은 형태, 크기 및 내강(lumen)의 유무가 각 개체 별로 불규칙적으로 발달되는 것으로 관찰되었다(Fig. 10f). 또한 척색(notochord)이 일정한 형태 및 크기로 형성되는 이배체와 달리 반수체에서는 액포 세포가 길게 늘어지지 않고 동그란 형태를 유지하며, 그 형태 및 크기도 균일하지 않게 발달하였다(Fig. 10f).

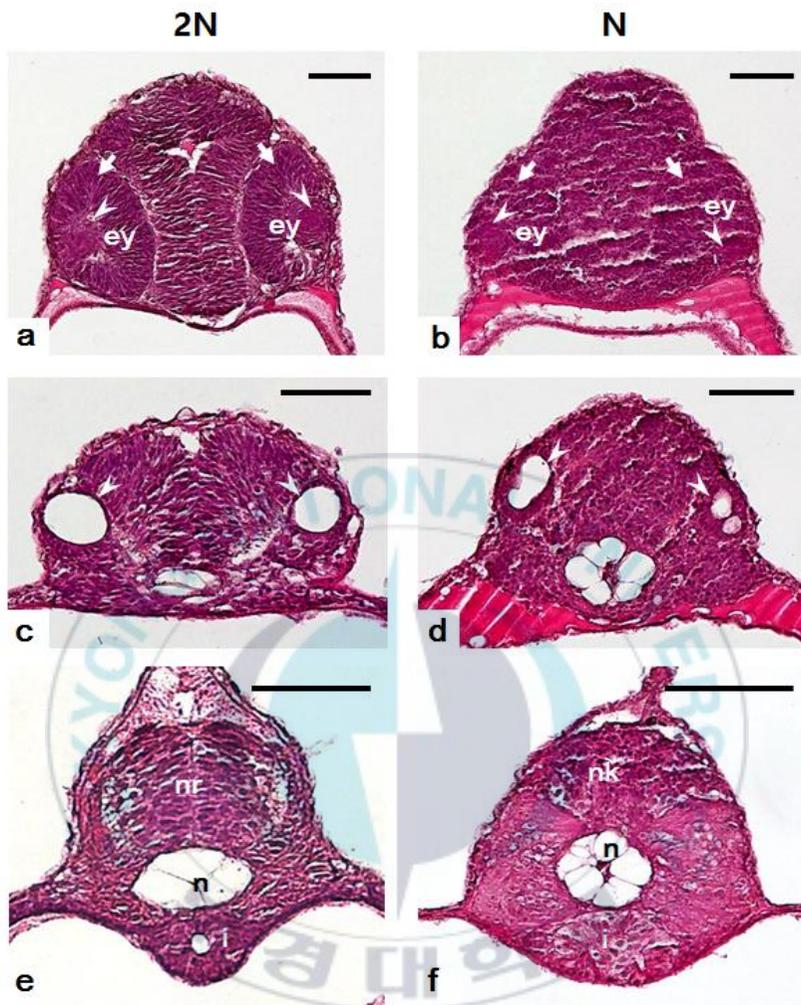


Fig. 10. Histological cross sections of head region in diploid and haploid *Paralichthys olivaceus* at hatching stage. a, b: Eyes (ey) of a diploid (a) and haploid (b) larva. Neural retina, arrows lens, arrowheads. c, d: Otic vesicles of a diploid (c) and haploid (d) larva. Otic vesicles, arrowheads. e: Neural rod (nr), notochord (n) and intestine (i) of a diploid larva. f: Neural keel (nk), notochord (n) and intestine (i) of a haploid larva. All scale bars indicate 50 μ m.

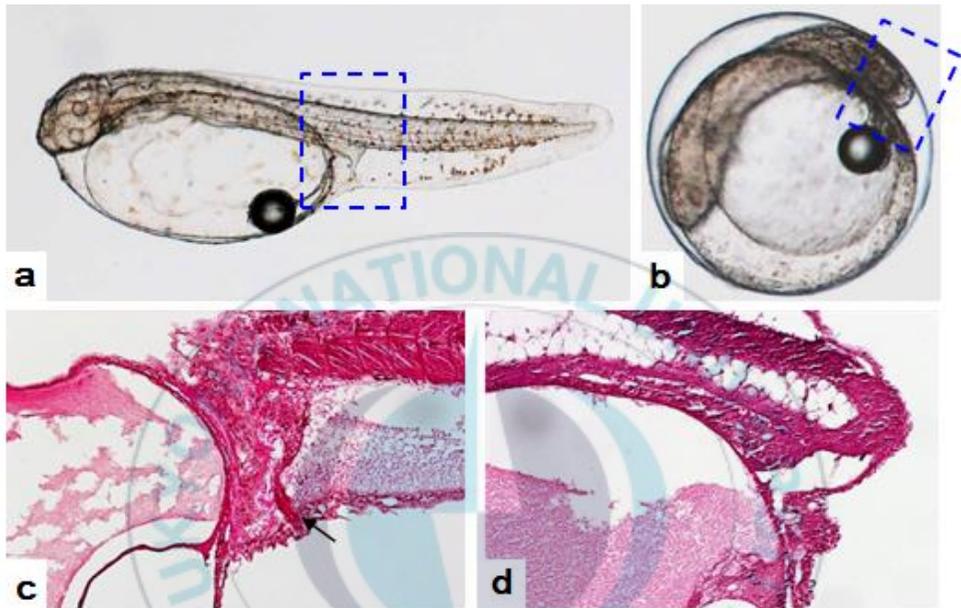


Fig. 11. Microphotography and histological section of diploid and haploid *Paralichthys olivaceus* at hatching stage. a: Microphotography of just-hatched larva in diploid. b: Microphotography of haploid embryo at hatching stage. c, d: Longitudinal section of just-hatched larva in diploid (c) and haploid (d). Anus (urogenital opening), arrow.

부화 자어의 종단면 조직분석 결과, 반수체에서도 체절(somite)이 발달은 되나, 그 형태가 불규칙하고 각 체절간의 구분이 불분명하였다(Fig. 11). 또한 장이 몸통부까지 발달되어 항문을 형성하는 이배체와는 달리, 반수체는 꼬리가 거의 형성되지 못함으로써 장이 몸통부까지 형성되지 못하고 항문 또한 형성되지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig. 11).

3. 자성발생성 2배체 유도

3-1. 강도다리 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도

3-1-1. 강도다리 정자의 확보

본 실험에 사용된 강도다리 수컷의 정소의 조직학적 분석 결과, 정소 내에 성숙한 정자들이 다량 존재하는 것으로 관찰되었고(Fig. 12), 이 들로부터 확보된 정자의 농도는 $2.11 \pm 0.97 \times 10^9$ cells/ml 로 확인되었다.

3-1-2. 자성발생성 2배체 유도율 분석

넙치 꼬리지느러미(1.42 pg/cell)를 대조군으로 사용하여 유도된 자성발생성 2배체 부화 자어 36 미의 DNA 함량을 분석한 결과, 26미는 1.43 ± 0.04 pg/cell (Fig 13b), 10미는 2.09 ± 0.03 pg/cell (Fig 13c)으로 확인되어 자성발생성 2배체 유도율은 27.8%으로 나타났다.

3-2. 넙치 정자의 불활성화를 통한 자성발생성 2배체 유도

3-2-1. 자성발생성 2배체 유도율 분석

앞서와 동일한 방법으로 유도된 자성발생성 2배체 부화 자어 107미의 DNA 함량을 분석한 결과, 83미는 1.44 ± 0.02 pg/cell (Fig 14b), 24미는 2.16 ± 0.05 pg/cell (Fig 14c)으로 확인되어 자성발생성 2배체 유도율은

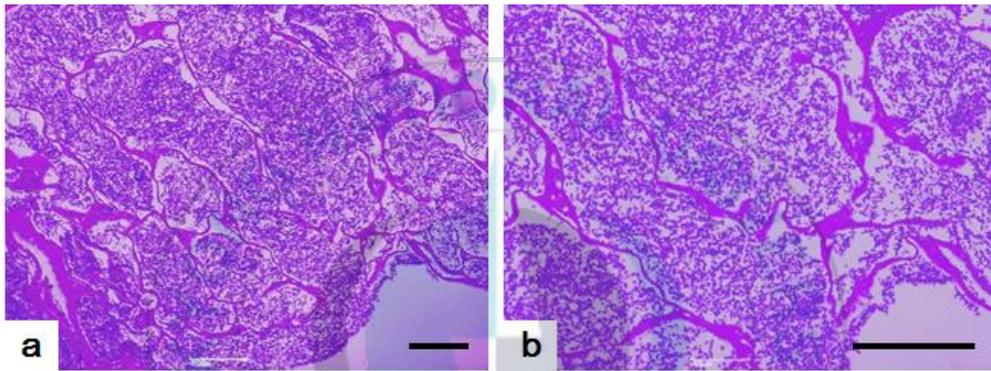


Fig. 12. Transverse sections of male gonad in *Platichthys stellatus*. Scale bars indicate 100 μm .

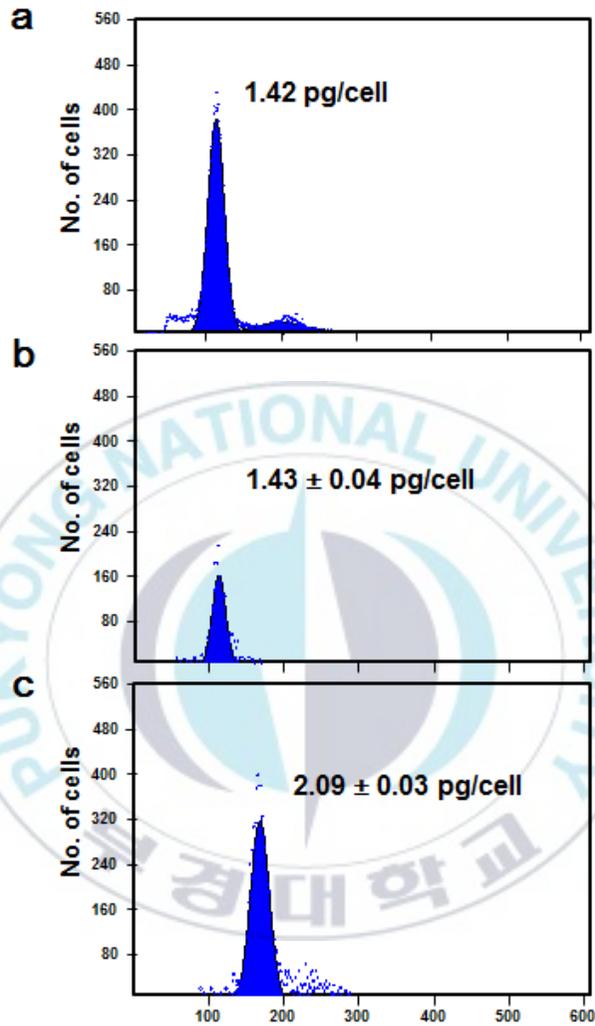


Fig. 13. Flow cytometric histograms of DNA contents of *Paralichthys olivaceus* (a) and gynogenetic diploid (b) and allotriploid (c) of female *Paralichthys olivaceus* and male *Platichthys stellatus*.

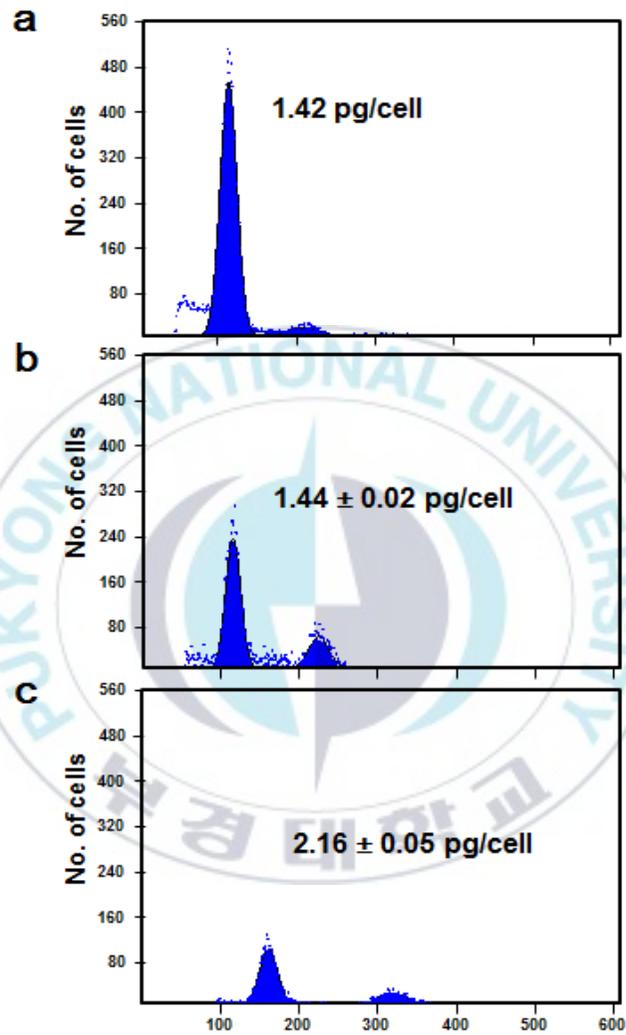


Fig. 14. Flow cytometric histograms of DNA contents of control (a), gynogenetic diploid (b) and triploid (c) of *Paralichthys olivaceus*.

77.6%으로 나타났다.

3-3. 자성발생성 2배체 집단 유도

3-3-1. 넙치 정자의 유전적 불활성화

넙치 정자를 0-13,500 erg/mm²의 자외선 농도로 조사한 후 농도의 증가에 따른 반수체 유도율을 확인한 결과, 97%의 반수체가 유도된 3,600 erg/mm²를 제외한, 5,400, 8,100, 10,800 및 13,500 erg/mm²에서 모두 100%로 확인되었다(Table 4).

3-3-2. 자성발생성 2배체 집단의 세포유전학적 분석

6개월령 자성발생성 2배체 집단의 세포 유전학적 분석을 수행한 결과, 적혈구 세포와 핵의 장축 및 단축은 각각 $9.63 \pm 0.42 \mu\text{m}$ 및 $5.38 \pm 0.33 \mu\text{m}$ 와 $3.72 \pm 0.25 \mu\text{m}$ 및 $2.94 \pm 0.12 \mu\text{m}$ 였고, 적혈구 세포와 핵의 표면적 및 부피는 각각 $40.64 \pm 3.35 \mu\text{m}^2$ 및 $146.17 \pm 20.22 \mu\text{m}^3$ 와 $8.57 \pm 0.55 \mu\text{m}^2$ 및 $16.79 \pm 1.39 \mu\text{m}^3$ 로 확인되어 넙치 2배체의 적혈구 세포 및 핵의 크기와 동일 한 것으로 확인되었다(Table 5, Fig 15). DNA 함량도 대조군과 동일하게 1.42 pg/cell로 확인되었고(Fig 16b), 염색체는 48개의 차단부 염색체로 구성되어 대조군 넙치와 염색체 수 및 핵형이 동일한 것으로 나타났다(Fig 16c). 또한 염색체의 NORs는 대조군 넙치와 동일하게 크기가 가장 큰 한 쌍의 차단부 염색체에서 진하게 염색되는 것으로 확인되었다(Fig 16d).

4. 자성발생성 2배체 수컷 유도

4-1. 생식소의 조직학적 분석

자성발생성 2배체 성전환 처리군 12미를 대상으로 생식소 분석을 수

Table 4. Effect of ultraviolet irradiation dose on haploid incidence of *Paralichthys olivaceus*

Dose of ultraviolet irradiation (erg/mm ²)	Haploid incidence (%)
0	0
3,600	97
5,400	100
8,100	100
10,800	100
13,500	100

Table 5. Erythrocyte measurement of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*

	Cell	Nucleus
<i>Paralichthys olivaceus</i>		
Major axis (μm)	9.63 \pm 0.42	3.72 \pm 0.25
Minor axis (μm)	5.38 \pm 0.33	2.94 \pm 0.12
Surface area (μm^2)	40.64 \pm 3.35	8.57 \pm 0.55
Volume (μm^3)	146.17 \pm 20.22	16.79 \pm 1.39

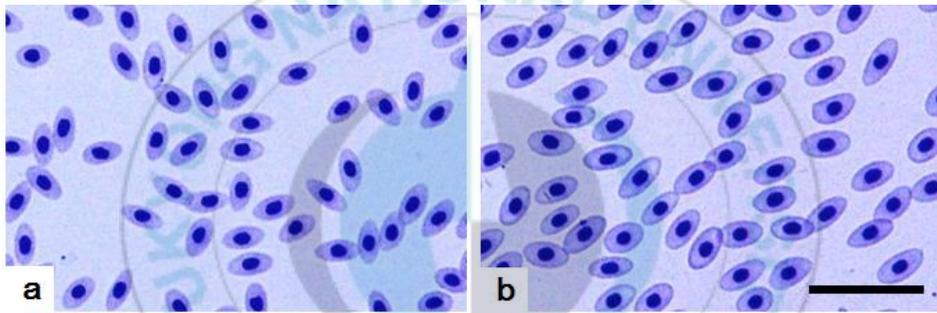


Fig. 15. Photographs of erythrocytes of control (a) and gynogenetic diploid (b) *Paralichthys olivaceus*. A scale bar indicates 25 μm .

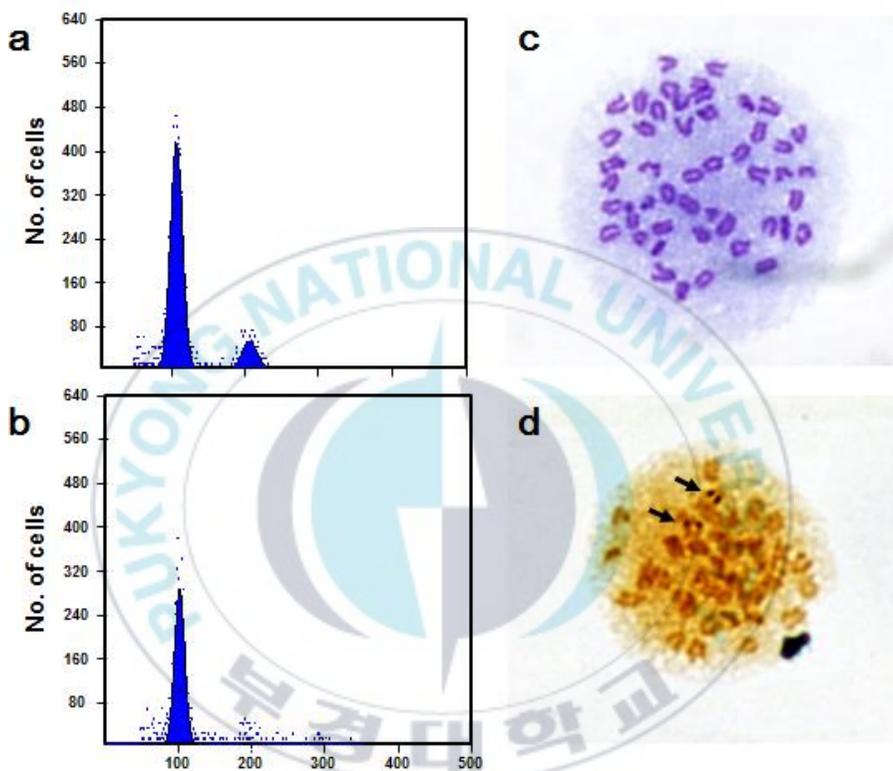


Fig. 16. Flow cytometric histograms for DNA contents of control (a) and gynogenetic diploid (b) *Paralichthys olivaceus*. Metaphase (c) and silver-stained metaphases (d) of gynogenetic diploid *Paralichthys olivaceus*. Arrows indicate silver-stained NORs signal.

행한 결과, 12미 모두 수컷으로 확인되었다(Fig. 17)

4-2. 자손 검정

넙치 암컷과 수컷의 교배 및 넙치 암컷과 성전환된 자성발생성 2배체 수컷의 교배에 의해 유도된 1개월령 자손의 암컷 유도율은 각각 45.9% 및 100%으로 확인되었다(Table 6). 또한 자성발생성 2배체 수컷 18미로부터 확보된 정자의 암수 유전자형 분석 결과 18미의 정자 모두 X 유전자형을 가지는 것으로 확인되었다. 이에 유도된 자성발생성 2배체 수컷은 암컷 유전자형(XX)을 가지며 정자를 생산하는 것으로 확인되었고, 이들 정자는 정상적인 생식능력을 가지고 전 암컷 자손을 유도하는 것으로 확인되었다.

4-3. 자성발생성 2배체 수컷의 가계별 특성 분석

4-3-1. 생존 및 성장

Microsatellite 분석 결과, 자성발생성 이배체 수컷은 5가계로 확인되었으며 이들의 각 가계별 생존 및 성장은 Table 7 및 Table 8과 같다. 5가계의 생존력은 'Z1-1697 > Z1-1788 > Z1-0219 > Z1-0335 > Z1-1779'로 확인되었고(Table 7), 성장의 경우 17개월령까지는 Z1-1697, Z1-1788 > Z1-0335 > Z1-0219 > Z1-1779 였으나, 22개월령에는 Z1-0335의 크기가 가장 큰 것으로 확인되었다(Table 8).

4-3-2. 외형

확보된 5 가계는 각각 계통 특이적인 외형을 지니고 있었으며 각 가계별 대표적인 9개월령의 외형은 대체로 Fig. 18와 같았다. 이중 가장 좋은 외형을 가진 가계는 체형이 둥글고 체고가 높은 Z1-0335인 것으로

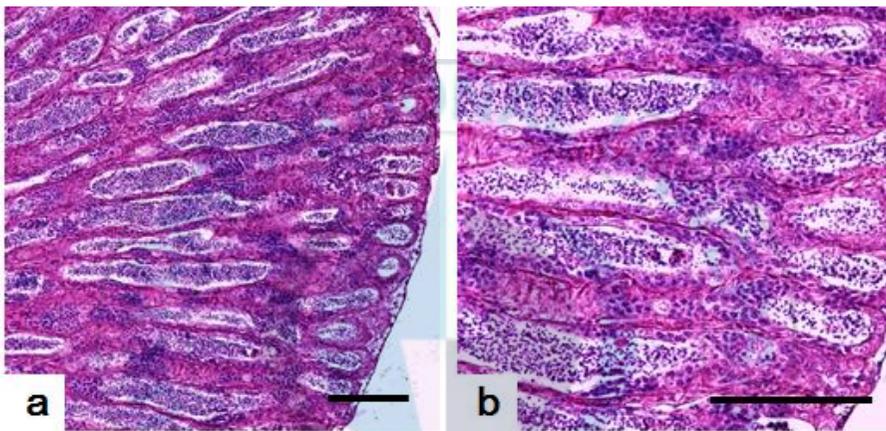


Fig. 17. Transverse sections of sex-reversed gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*. Scale bars indicate 100 μm .

Table 6. Progeny test results of control and sex-reversed gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*.

Exp. group	No. of fish examined	No. of Female	No. of male	incidence of female (%)
Cx ^c C*	12	6	6	50
	11	6	5	54.5
	12	4	7	33.3
CxSG	15	15	0	100
	12	11	0	100
	15	15	0	100

*Abbreviation: NxN, mating between control female and male; NxSG, matings between control female and sex-reversed gynogenetic diploid male.

Table 7. Survival rates of five strains of 28-month-old gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*.

Age (month)	Number of fish survived					Total
	Z1-1788	Z1-1697	Z1-0335	Z1-0219	Z1-1779	
4	105	106	10	21	4	258
9	94	103	9	13	4	223
11	93	103	9	13	4	222
17	62	86	5	7	2	162
22	58	85	5	7	2	157
28	54	75	5	7	2	143
	(51.4)*	(70.8)*	(50.0)*	(33.3)*	(50.0)*	(55.4)*

*Frequency (%)

Table 8. Growth of five strains of 22-month-old gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*.

	Z1-1788	Z1-1697	Z1-0335	Z1-0219	Z1-1779
4-month-old					
TL (cm)*	14.6±1.3	15.0±1.2	12.7±1.4	13.0±1.1	12.9±0.9
BW (g)*	25.3±7.4	28.5±6.7	17.5±6.3	17.8±4.1	17.5±3.1
CF*	7.9±0.8	8.4±0.7	8.2±0.5	8.1±0.9	8.1±0.3
9-month-old					
TL (cm)	33.0±1.5	32.8±1.5	29.4±1.7	29.6±1.8	29.6±0.5
BW (g)	348.1±58.8	377.9±51.6	300.3±49.3	280.1±41.0	269.0±15.8
CF	9.6±0.8	10.7±0.8	11.7±0.7	10.8±1.1	10.4±0.2
11-month-old					
TL (cm)	35.0±1.6	35.0±1.7	32.0±2.1	32.0±2.0	31.8±0.5
BW (g)	438.6±78.1	502.1±80.3	424.6±85.8	394.7±62.4	360.6±11.8
CF	10.2±0.9	11.6±0.9	11.1±0.7	12.0±1.1	11.2±0.2
17-month-old					
TL (cm)	41.7±2.2	41.9±2.6	40.8±1.3	39.7±1.6	38.4±0.4
BW (g)	745.8±145.7	860.5±175.0	816.7±60.4	699.1±75.9	627.5±11.5
CF	10.1±0.8	11.5±1.0	12.1±0.4	11.2±0.5	11.1±0.5
22-month-old					
TL (cm)	45.5±2.5	46.1±3.2	47.6±1.6	44.9±1.6	45.3±0.3
BW (g)	1028.0±197.4	1222.2±270.8	1458.4±92.8	1095.1±123.5	1078.5±8.5
CF	10.7±0.8	12.3±0.9	13.6±1.0	12.0±0.6	11.6±0.3

*Abbreviation: TL, total length; BW, body weight; CF, condition factor.



Fig. 18. External morphology of five strains of gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*.

확인되었다.

4-3-3. 질병저항성

가. Scuticocidal activity

Scuticocidal activity 분석은 총 3회 수행하였다. 각 분석은 각각 27, 28 및 29개월령에 수행되었으며 그 결과는 Fig. 19와 같다. 3회 분석 모두에서 Z1-1697 가계가 약간 높은 살충력을 나타냈으나, 유의적인 차이는 없었다($P < 0.05$).

나. Bacteriocidal activity

28개월령 자성발생성 2배체 수컷의 가계별 *E. tarda* 균 살균능을 분석한 결과, 5가계 모두에서 유의적인 차이는 확인되지 않았다(Fig. 20)($P < 0.05$).

다. Lymphocystis activity

17개월령 자성발생성 수컷의 lymphocystis 활성을 가계간 비교한 결과, 감염 비율이 가장 낮은 가계는 'Z1-1697' (74.6%)로 확인되었고, 감염 비율이 가장 높은 가계는 'Z1-0219' (100%)로 나타났다. 또한 가계 내 lymphocystis 감염 정도가 가장 심한 집단은 'Z1-1788' 이었다(Table 9). 각 가계별 Lymphocystis 감염 정도를 수치화 한 결과(가계 내 감염 집단 비율*평가 점수), 'Z1-1788' 82.1점, 'Z1-1697' 46.6점, 'Z1-0219' 54.6점, 'Z1-1779' 175점 및 'Z1-0335' 175점으로 나타나 lymphocystis에 대한 저항성이 가장 높은 가계는 'Z1-1697'이었다(Table 9).

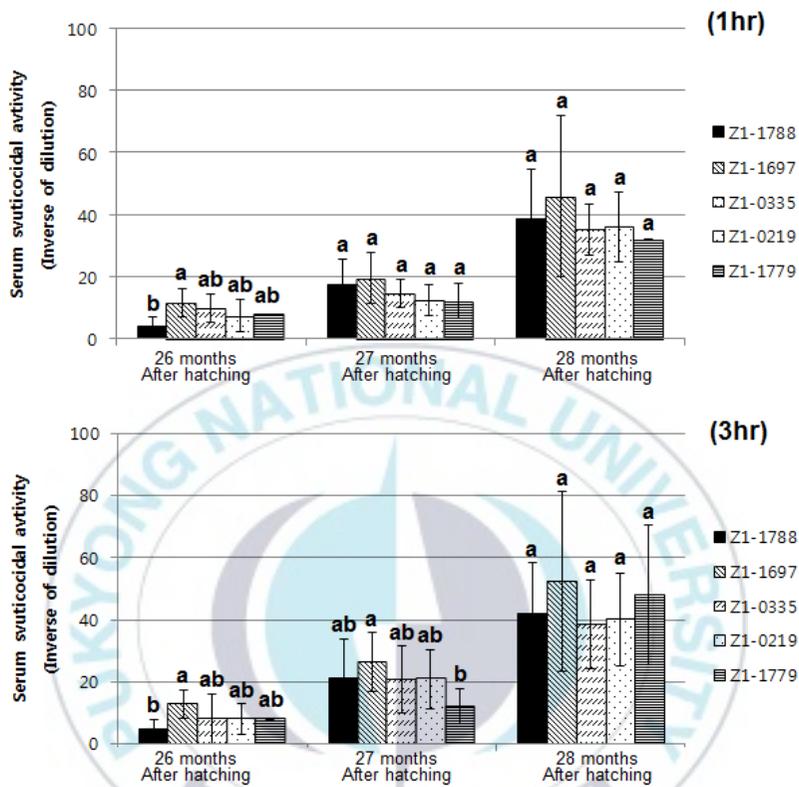


Fig. 19. Scuticocidal activity of sera collected from five strains of gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*.

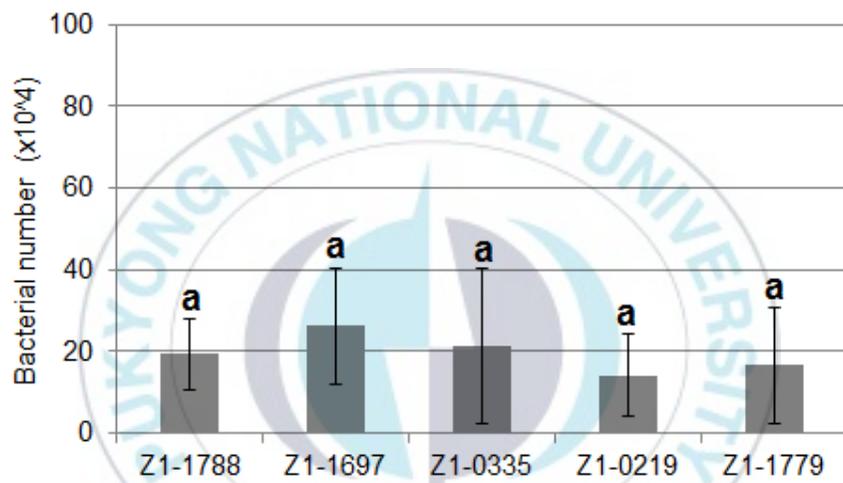


Fig. 20. Bacteriocidal activity of sera collected from five strains of gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*.

Table 9. Number of fish with lymphocystis disease (LD) in five strains of gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*.

Strain	LD activity*	Infection rate (%) at stages of LD			
		0	1	2	3
Z1-1788	82.1	55.1	21.8	9.0	14.1
Z1-1697	46.6	74.6	12.7	4.2	8.5
Z1-0335	175	12.5	25.0	37.5	25.0
Z1-0219	54.6	63.6	18.2	18.2	0
Z1-1779	175	0	25.0	75.0	0

*LD activity= Infection rate (%) at stage x stage

4-3-4. 생식 및 생존능력

가. 정자 농도

성전환된 자성발생성 이배체 수컷의 생식능력을 확인하기 위해 각 가계별 4미를 선별하여 정액을 확보한 후 정자의 농도를 측정된 결과, 정액의 양은 가계별로 유의적인 차이가 없었으나($P < 0.05$), 정자의 농도는 'Z1-0335' ($773.1 \pm 571.6 \times 10^7$ sperms/ml)가 가장 높은 것으로 확인되었다($P < 0.05$)(Table 10).

나. 수정 및 발생 능력

넙치 암컷의 난과 자성발생성 2배체 수컷의 정자를 수정한 후 3일째 부상율은 'Z1-1788'과 'Z1-0219'이 가장 높게 나타났고, 1개월령 생존개체 수는 'Z1-1788' 62미, 'Z1-1697' 8미, 'Z1-0219' 42미, 'Z1-0335' 29미 및 'Z1-1779' 56미로 초기생존율이 가장 높은 가계는 'Z1-1788'이었다(Table 11). 또한 1개월령 개체의 전장 측정된 결과, 'Z1-1788'과 'Z1-1697'는 8.934 ± 0.51 mm 및 8.781 ± 0.39 mm로 관찰되었고, 'Z1-0219', 'Z1-0335' 및 'Z1-1779'는 8.167 ± 0.57 mm, 7.995 ± 0.78 mm 및 8.431 ± 0.55 mm으로 관찰되어 'Z1-1788'의 초기성장이 가장 빠른 것으로 나타났다(Table 11).

5. 전암컷 3배체 유도

5-1. 인공 채정 유도

자성발생성 2배체 수컷으로부터 양질의 정자를 대량 확보하기 위해 HCG와 CP를 이용한 인공 채정 유도 실험을 수행한 결과는 Table 12와 같다. 호르몬 미주입군(대조군)과 PBS 주입군에서 3일간 정액의 양이 크게 증가하지 않는 것으로 관찰되었다. HCG의 경우, 모든 농도에서 정액의 양이 점차 증가되어 3일째에 가장 많은 정액이 확보되었고, 그 중

Table 10. Number of spermatozoa per 1 ml of milt in five strains of gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*.

Strain	Amount of milt (ml)	Number of sperms per 1 ml milt ($\times 10^7$ sperms/ml)
Z1-1788	0.48 \pm 0.15 ^a	276.4 \pm 142.3 ^b
Z1-1697	0.46 \pm 0.12 ^a	390.3 \pm 281.8 ^{ab}
Z1-0335	0.33 \pm 0.19 ^a	773.1 \pm 571.6 ^a
Z1-0219	0.35 \pm 0.37 ^a	256.8 \pm 128.6 ^b
Z1-1779	0.51 \pm 0.28 ^a	365.6 \pm 270.2 ^{ab}

Table 11. Early survival and growth (total length at 1-month-old) of 5 experimental groups

	Treated egg (cc)	Floating rate I (%) [*]	Floating rate II (%) ^{**}	1-month-old	
				No. of fish	Total length (mm)
Z1-1788	18	3.6	2.2	42	8.934±0.51
Z1-1697	18	14.4	1.4	8	8.781±0.39
Z1-0335	18	10	1.1	56	7.995±0.78
Z1-0219	18	11.1	2.2	62	8.167±0.57
Z1-1779	18	13.3	1.7	29	8.431±0.55

* 2-day after fertilization

** 3-day after fertilization

Table 12. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CP) in gynogenetic diploid male *Paralichthys olivaceus*

Injection group	Days after injection			
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
Non	0.04±0.05	0.01±0.01	0.04±0.05	0.07±0.05
PBS (0.1cc)	0.04±0.05	0.04±0.05	0.02±0.02	0.09±0.10
HCG				
1 IU/g	0.13±0.14	0.03±0.02	0.08±0.04	0.80±0.46
2 IU/g	0.01±0.01	0.09±0.10	0.08±0.04	0.80±0.36
4 IU/g	0.04±0.05	0.02±0.02	0.11±0.09	0.68±0.39
CP				
25 mg/kg	0.01	0.02±0.02	0.01±0.01	0.10±0.10
50 mg/kg	0.01±0.01	0.02±0.01	0.04±0.05	0.12±0.07
100 mg/kg	0.01±0.01	0.06±0.04	0.04±0.05	0.10±0.08
HCG + CP				
1 IU/g+25 mg/kg	0.02±0.01	0.02±0.02	0.04±0.01	0.2
2 IU/g+50 mg/kg	0.05±0.04	0.01±0.02	0.03±0.02	0.53±0.10
4 IU/g+100 mg/kg	0.10±0.10	0.13±0.17	0.14±0.07	0.18±0.03

2 IU/g 처리군이 0일째에 0.01 ± 0.01 cc에서 3일째에 0.80 ± 0.36 cc 정액이 확보되어 가장 큰 폭으로 증가되었다. CP 주입군은 2회 주입까지는 정액양 변화에 큰 변화가 없었으나, 3회 주입 후에 증가 하는 것이 확인되었다. 그러나 정액의 증가량이 HCG 주입군에 비해 낮았으며, CP 주입 농도에 따른 차이도 나타나지 않았다. HCG와 CP 동시 주입군은 2회 주입까지는 정액양 변화에 큰 변화가 없었으나, 3회 주입 후에 증가 하는 것이 확인되었고, 가장 높은 농도보다 HCG 2 IU/g와 CP 50 mg/kg을 동시 주입한 경우가 가장 높은 정액 증가율을 보였다. 이에 HCG 주입군이 CP 주입군 및 HCG와 CP 동시 주입군보다 넙치 정소 성숙에 보다 효과적인 것으로 확인되었으며, 그 중 HCG 2 IU/g가 가장 효과적인 농도인 것으로 확인되었다.

5-2. 세포유전학적 분석

유도된 전암컷 3배체 집단의 세포유전학적 분석을 수행한 결과, 적혈구 세포와 핵의 표면적 및 부피는 각각 $64.57 \pm 6.57 \mu\text{m}^2$ 및 $301.50 \pm 47.70 \mu\text{m}^3$ 와 $12.61 \pm 0.62 \mu\text{m}^2$ 및 $30.06 \pm 3.89 \mu\text{m}^3$ 로 확인되어 넙치 2배체의 적혈구 세포 및 핵의 표면적 및 부피의 1.5-2배인 것으로 확인되었다(Table 13, Fig 21a-21b).

2배체 넙치의 부화자어를 대조군으로 하여 전암컷 3배체의 DNA 함량을 분석한 결과 2.41 ± 0.03 pg/cell로 확인되었고(Fig 21c), 염색체는 72개의 차단부 염색체로 구성되어 있었다(Fig 21d). 또한 크기가 가장 큰 3개의 차단부 염색체에서 NOR band가 관찰되었으며(Fig 21e), 세포 핵 내 3개의 silver staining positive spot이 관찰되어(Fig 21f). 3배체가 유도되었음이 확인되었다.

Table 13. Erythrocyte measurement of diploid and all-female triploid in *Paralichthys olivaceus*

	Diploid (2N)	All female triploid (3N)	Ratio (3N/2N)
Cell			
Major axis (μm)	9.59 \pm 0.49	11.78 \pm 0.59	1.23
Minor axis (μm)	5.32 \pm 0.5	6.97 \pm 0.43	1.31
Surface area (μm^2)	40.02 \pm 4.54	64.57 \pm 6.57	1.61
Volume (μm^3)	143.98 \pm 31.26	301.50 \pm 47.70	2.09
Nucleus			
Major axis (μm)	3.73 \pm 0.21	4.59 \pm 0.27	1.23
Minor axis (μm)	2.89 \pm 0.21	3.53 \pm 0.21	1.22
Surface area (μm^2)	8.56 \pm 0.82	12.61 \pm 0.62	1.47
Volume (μm^3)	16.76 \pm 2.50	30.06 \pm 3.89	1.79

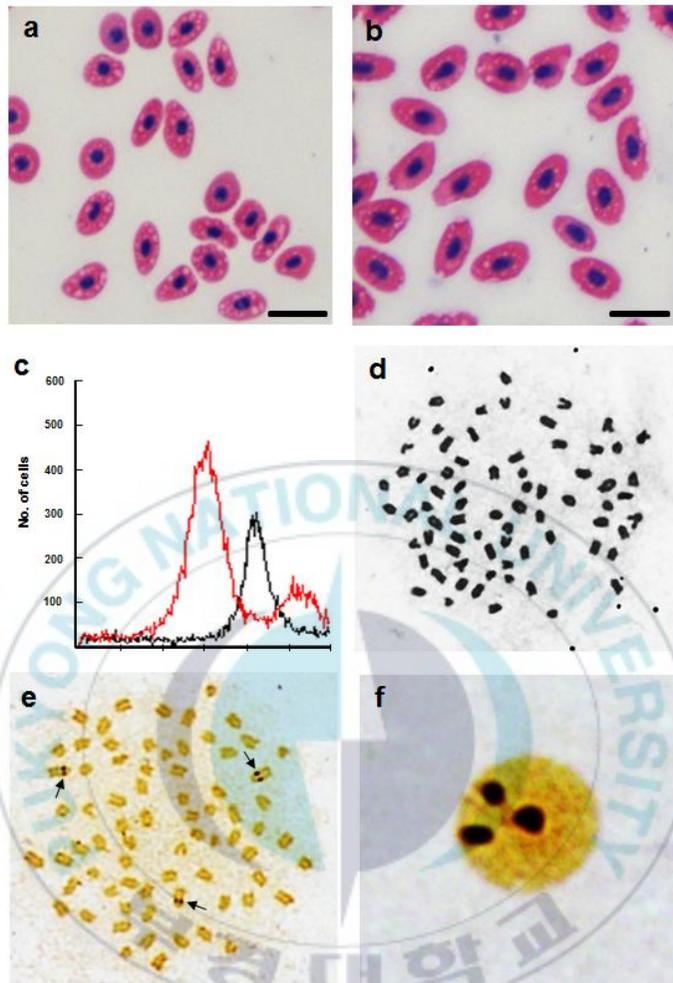


Fig. 21. Cytogenetic analysis of all-female triploid of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. a, erythrocytes of diploid (nuclear volume, $16.76 \pm 2.50 \mu\text{m}^3$); b, erythrocytes of all-female triploid (nuclear volume, $30.06 \pm 3.89 \mu\text{m}^3$); c, flow cytometry histogram in diploid (red, 1.42 pg/cell) and all-female triploid (black, 2.14 ± 0.03 pg/cell); d, metaphase spread of all-female triploid ($3N=72$); e, NOR-banded metaphase of all-female triploid. Arrows indicate NOR-banded chromosomes; f, silver stained nucleus of caudal fin. Bar indicates 10 μm .

5-3. 난발생

전암컷 3배체의 난발생 과정 및 수온별 발생 시간은 Table 14 및 Fig 22와 같으며, 이들의 난발생 특징 및 시간은 넙치 2배체와 동일한 것으로 관찰되었다.

5-4. 세포 주기

2배체, 3배체 및 전암컷 3배체의 G₁, S 및 G₂+M기의 세포 주기를 분석한 결과는 Table 15과 Fig. 23와 같다. G₁기의 경우, 2배체 62.1±3.3%, 3배체 65.4±3.6% 그리고 전암컷 3배체 64.3±1.9%으로 확인되어 배수성에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 그러나 S기 및 G₂+M기의 경우 2배체는 4.8±1.4% 및 31.2±2.8%으로 3배체(9.7±3.4% 및 22.5±1.7%)와 전암컷 3배체(9.9±1.7% 및 23.3±2.1%)보다 유의적으로 낮아 2배체가 3배체 보다 유사분열이 활발한 것으로 판단되었다(P<0.05).

5-5. 혈액학적 분석

2배체, 3배체 및 전암컷 3배체의 혈액학적 분석 결과, RBC (red blood cell, 적혈구)의 농도는 2배체 4.60±0.39 cells/pL, 3배체는 2.49±0.44 cells/pL 및 전암컷 3배체 2.53±0.37cells/pL로 확인되었고, Hct (hematocrit, 적혈구 용적률)는 2배체, 3배체 및 전암컷 3배체가 23.0±2.7%, 19.5±2.5% 및 20.6±1.7%로 측정되어 RBC와 Hct 모두 2배체가 높은 것으로 확인되었다. 그러나 MCV (평균 적혈구 용적)은 50.93±6.22 fL (2배체) 80.41±1.0 fL (3배체) 및 79.70±6.99 fL (전암컷 3배체)으로 측정되어 3배체가 2배체보다 큰 것으로 확인되었다. 또한 Hb (hemoglobin, 혈색소), MCH (평균 적혈구 혈색소량) 및 MCHC (적혈구 혈색소 농도)도 3배체가 2배체에 비해 높은 것으로 확인되었다(Table 16).

Table 14. Embryonic development of diploid and all-female triploid *Paralichthys olivaceus* at different water temperatures

	Diploid			All female triploid		
	10°C	14°C	18°C	10°C	14°C	18°C
Cleavage period						
2cell	4 h	2 h	1.5 h	4 h	2 h	1.5 h
8cell	6 h	4 h	2.5 h	6 h	4 h	2.5 h
32cell	9 h	6 h	4 h	9 h	6 h	4 h
Blastula period						
Mid-blastula	15 h	10 h	8 h	15 h	10 h	8 h
Gastrula period						
Germ ring	34 h	17 h	13 h	34 h	17 h	13 h
80-90% epiboly	52 h	27 h	21 h	52 h	27 h	21 h
Segmentation period						
Kupffer's vesicle appearance	69 h	35 h	26 h	69 h	35 h	26 h
Kupffer's vesicle disappearance	98 h	53 h	36 h	98 h	53 h	36 h
Hatching period						
Hatching	121 h	80 h	55 h	121 h	80 h	55 h

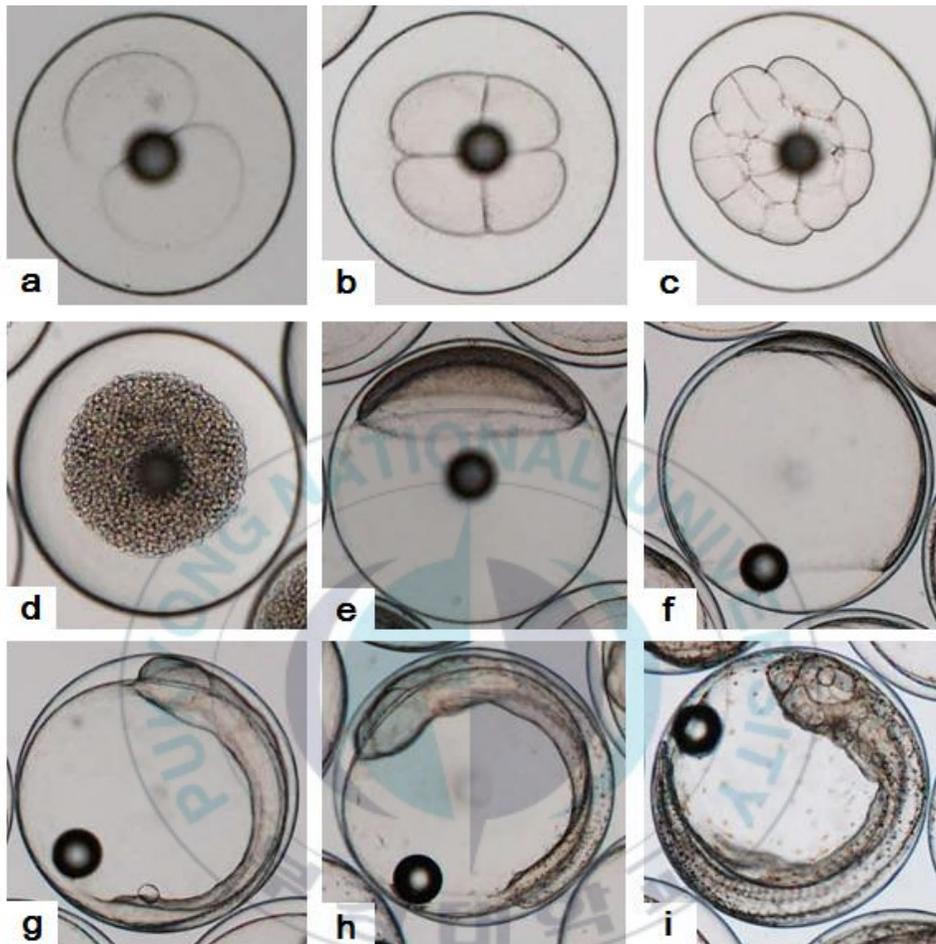


Fig. 22. External morphology of embryonic development in all-female triploid *Paralichthys olivaceus*. a: 2 cell stage, 1.5 h. b: 4 cell stage, 2.0 h. c: 16 cell stage, 3.3 h; d. mid-blastula stage, 8 h. e: germ ring stage, 13 h. f: 80-90% epiboly stage, 21 h. g: Kupffer's vesicle appearance, 26 h. h: Kupffer's vesicle disappearance stage, 36 h. i: pre-hatching, 54 h.

Table 15. Relationship of cell cycle phase fraction of experimental groups in *Paralichthys olivaceus*

	Percentage of cell cycle phase fraction (%)		
	G ₁	S	G ₂ +M
Diploid	62.1±3.3 ^a	4.8±1.4 ^a	31.2±2.8 ^a
Triploid	65.4±3.6 ^b	9.7±3.4 ^b	22.5±1.7 ^b
All female triploid	64.3±1.9 ^{ab}	9.9±1.7 ^b	23.3±2.1 ^b

*Value are means±SD.

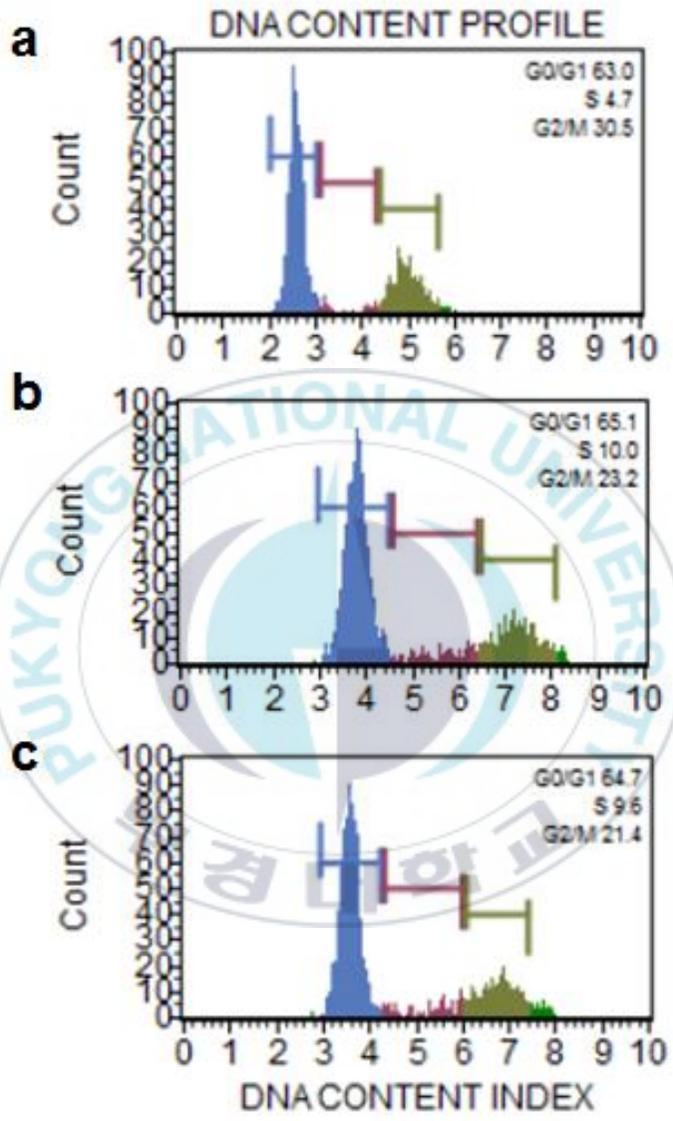


Fig. 23. DNA histogram of diploid (a), triploid (b) and all-female triploid (c) in *Paralichthys olivaceus*. blue, G0/G1; red, S; green; G2+M.

Table 16. Haematological indices in diploid, triploid and all-female triploid of *Paralichthys olivaceus*

	2N	3N	AF 3N	Ratio (AF3N/2N)
RBC (cells/pL)	4.60±0.39	2.49±0.44	2.53±0.37	0.55
Hct (%)	23.0±2.7	19.5±2.5	20.6±1.7	0.89
MCV (fL)	50.93±6.22	80.41±1.02	79.70±6.99	1.61
Hb (g/L)	50.53±7.88	58.72±9.86	58.93±11.20	1.18
MCH (pg)	11.05±0.98	24.22±3.44	24.12±2.29	2.13
MCHC (pg/fL)	0.22±0.01	0.30±0.04	0.29±0.06	1.32

5-6 질병 저항성 평가

5-6-1. Scuticocidal activity

Scuticocidal activity 분석은 총 2회 수행되었고 그 결과는 Fig. 24과 같다. 2회차의 3시간째 결과에서 전암컷 3배체의 스쿠티카충 살충력이 2배체보다 유의적으로 높은 것으로 확인되었으나, 그 외 분석 결과에서는 2배체와 전암컷 3배체의 스쿠티카충 살충력이 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다($P < 0.05$).

5-6-2. Bacteriocidal activity

2배체와 전암컷 3배체의 *E. tarda* 균 살균능을 분석한 결과, 전암컷 3배체가 2배체보다 *E. tarda* 균 살균능이 유의적으로 낮은 것으로 확인되었으나 3배체와는 유의적 차이가 없었다($P < 0.05$)(Fig. 25).

5-7. 생식소 조직학적 분석

2배체와 3배체에 대하여 난소조직을 분석한 결과는 Fig. 26과 같았다. 2배체 암컷의 경우, 전장 10-20cm 생식소에서 제 1성장기의 난모세포(primary growth oocyte, Fig. 26a-26c)들이 관찰되었고, 전장 22-24 cm의 생식소에서는 난황형성이 진행되고 있는 제 2성장기 초기 난모세포(early secondary growth oocyte, Fig. 26d)가 관찰되기 시작하였다. 그러나 3배체 암컷의 경우는 전장 22-24 cm 생식소에서 대부분 난원세포(oogonium)로 구성되어 있었고, 소량의 염색인기 난모세포(chromatin nucleolus oocytes)만이 관찰되었다(Fig. 26e-26h).

전장 25.5 cm의 전암컷 3배체의 난소조직도 역시 다량의 난원세포들과 염색인기 난모세포들로 구성되어 있어 2배체 난소조직에 비해 3배체 난소조직의 발달이 거의 이루어지지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 27)

2배체 수컷의 경우, Fig. 28에서 보듯이 전장 24 cm 생식소에서 다수

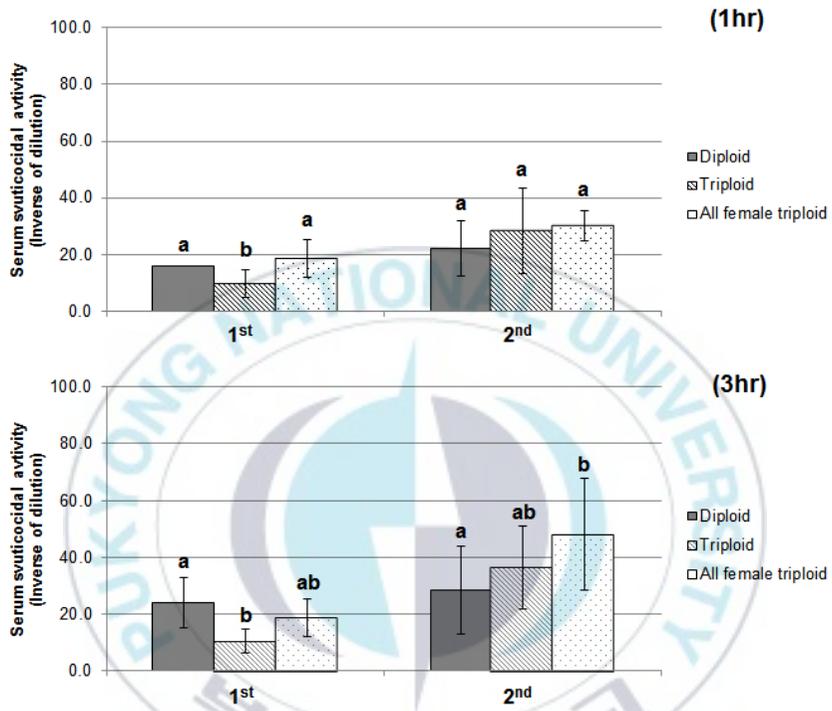


Fig. 24. Scuticocidal activity of sera collected from diploid, triploid and all-female triploid *Paralichthys olivaceus*.

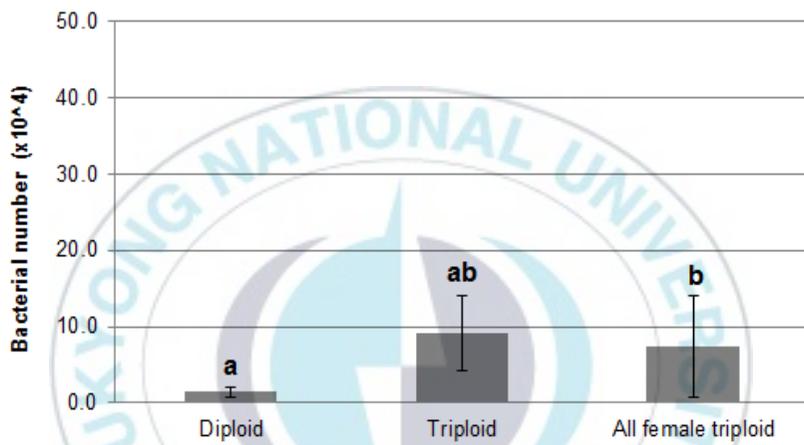


Fig. 25. Bacteriocidal activity of sera collected from diploid, triploid and all-female triploid in *Paralichthys olivaceus*.

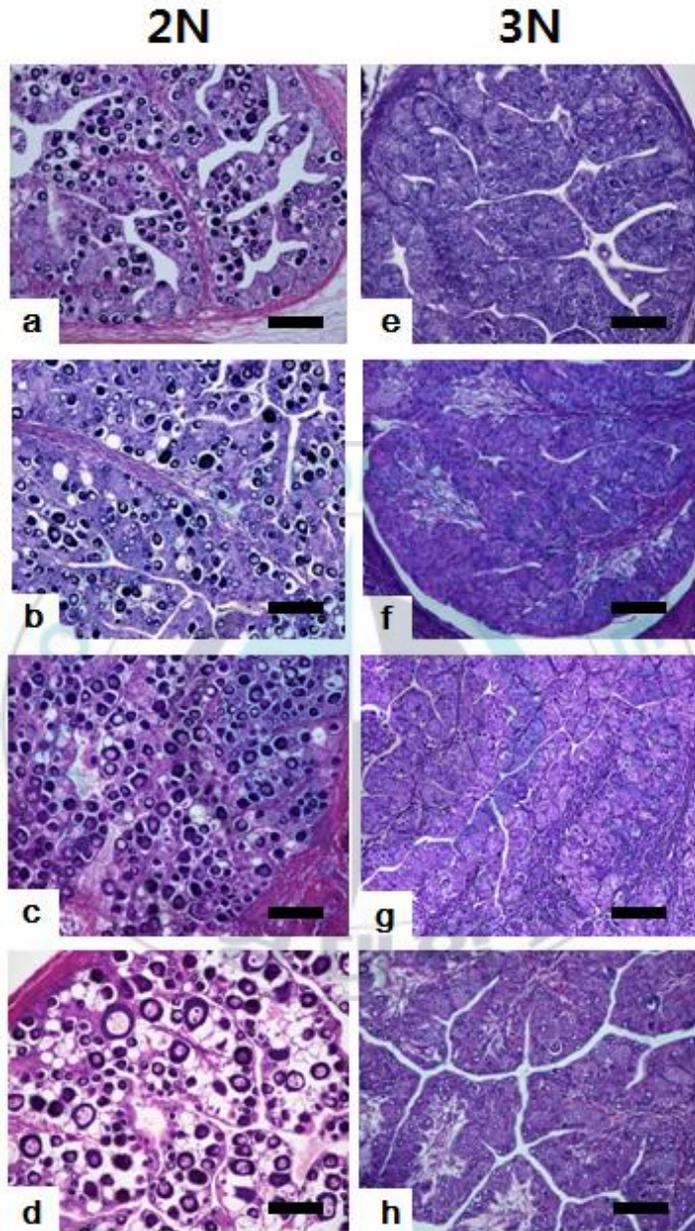


Fig 26. Transverse sections of diploid (a-d) and triploid (e-h) *Paralichthys olivaceus* ovary. Total length: a, e, 13-15 cm; b, f, 16-17 cm; c, g, 19-20 cm; d, h, 22-24 cm. All scale bars indicate 100 μ m.

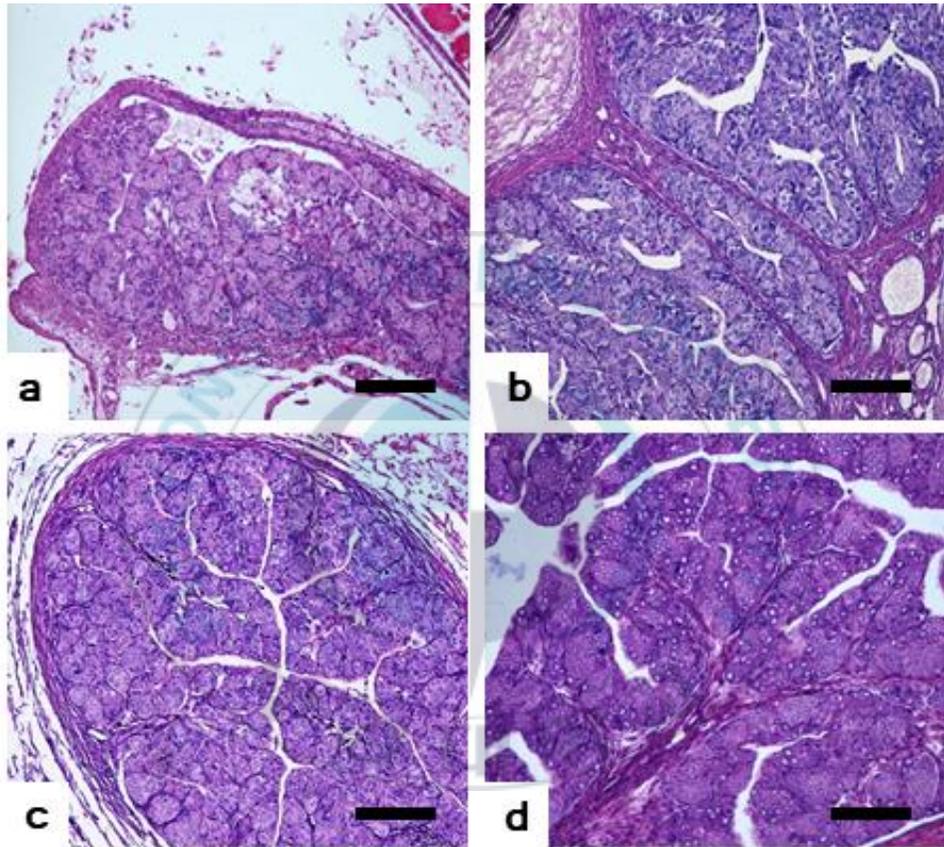


Fig 27. Transverse sections of gonad of all-female triploid in *Paralichthys olivaceus*. a, total length 9.5 cm; b, total length 17.5 cm; c, total length 20 cm; d, total length 25.5 cm. Scale bars indicate 100 μ m.

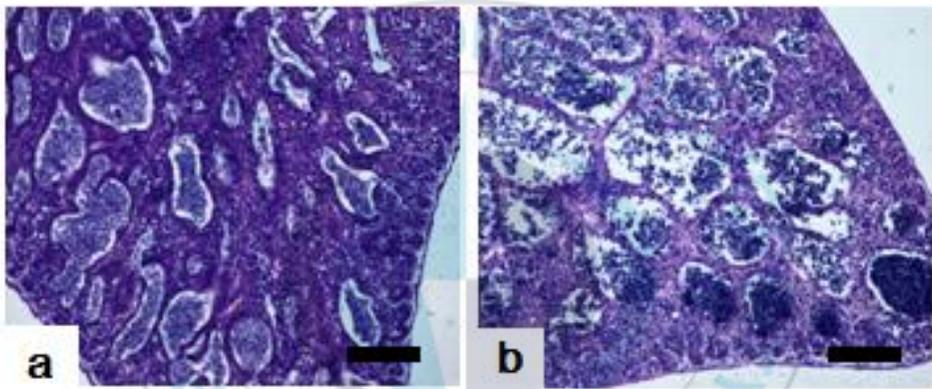


Fig 28. Transverse sections of diploid (a) and triploid (b) *Paralichthys olivaceus* testis. Total length 24cm. Scale bars indicate 100 μ m.

의 정세포(spermatid)와 정자(spermatozoa)가 형성되어 정소조직이 매우 발달된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 동일크기의 3배체 수컷에서는 다수의 정모세포와 비정상적인 정세포가 관찰되었다.

3배체 정소 내 형성된 정자의 크기를 2배체 정자의 크기와 비교한 결과는 Table 17 및 Fig. 29와 같았다. 전장 24cm 2배체 정소 조직 내 정자의 부피는 $4.51 \pm 1.05 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었으나, 3배체 정자의 부피는 $18.78 \pm 6.57 \mu\text{m}^3$ (전장 30 cm), $8.22 \pm 2.00 \mu\text{m}^3$ (전장 33 cm) $14.39 \pm 4.04 \mu\text{m}^3$ (전장 34 cm)으로 확인되어 개체에 따라 그 크기가 달랐으나, 모두 2배체 정소 조직 내 정자보다 큰 것으로 확인되었다($P < 0.05$).



Table 17. Comparisons of size of differences of spermatozoa in diploid and triploid male *Paralichthys olivaceus*

Exp. group	Diploid	Triploid		
		a*	b	c
Minor axis of spermatozoa (μm)	1.42 ± 0.17^a	2.79 ± 0.46^d	1.89 ± 0.23^b	2.47 ± 0.38^c
Major axis of spermatozoa (μm)	1.50 ± 0.15^a	3.13 ± 0.61^d	2.06 ± 0.26^b	2.74 ± 0.39^c
Volume of spermatozoa (μm^3)	4.51 ± 1.05^a	18.78 ± 6.57^d	8.22 ± 2.00^b	14.39 ± 4.04^c

a, total length 30 cm; b, total length 33 cm; c, total length 34 cm

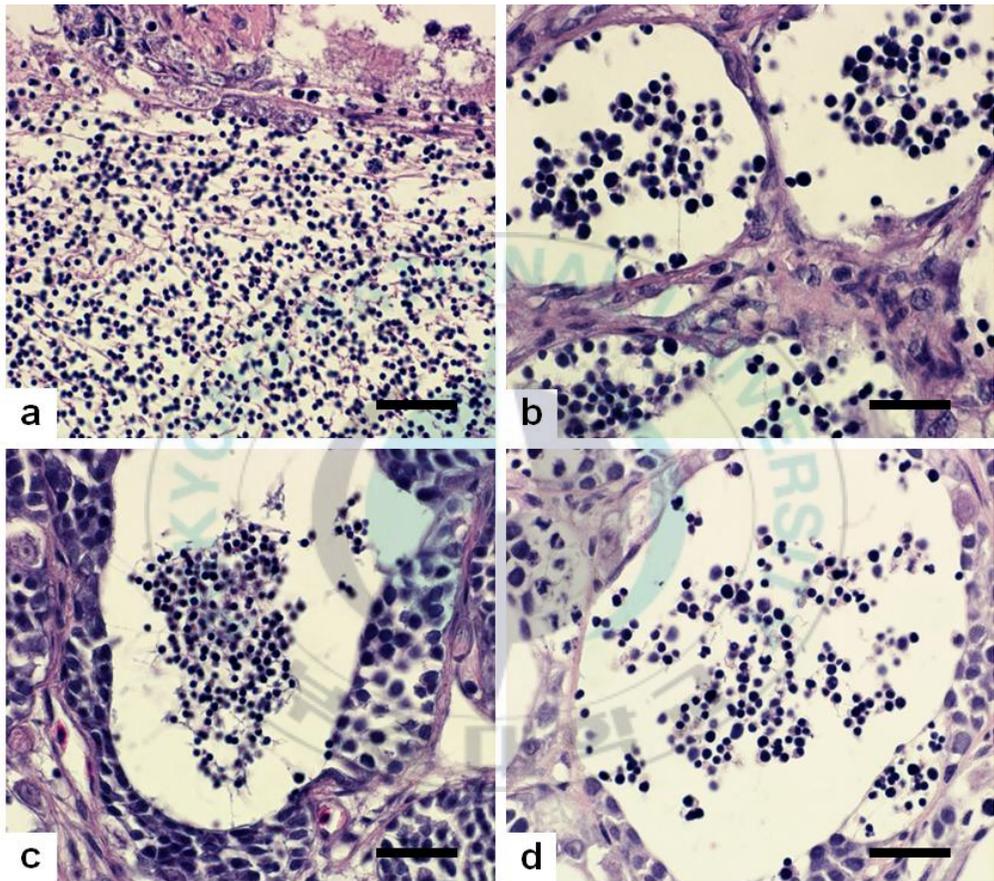


Fig 29. Histological analysis of spermatozoa in diploid (a) and triploid (b, c and d) male *Paralichthys olivaceus*. a, TL 24 cm; b, TL 30 cm; c, TL 33 cm; d, TL 34 cm. Scale bars indicate 30 μ m.

IV. 고 찰

어류의 유전 육종학적 연구 중 염색체 조작(chromosome-set manipulation techniques)은 난자의 핵분열 억제, 정자의 유전적 불활성화 및 수정란의 난할 억제 등을 통해 염색체의 반수체 또는 이배체를 첨가 또는 제거함으로써 자성 및 우성발생성 2배체, 3배체 및 클론 등을 생산하는 기법이다(Benfey, 1989; Yamamoto, 1999; Felip et al., 2001).

자성발생성 2배체 생산은 단기간에 순계를 확립할 수 있는 장점이 있고, 특히 그의 성 결정 기작이 암컷 동형접합성(XX female)일 경우 유도된 자성발생성 암컷을 생리학적 성전환 기법으로 생산한 가짜 수컷과 대조군 암컷을 교배시킴으로써 전 암컷집단을 손쉽게 생산할 수 있는 이점이 있어 많은 양식어류에 적용되어왔다(Kim et al., 1993a). 그간 자성발생성 2배체 낚치는 감성돔 또는 참돔의 정자를 불활성화시켜 유도된 바 있다(Kim et al. 1993a, Yamamoto 1999). 그러나 상기 어종들은 모두 봄에 산란하는 종으로 이들 정자의 이용에 계절적 제한이 따르므로 이를 해소하기 위한 적절한 어종의 선택이 필요하다. 이에 저수온기 낚치의 자성발생성 2배체 유도에 강도다리의 정자를 이용하고자 낚치와 강도다리에 대한 세포유전학적 분석을 수행하였고, 강도다리가 낚치와 잡종이 유도되었을 경우 낚치의 염색체와 쉽게 구별할 수 있는 마커 염색체를 찾고자 하였다. 이에 두 종의 DNA 함량 및 적혈구 세포 크기를 비교한 결과, 강도다리는 낚치 DNA 함량의 93%로 확인되었고, 적혈구 세포와 핵의 표면적 및 부피 또한 낚치의 75-93% 정도로 확인되었다. 특히, DNA 함량은 종에 따라 고유하며 단기간에 정확하게 그 함량을 분석할 수 있는 장점이 있어 종 고유의 특성을 분석하는데 유용하게 사용되고 있다(Byrappa, 2003). 또한 어류 적혈구 세포 및 핵의 크기는 배수체의 판단 기준 및 잡

종의 세포유전학적 특징을 연구하는데 유용하게 이용되며(Benfey, 1989), 어류의 세포 및 핵의 크기는 일반적으로 DNA 함량에 따라 비례하여 그 크기가 증가하는 것으로 보고되고 있어(Szarski, 1978), 이러한 두 종의 특성 차이는 자성발생성 넙치 생산 시 넙치와 강도다리 간 잡종 및 잡종 3배체와 비교할 수 있는 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다.

강도다리와 넙치의 염색체 수 및 핵형은 두 종 모두 $2n=48$ 및 24쌍의 차단부 염색체로 구성되어 있었고, 개체간 및 세포간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다(Fig. 1 & 2). 그러나 염색체 NORs 확인 결과, 넙치는 가장 큰 1쌍의 차단부 염색체 중간부위가 인형성 부위인 것으로 확인되었으나, 강도다리는 가장 작은 1쌍의 차단부 염색체의 단완부위에서 확인되었다(Fig 3). NORs는 인(nucleolus)을 형성하는 염색체의 특정 부위로서 rRNA 합성에 관여하는 유전자가 존재하는 부위로, 세포의 분화 과정에서 염색체의 분열 상태에 따라서 종, 개체 및 세포 간 다양한 변이가 있어 분류학적인 마커로 사용된다(Dobigny et al., 2002). 이에 강도다리와 넙치의 염색체 수 및 핵형 특징은 동일하나 NORs 부위가 다른 특징을 이용하여 자성발생성 2배체 유도 시 생산될 수 있는 잡종 개체 구별을 위한 마커 염색체 분석법으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

자성발생성 2배체는 UV 처리에 의해서 유전물질이 불활성화된 정자와 정상 난을 수정한 뒤, 이를 저온자극을 통해 제 2극체 방출을 억제함으로써 유도된다(Hulata, 2001). 자성발생성 2배체 유도 조건의 critical point는 난발생을 위한 기능성은 유지 할 수 있으며, DNA가 완전히 불활성화 되는 적정 UV 조사량이다(Felip et al., 1999; Piferrer et al., 2004). 이러한 UV의 최적농도 및 처리시간은 반수체 배아의 유도율에 의해 결정될 수 있으므로 반수체 넙치의 이배체와 서로 다른 특이적인 기형 발생 현상을 관찰하였다.

유도된 반수체 녀치의 배발생은 난할 및 초기 포배기 동안은 이배체의 발생 시기 및 형태가 동일하였으나, 128 세포기 이후부터 반수체의 발생시간이 대조군에 비해 점차 느려지고 이형적인 발생이 확인되기 시작하였다. 낭배기에 배환은 배반엽(blastoderm)이 난황을 감싸면서 일어나는 회절(involution), 수렴(convergence) 및 확장(extension)의 형태발생 세포 운동(morphogenetic cell movements) 중 가장 먼저 관찰되는 회절(involution)이 일어남으로써 형성된다(Kimmel et al., 1995). 본 연구 결과 반수체 배아의 배환이 대조군에 비하여 매우 진하고 두껍게 형성되며 피포 형성 시간 또한 늦어지는 것이 관찰되었다. Araki et al. (2001)는 송사리 반수체 배아가 이배체 배아보다 피포와 회절이 늦게 관찰되는 것은 반수체가 한쌍의 염색체조만을 가짐으로써 비특이적인 세포사멸이 일어나고, 정상적인 피포와 회절 발생에 영향을 주게 됨으로써 이배체에 비해 발생속도가 지연된다고 보고한 바 있다. 이에 녀치 반수체 배아도 비특이적으로 사멸된 세포들이 존재하게 되면서 이배체에 비해 두껍고 진한 배환이 형성됨으로 피포 및 회절 발생이 지연되는 것으로 판단된다. 또한 배체의 발생은 배반엽 세포의 수렴과 확장 과정에 의해 형성되고 이 과정들이 진행될수록 배체는 점차 좁아지고 신장되면서 더 명확해지게 된다(Kimmel et al., 1995). 그러나 녀치의 반수체 배아는 대조군에 비하여 배체의 형태가 넓고, 짧으며, 분명하지 않은 상태로 발생하는 것으로 관찰되었다. 송사리 반수체 배아에서도 초기 배체 형태가 짧고, 넓게 형성되었고 이것의 원인을 회절 지연현상으로 보고한 바 있어(Araki et al., 2001), 녀치 반수체 배아에서 이형적인 초기 배체 형태는 비정상적인 형태발생 세포 운동(회절, 수렴 및 신장)에 의한 것으로 판단된다.

Kupffer's vesicle은 경골어류의 배아에서만 유일하게 일시적으로 관찰되는 구체 기관으로, 섬모세포를 이용하여 좌우비대칭을 조정하는 역할

을 한다(Essner et al., 2005). 이에 Okabe et al. (2008)은 제브라피쉬 발생과정 중 Kupffer's vesicle 내에서 일어나는 유체역학적인 현상을 주사전자현미경, video microscopy 및 조직학적으로 밝혀 경골어류의 발생과정 중 그 중요성을 입증한 바 있다. 본 연구에서 넙치 반수체 배아의 Kupffer's vesicle은 모양과 크기가 다양하였으며, 배체의 형태도 대조군과 뚜렷하게 구별되었다. 이는 좌-우 축형성에 영향을 미치는 Kupffer's vesicle이 반수체 배아에서 이형적으로 발생함으로써, 이들의 후기 배발생과정에서 다양한 기관들의 정상적인 발달에 부정적인 영향을 준 것으로 보여진다.

반수체의 최초의 부화는 수정 후 55시간으로 대조군과 동일하였으나, 반수체의 경우 거의 대부분 부화하지 못하였고, 부화하였을지라도 6시간 이내에 모두 죽는 것으로 관찰되었다. 금붕어, 송사리, 제브라피쉬, 터봇(turbot, *Scophthalmus maximus*) 그리고 Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)에서도 반수체 배아의 낮은 부화율과 부화 자어의 짧은 몸체, 꼬리의 미발달 및 높은 치사율이 보고된 바 있으며(Luo and Li, 2003; Araki et al., 2001; Walker, 1999; Piferrer et al., 2004; Tvedt et al., 2006), 이러한 현상을 Felip et al. (1999)는 반수체의 유전체 부족에 따른 부화효소(hatching enzyme)와 같은 발생과정 및 부화에 반드시 필요한 단백질 합성량의 부족 때문으로 추론 한 바 있다.

반수체 부화자어의 조직학적 분석에서 눈, 귀소포, 신경관, 척색 및 체질이 비대칭적이거나 이형적인 형태로 발생하는 것으로 확인되었다. 본 연구결과와 동일하게 금붕어 반수체 자어의 눈에서도 색소 망막(pigmented retina), 신경 망막, 수정체, 각막(cornea)과 같은 눈을 구성하는 세포들이 모두 형성은 되지만, 각 세포들이 비정상적인 위치에서 형성됨으로써 이형적인 눈의 형태로 발달된다고 보고된 바 있다(Luo and Li,

2003; Tanaka et al., 2004). 이에 반수체에서도 각 기관을 구성하는 세포들이 형성은 되지만, 그 위치 및 형태가 비정상적으로 발달하는 것이 반수체 기관 발달의 특징인 것으로 판단되었다.

본 연구 결과, 넙치 반수체 배아는 피포가 시작되는 후기 포배기부터 발생 지연 및 이상발생 현상 나타나기 시작하여 짧은 꼬리 및 넓은 몸통을 가진 배체로 발생하였다. 또한 부화단계에서 일부 개체만이 부화하였으며 부화한 개체도 모두 치사함으로써, 넙치 반수체의 이상발생 현상은 다양한 경골어류에서 보고된 반수체 증후군(haploid syndrome)의 특징들과 유사한 것으로 확인되었다. 이러한 넙치 반수체 이상 발생 및 치사 현상은 기존의 연구에서 보고된 바와 같이 한 개의 유전체만을 가지는 반수체 특성에 의한 열성 치사 유전자의 발현 또는 유전자 산물의 부족으로 인한 것으로 판단된다. 또한 반수체에서 이형적으로 발달된 기관들은 대부분 축 시스템(axial system)과 연관된 것들로 눈 및 귀소포와 같은 기관은 좌-우 비대칭적으로 발생하였고 신경관, 척색, 장 및 체절과 같이 몸체에서 중심을 이루는 기관들은 대부분 불완전하게 발생하거나 발생하지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 반수체 배 발생 과정에서 Kupffer's vesicle이 이형적으로 발생함으로써 정상적인 좌-우 축이 형성되지 못하여 눈 및 귀소포의 이상발생이 나타난 것으로 판단되고, 앞-뒤 축이 형성되는 낭배기 시기의 이상발생으로 신경관, 척색 및 장과 같은 기관들에서 이상발생이 관찰되는 것으로 보여진다.

자성발생성 2배체를 유도하기 위해서 강도다리 및 넙치 정자를 Kim et al. (1993a)에서 보고된 자외선 조사량을 바탕으로 4,500 erg/mm²의 자외선으로 조사 후 수정란을 저온처리하였고 이들의 2배체 유도율을 비교하였다. 그 결과 강도다리 정자를 사용한 경우 27%의 낮은 유도율을 보였으나(Fig. 13), 넙치 정자를 사용한 경우는 77.6%의 유도율을 보이는 것

으로 확인되어(Fig. 14), 본 실험에서 강도다리 정자에 조사된 자외선 량이 낮았던 것으로 보여지며, 77.6%의 높은 유도율을 보인 넙치 정자를 이용하여 자성발생성 2배체 집단을 유도하는 것이 적합한 것으로 판단되었다.

넙치 정자를 불활성화 하기 위해 적정 자외선량을 Tabata and Gorie (1988)는 4,800 erg/mm²로 보고한 바 있고, Yamamoto (1999)는 4560 erg/mm² 그리고 Kim et al. (1993a)는 4,200 erg/mm²보고한 바 있어, 넙치 정자 불활성화를 위한 적정 자외선 조사량은 4,200-4,800 erg/mm²으로 보여지나, 본 연구에서 4,500 erg/mm²의 자외선을 조사하였음에도 단 77.6%만의 유도율을 보였다. 같은 종일지라도 정자 불활성화 처리 시 정자의 희석 농도가 다르기 때문에 상이한 조건이 도출되는 것으로 판단되었다. 따라서 Tabata (1991b)은 넙치 정자에 7,200 erg/mm²을 조사한 바도 있다. 이에 본 연구에서는 넙치 정자를 이용한 자성발생성 2배체 유도율을 높이기 위해 넙치 정자를 0-13,500 erg/mm²를 조사한 후 반수체 유도율을 확인하였다. 그 결과, 5,400-13,500 erg/mm²에서 넙치 반수체 발생의 특징인 짧은 꼬리 및 넓은 몸통을 가진 배체로 발생하고 부화를 못 하거나 부화 후 죽는 개체들이 100% 관찰되어 넙치 정자 불활성화에 5,400 erg/mm²의 자외선 조사량이 적합한 것으로 확인되었다.

선발육종 기법으로 생산된 킹넙치 암컷의 순계 확립 및 전암컷 넙치 집단을 생산하기 위해서 국립수산과학원의 킹넙치 산업화 가계 중 5미의 암컷으로부터 확보된 난을 사용하여 자성발생성 2배체를 유도하였고, 전암컷 집단의 대량 생산을 위해 유도된 자성발생성 2배체를 대한민국 특허 제 10-1996-0039105호와 Kang (2016)의 성전환 유도 방법에 따라 수컷으로 성전환 하였다. 그 결과, 자성발생성 2배체 수컷은 Z1-1788, Z1-1697, Z1-0335, Z1-0219 및 Z1-1779 5가계가 확보되었고 이들 가계 중 우수한

가계를 선정하고자 생존, 성장, 질병저항성 및 생식능력 등에 대하여 가계별 특징을 비교한 결과, 생존은 Z1-1697 가계가 생존력이 가장 좋은 것으로 확인되었고 성장은 Z1-0335가계가 가장 성장률이 높은 것으로 확인되었다. 질병 저항성 평가는 기생충, 박테리아 및 바이러스에 대한 저항성을 확인하였다. 스쿠티카충과 *E. tarda*에 대한 내성은 가계별 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었으나, 림포시스티스의 경우 Z1-1697가계가 가장 저항성이 높은 것으로 확인되었다. 생식능력을 평가하기 위해 가계별 자성발생성 2배체 수컷의 정자 농도, 수정 능력 및 수정란의 생존 능력 평가 등을 수행한 결과, 정자의 농도는 Z1-0335가 가장 높은 것으로 확인되었으나, F1 세대의 생존율은 Z1-0219가계가 가장 높은 것으로 확인되었다. 이에 성장, 생존, 외형 및 질병저항성의 특성들을 종합적으로 비교하였을 때 Z1-1697 가계가 우수한 것으로 확인되었으나, 킹넵치 및 일반 넵치 암컷과의 교배를 통한 F1 세대의 생존이 5가계 중 가장 낮은 것으로 확인되었다. 지금까지 넵치의 선발육종을 통해 다양한 가계를 유도하여 그 특징을 비교한 예가 없어 5가계 중 가장 우수한 가계의 선정에 어려움이 있었으나, 전암컷 3배체 생산을 위한 수컷 가계 선정에 가장 중요한 요건은 생식능력으로 판단되어 F1 세대의 생존율이 가장 높은 Z1-0219 가계가 전 암컷 3배체 생산을 위한 수컷 가계로 적합한 것으로 나타났다.

자성발생성 2배체 수컷 0219 가계의 정자와 일반 넵치의 난의 수정란을 저온처리함으로써 수정란의 제 2 감수분열의 억제로 인한 제 2극체 융합으로 3배체를 유도하였다. 3배체는 모계 2n DNA 함량과 부계 n DNA 함량을 가지게 되므로 유도된 3배체의 DNA 함량이 넵치 n DNA 함량의 약 3배인 2.41 ± 0.03 pg/cell 으로 관찰되어 성공적으로 3배체가 유도된 것으로 확인되어 세포 유전학적 특징은 기존의 연구 결과와 일치하였다(Tiwarly et al., 2004; He et al., 2013; Jung et al., 2016).

유도된 3배체 수정란을 $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ 수온에서 난발생을 관찰한 결과, 1.5 시간 후에 난할기(cleavage period)가 시작되어 8시간 후에 중기 포배기 (mid-blastula period), 13시간 후에 낭배기(gastrula period), 26시간 후에 Kupffer's vesicle이 형성, 55시간 후에 부화하는 것으로 관찰되어 3배체의 난발생은 2배체와 발생 형태과 시간이 동일한 것으로 확인되었다(Table 20). 어류의 발생에서 수온은 성장 및 생존에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나로 각 어종은 생태적인 특징에 따라 적정수온을 가지게 되며, 적정 수온 범위 내에서 수온이 높아질수록 발생속도는 빨라지게 된다(Rana, 1990). 이에 10°C , 14°C 및 18°C 에서 2배체와 3배체의 발생을 비교한 결과 난할기, 포배기, 낭배기 및 분할기에 이르는 모든 난발생 단계에서 2배체 및 3배체가 동일한 속도로 발생하는 것으로 관찰되었다. 그러나 You et al. (2001)은 넙치 2배체의 발생이 난할기에 3배체보다 조금 빠른 것으로 확인되나, 발생이 진행될수록 동일한 속도로 발생되며 동일한 시기에 부화한다고 보고한 바 있다. 이는 3배체의 발생을 저온처리 전 수정 시기부터 관찰하여 초기 난할기에 3배체가 2배체보다 발생이 느리게 관찰된 것으로서 저온처리 직후를 발생 시작시점으로 관찰한 본 연구와는 발생 관찰 시작 시점 차이에 의해 동일한 관찰 결과를 다르게 분석한 것으로 판단된다. 그러나 무지개 송어 3배체를 비롯한 어류에서 유도된 3배체 난은 일반적으로 2배체에 비하여 발생이 빠르게 진행되어 부화시간이 단축되는 것으로 이미 보고된 바 있다(Thorgaard, 1986).

세포주기 분석(cell cycle analysis)은 세포들의 세포주기 단계 분포를 확인하는 분석법으로 DNA 합성단계인 S기, 유사분열 단계인 G2+M기 및 유사분열 후 휴지기인 G1기의 3가지 세포주기 단계로 구분하여 분석된다(Nunez, 2001). 세포 내 DNA는 S기에 복제되기 때문에 G2+M기로 진행된 세포는 G1기 세포 DNA 함량의 2배가 된다. DNA가 두 배인 세포 주

기 단계 G2+M기 세포의 비율은 조직 내에서 일어나는 세포 복제 또는 성장의 양을 보여준다(Bromhead et al. 2000). 2배체, 3배체 및 전암컷 3배체의 혈액 세포를 대상으로 세포 주기 분석을 수행한 결과, 2배체가 3배체 및 전암컷 3배체보다 G2+M기 세포 비율이 유의적으로 높은 것으로 확인되어 2배체가 3배체보다 세포의 복제 및 성장이 활발한 것으로 확인되었다. 메기(*Silurus asotus*)의 경우에서도 2배체와 3배체 아가미 조직의 세포주기 분석에서 2배체의 G2+M기 비율이 3배체보다 높은 것으로 보고된 바 있다(Gil, 2016). 이에 유도된 3배체 어류는 세포의 크기가 증가된 만큼 세포분열에 소요되는 시간이 증가되므로 전체 세포수는 감소함으로써 세포 성장에 있어 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. Benfey (1999)는 3배체의 저하된 생식소 성장 에너지는 체성장 에너지를 증대시키지만 이들 에너지는 저하된 생식소 성장 에너지 만큼만 증대된다고 보고된 바 있고, *Ictalurus punctatus*, *Heteropneustes fossilis* 및 *Oreochromis niloticus* 등은 성장 초반에 이배체와 동일한 성장률을 보이다가 성숙기에 2배체보다 빠른 성장을 보인다고 보고된 바 있다(Wolters et al., 1982b; Bramick et al., 1995; Tiwary et al., 1997; Tiwary et al., 2004). 그러나 Yamashita (1993)는 근점유세포의 성장은 성장 시기와 상관없이 3배체와 2배체간 차이가 없다고 보고한 바 있다.

혈액학적 분석은 외부 환경적 변화에 따른 대사 작용 및 건강상태를 확인하기 위한 지표로 사용되며 생리 및 상태, 스트레스 반응 및 환경 또는 영양의 영향을 모니터링할 수 있다(Akrami et al. 2013). 생태 및 생리학적인 반응으로 적혈구 세포, 호르몬, hematocrit, hemoglobin 농도, 백혈구 수와 같은 다양한 혈액성분의 변화가 일어난다(Zarejabad et al., 2010).

3배체 어류는 2배체보다 1세트 많은 염색체를 가지기 때문에 적혈구 세포의 크기는 증가하고 그 수는 감소하게 된다(Benfey, 1999). 적혈구는

각 조직 세포로 산소를 운반하는 역할을 하기 때문에 적혈구의 크기 및 수가 변할 경우 어체 내 산소를 이용하는 능력에 영향을 미칠 수 있다 (Cal et al., 2005). 이에 2배체와 전암컷 3배체 넙치의 혈액학적 특성 비교한 결과, 적혈구(RBC) 농도는 3배체가 2배체의 0.55배로 적혈구 세포의 수는 적으나, 평균 적혈구 용적(MCV)은 1.6배로 적혈구 세포의 크기는 2배체 보다 큰 것으로 확인되었다.

3배체의 적혈구 세포가 커지면서 적혈구 세포 1개의 혈색소량을 의미하는 평균 적혈구 헤모글로빈(MCH)은 3배체가 2배체의 2.13배로 확인되었으나, 혈액 내 헤모글로빈은 3배체가 2배체의 1.18배로 그 수치가 크게 차이가 나지 않는 것으로 확인되었다. Parsons (1993)는 3배체가 적혈구 세포 내 높은 헤모글로빈을 가지는 것은 3배체가 2배체 혈액 내 헤모글로빈과 동일한 농도를 유지하기 위한 항상성 조절기작에 기인한 것으로 보고한 바 있어, 2배체에 비해 3배체는 적은 적혈구 세포수를 가지기 때문에 이를 보상하기 위해 적혈구 세포의 높은 산소운반능력을 높이기 위한 결과인 것으로 보여진다.

3배체 넙치가 2배체보다 적은 적혈구 세포 수를 가지지만 큰 적혈구를 가지고 있음에도 불구하고 3배체의 hematocrit 수치는 2배체보다 낮은 것으로 확인되었다. 이와 같이 3배체 적혈구는 MCV는 증가하나 hematocrit 수치가 감소함으로써 3배체 적혈구 세포가 표면적 대 부피 비율(surface-to-volume ratio)이 감소하므로 산소 동화 작용을 위해 이용 가능한 세포의 총 면적이 줄어들어 생리학적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 보고한 바 있다(Graham et al., 1985).

3배체는 3세트의 염색체를 가지므로 제1감수분열(meiosis I) 시기에 상동염색체 쌍을 이루는 과정에서 제대로 쌍을 이루지 못함으로써 이수체(aneuploid) 배우자를 형성하여 일반적으로 불임이 된다(Zhang et al.,

2005). 본 연구 결과 또한 3배체 넙치 암컷과 수컷에서 생식소의 발달이 지연되거나 비정상적인 발달이 관찰되어 불임인 것으로 확인되었다. 그러나 3배체 수컷의 경우 비정상적인 크기 및 형태이지만 정세포 및 정자가 형성되어 3배체 암컷 생식소에 비해 많이 발달된 형태를 보였다. Thorgaard (1983)는 정소에서 많이 이루어지는 유사분열은 3배체화의 영향을 적게 받기 때문에 3배체 암컷보다 수컷에서 생식소 발달이 많이 일어날 수 있다고 보고한 바 있다. Allen et al. (1986)은 초어 (*Ctenopharyngodon idellus*)에서 비정상적이지만 정자가 함유된 정액이 발견되었고, 이들로부터 매우 적은 양의 자손을 확보할 수 있을 것이라고 보고한 바 있으나, 대부분 어종에서 유도된 3배체는 불임인 것으로 보고되고 있다. 채널 메기(*Ictalurus punctatus*), 대서양 연어(*Salmo salar*) 및 미꾸라기(*Misgurnus anguillicaudatus*)의 경우 3배체 정소가 잘 발달되었으나 성숙한 정자는 관찰되지 않았고(Wolters et al., 1982b; Benfey and Sutterlin, 1984; Suzuki et al., 1985), 무지개 송어 3배체 정소에서는 정모세포(spermatocytes)와 정자가 관찰되었지만 비정상적인 형태의 정자가 관찰된 바 있다(Carrasco et al., 1998). 본 연구 결과 또한 3배체 넙치 수컷에서 비정상적인 크기의 정자가 형성되는 것으로 관찰되어 여타 3배체 어류 결과와 유사한 것으로 생각되나, 3배체 수컷 넙치의 정자에 대한 수정능력, DNA 함량 및 형태학적 특징 등 생식생물학적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

앞으로 본 연구에서 확립된 전암컷 3배체 유도 기법을 통해 이들을 대량생산한 후 그 경제성을 평가하여야 할 것으로 사료된다.

국문 요약

본 연구에서는 전 암컷 3배체 넙치를 유도하기 위해서 국립수산과학원 육종연구센터에서 선발육종기법을 통하여 생산된 킹넙치(KingNupchi) 5가계 암컷을 이용하여 자성발생성 2배체를 유도하고, 성호르몬 및 환경 조절을 통해 성전환을 유도함으로써 자성발생성 2배체 수컷을 생산하였다. 생산된 자성발생성 2배체 수컷 5가계 중 우수한 가계를 선정, 이들을 대상으로 3배체를 유도하여 3배체의 세포유전학적 분석, 생식소 성숙 여부, 세포 주기, 혈액학적 특징 및 질병저항성 특징 등에 대해 조사하였다.

강도다리와 넙치의 세포유전학적 분석을 수행한 결과, 적혈구 세포핵의 표면적 및 부피의 경우, 강도다리는 $7.60 \pm 0.93 \mu\text{m}^2$ 및 $12.80 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$ 이었고, 넙치는 $8.56 \pm 0.82 \mu\text{m}^2$ 및 $16.76 \pm 2.50 \mu\text{m}^3$ 이었고, DNA 함량은 강도다리가 0.66 pg/haploid cell, 넙치가 0.71 ph/haploid cell로 관찰되어 강도다리 DNA 함량은 넙치의 약 93%로 확인되었다. 염색체 수와 핵형은 두 종 모두 $2n=24$ 그리고 차단부 염색체 24쌍으로 구성되었으며, 암·수간, 개체간 및 세포간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다. 넙치는 24쌍의 차단부 염색체 중 가장 큰 1쌍의 차단부 염색체에서 NORs가 확인되었고, 강도다리는 가장 작은 1쌍의 차단부 염색체에서 확인되었다.

반수체 넙치의 특이적인 기형발생 현상을 관찰한 결과, 넙치의 반수체 배아는 이배체에 비하여 배체의 형태가 넓고, 짧으며, 분명하지 않은 상태로 발생하였으며, Kupffer's vesicle이 제대로 형성되지 않으면서 대부분 꼬리가 형성되지 않거나 짧게 형성되었다. 반수체의 최초의 부화는 수정 후 55시간으로 이배체와 동일하였으나, 반수체의 경우 거의 대부분 부화하지 못하였고, 부화하였을지라도 6시간 이내에 모두 죽는 것으로 관찰되었다.

자성발생성 2배체 수컷을 생산하기 위해서 킹넵치 암컷 5미로부터 확보된 난과 자외선 5,400 erg/mm²의 자외선을 조사한 킹넵치 정자를 수정하였고, 수정 3분 후 2℃에서 45분간 저온처리하여 자성발생성 2배체를 유도하였다. 유도된 자성발생성 2배체에 대한 세포유전학적 분석에서 대조군과 차이가 없는 것이 확인되었다. 수컷으로 성전환 하기 위해서 옹성화 호르몬(17 α -methyltestosterone) 첨가 사료 공급법 및 수온 조절법을 사용하여 자성발생성 2배체 수컷(XX)을 생산하였다.

유도된 자성발생성 2배체 수컷 5가계(Z1-1788, Z1-1697, Z1-0335, Z1-0219 및 Z1-1779) 중 우수한 가계를 선정하고자 생존, 성장, 질병저항성 및 생식능력 등에 대하여 가계별 특징을 비교하였고, 전암컷 3배체 생산을 위한 수컷 가계로 Z1-0219를 선정하였다.

전암컷 3배체 집단을 생산하기 위해서 일반 넵치의 난과 자성발생성 2배체 수컷 Z1-0219의 정자를 수정하였고, 수정 3분 후 2℃에서 45분간 저온처리하여 3배체를 유도하였다. 유도된 3배체를 대상으로 세포유전학적 분석을 수행한 결과 적혈구 세포 크기, 염색체 수, DNA 함량 및 NORs 수는 2배체의 약 1.5배 인 것으로 확인되어 성공적으로 3배체가 유도된 것으로 확인되었다.

3배체 넵치의 특징을 확인하기 위해서 난발생, 세포주기, 혈액학적 분석, 질병저항성 및 생식소 발달에 대한 분석을 수행하였다. 3배체의 난발생 형태 및 발생속도는 2배체와 동일한 것으로 확인되었고, 세포 주기는 3배체가 2배체에 비해 G₂+M기의 비율이 낮은 것으로 확인되어 2배체가 3배체보다 유사분열이 활발한 것으로 확인되었다. 혈액학적 분석의 경우 3배체가 2배체보다 적혈구 세포의 크기(MCV)는 1.6배 크고, 세포 수(RBC)는 0.55배 적은 것으로 확인되었으며, 평균 적혈구 헤모글로빈 수치(MCH)는 3배체가 2배체보다 2.13배 높았으나 3배체의 hematocrit 수치는

2배체 보다 낮은 것으로 확인되었다. 생식소 발달의 경우, 3배체 넘치 암컷과 수컷에서 생식소의 발달이 제대로 이루어지지 않거나 비정상적인 발달이 관찰되어 불임인 것으로 확인되었다. 그러나 3배체 정소는 난소에 비해 다소 많이 발달된 형태인 정세포 및 정자가 관찰되었으나, 이들은 비정상적인 크기 및 형태의 정세포 및 정자로 확인되어 3배체 암컷과 수컷 모두 불임인 것으로 확인되었다.



감사의 글

무사히 학위 과정을 마칠 수 있었던 것은 많은 분들의 도움이 있었기 때문에 가능했습니다. 먼저 이 논문이 완성될 수 있도록 항상 용기와 사랑을 주시고 학자로서 학문에 대한 자세와 열정을 가르쳐 주신 김동수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 부족한 논문의 심사를 위해 바쁘신 와중에 세심한 교정과 충고를 해주신 방인철 교수님, 노충환 박사님, 노재구 박사님, 남윤권 교수님께 감사드리며, 많은 가르침과 격려를 해주신 허성범 교수님, 장영진 교수님, 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 김종명 교수님, 공승표 교수님, 박정환 교수님, 최윤희 교수님께도 감사를 드립니다.

대학원 생활을 하면서 여러 가지 힘든 일도 많았지만 가족처럼 위로와 격려를 해주신 송하연 선배님, 김연경 선배님, 이상윤 선배님, 이일영 선배님께 감사드리고, 언제나 가까이에서 실험에 많은 도움을 준 양희상 선배님, 후배 민균이와 효빈이에게도 고마움을 표합니다. 바쁜 와중에도 힘들고 어려울 때 항상 옆에서 많은 위로를 해 준 경묘에게도 고마움을 표합니다.

바쁘다는 이유로 챙겨주지도 못했지만 힘들 때마다 항상 위로를 해주는 소중한 친구 정은이, 민정이, 지현이, 수향이, 지희와 미경이에게도 감사의 말을 전합니다. 그리고 자주 찾아뵙지도 못하는데 큰 격려와 사랑을 주시는 이모, 외삼촌, 고모, 삼촌과 사촌동생·언니·오빠들께 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 부족한 딸을 정성과 사랑으로 보살피 주시고 지금까지 학위과정을 무사히 마칠 수 있게 옆에서 도움을 주신 어머니와 아버지께 감사드리며 부족하지만 사랑과 감사의 마음으로 이 논문을 바칩니다.

V. 참고 문헌

- 김동수. 자성발생성 2배체 넙치 전수컷 집단 생산 방법. 특허출원 제 10-1996-0039105호, 1998.
- Akrami R, Gharaei A and Karami R. 2013. Age and sex specific variation in hematological and serum biochemical parameters of Beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758). Int J Aquat Biol 1, 132-137.
- Allen Jr SK, Thiery RG and Hagstrom NT. 1986. Cytological evaluation of the likelihood that triploid grass carp will reproduce. Trans Am Fish Soc 115, 841-848.
- Arai K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 197, 205-228.
- Araki K, Okamoto H, Graveson AC, Nakayama I 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.
- Benfey TJ and Sutterlin AM. 1984. Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can J Fish Aquat Sci 41, 1387-1392.
- Benfey TJ. 1989. A bibliography of triploid fish 1943 to 1988. Can Tech Rep Fish Aqua Sci 1682, 33
- Benfey TJ. 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. Fish Sci 7, 39-67.

- Bang IC, 1996. Genetic Improvement of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Sex Reversal and Chromosome Engineering. Ph. D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Bramick U, Puckhaber B, Langholz HJ and Horstgen-Schwark G. 1995. Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions. *Aquaculture* 137, 343-353.
- Bromhead D, Kalish J and Waring P. 2000. Application of flow cytometric cell cycle analysis to the assessment of condition and growth in larvae of a freshwater teleost *Galaxias olidus*. *Can J Fish Aquat Sci* 57, 732-741.
- Byrappa V. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 588-592.
- Cal RM, Vidalb S, Camachoc T, Piferrerd F and Guitian FJ. 2005. Effect of triploidy on turbot haematology. *Comp Biochem Physiol* 141, 35-41.
- Carrasco LA, Doroshov S, Penman DJ and Bromage N. 1998. Long term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *ncorhynchus mykiss*. *J Reprod Fert* 113, 197-210.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C and Volobouev V. 2002. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogene Genome Res* 98, 75-77.
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB and Yost HJ. 2005. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the

- brain, heart and gut. *Dev* 132, 1247-1260.
- Fan Z, You F, Wang L, Weng S, Wu Z, Hu J, Zou Y, Tan X and Zhang P. 2014. Gonadal transcriptome analysis of male and female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *BioMed res int* 2014, 1-10.
- Felip A, Piferrer F, Carrillo M and Zanuy S. 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Heredity* 83, 387-397.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M and Piferrer F. 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111, 175-195.
- Fopp-Bayat D, Kolman R and Woznicki P. 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. *Aquaculture* 264, 54-58.
- Gil HW. 2016. Characteristics of induced triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*. Ph. D. Thesis, Korea Maritime and Ocean University, Busan, Korea.
- Goodpasture C and Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53, 37-50.
- Graham MS, Fletcher GL and Benfey TJ. 1985. Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture* 50, 133-139.

- He W, Xie L, Li T, Liu S, Xiao J, Hu J, Wang J, Qin Q and Liu Y. 2013. The formation of diploid and triploid hybrids of female grass carp \times male blunt snout bream and their 5S rDNA analysis. *BMC Genet* 14,110–119.
- Hernández-Urcera J, Torres E, Barreiro D, Barreiro-Lois A, Alonso J, Cal R and Rotllant J. 2012. Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*) does not affect gross body morphology and skeleton characteristics. *Aquaculture* 338, 309–312.
- Hulata G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111, 155–173,
- 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.
- Jeong DS, Noh JG, Myung JI, Lee JH, Kim HC, Park CJ, Min BH, Ha DS and Jeoun CY. 2009. Genetic variability comparison of wild populations and cultured stocks of flounder *Paralichthys olivaceus* based on microsatellited DNA Markers. *Kor J Ichthyol* 21, 221–226.
- Jung HS, Kim YK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2014. Cytogenetic analysis of starry flounder *Platichthys stellatus* from Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 431–434.
- Jung HS, Ko MG, Lee HB and Kim DS. 2016 Development of Allotriploid Embryos from Female Olive Flounder *Paralichthys*

- olivaceus* Crossed with Male Starry Flounder *Platichthys stellatus*. Korean J Fish Aquat Sci 49, 628-634.
- Kang KL, 2016. Production of gynogenetic male in KingNupchi strain of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). M.S. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB and Cho KC. 1993a. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. Gene & Genomics 48, 179-186.
- Kim Y, Kim KK, Bang IC and Lee JK. 1993b. Studies on the production of all-female populations of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* I. induction of gynogenetic diploid and its growth. J Aquacul 6, 285-293.
- Kim DS, Moon YB, Jeong CH, Kim BS and Lee YD. 1994. Production of All-Female Diploid and Triploid Populations in *Paralichthys olivaceus*. J Aquacul 7, 159-164.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 203, 253-310.
- Ko MG, Jung HS, Lee HB and Kim DS. 2016. Cytogenetic Analysis of All-Female Triploid Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* for Ploidy Verification. Korean J Fish Aquat Sci 49, 671-674.
- Lemoine HL Jr and Smith LT. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans Fish Soc 109, 626-631.
- 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.
- Luo K, Xiao J, Liu S, Wang J, He W, Hu J, Qin QB, Zhang C, Tao M and Liu Y. 2011. Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp. *Int J Biol Sci* 7, 487-495.
- Maxime V. 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries* 9, 67-78.
- Morgan AJ, Murashige R, Woolridge CA, Luckenbach JA, Watanabe WO, Borski RJ, Godwin J and Daniels HV. 2006. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. *Aquaculture* 259, 290-299.
- NFRDI (National Fisheries Research and Development Institute). 2013. Olive flounder *Paralichthys olivaceus* Golden Seed project report. Golden Seed project report, 24-36, 1-533
- Nunez R. 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 3, 67-70.
- Okabe N, Xu B and Burdine RD. 2008. Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle. *Dev Dyn* 237, 3602-3612
- 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, *Lateolabrax* from Korea. *Kor J Ichthyol* 7, 79-83.
- Park JW, Lee YM, Noh JK, Kim HC, Park CJ, Hwang IJ, Kim SY

- and Lee JH. 2012. The Morphological Study of Wild and Farmed Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*): The Role of Indirect Selection within and between Populations. *Dev Reprod* 16, 309–314.
- Parsons GR. 1993. Comparisons of triploid and diploid white crappies. *Trans Am Fish Soc* 122, 237–243.
- Piferrer F, Cal RM, Álvarez-Blázquez B, Sánchez L and Martínez P. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188, 79–90.
- Piferrer F, Cal RM, Gómez C, Álvarez-Blázquez B, Castro J and Martínez P. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* 238, 403–419.
- Rana HJ. 1990. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* egg and fry I. gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. *Aquaculture* 87, 165–181.
- Sezaki K and Kobayashi H. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 41, 851–854.
- Suzuki R, Nakanishi T and Oshiro T. 1985 Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 51, 889–894.

- Tabata K. 1991a. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*. Bull Hyogo Pref Fish Exp Stn 28, 1-134.
- Tabata K. 1991b. 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. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth. Nipp Suisan Gakk 54, 1867-1872.
- Tanaka M, Yamaha E and Arai K. 2004. Survival capacity of haploid-diploid goldfish chimeras. J Exp Zool A Comp Exp Biol 301, 491-501.
- Thorgaard GH. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar WS, Randall DJ and Donaldson EM eds. Fish Physiology, Vol. IX, Part B. Academic Press, New York, U.S.A., 405-434.
- Thorgaard GH. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 57, 57-64.
- Tiwary BK, Kirubakaran R and Ray AK. 1997. Induction of triploidy by cold shock in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Asian Fish Sci 10, 123-129.
- Tiwary BK, Kirubakaran R and Ray AK. 2004. The biology of triploid fish. Rev Fish Biol Fish 14, 391-402.
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, McGowan C and Reith

- M. 2006. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 252, 573-583.
- Walker C. 1999. Haploid screens and gamma-ray mutagenesis. In: *Methods in Cell Biology*. Detrich HW and Westerfield M, eds. Academic Press, San Diego, U.S.A., 43-70.
- Wolters WR, Libey GS and Chrisman CL. 1982. Effects of triploidy on growth and gonadal development of Channel catfish. *Trans Am Fish Soc* 111, 102-105.
- Wu C, Chen R, Ye Y and Huang W. 1990. Production of all-female carp and its applications in fish cultivation. *Aquaculture* 85, 327.
- Xu K, Duan W, Xiao J, Tao M, Zhang C, Liu Y and Liu S. 2015. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. *Sci China Life Sci* 58, 187-201.
- Yamamoto E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 173, 235 - 246
- Yamashita Y. 1993. Histological change in the muscles of diploid and triploid ayu during growth and maturation. *Bull Japan Soc Sci Fish* 59, 151-154.
- You F, Liu J, Wang XC, Xu YL, Huang RD and Zhang PJ. 2001. Study on embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. et S.). *Chin J Oceanol Limnol* 19, 147-151.
- Zarejabad AM, Jalali MA, Sudagar M and Pouralimotlagh S. 2010.

Hematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to brackish water environment. *Fish Physiol Biochem* 36, 655-659.

Zhang C, He XX, Liu SJ, Sun YD and Liu Y. 2005. Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid crucian carp. *Acta Zool Sin* 51, 89-94.

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.

