



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.

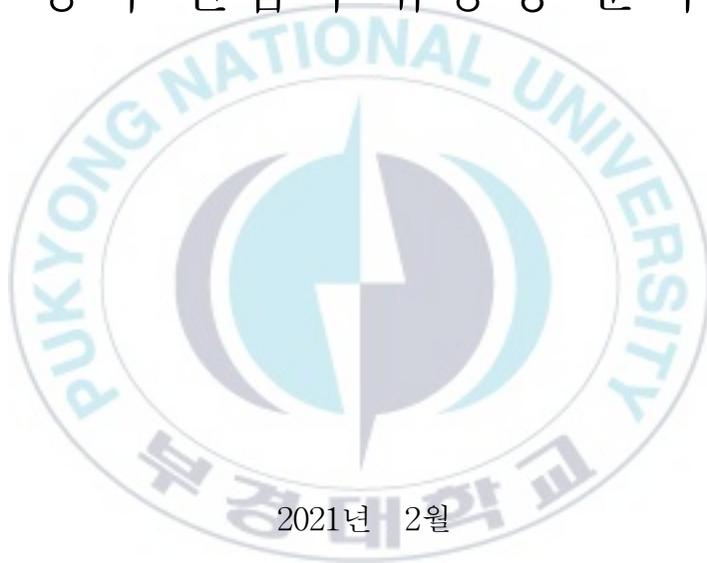
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

수산학박사 학위논문

강도다리와 돌가자미의 잡종 유도 및  
양식 산업적 유용성 분석



2021년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

이 일 영

수산학박사 학위논문

강도다리와 돌가자미의 잡종 유도 및  
양식 산업적 유용성 분석

지도교수 김 동 수

이 논문을 수산학 박사 학위논문으로 제출함

2021년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 일 영

이일영의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2021년 2월 19일



위 원 장 수산학박사 노 충 환



위 원 이학박사 조 성 환



위 원 이학박사 김 중 명



위 원 수산학박사 남 윤 권



위 원 이학박사 김 동 수



Production of hybrid between female starry flounder (*Platichthys stellatus*)  
and male stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and analysis of usefulness  
in aquaculture industry

Il young Lee

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

**Abstract**

Intergeneric hybridization has greatly contributed to genetic and productive improvements in aquaculture. This manipulation technique has been widely used in various species of fish to improve disease resistance, growth rate and flesh quality, environmental tolerance and a various traits to make fish more profitable to increase.

As starry flounder (*Platichthys stellatus*) is a cold-water breeder, which has strong disease resistance and euryhaline characteristics. Its production is rapidly increased recently. However, it takes more than two years for fish to fully grow-up to marketable size for high quality of "Sashimi". On the other hand, stone flounder (*Kareius bicoloratus*) has relatively good meat quality and flavor, but susceptible to high temperature, stress and disease. Therefore, seedling production of stone flounder is only made for releasing fry to improve stock resources in wild, but not for aquaculture in commercial scale farm. The purpose of this study is designed to examine the usability of hybrids between two species and investigate aquacultural effectiveness.

The induced hybrid has floating type of eggs and first cleavage was conducted in 1 hour after fertilization at 12 °C. Small sized Kupffer's

vesicle began to be observed in 46 hours and generated to full size in 51 hours after fertilization. They disappeared in 7 and a half hours, and then the tails were formed. The eggs started to hatch-out in 85 hours after fertilization. Five days after hatching, the larva absorbed most of the egg yolk and transformed to normal swimming position from the head lower position. Seven days after hatching-out, almost all entities started to eat rotifer. Eighteen days after hatching-out, *Artemia* nauplius started to be provided. 35 days after hatching-out, commercially available frozen copepod (Aquanet) were provided along with *Artemia* nauplius. About 50 days after hatching-out, the mixed feed of what was provided. In day 112 after hatching-out, they were grown to 5.5 to 7.8 cm in total length.

In order to determine an optimal anesthetizing concentration for hybrid, the clove oil was used as the standard anesthetic and the time for anesthesia and recovery were calculated. As the concentration of clove oil increased, the anesthetizing time took about one to two minutes at 20~80 ppm; however, the recovering time was not affected by oil concentration.

The results of morphological analysis of induced hybrid showed that the proportion of the body length to the total length were 85.99, 85.51 and 87.14% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively, which were not different from each other. The proportion of the body height to the total length were 48.56, 49.39, 44.74% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. The proportion of the caudal peduncle length to the total length were 8.55, 8.27, and 9.25% for starry flounder, hybrid, and stone flounder, respectively. The proportion of the caudal peduncle height to the total length were 9.48, 9.59, and 10.54% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. The proportion of the head length to total length was 26.83, 25.32 and

22.47% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. There was no morphologically significant difference between starry flounder and hybrid. The proportion of the upper chin length to the head length were 31.54, 32.85 and 33.70% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively, which were not different from each other. The proportions of the snout length to the head length were 21.26, 21.16 and 19.75% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. The interorbital width to the head length were 7.43, 9.31 and 7.19% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. And the proportion the of eye diameter to the head length were 18.71, 22.71 and 17.76% for starry flounder, hybrid and stone flounder, respectively. There was no significant differences in measurement trait among three fish groups.

The result of cytogenetic analysis of induced hybrid showed that the surface area and volume of the cell in hybrid were  $38.11 \pm 4.30 \mu\text{m}^2$  and  $136.07 \pm 45.51 \mu\text{m}^3$ , respectively. The surface area and the volume of the nucleus in stone flounder, starry flounder and hybrid were  $8.19 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$  and  $16.08 \pm 2.45 \mu\text{m}^3$ . These values were identical to the values of two parents used in this study. The content of DNA were also 0.66 pg/haploid cell for all three groups. The result of the mid-term mitotic figure of female and male hybrids showed that the number of chromosomes were  $2n=48$  and the karyotype was consisted of 24 sets of acrocentric chromosomes. There were no differences in the number of chromosomes and the karyotypes between female and male starry flounder, hybrid and stone flounder. Moreover, the result of the nuclear organization regions (NOR's) through silver staining showed that the NOR's existed in one set of the smallest no significant differences ( $p < 0.05$ ) in measurement trait among three.

There were no significant differences in daily growth rate, feed

coefficient and condition factor in fry for starry flounder, hybrid and stone flounder in the 60-day feeding trial. However, after stocking hybrid and starry flounder in the same tank for 8 months, the hybrids showed 15.1% higher in growth rate and 12.0% in condition factor than starry flounder.

The Scuticocidal activities were analyzed for three sessions for 4-month old starry flounder, hybrid and stone flounder. The result showed that starry flounder showed the highest tolerance and the lowest for stone flounder, respectively, whereas the induced hybrid showed the tolerance that is higher than the average of the two parent breeds.

The starry flounder and the hybrid were fed to *ad libitum* daily. The two experiment groups were observed up to 24 hours. The result showed that there were no differences in cell cycles up to eight hours and after 12 hours, the cell cycle of the starry flounders became faster. The experiment group were not fed and observed from two days to two weeks. Up to 12 days after initial feeding, the cell cycle of starry flounders excelled faster than the right-eyed flounders. From day 14, the cell cycle of hybrids excelled.

Salinity resistance test of starry flounders and hybrid was performed by lowering salinity of water from 35 psu to 2.5 psu. The result showed that one unit from each experiment group died which showed that both hybrid and the starry flounder were highly resistance to low salinity when salinity was gradually lowered. However, when the units were starved for two weeks and processed with fresh water, mortality of hybrid increased rapidly after three days and all units died after five days. All units that died showed bleeding in fins and failing of phlegm.

The result of analyzing gDNA of PRL using tail fins of starry flounders, stone flounder and hybrids showed that the hybrid having two

PRL genes that are different from one of each gene in starry flounder and stone flounder. The PRL expression was not present at 32 psu in starry flounders; however, the hybrid showed relatively low expression at 32 psu, and high expression at 6 psu. Starry flounder genes only were expressed in hybrids when exposed to low salinity.

The ovarian tissues were analyzed for starry flounders and hybrids. Reduction division was observed in all groups. Therefore, the maturation for 19-month old hybrid was examined anatomically, and normal maturation was observed.

There was no difference in moisture, crude protein and ash content in the whole body of starry flounder and hybrids, but crude lipid content in hybrid was higher than in starry flounder. There was no difference in free amino acid and fatty acid profiles, except for L-valine between starry flounder and hybrid.

These results indicate that hybrid between starry flounder and stone flounder is expected to contribute to the improved profits in fish culture industry in Korea.

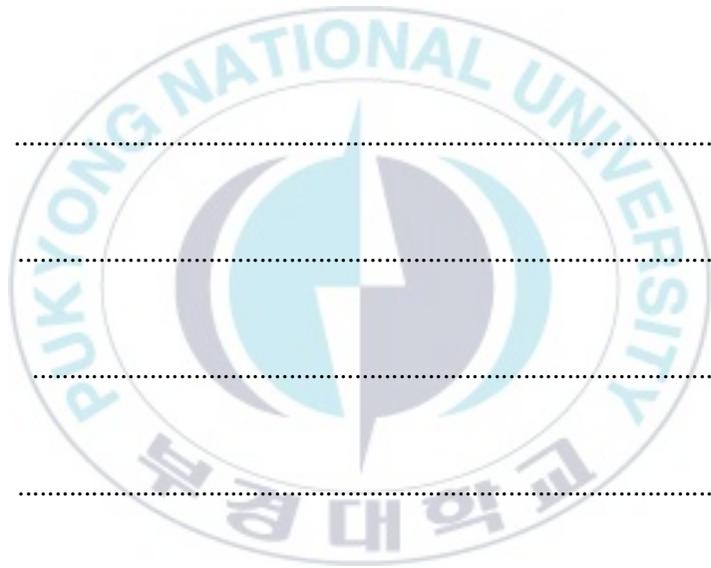
# 목 차

영문요약 (Abstract) .....	I
목차 (Content) .....	VI
표목차 (List of Tables) .....	IX
그림목차 (List of Figures) .....	XI
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 실험어 .....	8
2. 잡종유도 .....	8
2-1. 수정란 생산 .....	8
2-1-1. 성숙유도 .....	8
2-1-2. 산란유도 및 인공수정 .....	8
2-2. 발생관찰 .....	8
2-3. 종묘생산 .....	10
2-4. 태깅 .....	10
2-5. 마취 .....	12
3. 잡종의 분석 .....	12
3-1. 형태학적 분석 .....	12
3-2. 세포 유전학적 분석 .....	13

3-2-1. 적혈구의 세포와 핵 크기 측정 .....	13
3-2-2. DNA 함량 분석 .....	13
3-2-3. 염색체 및 핵형 분석 .....	13
3-3. 산업성 분석 .....	15
3-3-1. 사료효율 .....	15
3-3-2. 성장 및 비만도 .....	16
3-3-3. 스쿠티카증 내성 .....	16
3-3-4. 기아내성 .....	16
3-3-5. 담수 적응력 .....	17
3-3-5-1. 만복시 담수 적응력 .....	17
3-3-5-2. 기아시 담수 적응력 .....	17
3-3-5-3. 프로락틴(prolactin) 유전자 분석 .....	17
3-3-6. 생식소 성숙 .....	20
3-3-7. 어체 성분 분석 .....	20
Ⅲ. 결과 .....	23
1. 잡종의 난 발생 .....	23
2. 종묘생산 .....	23
3. 마취 .....	26
4. 형태학적 분석 .....	27
5. 태깅 .....	32
6. 세포 유전학적 분석 .....	32
6-1. 적혈구 계측 .....	32
6-2. DNA 함량 분석 .....	32
6-3. 염색체 수 및 핵형 분석 .....	36

7. 산업적 분석 .....	36
7-1. 성장, 비만도 및 사료효율 .....	36
7-2. 질병내성 .....	43
7-3. 기아내성 .....	43
7-4. 담수 적응력 .....	47
7-5. 프로락틴(Prolactin) 유전자 분석 .....	47
7-6. 생식소 성숙 .....	59
7-7. 어체 성분 분석 .....	59

IV. 토의 .....	65
국문요약 .....	75
감사의 글 .....	80
참고문헌 .....	82



## 표 목차(List of Tables)

Table 1. Seeding production method for hybrid between starry flounder ( <i>Platichthys stellatus</i> ) and stone flounder ( <i>Kareius bicoloratus</i> ) .....	11
Table 2. Induction and recovery times in 3 experimental fishes anaesthetized with various concentrations of olive oil .....	29
Table 3. Body proportions (mean $\pm$ SD) of starry flounder, stone flounder and its hybrid. The data was analyzed by the percent with total length .....	30
Table 4. Body proportions (mean $\pm$ SD) of <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and its hybrid. The data was analyzed by the percent with head length .....	31
Table 5. Erythrocyte measurement of 3 experimental groups .....	34
Table 6. DNA contents measurement of 3 experimental group .....	37
Table 7. Chromosome counts of hybrid fish between female <i>Platichthys stellatus</i> and male <i>Kareius bicoloratus</i> .....	39
Table 8. Early growth comparisons of weight gain and condition factor of <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and its hybrid ....	42
Table 9. Comparision of body weight and condition factor between <i>Platichthys stellatus</i> and hybrid flounder .....	44
Table 10. Comparison of DNA synthesis ability by flow cytometric cell cycle analysis of two experimental groups after feeding .....	46
Table 11. Comparison of DNA synthesis ability by flow cytometric cell cycle analysis of two experimental groups after starvation ....	48

Table 12. Number of dead fish in 2 experimental groups cultured at various concentrations of salt water .....	49
Table 13. Number of dead fish in 2 experimental groups cultured at fresh water after starvation for 2 weeks .....	50
Table 14. Whole-body proximate composition analysis of <i>Platichthys stellatus</i> and hybrid fish .....	62
Table 15. Total fatty acid composition of <i>Platichthys stellatus</i> and hybrid fish .....	62
Table 16. Free amino acid composition of <i>Platichthys stellatus</i> and hybrid fish .....	64



## 그림 목차(List of Figures)

Fig. 1. Comparison of yield by catch and culture in flatfishes in Korea from 2009 to 2019 .....	6
Fig 2. Photoperiod and water temperature control of sexual maturation of the starry flounder ♀ ( <i>Platichthys stellatus</i> ) during the experiment period .....	9
Fig. 3. Scheme of measurements for <i>Platichthys stellatus</i> (a) and hybrid between <i>Platichthys stellatus</i> and <i>Kareius bicoloratus</i> (b) ..	14
Fig. 4. External morphology of the egg development stages of the hybrid fish, and yolk-sac larvae of the hybrid .....	24
Fig. 5. Photograph of hybrid flounder ( <i>Platichthys stellatus</i> ♀ × <i>Kareius bicoloratuschthys</i> ♂) .....	28
Fig. 6. External morphology of tagged fish .....	33
Fig. 7. Photographs of erythrocytes cell of <i>Platichthys stellatus</i> (a), hybrid (b) and <i>Kareius bicoloratus</i> .....	35
Fig. 8. Flow cytometric histograms for DNA content of 3 experimental groups .....	35
Fig. 9. Metaphase of female and male starry flounder and hybrid female and male .....	40
Fig. 10. Silver-stained metaphases of female (a) and male hybrid (b) between starry flounder and stone flounder .....	41
Fig. 11. Scuticocidal activity of sera collected from 3 experimental groups of <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and its	

hybrid .....	43
Fig. 12. External morphology of death fish treated with freshwater after starvation for 2 weeks .....	51
Fig. 13. Electrophoresis analysis of genomic DNA of <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and its hybrid .....	52
Fig. 14. Multiple alignment of coding sequences of PRL gene in <i>Platichthys stellatus</i> (1), <i>Platichthys stellatus</i> (2& 3), and then hybrid (4& 5) .....	54
Fig. 15. Coding sequences of the gene encoding prolactin of hybrid between <i>Platichthys stellatus</i> and <i>Kareius bicoloratus</i> .....	55
Fig. 16. Coding sequences of the gene encoding prolactin of <i>Kareius bicoloratus</i> .....	56
Fig. 17. Analysis of relative expression level of prolactin in <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and Hybrid. PCR primers used are F1 × R1 170bp, F3 × RPLR 97bp and RPLF × R2 282bp .....	57
Fig. 18. Analysis of relative expression level of prolactin in <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and its Hybrid. PCR primers used are RPLF × R3 156bp, RPLF × R4 156bp and RPLF × R5 102bp .....	58
Fig. 19. Transverse sections of gonads of <i>Platichthys stellatus</i> (a: female, c: male) and hybrid fish (b: female, d: male). .....	60
Fig. 20. Transverse sections of gonads of starry flounder (a: female, c: male) and hybrid fish (b: female, d: male) .....	61

# I. 서론

전 세계 총 어류 생산량은 2016년 기준 약 1억 7천만 톤이며, 그 중 어획생산량은 8천만 톤 그리고 양식을 통한 생산량은 약 9천만 톤으로 점점 증가하고 있다. 어획 생산량은 1980년대 후반부터 큰 증가 폭이 없이 정체된 반면 양식생산량은 매년 크게 증가하여 현재 총 어류 생산량의 약 47%까지 차지하고 있다. 1961년에서 2016년까지의 연간 어류 소비량 증가율은 3.2%이며, 이것은 같은 기간 인구 증가율인 1.6%를 앞지르는 수치로써 1인당 어류 소비량의 증가 폭은 1961년 9.0 kg에서 2015년 20.2 kg으로 증가하였다. 그러나 현재 전 세계 어류 소비량은 해마다 증가하고 있으나, 남획, 연안 오염 그리고 엘니노와 같은 자연환경의 변화는 생산량에 한계를 보여 앞으로 늘어나는 전세계 수요를 충족시키기 어려운 것이 현실이다(FAO/UNEP, 1981; FAO, 2018).

우리나라에서 어류 양식업의 역사는 1970년대부터 자연에서 채취한 방어 종자를 이용하여 육성 위주의 양식이 활성화 되었고 1980년대부터 종자를 직접 생산 하여 전 생활 주기를 조절 하는 어류양식이 시작되어왔다. 1990부터는 넙치와 조피볼락을 중심으로 어류양식업이 본격적으로 발달하기 시작하였으나 2000년대 들어 활발히 보급된 어류 양식은 생산 기술의 발전과 더불어 양식 생산기반이 확충됨으로써 가능하였다. 이에 따라 국내 양식면허 건수와 면적을 증가 시켜 지난 10년간 까지 양식장 면허 건수는 13.5% 그리고 면적은 14.4%가 증가 하여 필연적으로 양식장 주변의 수질 오염의 문제점을 내포하고 있다. 그러나 국민 생활의 향상을 통한 생활수준의 상승은 안전한 양식어류에 대한 생산 및 어장 환경 개선에 대한 요구를 증가 시키고 있다. 이와 함께 우리나라는 국제유가, 사

료가격 및 환율 그리고 WTO와 FTA 등 경제적 요인과 대외적 요인에 의해 더 많은 영향을 받고 있다. 예컨대 양식업에서 원가 요인의 하나인 유류 가격은 국제 유가의 추세에 따라 육상수조의 발전 연료 등으로 쓰이는 면세유의 가격이 지속해서 상승 추세를 보여 양식생산 원가를 압박하는 요인이 되고 있으며 원양 어업자원의 감소와 유가 상승으로 인한 어획단가의 계속된 상승은 사료로 사용되는 어분 및 생 사료의 가격 상승으로 인해 어류 양식업의 생산원가에 지대한 영향을 주고 있다. 특히 지구의 기후 변화로 인한 수온 상승은 해산 어류의 양식에 직접적 영향을 끼쳐 일부 어종의 경우 여름철 대량폐사를 가져오는 등 어류 양식 산업에 있어 단위 면적당 생산성을 획기적으로 개선 할 수 있는 새로운 양식 품종의 개발 및 양식 종의 보급이 절실한 실정이다(NFRDI, 2008).

잡종은 교잡강세(hybrid vigor)를 통하여 부모 종이 각각 가진 바람직한 형질이 자손에게서 동시에 발현되기를 희망하면서 연구자들과 양식가들에 의해 사용되고 있다(Bartley et al., 2001). 그리고 부모 종에서 가지지 않은 긍정적인 형질이 자손에게서 나타난다고도 알려져 있다(Purdom, 1993b). 잡종 기법을 통한 종간 교배(interspecific hybridization)와 속간교배(intergeneric hybridization)는 포유류를 주로 다루는 축산업에 있어서는 생산성 향상에 그다지 큰 기여를 못 하고 있다. 그러나 경골어류는 일반적으로 체외 수정, 짧은 생식 주기 그리고 다량의 알을 산란하는 특징을 가지며, 자연계에서도 간혹 잡종 현상이 일어나기도 하므로 특정 조건에서 인공적으로 생산한 잡종 개체 들은 어류 양식업에 있어서 형질 개선과 생산력 향상에 실질적인 가치를 높여 어류 양식 산업에 크게 기여하고 있다(Jung et al., 2016).

인위적 유도를 통한 잡종은 (1) 성(性) 성숙 호르몬을 주사 후 다른 두 종의 암수를 합사하여 자연 방란과 방정을 유도하여 수정란을 생산 하

거나, (2) 서로 다른 두 종의 암수를 각각 따로 수용하여 정자와 난을 채취한 후 인공 수정, 또는 (3) 한 종의 정자를 동결 보존하여 산란된 다른 종의 알을 채취하여 인공 수정시켜 생산할 수 있다.

대부분의 유도된 잡종은 불임으로서 양식 도중 예기치 못한 사고로 인하여 자연계에 누출되었을 경우 생태계의 종 다양성을 저해하지 않는 장점이 있다. 일부 연어과 어류와 잉어과 어류의 중간, 속간잡종은 부모종에 비해 생존력이 낮거나 열악한 신체 능력으로 인해 사육이나 재생산에 대한 잠재력이 전혀 없는 경우도 보고되어 있다(Campton, 1987). 이런 몇 가지 보고 이외에는 잡종의 경우 대체로 몇 가지의 장점을 나타낼 수 있는데 Chevassus (1979)는 이러한 장점을 중개성(intermediacy), 조합성(combination), 다산성(luxuriance) 및 단일성(monosexuality) 등으로 정리한 바 있다.

잡종의 형태학적, 계수 및 계측학적 특성은 부모 종들 사이의 중간 정도인 경우가 다양한 잡종에서 이미 확인된 바 있다(Chourrout, 1987). 이런 특징은 관상어 생산 시 더욱 산업적 가치가 있는 형태의 어류를 생산하는 데에 유용하며 잡종은 각각의 부모 종에서 유리한 특성이 조합되어 내제할 가능성이 많은데, 특히 철갑상어 잡종인 bester는 great beluga의 장점인 빠른 성장과 *Huso huso*의 담수 내성을 모두 가지고 있다 (Shiraishi et al., 1993). Bester는 생식능력을 가지고 있어, 자체 교배가 가능하여 부모종의 장점을 조합하여 번식이 가능한 잡종의 좋은 예이다. 또한 대부분의 어류 잡종은 성장에 있어 주로 모계와 관련하여 잡종의 우수한 초기 성장률을 나타내어 이들 초기 성장 속도의 향상은 여러 잡종에서 나타나는 특징이며, 이는 모계로부터 유전된 기본 분자 메커니즘이 성장 억제 조절을 감소시키는 영향을 주는 것으로 예측되고 있다(Chourrout, 1987). 그중 한 예로 잡종인 sunshine bass(female *Morone chrysops* X

male *M. saxatilis*)는 표준화 된 감금 스트레스 실험에서 혈장 코티졸 수준이 부모 종들 보다 측정값이 낮음을 보여주었다. 이러한 특성은 sunshine bass의 경우 외부 스트레스에 대한 반응이 약하기 때문에 코르티코스테로이드 면역 반응 억제의 결과로 이에 필요한 많은 에너지를 남길 수 있어 빠른 초기 성장이 기대 되며, 또한 질병원의 감염에 대한 내성을 증가시키므로 생존에도 영향을 미쳐 양식 생산에 있어 긍정적 특성이 된다. (Noga et al., 1994). 또한 잡종은 암수가 상호 특이적인 형질이 있는 경우 나타난 암수 어느 한 쪽이 유용한 특성이 확실 할 때 산업적 이용이 가능하다. 예를 들어 틸라피아류는 수컷이 암컷 보다 성장이 빠르므로 성 결정 기작(sex determination mechanism)이 서로 다른 특성을 이용하여 전수컷 집단을 생산 할 수 있다(Mair et al., 1995). 더욱이 어류의 잡종에서 부모 종에 없었던 긍정적인 새로운 형질이 새로이 나타나는 경우도 존재한다. 예를 들어 암컷 브라운 송어(*Salmo trutta*)와 수컷 브룩 송어(*Salvelinus fontinalis*) 사이의 잡종인 tiger trout은 시각적으로 뛰어난 대리석 색상 패턴의 채색을 가지게 된다(McKay et al., 1992). 배스류 잡종어인 *M. saxatilis* ♀ × *Morone chrysops* ♂과 *M. saxatilis* ♀ × *M. americana* ♂은 striped bass에 비해 빠른 초기성장, 우수한 삼투압 적응과 열내성, 스트레스 및 감염에 대한 내성이 증가하여 저수지 및 다양한 양식 형태에서(호수, 가두리 및 실내 탱크 등) 높은 생존율을 나타내어 우수한 평가를 받는다(Noga et al., 1994).

유도 된 잡종이 생식 능력이 있는 경우, 잡종 F1 은 이후 산란과 수정을 통해 추가적으로 (1) 잡종 F1 끼리 교배시켜 생산하거나 (F2 잡종화), (2) 동일한 암수 종에서 잡종 F1 과 상호 교차로 교배시키는 방법(F2 상호 잡종화), (3) 서로 다른 암수로부터 4가지 가능한 잡종화와 상호 교차 잡종화 조합 (이중 잡종화), (4) 하나 이상의 부모종과 잡종 간의 역교배

(내성적 잡종화), (5) 부모종과 다른 제3의 새로운 종과 잡종 교배 (재 잡종화) 등 다양한 잡종의 육정이 가능하다. 그러나 이제까지 해산어는 담수어에 비해 위와 같은 잡종화가 제한적임이 보고되어 있다(Chevassus, 1987).

우리나라의 가자미과 어류 어업 생산량은 2019년 기준으로 18,171톤, 그리고 양식 생산량은 3,669톤으로 꾸준히 증가되고 있다(Fig. 1). 그러나 이들 대부분의 생산량은 넙치 단일 종에 편중되어 있으며, 2014년부터 강도다리(*Platichthys stellatus*) 양식이 동해 연안을 중심으로 시작되어 가지미류 양식 생산이 다양화되는 경향을 보이고 있다.

강도다리는 육질이 담백하고 탄력이 있어 넙치보다 약 15% 높은 가격으로 판매되고 있는 고가의 어류이다(Lim et al., 2007). 강한 내병성 및 광염성 등의 특징을 가지고 있어 질병에 약한 넙치를 대신할 양식어종으로 주목받아 그 생산량이 크게 증가되고 있다(Do et al., 2014). 그러나 성장이 느려 대형의 고급횃감으로 사용하기 위해서는 2년 이상 키워야 하는 문제점이 있어 대체로 당년 300~500 g 정도가 되면 뼈째 찢기 용으로 싼값에 판매되어 수익성이 떨어지는 문제점과 성숙이 되면 물질대사가 급격히 증가하여 고수온기에 대량 폐사가 일어나는 단점이 있다(Jung et al., 2016).

돌가자미(*Kareius bicoloratus*)는 육질과 맛이 좋아 고급 횃감으로 주목받고 있어 경제적 가치가 높은 양식 대상종이지만 고수온, 스트레스 및 질병에 약해 국내에서는 본격적인 양식이 이루어지지 못하고 단지 방류용 종묘 생산이 이루어지고 있고, 중국에서는 자연산 종묘를 이용한 축제식 양식이 이루어지고 있다(NFRDI, 2008).

이에 본 연구는 두 종간 우수한 특성을 가진 잡종을 유도하여, 그 산업성을 분석함으로써 현재 국내에서 대량으로 양식되어 산업적으로 정착

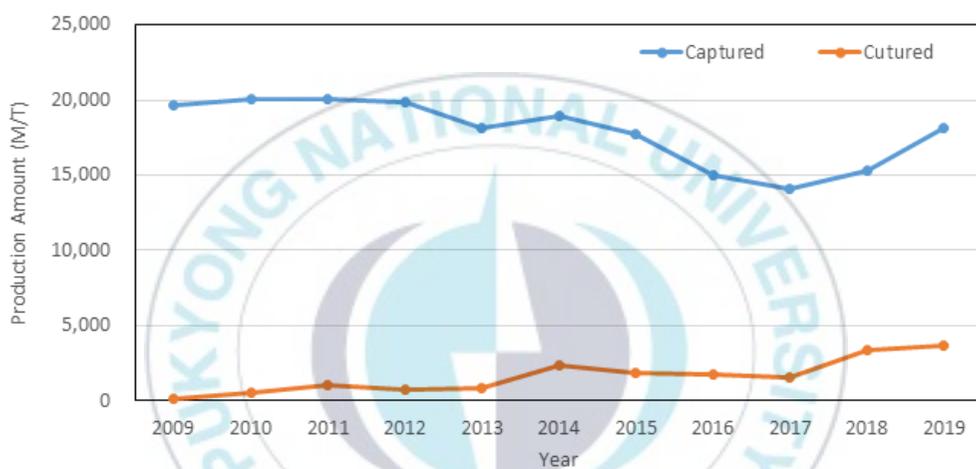


Fig. 1. Comparison of yield by catch and culture in flatfishes in Korea from 2009 to 2019.

된 강도다리의 그것과 비교함으로써 두 종간 잡종의 국내 양식 산업에 이용 가능성을 조사하고자 수행하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어

본 연구에서 교잡 자손 생산에 강도다리 친어는 여수의 마린씨드에서 사육 중인 2.2 kg에서 3.1 kg의 무게를 가진 5 마리의 암컷 그리고 돌가자미 친어는 0.4 kg에서 0.5 kg의 무게를 가진 4마리의 수컷을 사용 하였다. 초기성장, 형태분석, DNA 함량 분석 및 스쿠티카 내성 분석에 사용 된 돌가자미는 경북 수산자원연구소에서 생산 된 종묘를 제공 받아 사용 하였다.

### 2. 잡종유도

#### 2-1. 수정란 생산

##### 2-1-1. 성숙유도

인공수정을 위해 산란유도 약 3개월 전부터 강도다리와 돌가자미를 친어를 합사시켜 5m×5m 콘크리트 수조에 사육하며 광주기와 수온을 조절하였다(Fig. 2).

##### 2-1-2. 산란유도 및 인공수정

자연산란을 유도하기 위하여 친어의 성숙도를 확인 한 후 채란. 채정 하여 습식법으로 수정란을 생산하거나, 성(性)성숙 유도 호르몬을 주사하여 인공산란을 유도한 후 습식법으로 수정 시켰다.

#### 2-2. 발생 관찰

수정란은 12±1 °C의 수온에서 부화시켰고, 발생 단계별 관찰과 촬영에는 해부 현미경과 디지털 카메라(AZ100; Nikon Co., Japan: DS-Ril;

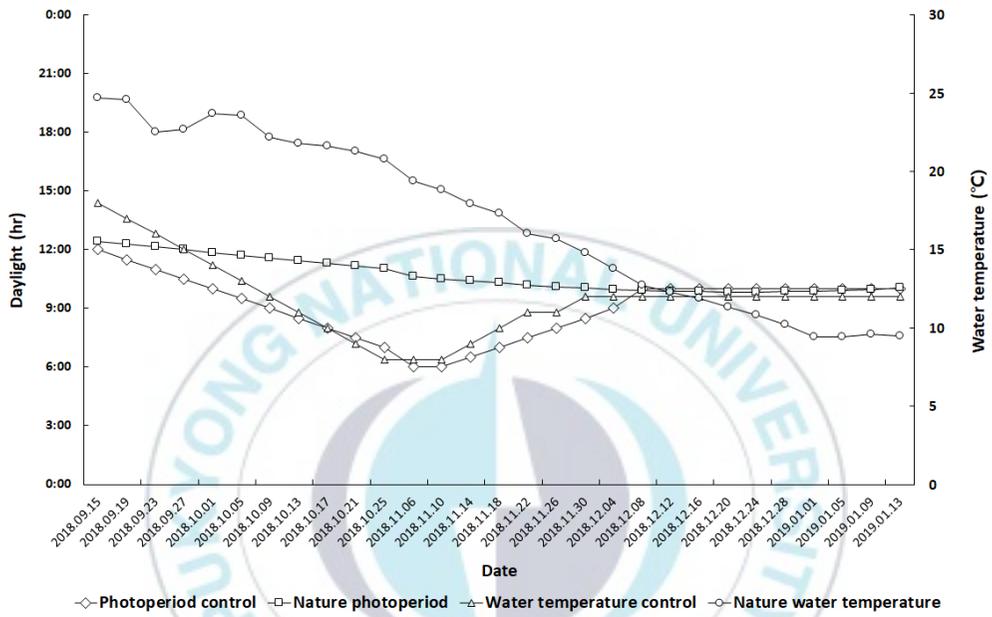


Fig 2. Photoperiod and water temperature control of sexual maturation of the starry flounder ♀ (*Platichthys stellatus*) during the experimental period.

Nikon Co., Tokyo, Japan)가 사용 되었으며, 배 발생 단계는 Kimmel et al. (1995)의 발생 단계를 기준으로 하였고 수정란의 90% 이상이 동일 한 단계에 도달 시 각 단계별 소요 시간과 발생학적 특징을 기록하였다.

### 2-3. 종자생산

사육 수조는 6×6 m, 수심 1 m의 콘크리트 수조이며, 방양 된 수정란의 양은 1,000 ml (약 80 만개), 수온은 12 °C였다. 종자생산을 위한 일령별 먹이 공급 및 수온을 나타낸 표는 Table 1과 같다. Table 1에서 보듯이 부화 5일째부터 로티퍼를 공급하였고, 이때 수온은 12 °C를 유지 하였으며, 이후 변태시기인 18일령까지 점진적으로 수온을 올려 15 °C로 사육하여 로티퍼와 알테미아를 공급하였다. 이때 저서생활로 들어가는 변태자어는 자어의 축이 돌아가기 시작하여 최초 저서생활로 들어가는 개체 발견 이후 72시간 내에 모두 완료되었다.

부화 24일령부터 알테미아를 공급하였고, 이후 부화 47일(2.0 - 30 cm) 까지 알테미아와 냉동 코페포다를 공급하였으며 이후 배합사료(러브라바 2 호, 4호, 수협사료 침강 1호, 1s호)로 전환 하였고 수온은 18 °C를 유지하였다.

### 2-4. 태깅(tagging)

강도다리 대조군과 잡종의 형태 구분이 어려워 분석용 실험군은 태깅을 하여 이후 실험에 사용하였다. 태깅 방법은 첫째 아가미 뚜껑을 들어 올린 후 적당한 위치에 편치로 구멍을 뚫고, 둘째 타이틀 그 구멍에 끼운 후 태그를 타이틀에 끼우고 타이틀을 잠그고 조인다. 이후 가위로 타이틀의 조이고 남은 부분을 자르면 어체에 태그가 장착된다. 태그의 탈락율을 조사하기 위하여 20 g내외의 강도다리와 잡종 각 12마리씩을 태깅하여 2개월

Table 1. Seedling production method for hybrid between starry flounder (*Platichthys stellatus*) and stone flounder (*Kareius bicoloratus*)

Age (day)	Developmental stage	Feeding	Temperature
0	hatched out		12 °C
5	larvae (eleutheroembryo)	rotifer	14 °C
18	larvae (metamorphosis)	rotifer+ artemia nauplius	16 °C
24	fry (0.8 – 1.5 cm)	artemia nauplius	18 °C
36	fry (1.2 – 2.0 cm)	artemia nauplius+ frozen copepoda	18 °C
47	fry (2.0 – 3.0 cm)	artificial feed (0.2 – 0.3 mm)	18 °C
68	seedling (3.2 – 4.6 cm)	artificial feed (0.4 – 0.6 mm)	18 °C
85	seedling (4.5 – 5.5 cm)	artificial feed (0.9 – 1.1 mm)	18 °C
112	seedling (5.5 – 7.8 cm)	artificial feed (1.4 – 1.6 mm)	18 °C

간 태그가 탈락되는 개체를 계수 하였다.

## 2-5. 마취

마취제는 clove oil을 사용하였고, 마취제의 농도에 따른 실험군의 마취 시간과 회복 시간을 측정하여 그 효과를 조사하였다. 마취 효과는 각 어종별마다 마취제 농도별 실험군을 정하고 각 실험군은 6~10마리의 실험어를 사용하여 조사하였다. 마취에 사용 된 어류는 실험 전 24시간 동안 절식시켰다. 마취 시 수온은  $20 \pm 1$  °C를 유지하며 그 효과를 분석하였다(Weber et al., 2009). 마취 효과 판정 기준 및 회복 시기는 Keene et al. (1998) 및 Minter et al. (2014)의 방법에 따라 약간 개선하여 판정하였다. 마취 시간은 마취액에 침지 후 평형감각, 움직임 및 자극 등에 대한 반응성이 상실된 stage 4까지 소요되는 시간을 측정하였고, 마취시간이 5분 이상 소요되는 경우는 마취효과가 없는 것으로 판단하였다. 회복 시간은 마취된 개체를 자연 해수로 이동한 후 정상적인 수영이 가능한 stage 5까지 소요되는 시간을 측정하였다.

## 3. 잡종의 분석

### 3-1. 형태학적 분석

강도다리, 돌가자미 및 잡종의 형태학적 특성을 비교 분석하기 위하여 계측형질과 계수형질을 측정하였다. 계측에는 digital vernier calipers를 사용하여 0.1 mm 까지 그리고 체중은 전자저울로 0.1 g까지 측정하였다. 계측형질로는 전장(total length, TL), 체장(body length, BL), 체고(body height, BH), 두장(head length, HL), 미병장(caudal peduncle length, CPH), 미병고(caudal peduncle height, CPH), 문장(snout length, SL), 안경(eye diameter, ED) 및 양안간격(interorbital width, IW)이었다

(Fig. 3). 그중 체장, 체고, 두장, 미병장 및 미병고 등은 전장에 대한 백분비, 문장, 안경 및 양안 간격 등은 두장에 대한 백분비를 구하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

### 3-2. 세포유전학적 분석

#### 3-2-1. 적혈구의 세포와 핵 크기를 측정

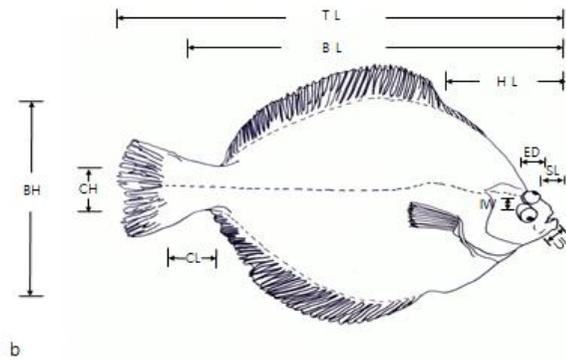
실험어의 세포와 핵 크기를 측정하기 위해 강도다리와 잡종 및 돌가자미의 미부정맥에서 혈액을 각각 채취한 후 슬라이드에 도말하여 100% ethanol에서 5분간 고정한 다음 3% Giemsa 염색 용액에서 20분간 염색하였다. 적혈구 세포와 핵의 장경(a) 및 단경(b)은 광학현미경에서 micrometer로 측정하였고, 표면적은  $(a) \cdot (b) \cdot \pi / 4$  (Sezaki and Kobayashi, 1978), 부피는  $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \cdot \pi / 3$  (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였다.

#### 3-2-2 . DNA 함량 분석

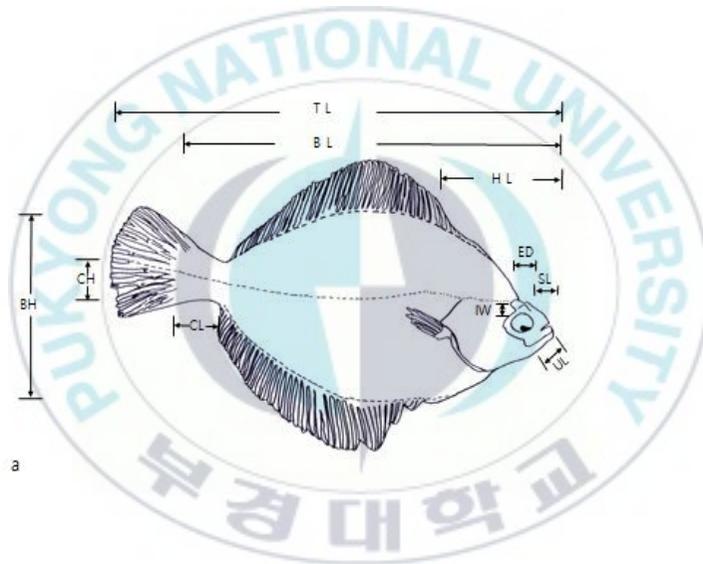
유도 된 잡종의 DNA 함량 분석을 위하여 flow cytometry를 수행하였다. 강도다리와 잡종 및 돌가자미의 혈액 시료는 staining buffer (Partec, Germany)를 이용하여 염색하였다. 염색된 시료들은 PA II flow cytometry (Partec Co., Münster, Germany)로 분석하였으며, 넙치 혈구세포를 대조군으로 사용하였다.

#### 3-2-3. 염색체 및 핵형 분석

강도다리와 잡종 및 돌가자미의 염색체 수 판별 및 핵형 분석을 위해 신장직접법(Kim et al., 1993)을 이용하였다. 실험군에 colchicine을 10  $\mu$ g/g 체중의 용량으로 복강 주사하고 4시간 방치한 후 신장을 적출 세절



b



a

Fig. 3. Scheme of measurements for *Platichthys stellatus* (a) and hybrid between *Platichthys stellatus* and *Kareius bicoloratus* (b). TL, total length; BL, body height; HL, head length; CPL, caudal peduncle length; CPH, caudal peduncle height; ML maxilla length; SL, snout length; IW, interorbital width; ED, eye diameter.

하고 상온에서 10분간 저장액 (0.075 M KCl)에 처리한 후 Carnoy's 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 6회에 걸쳐 고정하였다. 공기 건조법으로 슬라이드 표본을 작성 한 후, 3% Giemsa 염색 용액에 20분간 염색하여 광학현미경 (Eclipse E400; Nikon Co., Japan)에서 증기 염색체 상을 관찰하였다. 각 슬라이드 당 20여 개의 판독 가능한 염색체 증기 분열상을 계수하였으며, 분열상이 뚜렷한 시료는 디지털 카메라 (Moticamp Pro 205A; Motic Co., China)로 촬영하여 핵형 분석을 하였다.

### 3-3. 산업성 분석

#### 3-3-1. 사료효율

전남 여수 마린씨드에서 생산된 강도다리와 잡종의 치어와 경북수산 자원연구소에서 생산된 돌가자미의 치어를 사용하여 성장, 비만도 및 사료효율을 측정하였다. 60일간 각 실험군마다 30마리씩 3반복하여, 100 L 플라스틱 수조에 수용하였으며, 실험 기간 중 염분은 자연해수를 이용하였고(32 psu), 사육 기간 중 수온은 18 °C를 유지하였다. 먹이 공급은 1일 2회 만복 공급 하였으며(수협사료 2호), 유수식으로 사육하였다.

실험 시작과 종료 시 버어니어 캘리퍼스와 전자저울을 사용하여 실험어의 전장과 체중을 측정하였으며, 공급된 사료량과 폐사 개체는 매일 기록하였다. 측정된 성장자료와 사료공급량을 바탕으로 성장 관련 요인을 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

- 증중량(Weight gain, g):  $W_2 - W_1$
- 사료효율(Feed efficiency, %):  $(G/F) \times 100$
- 사료계수(Feed intake):  $F/G$
- 비만도(Condition factor, %):  $(W_2/L^3) \times 100$

W1: 실험시작시 어류 총중량, W2: 실험종료시 어류 총중량, G: 증중량, F: 총사료 공급량, L: 실험종료시 실험어 전장

### 3-3-2. 성장 및 비만도

8개월간 사육한 강도다리와 잡종을 각 실험군 당 16마리를 무작위 추출하여 어체 중량과 전장을 측정한 후 성장과 비만도를 조사하였다. 비만도는 상기 3-3-가와 동일한 방법을 통해 산출하였다.

### 3-3-3. 스쿠티카충 내성

실험에 사용된 스쿠티카충(*Miamiensis avidus*)은 스쿠티카충에 걸린 넙치의 뇌에서 채취하여 streptomycin (100 µg/ml, Sigma, USA), penicillin (100 U/ml, Sigma), 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) 이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma, USA)에서 배양한 *Epithelium papulosum cyprini* (EPC) cells을 먹이로 공급하여 20 °C에서 배양하였다.

혈청의 질병저항성은 96-well plate를 이용하였고, 강도다리, 잡종군 및 돌가자미의 각 개체로부터 분리한 혈청을 Hank's balanced salt solution (HBSS)를 이용해 1/2~1/32로 단계 희석하였다. 단계 희석한 혈청에  $1 \times 10^2$ 의 스쿠티카충을 동일 양으로 접종한 후 1, 3 및 8시간 별로 혈청의 스쿠티카충 살충력을 현미경을 이용하여 조사하였다. 각 혈청의 스쿠티카충 살충 titer는 스쿠티카충이 100% lysis 되었거나 혹은 움직임이 전혀 없는 상태를 최종 titer로 정하고 그 희석배수의 역수를 최종 scuticocidal activity로 사용하였다.

### 3-3-4. 기아내성

어류를 반복으로 사료를 공급한 후 4시간 간격으로 24시간까지의 세포 주기를 분석하여 강도다리와 잡종의 두 실험군간 기아에 대한 대조군으로 설정하였다. 이후 2주간 굶기며 잡종의 기아에 대한 내성을 강도다

리의 그것과 비교하였다. 실험군의 DNA 합성을 위한 세포 주기를 분석하기 위하여 실험군 각 4미로부터 헤파린이 처리된 주사기로 혈액을 채취하여 70% 에탄올로 고정하였다. 고정된 혈구세포를 PBS로 1회 세척한 후 Muse™ Cell cycle reagent (EMD Millipore Corp. Billerica, MA, USA)를 첨가하여 암냉소에서 염색하고 Muse™ Cell Analyzer (Merck-Millipore, Germany)를 이용하여 G1기, S기 및 G2+M기의 세포 주기를 분석하였다. 이후 두 그룹 간  $\frac{G_1}{G_2+M}$  과  $\frac{S}{G_2+M}$  의 값을 측정한 후 강도다리의 값을 잡종의 그것으로 나누어 비교 분석하였다.

### 3-3-5. 담수 적응력

#### 3-3-5-1. 반복 시 담수 적응력

사료를 반복으로 공급하며 강도다리와 잡종의 담수에 대한 적응력을 조사하기 위하여 각 어종별 실험군당 60마리씩 3반복하여 2주간 염분 35, 30, 25, 15, 5 및 2.5 psu에서 사육하며 생존율을 관찰하였다.

#### 3-3-5-2. 기아 시 담수 적응력

어류를 굶겼을 때 담수에 대한 적응력을 관찰하기 위하여 강도다리와 잡종의 각 실험군 당 24 미의 어류를 3 반복하여 2주간 먹이공급을 중단한 후 1일 5 psu 씩 염분도를 낮추며, 저염분 농도에서의 생존 능력을 조사하였고 폐사 한 개체의 외형을 관찰하였다.

#### 3-3-5-3. 프로락틴(prolactin) 유전자 분석

잡종의 담수 적응력을 비교하기 위해 강도다리, 돌가자미 및 잡종의 사육수에 염분 변화를 준 후, 경골어류의 저염분 삼투조절 인자로 알려진 프로락틴 유전자를 비교 분석하였다. 실험어인 강도다리(20마리, 전장

18±1 cm, 어체중 80±10 g), 돌가자미(20마리, 전장 19±2 cm, 어체중 84±12 g) 및 잡종(20마리, 전장 18±2 cm, 어체중 83±9 g)를 100 L 플라스틱 수조에 수용 후 32 psu에서 1시간에 2 psu씩 염분 농도 낮추면서 32 psu, 18 psu, 6 psu 구간에서 5마리씩, 뇌와 꼬리지느러미 조직을 샘플 하였다. 실험기간 동안 수온은 18±2 °C였고, 자연광에서 실험을 진행하였다.

강도다리, 돌가자미 및 잡종에 PRL의 gDNA 분석을 위해 채취 한 각 실험어의 꼬리지느러미 조직은 70% 에탄올에 분석 전까지 보관하였으며, AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 각각의 gDNA는 AccuPrep PCR/Gel DNA Purification Kit (Bioneer)를 사용하여 gel purify를 수행하여 분석 하였다.

돌가자미 및 잡종의 prolactin 유전자의 조직 특이적 발현패턴을 분석하기 위하여 각 어종에서 채취한 근육, 비장, 장, 신장, 심장, 생식소, 아가미, 뇌 조직은 분리하였다. Trizol을 사용하여 각 조직으로부터 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하였고, reverse-transcription (RT)-PCR을 수행하였다. Reference gene으로서 사용한 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 PCR 조건은 GAPDH-F (5'-CCAGAAC-ATCATCCCAGCTT-3'), GAPDH-R (5'-GGCCTTCACAACCTTCTT-GA-3')을 사용하여 pre-denaturation을 95 °C에서 3분, denaturation을 95 °C에서 30초, annealing을 52 °C에서 30초, extension을 72 °C에서 30초로 총 30 cycle로 수행한 후, final extension을 72 °C에서 5분간 진행하였다. Prolactin의 PCR 조건은 Deg-PRL F (5'-CCCTCCATGTGCCACACCT-CC-3'), Deg-PRL R (5'-AGGACTTTCAGGAAGCTGTCAAT-3')을 사용하여 annealing을 55 °C에서 30초, 나머지는 GAPDH의 PCR 조건과 동일한 조건으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

각 실험구 당 PRL 발현량 분석은 채취 한 뇌 조직을 즉시 액체질소 (-196 °C)에 분석 전까지 보관하여, TRizol 방법으로 total RNA를 추출하였다. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit RT-qPCR(Thermo)를 이용해서 cDNA로 합성 후 Prolactin 유전자를 대상으로 qRT-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 pre-denaturatio 94 °C에서 4분, denaturation을 94°C에서 30초, annealing을 60 °C에서 30초, extension을 72 °C에서 1분으로 30 cycle로 PCR을 수행하였고, primer는 PRLF (5'-T-ATGACTC-ACAGGAGAACCAGACTC-3') 와 PRLR (5'- TCAGCACGTCTCAGG-CTGTGTGTTTCGTAGC - 3')를 사용하였다. semi-qPCR을 위해 전기영동을 수행하였고 1 % agarose gel을 사용하였다.

사육수의 저염분 변화시 잡종에서 발현 된 PRL과 gDNA 상의 PRL 유전자를 비교 분석하기 위해 위에서 얻어진 강도다리, 돌가지미 그리고 잡종의 gDNA, cDNA를 이용해 염기서열 분석을 하였다. PCR 조건으로는 2µl의 DNA, 5X HiQ-PCR 4µl 와 PRL Deg-F(5'-CCCTCCATGTGC-CACACCTCC-3'), Deg-R(5'-AGGACTT-TCAGGAAGCTGTC-AAT-3') primer를 각각 1 µl씩 혼합하여 최종 용량은 20 µl가 되게하였다. PCR 반응은 95 °C에서 3분간 초기 변성 후, 95 °C에서 30초, 55 °C에서 30초, 72 °C에서 1분의 반응을 35회 반복하였고, 72 °C에서 5분간 최종 신장하였고, 증폭된 유전자는 1% Agarose gel에 전기 영동하였고, Ethidium bromide (0.5 µg/mL)에 염색하여 확인하였다. 이어 DNA Gel Extraction S&V Kit (Bionics, Korea)를 사용하여 정제하였고, TOPcloner™ TA core kit (Enzymomics, Korea)를 이용해 유전자를 삽입했다. Ligation은 pTOP TA V2 (10 ng/µl) 0.75 µl, 6X TOP cloner™ buffer (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>) 2 µl와 9.25 µl의 PCR 산물로 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 산물은 100µl *E.coli* DH5α에 Transformation 하였다. 얼음 속에 3

0분, 42 °C에서 1분, 다시 얼음에 3분간 두었고, LB배지 600µl 첨가 후 37°C 200rpm으로 1시간 배양하였다. 그 후 LB+Ampicilin 고체배지에 도말하여 37 °C에 16시간 배양하였다. Transformant는 다시 5 ml LB에 옮겨 37 °C 200 rpm으로 16시간 배양하였다. Plasmid DNA Miniprep S&V Kit의 protocol대로 정제했고 Digestion은 EcoR I 으로 37 °C 2시간 경과 후 삽입 유전자를 확인하고 Genotech에서 염기서열을 확인하였다.

### 3-3-6. 생식소 성숙

잡종어 실험군에서 무작위로 12마리 (전장 12~15 cm)를 선별한 후 생식소를 적출하여 4% formaldehyde에 고정하였다. 일반적인 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 파라핀을 이용하여 포매한 뒤, 6 µm 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 Canada balsam으로 마운팅하여 영구표본을 작성한 후 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 성 분화여부를 관찰하였다.

성체의 생식소를 관찰하기 위하여 19개월 된 40~45 cm 크기의 잡종어 7마리를 해부한 후, 성숙된 정소와 난소 조직을 관찰하였다.

### 3-3-7. 어체 성분 분석

사육 중인 11개월령의 강도다리(5마리, 268±5 g)와 잡종(5마리, 평균 284±6 g)을 무작위 선별하여 각 전 어체를 분쇄한 후, AOAC(Association of Official Analytical Chemists, 2000) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(135°C, 2시간), 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법(N×6.25), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 시료를 동결 건조 후, soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 Soxhlet 추출법으로 분석하였다.

유리 아미노산은 분쇄한 시료를 5 g씩 정량하여 ethanol 30 ml을 첨

가하고 homogenizer로 균질화한 후 4 °C에서 24시간 처리하였다. 이때 얻은 용액을 15분간 원심분리(9,500 g) 한 후 상층 액을 분리하였다. 침전된 시료는 다시 70% ethanol 30 ml를 첨가하여 혼합하고 원심분리한 후 상층액만 분리하여 40 °C에서 감압농축 하였다. 농축된 시료는 증류수와 diethyl ether를 첨가하여 메스실린더에 옮기고 1시간 후 diethyl ether층을 분리한 뒤, 분리된 ether층을 제거하였다. 시료는 감압 농축 한 후 lithium citrate buffer 를 첨가하여 25 ml로 희석하였다. 희석 된 시료에 sulphosalicylic acid 1 g을 첨가 후 암실에 1시간 방치하여 단백질을 침전시켰다. 이후 원심분리하여 상층액을 분리한 후 0.45 µm membrane filter로 여과, 얻어진 용액을 분석시료로 사용하였다. 유리아미노산 분석은 아미노산 자동분석기를 사용하였으며 형광 검출기를 이용하는 OPA법으로 아미노산을 측정하였다. Column은 Shim-pack AMINO-Li (6.0 x100mm), buffer flow rate는 0.6 mL/min, POA reagent flow rate는 0.3mL로 설정하여 분석하였으며 형광검출기의 excitation파장은 350 nm 와 emission 파장은 450 nm를 사용하였다.

전 어체의 지방산 분석은 Folch et al. (1957)의 방법에 의해 분석되었다. 클로로포름과 메탄올을 2:1로 혼합한 후 시료에 처리하고 총 지질을 추출하여 14% BF<sub>3</sub>-methanol (Sigma, USA) 용액으로 지방산을 methylation 시켰다. 이 후 capillary column (SPTM-2560, 100 m×0.25 mm I. d., film thickness 0.20 µm, USA)이 장착된 gas chromatography (HP-6890 PLUS, Hewlett-Packard, USA)로 지방산을 분석하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였으며, Oven 온도는 140~240 °C 였으며, 온도증가 속도는 4 °C/min 였다. injector 온도는 250 °C, detector (FID) 온도는 260 °C로 설정하였고, 표준 지방산으로 37개 지방산 혼합물(PUFA 37 Component FAME Mix USA)을 사용하였다.

#### 4. 통계처리

실험 결과의 측정값(mean±SD)들은 SPSS-통계프로그램(version 23)을 이용하여 One-way ANOVA와 Duncan's multiple test (Duncan, 1955)로 유의성을 검정하였다. 데이터 값은 유의수준 5% 이내( $P<0.05$ )로 각 평균값에 대한 유의적 차이를 조사하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 잡종의 난 발생

잡종의 난 발생 과정은 Fig. 4와 같다. 수정란은 구형이며 분리 부성란으로 난황과 난막은 무색투명하다. 저온처리 후 1시간에 제 1난황이 이루어져 배반의 중앙 부위가 수직으로 나누어져 2세포기가 되었고 (Fig. 4 b), 난황이 계속되어 2시간 20분 후 4세포기(Fig. 4 c), 3시간 후 8세포기 (Fig. 3 d), 4시간 10분 후 16세포기(Fig. 4 e)가 되었다. 지속적인 난황이 일어나 수정 후 12시간에 배반엽이 형성되는 중기 포배기가 되었다(Fig. 3 f). 저온처리 후 15시간에 난황이 돛 형태 가 되고 배반엽이 얇아지기 시작하였고(Fig. 4 g), 19시간에 배환이 형성되었으며(Fig. 4 h), 21시간에 배방패가 형성되었다(Fig. 4 i). 배반엽이 식물극 방향으로 계속 확장되어 저온처리 후 30시간에 60% 피포가 형성되었고(Fig. 4 k), 44시간 30분에 90% 피포가 형성되었다(Fig. 4 l). Kupffer's vesicle은 수정 후 46시간부터 작은 크기로 관찰되기 시작하여 51시간에 최대 크기로 발생하고, 79시간 30분에 소멸하였으며(Fig. 4 m~o), Kupffer's vesicle이 소멸한 후 꼬리가 형성되기 시작하였고 발생 85시간이 경과 한 후 부화하기 시작하였다(Fig. 4 p, q).

#### 2. 종자생산

수정란 관리조에서 육란한 잡종의 수정란은 수정 후 72 시간 경과 한 뒤 종묘 생산 수조로 옮겨 사육하였다. 사육 수조는 6×6 m, 수심 1 m 의 콘크리트 수조이며, 방양 된 수정란의 양은 1,000 ml (약 80만개), 수온은 12 °C 였다. 잡종의 부화 직후 자어는 머리를 아래로 하고 중층에 정체를 하고 있어, 약한 포기를 통해 사육조 전체에 고르게 분포 할 수 있도록

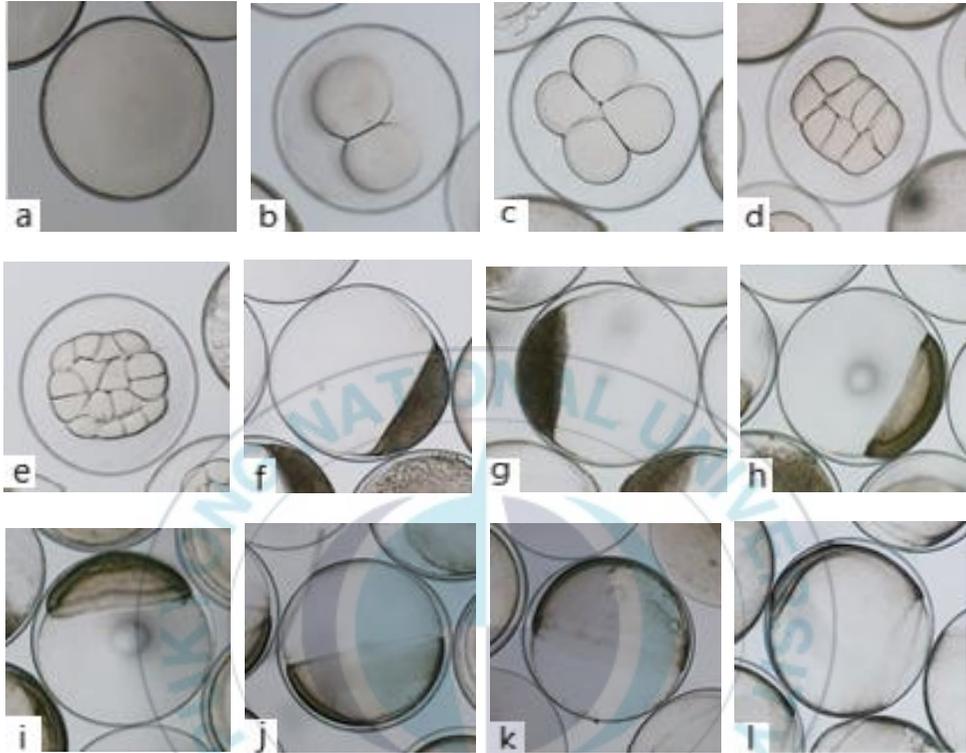


Fig. 4. External morphology of the egg development stages of the hybrid fish, and yolk-sac larvae of the hybrid, a: Blastodisc formed. b: 2 cell stage, 1 h. c: 4 cell stage, 2 h 20 min. d: 8 cell stage, 3 h. e: 16 cell stage, 4 h 10 min. f: midblastula stage, 12 h. g: 30% epiboly stage, 15 h. h: germ ring stage, 19 h. i: embryonic shield stage, 21 h. j: 40-45% epiboly stage, 25 h. k: 60% epiboly stage, 30 h. l: 90-95% epiboly stage, 44 h 30 min.



Fig. 4. continued

m: Kupffer's vesicle appearance, 46 h. n: Kupffer's vesicle stage, 51 h.  
o: Kupffer's vesicle disappearance, 79 h 30 min. p: pre-hatching, 85 h.  
q: hatched larva of hybrids . All scale bars indicate 200  $\mu$ m.

하였다. 이 시기의 자어는 난황을 에너지원으로 이용하기 때문에 별도의 먹이 공급을 필요로 하지 않는다. 부화 후 5일이 경과하면 자어는 난황을 거의 흡수하게 되고, 입이 열리며, 머리를 아래로 한 체위에서 정상 유영 체위로 변하였다. 이러한 현상과 함께 자어가 벽을 쪼는 듯한 행동을 보이면 먹이생물인 로티퍼를 공급하기 시작하였다. 이때 로티퍼 공급과 함께 별도의 가온시설을 이용하여 사육 수조 수온을 조금씩 상승시켰다. 부화 후 7일이 되면 거의 모든 개체가 로티퍼를 먹기 시작하였고, 10일이 경과되면 자어의 장이 발달되는 것을 확인 할 수 있었다. 18일 경과 시 알테미아를 공급하기 시작하였고, 첫 공급시에는 로티퍼와 3일간 혼합으로 공급하였다. 이 시기에는 자어의 축이 돌아가는 변태가 일어나기 시작하며, 변태를 마치고 저서 생활로 들어 간 개체들도 발견되기 시작하였다. 90% 이상의 개체가 변태를 완료하는 시기는 24일령 전후이며, 자어는 어미와 같은 형태를 갖춘 치어가 되었다. 35일이 경과 된 시기부터 알테미아와 함께 냉동 코페포다(아쿠아넷, 통영, 한국)를 공급하였으며, 50일령을 전후하여 배합사료(Love lavar 2호, 3호, 수협사료 침강 1호, 1s호)를 공급하였다. 이 시기에 잡종의 치어는 전장 2.0~3.0 cm 에 이르렀으며, 선별망을 이용하여 선별 후 크기별로 사육하였다. 이후 잡종의 치어는 68일 경과 시에는 3.2~4.6 cm, 85일에는 4.5~5.5 cm, 112일에는 5.5~7.8 cm로 성장하였다.

### 3. 마취

3개의 실험군간 적정 마취 농도를 구하기 위해 clove oil을 표준 마취제로 사용하여 마취에 소요되는 시간과 회복 시간을 측정한 결과, clove oil 20~80 ppm에서 잡종의 마취 시간은  $140.5 \pm 13.30$ 초(20 ppm),  $88 \pm 21.59$ 초(40 ppm) 및  $55 \pm 8.31$ 초(80 ppm)로 관찰되어 clove oil 농도가 증가될수

록 마취 시간이 단축되는 것으로 나타났다. 그러나 회복시간은 140.5~147.5초 로 농도 증가에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 ( $P>0.05$ ). 강도다리는 clove oil 80 ppm에서 104.5±9.71초에 마취가 시작되었고, 회복 시간은 220.8±27.69초이었으며, 돌가자미의 경우는 clove oil 20 ppm의 농도에서 마취 소요시간은 120.4±10.78초로 관찰되었으며, 회복에는 183.6±22.74초가 소요되었다(Table 2).

#### 4. 형태

어체 각 부위를 측정하여 전장에 대한 백분비를 나타낸 결과는 Table 3과 같다. 전장에 대한 체장의 비는 강도다리가 85.99% 잡종은 85.51% 그리고 돌가자미는 87.14% 로 세 그룹간 차이가 없었다. 전장에 대한 체고의 비는 강도다리가 48.56 % 그리고 잡종은 49.39% 로 나타났고 돌가자미는 44.74% 였다. 전장에 대한 미병장의 비는 강도다리, 잡종 그리고 돌가자미는 8.55%, 8.72%, 9.25%로 나타났다. 미병고의 비는 세 실험군 각각 9.48%, 9.59%, 10.54%였다. 전장에 대한 두장의 비는 강도다리 26.83%, 잡종 25.32% 그리고 돌가자미 22.47%로 나타나 강도다리와 잡종간에는 전장에 대한 계측형질에 있어 통계적 유의성( $P>0.05$ )이 나타나지 않아 형태적으로 동일함을 알 수 있었다(Fig. 5).

어체 각 부위를 측정하여 두장에 대한 백분비를 나타낸 결과는 Table 4 와 같다. 두장에 대한 상악장의 비는 강도다리가 31.54% 잡종은 32.85% 그리고 돌가자미는 33.70%로 세 그룹간 차이가 없었다. 두장에 대한 문장의 비는 강도다리가 21.26% 그리고 잡종은 21.16% 로 나타났고 돌가자미는 19.75%였다. 두장에 대한 양안간격의 비는 강도다리, 잡종 그리고 돌가자미는 7.43%, 9.31%, 7.19%로 나타났다. 안경에 대한 비는 세 실험군 각각 18.71%, 22.27%, 17.76%로 나타나 강도다리와 잡종 간에

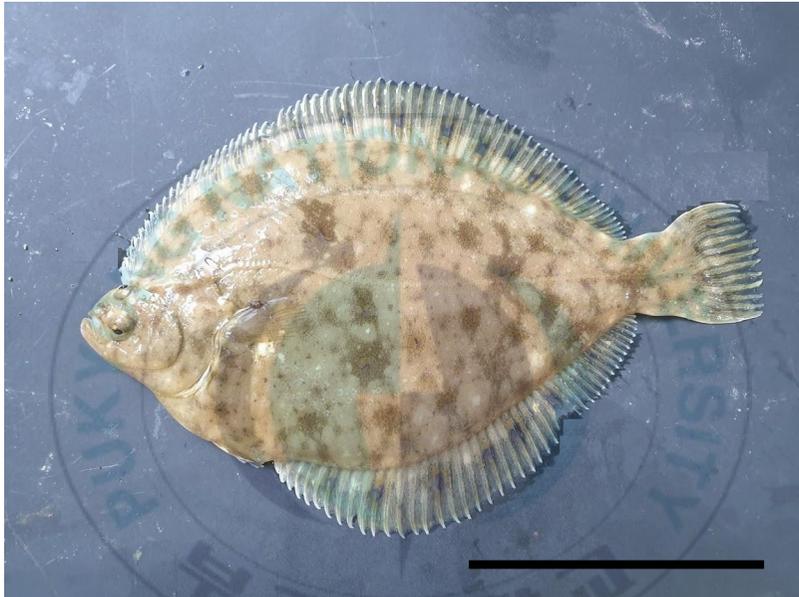


Fig. 5. Photograph of hybrid flounder (*Platichthys stellatus* ♀ × *Kareius bicoloratuschthys* ♂). Scale bar= 10 cm

Table 2. Induction and recovery times (mean±SD) in 3 experimental fishes anaesthetized with various concentrations of clove oil

Exp. group	Dose (ppm)	Induced time	Recovery time
Hybrid	20	140.5±13.30 <sup>a</sup>	147.5±15.72 <sup>a</sup>
	40	88±21.59	156.8±16.74 <sup>a</sup>
	80	55±8.31 <sup>a</sup>	140.5±30.99 <sup>a</sup>
Starry flounder	80	104.5±9.71 <sup>b</sup>	220.8±27.69 <sup>b</sup>
Stone flounder	20	120.4±10.78 <sup>a</sup>	183.6±22.74 <sup>ab</sup>

\*  $P < 0.05$

Table 3. Body proportions (mean  $\pm$  SD) of starry flounder, stone flounder and its hybrid. The data was analyzed by the percent with total length

Species	Starry flounder	Hybrid	Stone flounder
% to TL			
BL	85.99 $\pm$ 3.72 <sup>a</sup>	85.51 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>	87.14 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>
BH	48.56 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	49.39 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	44.74 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>
CL	8.55 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	8.72 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>	9.25 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>
CH	9.48 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	9.59 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	10.54 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
HL	26.83 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	25.32 $\pm$ 2.63 <sup>b</sup>	22.47 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>

\*  $P < 0.05$

Table 4. Body proportions (mean  $\pm$  SD) of starry flounder, stone flounder and its hybrid. The data was analyzed by the percent with head length.

Species	Starry flounder	Hybrid	Stone flounder
% to HL			
UL	31.54 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	32.85 $\pm$ 5.46 <sup>a</sup>	33.70 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>
SL	21.26 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	22.16 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	19.75 $\pm$ 2.25 <sup>b</sup>
IW	7.43 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	9.31 $\pm$ 2.23 <sup>a</sup>	7.18 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>
ED	18.71 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>	21.27 $\pm$ 4.35 <sup>a</sup>	17.16 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>

\*  $P < 0.05$

두장에 대한 계측형질도 통계적 유의성( $P>0.05$ )이 나타나지 않아 형태적으로 동일하였다.

## 5. 태깅

상기 형태학적 분석결과 강도다리와 잡종 간 형태적으로 구분이 어려워 태깅을 실시하였다(Fig. 6). 8~10 cm 의 어류에서 앞서 언급된 태깅 방법으로 어류에 손상을 주지 않고 태깅이 가능하였으며, 실제 성장 실험을 위해 20 g 내외의 어류 각 12마리씩을 태깅하여 2개월간 태그의 탈락율을 조사한 결과 강도다리에서 1마리만이 탈락되어 태그의 성공 유지율은 95.8% 였고, 잡종에서는 단 한 마리도 폐사하지 않아 생존율은 100%이었다.

## 6. 잡종의 세포유전학적 분석

### 6-1. 적혈구 계측

강도다리 적혈구 세포 표면적은  $38.81 \pm 4.10 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $138.74 \pm 30.01 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었다. 적혈구 핵의 표면적 및 부피는  $8.30 \pm 0.61 \mu\text{m}^2$  및  $16.42 \pm 1.80 \mu\text{m}^3$ 으로 관찰되었다(Table 5, Fig. 7). 잡종의 경우 적혈구 표면적은  $38.11 \pm 4.10 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $136.07 \pm 45.51 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었고. 적혈구 핵의 표면적 및 부피는  $8.19 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$  및  $16.08 \pm 2.45 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되었다. 돌가자미의 경우 적혈구 표면적은  $38.12 \pm 5.10 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $135.51 \pm 42.14 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었고. 적혈구 핵의 표면적 및 부피는  $8.15 \pm 0.52 \mu\text{m}^2$  및  $16.01 \pm 3.12 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되었다.

### 6-2. DNA 함량 분석

넙치의 혈구세포를 대조군으로 하여 강도다리, 잡종과 돌가자미의



Fig. 6. External morphology of tagged fish. a, b: hybrids. c, d: starry flounder.

Table 5. Erythrocyte measurement (mean  $\pm$  SD) of 3 experimental groups

	Starry flounder	Hybrid	Stone flounder
Cell			
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	38.81 $\pm$ 4.10 <sup>a</sup>	38.11 $\pm$ 4.30 <sup>a</sup>	38.12 $\pm$ 5.10 <sup>a</sup>
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	138.74 $\pm$ 30.01 <sup>ab</sup>	136.07 $\pm$ 45.51 <sup>a</sup>	135.51 $\pm$ 42.14 <sup>a</sup>
Nucleus			
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	8.30 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	8.19 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	8.15 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	16.42 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	16.08 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>	16.01 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>

\*  $P < 0.05$

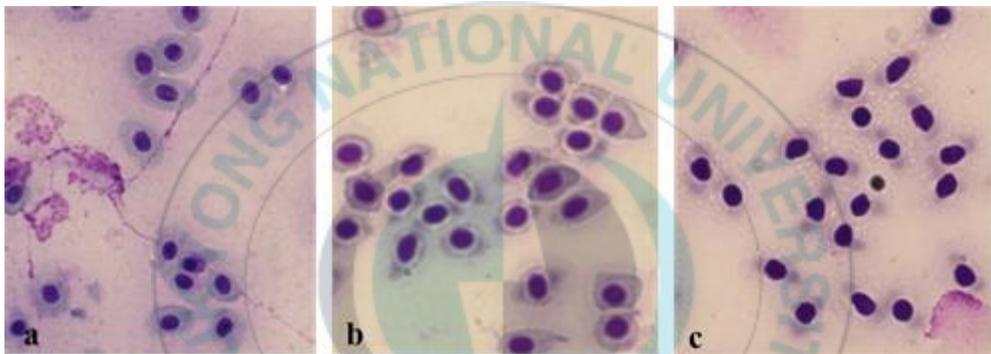


Fig. 7. Photographs of erythrocytes cell of 3 experimental groups. a: starry flounder, b: hybrid flounder, c: stone flounder.

DNA 함량을 측정된 결과, 강도다리와 돌가자미 모두 0.66 pg/haploid cell로 확인되었고, 분석된 잡종 3미 모두 역시 0.66 pg/haploid cell이었다 (Table 6. Fig. 8).

### 6-3. 염색체 수 및 핵형 분석

잡종의 중기분열상을 분석한 결과, 암컷과 수컷 모두 염색체 수는  $2n=48$ 이었고 핵형은 acrocentric chromosome 24쌍으로 구성되어 있어 암·수간 염색체수 및 핵형간의 차이는 없었으며, 개체 간 및 세포 간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다(Table 7, Fig. 9). 또한 silver staining 을 통해 nuclear organizer region (NOR's)을 분석한 결과 가장 작은 1쌍의 acrocentric 염색체에 nuclear organizer region (NOR's)이 존재하였다 (Fig. 10).

## 7. 산업적 분석

### 7-1. 성장, 비만도 및 사료효율

강도다리, 돌가자미와 잡종의 치어를 60일간 사육 한 후 측정된 증체량, 사료효율, 사료계수, 비만도의 결과는 Table 8.에 나타내었다. 실험기간 중 모든 실험구에서 폐사가 일어나지 않아 생존율은 100 %였다. 일간 성장율에 있어서는 강도다리와 잡종간에는 유의한 차이가 없었고, 돌가자미는  $0.28 \pm 0.04\%$ 로 높은 값을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 사료효율은 강도다리가  $84.7 \pm 9.4\%$ , 돌가자미가  $78.2 \pm 5.7\%$ 로 강도다리가 높게 측정되었으며, 잡종은  $80.2 \pm 6.6\%$ 로 강도다리와 돌가자미 각각의 사료효율값에 유의적 차이는 없었다. 사료계수는 강도다리는  $1.1 \pm 0.0$ , 돌가자미는  $1.2 \pm 0.1$  와 잡종  $1.1 \pm 0.1$ 으로 측정되었으며, 비만도의 경우 강도다리는  $1.5 \pm 0.0$ , 돌가자미는  $1.4 \pm 0.1$  그리고 잡종은  $1.5 \pm 0.1$  의 값을 나타내었다.

Table. 6. DNA contents measurement of 3 experimental groups

Genotype & fish ID	DNA channel of main peak			DNA content (pg/cell)		
	Mean	Median	CV	Based on the mean value	Based on the median value	
Starry flounder	1	13035.49	12939	7.95	0.65	0.65
	2	13073.22	12996	7.97	0.65	0.65
	3	13043.33	12982	7.61	0.65	0.65
	4	13422.11	13309	9.56	0.67	0.67
	5	13332.26	13272	6.66	0.67	0.67
	Mean	13181.28	13099.60	7.95	0.66	0.66
SD	162.95	157.43	0.94	0.01	0.01	
Hybrid	1	12902.18	12765	10.68	0.65	0.64
	2	13188.89	13064	9.1	0.66	0.66
	3	13116.03	12999	15.81	0.66	0.65
	Mean	13069.03	12942.67	11.86	0.66	0.66
	SD	149.02	157.26	3.50	0.01	0.01
Stone flounder	1	12582.09	12514	7.7	0.63	0.63
	2	13533.98	13460	8.22	0.68	0.68
	3	13463.24	13377	8.82	0.67	0.67
	Mean	13193.10	13117.00	8.24	0.66	0.66
	SD	530.33	523.86	0.56	0.02	0.02

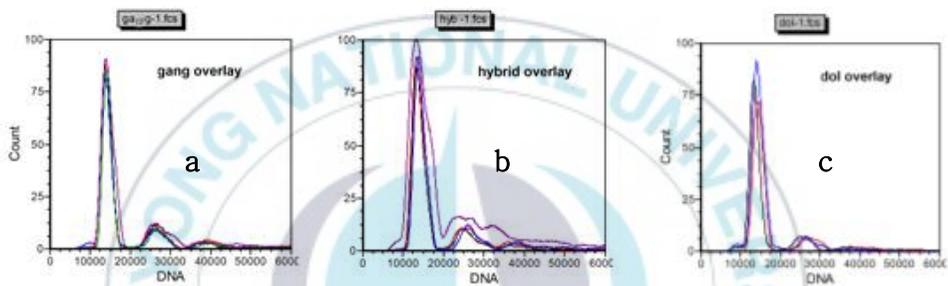


Fig. 8. Flow cytometric histograms for DNA content of starry flounder (a), hybrid (b) and stone flounder (c).

Table 7. Chromosome counts of hybrid fish between female starry flounder and male stone flounder

Fish No.	sex	Frequency of chromosome count				
		46	47	48	49	50
1	♂	1	8	37	1	
2	♂		3	16		
3	♀		4	28		
4	♀		2	21		
5	♂	1	2	11	1	
6	♀	1	6	40	3	1



Fig. 9. Metaphase of female and male starry flounder and hybrid female and male. a: starry flounder ♀, b: starry flounder ♂, c: hybrid ♀, d: hybrid ♂.

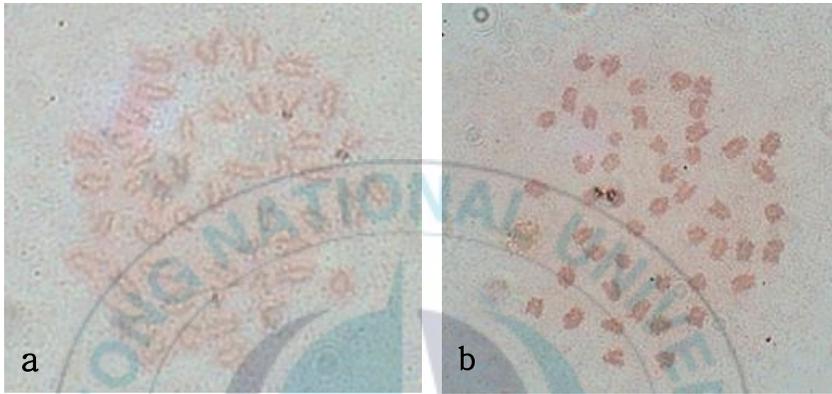


Fig. 10. Silver-stained metaphases of female (a) and male hybrid (b) between starry flounder and stone flounder.

Table 8. Early growth comparisons of weight gain and condition factor of starry flounder, stone flounder and its hybrid (mean  $\pm$  SD)

	Starry flounder	Stone flounder	Hybrid
Initial mean body weight (g/fish)	14.6 $\pm$ 0.6	15.8 $\pm$ 0.7	13.5 $\pm$ 0.4
Final mean body weight (g/fish)	32.6 $\pm$ 2.0	41.4 $\pm$ 4.2	37.1 $\pm$ 2.4
Weight gain (g/fish)	18.0 $\pm$ 2.2	25.6 $\pm$ 4.3	23.6 $\pm$ 2.4
Specific growth rate (%)	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Feed efficiency (%)	84.7 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>	78.2 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	80.2 $\pm$ 6.6 <sup>ab</sup>
Feed intake	1.1 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
Condition factor	1.5 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1

Weight gain: final body weight–initial body weight

Specific growth rate: [(final body weight)–(initial body weight)] $\times$ 100/days reared

Feed efficiency: (wet weight gain/feed intake) $\times$ 100

Feed intake:: feed intake/wet weight gain

Condition factor: (body wt./total length<sup>3</sup>) $\times$ 100

Values (mean $\pm$ SE of three replications) in each row with a different superscript are significantly different ( $P$ <0.05).

8개월간 사육한 강도다리와 잡종의 성장과 비만도는 Table 9와 같다. 두 실험군에서 각각 무작위로 16마리씩 선별하여 측정된 결과 강도다리의 평균 어체중량은  $193.0 \pm 47.4$  g이었으며, 잡종은  $222.2 \pm 44.7$  g으로 잡종이 강도다리에 비해 15.1% 높게 측정되었다. 비만도는 강도다리가  $1.99 \pm 0.22$ , 잡종이  $2.23 \pm 0.31$ 으로 잡종이 강도다리에 비해 12.0% 높은 값을 보였다.

### 7-2. 질병내성

4개월령의 어류에 대하여 scuticocidal activity를 총 3회에 걸쳐 분석한 결과 강도다리가 제일 큰 내성을 가져 12배에서 15배의 희석 샘플까지도 scuticocidal activity를 보여주었다. 그러나 돌가자미의 경우 3~12배의 희석 샘플까지만 scuticocidal activity가 나타나 강도다리에 비하여 매우 낮은 활성을 가지고 있었다. 본 연구에서 유도된 잡종의 경우 9에서 15배의 희석 농도에서 scuticocidal activity를 보여 두 종간의 평균값보다 높은 10.7배의 희석 농도에서 활성을 나타내었다(Fig. 11).

### 7-3. 기아내성

강도다리와 잡종어에 반복으로 먹이를 공급한 후, 24 시간까지 두 실험군간 세포주기를 분석한 결과 먹이공급 8시간까지는  $\frac{G_1}{G_2+M}$ 에서 두 실험군 간 세포주기에 차이가 나타나지 않았으나 이후 12시간부터는 강도다리의 세포주기가 빨라짐을 알 수 있었다.  $\frac{S}{G_2+M}$ 에 있어 먹이공급 초기에는 잡종군의 DNA 합성 능력이 대조군보다 약 20% 높았으나 12시간 이후에는 약 20% 정도 늦어짐이 관찰 되었다(Table 10). 이후 실험군을 굶기며 2일부터 2주간까지의 세포주기를 통한  $\frac{G_1}{G_2+M}$  을 분석한 결과 최초 먹이 공급 후 12일까지는 강도다리의 세포주기가 가자미류에 비해 빠르게 진전됨이 관찰 되었으나 이후 14일째부터는 잡종의 세포주기가

Table 9. Comparison of body weight and condition factor between starry flounder and hybrid flounder (mean  $\pm$  SD)

	Starry flounder (g)	Hybrid (g)	Hybrid / Sf
Growth (W)	193.0 $\pm$ 47.4	222.2 $\pm$ 44.7	15.1% up
C. f.	1.99 $\pm$ 0.22	2.23 $\pm$ 0.31	12.0% up

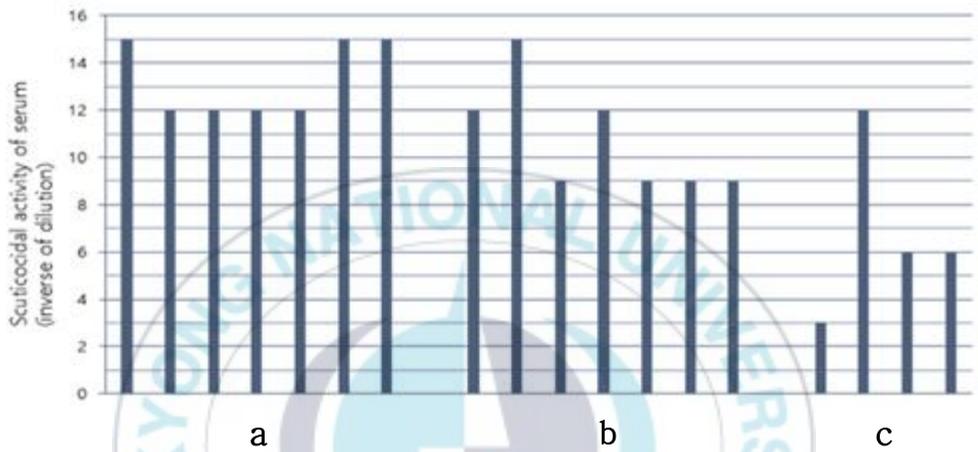


Fig. 11. Scuticocidal activity of sera collected from starry flounder (a), hybrid (b) and stone flounder (c).

Table 10. Comparison of DNA synthesis ability by flow cytometric cell cycle analysis of two experimental groups after feeding

Time (h)	$\frac{G_1}{G_2 + M}$	$\frac{S}{G_2 + M}$
	Starry flounder / Hybrid	Starry flounder / Hybrid
0	0.98±0.18	0.80±0.13
4	1.01±0.18	0.83±0.10
8	1.0±0.04	0.78±0.04
12	1.46±0.91	1.23±0.41
24	1.49±0.16	1.14±0.11

\*Values are mean±SD of replicate groups.

빨라짐을 보였다.  $\frac{S}{G_2+M}$ 에 있어서도 G1 stage에 도달하는 세포주기의 속도와 동일한 양상을 보였주었다. 강도다리와 잡종어에 반복으로 먹이를 공급하고 이후 굶기며 2일부터 2주간까지의 세포주기를 통한  $\frac{G_1}{G_2+M}$ 을 분석 한 결과 최초 먹이 공급 후 12일까지는 강도다리의 세포주기가 가자미류에 비해 빠르게 진전됨이 관찰 되었으나 이후 14일째부터는 잡종의 세포주기가 빨라짐을 보였다.  $\frac{S}{G_2+M}$ 에 있어서도 G1 stage에 도달하는 세포주기의 속도와 동일한 양상을 보여주었다(Table 11).

#### 7-4. 담수 적응력

염분도를 35 psu에서 2.5 psu까지 점진적으로 낮추며 강도다리와 잡종 간의 생존율을 분석한 결과, 각 실험군에서 한 마리씩만 폐사하여, 점진적으로 염분도를 낮출 경우 잡종은 강도다리와 마찬가지로 저염분에 매우 강한 것으로 나타났다(Table 12). 그러나 어체를 2주간 굶긴 후 담수 처리를 하였을 경우 잡종군에서는 처리 3일 후부터 급격하게 사망률이 증가하여 5일 후에는 모든 실험군이 폐사하였다(Table 13). 이때 폐사 한 모든 어류는 지느러미에 출혈이 나타나고, 점액질이 모두 다 탈락되는 현상을 보여주었다(Fig. 12).

#### 7-5. 프로락틴(Prolactin) 유전자 분석

강도다리, 돌가자미 그리고 잡종의 꼬리지느러미 조직을 이용한 PRL 유전자의 gDNA 분석 결과는 Fig. 13과 같다. PRL gene에서 Deg-F, Deg-R primer를 사용하여 gDNA 염기서열을 분석한 결과 강도다리, 돌가자미, 잡종의 Intron 영역을 확인하였다. 강도다리는 2가지 형태의 gDNA(796/844bp)가 확인되며, 돌가자미도 gDNA상에서 2타입(970bp/

Table 11. Comparison of DNA synthesis ability by flow cytometric cell cycle analysis of two experimental groups after starvation

Time (Day)	$\frac{G_1}{G_2+M}$		$\frac{S}{G_2+M}$	
	Starry flounder	Hybrid	Starry flounder	Hybrid
2	1.28±0.02		1.19±0.02	
5	1.09±0.21		1.24±0.07	
7	1.12±0.24		1.13±0.16	
12	1.17±0.11		1.06±0.11	
14	0.56±0.02		0.73±0.08	

\*Values are mean±SD

Table 12. Number of dead fish in 2 experimental groups cultured at various concentrations of salt water

Exp. group	Salinity (‰)					
	35	30	25	15	5	2.5
Starry flounder	0	0	1	0	0	0
Hybrid	0	0	0	0	1	0

Table 13. Number of dead fish in 2 experimental groups cultured at fresh water after starvation for 2 weeks

Exp. group	Day					
	0	1	2	3	4	5
Starry flounder	0	0	0	0	1	0
Hybrid	0	1	1	9	8	5



Fig. 12. External morphology of death hybrid fish treated with freshwater after starvation for 2 weeks.

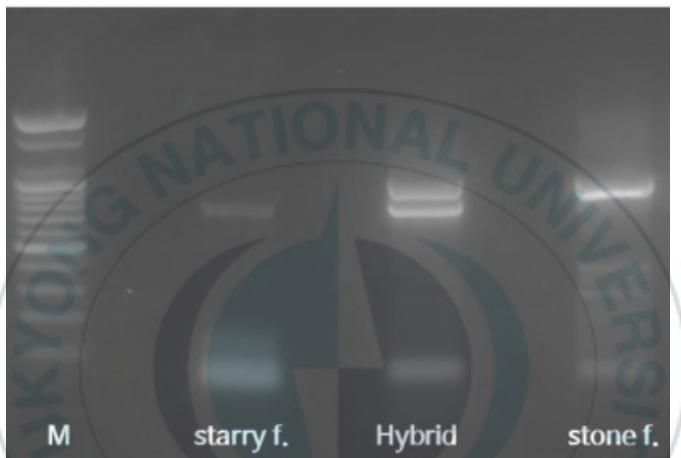


Fig. 13. Electrophoretic patterns of prolactin genomic DNA of starry flounder, stone flounder and its hybrid.

995 bp)으로 확인되었다. PRL 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭한 결과 강도다리와 돌가자미는 각기 하나의 증폭된 밴드를 보이나 잡종의 PRL 유전자는 각 부모에서 유래된 두 개의 밴드를 함께 보여주었다. 잡종 gDNA는 2가지 형태로 각각 강도다리, 돌가자미에서 유래한 것으로 보이나 강도다리(844bp)와 잡종 II(844bp)는 일치하였고, 돌가자미와 잡종 I은 Intron 영역에서 50 bp의 차이를 보였다(Fig. 14).

각 어종에서 실제 발현하는 PRL 유전자를 확인하기 위하여 뇌하수체 조직으로부터 RNA 분리 후 cDNA를 합성하였다. cDNA는 PRLF, PRLR 1개의 세트, Deg-F, Deg-R을 각각 1개의 세트로 염기서열을 분석하였다. PRL cDNA Full sequence의 285번째 염기서열이 돌가자미는 GCT이며 강도다리(GCC)와 잡종(GCC)은 일치하였지만 아미노산 상의 변화(Alanine=GCN)는 없었다(Fig. 15, Fig. 16).

돌가자미 및 잡종의 PRL 유전자의 조직특이적 발현양상을 조사하기 위하여 근육, 비장, 장, 신장, 심장, 생식소, 아가미, 뇌 조직에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PRL 유전자에 특이적인 primer를 이용한 증폭결과 (Fig. 17)는 두 어종 모두 뇌하수체를 포함한 뇌 조직에서만 특이적으로 발현하는 것으로 나타났으며, 그 외 다른 조직에서는 발현하지 않았다.

염분조절 구간에 따른 PRL 유전자의 발현을 확인하기 위하여 qPCR을 시행하였다. 저염분 노출 시 PRL 발현량은 강도다리는 32 psu에서는 거의 검출이 되지 않았으며, 18 psu와 6 psu에서 낮게 발현 되었다. 돌가자미는 모두 구간에서 발현량이 상대적으로 높게 나타났으며, 잡종은 32 psu와 18 psu에서는 발현량이 상대적으로 낮았으나, 6 psu에서는 발현량이 높게 변화하였다(Fig. 18).

```

2 ATGACTCAGAGGAAACAGACTCTTCATCATGGCTGCCGTGGTGTCTCTATGTGATGACA
3 ATGACTCAGAGGAAACAGACTCTTCATCATGGCTGCCGTGGTGTCTCTATGTGATGACA
5 ATGACTCAGAGGAAACAGACTCTTCATCATGGCTGCCGTGGTGTCTCTATGTGATGACA
1 ATGACTCAGAGGAAACAGACTCTTCATCATGGCTGCCGTGGTGTCTCTATGTGATGACA
4 ATGACTCAGAGGAAACAGACTCTTCATCATGGCTGCCGTGGTGTCTCTATGTGATGACA
.....
2 TCATGCGGCGCCGTCCCCATCAACGACCTGTTGGACCGAGCGTCAACGCGCTCAGACAAA
3 TCATGCGGCGCCGTCCCCATCAACGACCTGTTGGACCGAGCGTCAACGCGCTCAGACAAA
5 TCATGCGGCGCCGTCCCCATCAACGACCTGTTGGACCGAGCGTCAACGCGCTCAGACAAA
1 TCATGCGGCGCCGTCCCCATCAACGACCTGTTGGACCGAGCGTCAACGCGCTCAGACAAA
4 TCATGCGGCGCCGTCCCCATCAACGACCTGTTGGACCGAGCGTCAACGCGCTCAGACAAA
.....
2 CTGCACTCGCTCAGCACCACTCAGCCAGGAGCTGGACTCTCACTTCCCTCCGATTGGT
3 CTGCACTCGCTCAGCACCACTCAGCCAGGAGCTGGACTCTCACTTCCCTCCGATTGGT
5 CTGCACTCGCTCAGCACCACTCAGCCAGGAGCTGGACTCTCACTTCCCTCCGATTGGT
1 CTGCACTCGCTCAGCACCACTCAGCCAGGAGCTGGACTCTCACTTCCCTCCGATTGGT
4 CTGCACTCGCTCAGCACCACTCAGCCAGGAGCTGGACTCTCACTTCCCTCCGATTGGT
.....
2 CGGCTGATGTTGCCCCGCCCTCGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAAGCAGCCACTGAC
3 CGGCTGATGTTGCCCCGCCCTCGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAAGCAGCCACTGAC
5 CGGCTGATGTTGCCCCGCCCTCGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAAGCAGCCACTGAC
1 CGGCTGATGTTGCCCCGCCCTCGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAAGCAGCCACTGAC
4 CGGCTGATGTTGCCCCGCCCTCGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAAGCAGCCACTGAC
.....
2 AAGACACAAGCTCTTCAAGTATCAGAGTCCGACCTGCTGTCTCTGGGCTGCTCTGCTC
3 AAGACACAAGCTCTTCAAGTATCAGAGTCCGACCTGCTGTCTCTGGGCTGCTCTGCTC
5 AAGACACAAGCTCTTCAAGTATCAGAGTCCGACCTGCTGTCTCTGGGCTGCTCTGCTC
1 AAGACACAAGCTCTTCAAGTATCAGAGTCCGACCTGCTGTCTCTGGGCTGCTCTGCTC
4 AAGACACAAGCTCTTCAAGTATCAGAGTCCGACCTGCTGTCTCTGGGCTGCTCTGCTC
.....
2 CAGGCTGGGACGACCCCTGTCCGTCCTGTCTCTCCGCTCTCTCTGCTCAACCG
3 CAGGCTGGGACGACCCCTGTCCGTCCTGTCTCTCCGCTCTCTCTGCTCAACCG
5 CAGGCTGGGACGACCCCTGTCCGTCCTGTCTCTCCGCTCTCTCTGCTCAACCG
1 CAGGCTGGGACGACCCCTGTCCGTCCTGTCTCTCCGCTCTCTCTGCTCAACCG
4 CAGGCTGGGACGACCCCTGTCCGTCCTGTCTCTCCGCTCTCTCTGCTCAACCG
.....
2 GCTCAGAGCAGCATCTTCAACAAGGTGCGCGAGCTGAGGAGCACTCCAAGAACTGTGG
3 GCTCAGAGCAGCATCTTCAACAAGGTGCGCGAGCTGAGGAGCACTCCAAGAACTGTGG
5 GCTCAGAGCAGCATCTTCAACAAGGTGCGCGAGCTGAGGAGCACTCCAAGAACTGTGG
1 GCTCAGAGCAGCATCTTCAACAAGGTGCGCGAGCTGAGGAGCACTCCAAGAACTGTGG
4 GCTCAGAGCAGCATCTTCAACAAGGTGCGCGAGCTGAGGAGCACTCCAAGAACTGTGG
.....
2 GACGBCCTGSAAGTCTCTCTGGGAAGTGGGTGACGCGGATCAGACCCCTCCCTCTG
3 GACGBCCTGSAAGTCTCTCTGGGAAGTGGGTGACGCGGATCAGACCCCTCCCTCTG
5 GACGBCCTGSAAGTCTCTCTGGGAAGTGGGTGACGCGGATCAGACCCCTCCCTCTG
1 GACGBCCTGSAAGTCTCTCTGGGAAGTGGGTGACGCGGATCAGACCCCTCCCTCTG
4 GACGBCCTGSAAGTCTCTCTGGGAAGTGGGTGACGCGGATCAGACCCCTCCCTCTG
.....
2 CCCTACAGAGGCAACGACCTCGGCCAGGACAGGATCTCCAACCTGATCGACTTCCACTTC
3 CCCTACAGAGGCAACGACCTCGGCCAGGACAGGATCTCCAACCTGATCGACTTCCACTTC
5 CCCTACAGAGGCAACGACCTCGGCCAGGACAGGATCTCCAACCTGATCGACTTCCACTTC
1 CCCTACAGAGGCAACGACCTCGGCCAGGACAGGATCTCCAACCTGATCGACTTCCACTTC
4 CCCTACAGAGGCAACGACCTCGGCCAGGACAGGATCTCCAACCTGATCGACTTCCACTTC
.....
2 CTGTTGTCTGCTTCCGACGGGACTCGCAACAAGTGCAGACTTCTGAAAGTCTGCGC
3 CTGTTGTCTGCTTCCGACGGGACTCGCAACAAGTGCAGACTTCTGAAAGTCTGCGC
5 CTGTTGTCTGCTTCCGACGGGACTCGCAACAAGTGCAGACTTCTGAAAGTCTGCGC
1 CTGTTGTCTGCTTCCGACGGGACTCGCAACAAGTGCAGACTTCTGAAAGTCTGCGC
4 CTGTTGTCTGCTTCCGACGGGACTCGCAACAAGTGCAGACTTCTGAAAGTCTGCGC
.....
2 TGC096GCTACGAAACACACAGCTGAGACGTGCTGA
3 TGC096GCTACGAAACACACAGCTGAGACGTGCTGA
5 TGC096GCTACGAAACACACAGCTGAGACGTGCTGA
1 TGC096GCTACGAAACACACAGCTGAGACGTGCTGA
4 TGC096GCTACGAAACACACAGCTGAGACGTGCTGA
.....

```

Fig. 14. Multiple alignment of coding sequences of PRL gene in starry flounder (1), stone flounder (2 & 3), and hybrid (4 & 5). Prolactin sequences were aligned by using Clustal W. Identical nucleotide sequence among PRL genes was indicated by red box.

ATG	ACT	CAC	AGG	AGA	ACC	AGA	CTC	TTC	ATC	ATG	GCT	GCC	GTG	GTG	TCC	TAT	GTG	ATG	ACA		
<b>M</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>I</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>T</b>		20
TCA	TGC	GGC	GCC	GTC	CCC	ATC	AAC	GAC	CTG	TTG	GAC	CGA	GCG	TCA	CAG	CGC	TCA	GAC	AAA		
<b>S</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>K</b>		40
CTG	CAC	TCG	CTC	AGC	ACC	ACA	CTC	AGC	CAG	GAG	CTG	GAC	TCT	CAC	TTC	CCT	CCG	ATT	GGT		
<b>L</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>G</b>		60
CGG	CTG	ATG	TTG	CCC	CGC	CCC	TCG	ATG	TGC	CAC	ACC	TCC	GCT	CTG	CAG	ACG	CCC	ACT	GAC		
<b>R</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>T</b>	<b>D</b>		80
AAG	ACA	CAA	GCT	CTT	CAA	GTA	TCA	GAG	TCC	GAC	CTA	CTG	TCC	CTG	GCC	CGC	TCT	CTG	CTC		
<b>K</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>L</b>		100
CAG	GCC	TGG	GAC	GAC	CCC	CTG	TCC	GTC	CTG	TCC	TCC	TCG	GCC	TTC	TCT	CTG	CCT	CAC	CCG		
<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>H</b>	<b>P</b>			120
GCT	CAG	AGC	AGC	ATC	TTC	AAC	AAG	GTG	CGC	GAG	CTG	CAG	GAG	CAC	TCC	AAG	AAC	CTG	TGG		
<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>W</b>		140
GAC	GGC	CTG	GAC	GTC	CTC	TCT	GGG	AAG	ATG	GGT	GCA	GCG	GAT	CAG	ACC	CTC	TCC	TTC	CTG		
<b>D</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>L</b>		160
CCC	TAC	AGA	GGC	AAC	GAC	CTC	GGC	CAG	GAC	AGG	ATC	TCC	AAC	CTG	ATC	GAC	TTC	CAC	TTC		
<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>F</b>		180
CTG	TTG	TCC	TGC	TTC	CGA	CGG	GAC	TCG	CAC	AAG	ATC	GAC	AGC	TTC	CTG	AAG	GTC	CTG	CGC		
<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>		200
TGC	CGG	GCT	ACG	AAC	ACA	CAG	CCT	GAG	ACG	TGC	TGA										
<b>C</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>*</b>										220

Fig. 15. Coding sequences of the gene encoding prolactin of hybrid between starry flounder and stone flounder. Coding regions in the exons are shown and the corresponding amino acid sequences are indicated as bold characters. Sequence that differ from other species are indicated in a square box.

ATG	ACT	CAC	AGG	AGA	ACC	AGA	CTC	TTC	ATC	ATG	GCT	GCC	GTG	GTG	TCC	TAT	GTG	ATG	ACA		
<b>M</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>I</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	20	
TCA	TGC	GGC	GCC	GTC	CCC	ATC	AAC	GAC	CTG	TIG	GAC	CGA	GCG	TCA	CAG	CGC	TCA	GAC	AAA		
<b>S</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	40	
CTG	CAC	TCG	CTC	AGC	ACC	ACA	CTC	AGC	CAG	GAG	CTG	GAC	TCT	CAC	TTC	CCT	CCG	ATT	GGT		
<b>L</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	60	
CGG	CTG	ATG	TTG	CCC	CGC	CCC	TCG	ATG	TGC	CAC	ACC	TCC	GCT	CTG	CAG	ACG	CCC	ACT	GAC		
<b>R</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	80	
AAG	ACA	CAA	GCT	CTT	CAA	GTA	TCA	GAG	TCC	GAC	CTG	CTG	TCC	CTG	GCT	CGC	TCT	CTG	CTC		
<b>K</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	100	
CAG	GCC	TGG	GAC	AAC	CCC	CTG	TCC	GTC	CTG	TCC	TCC	TCG	GCC	TTC	TCT	CTG	CCT	CAC	CCG		
<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>H</b>	<b>P</b>	120		
GCT	CAG	AGC	AGC	ATC	TTC	AAC	AAG	GTG	CGC	GAG	CTG	CAG	GAG	CAC	TCC	AAG	AAC	CTG	TGG		
<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	140	
GAC	GGC	CTG	GAC	GTC	CTC	TCT	GGG	AAG	ATG	GGT	GCA	GCG	GAT	CAG	ACC	CTC	TCC	TTC	CTG		
<b>D</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	160	
CCC	TAC	AGA	GGC	AAC	GAC	CTC	GGC	CAG	GAC	AGG	ATC	TCC	AAC	CTG	ATC	GAC	TTC	CAC	TTC		
<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	180	
CTG	TTG	TCC	TGC	TTC	CGA	CGG	GAC	TCG	CAC	AAG	ATC	GAC	AGC	TTC	CTG	AAG	GTC	CTG	CGC		
<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	200	
TGC	CGG	GCT	ACG	AAC	ACA	CAG	CCT	GAG	ACG	TGC	TGA										
<b>C</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>*</b>									220	

Fig. 16. Coding sequences of the gene encoding prolactin of stone flounder. Coding regions in the exons are shown and the corresponding amino acid sequences are indicated as bold characters. Sequence that differ from other species are indicated in a square box.



Fig. 17. Tissue-specific expression of prolactin gene in the hybrid and stone flounder analyzed by reverse transcription (RT)-PCR. RT-PCR was carried out with cDNA prepared by using total RNA isolated from muscle (M), spleen (S), intestine (I), kidney (K), heart (H), gonad (Gn), gill (Gi), brain (B) as indicated.

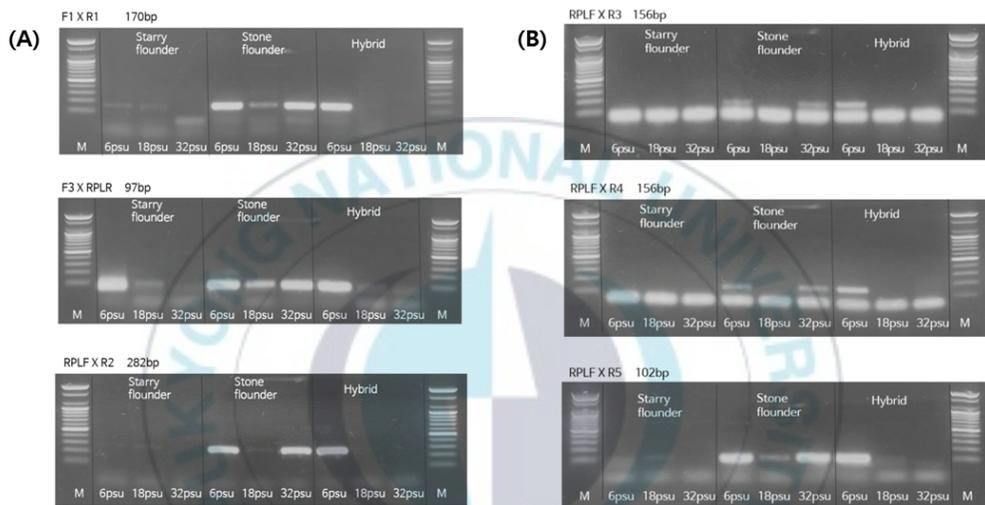


Fig. 18. Analysis of relative expression level of prolactin in starry flounder, stone flounder and its hybrid. (A) PCR primers used are F1  $\times$  R1 170bp, F3  $\times$  RPLR 97bp and RPLF  $\times$  R2 282bp. (B) PCR primers used are RPLF  $\times$  R3 156bp, RPLF  $\times$  R4 156bp and RPLF  $\times$  R5 102 bp.

#### 7-6. 생식소 성숙

강도다리와 잡종에 대하여 난소조직을 분석한 결과는 Fig. 19와 같았다. 강도다리 암컷의 경우, 전장 8~10cm 생식소에서 제 1 성장기의 난모세포들이 관찰되었다. 또한 동일시기의 잡종에서도 강도다리와 마찬가지로 제 1 난모세포가 관찰되었다.

강도다리와 잡종의 수컷의 경우에 있어서, Fig. 19에서 보듯이 전장 8~10 cm 의 생식소에서 감수분열이 나타나는 것이 관찰되어 잡종은 암수 모두 발생 초기에 감수분열이 진행되어 생식 능력이 있는 것으로 나타났다.

18개월령의 성숙 된 잡종 암수 개체를 해부하여, 생식소의 성숙 여부를 관찰한 결과는 Fig. 20과 같다. Fig. 20에서 보듯이 암수 모두 생식소내에서 잘 성숙 된 난과 정자가 있는 것으로 판단 되었다. 이에 이들의 압착 표본을 만들어 현미경으로 관찰한 바 난황물질이 잘 축적 된 난자와 움직이는 정자가 관찰되었다.

#### 7-7. 어체 성분 분석

11개월령인 강도다리와 잡종의 전어체 일반성분 분석 결과는 Table 14 에 나타내었다. 수분 함량, 조단백질 그리고 조회분에는 유의적인 차이가 없었으나( $P>0.05$ ), 조지질의 경우에는 강도다리가  $3.60 \pm 0.205^b$ , 잡종이  $5.56 \pm 0.130^a$ 의 값을 보이며 잡종이 높은 결과를 보였다( $P<0.05$ ). 총 31개 항목의 유리 아미노산을 분석한 결과 강도다리와 잡종에 있어 전체적으로 큰 차이를 보이지 않았지만 L-valine의 경우 강도다리가 잡종보다 높은 값을 보였고( $P<0.05$ )(Table 15), 지방산이 경우도 25개의 분석 항목 전체적으로 유의적인 차이가 없었다(Table 16).

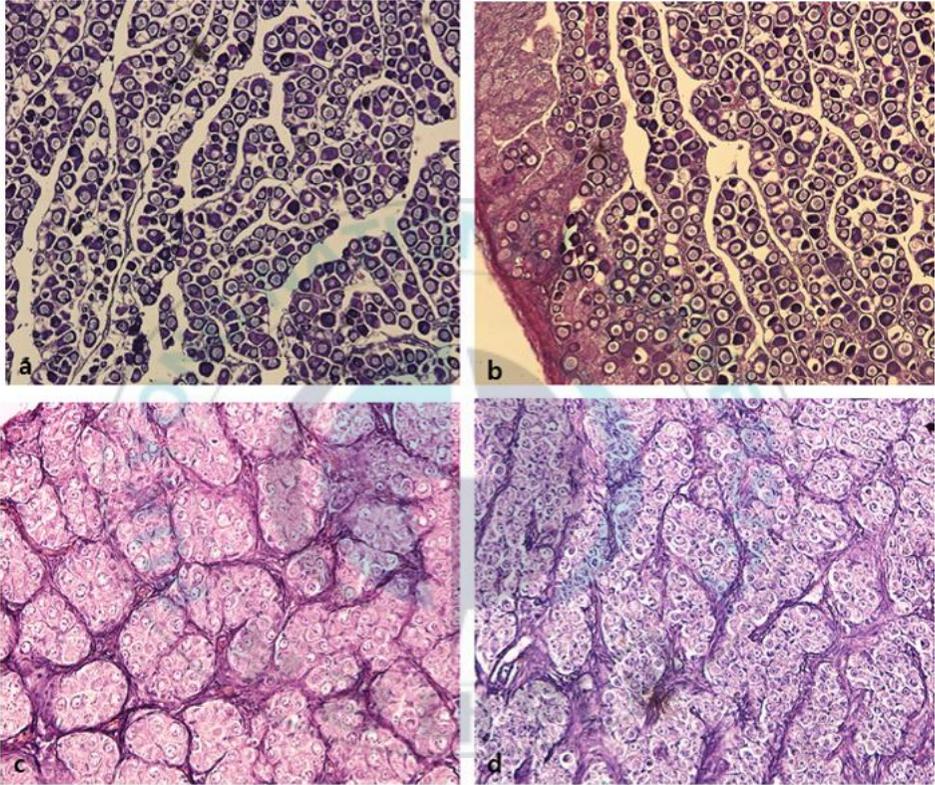


Fig. 19. Transverse sections of gonads of starry flounder (a: female, c: male) and hybrid fish (b: female, d: male).

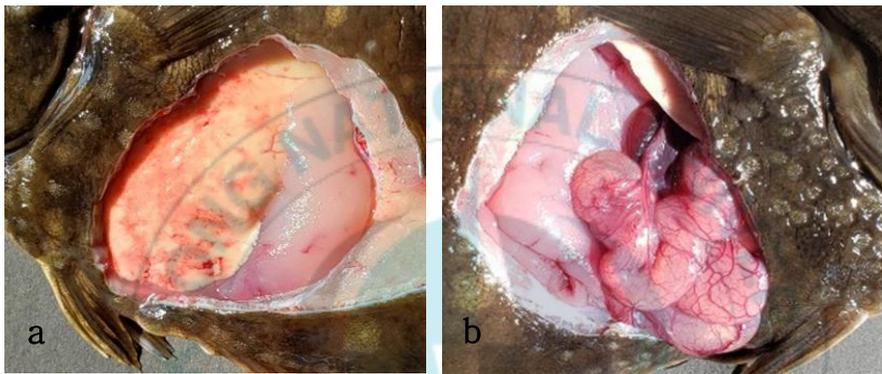


Fig. 20. External morphology of gonad with 19-month-old hybrid fish (a; female, b; male).

Table 14. Whole-body proximate composition(%) analysis of starry flounder and hybrid fish (mean±SD)

	Starry flounder	Hybrid
Moisture	73.78 ± 0.385 <sup>a</sup>	74.33 ± 0.825 <sup>a</sup>
Crude protein	19.10 ± 0.165 <sup>a</sup>	18.54 ± 0.735 <sup>a</sup>
Crude lipid	3.60 ± 0.205 <sup>b</sup>	5.56 ± 0.130 <sup>a</sup>
Crude ash	1.39 ± 0.025 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.060 <sup>a</sup>

\*Values with different superscripts in the same row are significantly different.

Table 15. Total fatty acid composition of starry flounder and hybrid fish (% of total fatty acids)

	Starry flounder	Hybrid
Lauric acid C12:0	0.115 ± 0.0050 <sup>a</sup>	0.055 ± 0.0550 <sup>a</sup>
Myristic acid C14:0	11.205 ± 0.0050 <sup>a</sup>	11.295 ± 0.1850 <sup>a</sup>
Pentadecanoic acid C15:0	0.550 ± 0.0100 <sup>a</sup>	0.565 ± 0.0050 <sup>a</sup>
Palmitic acid C16:0	42.625 ± 0.0650 <sup>a</sup>	43.080 ± 1.7000 <sup>a</sup>
decanoic acid C17:0	0.265 ± 0.0250 <sup>a</sup>	0.275 ± 0.0050 <sup>a</sup>
Stearic acid C18:0	3.650 ± 0.0000 <sup>a</sup>	3.585 ± 0.2350 <sup>a</sup>
Arachidic acid C20:0	0.165 ± 0.0050 <sup>a</sup>	0.180 ± 0.0200 <sup>a</sup>
Behenic acid C22:0	0.000 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.020 ± 0.0200 <sup>a</sup>
ΣSaturates	58.675 ± 0.0250 <sup>a</sup>	59.110 ± 1.5550 <sup>a</sup>
Myristoleic acid C14:1	0.100 ± 0.0100 <sup>a</sup>	0.055 ± 0.0550 <sup>a</sup>
Palmitoleic acid C16:1	7.725 ± 0.0250 <sup>a</sup>	7.835 ± 0.1750 <sup>a</sup>
cis-10-Heptadecenoic acid C17:1	0.140 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.065 ± 0.0650 <sup>a</sup>
Oleic acid C18:1n9c	16.080 ± 0.0700 <sup>a</sup>	16.230 ± 0.4000 <sup>a</sup>
cis-11-Eicosenoic acid C20:1	1.615 ± 0.0050 <sup>a</sup>	1.630 ± 0.0900 <sup>a</sup>
Erucic acid C22:1n9	0.170 ± 0.0100 <sup>a</sup>	0.095 ± 0.0950 <sup>a</sup>
Nervonic acid C24:1	0.150 ± 0.0200 <sup>a</sup>	0.095 ± 0.0950 <sup>a</sup>
ΣMonoenes	25.880 ± 0.0600 <sup>a</sup>	25.950 ± 0.2300 <sup>a</sup>
Linoleic acid C18:2n6c	3.810 ± 0.0100 <sup>a</sup>	3.790 ± 0.1800 <sup>a</sup>
Linolenic acid C18:3n3	0.450 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.255 ± 0.2550 <sup>a</sup>
γ-Linolenic acid C18:3n6	0.000 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.030 ± 0.0300 <sup>a</sup>
cis-11,14-Eicosadienoic acid C20:2	0.130 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.080 ± 0.0800 <sup>a</sup>
Methyl cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid C20:4n6	0.170 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.095 ± 0.0950 <sup>a</sup>
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid C20:5n3	6.005 ± 0.0150 <sup>a</sup>	5.965 ± 0.3850 <sup>a</sup>
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid C22:6n3	4.880 ± 0.7000 <sup>a</sup>	4.725 ± 0.7050 <sup>a</sup>
Σn-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA)	11.055 ± 0.0850 <sup>a</sup>	10.785 ± 1.1850 <sup>a</sup>

Values (means±SE of the triplicate replications) in the same column with the same superscript are not significantly different ( $P>0.05$ )

Table 16. Free amino acid composition of starry flounder and hybrid fish (mg/100 g)

	Starry flounder	Hybrid
Alanine	17.0 ± 1.50 <sup>a</sup>	31.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
β-alanine	37.0 ± 1.50 <sup>a</sup>	24.0 ± 1.50 <sup>b</sup>
Aminoadipic acid	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
DL-β-Aminoisobutyric acid	1.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	4.0 ± 2.00 <sup>a</sup>
Aminobutyric acid	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
γ-Aminobutyric acid	3.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Asparagine	2.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Aspartic acid	2.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Carnosine	2.0 ± 2.00 <sup>a</sup>	3.0 ± 3.00 <sup>a</sup>
Citulline	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Cystine	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Glutamic acid	6.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	6.0 ± 1.00 <sup>a</sup>
Glycine	42.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	36.0 ± 1.50 <sup>a</sup>
Histidine	16.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	15.0 ± 2.00 <sup>a</sup>
3-Methyl-L-Histidine	2.0 ± 1.50 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
1-Methyl-L-Histidine	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Isoleucine	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Leucine	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Methionine	1.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Ornithine	2.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Phenylalanine	1.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Phosphoserine	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Phosphoethanolamine	10.0 ± 2.00 <sup>a</sup>	15.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Proline	11.0 ± 1.50 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Serine	12.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	12.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Taurine	106.0 ± 3.50 <sup>a</sup>	130.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Threonine	14.0 ± 1.50 <sup>a</sup>	14.0 ± 0.50 <sup>a</sup>
Tyrosine	3.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Tryptophan	1.0 ± 1.00 <sup>a</sup>	2.0 ± 2.00 <sup>a</sup>
Urea	2.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>
Valine	1.0 ± 0.50 <sup>b</sup>	7.0 ± 0.50 <sup>a</sup>

Values (means±SE of the triplicate replications) in the same column with the same superscript are not significantly different ( $P>0.05$ )

## IV. 토의

잡종 및 잡종화를 통한 어류의 유전 육종기법은 잡종강세를 유도하여 우량형질이 획득된 개체를 단기간에 생산하기 위해 시도되며 양식 산업에 있어서 비교적 적은 노력으로 생산성을 극대화할 수 있어 중간 또는 속간 교배를 통한 잡종 어류의 생산이 중요시되고 있다(Wohlfarth, 1994, Bartley et al., 2001).

일반적으로 유도된 잡종의 분석은 생리학적, 형태학적 및 세포유전학적 분석을 통하여 그들의 잡종 유도 여부를 분석하게 된다. 이 중 생리학적 분석은 주로 난 발생 시 소요되는 시간을 비교함으로써 판단하게 된다. 어류에 있어 교잡 수정란의 발생 소요 시간은 부모 어종의 중간이거나 부모 어종의 어느 한쪽과 비슷하며, 어떤 경우에는 부모 어종보다 더 느리다고 알려져 있다(Chevassus, 1983; Kurita et al., 1995). 본 연구에 있어 잡종의 발생 시간은 암컷으로 사용된 강도다리의 발생 단계별 소요 시간과 유사하였으나(Jung et al., 2014), 돌가자미의 경우 아직 본 연구의 부화 온도에서 발생 단계를 보고한 문헌이 없어 직접 비교는 어려워 앞으로 돌가자미의 발생시간을 조사한다면 본 잡종의 난 발생 소요 시간이, 사용된 친어 종의 중간을 나타내는지 알 수 있을 것으로 생각된다. 특히 유도된 잡종의 산업성은 발생 초기의 생존율에 크게 좌우되어 연어과 어류의 경우 초기 발생단계에서 높은 사망률이 보고되어 있다(Purdom, 1993). 그러나 본 연구 결과 유도된 잡종의 초기 사망률과 종묘 생산 후 후기 사망률에 있어 강도다리의 그것과 별 차이가 없어 산업적 유용성이 큰 것으로 생각된다.

어류의 마취제 사용은 인공산란, 어체 측정, 해부 및 운반에 있어 어

체 스트레스를 최소화하여 최적 효과를 얻기 위해 사용 한다(Kolomytkin et al., 2007). 특히 어류에 있어 사용되는 마취제는 매우 다양함이 알려져 있으나, 그중 clove oil은 clove 나무의 잎과 꽃의 증류를 통해 얻어지는 액체로써 갈색을 띠며 eugenol 성분이 진정작용과 마취에 관여하는 활성 물질로 알려져 있을 뿐만 아니라 매우 안정적인 마취제로서 인체의 치과 치료 등에 사용되고 있다(Keene et al., 1998). 본 연구에서 사용 된 3종의 마취 효과를 비교한 결과 잡종은 양친으로 사용된 두 종간의 중간 정도의 마취 강도를 가지고 있었으나 회복력의 경우에는 농도의 증가에 상관없이 동일한 회복력을 보였다. 각시붕어와 돌납자루의 경우 clove oil로 마취 시 80~160 ppm의 농도에서 1~2분 정도가 소요되는 것으로 보고되어 있어(Kang et al., 2005), 본 연구에서 유도된 잡종은 clove oil에 이들 보다 민감한 것으로 나타났다. 그러나 상기 어종들은 담수 어종으로서 어종에 따른 민감도 보다는 염분 농도에 따른 민감성의 차이일 가능성도 있다. 따라서 본 잡종이 앞서 결과에서 보듯이 높은 광염성을 보이므로 본 잡종은 염분 농도에 따른 clove oil의 마취 효과를 연구 할 수 있는 좋은 모델 어류가 될 것으로 사료된다.

어류를 연구함에 있어 개체의 식별 및 어업 자원의 관리 측면에 있어 유용한 태깅 기법의 사용은 매우 중요하다(McFarlane et al., 1990). 본 연구에 있어 강도다리와 유도된 잡종과의 외형이 거의 동일하여 새로운 태깅 방법을 시도하였다. 그 결과 태그 탈락률이 낮아 본 방법을 개선한다면 매우 경제성 있고 유용한 태깅 기법이 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

유도된 잡종의 형태는 일반적으로 사용된 양친의 중간 형질을 나타내는 것으로 알려져 이들에 대한 형태학적 분석은 잡종의 산업성 평가의 한 방법으로 사용되고 있다(Campton, 1987). 본 연구에서는 강도다리, 돌가자

미 및 유도된 잡종에 대하여 계측학적 형질을 분석하여 유도된 잡종의 형태가 소비자의 구매욕을 충족시킬 수 있는가를 알아보고자 하였다. 그 결과 몇 가지 계측형질을 제외하고 잡종은 암컷으로 사용된 강도다리의 형질과 매우 유사하였다. 따라서 본 연구결과 유도된 잡종은 모계의 형질을 매우 닮아 소비자의 구매욕을 충족시키는 데에 문제가 없을 것으로 생각된다. 연어과 어류의 잡종들은 대부분 사용된 친어의 중간 정도를 나타낸다고 보고되어 있고, 메기과 어류는 대부분 사용된 친어 중 수컷의 형질을 나타낸다(Volckaert et al., 1994).

염색체는 종에 따라 수와 형태에 있어 염색체 수 및 형태에 이상이 있으면 생물체에 영향을 주어 형질을 변화시키며 새로운 형질의 개체가 발생 시 생물 진화에 원인이 되기도 함으로 세포유전학적 분석은 생물의 종을 구분하거나 종간 유연관계를 연구함에 있어 중요한 역할을 한다(Thorgaard, 1983). 어류의 세포유전학적 분석 중 적혈구의 세포 및 핵의 크기 분석은 그 방법이 측정 시 용이하다는 장점이 있어 매우 유용하게 사용되고 있으나, 실제 유사한 크기의 적혈구 세포 간 명확한 판별이 불가능한 단점이 있다. 이에 핵 내 DNA 함량을 직접 분석 하는 방법이 사용되고 있으나 이는 매우 고가의 장비를 사용하여야 하는 등의 단점을 지니고 있다. 염색체수 및 핵형의 분석은 인위적으로 유도된 잡종뿐만 아니라 배수체의 분석에 널리 이용되고 있으나 본 분석 방법은 숙련된 기술을 요구하는 단점이 있다. 염색체의 밴딩 방법은 일반 염색으로 찾아내기 어려운 염색체를 판별하는 방법으로 중요시되며 특히 본 연구에서 사용된 silver staining 방법을 통한 nuclear organizer region (NOR's) 분석법은 rRNA 생산 유전자 부위를 분석하는 방법으로 유용하게 사용되고 있다(Jung, 2018).

본 연구에서 나타난 세포 유전학적 분석 결과는 세포 크기, DNA 함

량, 염색체 수 및 핵형 그리고 NOR band 등에서 강도다리와 거의 차이를 보이지 않아 친어로 사용된 부계의 돌가자미는 세포유전학적으로 강도다리와 매우 근연 관계가 가까운 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서 돌가자미에 대한 세포유전학적 분석을 시행한 결과 이미 밝혀진 염색체수 및 핵형 분석 결과 이외에 DNA 함량은 0.66 pg이고, 제일 크기가 작은 acrocentric 염색체 한 쌍에 NOR's 부분이 있음이 밝혀져 세포유전학적으로는 매우 강도다리와 유사함이 입증되었다. 앞으로 분자생물학적 분석을 통한 두 종간 유연관계를 밝혀야 할 것으로 생각된다.

양식 산업에 있어 사료효율, 성장률 및 비만도 등은 유도된 잡종의 산업성 평가에 가장 중요한 척도로 인식되고 있다(Carter et al., 1994). 특히 어류 양식의 성공적 요인인 빠른 성장과 높은 사료 효율은 산업적 이용에 있어 결정적인 요인이 될 수 있어 그간 전 세계적으로 양식생산에 있어 중요하게 인식되고 있는 연어과 어류를 중심으로 성장 개선과 사료 효율의 증가를 위한 유전 육종 연구가 주류를 이루었다. 본 연구 결과 유도된 잡종은 강도다리보다 탁월한 사료효율, 성장률 및 비만도 등을 보였다. 어류의 계통 간 성장 차이는 어미의 영향, 위의 크기 및 먹이의 종류, 먹이의 섭취량 및 소화 효율과 함께 수온과 유전자형 간의 연관성 및 섭식 행동 등 다양한 요인에 의해 나타나는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서 유도된 잡종은 서로 다른 종 특이성 때문에 앞서 언급된 다양한 요인에 따라 성장 차이가 나타나는 것으로 보이나 그중 어떤 형질이 가장 영향을 끼쳤는가에 대한 연구가 이루어져 이들 특성을 극대화 할 수 있는 방향으로 본 잡종을 육종한다면 앞으로 양식 어민의 소득 증대에 크게 일조 할 수 있을 것으로 보인다.

스쿠티카증(scuticociliatosis)은 연체동물, 갑각류 및 어류 등에서 발생하는 scuticociliatida 목에 속하는 조직섭이성 섬모충에 의한 감염증을

말한다. 최근 전 세계적으로 해산 양식에 크게 문제가 되는 기생충성 질병으로 원인충인 스쿠티카충은 대부분의 섬모충과는 달리 뇌, 혈관 및 신장조직까지 감염을 유발하여 높은 폐사율을 나타내며 우리나라의 경우 넙치 양식 증가에 따라 만연하고 있는 스쿠티카 감염에 의한 대량 폐사는 넙치의 양식 생산고 증가에 큰 걸림돌로 작용하고 있다(Harikrishnan et al., 2010; Iglesias et al., 2002; Bae et al., 2009). 그러나 강도다리는 스쿠티카 감염에 매우 강하여 스쿠티카증으로 폐사하는 경우는 보고된 바 없다. 본 연구에서 잡종의 경우에도 스쿠티카에 대한 면역력이 매우 높아 본 잡종어의 양식 시 스쿠티카 감염에 의한 대량 폐사를 방지함으로써 양식산업에 있어 수익률을 극대화 할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 국내 제주도 지역 넙치 양식장의 경우 스쿠티카증이 발생하면 이들과 비브리오균이나 활주세균 등과의 혼합감염에 의해 대량 폐사가 일어남이 보고되어 있으므로(Jin et al., 2007) 앞으로 본 잡종의 비브리오균과 활주세균에 대한 내성도 함께 연구되어야 할 필요성이 있다.

어류는 단기간 변화된 환경에 적응하며 자체 에너지를 소비하여 절식 기간에 대응한다 (Mustafa and Mittal, 1982; Weatherley and Gill, 1987). 어류의 절식에 따른 영향 분석을 위하여 일반적으로 체중의 변화, 간중량 지수, 간조직의 변화 및 혈액학적 특성 등을 분석한다(Liang et al., 2011). 그러나 최근 근조직 내 RNA/DNA 비는 먹이 섭취 여부, 스트레스와 세포 내 단백질 합성능력 평가와 생식주기와 관련한 영양분의 축척과 소비 등 다양한 해양생물의 건강도를 판정하는 지표로 활용되고 있다(Anger and Hirche, 1990). 그러나 이 분석 방법은 근조직을 사용함으로써 분석 시료에 상해를 주는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 어체에 큰 해를 끼치지 않기 위해 적혈구 세포를 이용한 세포주기 분석을 실시하였다. 세포주기 분석은 DNA 합성기인 S기, 유사분열 단계인 G2+M기 및 유사분열

후 휴지기인 G1기로 구분된다. 본 연구에서 세포주기를 분석하여 강도다리와 잡종군의 DNA 합성시기와 G1기에 도달하는 시간을 혈구세포를 이용하여, 분석한 결과 강도다리와 잡종어에 반복으로 먹이를 공급한 후, 24시간까지 두 실험군간 세포주기를 분석한 결과 먹이공급 8시간까지는 두 실험군 간 세포주기에 차이가 나타나지 않았으나 이후 12시간부터는 강도다리의 세포주기가 빨라짐을 알 수 있었고, 먹이공급 초기에는 잡종군의 DNA 합성 능력이 대조군보다 약 20% 높았으나 12시간 이후에는 약 20% 정도 늦어짐이 관찰되었다(Table 10). 이후 실험군을 굶기며 2일부터 2주간까지의 세포주기를 통한 분석 결과 최초 먹이 공급 후 12일까지는 강도다리의 세포주기가 가자미류에 비해 빠르게 진전됨이 관찰되었으나 이후 14일째부터는 잡종의 세포주기가 빨라짐을 보였다. 이상의 결과에서 본 종의 사료를 공급할 시 최소한 8시간 간격으로 먹이를 공급할 경우 잡종이 강도다리보다 세포주기가 빨라 빠른 성장을 기대 할 수 있을 것으로 생각되며 이는 앞서 성장률, 사료효율 및 비만도에서 잡종군이 강도다리에 비해 월등히 높은 경향을 보이는 현상과 일치하는 결과로 보인다. 또한 거의 모든 양식장은 고수온기 또는 양식어가 질병에 감염되었을 경우 먹이 공급을 중단하는 것이 일반적으로 되어 있다. 본 연구 결과에서 먹이 공급을 중단하고 12일까지는 강도다리와 잡종군이 세포주기에 큰 차이가 없는 것으로 나타나 이 시기까지는 잡종군을 양식할 때 강도다리와 수익에 차이가 없을 것으로 기대된다. 그러나 14일간 굶긴 경우 잡종군의 세포 분열 속도가 강도다리보다 현저하게 감소하여 가능한 한 먹이 공급 중단을 12일 이상 하지 않는 것이 좋을 것으로 판단된다. Kim 등 (2014)은 강도다리를 절식시킨 후 먹이를 재공급하고 그들의 생리 조직학적 특성을 조사한 바 2주간의 절식 후 먹이를 재공급하면 3~4주 후 실험 초기의 상태로 회복이 가능함을 보고 한 바 있다.

최근 국내에서는 우리나라 연안의 오염 저감을 위해 해산어의 순환 여과식 양식을 위한 스마트 양식장의 개발 및 보급이 권장되고 있는 실정이다. 그런데 수질 관리에 있어 암모니아 농도의 조절은 어류의 순환 여과식 양식에 있어서 매우 중요한 요소이다(Randall and Tsui, 2002). 특히 해산어는 담수어보다 암모니아 독성에 매우 민감한 것으로 보고되어 있어 순환 여과식 양식 시설의 경우 수중 암모니아 농도의 저감은 매우 어려운 실정이다(Kim et al., 2019). 강도다리는 담수에 대한 적응력이 매우 강하여 순환 여과식 양식시 사육수의 암모니아 농도를 담수를 섞어 쉽게 낮출 수 있는 장점이 있다. 이에 본 연구에서는 유도된 잡종이 강도다리와 마찬가지로 순환 여과식 양식 시설에 적합한 어종인가를 평가하기 위하여 반복 시와 기아 시, 담수에 대한 적응력을 평가하였다. 그 결과 정상적으로 사료를 공급한 경우 강도다리와 동일한 담수 적응력을 보였으나 상기 기아내성 실험에서 나타났던 2주간 굶긴 실험군의 경우 담수처리 5일 만에 모두 폐사하여 본 잡종어를 순환 여과식 양식 시설에서 사육할 경우 2주 이상 먹이 공급을 중단하는 것은 금시 해야 할 것으로 보인다. 이때 나타난 폐사 개체의 형태 분석 시 피부 표층의 점액질이 모두 탈락되고, 일부 충혈이 나타나는 것으로 보아 잡종어는 2주 이상 굶기면 물질대사가 급격히 감소되는 것으로 생각된다. 본 결과는 상기 기아내성 결과에 있어 DNA 합성 능력이 2주 후에 급격히 감소하는 것과 일치 하였다. 강도다리를 38일간 굶긴 후 간의 조직학적 분석을 실시한 결과, 간세포 핵의 응축과 모세혈관의 팽창을 관찰하였고, 췌장의 경우 효소원 과립들이 감소되며 외분비선 상피세포의 핵들이 응축되는 결과를 보고한 바 있다(Kim et al., 2014). 앞으로 본 연구에서 폐사된 개체에 대한 조직 병리학적 연구가 이루어진다면 기아와 담수 적응력 간의 관련성을 검토 할 수 있을 것으로 보인다.

강도다리는 0 psu에서도 생존 및 담수순화가 가능한 광염성 어류로 알려져 있다(Kim et al., 2009). 특히 프로락틴(PRL)은 어류의 담수 적응력에 있어 중요한 인자로 작용하는 펩타이드 호르몬으로, 뇌하수체에서 분비와 조절이 된다고 보고 되어있다(Ruijter and Bonga, 1988). 이에 본 연구에서는 강도다리, 돌가자미 그리고 잡종어의 PRL의 분자학적 특성과 발현 양상을 알아보기 위해 각 실험어들을 담수 처리하고 이때 지느러미와 뇌하수체 조직을 채취하여 PRL의 gDNA와 mRNA 발현양상을 비교 분석하였다. PRL 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭한 결과 강도다리와 돌가자미는 각기 다른 하나의 증폭된 밴드를 보이나, 잡종의 PRL 유전자는 강도다리와 돌가자미에서 보인 각각의 두 개의 밴드를 모두 나타내었다. 이는 잡종은 gDNA 상에서 어미인 강도다리와 돌가자미의 서로 다른 PRL 유전자를 하나씩 모두 가지는 것으로 보이고 강도다리와 돌가자미 PRL 유전자의 차이는 1st Intron 영역에서 25bp 차이에 기인한 것으로 판단된다. 그리고 이 결과는 PRL 유전자의 1st intron 부위의 증폭을 통해, 잡종어의 판별하는 데에 이용이 가능할 수 있음을 시사한다.

돌가미와 하이브리드에서 PRL 유전자의 조직별 발현 양상을 분석한 결과 두 어종 모두 뇌 조직에서만 특이적으로 발현하는 것으로 나타났다. 이 결과는 강도다리에서와 유사하게 뇌하수체에 특이적인 발현양상을 보여주는 강도다리의 결과와 일치함을 보여준다(Noh et al., 2013).

각 어종에서 실제 발현하는 PRL 유전자를 확인하기 위하여 뇌하수체 조직으로부터 RNA 분리 후 cDNA를 확인한 결과, PRL cDNA Full sequence의 285번째 염기서열이 돌가자미는 GCT이며, 강도다리(GCC)와 잡종(GCC)은 일치하였다. 이 결과는 잡종에서 발현되는 PRL 유전자는 강도다리와 같은 copy 유전자가 발현됨을 보여준다. 그리고 염분 변

화 시 강도다리, 돌가자미와 잡종의 PRL 유전자의 발현 정도를 알기 위해 시행한 qPCR 실험에서는 강도다리는 32 psu에서는 거의 검출이 되지 않았으며, 18 psu와 6 psu에서 낮게 발현되었으나 돌가자미는 모든 구간에서 상대적으로 높은 발현량을 보였다. 잡종은 돌가자미와 강도다리의 중간 정도의 발현량을 보였으며 이는 PRL 외에 어류의 저염분 적응에는 다른 요인이 작용하고 있음을 시사하였다.

잡종의 생식력은 생식소 상의 불임과 수정 능력이 있는 잡종의 두 가지로 나누어진다. 성적 성숙이 일어나지 않는 생식소 불임인 경우 성장 및 생존력의 증가와 아울러 육질부위 증가 및 개선이 수반 된다고 보고되어 있다(Fries and Harvey, 1989). 그러나 잡종이 생식 능력이 있는 경우 상기 불임이 이득은 기대하기 어려우나 이를 이용한 잡종들 간의 F2 교배, 역교배 및 3 way hybrid 등의 유도가 가능하므로 신품종으로 인정받고 있다(Chavassus, 1987). 특히 세대 간 역교배는 양친으로 사용된 두 종의 산업성이 크게 차이가 나는 경우 양친 중 한 종의 형질을 증폭시킬 수 있다는 이점이 있다(Gui et al., 1993). 본 연구에서 유도된 잡종은 생식 능력이 있어 F2 교배, 역교배 및 3 way hybrid 기법 등을 통한 유전 육종이 가능할 것으로 사료된다. 특히 F2 잡종은 잡종강세에 따른 새로운 품종으로 정착시킬 수 있는 가능성이 보이므로 이들을 유도하여 세포유전학적 안정성을 평가하고 형태학적 및 본 연구에서 수행된 다양한 유용 산업형질에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

식품 영양학적 평가를 위해 전어체의 일반 성분, 유리 아미노산 및 지방산을 강도다리의 그것과 비교한 결과 두 실험군 간 큰 차이는 나타나지 않아 잡종은 영양학적으로 강도다리와 큰 차이가 없는 것으로 보인다. 그러나 일반 성분의 경우 잡종의 지질 함량이 높은 것으로 나타났으나 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 25종의 지방산을 분석한 결과 두 실험

군 간 전어체에 있어 차이는 없는 것으로 나타났고, 유리 아미노산의 분석 결과에 있어 강도다리에서 높게 나타난 L-valine 의 경우 쓴맛을 증가시키는 요인으로 작용함이 알려져 있다(Warmke and Belitz, 1993). 앞으로 잡종어와 강도다리 간 패널 테스트를 통한 소비자의 기호성을 분석하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 강도다리와 돌가자미의 단점을 개선하여 국내 양식 산업에 이용하기 위해 두 종간 잡종을 생산, 이를 생리학적, 형태학적 및 세포유전학적으로 분석한 결과 두 종간의 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 잡종의 산업성을 강도다리의 그것과 비교 시 성장 및 사료효율 그리고 비만도가 증가함을 알 수 있었고, 스쿠티카 감염에 대하여 강도다리와 유사한 내성을 보였다. 또한 기아에 대한 내성도 먹이 공급 중단 후 12일까지 두 실험군간 차이가 없었으며, 사료를 만복으로 공급하였을 시 담수에 대한 적응력도 강도다리와 동일하였다. 특히 유도된 잡종은 생식능력을 가져 앞으로 새로운 잡종군을 생산할 수 있는 가능성을 보였으며, 식품영양학적 분석에 있어 두 실험군 간 큰 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 잡종군이 강도다리보다 산업적인 가치에 있어 높게 평가됨으로 앞으로 본 종은 국내 양식 산업에 있어 어민의 소득증대에 기여할 수 있는 신품종으로서 정착이 가능할 것으로 생각된다.

## 국문 요약

어류에서 잡종 유도는 우량형질을 가진 두 종간 교배를 통해 단기간 내 최소한의 노력으로 잡종강세를 얻기 위해 시도된다.

강도다리는 냉수성 어종으로 강한 내병성 및 광염성 등의 특징을 가지고 있어 우리나라에서 양식 생산량이 점차 증가되고 있다. 그러나 성장이 느려 대형의 고급횃감으로 사용하기 위해서는 2년 이상 키워야 하는 문제점이 있다. 돌가자미는 육질과 맛이 좋아 고급 횃감으로 각광받고 있어 경제적 가치가 높은 양식대상종이지만 고수온, 스트레스 및 질병에 약해 국내에서는 본격적인 양식이 이루어지지 못하고 단지 방류용 종묘 생산만이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 두 종간 잡종을 유도하여, 그 산업성을 분석함으로써 현재 국내에서 대량으로 양식되어 이미 산업적으로 정착된 강도다리의 그것과 비교함으로써 두 종간 잡종의 국내 양식 산업에 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

그 결과 유도된 잡종의 난은 분리 부성란 이였으며 12 °C의 발생 조건에서 수정 시간 후 첫 번째 난황이 이루어졌으며, Kupffer's vesicle은 수정 후 46시간부터 작은 크기로 관찰되기 시작하여 5시간에 최대 크기로 발생하고, 79시간 30분에 소멸되었고, Kupffer's vesicle이 소멸된 후 꼬리가 형성되기 시작하여 수정 후 85시간에 부화하기 시작하였다. 부화 후 5일이 경과하면 자어는 난황을 거의 흡수하고, 입이 열리며, 머리를 아래로 한 체위에서 정상 유영 체위로 변하였다. 부화 후 7일이 되면 거의 모든 개체가 로티퍼를 먹기 시작하였고, 18일 경과 시 알테미아를 공급하기 시작하였고, 35일이 경과된 시기부터 알테미아와 함께 냉동 코페포다 (아쿠아넷 냉동 코페포다)를 공급하였으며, 50일령을 전후하여 배합사료의

공급을 시작하였으며. 112일에는 5.5~7.8 cm로 성장하였다.

잡종의 적정 마취 농도를 구하기 위해 clove oil을 표준 마취제로 사용하여 마취에 소요되는 시간과 회복 시간을 측정한 결과, clove oil의 농도 증가에 따라 20~80 ppm에서 잡종의 마취 시간은 약 1내지 2분 소요되었다. 그러나 회복 시간은 140.5~147.5초로 농도 증가에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

유도된 잡종의 형태학적 분석 결과 전장에 대한 체장의 비는 강도다리가 85.99% 잡종은 85.51% 그리고 돌가자미는 87.14%로 세 그룹 간 차이가 없었다. 전장에 대한 체고의 비는 강도다리가 48.56% 그리고 잡종은 49.39%로 나타났고 돌가자미는 44.74%였다. 전장에 대한 미병장의 비는 강도다리, 잡종 그리고 돌가자미는 8.55%, 8.72%, 9.25%로 나타났다. 미병고의 비는 세 실험군 각각 9.48%, 9.59%, 10.54%였다. 전장에 대한 두장의 비는 강도다리 26.83%, 잡종 25.32% 그리고 돌가자미 22.47%로 나타나 강도다리와 잡종 간에는 전장에 대한 계측형질에 있어 통계적 유의성( $P < 0.05$ )이 나타나지 않아 형태적으로 동일함을 알 수 있었다.

어체 각 부위를 측정하여 두장에 대한 백분비를 나타낸 결과 두장에 대한 상악장의 비는 강도다리가 31.54% 잡종은 32.85% 그리고 돌가자미는 33.70%로 세 그룹간 차이가 없었다. 두장에 대한 문장의 비는 강도다리가 21.26% 그리고 잡종은 21.16%로 나타났고 돌가자미는 19.75%였다. 두장에 대한 양안간격의 비는 강도다리, 잡종 그리고 돌가자미는 7.43%, 9.31%, 7.19%로 나타났다. 안경에 대한 비는 세 실험군 각각 18.71%, 22.27%, 17.76%로 나타나 강도다리와 잡종 간에는 두장에 대한 계측형질도 통계적 유의성( $P > 0.05$ )이 나타나지 않아 형태적으로 동일하였다.

유도된 잡종을 세포 유전학적으로 분석한 결과, 적혈구 세포크기에 있어 표면적은  $38.11 \pm 4.10 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $136.07 \pm 45.51 \mu\text{m}^3$ 으로 확인되었고.

핵의 표면적 및 부피는  $8.19 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$  및  $16.08 \pm 2.45 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되어 부모로 사용된 두 종의 값과 동일하였으며 DNA 함량에 있어서도 실험군 모두 0.66 pg/haploid cell로 동일하였다. 잡종의 암컷 및 수컷의 중기분열상을 분석한 결과, 모두 염색체 수는  $2n=48$ 이었고 핵형은 차단부 염색체(acrocentric chromosome) 24쌍으로 구성되어 있어 암·수간 염색체수 및 핵형간의 차이는 없었으며, 개체 간 및 세포 간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다. 또한 silver staining을 통해 nuclear organizer region (NOR's)을 분석한 결과 가장 작은 1쌍의 acrocentric 염색체에 nuclear organizer region (NOR's)이 존재하였다.

강도다리, 돌가자미와 잡종의 치어를 60일간 사육한 후 분석된 일간 성장율, 사료계수 및 비만도에서 강도다리, 돌가자미 그리고 잡종간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 8개월간 강도다리와 잡종을 동일 사육수조에 혼합 사육하며 성장과 비만도를 측정된 결과 잡종이 강도다리에 비해 성장률에 있어 15.1% 높게 측정되었고 비만도는 12.0 % 높은 값을 보였다.

4개월령의 강도다리, 돌가자미 및 잡종에 대하여 scuticocidal activity를 총 3회에 걸쳐 분석한 결과 강도다리에서 제일 큰 내성을 보였고 돌가자미는 매우 낮게 나타났으나 유도된 잡종의 경우 두 종간의 중간보다 높은 활성을 나타내었다.

강도다리와 잡종어에 만복으로 사료를 공급한 후, 24시간까지 두 실험군간 세포주기를 분석한 결과, 먹이공급 8시간까지는 세포주기에 있어 차이가 나지 않았으나 이후 12시간부터는 강도다리의 세포주기가 빨라짐을 알 수 있었다. 이후 실험군을 굶기며 2일부터 2주간 동안 세포주기를 분석한 결과 최초 먹이 공급 후 12일까지는 강도다리의 세포주기가 가자미류에 비해 빠르게 진전됨이 관찰 되었으나 이후 14일째부터는 잡종의 세포주기가 빨라짐을 보였다.

염분도를 35 psu에서 2.5 psu까지 점진적으로 낮추며 강도다리와 잡종 간의 생존율을 분석한 결과, 각 실험군에서 한 마리씩만 폐사하여, 점진적으로 염분도를 낮출 경우 잡종은 강도다리와 마찬가지로 저염분에 매우 강한 것으로 나타났다. 그러나 어체를 2주간 굶긴 후 담수 처리를 하였을 경우 잡종군에서는 처리 3일 후부터 급격하게 사망률이 증가하여 5일 후에는 모든 실험군이 폐사하였다. 이때 폐사한 모든 어류는 지느러미에 출혈이 나타나고, 점액질이 모두 다 탈락하는 현상을 보여주었다.

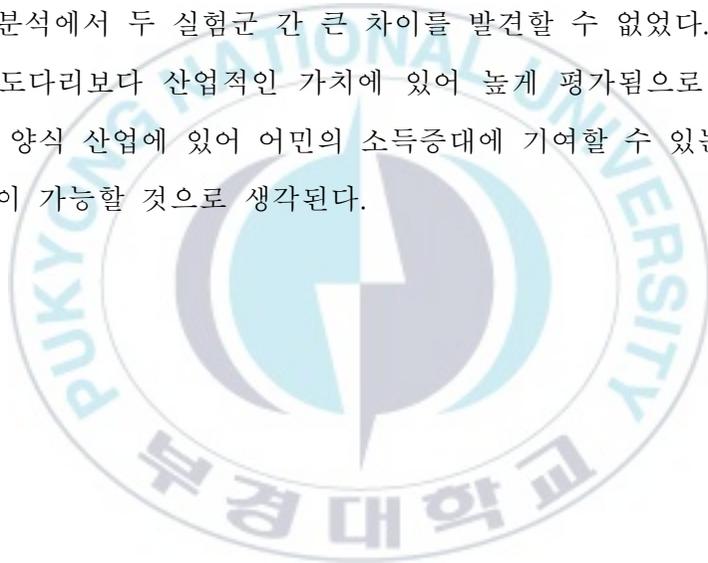
강도다리, 돌가자미 그리고 잡종의 꼬리지느러미 조직을 이용한 PRL의 gDNA 분석 결과잡종은 gDNA 상에서 강도다리와 돌가자미의 서로 다른 PRL 유전자를 한 개씩 두 개를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 저염분 노출 시 PRL 발현량은 강도다리는 32 psu에서 발현하지 않았으나 잡종은 32 psu에서 상대적으로 낮은 발현량을 보였고, 6 psu에서는 발현량이 높게 나타났고 특이적으로 잡종의 경우 저염분에 노출 시 강도다리의 유전자만이 발현되는 양상을 보여주었다.

강도다리와 잡종에 대하여 생식소 조직을 분석한 결과 강도다리와 잡종의 경우 모두에서 발생 초기에 감수분열이 진행되어 생식 능력이 있는 것으로 나타났다. 이에 19개월령 잡종의 성숙 여부를 해부학적으로 관찰한 결과 잡종은 정상적으로 성숙이 이루어짐이 관찰되었다.

11개월령인 강도다리와 잡종의 전어체 일반성분 분석 결과 수분 함량, 조단백질 그리고 조회분에는 유의적인 차이가 없었으나, 조지질의 경우에는 잡종이 약간 높은 결과를 보였다. 유리 아미노산은 강도다리와 잡종에 있어 전체적으로 큰 차이를 보이지 않았지만, L-valine의 경우 강도다리가 잡종보다 높은 값을 보였고, 지방산이 경우도 전체적으로 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

본 연구에서 강도다리와 돌가자미의 단점을 개선하여 국내 양식 산업

에 이용하기 위해 두 종간 잡종을 생산, 이를 생리학적, 형태학적 및 세포 유전학적으로 분석한 결과 두 종간의 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 잡종의 산업성을 강도다리의 그것과 비교 시 성장 및 사료효율 그리고 비만도가 증가함을 알 수 있었고, 스쿠티카 감염에 대하여 강도다리와 유사한 내성을 보였다. 또한 기아에 대한 내성도 먹이 공급 중단 후 12일까지 두 실험군간 차이가 없었으며, 사료를 반복으로 공급하였을 시 담수에 대한 적응력도 강도다리와 동일하였다. 특히 유도된 잡종은 생식능력을 가져 앞으로 새로운 잡종군을 생산 할 수 있는 가능성을 보였으며, 식품 영양학적 분석에서 두 실험군 간 큰 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 잡종군이 강도다리보다 산업적인 가치에 있어 높게 평가됨으로 앞으로 본 종은 국내 양식 산업에 있어 어민의 소득증대에 기여할 수 있는 신품종으로서 정착이 가능할 것으로 생각된다.



## 감사의 글

‘공부에도 때가 있다.’

학업을 손에서 놓은 지 15여 년 만에 다시 책을 잡은 첫 학기 때 문득 중고교 학창시절에 귀 따갑게 들던 이 말이 갑자기 떠올랐습니다. 강의 내용은 이해하기 힘들었고, 내어주는 과제는 망막하기만 하였습니다. 그렇게 첫 과제발표 때를 떠올려 보면 8페이지짜리 영어 논문 하나 해석하고, 이해하고, PPT를 만드는 데에 꼬박 한 달을 전전긍긍 했었지만, 이제 필요한 내용의 논문을 검색해서 찾아보고 실제 현장에서 참고하여 적용시켜 보는 작금의 제 자신을 보면서 지난 수년간의 시간들이 헛되지 않았다는 위로와 작은 성취감을 느끼곤 합니다.

물론 여기까지 오는 데에 그리고 이 학위논문이 나오기까지 저 혼자만의 고군분투로 이루어졌을 리가 만무합니다.

학문으로써 인품으로써 가르침과 이쁨을 주셨던 김동수 교수님의 은덕이 가장 컸습니다. 열정적인 지도와 연구자가 가져야 할 자세에 대한 가르침은 산업 현장에서 나름 자만심에 찬 저를 겸손케 하였고, 앞으로 가야 할 길에 대한 새로운 눈을 뜨게 해 주셨습니다.

그리고 바쁘신 와중에도 신경 써 주시고 조언을 아끼지 않으셨던 노충환 박사님, 대학원 수업 중 가장 따라가기 힘든 과목이었지만 지금은 가장 관심을 가지게 된 분야를 가르쳐 주신 남윤권 교수님, 학창시절 실험실 선배였을 때부터 지금까지 항상 사려 깊고 명철하신 조성환 교수님, 학업과 일상에서도 많은 조언을 주셨던 김종명 교수님께도 감사를 드립니다.

실험에 도움을 주었던 이효빈, 윤지혜, 김여름, 노수현 후배들에게 깊은 고마움을 전하며, 남은 대학원 생활 알차게 보내어 훌륭한 연구자가 되길 기원합니다.

대학원 수업 과정에서 모르는 것이 있을 때마다 친절하고 적극적으로 답해주던 실험실의 정효선 박사, 고민균 군 그리고 같은 클래스의 후배인 최재훈, 최복기, 배재현, 최원석 군에게 고맙다는 말을 전하며, 정태혁 박사, 박중열, 조운수 군에게도 밥 한끼 사야 할 거 같습니다.

뒤늦게 학교 다닌답시고 현장에서 자리를 비워두는 일이 많았었는데 묵묵히 현장을 지켜 주었던 이상기 선배님과 에드워드 군에게도 미안함과 감사를 표합니다.

그리고 학업의 계기를 마련해 주었던 임한규 교수님과 오랜 세월 조언과 격려를 보내 주신 홍성윤 교수님께도 감사를 드립니다.

끝으로 세월이 지나도 나이 많은 아들을 물가에 내놓은 어린 아이처럼 항상 노심초사 하시고, 앞길을 열어주시는 아버지와 어머니께 감사드립니다.

학위는 이제 산을 하나 넘은 거라고들 하는데, 저에게 있어서는 오히려 더 큰 산을 보게 하여 준 전환점이 된 거 같습니다. 앞으로 현장에서 보고, 듣고, 습득한 현상과 경험들은 단순 노하우를 넘어 찾아보고 탐구하여 논리와 지식을 쌓는 데에 방향성을 두어야겠다는 동기 부여를 받게 하였습니다.

그런 걸음을 한 발을 떼는 데에 가능케 해 준 지난 늦깎이 학창시절 과정에서 만난 모든 사람들에게 다시금 한 번 더 감사를 드립니다.

“공부에는 때가 있다.”

글쎄요.

2021.01.04.

이일영

## 참고 문헌

- Anger K and Hirche HJ. 1990. Nucleic acids and growth of larvae and juvenile spider crab, *Hyas araneus*. Mar Biol 105, 403-411.
- Bae MJ, Im EY, Kim HY and Jung SJ. 2009. The effect of temperature to scuticociliatida *Miamiensis avidus* proliferation, and to mortality of infected olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 22, 97-105.
- Bartely DM, Rana K and Immink AJ. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries, Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10, 325-337.
- Campton DE 1987. Natural hybridization and introgression in fishes. In: Population Genetics Fishery Management. Ryman, N. and Utter, F. (eds). University of Washington Press, pp. 161 - 192.
- Carter CG, McCarthy ID, Houlihan DF, Johnstone R, Walsingham MV and Mitchell AI. 1994. Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Can J Zool 72, 609-617.
- Chevassus B. 1979. Hybridization in salmonids: Results and perspectives. Aquaculture 17: 113-128.
- Chevassus D. 1987. Genetic manipulation in fish: Review of methods. In: Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking, Bordeaux, France, 27-30 May 1986, Tiews, K. (ed). Berlin, Vol. II, pp. 111-126.

- Do YH, Min BH, Choi ML and Lim HG. 2014. Developmental Speed of hybrid fertilized egg between olive flounder *Paralichthys olivaceus* female and starry flounder *Platichthys stellatus* male at different water temperatures and larval growth. Kor J Fish Aquat Sci 47, 630-636.
- FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome.
- Folch J, Leawe SM and Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J Biol Chem 14, 496-509.
- Fries LT and Harvey WD. 1989. Natural hybridization of white bass and yellow bass in Texas. Trans Am Fish Soc 118, 87-89.
- Gui J, Liang S, Zhu L, Sun J and Jiang Y. 1993. Cytogenetic analysis of developmental differences between embryos of reciprocal cross in distant hybrids of fish. Zool Res 14, 171-177.
- Harikrishnan R, Balasundaram C and Heo MS. 2010. Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea Taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis: Part I Control strategies of scuticociliatosis: Part II. Fish Shellfish Immunol 29, 15-31.
- Iglesias R, Parama A, Alvarez F, Leiro J and Sanmartim ML. 2002. Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aqua Org 49, 191-197.

- Jin CN, Lee CH, Oh SP, Jung YU, Song CB, Lee J and Heo MS. 2003. Infection route of scuticociliates in the juvenile of the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 16, 13-21.
- Jin CN, Kang HS, Moon YG, Lee CH, Lee YD, Lee JH, Song CB and Heo MS. 2007. Scuticociliatosis in flounder farms of jeju island. J Fish Pathol 20, 93-98.
- Jung HS and Kim DS. 2018. Production of all-female triploid in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Ph.D. dissertation, Pukyong National University, Busan.
- Jung HS, Kim YK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2014. Cytogenetic analysis of starry flounder *Platichthys stellatus* from Korea. Kor J Fish Aquat Sci 47, 431-434
- Jung HS, Lee IY, Lee HB and Kim DS. 2019. Development of allotriploid embryos produced by crossing female starry flounder *Platichthys stellatus* and male stone flounder *Kareius bicoloratus*. Kor J Fish Aquat Sci 52, 298-301.
- Jung HS, Kim YK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2014. Cytogenetic Analysis of Starry Flounder *Platichthys stellatus* from Korea. Kor J Fish Aquat Sci 47, 431-434.
- Kang EJ, Kim EM, Kim YJ, Lim SG, Sim DS, Kim YH and Park IS. 2005, Effect of lidocaine hydrochloride and clove oil as an anaesthetic on Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii* and oily bitterling, *Acheilognathus koreensis*. J Aquaculture 18, 272-279.

- Keene JL, Noakes DLG, Moccia RD and Soto CG. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult Res* 29, 89–101.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB and Cho KC. 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Gene Genom* 48, 179–186.
- Kim JH, Kang YJ, Kim KI, Kim SK and Kim JH. 2019. Toxic effects of nitrogenous compounds (ammonia, nitrite, and nitrate) on acute toxicity and antioxidant responses of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 67, 73–78.
- Kim YS, Deo YH, Min BH, Lim HG and Jang YG. 2009. Physiological responses of starry flounder *Platichthys stellatus* during freshwater acclimation with different speeds in salinity change. *J Aquaculture* 7, 28–33.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253–310.
- Kolomytkin OV, Dunn S, Hart FX, Frilot C, Kolomytkin D and Marino AA. 2007. Glycoproteins bound to ion channels mediate detection of electric fields: A proposed mechanism and supporting evidence. *Bioelectromagnetics* 28, 375–385.
- Kurita J, Oshiro T, Takashima F and Sakaizumi M. 1995. Cytogenetic studies on diploid and triploid oogenesis in interspecific hybrid fish between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *J Exp Zool*

273, 234-241.

- Lemoine HL Jr and Smith LT. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans Fish Soc* 109, 626-631.
- Liang YJ, Sun XJ, Ahang SL, Fu CD and Jiang ZQ. 2011. The effects of starvation and refeeding on growth and ingestion in Starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Fish Sci* 30, 125-131.
- Lim HK, Byun SG, Lee HJ, Park SU, Kim YC, Han HK, Min, BH and Lee BY. 2007. Sexual maturity and reproductive cycle of starry flounder *Platichthys stellatus* cultured in indoor tank. *J Aquaculture* 20, 212-218.
- NFRDI (National Fisheries Research and Development Institute). 2008. Manual of Starry Flounder Culture. 11, 1-105.
- Mair GC, Abucay JS, Beardmore JA and Skibinski DOF. 1995. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY males in *Oreochromis niloticus* L.: On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* 137, 313-323.
- McFarlane GA, Wydoski RS, Prince ED. 1990. Historical review of the development of external tags and marks. *American Fisheries Society Symposium* 7, 9-29.
- McKay LR, Ihssen PE and McMillan I. 1992. Growth and mortality of diploid and triploid tiger trout (*Salmo trutta* x *Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 106, 239-251.
- Minter LJ, Bailey KM, Harms CA, Lewbart GA and Posner L. 2014. The efficacy of alfaxalone for immersion anesthesia in koi

- carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Anaesth Analg* 41, 398-405.
- Mullerbelecke A and Horstgenschwark G. 1995. Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring. *Aquaculture* 137, 57-65.
- Mustafa S and Mittal A. 1982. Protein, RNA and DNA levels in liver and brain of starved catfish, *Clarias batrachus*. *J Ichthyol* 28, 396-400.
- Myers JM, Penman DJ, Basavaraju Y, Powell SF, Baoprasertkul P, Rana KJ, Bromage N and McAndrew BJ. 1995. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Theor Appl Genet* 90, 205-210.
- Noga EJ, Kerby JH, King W, Aucoin DP and Giesbrecht F. 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* × *Morone americana*). *Am J Vet Res* 55, 405-409.
- Olsen RL and Hasan M. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production, *Trends Food Sci Tech* 27, 120-128.
- Purdom CE. 1993a. Hybridization In: *Genetics and Fish Breeding*, Chapman & Hall, London, pp. 158-177.
- Purdom CE. 1993b. Chromosome engineering. In: *Genetics and Fish Breeding*, Chapman & Hall, London, pp. 204-222.
- Rainer W and Hans-Dieter B. 1993. Influence of glutamic acid on the

bitter taste of various compounds. Zeitschrift für  
Lebensmittel-Untersuchung und Forschung volume 197,  
pages 132 - 133.

Randall DJ and Tsui TKN. 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine  
Pollution Bulletin Volume 45, Issues 1 - 12, September 2002,  
Pages 17-23.

Ruijter JM and Bonga SEW. 1988. Allometric relation of total volumes  
of prolactin cells and corticotropic cells to body length in the  
annual cyprinodont *Cynolebias whiei*: effects of environmental  
salinity, stress and ageing. Cell Tissue Res 249, 477-483.

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.

Shiraishi M, Fujii K, Maruyama T and Maeda H. 1993. Basic research  
on aquaculture of sturgeon-I: Growth and vitellogenesis of  
hybrid sturgeon between female *Huso huso* and male  
*Acipenser ruthenus*, so-called "Bester". Bull Nat Res Inst  
Aquacult 22, 27-35.

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, USA,  
pp. 405-434.

Volckaert FAM, Galbusera PHA, Hellemans BAS, van den Haute C,  
Vanstaen D and Ollevier F. 1994. Gynogenesis in the African  
catfish (*Clarias gariepinus*). I. Induction of meiogynogenesis

- with thermal and pressure shocks. *Aquaculture* 128, 221-133.
- Weatherley AH and Gill HS. 1987. *The biology of fish growth*, vol. 4. Protein, lipid and caloric contents. Academic Press London, 139-146.
- Weber RA, Peleteiro JB, Martín LG and Aldegunde M. 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* 288, 147-150.
- Wohlfarth GW. 1994. The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. *Aquacult Fish Manage* 25, 781-788.

