

강도다리(*Platichthys stellatus*, ♀)와 돌가자미(*Kareius bicoloratus*, ♂) 간 잡종 3배체의 난발생

정효선 · 이일영¹ · 이효빈² · 김동수^{3*}

국립수산물연구원 생명공학과, ¹부경대학교 수산생물학과, ²목포대학교 해양수산자원학과, ³부경대학교 해양바이오신소재학과

Development of Allotriploid Embryos Produced by Crossing Female Starry Flounder *Platichthys stellatus* and Male Stone Flounder *Kareius bicoloratus*

Hyo Sun Jung, Il Yong Lee¹, Hyo Bin Lee² and Dong Soo Kim^{3*}

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Department of Fisheries Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Department of Marine & Fisheries Resources, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea

³Department of Marine Bio-Materials & Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

We investigated the development of allotriploid embryos derived from a cross between female starry flounder *Platichthys stellatus* and male stone flounder *Kareius bicoloratus*. The second cleavage, mid-blastula, gastrula, and Kupffer's vesicle appearance stages, and hatching of embryos began 3.7, 25.6, 45.7, 87.7, and 213.2 h after cold shock at 6°C, respectively. The hatching and development time of triploid interspecific hybrid eggs was approximately the same as those of diploid starry flounder eggs at the same incubation temperature.

Key words: Allotriploid, Embryonic development, Starry flounder, Stone flounder

잡종 3배체는 잡종의 유도를 및 생존율이 낮은 경우, 두 종간의 우량 형질을 유지하며 생존율을 높여 양식 산업에 이용할 수 있어 어류의 육종 방법 중 하나로 사용되고 있다(Scheerer and Thorgaard, 1983; Thorgaard, 1986; Piferrer et al., 2009; Jung et al., 2016).

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 가자미목(Pleuronectiformes), 가자미과(Pleuronectidae)에 속하는 저서성 어류로 넙치와 함께 우리나라 가자미류 양식의 대표적인 어종으로 연간 약 3,000톤이 생산 및 소비되고 있으며, 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 대신 할 양식어종으로 각광 받아 그 생산량이 크게 증가되고 있으나(Do et al., 2014), 성장이 느려 대형의 고급횡감으로 사용하기 위해서는 2년 이상 키워야 하는 문제점이 있어 대체로 당년 300-500그램 정도가 되면 폐채설

기 용(일명 세꼬시)으로 썬 값에 판매되어 수익성이 떨어지는 문제점과 성숙이 되면 물질대사가 급격히 증가되어 고수온기에 대량 폐사가 일어나는 단점이 있어 불임 어류의 양식이 절실한 실정이다.

돌가자미(*Kareius bicoloratus*)는 우리나라 전 해역에 서식하고 육질과 맛이 좋아 고급 횡감으로 각광받고 있어 경제적 가치가 높은 양식대상종이지만 고수온, 스트레스 및 질병에 약해 국내에서는 본격적인 양식이 이루어지지 못하고 있고, 중국에서는 자연산 종묘를 이용한 축적식 양식이 이뤄지고 있다(Jun et al., 2009).

이에 본 연구에서는 두 종간 우수한 특성을 가지며 불임으로 산란기 물질대사의 증가로 인한 대량 폐사를 방지 할 수 있는 잡종의 배수체를 유도하여, 그 발생 단계와 부화 자어의 형태 등을 조사함으로써 두 종간 잡종 3배체의 국내 양식 산업에 이용 가능성을 조사하고자하였다.

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5914 Fax: +82. 51. 629. 5908

E-mail address: dongskim@pknu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0298>

Korean J Fish Aquat Sci 52(3), 298-301, June 2019

Received 19 November 2018; Revised 11 December 2018; Accepted 16 May 2019

저자 직위: 정효선(연구원), 이일영(대학원생), 이효빈(대학원생), 김동수(교수)

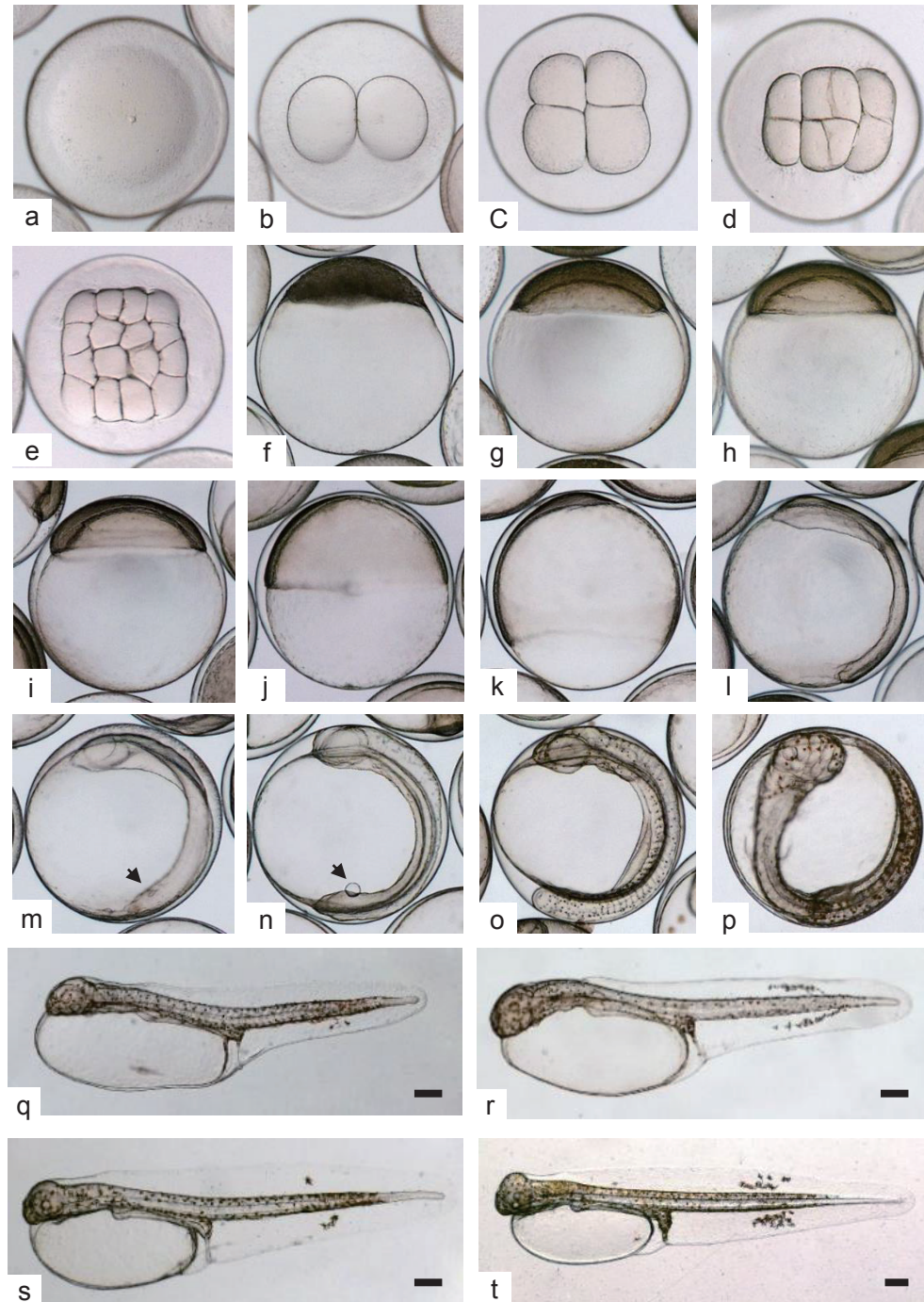


Fig 1. External morphology of the egg development stages (a-p) of the triploid interspecific hybrid of female starry flounder *Platichthys stellatus* and male stone flounder *Kareius bicoloratus* and yolk-sac larvae of triploid interspecific hybrid (q,s) and starry flounder (r,t). a: Blastodisc formed; b: 2 cell stage, 3.7 h; c: 4 cell stage, 5.8 h; d: 8 cell stage, 8.0 h; e: 16 cell stage, 9.0 h; f: mid-blastula stage, 25.6 h; g: 30% epiboly stage, 42.2 h; h: germ ring stage, 45.7 h; i: embryonic shield stage, 49.7 h; j: 50% epiboly stage, 61.2 h; k: 70% epiboly stage, 69.7 h; l: 90-95% epiboly stage, 81.0 h; m: Kupffer's vesicle appearance, 87.7 h; n: Kupffer's vesicle stage, 104.3 h; o: Kupffer's vesicle disappearance, 141.3 h; p: pre-hatching, 213.2 h; q: hatched larva of triploid interspecific; r: hatched larva of diploid Starry flounder; s: yolk-sac larva of triploid interspecific, 1 days after hatching; t: yolk-sac larva of diploid Starry flounder, 1 day after hatching; Arrows: Kupffer's vesicle. All scale bars indicate 200 μ m.

재료 및 방법

본 연구에 친어로 사용된 강도다리 암컷과 수컷 및 돌가자미 수컷은 전남 여수의 마린씨드사에서 양성 중인 친어를 사용하였다. 강도다리 암컷 3미로부터 복부압박법으로 확보된 난과 돌가자미 수컷 2미로부터 채취한 정자를 건식법으로 수정한 뒤, 제 2극체 방출 억제제를 위해 수정란을 저온 처리하였고, 이때 저온 처리조건은 Kim et al. (1994) 방법에 의거하여 수정 3분 후 2°C의 온도 조건하에서 45분간 저온 처리를 하였다. 실험은 3반복으로 수행하였고 대조군은 강도다리 난자와 정자를 수정한 배아를 사용하였다. 잡종 3배체의 생존을 확인을 위해 상기와 동일한 방법으로 수행하여 강도다리 2배체와 부화율을 비교한 결과, 강도다리 2배체는 $58.6 \pm 12.2\%$ 였고 잡종 3배체는 $36.4 \pm 14.6\%$ 였다.

배수체 분석은 유세포 분석기(PA II flow cytometer, Partec Co., Munster, Germany)를 이용하여 DNA 함량을 측정하였고, 잡종 3배체 부화자어 1미를 균질기로 세포를 파쇄한 후, Jung et al. (2016)의 방법론에 따라 핵막 제거 및 염색 과정을 수행하였다. 염색된 시료들은 PA II flow cytometry (Partec Co., Münster, Germany)를 이용 분석하였으며, 강도다리 혈액과 돌가자미의 정액을 대조군으로 사용하였다. 난발생은 $6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수온에서 발생을 유도하였고, 해부현미경(AZ 100, Nikon Co., Japan)과 이에 부착된 디지털 카메라로 관찰과 촬영을 하였다. 난 발생 단계는 Kimmel et al. (1995)의 기준에 의거하여 관찰하였고, 저온처리가 끝난 시기를 0시로 하여 수정란의 90% 이상이 동일한 단계에 도달하는 시기를 기준으로 기록하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 유도된 잡종 3배체의 DNA 함량을 분석한 결과 2.0 pg/cell로 나타나 강도다리의 2n (1.4 pg/cell)과 돌가자미 n (0.6 pg/cell)으로 구성되어 있음이 확인되었다.

부화 수온 6°C에서 잡종 3배체의 난 발생 과정은 Fig. 1과 같다. 저온 처리 후 3.7시간에 첫 번째 난할(cleavage)이 이루어져 배반(blastodisc)의 중앙 부위가 수직으로 이등분되어 2세포기가 되었고(Fig. 1b), 난할이 계속되어 8시간 후 8세포기(Fig. 1d), 9시간 후 16세포기가 되었고(Fig. 1e). 이후 계속적인 난할이 일어나 저온 처리 후 25.6시간에 포배기 중기(mid-blastula)가 되었다(Fig. 1f). 30% 피포(epiboly)는 저온 처리 후 42.2시간에 형성되었고(Fig. 1g), 45.7시간에 배환(germ ring)이 형성되었으며(Fig. 1h), 49.7시간에 배방패(embryonic shield)가 형성되었다(Fig. 1i). 배반엽이 식물극 방향으로 계속 확장되어 저온 처리 후 61.2시간에 50% 피포가 형성되었고(Fig. 1j), 81시간에 90-95% 피포가 형성되었다(Fig. 1l). Kupffer's vesicle은 저온 처리 후 87.7시간부터 작은 크기로 관찰되기 시작하여 104.3시간에 최대 크기가 되었고, 141.3시간에 소멸되었다(Fig. 1m-o). Kupffer's vesicle이 소멸된 후 꼬리가 형성되기 시작하여 저온

처리 후 213.2시간에 부화하기 시작하였다(Fig. 1q).

본 실험에서 나타난 잡종 3배체의 부화 소요 시간 및 발생 양상은 암컷으로 사용된 강도다리 발생과 유사한 것으로 확인되었으나, 부화자어의 경우 막지느러미 내 색소포의 분포범위가 암컷으로 사용된 강도다리에 비해 좁은 것으로 확인되었다. 이러한 색소포 분포 차이는 부계로 사용된 돌가자미의 영향에 기인한 것으로 보여진다. Jung et al. (2016)은 넙치와 강도다리 간 잡종 3배체의 난발생 양상은 두 종의 중간 형질을 나타내지만 모계로 사용된 넙치의 형질이 더 많이 나타난다고 보고한 바 있어 본 연구 결과와 동일한 것으로 확인되었다.

본 연구결과, 강도다리와 돌가자미 간 잡종 3배체의 정상적인 발생 및 생존이 확인되었다. 이에 이들의 산업적 가능성을 판단하기 위한 성장력, 생식력, 성비 및 친어로 사용된 두 종의 우량 형질 획득 유무 분석 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국립부경대학교 자율창의학술연구비(2017년)에 의하여 수행되었습니다.

References

- 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. Korean J Fish Aquat Sci 47, 630-636. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0630>.
- Jun JC, Kang HW, Kim BG, Choi KH and Jo KC. 2009. Fecundity and hatchability of natural stone flounder *Kareius bicoloratus* from the west coast of Korea. Korean J Ichthyol 21, 239-246.
- Jung HS, Ko MG, Lee HB and Kim DS. 2016. Development of allotriploid embryos from female olive flounder *Paralichthys olivaceus* crossed with male starry flounder *Platichthys stellatus*. Korean J Fish Aquat Sci 49, 628-634. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0628>.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 203, 253-310. <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Kim DS, Jeong CH, Lee YD and Rho S. 1994. Triploidy induction in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Aquaculture 7, 55-61.
- 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. <http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2012.24.6.1003>.

- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, Flajšhans M, Haffray P and Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, 125-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036>.
- Scheer PD and Thorgaard GH. 1983. Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. *Can J Fish Aquat Sci* 40, 2040-2044. <https://doi.org/10.1139/f83-235>.
- Thorgaard GH. 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57, 57-64. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90180-8](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(86)90180-8).