

# 북방전복 *Haliotis discus hannai*의 형태학적 성분화

김혜진, 전미애, 최지성, 김병학<sup>1</sup>, 손맹현<sup>1</sup>, 이정식

전남대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 남해수산연구소

## Morphological Sex Differentiation of the Abalone *Haliotis discus hannai*

Hyejin Kim, Mi Ae Jeon, Ji Sung Choi, Byeong Hak Kim<sup>1</sup>, Maeng Hyun Son<sup>1</sup> and  
Jung Sick Lee

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

<sup>1</sup>South Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Yeosu 59780, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to provide the reproductive biological information and basic data on the artificial sex control of *Haliotis discus hannai*. The morphological sex differentiation process of *H. discus hannai* could be classified into following five phases: 1) formation of gonad outer membrane (FGOM) ( $\leq$  SL  $10.0 \pm 1.0$  mm), 2) primordial germ cells (PGCs) appearance in the connective tissue between intestine and hepatopancreas (PAC), and formation of gonadal cavity (FGC) (SL  $15.0 \pm 2.0$  mm), 3) PGCs appearance in the epithelial layer of gonadal cavity (PAG) (SL  $18.0 \pm 2.0$  mm), 4) formation of gametogenic follicle and appearance of early oocytes and spermatogonia (FGOC) (SL  $21.0 \pm 2.0$  mm), 5) morphological sex differentiation (MSD) ( $\geq$  SL  $23.0 \pm 2.0$  mm). From histological analysis sex differentiation rate in SL 24.1-25.0 mm of *H. discus hannai* was 90.0% and sex ratio (female : male) was 1:0.8.

**Key words:** *Haliotis discus hannai*, sex differentiation

### 서 론

동물의 성은 유전학적 성과 형태학적 성으로 구분되는데, 성의 표현은 일반적으로 형태학적 성을 기준으로 한다. 전복류의 성체에서 생식소 구조, 생식소 조직의 계절적 변화 및 생식세포의 발달과정에 관해서는 비교적 많은 종에서 보고 되어왔지만, 초기생활사 동안 형태학적 성의 형성과정에 관한 정보는 매우 적다 (Lee, 1974; Wilson and Schiel, 1995; Capinpin *et al.*, 1998; Sobhon *et al.*, 1999; Awaji and Hamano, 2004; Visser-Roux, 2011; Kim *et al.*, 2015). 전복류의 형

태학적 성의 분화에 관한 연구는 이들의 성에 따른 성분화 시기의 차이 등 생식생물학적 기초정보 제공에 필요하다. 또한, 연체동물의 성결정 및 분화에는 유전적인 요인과 수온 등의 환경적인 요인들이 영향을 미치게 되므로 (Yusa, 2007; Chávez-Villalba *et al.*, 2011), 성분화에 관한 연구는 전복류의 양식 산업에서 성에 따른 초기생활사 동안 인위적인 성의 조절 등에 반드시 필요하다. 본 연구는 북방전복 *Haliotis discus hannai*의 초기생활사 동안 생식생물학적 정보를 제공하고 아울러 성분화 과정에 영향을 줄 수 있는 다양한 환경요인의 작용 및 성의 인위적인 조절에 필요한 기초정보를 제공하기 위한 연구의 일환으로 수행하였다.

Received: November 20, 2015; Revised: December 9, 2015;  
Accepted: December 30, 2015

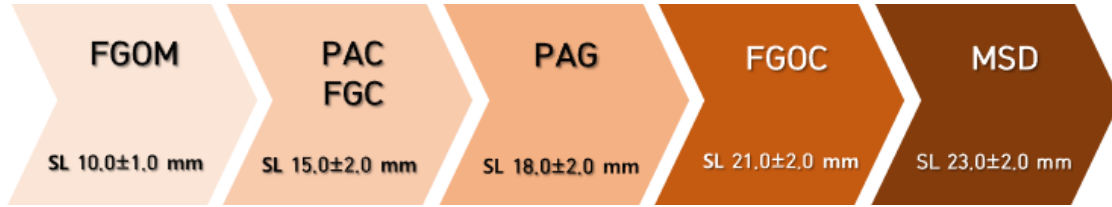
Corresponding author : Jung Sick Lee

Tel: +82 (61) 659-7172 e-mail: ljs@jnu.ac.kr  
1225-3480/24595

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

### 재료 및 방법

분석에는 2013년 11월 제주도 성산포 인근 전복 양식장에서 인공 수정하여 생산된 각장 8.0-35.0 mm의 북방전복 치패 120개체가 이용되었다. 채집한 개체는 우선 형태변형을 방지하기 위하여 1% 중성포르말린으로 일차 고정하였다. 그 후, 측정자를 이용하여 각장을 0.1 mm까지 측정하였다. 분석용



**Fig. 1.** Phase of morphological sex differentiation of the abalone, *Haliotis discus hannai*. **FGOM**: formation of gonad outer membrane. **PAC**: PGCs appearance in the connective tissue between intestine and hepatopancreas. **FGC**: formation of gonadal cavity. **PAG**: PGCs appearance in the epithelial layer of gonadal cavity. **FGO**: formation of gametogenic follicle and appearance of early oocytes and spermatogonia. **MSD**: morphological sex differentiation.

개체들은 측정 후 조직표본제작을 위해 Bouin's solution에 일정시간 이차 고정을 하였다. 각장 20.0 mm 이하의 개체는 발 근육 부위를 제거한 후 포매하여 종단면과 횡단면의 연속절편을 제작하였다. 각장 20.0 mm 이상의 개체는 생식소 부위가 포함된 간체장을 적출하여 파라핀 절편법에 의해 4-6  $\mu$ m 두께로 연속절편하여 조직표본을 제작하였다. 염색은 Mayer's hematoxylin과 0.5% eosin (H-E) 의 비교염색, AB-PAS (pH 2.5) 반응과 Masson 삼중염색을 실시하였다. 생물학적 시간 (biological time) 은 Awaji and Hamano (2004) 의 방법과 마찬가지로 개체간의 성장 차이를 고려하여 착저 후 일령으로 나타내지 않고 개체의 각장을 기준으로 하였다.

### 결과 및 고찰

복방전복 성체의 생식소는 긴 원뿔형으로 발달된 간체장을 둘러싸고 있으며, 외형의 색깔에 따라 난소는 진녹색, 정소는 옅은 노란색을 나타낸다. 성체의 난소와 정소는 각각 생식소 외막에서부터 간체장까지 생식소 내강 쪽으로 발달된 격벽에 의해 여러 개의 내강으로 구분되며, 각각의 내강에서 생식세포 형성소낭 (gametogenic follicle) 을 따라 생식세포들이 발달한다.

많은 복족류의 생식소는 다수의 생식세포형성소낭 (gametogenic follicle) 으로 구성되며, 각각의 소낭 내에서 생식세포의 분화 및 발달이 진행된다. 각 소낭 내에서 생식세포들의 발달은 비동시적으로 진행되며, 계절적으로 뚜렷한 변화를 보인다. 이러한 구조적 특징은 *Haliotis iris*와 *H. australis* (Wilson and Schiel, 1995), *H. asinina* (Capinpin et al., 1998; Sobhon et al., 1999), *H. varia* (Najmudeen and Victor, 2004), *Batillus cornutus* (Jung et al., 2007), *H. midae* (Visser-Roux, 2011) 와 동근전복 *H. discus discus* (Kim et al., 2015) 에서도 확인되었다.

복방전복의 성분화 과정을 조직학적으로 분석한 결과, 형태학적 성분화 과정은 크게 다음과 같이 1) 생식소 외막 형성 (FGOM), 2) 장과 간체장 사이의 결체조직에 시원생식세포

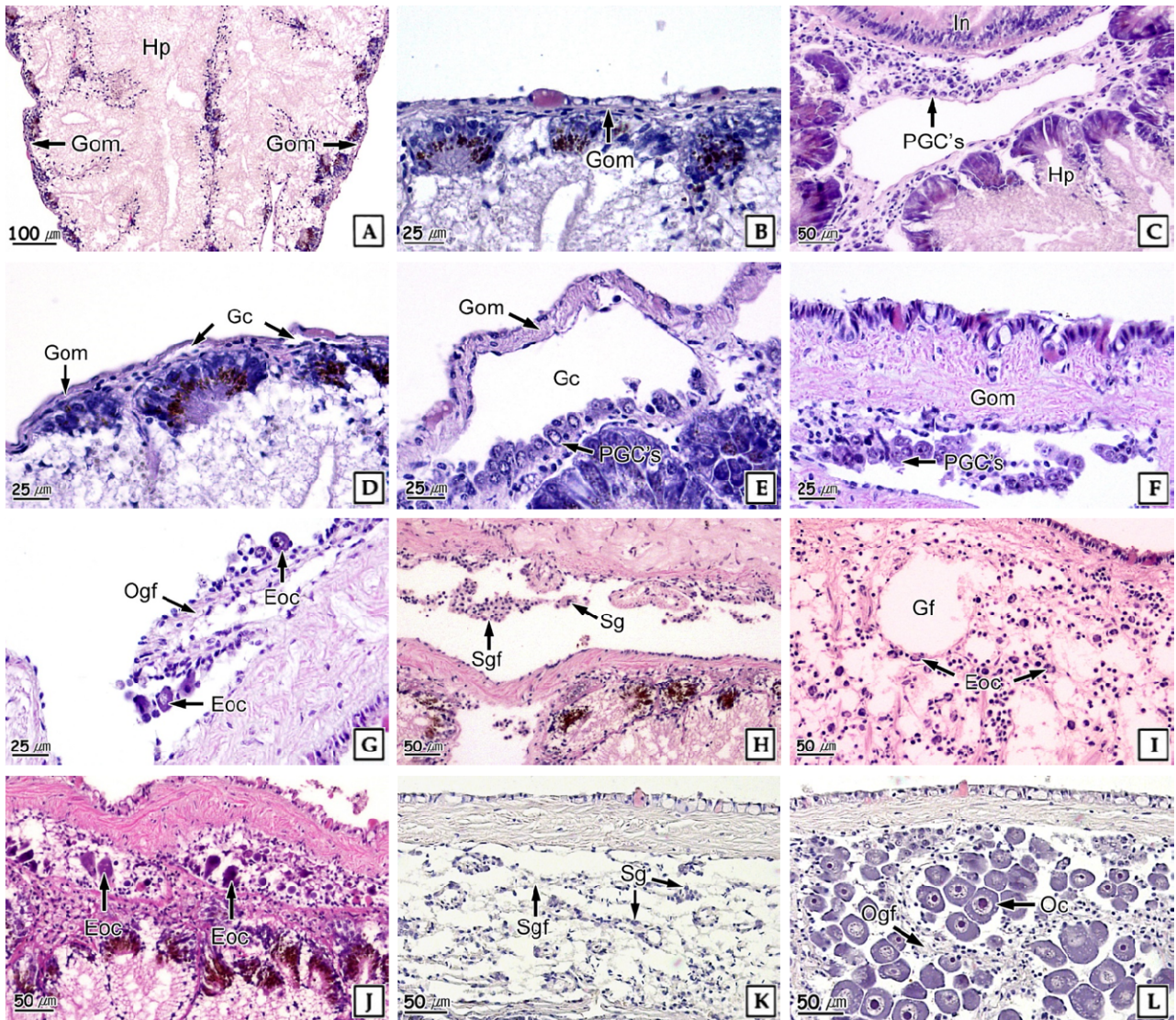
(PGCs: primordial germ cells) 출현 (PAC) 및 생식소 내강 형성 (FGC), 3) 생식소 내강 상피층에 PGCs 출현 (PAG), 4) 생식세포형성소낭 형성, 초기 난모세포 및 정원세포 출현 (FGO), 5) 형태학적 성분화 (MSD) 의 5단계로 구분할 수 있었다 (Fig. 1).

각장 10.0 mm 전후의 복방전복 치폐에서 간체장은 돌기모양으로 형성되어 육안으로 구분이 가능하며, 간체장의 외막은 이중막으로 형성되어 있다. 이 시기에 안쪽 상피층은 편평형 상피세포들로 구성되며, 바깥쪽 상피층은 편평형 상피세포들과 점액세포들로 구성되는데, 점액세포의 세포질은 AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 붉은색을 나타냈다 (Fig. 2A and B).

각장 15.0 mm 전후에는 장과 간체장 사이의 결체조직에서 처음으로 시원생식세포들의 확인이 가능하다. 이들 시원생식세포의 크기는 직경 약 7.4  $\mu$ m였으며, 핵의 크기는 약 4.7  $\mu$ m였다. H-E 염색결과, 시원생식세포의 핵은 강한 호염기성을 나타냈으며, 세포질은 호산성의 염색성을 보였다 (Fig. 2C). 또한, 이 시기에 간체장의 이중막 가운데 외막이 내막으로부터 분리 되면서 생식소 내강이 형성 된다 (Fig. 2D).

각장 18.0 mm 전후에는 생식소 내강이 뚜렷해지며, 생식소 내강의 기저부 상피층에는 시원생식세포들이 일렬로 배열된다. 이때, 시원생식세포의 형태는 타원형이며, 크기는 장경 약 10.8  $\mu$ m였으며, 핵의 크기는 약 7.2  $\mu$ m였다. 핵질에서는 핵막 주변을 따라 강한 호염기성을 나타내는 이형염색질이 발달되어 있으며, 핵 중앙부에는 호염기성의 인이 위치하고 있었다. 이 시기에 생식소 외막은 이중막으로 안쪽 상피층과 바깥쪽 상피층 사이에는 섬유성 결합조직층이 발달되어 있었으며, 각각의 상피층을 구성하는 상피세포들의 형태는 여전히 편평형이었다 (Fig. 2E).

각장 21.0 mm 전후에는 생식소 내강에 격벽이 형성되고 각각의 격벽 사이에 생식세포형성소낭이 발달되며, 각각의 소낭 기저부 결체조직에서는 시원생식세포들이 증가하며 배열된다. 이 시기에 생식소 외막의 섬유성 결합조직층은 두껍게 발달되어 있었으며, 바깥쪽 상피층은 입방형 또는 원주형 상피세포들과 점액세포들로 구성되며, 안쪽 상피층은 편평형 상피세



**Fig. 2.** Photomicrographs on the morphological sex differentiation of the abalone, *Hailotis discus hannai*. **A** and **B**: formation of gonad outer membrane (SL 10.2 mm). **C**: PGC's appearance in the connective tissue between intestine and hepatopancreas (SL 15.7 mm). **D**: formation of gonadal cavity (SL 16.3 mm). **E**: PGC's appearance in the epithelial layer of gonadal cavity (SL 18.5 mm). **F**: PGC's appearance and formation of gametogenic follicle (SL 21.4 mm). **G**: formation of oogenic follicle and early oocytes (SL 23.5 mm). **H**: formation of spermatogenic follicle and spermatogonia (SL 23.8 mm). **I**: development of gametogenic follicle and early oocytes (SL 26.5 mm). **J**: growing of early oocytes (SL 27.0 mm). **K**: formation of spermatogenic follicle and spermatogonia (SL 26.8 mm). **L**: development of spermatogenic follicle and spermatogonia (SL 32.0 mm). Eoc: early oocyte, Gc: gonadal cavity, Gf: gametogenic follicle, Gom: gonad outer membrane, Hp: hepatopancreas, In: intestine, Ogf: oogenic follicle, PGC's: primordial germ cells, Sg: spermatogonia, Sgf: spermatogenic follicle.

포들로 구성되어 있었다 (Fig. 2F).

각장 23.0 mm 전후에 생식세포형성소낭의 기저부 결체조직에서는 초기 난모세포들과 정원세포들이 구분되기 시작한다. 이때 초기 난모세포들은 직경 약 15 μm 내외로 세포질은 호염기성을 나타내며, 핵질에서는 염색사의 구분이 가능하다. 정원세포들은 직경 약 10 μm 내외로 세포질은 호산성을 나타

내며, 핵 내에서는 인이 뚜렷하게 관찰된다 (Fig. 2G and H).

각장 27.0 mm 이후의 북방전복 치패의 생식소에서는 생식세포형성소낭들이 뚜렷하게 발달된 조직상의 확인이 가능하며, 각각의 난자형성소낭과 정자형성소낭에서는 초기 난모세포와 정원세포들의 증가가 뚜렷하게 관찰된다 (Fig. 2I, J and K).

이후 각장 30.0 mm 이상의 북방전복 치패의 난소에서는

직경 약 30  $\mu\text{m}$  내외의 초기 난모세포들이 확인되는데, H-E 염색결과, 이들의 세포질은 호염기성을 나타내며 핵질에서는 뚜렷한 인과 염색사의 관찰이 가능하다 (Fig. 2L).

Awaji and Hamano (2004) 의 북방전복의 성분화 및 생식소 형성에 관한 보고에 의하면 생식소 내강의 형성은 각장 7 mm 이상의 치폐에서 시작되며, 이때부터 생식소 내강에서 시원생식세포들이 관찰된다. 시원생식세포의 크기는 8-13  $\mu\text{m}$  이며 대형의 핵을 가진다. 그리고 각장 21 mm 이상에서는 염색인기단계 (chromatin nucleolus stage) 의 초기 난모세포들이 관찰됨으로써 성의 구분이 가능하다. 이러한 결과와 본 연구 결과를 비교해보면 시원생식세포들이 처음 확인되는 위치와 시기 그리고 생식소 내강의 형성 시기는 차이가 있으나 성의 구분이 가능한 시기는 유사한 것으로 나타났다.

북쪽류의 성결정 및 성성숙 등의 생식에는 유전적인 요인과 수온 등의 물리적 요인 및 화학적 요인들이 영향을 미치는데 (Fretter, 1984), Awaji and Hamano (2004) 는 수중의 내분비계장애물질 (endocrine disrupting chemicals: EDCs) 과 같은 화학적 요인들이 북방전복의 성분화 및 생식소 형성에 영향을 줄 수 있는 가능성을 언급하였다. 따라서 본 연구와 기존 연구 결과의 차이에 관해서는 물리·화학적 요인과 함께 추후의 연구가 필요하다.

북방전복의 각장 24.1-25.0 mm 그룹에서 조직학적으로 성이 구분되는 성분화율은 90.0% (n = 18/20) 였으며, 성비 (암:수) 는 1:0.8 (n = 10:8) 로 나타났다.

전복류의 성비 (암:수) 는 *H. cracheroidii* (Weber and Giese, 1969), *H. rufescens* (Young, 1970), *H. australis* (Wilson and Schiel, 1995), *H. asinina* (Capinpin et al., 1998) 및 *H. varia* (Najmudeen and Victor, 2004) 는 약 1:1로 보고되었다. 하지만, 뉴질랜드 남섬의 Dunedin 인근의 두 지역에서 채집된 *H. iris*에서는 성비가 각각 1:1과 1.7:1로 다르게 보고되었는데, 이에 관한 원인은 언급되지 않았다 (Wilson and Schiel, 1995). 한국에서 전복류의 성비는 부산 인근 해역에서 채집한 말전복 *H. gigantea*, *H. sieboldii*, 등근전복 및 북방전복에서는 약 1:1로 보고되었다 (Lee, 1974). 그리고 진도에서 채집된 북방전복에서는 1:0.8 (Park et al., 2014) 로 보고되었으며, 제주도에서 채집된 등근전복에서는 1:0.7로 암컷의 비율이 수컷 비율보다 다소 높았으나 암수사이 에 유의적인 차이는 없었다 (Kim et al., 2015).

## 요 약

본 연구는 북방전복의 생식생물학적 정보를 제공하고 아울러 성의 인위적인 조절에 필요한 정보를 제공하기 위하여 수행하였다. 북방전복의 형태학적 성분화 과정은 크게 다음과 같이

5단계로 구분할 수 있었다. 1) 생식소 외막 형성 (FGOM) ( $\leq$  SL 10.0  $\pm$  1.0 mm), 2) 장과 간체장 사이의 결체조직에 시원생식세포 (PGCs: primordial germ cells) 출현 (PAC) 및 생식소 내강 형성 (FGC) (SL 15.0  $\pm$  2.0 mm), 3) 생식소 내강 상피층에 PGCs 출현 (PAG) (SL 18.0  $\pm$  2.0 mm), 4) 생식세포형성소낭 형성, 초기 난모세포 및 정원세포 출현 (FGOC) (SL 21.0  $\pm$  2.0 mm), 5) 형태학적 성분화 (MSD) ( $\geq$  SL 23.0  $\pm$  2.0 mm). 조직학적 분석 결과, 각장 24.1-25.0 mm 그룹에서 북방전복의 성분화율은 90.0%였으며, 성비 (암:수) 는 1:0.8로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청의 Golden Seed 프로젝트 사업과 국립수산물과학원 (전복 가두리양식 생산성향상 및 표준화 연구 15-AQ-51) 지원으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Awaji, M. and Hamano, K. (2004) Gonad formation, sex differentiation and gonad maturation processes in artificially produced juveniles of the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture*, **239**: 397-411.
- Capinpin Jr., E.C., Encena II, V.C. and Bayona, N.C. (1998) Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linné. *Aquaculture*, **166**: 141-150.
- Chávez-Villalba, J., Soyez, C., Huvet, A., Gueguen, Y., Lo, C. and Le Moullac, G. (2011) Determination of gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Shellfish Research*, **30**: 231-240.
- Fretter, T. (1984) Prosobranchs. *In*: The Mollusca, Vol. 7. Reproduction. (ed. by Tompa, A.S., Verdonk, N.H. and van den Biggelaar, J.A.M.). pp. 1-45. Academic Press, New York.
- Jung, G.K., Park, J.J., Ju, S.M., Jin, Y.G. and Lee, J.S. (2007) Ovarian structure and oogenesis of the spiny top shell, *Batillus cornutus* (Lightfoot, 1786) (Gastropoda: Turbinidae). *The Korean Journal of Malacology*, **23**: 209-216.
- Kim, J.W., Lee, B.W., Kang, J.C., Min, E.Y., Won, S.H., Lim, H.G., Kang, S.W., Jeon, M.A. and Lee, J.S. (2015) Reproductive cycle of the abalone, *Haliotis discus discus* collected from Jeju Island of Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **31**: 21-26.
- Lee, T.Y. (1974) Gametogenesis and reproductive cycle of abalones. *Publications of the Marine Laboratory, Busan Fisheries College*, **7**: 21-50.
- Najmudeen, T.M. and Victor, A.C.C. (2004) Reproductive biology of the tropical abalone *Haliotis varia* from Gulf of Mannar. *Journal of Marine Biological*

- Association of India*, **46**: 154-161.
- Park, M.W., Kim, H., Kim, B.H., Son, M.H., Choi, J.S. and Lee, J.S. (2014) Reproductive cycle of the abalone, *Haliotis discus hannai* collected from Jindo of Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **30**: 243-248.
- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, S.E. and Poomthong, T. (1999) Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *ScienceAsia*, **25**: 3-21.
- Visser-Roux, A. (2011) Reproduction of the South African abalone, *Haliotis midae*. Ph.D. Dissertation, pp. 88, University of Stellenbosch, Stellenbosch.
- Webber, H.H. and Giese, A.C. (1969) Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone, *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Marine Biology*, **4**: 152-159.
- Wilson, N.H.F. and Schiel, D.R. (1995) Reproduction in two speies of abalone (*Haliotis iris* and *H. australis*) in southern New Zealand. *Marine and Freshwater Research*, **46**: 629-637.
- Young, J.S. (1970) The reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone *Haliotis rufescens* (Swaison). *California Fish and Game*, **56**: 298-309.
- Yusa, Y. (2007) Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca - an overview. *American Malacological Bulletin*, **23**: 89-98.