

3배체 산천어(*Oncorhynchus masou*) 유도

박인석 · 김형배*

군산대학교 해양개발학과
*한국해양연구소 해양생물공학연구그룹

Induction of Triploid Cherry Salmon, *Oncorhynchus masou*

In-Seok PARK and Hyung-Bae KIM*

Department of Marine Development, Kunsan National University,
Kunsan 573-360, Korea

*Marine Biotechnology Research Group, KORDI,
Ansan P. O. Box 29, Ansan 425-600, Korea

ABSTRACT

Induction of triploid cherry salmon, *Oncorhynchus masou* was performed by the heat shock procedure. The triploids were induced by 15 and 20 min heat shock treatments after 10 min fertilization at 28°C. Incidences of the triploidy were 91.4% and 89.8%, respectively.

Nucleus and erythrocyte from the induced triploids larger than those of the diploids in major axis, minor axis, major axis/minor axis, surface area and volume. The chromosome number of diploid was $2n=66$ (17 pairs of metacentrics or submetacentrics, 16 pairs of acrocentrics or telocentrics), and that of triploid was $3n=99$. Satellites were observed in the short arm of the largest telocentrics, and these may be useful marker to determine the polyploidization. Diploid have outgrown to triploid, and female have also outgrown to male in the triploid group during the 22 months of observation period after hatching. During the spawning season, 22 to 26 months after hatching, diploid were observed the growth retardation because of their sexual maturation, however the triploid showed continuous growth.

서 론

척추동물에서 염색체 반수체의 첨가 및 제거에 관한 연구는 금세기 초부터 시작되었으며, 실험적인 처녀생식 즉, 수컷의 유전물질없는 배체의 생산은 양서류에서 최초로 보고되었다. 이러한 처녀생식 유도는 바늘로 미수정난을 찌르거나, 미수정난에 저온처리가 효과적이며 처녀생식성 배체는 제 1 난할의 지연 즉, 제 1 체세포분열이 억제됨으로 2배체가 될 수 있다(Bataillon 1911; Frankhauser 1945; Levy 1913).

어류를 대상으로 염색체조작(chromosome manipulation)에 관한 연구로는 Svårdson (1945)이 연어류인 powan, *Coregonus lavaretus* 그리고 대서양연어, *Salmo salar* 와 brown trout, *S. trutta*의 잡종 개체들에서 3배체를 발견하였고 이러한 3배체는 제 2 감수분열을 거치지 않은 수정란에 기인된다고 제안하였으며, 저온처리를 가하여 3배체를 역시 유도한 바 있다. 이후 큰가시고기류, *Gasterosteus aculeatus*의 수정란에 저온처리, 고온처리로 3배체가 유도된 바 고온처리시 발생 후반부의 사망율이 높아 고온처리에 비해 저온처리가 3배체 유도에 효과적이었으며 이들 유도 3배체를 성체까지 사육하여 그들의 성장, 성숙을 2배체와 비교한 바 있다(Swarup 1959a & b).

3배체 유도시 이와같이 수정란에 사용되는 온도처리는 제 2 감수분열시 방추사의 역할과 제 2 극체 방출에 영향을 미쳐 모계 염색체의 부수적인 반수체가 유지되어 결과적으로 2배체 난의 전핵과 반수체 정자 전핵과의 융합이 이루어지게 한다. 어류에서 빈번히 관찰되는 자연발생성 3배체는 이러한 기작에 의해 생성된다고 보고되고 있다(Gold and Avise 1976; Thorgaard and Gall 1979).

어류 3배체 유도시 주 관심이 되는 것은 체형을 크게 하는 것이지만 어류의 경우 3배체가 2배체에 비해 반수체 증가로 인해 비록 세포 크기의 증가는 보이나 세포 수의 감소로 체형 증가는 상쇄됨을 보이고 있다(Beatty and Fishberg 1951). 그렇지만 3배체는 산란기에 정상적인 생식소 발달을 하지않으며 생식소지수도 매우 낮고 이수체 배우자를 생산하므로 기능적으로 불임으로 된다(Lincoln and Scott 1984; Thorgaard 1983), 이와 같이 3배체의 불임으로 인해 3배체는 생식에 사용되는 에너지를 체성장으로 전환하므로 성적성숙기에 2배체에 비해 성장이 지속되며 양식산업의 관점에서 정상 2배체에서 산란기에 나타나는 여타 불리한 현상인 식욕감퇴, 사료효율 감소, 육질감소 및 산란 후의 사망 등을 억제 시킬 수 있다(김 등 1990; Ihssen *et al.* 1990).

현재까지 발견 및 유도된 어류 3배체는 49종(23과 11목)이고 이중 주종을 이루는 것은 연어과 어류(99사례), 잉어과 어류(25사례)로서 연어과 어류 중 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (66사례)와 잉어과 어류 중 초어, *Ctenopharyngodon idella* (13사례)가 가장 많이 보고되고 있으며, 이들 연구의 대부분은 배수체 어류의 생산 가능성, 세포유전학적 연구, 생리학적 연구 및 수산분야에서의 적용 가능성 등에 집중되고 있다(Benfey 1989; Thorgaard 1983, 1986).

국내에서 어류 3배체에 관한 연구로는 양식산업 어종인 참돔, *Pagrus major* (박 등 1994) 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus* (김 등 1990) 와 차멜메기, *Ictalurus punctatus* (Kim *et al.* 1990) 그리고 무지개송어(Kim *et al.* 1986, 1988) 를 대상으로 세포유전학적, 양식산업적 연구가 이루어진 바 있으며, 미꾸리, *Misgurnus anguillicaudatus* 와 미꾸라지, *M. mizolepis* 의 잡종 3배체가 유도된 바(박 1992) 있어 앞으로 양식산업에서 양식대상 어종 확대 및 이들 양식대상 어종의 양식산업에서의 안정적 정착이 이루어질 경우 이들에 대한 3배체화는 3배체의 불임화와 아울러 그 부수적인 효과로 인해 양식산업적 수요가 클 것으로 예상된다.

산천어, *Oncorhynchus masou* 는 국내에서의 연간 총 생산량은 비록 적지만 냉수성 양식 어류의 다양화시 산천어 자체의 높은 육질로 인해 앞으로 양식 확대 대상어종으로 각광 받을 수 있는 냉수성 어종이다. 그러나 산천어 성숙기에서의 암·수간 동시적인 성적 성숙이 잘 이루어지지 않으며, 암·수 혼합사육시 성적 성숙기에서의 수컷간 싸움, 수컷의 암컷에 대한 공격 등으로 폐사가 일어나고 성적 성숙에 기인된 육질저하와 아울러 검은 혼인색이 나타나며 특히 수컷에서는 두부의 변형 등으로 상품가치가 떨어진다. 또 산천어는 연어속 특유의 1회 산란 후 죽는 특성을 나타내고 있다.

본 연구는 이와같은 산천어 양식시의 문제점을 해결하기 위한 방편으로 산천어 3배체를 유도하였고 이들 3배체의 세포크기, 인염색, 염색체수의 조사 및 핵형 확인 등의 세포유전학적 연구를 실시하였다. 아울러 양식산업적 측면에서의 2배체, 3배체의 성장을 비교 하였으며 성적 성숙기의 3배체

생식소의 불임성을 외형적, 조직학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

산천어 3배체를 유도하기 위하여 수정난을 수정 10분 후에 28℃ 및 30℃의 수온에 5, 10, 15 및 20분간 각각 처리하였으며 수정 20분 후에 28℃ 및 30℃의 수온으로 5, 10, 15 및 20분간 각각 처리하였다. 처리시 대조군을 설정하였으며 각 대조군 및 각 실험군을 대상으로 발안율, 부화율, 부화시기형율, 부화기부터 부화후 137일 까지의 생존율, 3배체율 및 3배체 생산율을 조사하였다.

산천어 2배체, 3배체 적혈구 크기 측정을 위하여 성체 산천어 2배체, 3배체의 미병부로부터 적혈구를 채취하여 slide에 도말하고 고정한 다음 May-Grünbaldt Giemsa 혹은 Giemsa로 염색후 고배율($\times 1,000$)의 현미경 하에서 관찰하였다. 2배체, 3배체 각 20개체로부터 개체당 200개 이상의 적혈구 세포 및 핵의 장·단경을 micrometer로 측정하였으며 표면적(S)은 $1/4ab\pi$ (Sezaki and Kobayashi 1978)로 부피(V)는 $4/3\pi(a/2)(b/2)^2$ (Lemoine and Smith 1980)로 계산하였다(a, 세포 및 핵의 장경; b, 세포 및 핵의 단경). 산천어 2배체, 3배체 적혈구 세포 및 핵의 각 측정항목에서의 유의성 검정은 student's, t-test에 의하였다. 아울러 발안란(eyed embryo)을 대상으로 Gold (1984)의 방법에 의거 인(nucleolus)을 silver 염색한 후 2배체, 3배체의 차이를 비교하였다.

산천어 2배체, 3배체의 염색체 수 조사 및 핵형분석은 신장직접법(kidney direct method)에 의하였다. 즉 colchicine을 적정농도(1~10 $\mu\text{g/g}$ 체중)로 복강주사하여 3~4시간 후 신장을 적출하여 이를 균등 세절하고 저장액 처리후 고정액(methanol : glacial acetic acid = 3:1)으로 3회에 걸쳐 고정하였다. 표본은 고정이 완료된 세포를 공기건조법(air drying method)으로 제작하였으며 5% Giemsa (Gurr's R-66) 용액으로 10~15분간 염색하였다. 염색체수는 현미경($\times 1,000$) 하에서 각 개체당 최소한 20여개의 선명한 염색체 중기상을 대상으로 계수 하였으며 핵형은 Levan *et al.* (1964)의 방법에 의거하였다.

2배체, 3배체 그리고 이들의 암컷, 수컷 성장을 조사하기 위하여 부화부터 부화 후 10개월까지는 200 l 용 원형수조에서 먹이를 충분히 공급하여 사육하면서 2개월 간격으로 5번에 걸쳐 2배체, 3배체 암·수 각 20마리씩 표본하여 체중을 0.1 g 단위로 측정하였다. 2배체, 3배체의 구분은 적혈구 크기 조사에 의하였으며 암·수 판별은 생식소 압착법에 의하였다. 부화 후 10개월 부터는 적혈구 크기 측정에 의해 분리된 2배체, 3배체 각 1,000마리 씩을 raceway 수조에서 18개월 동안 수용하여 먹이를 충분히 공급하며 사육하였다. 2개월 간격으로 2배체, 3배체군에서 각 50마리 씩을 표본하여 생식소 외형 및 생식소 압착법에 의한 암·수를 구별 후 2배체 암컷, 2배체 수컷, 3배체 암컷 및 3배체 수컷의 체중을 0.1 g 단위로 측정하였다. 아울러 산천어 2년산 암컷 2배체 및 4년산 암컷 3배체 각각 20마리를 대상으로 전장을 mm단위로 측정하였다.

산란기에 2배체, 3배체의 생식소 성숙상태 파악을 위하여 생식소의 외부형태를 관찰하였다. 아울러 이들 생식소를 10% 중성포르말린에 고정 하였으며 고정된 표본은 Bouin's 용액에 24시간 재고정 하여 파라핀 조직절편법에 따라 4~6 μm 로 조직절편을 만들어 Harris's haematoxylin과 eosin-phloxin B로 염색후 조직학적 분석을 실시하였다.

결 과

각 처리조건에서의 발안율, 부화율, 부화시 기형율, 생존율, 3배체율 및 3배체 생산율은 Table 1과

같다. 동일 온도, 동일 최초처리시간에서는 처리시간이 길어질수록 발안율, 부화율 및 생존율은 낮아지는 경향을 보였으나 부화시 기형율, 3배체율, 3배체 생산율은 일반적으로 증가하였다. 3배체

Table 1. Survival rates and ploidy ratios in cherry salmon, *Oncorhynchus masou* following various heat shock treatments

Experiment No.	Temperature (°C)	Time after insemination (min)	Duration of shock (min)	Rate of eyed eggs (%)	Hatching rate (%)	Abnormal rate of hatched eggs (%)	Survival rate (%)	Triploid rate* (%)	Triploid yield** (%)
1	Control	-	-	89.6	91.4	3.1	87.6	0/30 (0)	0
	28	10	5	80.0	88.3	6.3	86.3	10/30 (33.3)	32.8
	28	10	10	76.4	82.2	7.5	84.2	17/29 (58.6)	56.3
	28	10	15	71.7	77.5	8.3	82.8	29/30 (96.7)	91.4
	28	10	20	64.8	70.5	15.2	78.7	28/28 (100)	89.8
	28	20	5	83.4	89.8	5.9	87.0	4/30 (13.3)	13.2
	28	20	10	80.9	88.1	7.7	83.2	7/30 (23.3)	22.1
	28	20	15	76.5	87.0	9.8	85.3	11/25 (44.0)	42.8
	28	20	20	72.6	82.3	10.3	84.2	24/30 (80.0)	76.9
2	Control	-	-	92.4	92.6	2.6	91.3	0/30 (0)	0
	30	10	5	72.5	85.7	11.7	80.8	14/30 (46.7)	41.3
	30	10	10	67.1	78.8	16.4	80.9	16/27 (59.3)	52.5
	30	10	15	56.2	67.9	15.9	78.0	23/30 (76.7)	65.5
	30	10	20	44.8	68.4	23.7	76.5	24/26 (92.3)	77.3
	30	20	5	81.8	90.9	6.5	87.7	8/29 (27.6)	26.5
	30	20	10	77.0	81.4	8.3	85.2	14/30 (46.7)	43.6
	30	20	15	64.3	79.0	10.9	79.5	18/30 (60.0)	52.2
	30	20	20	58.1	74.6	12.5	80.4	25/28 (89.3)	78.6

* From hatching to 137 days after fertilization.

** Triploid yield = $\frac{\text{survival rate of treated eggs}}{\text{survival rate of control eggs}} \times \text{percent of triploid}$

3배체 산천어(*Oncorhynchus masou*)유도

생산율은 처리수온 28℃에서 수정 20분 후에 20분 처리군과 처리수온 30℃에서 수정 10분 후, 20분 후에 20분씩 처리한 경우 각 처리군에서 비교적 높게 76.9%, 77.3%, 78.6%로 나타났고, 수온 28℃에서 수정후 10분에 15분간, 20분간 처리는 각각 91.4%, 89.8%로서 전체 실험군에서 최대값을 보여 산천어 3배체 유도시 적절한 처리 조건임이 판명되었다.

산천어 2배체, 3배체의 적혈구 크기 측정 결과는 Table 2 및 Fig. 1과 같다. 2배체 적혈구 세포의 장축 및 단축은 각각 13.16 μm , 8.13 μm 로 나타났으며, 3배체 적혈구 세포의 장축 및 단축은 각각 17.01 μm , 9.51 μm 로 나타나 3배체가 2배체에 비해 적혈구 세포의 장축 및 단축에서 각각 1.29배, 1.17배의 크기증가 효과를 보였다. 적혈구 세포의 단축에 대한 장축의 증가비는 2배체가 1.62배, 3배체가 1.79배로 3배체가 2배체에 비해 1.10배의 크기 증가를 보였다. 적혈구 세포의 표면적은 2배체가 82.7 μm^2 으로 3배체 적혈구 세포의 표면적 127.6 μm^2 이 2배체 적혈구 세포의 표면적에 비해 1.54배의 표면적 증가를 보였다. 적혈구 세포의 부피는 2배체가 453.6 μm^3 으로 3배체 적혈구 세포의 부피 807.2 μm^3 이 2배체에 비해 1.78배의 부피 증가를 보였다.

Table 2. Measurement of erythrocytic characters for diploid and triploid cherry salmon

Variable	Diploid	Triploid	Ratio of triploid to diploid
Cell*			
Major axis (μm)	13.16 \pm 0.76	17.01 \pm 1.27	1.29 ^a
Minor axis (μm)	8.13 \pm 0.53	9.51 \pm 0.68	1.17 ^a
Major axis/ Minor axis	1.62 \pm 0.07	1.79 \pm 0.08	1.10 ^b
Surface area (μm^2)	82.70 \pm 7.3	127.60 \pm 9.7	1.54 ^a
Volume (μm^3)	453.60 \pm 34.5	807.20 \pm 67.8	1.78 ^a
Nucleus*			
Major axis (μm)	6.28 \pm 0.41	8.54 \pm 0.83	1.36 ^a
Minor axis (μm)	4.11 \pm 0.31	5.43 \pm 0.57	1.32 ^a
Major axis/ Minor axis	1.53 \pm 0.06	1.75 \pm 0.09	1.14 ^a
Surface area (μm^2)	19.80 \pm 1.3	34.70 \pm 2.4	1.75 ^a
Volume (μm^3)	55.90 \pm 9.7	129.20 \pm 9.5	2.31 ^a

* Values are means \pm S.D.

^a Significant at P < 0.01; ^b Significant at P < 0.05.

2배체 적혈구 핵의 장축 및 단축은 각각 6.28 μm , 4.11 μm 로 나타났으며, 3배체 적혈구의 핵 장축 및 단축은 각각 8.54 μm , 5.43 μm 로 나타나 3배체가 2배체에 비해 적혈구 핵의 장축 및 단축에서 각각 1.36배, 1.32배의 크기 증가 효과를 보였다. 적혈구 핵의 단축에 대한 장축의 증가비는 2배체가 1.53배, 3배체가 1.75배로 3배체가 2배체에 비해 핵 단축에 대한 장축의 증가비에서 1.14배의 크기 증가를

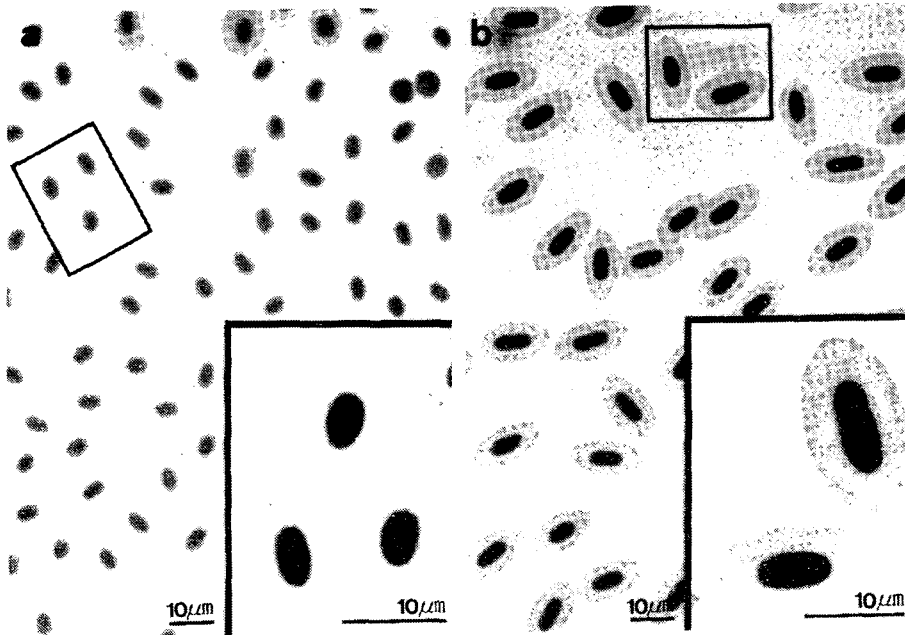


Fig. 1. Photomicrographs of diploid (a) and triploid (b) erythrocytes of cherry salmon *Oncorhynchus masou*.

를 보였다. 적혈구 핵의 표면적은 2배체가 $19.8 \mu\text{m}^2$ 으로 3배체 적혈구 핵의 표면적 $34.7 \mu\text{m}^2$ 이 2배체 적혈구 핵 표면적에 비해 1.75배의 표면적 증가를 보였다. 적혈구 핵의 부피는 2배체가 $55.9 \mu\text{m}^3$ 으로 3배체 적혈구 핵의 부피 $129.2 \mu\text{m}^3$ 이 2배체 적혈구 핵의 부피에 비해 2.31배의 부피 증가를 보였다.

산천어 2배체, 3배체의 적혈구 인(nucleolus)을 조사한 결과 인의 수/세포에서 산천어 2배체(Fig. 2a)는 1 및 2를 나타내었으며, 산천어 3배체(Fig. 2b)는 1, 2 및 3을 나타내었다.

산천어 2배체의 염색체 수 및 핵형분석시(Fig. 3a) heteromorphic sex chromosome은 발견할수 없었으며 산천어 2배체의 염색체 수는 $2n=66$ 으로서 17쌍의 metacentrics 혹은 submetacentrics와 16쌍의 acrocentrics 혹은 telocentrics로 이루어졌고 arm 수는 104개 이었으며 가장 큰 telocentrics 1쌍의 단완에 부수체가 존재하였다. 산천어 3배체(Fig. 3b)는 $3n=99$ 로서 2배체와 비교시 핵형은 동일하였으나 각 조에서 3개의 염색체로 구성되어 배수화에 따른 반수체의 DNA 증가현상을 나타내었다.

2배체, 3배체의 암컷, 수컷의 부화 후 28개월까지의 평균 성장의 결과는 Fig. 4와 같다. 2배체 암컷의 부화 후 2개월, 4개월, 6개월, 8개월 및 10개월에서의 체중은 1.5 g, 3.1 g, 6.2 g, 19.8 g 및 53.8 g, 3배체 암컷 체중은 1.4 g, 2.8 g, 5.8 g, 17.4 g 및 47.7 g 이었고 같은기간 동안 2배체 수컷 체중은

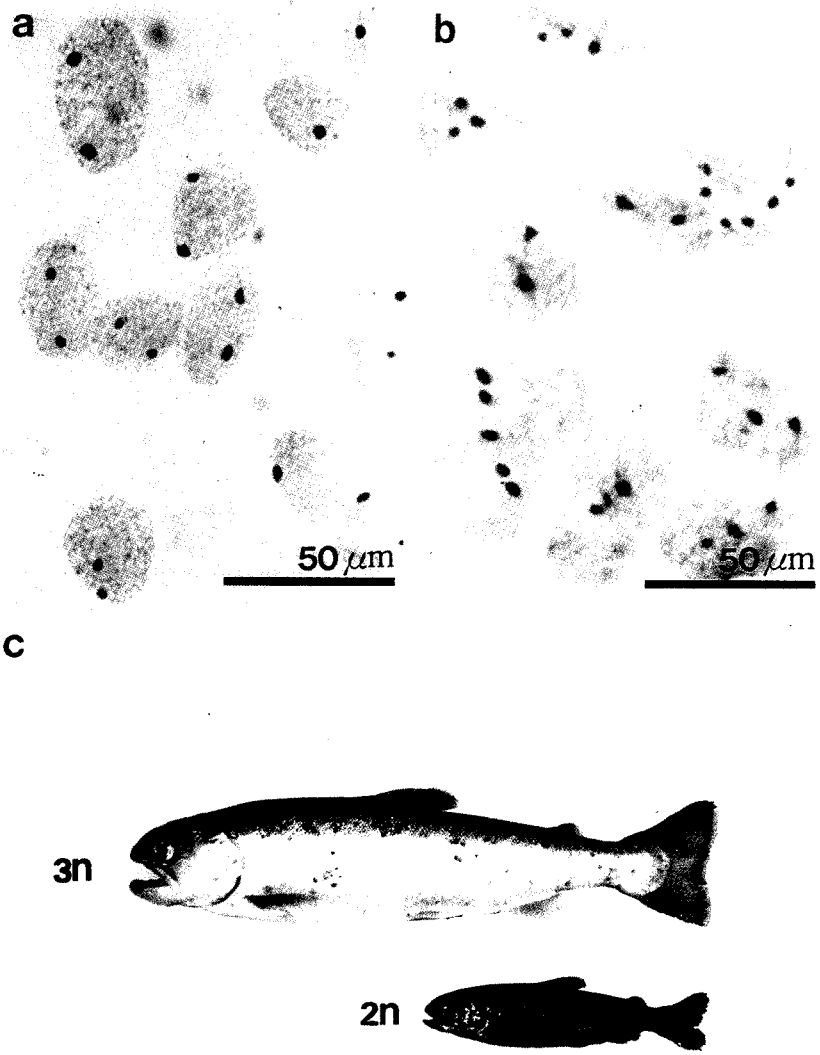


Fig. 2. Siver-stained cells of diploid (a) and triploid (b) cherry salmon. External morphology of 4-years female triploid (3n) and 2-years female diploid (2n) cherry salmon, *Oncorhynchus masou* (c).

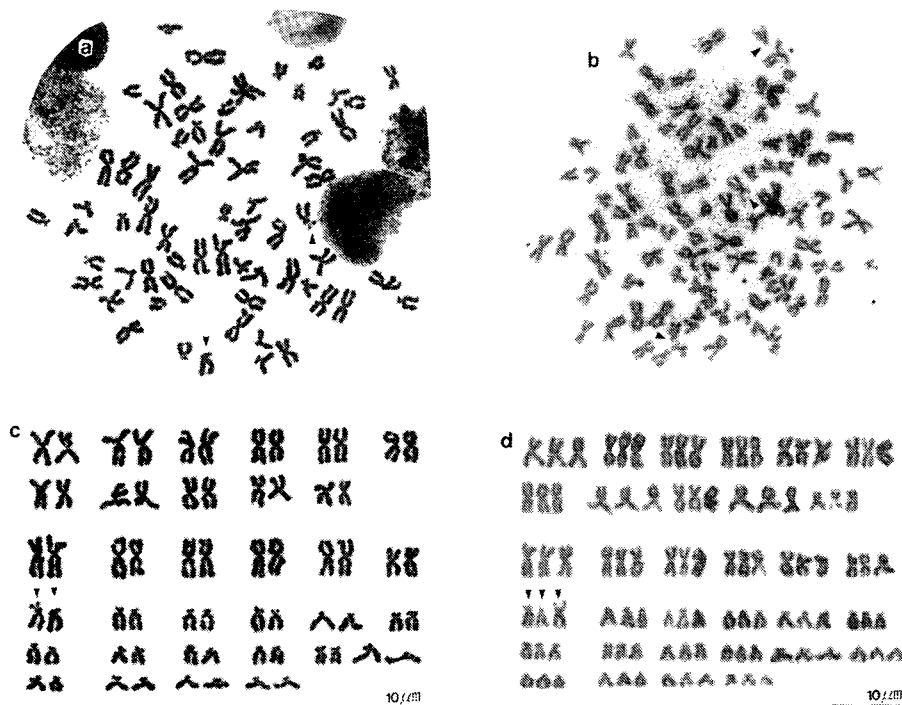


Fig. 3. Metaphase and idiograms of diploid (a & c) and triploid (b & d) cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. Arrows indicate satellited telocentrics.

1.4 g, 2.0 g, 5.5 g, 12.6 g, 및 39.8 g, 3배체 수컷 체중은 1.0 g, 1.5 g, 5.0 g, 7.1 g 및 34.8 g 을 나타내어 2배체 암컷, 2배체 수컷, 3배체 암컷, 3배체 수컷의 순으로 초기성장을 보였다. 부화 후 10개월 이후 부화 후 28개월 까지의 성장은 2배체 암컷, 2배체 수컷, 3배체 암컷, 3배체 수컷의 순으로 성장을 보였다. 그러나 산란기인 부화 후 22~26개월에서 2배체 암컷은 248.7 g 에서 209.8 g 으로, 2배체 수컷은 231.3 g 에서 220.9 g 으로 체중감소를 보였으며 3배체 수컷 역시 206.7 g 에서 203.7 g 으로 다소의 체중감소를 보였다. 그러나 3배체 암컷은 219.9 g 에서 251.9 g 으로 체중증가를 보였다. 더우기 2배체 개체들은 산란기에 산란에 기인되어 폐사한 반면 3배체 개체들은 폐사하지 않고 지속적인 체중성장을 나타내어 3배체 암컷은 부화 후 28개월에 286.4 g, 3배체 수컷은 부화 후 28개월에 238.7 g에 이르렀다.

3배체는 2배체에 비해 외형상 별다른 차이를 보이지 않았으며 산란치사를 겪지 않은 4년산 3배체 산천어 암컷의 평균 전장은 32.7 cm로 2년산 산천어 2배체 암컷의 평균 전장 16.2 cm에 비해 큰 전장 성장을 나타내었다(Fig. 2c).

산란기의 성숙은 2배체 암컷인 경우 성숙 난소를 보였으며, 2배체 수컷 역시 성숙 정소를 나타내었다(Fig. 5a & c). 그러나 3배체 암컷 및 3배체 수컷의 난소, 정소는 가는 끈모양으로 생식소 불임

을 나타내었다(Fig. 5b & d). 산란기에 2배체와 3배체의 생식소를 조직학적으로 조사한 결과 Fig. 6의
와 같이 2배체 난소는 난황구기(yolk granule stage)의 제1차 난모세포(primary oocyte) 상태로 내

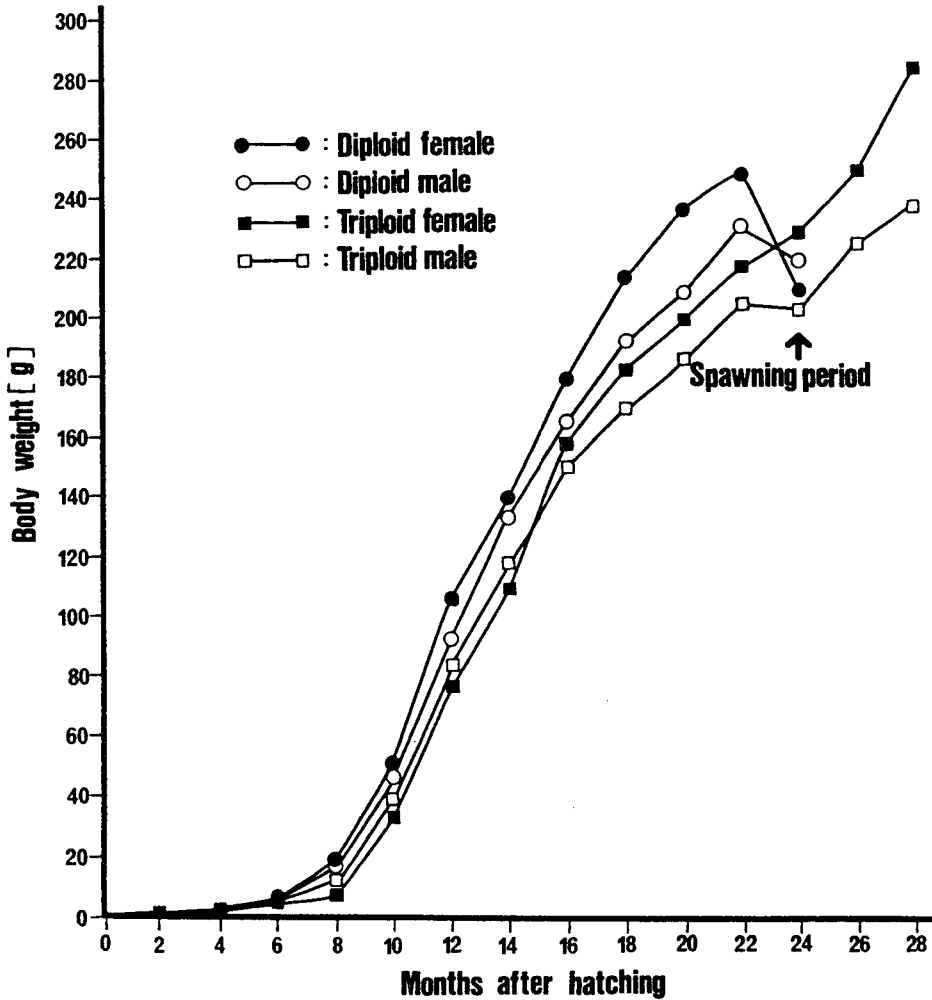


Fig. 4. Comparison of growth between diploid and triploid cherry salmon, *Oncorhynchus masou*.

생적 난황형성(endogenous perivitellogenesis)이 일어나고 있는 반면, 3배체 난소는 Fig. 6의 b와 같
이 관상으로서 난지 난원세포(oogonia) 상태로 존재하였다. 2배체 정소는 관상구조로 되어 정세포

(spermatid), 정자(sperm)로 이루어져 성숙이 이루어진 반면 3배체 정소는 명확한 관상구조없이 정 세포 상태로만 이루어졌다(Fig. 6c & d).

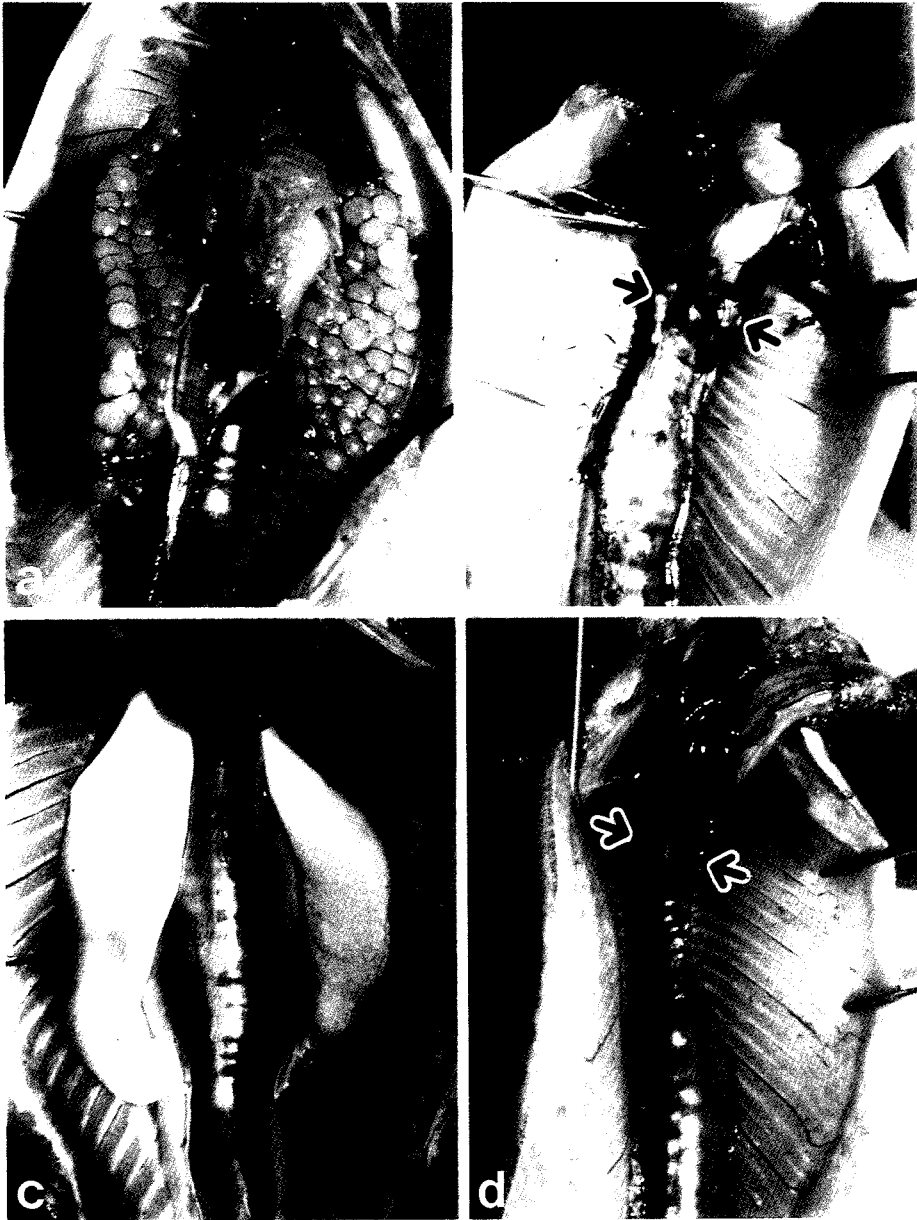


Fig. 5. External morphology of ovary and testis of diploid (a & c) and triploid (b & d: arrows) cherry salmon, *Oncorhynchus masou*.

고 찰

어류의 난은 대부분 제 1 감수분열을 완료하고 제 1 극체를 방출한 뒤 제 2 감수분열 중에 배란되며 배란된 미수정난은 정자와의 수정 후 제 2 극체를 방출한다. 어류 3배체 유도는 수정난에서 이

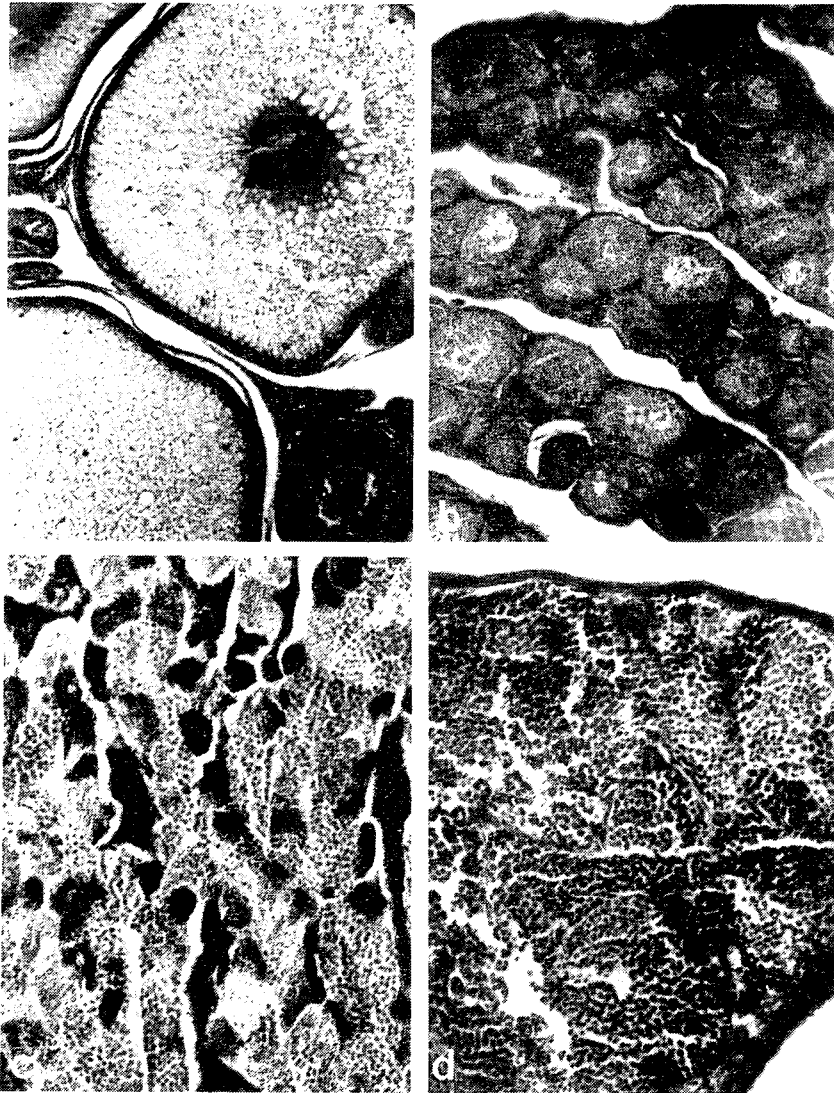


Fig. 6. Section preparations of ovary and testis of diploid (a & c) and triploid (b & d) cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. $\times 400$.

러한 제 2 극체 방출억제로 이루어지는 것으로 제 2 극체 방출억제 인자로는 고온처리, 저온처리 및 수압 등의 물리적처리와 colchicine, nitrous oxide, cytochalasin B 및 ether 등의 화학적 처리가 있다 (Benfey 1989; Refstie *et al.* 1982; Thorgaard 1986). 이외에도 제 2 극체 방출억제 없이 polyethylene glycol에 의한 dispermy에 의한 3배체 유도과 4배체 수컷과 2배체 암컷과의 단순교배에 의해 3배체를 유도시킨 보고가 있으나, 물리적처리 방법 중 고온처리, 저온처리가 그 손쉬운 처리법으로 인해 3배체 유도시 일반적으로 사용되고 있다(Blanc *et al.* 1987; Chourrout and Nakayama 1987; Chourrout *et al.* 1986; Ueda *et al.* 1986).

본 실험에서 고온처리에 의해 산천어 3배체 유도시 최적조건인 수정 후 10분에 수온 28°C 에서 15분간, 20분간 처리시 각각 91.4%, 89.8%의 3배체 생산율은 대서양연어, *Salmo salar* 3배체 유도시 수정 후 15분에 수온 32°C로 5분간 처리의 90% 3배체 생산율, 수정 후 15분에 710 kg/cm²의 수압으로 6분간 처리에 의한 89% 3배체 생산율(Benfey and Sutterlin 1984)과 비교시 3배체 생산율에 있어 유사하게 나타났다. 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 3배체 유도시 대조군의 생존율을 고려하지 않고 단지 3배체 유도군의 생존율만으로 계산된 3배체 생산율은 수정 후 10분에 수온 36°C로 1분간 처리가 14.2%의 3배체 생산율, 수정 후 25분에 수온 26°C로 20분간 처리가 85.3%의 3배체 생산율, 수정 후 1~40분에 수온 26~28°C로 10분간 처리가 41.5~70.0%의 3배체 생산율, 수정 후 10분에 420 kg/cm²의 수압으로 8분간 처리가 53%의 3배체 생산율을 보임(Chourrout and Quillet 1982; Chourrout 1984; Solar *et al.* 1984; Thorgaard *et al.* 1981)을 고려시 3배체 유도에 있어 본 실험의 산천어는 무지개송어보다 처리조건에서 더욱 효과적인 결과를 나타내었다.

2배체에 대한 3배체의 적혈구 세포 장축, 단축에서의 증가는 대서양연어가 1.25배, 1.12배(Benfey and Sutterlin 1984), 무지개송어가 1.22배, 1.16배(Kim *et al.* 1988)를 나타내어 본 실험의 산천어 2배체에 대한 3배체의 적혈구 세포 장축, 단축에서의 증가비 1.29배, 1.17배와 유사하였다. 또, 3배체화에 따른 적혈구 세포 장축 증가비에 대한 적혈구 세포 단축 증가비는 대서양연어가 1.12배, 무지개송어가 1.05배 그리고 본 실험의 산천어에서는 1.10배를 나타내어 3배체화시 공히 적혈구 세포 단축에서의 증가보다 장축에서의 증가가 현저하였다. 2배체에 대한 3배체의 적혈구 핵의 장축, 단축에서의 증가는 대서양 연어가 1.30배, 1.14배, 무지개송어가 1.30배, 1.25배를 나타내어 본 실험의 산천어 2배체에 대한 3배체의 적혈구 핵의 장축, 단축에서의 증가 1.36배, 1.32배와 유사하였다. 그리고 3배체화에 따른 적혈구 핵의 단축 증가비에 대한 적혈구 핵의 장축 증가비는 대서양연어가 1.14배, 무지개송어가 1.04배 그리고 본 실험의 산천어에서는 1.14배를 나타내어 3배체화시 적혈구 세포에서의 결과와 마찬가지로 적혈구 핵의 단축에서의 증가보다 장축에서의 증가가 현저하였다. 대서양 연어, 무지개송어 및 산천어의 장축에서의 증가비/단축에서의 증가비를 적혈구 세포와 적혈구 핵에서 비교시 적혈구 핵이 적혈구 세포보다 크게 나타났다.

무지개송어와 모든 연어속에서 보고된 바와 같이(Phillips and Ihssen 1985; Phillips *et al.* 1986) 대부분의 종에서 인형성부위(nucleolar organizer region)는 반수체 한 조의 일정 염색체에 존재하는 것으로 2배체 간의 세포에서 인형성부위가 인접되었을 경우 1개의 인, 분리된 각 염색체에 인이 존재할 경우 2개의 인이 발견된다. 따라서 분열이 왕성한 조직인 경우 분리된 인이 발견되는 반면 낮은 체세포분열율을 보이는 조직은 빈번히 1개의 인이 발견된다. 산천어도 1개의 염색체에 1개의 인이 존재하여 2배체는 세포당 인의 수가 1개 혹은 2개로 관찰되었으며 3배체는 세포당 인의 수가 1개, 2개 및 3개가 관찰되었다. 본 실험에서는 silver 염색에 의해 배체(embryo)에서 배수화를 판별 하였지만 이 방법이 성체에 적용될 경우 성체를 죽이지 않고 성체 일부 조직의 채취에 의해 간편히 배수화를 파악할 수 있어 인형성부위 측정은 적혈구 세포 및 적혈구 핵의 크기 측정법과 아울러 배

수화 판별에 유용하리라 사료된다.

배수체의 판별은 염색체 수 조사, 전기영동, 적혈구 및 적혈구 핵 크기 측정, 인염색과 flow cytometry에 의한 직접적인 DNA함량 측정에 의할 수 있다. 이들 중 염색체 수 조사 및 flow cytometry에 의한 DNA함량 측정법은 3배체가 제 2 극체 방출억제로 인해 모계 기원의 2개의 반수체와 부계 기원의 1개의 반수체로 이루어져 3개의 반수체를 나타내므로 이들 3배체를 세포유전학적으로 정확히 조사할 수 있는 방법이다(김 등 1994; 박 1992; Allen and Stanley 1983; Thorgaard *et al.* 1982; Utter *et al.* 1983). 본 실험의 산천어 3배체는 2배체와 비교시 핵형은 동일하였으나 각 조에서 3개의 염색체로 구성되어 배수화에 따른 반수체 DNA 증가현상을 나타내었다. 특히 3배체의 가장 큰 telocentrics의 단완에 존재하는 3개의 부수체는 3배체 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 큰 3개의 metacentrics가 3배체 배수화의 수준 판별용 marker로 이용되는 것(김 등 1990)과 마찬가지로 3배체에서 배수화의 수준을 판별할 수 있는 marker로 유용하리라 사료된다.

Table 3. Review of growth data between triploid and diploid specimens under various standard fish culture conditions

Species	Life stage	Growth (measure)*	Reference
Threespine stickleback	Juvenile, adults	$3n \cong 2n$ (L)	Swarup (1959)
Plaice x European flounder	Juvenile to 34 weeks	$3n \cong 2n$ (L)	Purdom (1972)
	Adults to 4 years	$3n \cong 2n$ (W)	Lincoln (1981)
		$3n \geq 2n$ (L)	
Red seabream	Juveniles to 34 days	$3n < 2n$ (L)	Park <i>et al.</i> (1994)
Tilapia species	Juveniles at 14 weeks	$3n > 2n$ (L)	Valenti (1975)
	Juveniles to adults, 31 weeks	$3n \leq 2n$ (L,W)	Perman <i>et al.</i> (1987)
Common carp	Juvenile	$3n \cong 2n$ (W)	Gervai <i>et al.</i> (1980)
Loach	1-year-old	$3n < 2n$ (W)	Suzuki <i>et al.</i> (1985)
Ayu	1-year-old	$3n > 2n$ (L)	Ueno <i>et al.</i> (1986)
Channel catfish	Juvenile	$3n \cong 2n$ (W)	Wolters <i>et al.</i> (1991)
	Adults > 8 months	$3n > 2n$ (W)	
	Juveniles to 6 months	$3n < 2n$ (W)	Kim <i>et al.</i> (1990)
	6 months plus	$3n > 2n$ (W)	
	Juvenile at 6 months	$3n < 2n$ (W)	Wolters <i>et al.</i> (1991)
		$3n < 2n$ (W)	Thorgaard <i>et al.</i> (1982)
Rainbow trout	Juveniles	$3n < 2n$ (W)	Solar <i>et al.</i> (1984)
	Juveniles to 48 weeks	$3n < 2n$ (W)	Lincoln and Scott (1984)
	2-year-old	$3n \cong 2n$ (L,W)	Chourrout <i>et al.</i> (1986)
	2 year plus	$3n > 2n$ (W)	Thorgaard (1986)
	3.5-year adults	$3n > 2n$ (W)	Kim <i>et al.</i> (1988)
	Juveniles to 8 months	$3n < 2n$ (L)	
	1-year-old	$3n > 2n$ (L)	
	1, 2-year-olds	$3n < 2n$	Oliva-Teles and Kaushik (1990)
Coho salmon	Juveniles, 17 months	$3n < 2n$ (W)	Utter <i>et al.</i> (1983)
	Juveniles to 30 months	$3n \cong 2n$ (L,W)	Johnson <i>et al.</i> (1986)
Atlantic salmon	Juveniles, 9 months	$3n \cong 2n$ (W)	Benfey and Sutterlin (1984)
		$3n > 2n$ (L)	
Cherry salmon	Juveniles to 22 months	$3n < 2n$ (W)	Present study (1993)
	22 months plus	$3n > 2n$ (W)	

*L; length, W; weight, 3n; triploid, 2n; diploid.

2배체에 대한 유도 3배체의 성장 조사에 관한 결과는 Table 3과 같다. 3배체는 2배체에 비해 초기성장기 다소 낮게 나타나며, 이러한 3배체의 성장 장애는 3배체화시 3배체 자체의 유전물질 증가에 따른 shy (Lincoln and Bye 1984; Wolters *et al.* 1982) 함에 기인된 것으로 판단된다. 그러므로 3배체 유도시 높은 3배체율이 필요한 것은 2배체와 3배체의 혼합사육시 이러한 shy함을 나타내는 3배체가 2배체와의 먹이경쟁에서 극복이 요구되기 때문이다. 그러나, 후기성장에서 3배체는 2배체에 비해 성장이 비교적 높게 나타나고 본 실험의 산천어 3배체는 산란기에 치사를 보이는 2배체에 비해, 높고 지속적인 성장을 보였다. 이와같은 산란기의 2배체 치사에 반한 3배체의 지속적인 성장 및 생명의 연장은 은어, *Plecoglossus altivelis* 에서도 나타나고 있다(Ueno *et al.* 1986).

산란기에 산천어 2배체는 정상적인 생식소 성숙을 보인 반면 산천어 3배체는 생식소의 외형적, 조직학적 분석시 불임화를 나타내었다. 이러한 불임화는 산란기에 2배체에서 나타나는 식욕감퇴, 사료효율 감소, 육질 감소 및 비만도 감소 등을 억제(Lincoln and Scott 1984; Thorgaard 1983)할 수 있으며, 은어 3배체(Ueno *et al.* 1986)와 마찬가지로 산천어 3배체는 생식소의 미성숙과 불임에 기인되어 산란기 이후 생존하여 생활사를 연장시키고, 생식소의 미발달에 기인된 성 호르몬의 합성 및 분비장애를 일으켜 산란기 2차 성징발현을 억제시켜 상품가치 하락을 방지시키며 또한 2배체의 성숙에 따른 생식소 발달 및 산란에 따른 왕성한 물질대사를 재회수 할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 산란기에 무지개송어를 포함한 일부 종의 3배체 수컷 정소는 외형적으로 가늘었으나 운동성 있는 정자를 포함하는 수분이 많고 묽은 정액을 형성하며 androgen의 수준은 2배체 수컷과 유사함을 보였다(Gervai *et al.* 1980; Lincoln 1981; Lincoln and Scott 1984). 이러한 점을 고려 산천어 2배체에 비해 3배체 암컷은 난원세포 상태로 머물러 성숙기에도 불임을 나타내나 3배체 수컷은 성숙기에 정세포를 형성하므로 차후 3배체 정소에 대한 성숙기에서의 면밀한 조사가 필요시 되며 3배체 수컷과 정상 2배체 암컷과의 교배에 의한 접합자 불임(zygotic sterility) 유무 등의 불임화 정도에 관한 연구가 필요시 된다.

산천어 3배체는 산천어 1회 산란에 의한 사망을 방지하여 생활사를 연장시킬 수 있고 산천어 3배체는 불임을 나타내므로, 은어 3배체(Ueno *et al.* 1986)와 마찬가지로 산란기에 집중 출하로 인한 가격하락을 막을 수 있어 산란기 이후 큰 크기를 연중출하 가능케 할 것이다. 이와 다른 어류에서의 3배체화는 집단의 조절용, 수생식물의 조절용 그리고 중간 잠종에서의 생존율 증가를 위하여 사용되고 있다(박 1992; Chevassus *et al.* 1983; Scheerer *et al.* 1987; Thorgaard and Allen 1987; Wiley and Wike 1986). 더욱이 어류 3배체화는 3배체가 불임을 나타내며 무정자 이거나 이수체 정자를 생산하므로 외래 도입 이식종의 국내 생태계 파괴없이 안전한 국내도입, 방류를 가능케 한다(Anonymous 1989). 이러한 관점에서 차후 산천어 3배체화는 산천어 3배체 자체의 양식 산업적 경제성과 아울러 외래 산천어 계통의 도입, 사육 및 방류시 유용하게 사용되리라 사료되며 산란기에 암컷이 높은 생식소지수를 보이고 암컷 3배체가 완전한 불임을 보임을 고려시 산천어 전암컷 3배체(all female triploid)의 유도가 차후 필요하리라 사료된다.

요 약

산천어 3배체를 유도하기 위해 수정난에 고온처리가 실시되었다. 3배체 유도율 및 3배체 생산율을 고려시 수온 28℃에서 수정후 10분에 15분간, 20분간의 처리가 각각 96.7%의 3배체 유도율, 91.4%의 3배체 생산율 및 100%의 3배체 유도율, 89.8%의 3배체 생산율을 보여 산천어 3배체 유도시 적절한 처리조건임이 판명되었다. 산천어 3배체는 2배체에 비해 적혈구 세포의 장축, 단축, 장축/단축,

표면적 및 부피에 있어 1.29배, 1.17배, 1.10배, 1.54배 및 1.78배의 증가를 보였으며 적혈구 핵의 장축, 단축, 장축/단축, 표면적 및 부피에 있어 각각 1.36배, 1.32배, 1.14배, 1.75배 및 2.31배의 증가를 보였다. 산천어 3배체의 염색체수($3n=99$) 및 핵형(17 sets of metacentrics or submetacentrics, 16 sets of acrocentrics or telocentrics)은 2배체의 염색체수($2n=66$) 및 핵형과 비교시 핵형은 동일 하였으나 각 조에서 3개의 염색체로 구성되어 배수화에 따른 반수체의 DNA증가 현상을 나타내었다. 특히 3배체의 가장 큰 3개의 telocentrics 단완에 존재하는 부수체(satellite)는 산천어 3배체 확인의 marker로 유용하리라 사료된다. 산천어 2배체, 3배체를 대상으로 배체(embryo)에서 인형성부위(nucleolar organizer regions)를 silver 염색한 결과 인의 수/세포에서 산천어 2배체는 1, 2를 나타내었으며 산천어 3배체는 1, 2 및 3을 나타내어 인형성부위의 silver 염색법은 적혈구 세포 및 핵 크기 측정법과 아울러 대상 개체를 죽이지 않고 쉽게 배수화를 판별할 수 있는 방법임이 판명되었다. 산란기에 3배체는 2배체에 비해 성장증대 효과를 보였으며 생식소를 외형적, 조직학적으로 조사한 결과 3배체 암컷은 불임을 나타내었으며 3배체 수컷은 성숙 장애를 나타내었다. 3배체는 이러한 불임에 기인된 산란 치사를 겪지 않았으며 4년산 3배체 암컷의 평균 전장은 32.7 cm로 2년산 2배체 암컷의 평균전장 16.2 cm에 비해 크게 나타났다.

참 고 문 헌

- Allen, S. K. Jr. and J. G. Stanley. 1983. Ploidy of hybrid grass carp \times bighead carp determined by flow cytometry. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112: 431~435.
- Anonymous, T. 1989. Draft protocols dealing with ecological concerns respecting Atlantic salmon due to introductions and transfers of fish. North Atlantic Salmon Conserv. Organ., comm. Paper WAC (89) 16, Edinburgh, UK.
- Bataillon, E. 1911. La parthenogenese experimentale chez *Bufo vulgaris*. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie* 152: 1120~1122.
- Beatty, R. A. and M. Fischberg. 1951. Cell number in haploid, diploid and polyploid mouse embryos. *J. Exp. Biol.* 28: 541~552.
- Benfey, T. J. 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1682: 33pp.
- Benfey, T. J. and A. M. Sutterlin. 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 36: 359~367.
- Blanc, J. M., D. Chourrout and F. Krieg. 1987. Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture* 65: 215~220.
- Chevassus, B., R. Guyomard, D. Chourrout, and E. Quillet. 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. *Genetique, Selection, Evolution* 15: 519~532.
- Chourrout, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36: 111~126.
- Chourrout, D. and E. Quillet. 1982. Induced gynogenesis in rainbow trout: sex and survival of progenies. Production of all-triploid populations. *Theor. Appl. Genet.* 63: 201~205.
- Chourrout, D. and I. Nakayama. 1987. Chromosome studies of progenies issued from tetraploid females of rainbow trout. *Theor. Appl. Genet.* 74: 687~692.

- Chourrout, D., B. Chevassus, F. Krieg, A. Happe, G. Burger and P. Renard. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid female—potential of tetraploid fishes. *Theor. Appl. Genet.* 72: 193~206.
- Frankhauser, G. 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quart. Rev. Biol.* 20: 20~78.
- Gervai, J., S. Péter, A. Nagy, L. Horváth, and V. Csányi. 1980. Induced triploidy in carp. *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 17: 667~671.
- Gold, J. R. 1984. Silver staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia* 1984: 133~139.
- Gold, J. R. and J. C. Avise. 1976. Spontaneous triploidy in California roach *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 17: 144~149.
- Ihssen, P. E., L. R. Mckay, I. McMillan, and P. B. Phillips. 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetics and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 698~717.
- Kim, D. S., G. C. Choi and J.-Y. Jo. 1990. Induced triploid in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Teleostomi: Siluriformes). *Korean J. Genet.* 12: 229~235.
- Kim, D. S., I.-B. Kim and Y. G. Baik. 1986. A report of triploid rainbow trout production in Korea. *Bull. Kor. Fish. Soc.* 19: 575~580.
- Kim, D. S., I.-B. Kim and Y. G. Baik. 1988. Early growth development of triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Aquacult.* 1: 41~51.
- Lemoine, H. L. Jr. and L. T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 626~631.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201~220.
- Levy, F. 1913. Über künstliche Entwicklungserregung bei Amphibien. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 82: 65~79.
- Lincoln, R. F. 1981. The growth of female diploid and triploid plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice × flounder (*Platichthys flesus*) hybrids over one spawning season. *Aquaculture* 25: 259~268.
- Lincoln, R. F. and A. P. Scott. 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 25: 385~392.
- Lincoln, R. F. and V. Bye. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. *Fish Farmer* 7: 30~32.
- Phillips, R. B., K. D. Zajicek, P. E. Ihssen and O. Johnson. 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54: 313~319.
- Phillips, R. B. and P. E. Ihssen. 1985. Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 433~440.
- Refstie, T., J. Stoss and E. M. Donaldson. 1982. Production of all female coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture* 29: 67~82.
- Scheerer, P. D., G. H. Thorgaard and J. E. Seeb. 1987. Performance and developmental

- stability of triploid tiger trout (brown trout ♀ × brook trout ♂). Trans. Am. Fish. Soc. 116: 92~97.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwa*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44: 851~854.
- Solar, I. I., E. M. Donaldson and G. A. Hunter. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigations of early growth. Aquaculture 42: 57~67.
- Svärdson, G. 1945. Chromosome studies on Salmonidae. Report of the Swedish State Institute of Freshwater Fisheries 23: 1~151.
- Swarup, H. 1959a. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus*. J. Genet. 56: 129~142.
- Swarup, H. 1959b. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). J. Genet. 56: 143~155.
- Thorgaard, G. H. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. p. 405-434, In W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds., Fish physiology, volume 9, part B. Academic Press, New York.
- Thorgaard, G. H. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 57: 57~64.
- Thorgaard, G. H. and G. A. E. Gall. 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. Genetics 93: 961~973.
- Thorgaard, G. H. and S. K. Allen, Jr. 1987. Chromosome manipulation and markers in fishery management. p. 319-331, In: N. Ryman and F. M. Utter, eds. Population genetics and fisheries management. University of Washington Press, Seattle.
- Thorgaard, G. H., M. E. Jazwin and A. R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 110: 546~550.
- Thorgaard, G. H., P. S. Rabinovitch, M. W. Shen, G. A. E. Gall, J. Propp, and F. M. Utter. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture 29: 305~309.
- Ueda, T., M. Kobayashi and R. Sato. 1986. Triploid rainbow trouts induced by polyethylene glycol. Proc. Jap. Acad. 62: 161~164.
- Ueno, B. K., Y. Ikenaga and H. Kariya. 1986. Potentiality of application of triploidy to the culture of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel. Jap. J. Genet. 61:71~77.
- Utter, F. M., O. W. Johnson, G. H. Thorgaard and P. S. Rabinovitch. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. Aquaculture 35: 125~135.
- Wiley, M. J. and L. D. Wike. 1986. Energy balances of diploid, triploid, and hybrid grass carp. Trans. Am. Fish. Soc. 115: 853~863.
- Wolters. W. R., G. S. Libey and C. L. Chrisman. 1982. Effects of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc. 111: 102~105.
- 김동수 · 정창화 · 이영돈 · 노섭. 1994. 3배체 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 유도에 관한 연구. 한국양식학회지 7: 55~61.
- 김동수 · 최경철 · 박인석. 1990. 3배체 나일틸라피아 생산에 관하여. 한국양식학회지 3: 135~144.
- 박인석. 1992. 미꾸리와 미꾸라지의 잡종 및 잡종 3배체에 관한 연구. 부산수산대학교 대학원 박사학위 청구논문 85pp.
- 박인석 · 김형배 · 손진기 · 김동수. 1994. 3배체 참돔(*Pagrus major*)의 생산. 한국어류학회지 6: 71~78.