

# 염색체 조작에 의한 전 암컷 3배체 무지개송어 조기난의 대량생산

정창화 · 안재현 · 김봉석 · 김동수

부산수산대학교 양식학과

## Mass Production of All-Female Triploid Eggs in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) During the Fall Season by Chromosome Manipulation

Chang Hwa Jeong, Jae Hyun Ahn, Bong-Seok Kim and Dong Soo Kim

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608-737, Korea

### ABSTRACT

For the mass production of all-female triploid rainbow trout during fall season, treatment of short-term daylength from 30th of August, 1994 and chromosome manipulation by heat shock were performed with 3-year-old fish.

After treatment of short-term daylength to fish, we successfully obtained the fertilized eggs from all treated fishes. However, hatching rate were significantly lower than that of natural spawning season ( $P < 0.05$ ). Hormonal treatment using 3 mg of 17 $\alpha$ -methyltestosterone per kg of diet for 55 days at 16.5 $^{\circ}$ C gave 100% of sex-reversed male (masculinized female) population. When the fertilized eggs were treated with the various conditions of heat shocks survival rates and triploid incidencies were varied, and ranged from 15.0 to 88.2% and 36.7 to 100%, respectively.

### 서 론

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 남극을 제외한 모든 대륙의 수계에 분포하는 연어과 어류이다(Hershberger 1992). 본 종은 최근, UR에 따른 양식 수산물의 국내 도입시 우리나라 수산물 소비 형태의 특수성에 따라 국제 경쟁력을 갖는 어종으로 평가되고 있으며, 향후 내수면 가두리 양식업의 폐지에 따른 담수 양어 생산고의 저하를 막을 수 있는 주요 어종으로 평가되고 있다. 그러나, 본 종은 성숙기에 성장, 생존 및 상품성에 있어 생산성에 역효과를 초래하며, 이러한 효과는 수컷에 있어 더욱 극심하게 나타난다(Lincoln and Scott 1983; Kim *et al.* 1986). 따라서 이러한 성숙기의 생산성 감소를 줄이기 위하여 전 암컷 3배체 집단만을 생산 양식하는 방법이 개발된 바 있다

\* 본 연구는 1994년 산학협동재단 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

(Thorgaard and Gall 1979; Johnstone *et al.* 1979; Bye and Lincoln 1981; Guo *et al.* 1990; Thorgaard 1992; Jeong 1993; Kim *et al.* 1993).

이에 유럽 각국 및 미국 등지에서 super-trout라는 명칭으로 전 암컷 3배체 무지개송어를 판매하고 있으며, 국내에서도 이미 전 암컷 3배체 무지개송어가 유도되었으나(Kim *et al.* 1993), 우리나라의 경우 지하수를 사육수로 사용하는 양식장의 경우 하천수를 이용하는 양식장과 수온이 서로 달라 기존의 3배체 유도 조건을 모든 양식장에 적용하기 어려운 문제점 때문에 아직 산업화되지 못하고 있는 실정이다.

본 연구는 전 암컷 3배체 무지개송어의 산업화를 위한 연구의 일환으로 우리나라 무지개송어 양식장의 사육 수온 조건에 맞는 적절한 전 암컷 3배체 무지개송어를 생산할 수 있는 기술을 개발하고, 광량 조절을 통해 산란 시기를 앞당겨 홍수 출하를 방지함으로써 무지개송어의 생산성을 향상시키고자 하였다.

## 재료 및 방법

실험어는 경상북도 상주군 공성면 이화리에 위치한 이화 정송어양식장에서 사육 중인 3년생 암·수 무지개송어를 친어로 사용하였다. 친어의 유지와 관리에 3년생 무지개송어 암·수에 비타민 A와 C를 강화한 배합사료를 공급하였으며, 무지개송어의 조기난을 생산하기 위해 Bromage 등(1992)의 방법을 약간 수정하여 성숙을 유도하였다.

1994년 여름 고수온 및 가뭄으로 인해 사육수의 온도가 높아 9월 30일(수온 22°C)부터 점차 광량을 줄여 10월 31일(수온 15°C) 첫 산란을 유도하였다. 빛의 조절은 시간자동장치가 부착되어 있는 형광등 장치를 이용, 각 실험군을 30 톤 수조에서 반유수식으로 최적 사육 조건을 유지하였다. 충분히 성숙된 암·수 친어로부터 인위적으로 채란·채정한 후 등조법으로 수정시킨 후 아트킨스 부화기를 이용하여 유수식으로 부화시켜 실험군의 부화율을 구하였다. 또한 이들의 부화율을 대조군과 비교하기 위해 주산란기인 11월 매주 1회씩 4회에 걸쳐 부화중인 난을 채집, 평균을 구하여 대조군의 부화율로 정하였다.

무지개송어 수컷으로의 성전환은 Kim 등(1993)의 방법에 의거 17 $\alpha$ -methyltestosterone을 사료 1 kg당 3 mg 섞어 16.5°C 수온 조건하에서 적산수온 90도까지 공급하여 성전환을 각각 유도하였다. 부상 후 4개월된 5 g 전후의 실험어 12마리를 4회에 걸쳐 무작위 추출하여 복부를 절개하고 생식소를 적출한 후 squash method에 의거하여 암·수를 판별하였다.

3배체를 생산하기 위한 최적 처리 시간을 구하기 위하여 13.5°C 조건에서 채란·채정하여 수정 후 5분부터 20분까지 2.5분 간격으로 15분 및 20분간 고온 처리를 행하였다. 이후 3배체 유도시 생존율을 높이기 위하여 앞의 실험에서 얻은 결과를 토대로 수정 20분, 25분 및 30분 뒤 26°C와 28°C의 고온 처리를 각각 15분과 17.5분간 하였다. 또한 3배체의 대량생산을 위해 앞의 두 실험에서 얻은 결과를 근거로 13.5°C의 수온 조건하에서 수정 18분 후 26°C 조건으로 고온처리를 18분간 행하였다.

실험군과 대조군을 대상으로 3배체의 발안율, 부화율 및 생존율을 구하였으며, 2배체와 3배체의 판별을 위하여 세포 크기 측정, 염색체 분석 및 핵내 인의 수를 분석하였다. 세포 크기 측정은 2배체와 3배체의 혈액을 미부동액에서 채취하여 slide에 도말하여 표본을 작성한 뒤 Kim 등(1986)의 방법으로 적혈구 세포 및 핵의 장, 단경을 광학 현미경하에서  $\mu$ m 단위로 측정하였고, 염색체 분석은 Kim 등(1982 & 1994)의 신장 직접법을 수정하여 염색체 수를 조사하였다. 또한 대조군 및 3배체 부화자어를 대상으로 표피세포 시료를 Phillips 등(1986)의 방법에 의거하여 methyl Carnoy 액으로 고정 후 silver staining을 실시하여 인을 염색한 후, 광학현미경하에서 개체당 110 세포를 대상으로 세포당 인의 수를 검경하여 3배체의 유도율을 구하였다.

## 결과 및 고찰

늦가을부터 겨울에 걸쳐 산란기를 갖는 무지개송어에 있어 광주기 조절은 산란 시기를 조절함으로써 연 중 종묘의 안정적 계획생산을 가능하게 한다. 이미 Bromage 등(1992)은 무지개송어에 대하여 광주기를 단일 처리하여 산란 시기를 3~4개월 앞당길 수 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 조기난의 대량 생산을 위해 단일 처리를 실시한 결과 처리 개시 1개월 후 산란이 유도되었다. 그 결과 광량 조절에 의해 조기 채란된 개체 및 난의 수는 Table 1과 같다. Table 1과 같이 광량조절 후 4회에 걸쳐 170마리의 암컷에서 340,000 개의 난을 얻을 수 있었으며, 부화율은 45~55% 범위로 평균  $51.25 \pm 4.15\%$ 로 나타났다. 이 결과는 산란된 난의 수에 있어 여타 보고와 같았으나, Bromage 등(1992)의 경우 70%를 보인 것에 비해 약간 낮았다. 이는 부화 수온이 높았던 때문으로 생각되나, 조기 성숙에 따라 난질이 저하되었을 가능성도 전혀 배제할 수 없다.

Table 1. Artificial spawning experiment in rainbow trout treated with short-term daylength

Exp. No	No. of female spawned	No. of eggs obtained	Hatchability (%)
1	10	20,000	45
2	35	70,000	50
3	50	100,000	55
4	75	150,000	55
Total	170	340,000	$51.3 \pm 4.2^a$
Control*	-	-	$84.9 \pm 0.4^b$

\* Data from natural spawning season (see materials and methods).

Different superscripts were significantly different at  $P < 0.05$ .

무지개송어를 대상으로 한 수컷으로의 성전환에 있어 수온  $10^\circ\text{C}$ 를 기준으로 할 때 Simpson (1976)은 사료 1 kg당 3 mg의 methyltestosterone을 섞어 첫 먹이 공급기부터 90일 동안 공급하여 100% 수컷을 유도한 바 있으며, Kim 등 (1993)은 동일 방법으로 적산 수온 800도까지 처리하여 100% 수컷을 유도하였음을 보고한 바 있다. 본 연구에서는  $16.5^\circ\text{C}$ 의 사육 수온에서 사료 1 kg 당 3 mg의 17 $\alpha$ -methyltestosterone을 섞어 적산수온 900도 까지 공급하여(55일) 성전환을 유도하여 4개월된 5 g 전후의 치어 48마리를 대상으로 squash method를 이용한 조직학적 분석을 행한 결과 분석된 48마리 전부 수컷으로 나타났다(Table 2). 본 연구에서의 결과는 처리 기간에서 Simpson (1976)보다 35일, Kim 등(1993)보다는 25일 정도 적게 처리한 결과로, 일반 양식장에서 처리시 그 기간을 단축할 수 있어 매우 편리할 것으로 보인다. 앞으로, 사육 수온의 상승에 따른 처리 기간의 단축에 대한 성전환을 및 생리학적 영향에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

유도된 3배체의 검증을 위하여 세포 크기 및 염색체를 조사한 결과 3배체의 세포 크기는 장경에서 1.7배 증가되는 것으로 나타나 Kim 등(1988)의 보고와 동일하였다(Fig. 1). 염색체의 경우 분석된 개체에서 그 수가  $3n=90\sim 92$ 의 개체들이 나타나 3배체임을 확인할 수 있었다(Fig. 2a). 핵내 인수에 있어서 2배체는 세포당 1 또는 2개로 관찰되었으며, 3배체는 1, 2 및 3개로 관찰되어(Fig. 2b), Phillips 등(1986)의 결과와 일치하였다.

Table 2. Sex ratio of rainbow trout population treated with 17 $\alpha$ -methyltestosterone for 55 days at 16.5 $^{\circ}$ C

Exp. No	No. of fish observed	Sex			Percentage of male
		Male	Female	Intersex	
1	12	12	0	0	100
2	12	12	0	0	100
3	12	12	0	0	100
4	12	12	0	0	100
Total	48	48	0	0	100

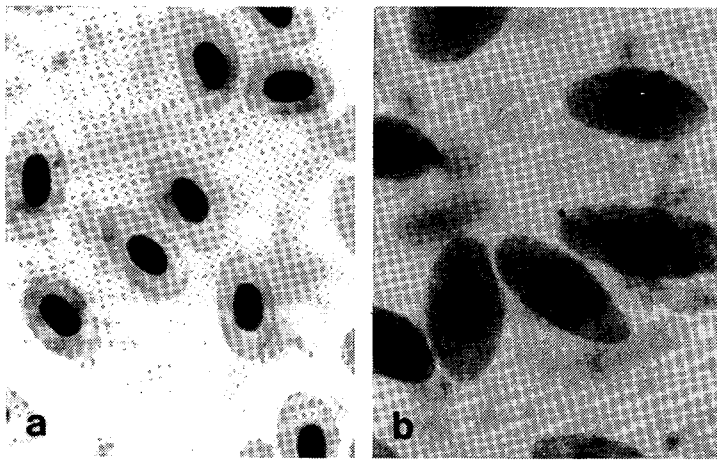


Fig. 1. Microphotographs of diploid (a) and artificial triploid (b) erythrocytes in rainbow trout.

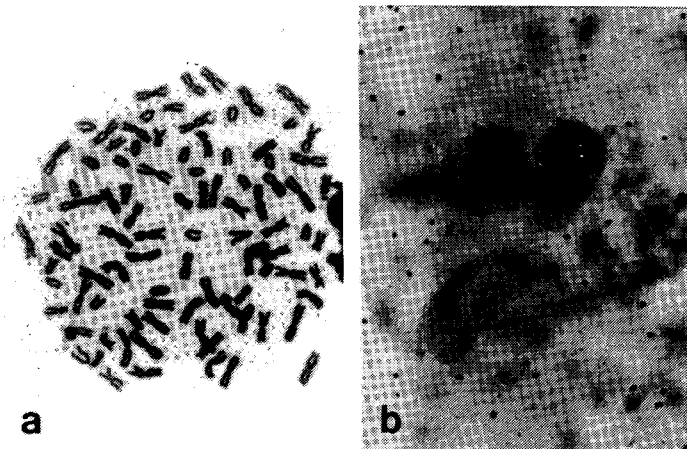


Fig. 2. Metaphase of triploid female rainbow trout (a) and silver-stained epithelial cells from triploid rainbow trout embryos (b).

염색체 조작에 의한 전암컷 3배체 무지개송어 조기난의 대량생산

3배체 생산을 위한 최적처리 시간을 구하기 위해 13.5℃ 조건에서 수정 후 5분부터 20분까지 2.5분 간격으로 15분 및 20분간 고온 처리를 행한 결과를 Table 3에 나타내었다. 발안율에 있어서 대조군이 85.2%로 나타났으며, 처리군은 28.8~59.1%의 범위로 나타났다. 3배체는 고온 처리군에서 전부 유도되었으며, 유도율은 66.7~100% 범위로 다양하게 나타났다. 수정 5분뒤 15분간의 고온 처리군은 91.7%, 수정 7.5분뒤 20분간의 고온처리는 90.5%의 3배체 유도율을 보였다. 또한 수정 12.5분, 15분, 17.5분 및 20분뒤 15분간의 고온처리에 의한 3배체 유도율이 각각 90.8%, 90.0%, 91.7% 및 91.7%로 나타났으며, 수정 10분 및 20분 뒤 20분간 고온 처리군에서 100% 3배체가 유도되었다. 이는 13.5℃ 수온 조건하에서 3배체 유도시 수정 5~20분 뒤 고온 처리하면 모두 3배체가 유도됨을 알 수 있어 최초 처리 시간에 따른 유도율에 있어 일정한 상관관계가 없음을 나타내어 Diter 등(1993)의 보고와 상반된 결과였다.

Lincoln and Bye (1984)는 무지개송어 3배체 생산시 생존율에 있어 고온 처리군이 사용된 난질에 따라 대조군에 비하여 20~60% 감소함을 보고한 바 있다. 또한 Springate (1984)는 10℃ 수온을 기준으로 이보다 높은 수온에서의 난의 성숙에 있어서는 난질이 현저하게 감소된다고 보고한 바 있다. 본 연구의 결과에서도 발안율에 있어 고온 처리군이 대조군에 비하여 50% 정도 낮게 나타나, 상기 연구자들의 결과와 일치하였다.

Table 3. Survival rate and triploid incidence obtained from heat shock at 28℃ for 15 and 20 minutes starting 5 to 20 minutes after insemination at 13.5℃

Initial treatment time (min)	Treatment duration (min)	Survival rate at eyed stage (%)	Triploid incidence (%)
control	-	92/108 (85.2)	0/12 ( 0.0)
5	15	67/188 (35.6)	11/12 (91.7)
	20	38/132 (28.8)	6/7 (85.7)
7.5	15	57/157 (36.3)	8/12 (66.7)
	20	60/152 (39.4)	19/21 (90.5)
10	15	50/134 (37.3)	10/12 (83.3)
	20	74/152 (48.7)	12/12 (100.0)
12.5	15	58/142 (40.8)	10/11 (90.9)
	20	72/186 (38.7)	9/11 (81.8)
15	15	61/123 (49.6)	18/20 (90.0)
	20	54/130 (41.5)	4/5 (80.0)
17.5	15	60/121 (49.6)	11/12 (91.7)
	20	54/131 (41.2)	2/3 (66.7)
20	15	75/127 (59.1)	11/12 (91.7)
	20	38/111 (34.2)	4/4 (100.0)

3배체 유도시 생존율을 높이기 위하여 수정 20분, 25분 및 30분 뒤에 26℃와 28℃의 고온 처리를 15분과 17.5분간 행한 결과를 Table 4에 나타내었다. 26℃와 28℃ 처리군에 있어서 발안율은 각각, 71.8~88.2%, 71.1~75.3%로 난의 발안기까지의 생존율에 있어서는 26℃ 처리군이 높은 것으로 나타났다. 3배체 유도율에 있어서는 각각 26.7~76.7%, 29.2~70.0%로 나타났다. Table 5는 3배체의 대량

생산을 위한 실험의 결과이다. 산란 기간 중 초기와 후기 두 번에 걸쳐 13.5℃의 수온에서 수정 후 18분 뒤 26.0℃의 고온 처리를 18분간 행한 결과 각각 15.0%, 36.7%의 발안율과 36.7%, 61.9%의 3배체 유도율을 나타내었다. 이는 국내에서 양식되고 있는 무지개송어의 3배체 유도시 Kim 등 (1986, 1993)에 의해 보고된 생존율 및 유도율보다 매우 낮은 결과였다. 이는 아마도 본 연구를 위해 산란을 유도한 시기의 사육 수온이 높은 때문으로 사료된다. Diaz 등 (1993)은 채란시의 수온과 3배체의 생존율과 유도율에 관한 연구에서 사육 수온 10.1~12.0℃ 와 12.1~14℃ 조건에서의 3배체 유도시 12.1~14.0℃ 사육수온에서는 10.1~12.0℃ 사육 수온보다 생존율과 유도율에서 10% 정도 낮음을 보고하였다. 본 연구에서도 산란기간 중 사료섭이율의 저하 및 높은 수온의 영향에 따라 좋은 난질을 획득하지 못하여 13.5℃ 에서의 3배체 대량생산은 산업적 이용이 가능한 유도율 90%를 상회하는 결과를 얻지 못하여 산업적 적용에 어려움이 따르리라 사료된다.

Table 4. Survival rate and triploid incidence obtained from heat shocks at 26℃ and 28℃, respectively, for 15 and 17.5 minutes starting 20, 25 and 30 minutes after insemination at 13.5℃

Temperature	Initial treatment time (min)	Treatment duration	Survival rate at eyed stage (%)	Triploid incidence (%)
control	-	-	338/400 (84.5)	0/30 ( 0.0)
26℃	20	15	262/297 (88.2)	8/30 (26.7)
		17.5	336/422 (79.6)	23/30 (76.7)
	25	15	331/461 (71.8)	16/30 (53.3)
		17.5	326/393 (83.0)	20/30 (66.7)
	30	15	259/305 (84.9)	12/30 (40.0)
		17.5	430/508 (84.6)	12/30 (40.0)
28℃	20	15	220/298 (73.8)	21/30 (70.0)
		17.5	311/413 (75.3)	17/30 (56.7)
	25	15	241/332 (72.6)	17/30 (56.7)
		17.5	268/366 (73.2)	14/30 (46.7)
	30	15	196/263 (74.5)	19/30 (63.3)
		17.5	244/343 (71.1)	7/24 (29.2)

Table 5. The results of mass production of triploid rainbow trout with heat shocks at 26.0℃ for 18 minutes starting 18 minutes after insemination at 13.5℃

Exp. No	No. of eggs treated	Survival rate at eyed stage (%)	Hatching rate (%)	Triploid incidence (%)
1	100,000	15/100 (15.0)	2/15 (13.3)	11/30 (36.7)
2	150,000	55/150 (36.7)	12/30 (40.0)	13/21 (61.9)

## 요 약

무지개송어 전 암컷 3배체 조기난 생산을 위해 1994년 9월 30일부터 3년생 암컷 친어에 대하여 광주기를 단일 처리하여 조기 산란 및 성전환 유도과 고온 처리에 의한 염색체 조작을 실시하였다.

광주기 조절이 시작된지 1개월째 170마리의 암컷으로부터 340,000개의 난을 얻었다. 그러나, 부화율에 있어서는 자연 상태의 산란기때 부화율에 미치지 못하는 40~55% 범위로 평균  $51.3 \pm 4.2\%$  였다( $P < 0.05$ ). 수컷으로의 성전환을 위해 16.5°C의 사육 수온 조건하에서 17 $\alpha$ -methyltestosterone 을 사료 1 kg당 3 mg 섞어 첫 먹이 공급기부터 55일간 공급하여 성전환율을 조사한 결과 전부 수컷으로 판명되어 16.5°C의 조건하에서도 성전환이 효율적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 13.5°C의 사육 수온 조건하에서 3배체를 생산하기 위해 최초 처리 시간 및 고온 처리 기간에 대해 다양한 조건으로 처리한 결과 발란기까지의 생존율에 있어 15.0~88.2% 범위로 나타났다. 이때 3배체 유도율은 36.7~100% 범위로 다양하였다.

## 참 고 문 헌

- Bromage, N., J. Jones, C. Randall, M. Thrush, B. Davies, J. Springate, J. Duston and G. Barker. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141~166.
- Bye, V. J. and R. F. Lincoln. 1981. Get rid of the males and let the female prosper. *Fish Farm.* 4: 22~24.
- Diaz, N. F., P. Iturra, A. Veloso, F. Estay and N. Colihueque. 1993. Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 114: 33~40.
- Diter, A., E. Quillet and D. Chourrout. 1993. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J. Fish Biol.* 42: 777~786.
- Guo, X., W. K. Hershberger and J. M. Myers. 1990. Growth and survival of intrastain and interstrain rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) triploids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 250~256.
- Hershberger, W. K. 1992. Genetic variability in rainbow trout populations. *Aquaculture* 100: 51~71.
- Jeong, C. H. 1993. Inducion of all-female triploid in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostomi : Salmonidae). Master thesis, Nat'l. Fish. Univ. Pusan, Korea 32pp.
- Johnstone, R., T. H. Simpson, A. F. Youngson and C. Whitehead. 1979. Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture* 18: 13~19.
- Kim, D. S., E.-H. Park and J. S. Kim. 1982. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes (Teleostomi : Siluriformes). *Korean J. Genet.* 4: 57~68.
- 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., C. H. Jeong and I.-B. Kim. 1993. Induction of all-female triploid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Korean J. Genet.* 15: 213~218.

- Kim, D. S., J.-Y. Jo and T.-Y. Lee. 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture* 120: 263~270.
- Lincoln, R. F. and A. P. Scott. 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture* 30: 375~380.
- Lincoln, R. F. and V. J. Bye. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. *Fish Farm.* 7: 22~26.
- 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.
- Springate, J. R. C., N. R. Bromage, J. A. K. Elliot and D. L. Hudson. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatching swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 43: 313~322.
- Thorgaard, G. H. 1992. Application of genetic technologies to rainbow trout. *Aquaculture* 100: 85~97.
- Thorgaard, G. H. and G. A. E. Gall. 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics* 93: 961~973.