

## 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*와 미꾸리, *M. anguillicaudatus*간 잡종 및 잡종 3배체 일부 조직에서의 세포 및 핵 크기

박인석<sup>1†</sup> · 김동수<sup>2</sup>

<sup>1</sup>군산대학교 해양생명과학부, <sup>2</sup>부경대학교 양식학과

### Comparison of Some Tissues in Diploid and Triploid Hybrid between Mud Loach, *Misgurnus mizolepis* and Cyprinid Loach, *M. anguillicaudatus*

In-Seok Park<sup>1†</sup> and Dong-Soo Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Marine Life Science, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**요약:** 암컷 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*와 수컷 미꾸리, *M. anguillicaudatus*간 잡종과 잡종 3배체를 생산하였으며, 잡종화 및 잡종 3배체화가 망막, 시개 및 trunk kidney에 미치는 영향을 조직학적으로 조사하였다. 잡종은 일부 조직의 핵과 세포 크기에서 양친과 거의 유사하였다. 잡종 3배체는 잡종에 비해 적혈구 세포 및 핵 크기, 망막 내과립층 horizontal cell 핵 크기, 망막신경절 신경세포 층의 신경세포, 시개과립층의 신경세포 핵 및 trunk kidney 2차 근위노세관 세포 및 핵 크기에서 증가한 반면 망막 외과립층 수와 2차 근위노세관 핵 수에서는 감소하였다. 본 연구 결과 잡종에 비해 잡종 3배체의 일부 조직에서 세포 및 핵 크기 증가를 동반한 세포 수 감소 특성은, 미꾸리류에서의 잡종 및 잡종 3배체의 판별 및 배수화 수준 평가의 한 방법으로 사용 가능할 것이다.

**ABSTRACT:** Diploid and triploid hybrid between female mud loach, *Misgurnus mizolepis* and male cyprinid loach, *M. anguillicaudatus* were produced, using artificial propagation. The influence of hybridization and triploidization on characteristics of the some tissues of retina, optic tectum and trunk kidney in loach was determined histologically. Diploid hybrid have almost size similarities in nucleus and the cell size of some tissues to both parents. In the triploid hybrid, the nucleus and/or the cell size in erythrocyte, horizontal cell in inner nuclear layer of retina, ganglion cell in ganglion cell layer of retina, neuronal cell in granular layer of optic tectum, and secondary proximal tubule cell of trunk kidney, are much larger than those of the corresponding cells in the diploid hybrid individuals. However, triploid hybrid showed fewer number of cells in outer nuclear layer in retina and nuclei in secondary proximal tubule of trunk kidney than in diploid hybrid. Results of this study suggest that some characteristics in the triploid hybrid exhibiting larger cell and nucleus size with fewer number of cell than diploid hybrid can be useful criteria for the distinction between diploid hybrid and triploid hybrid, and the ploidy level in loach.

**Key words:** *Misgurnus mizolepis*, *M. anguillicaudatus*, Diploid hybrid, Triploid hybrid, Cell and nucleus size.

## 서론

어류를 대상으로 한 잡종 (diploid hybrid) 유도는 우량 형질을 가진 서로 다른 두 종간의 교배를 통해 생산된 잡종으로 부터 잡종강세 (heterosis)를 획득하기 위하여 시도되며, 텔라피아인 경우 단성 (mono-sex) 집단 생산을 위한 방편으로 시도되고 또한, 유도된 잡종 자체의 감수분열 능력 상실

에 기인된 불임성 개체 생산을 위해 시도되고 있다 (Thorgaard et al., 1992; Wohlfarth, 1994; Kim et al., 1996; 박 등, 1996). 그러나 이와 같이 유도된 잡종은 대체로 그 초기생존율이 잡종 유도시 사용된 양친들의 초기생존율에 비해 낮게 나타나고 있어 이러한 낮은 초기생존율을 향상시키기 위하여, 유도된 잡종의 3배체화에 의해 이루어지는 잡종 3배체 (triploid hybrid)가 생산되고 있다 (Thorgaard et al., 1992; Gray et al., 1993; 박 등, 1997b, 1997c).

어류 3배체는 배수화에 기인되어 2배체에 비해 1.5배의 염색체 증가 및 이에 따른 세포 크기 증가 현상이 나타남에도 불구하고 체형의 거대화 (giantism)는 동반하지 않는 것으로,

†교신저자: 전북 군산시 소흥동 1044-2, 군산대학교 해양과학대학 해양생명과학부 (우) 573-702 (전) 063-469-4595 (팩) 063-463-4595 e-mail: ispark2@kunsan.ac.kr

이러한 현상은 Swarup (1959b)이 3배체 stickleback *Gasterosteus aculeatus*의 연골, 혈액 및 신경세포에서의 세포 및 핵 크기가 2배체에 비해 증가하나 이러한 세포 및 핵 크기 증가가 3배체의 체형에 영향을 미치지 않음을 밝힌 바 있다. 3배체는 적혈구 세포 및 핵 크기에서 2배체에 비해 증가하나, 반면 3배체의 적혈구 수가 2배체에 비해 오히려 감소함에 따라 3배체 체형 증가 효과를 상쇄하는 것으로서, 이와 같은 3배체에서의 적혈구 수 감소는 3배체의 적혈구 효소 활성 감소, 낮은 산소 운반 능력을 야기한다 (Ueno, 1984; Sezaki et al., 1988; 박과 박, 1994). 현재까지 어류 3배체를 판별할 수 있는 방법으로는 염색체 분석법 (Thorgaard, 1986), 핵 DNA 함량의 microfluorimetry법 (Komaru et al., 1988), flowcytometry에 의한 핵 DNA 함량 측정법 (Allen and Stanley, 1978), 적혈구 세포 및 핵 크기 측정법 (Thorgaard, 1986; 김 등, 1990; 박과 김, 1994; 박 등, 1994), 인의 수 판별법 (Phillips et al., 1986) 및 세포 수 측정법 (Ueno, 1984; 박과 박, 1994)이 있으며 일부 조직에서의 세포 및 핵 크기 조사법 (Swarup, 1959a; Aliah et al., 1990)이 보고되고 있다.

미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*와 미꾸리, *M. anguillicaudatus*는 현재 우리나라 내수면 양식산업에서 주요 위치를 차지하는 어종들로, Kim 등 (1995), 김 등 (1999) 및 박 등 (1997a)은 이러한 미꾸라지와 미꾸리를 대상으로 교배체, 역교배체 및 이들 각각의 잡종 3배체를 유도한 바 있다. 본 연구는 이와 같은 연구를 토대로 유도된 암컷 미꾸라지와 수컷 미꾸리간의 잡종군 및 잡종 3배체군 그리고 미꾸라지군 및 미꾸리군을 대상으로 일부 조직에서의 세포 및 핵 크기를 조사한 후 일부 조직에서 어떠한 변화를 나타내는지를 파악하고자 하였다. 그리하여 잡종 3배체화시 잡종에 비해 변화를 보이는 일부 조직을 규명하여, 차후 미꾸리류, 미꾸리류 잡종 및 미꾸리류 잡종 3배체를 위시한 여타 어류 잡종 3배체화시 배수체 수준 확인 방편으로 본 연구 결과의 가능성을 타진하고자 한다.

## 재료 및 방법

성숙한 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis* 암컷 5마리와 수컷 3마리 그리고 성숙한 미꾸리, *M. anguillicaudatus* 암컷 5마리와 수컷 3마리를 대상으로 Kim 등 (1995)의 방법에 의해 산란을 유도하였다. 인공수정 후 미꾸라지군과 미꾸리군을 설정하였으며 미꾸라지 암컷과 미꾸리 수컷과의 교배에 의한 잡종군 및 이들 잡종군을 3배체화한 잡종 3배체군을 박 (1992)의 방법에 의하여 유도하여 설정하였다. 부화 후 10개

월에 미꾸라지군, 미꾸리군, 잡종군 및 잡종 3배체군으로 부터 각 20마리씩을 무작위 표본하였으며, 이들 군들의 확인은 Kim 등 (1995, 1996)이 사용한 신장직접법에 의한 염색체 수 조사 및 핵형 분석에 의하였다.

표본된 각 실험군으로 부터의 20마리를 대상으로 300 ppm 염산리도카인 (친화약품, 한국)/1,000 ppm NaHCO<sub>3</sub>로 마취 후 (김 등, 1988) 1 ml 1회용 주사기를 사용하여 미병부위 미부정맥에서 채혈하여 slide glass에 도말하였다. 도말된 혈액 표본을 May-Grünwaldt Giemsa로 염색 후 ×1,000 배율의 생물현미경 (Axioskop, Zeiss, Germany) 하에서 관찰하였으며 각 개체당 100개 이상의 적혈구를 대상으로 이들의 세포 및 핵의 장, 단경을 접안 micrometer disc를 통하여 측정하였다. 측정된 적혈구 세포 및 핵의 장·단경을 대상으로, 김 등 (1990)의 방법에 따라 표면적은  $\frac{1}{4}ab\pi$  로, 부피는  $\frac{4}{3}(a/2)(b/2)\pi$  로 계산하였다 (a, 세포 및 핵의 장경; b, 세포 및 핵의 단경). 본 실험의 일부 조직에서 계산된 모든 표면적 및 부피 역시 이와 같은 공식을 사용하여 계산하였다. 미꾸라지군, 미꾸리군, 잡종군 및 잡종 3배체군의 각 일부 조직에서의 세포 및 핵 크기 측정을 위해 10% 중성포르말린에 고정된 눈 (eye), 신장 (kidney) 및 시개 (optic tectum)를 Bouin 용액에 24 시간 재고정하였다. 이후 통상의 paraffin 조직절편법을 사용하여 6  $\mu$ m 두께로 절편 후 hematoxylin 및 eosin Y-phroline B로 염색된 slide 표본을 작성하여 검정하였다.

각 실험군으로 부터의 20마리 표본당 30개 slide 표본을 대상으로 망막 (retina), 신장 및 시개의 조직을 조사, 비교하였다. 망막의 두께와 망막을 이루는 각 층의 두께를 ×1,000 배율의 생물현미경 하에서 접안 micrometer disc를 통하여 0.01  $\mu$ m 단위까지 측정하여, 망막 전체 두께에 대한 망막을 이루는 각 층의 두께를 백분율로 환산하였다. 아울러 망막의 외과립층 (outer nuclear layer) 수를 조사하였다. 배율 ×1,000의 생물현미경 하에서 접안 micrometer disc를 통한 핵 크기 측정을 위해 망막 내과립층 (inner nuclear layer) 내의 horizontal cell의 핵, 망막 신경세포층 (ganglion cell layer) 내의 신경세포 (ganglion cell)의 핵 그리고 시개과립층 (granular layer of optic tectum) 내의 신경세포 핵 (neuronal cell nucleus)의 장·단경을 측정하였다. 아울러 측정된 핵 크기를 기준으로 표면적 및 부피를 계산하였다. Trunk kidney의 2차 근위뇨세관 (secondary proximal tubule)의 세포 및 핵 크기 측정을 위해 세포 및 핵의 장·단경을 측정 후 측정된 세포 및 핵 크기를 대상으로 세포의 표면적 및 핵의 표면적과 부피를 계산하였으며, 2차 근위뇨세관내 핵 수를 역시 계수하였다. 망막, 신장 및 시개의 조직상을 촬영하였으며 미꾸라지군, 미꾸리군,

잡종군 및 잡종 3배체군의 각 측정 항목 평균치에서의 차이 정도는 Duncan's multiple range test로 수준에서 그 유의성을 검정하였다 (P<0.05).

### 결 과

미꾸라지군, 미꾸리군, 잡종군 및 잡종 3배체에서 각 적혈구 세포 및 핵의 장축 및 단축 크기를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 미꾸라지군, 미꾸리군 및 잡종군은 적혈구 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 각 항목별 서로간 크기 차이가 없었다. 반면 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 적혈구 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 각각 1.16배, 1.20배 1.21배 그리고 1.29배로 컸다 (P<0.05). 적혈구 핵의 장축과 단축에서 미꾸라지군, 미꾸리군, 및 잡종군이 서로 유사한 크기인 반면, 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 적혈구 핵의 장축과 단축에서 각각 1.38배, 1.17배로 컸다 (P<0.05). 적혈구 핵의 표면적 그리고 적혈구 핵의 부피에서 미꾸리군과 잡종군은 서로 유사하였으며 이들은 미꾸라지군에 비해 각각 작았다 (P<0.05). 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 적혈구 핵의 표면적과 부피에서 각각 1.72배, 2.13배로 컸다 (P<0.05).

Table 2와 Fig. 1의 a, c는 미꾸라지군, 미꾸리군, 잡종군 및 잡종 3배체군의 망막 두께, 망막에 대비한 망막을 이루는 각 층의 두께 백분율 및 망막 과립층 수를 조사, 비교한 결과이다. 망막 두께에서 잡종 3배체군은 137.48  $\mu\text{m}$ 로 미꾸라지군, 미꾸리군 및 잡종군의 망막 두께 범위 143.98~148.27  $\mu\text{m}$ 에 비

해 작았으며 (p<0.05), 잡종 3배군은 잡종군에 비해 망막 두께가 0.95배로 감소하였다. 표피층 비는 미꾸리군, 잡종군 및 잡종 3배체군이 서로 유사하였으며 미꾸라지군의 표피층 비 18.07%에 비해 컸다 (P<0.05). 시각세포층 비는 잡종 3배체군이 39.94%로 가장 컸고 미꾸라지군, 잡종군 그리고 미꾸리군의 순으로 시각세포층 크기 비를 보였으며 (P<0.05), 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 1.08배의 시각세포층 비가 증가하였다. 미꾸라지군, 미꾸리군, 잡종군은 외과립층 비와 신경섬유층 비에서 각각 6.08~6.12%, 3.00~3.39%의 범위를 보여 서로 유사하였다. 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 외과립층 비에서는 0.83배의 감소 그리고 신경섬유층 비에서는 1.21배의 증가를 보였다 (P<0.05). 외망상층 비와 신경절 세포층 비에서는 모든 실험군이 유사하였다. 내과립층 비에서는 미꾸라지군과 잡종 3배체군이 서로 유사하고 가장 크게 나타났으며, 잡종군 그리고 미꾸리 순으로 내과립층 크기 비를 보였다 (P<0.05). 내망상층 비에서는 미꾸라지군이 가장 컸으며 미꾸리군과 잡종군이 서로 유사하게 중간 크기를 보였고 잡종 3배체군이 가장 낮은 크기를 보였다 (P<0.05). 내망상층 비에서 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 0.78배 작았다. 망막 외과립층 수는 미꾸라지군, 미꾸리군 그리고 잡종군이 각각 3층을 보인 반면 잡종 3배체군은 2층의 망막 외과립층 수를 보였다 (Fig. 1의 b, d).

Table 3과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 망막 내과립층 horizontal cell 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피 그리고 망막 신경절 세포층내 신경세포 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피

Table 1. Size of erythrocyte and nucleus in *Misgurnus mizolepis*, *M. anguillicaudatus*, diploid hybrid, and triploid hybrid between two species

	<i>M. mizolepis</i>	<i>M. anguillicaudatus</i>	Diploid hybrid	Triploid hybrid	Ratios of means*
Erythrocyte**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	11.29 ± 0.27 <sup>a</sup>	11.44 ± 0.63 <sup>a</sup>	11.39 ± 0.58 <sup>a</sup>	13.22 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.16
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	7.49 ± 0.42 <sup>a</sup>	7.64 ± 0.76 <sup>a</sup>	7.57 ± 0.74 <sup>a</sup>	9.05 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.20
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	67.50 ± 5.45 <sup>a</sup>	68.93 ± 11.05 <sup>a</sup>	67.81 ± 9.95 <sup>a</sup>	82.09 ± 1.25 <sup>b</sup>	1.21
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	342.30 ± 46.80 <sup>a</sup>	356.46 ± 96.01 <sup>a</sup>	347.51 ± 89.28 <sup>a</sup>	449.12 ± 2.15 <sup>b</sup>	1.29
Nucleus of erythrocyte**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	5.27 ± 0.27 <sup>a</sup>	5.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.20 ± 0.19 <sup>a</sup>	7.16 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.38
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	2.93 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.17
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	12.53 ± 1.41 <sup>a</sup>	11.23 ± 0.57 <sup>b</sup>	10.89 ± 0.36 <sup>b</sup>	18.76 ± 0.27 <sup>c</sup>	1.72
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	24.53 ± 4.48 <sup>a</sup>	21.18 ± 2.29 <sup>b</sup>	19.64 ± 1.25 <sup>b</sup>	41.89 ± 0.86 <sup>c</sup>	2.13

\* Triploid hybrid/diploid hybrid.

\*\* Values are means ± SD. Values in same row having the different superscripts are significantly different (P<0.05).

**Table 2. Thickness in each component layer and the numbers of outer nuclear layer of retina in *Misgurnus mizolepis*, *M. anguillicaudatus*, diploid hybrid, and triploid hybrid between two species**

	<i>M.</i> <i>mizolepis</i>	<i>M.</i> <i>anguillicaudatus</i>	Diploid hybrid	Triploid hybrid	Ratios of means*
Thickness of retina ( $\mu\text{m}$ )**	148.27 $\pm$ 14.28 <sup>a</sup>	143.98 $\pm$ 13.11 <sup>a</sup>	145.18 $\pm$ 12.79 <sup>a</sup>	137.48 $\pm$ 9.07 <sup>b</sup>	0.95
Thickness of each layer of retina (%)**					
Epithelial layer	18.07 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	22.82 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	20.37 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>	19.96 $\pm$ 1.79 <sup>b</sup>	0.98
Rod and cone layer	38.07 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>	36.00 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup>	37.02 $\pm$ 3.90 <sup>c</sup>	39.94 $\pm$ 3.65 <sup>d</sup>	1.08
Outer nuclear layer	6.08 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	6.12 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	6.10 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	5.04 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.83
Outer plexiform layer	6.73 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	7.03 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	7.00 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	6.89 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.98
Inner nuclear layer	11.70 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	10.66 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	11.21 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	11.88 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	1.06
Inner plexiform layer	13.05 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	11.42 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	12.09 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	9.46 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	0.78
Ganglion cell layer	2.91 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.95 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.94 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.86 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.97
Optic nerve fiber layer	3.39 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.27 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.97 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.21
Number of outer nuclear layers in retina	3	3	3	2	1.50

\* Triploid hybrid/diploid hybrid.

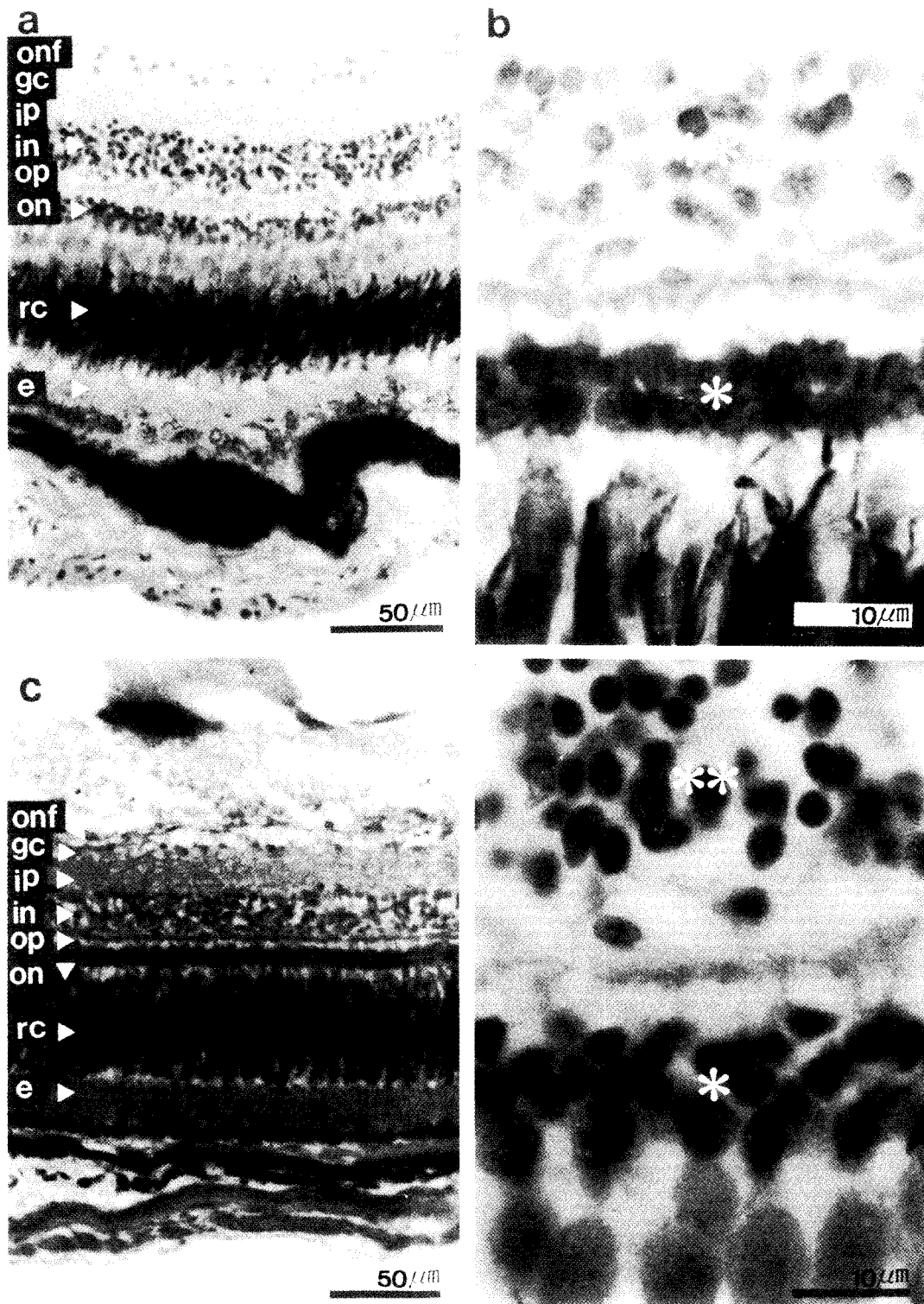
\*\* Values are means $\pm$ SD. Values in same row having the different superscripts are significantly different (P<0.05).

**Table 3. Nuclear size for horizontal cell and ganglion cell of retina and neuronal cell of optic tectum in *Misgurnus mizolepis*, *M. anguillicaudatus*, diploid hybrid, and triploid hybrid between two species**

	<i>M.</i> <i>mizolepis</i>	<i>M.</i> <i>anguillicaudatus</i>	Diploid hybrid	Triploid hybrid	Ratios of means*
Horizontal cell nucleus in inner nuclear layer of retina**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	3.10 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.06 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	3.62 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.18
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	2.80 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.77 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.79 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.45 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.24
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	6.81 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	6.51 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	6.70 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	9.79 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.46
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	12.71 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	12.04 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	12.44 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	22.52 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	1.80
Ganglion cell nucleus in ganglion cell layer of retina**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	3.27 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.13 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	3.20 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	3.95 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.23
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	3.01 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.97 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.23
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	7.70 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	7.11 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	7.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	11.29 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	1.52
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	15.48 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	13.75 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	14.74 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	27.50 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>	1.87
Neuronal cell nucleus in granular layer of optic tectum**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	3.87 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	3.50 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	3.73 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.60 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.23
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	3.43 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	3.03 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.20 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	4.00 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	1.25
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	10.40 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	8.31 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	9.34 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	14.41 $\pm$ 1.09 <sup>c</sup>	1.54
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	23.81 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	16.80 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	19.95 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	38.48 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup>	1.93

\* Triploid hybrid/diploid hybrid.

\*\* Values are means $\pm$ SD. Values in same row having the different superscripts are significantly different (P<0.05).



**Fig. 1.** Retina of hybrid and triploid hybrid between *Misgurnus mizolepis* and *M. anguillicaudatus*. a, layer of retina of diploid hybrid; b, outer nuclear layer (\*1) and horizontal cell nucleus (\*2) in inner nuclear layer of diploid hybrid retina; c, layer of retina of triploid hybrid; d, outer nuclear layer (\*1) and horizontal cell nucleus (\*2) in inner nuclear layer of triploid hybrid retina. Abbr. onf, optic nerve fiber layer; gc, ganglion cell layer; ip, inner plexiform layer; in, inner nuclear layer; op, outer plexiform layer; on, outer nuclear layer; rc, rod and cone layer; e, epithelial layer.

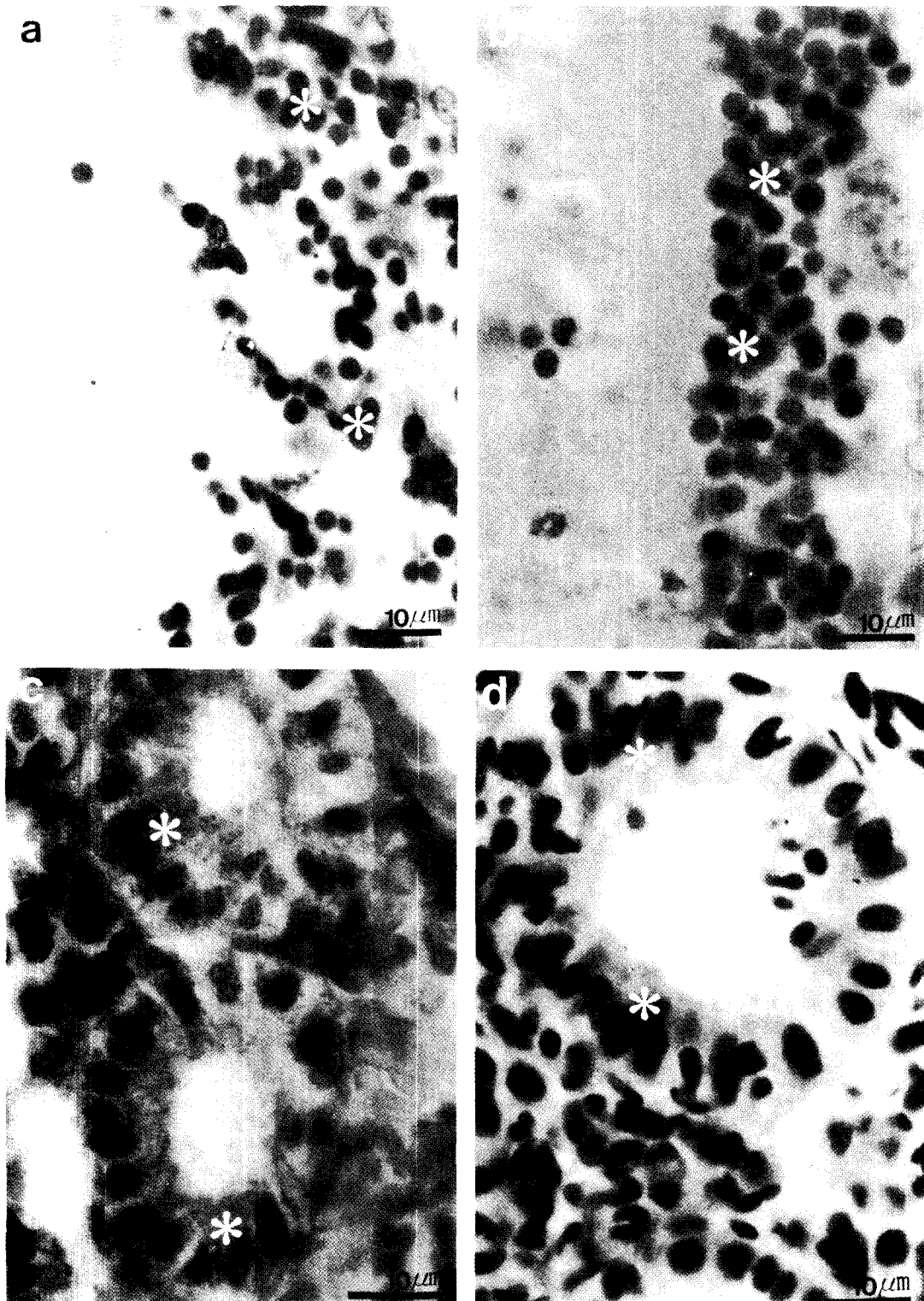


Fig. 2. Neuronal cell nucleus in granular layer of optic tectum and secondary proximal tubule of trunk kidney in diploid hybrid and triploid hybrid between *Misgurnus mizolepis* and *M. anguillicaudatus*. a, neuronal cell nucleus (\*) in granular layer of diploid hybrid optic tectum; b, neuronal cell nucleus (\*) in granular layer of triploid hybrid optic tectum; c, secondary proximal tubule nucleus (\*) of diploid hybrid trunk kidney; d, secondary proximal tubule nucleus (\*) of triploid hybrid trunk kidney.

**Table 4. Cell and nuclear size of secondary proximal tubule of trunk kidney and its nuclear number in *Misgurnus mizolepis*, *M. anguillicaudatus*, diploid hybrid, and triploid hybrid between two species**

	<i>M.</i> <i>mizolepis</i>	<i>M.</i> <i>anguillicaudatus</i>	Diploid hybrid	Triploid hybrid	Ratios of means*
Secondary proximal tubule cell of trunk kidney**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	42.74 ± 3.78 <sup>a</sup>	39.06 ± 2.98 <sup>a</sup>	41.66 ± 2.78 <sup>a</sup>	56.73 ± 4.91 <sup>b</sup>	1.36
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	33.71 ± 2.92 <sup>a</sup>	31.38 ± 2.04 <sup>a</sup>	32.74 ± 2.49 <sup>a</sup>	42.29 ± 3.86 <sup>b</sup>	1.29
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	1,124.16 ± 138.52 <sup>a</sup>	954.72 ± 105.28 <sup>a</sup>	1,074.27 ± 101.34 <sup>a</sup>	1,893.53 ± 191.46 <sup>b</sup>	1.76
Secondary proximal tubule nucleus of trunk kidney**					
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	4.21 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.99 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.14 ± 0.37 <sup>a</sup>	5.08 ± 0.47 <sup>b</sup>	1.23
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	3.33 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.98 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.28
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	10.85 ± 0.80 <sup>a</sup>	8.85 ± 0.78 <sup>b</sup>	9.94 ± 0.70 <sup>b</sup>	15.24 ± 0.98 <sup>c</sup>	1.53
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	23.88 ± 1.51 <sup>a</sup>	17.12 ± 0.59 <sup>b</sup>	20.58 ± 2.39 <sup>b</sup>	32.82 ± 2.80 <sup>c</sup>	1.59
Nucleus number in secondary proximal tubule**	11.94 ± 0.89 <sup>a</sup>	12.21 ± 0.93 <sup>a</sup>	12.17 ± 0.91 <sup>a</sup>	7.48 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.61

\* Triploid hybrids/diploid hybrid.

\*\* Values are means ± SD. Values in same row having the different superscripts are significantly different (P < 0.05).

에 있어 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근은 서로 유사한 반면 잡종 3배체근은 이들에 비해 컸다 (P < 0.05). 이러한 잡종 3배체근의 잡종근에 대한 크기 증가는, horizontal cell 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 각각 1.18배, 1.24배, 1.46배 및 1.81배였으며 망막신경절 세포층내 신경세포 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 각각 1.23배, 1.23배, 1.52배 및 1.87배였다. Table 3에서 나타난 바와 같이 시개과립층내 신경세포 핵의 장축과 단축에서는 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근이 서로 크기가 유사한 반면, 잡종 3배체근은 이들에 비해 크기가 증가하여 잡종 3배체근은 잡종근에 비해 각각 1.23배, 1.25배였다 (Fig. 2의 a, b). 시개과립층내 신경세포 핵의 표면적과 부피에서 미꾸리근과 잡종근이 서로 유사하였으며 미꾸라지근은 이들보다 컸다 (P < 0.05). 잡종 3배체근은 시개과립층내 신경세포 핵의 표면적과 부피에서 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근에 비해 컸으며, 잡종근에 비해서는 각각 1.54배, 1.93배 컸다 (P < 0.05) (Fig. 2의 a, b).

Table 4는 각 실험군을 대상으로 한 trunk kidney 2차 근위뇨세관의 세포 및 핵 크기 측정과 2차 근위뇨세관내 핵 수를 측정한 결과이다. Trunk kidney 2차 근위뇨세관 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근은 서로 유사한 반면 잡종 3배체근은 이들에 비해 컸다 (P < 0.05). 이러한 잡종 3배체근의 잡종근에 대한 크기 증가는

trunk kidney 2차 근위뇨세관 세포의 장축, 단축 및 표면적에서 각각 1.36배, 1.29배 및 1.76배였다. Trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 장축과 단축에서 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근은 서로 유사한 반면, 잡종 3배체근은 이들에 비해 크기가 증가하였으며 잡종 3배체근은 잡종근에 비해 각각 1.23배, 1.28배이었다 (Fig. 2의 c, d). Trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 표면적과 부피에서 미꾸리근과 잡종근이 서로 유사하였고 미꾸라지근은 이들보다 컸다 (P < 0.05). 잡종 3배체근의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 표면적과 부피는 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근에 비해 각각 컸으며, 잡종근의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 표면적에 비해서는 1.53배 잡종근의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 부피에 비해 1.59배 컸다 (P < 0.05). Trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 평균 수는 미꾸라지근, 미꾸리근 및 잡종근이 각각 11.94개, 12.21개 및 12.17개로 서로 유사한 반면, 잡종 3배체근의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵의 평균 수는 평균 7.48개로 이들에 비해 감소하였으며 (P < 0.05), 잡종 3배체근은 잡종근에 비해 그 감소 정도가 0.61배에 달하였다 (Fig. 2의 c, d).

## 고찰

잡종근의 적혈구 세포 및 핵 크기는 잡종 유도시 사용된

미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*, 미꾸리, *M. anguillicaudatus*의 적혈구 세포 및 핵 크기의 중간이었으며 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 적혈구 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 1.16~1.29배, 적혈구 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 1.17~2.13배로 크기가 증가하였다. 이와 같이 3배체화시 적혈구 세포 및 핵 크기 증가는, 여타 어류 3배체에서 나타나는 현상과 마찬가지로 2배체에 대한 3배체의 모계 기원 염색체 반수체 증가에 기인된 것으로 (Thorgaard, 1986; 김 등, 1990; 박과 김, 1994; 박 등, 1994), 이러한 반수체 증가는 박 등 (1992)이 염색체와 DNA 함량에서는 미꾸라지와 미꾸리 잡종이 49개, 2.9 pg/cell 그리고 잡종 3배체가 72개, 4.8 pg /cell로 각각 보고한 바 있다. 현재 어류 3배체 생산은, 생산된 3배체 자체의 이러한 반수체 증가로 불임에 수반되는 그 어류 양식 산업적 제반 파급 효과를 추구하기 위하여 활발히 시도되고 있다 (Thorgaard, 1986; 김 등, 1990; 박과 김, 1994; 박 등, 1994; Kim et al., 1995). 어류 3배체에서 이러한 적혈구 세포 및 핵 크기 증가에도 불구하고 명확한 거대화가 일어나지 않음은, 3배체 어류 적혈구 수가 2배체 어류 적혈구 수에 비해 적어짐으로 인해 3배체 어류 자체내에서 적혈구 세포 및 핵 크기 효과를 상쇄시키기 때문이다 (Sezaki et al., 1988, 박과 박, 1994;). 반면, 비록 어류 3배체는 적혈구 수 감소로 인하여 2배체에 비해 산소 소비 및 호흡에 있어 낮은 효율을 보이는 하나, 3배체 대서양연어 *Salmo salar*, 3배체 white crappie *Pomoxis annularis* 및 3배체 산천어 *Oncorhynchus masou*에서의 각 적혈구 hemoglobin의 평균 함량 및 적혈구 hemoglobin의 평균 농도는 각각 이들 2배체에 비해 각각 높게 나타나고 있어 3배체 자체의 낮은 적혈구 수를 보상하고도 있다 (Benfey et al., 1984; 박과 박, 1994).

미꾸라지군과 미꾸리군의 망막을 이루는 각 층은 잉어과 어류 망막을 이루는 각 층의 특징을 나타내어 (Takashi, 1982) 표피층, 시각세포층, 외과립층, 외망상층, 내과립층, 내망상층, 신경절 세포층 및 신경섬유층으로 이루어졌다. 망막 두께에 대비한 각 망막층 두께 백분율에서 잡종군은 시각세포층과 내과립층에서 미꾸라지군과 미꾸리군의 중간치를 나타내었고, 표피층과 내망상층에서는 미꾸리군과 유사하였으며, 나머지 각 망막층에서는 미꾸라지군 및 미꾸리군과 닮게 나타났다. 이와 같은 형태적 형질을 비롯한 계수적 측면에서 잡종의 형질은 잡종 유도시 사용된 종간의 중간 형질을 보이거나 간혹 잡종이 일부 형질에서 한쪽 양친 형질과 유사하게 나타나고도 있다 (Chevassus, 1983; 박 등, 1997c). 잡종군에서 망막 외과립층 수는 미꾸라지군에서 3개 미꾸리군에서 3개와 동일하게 3개인 반면, stickleback *Gasterosteus aculeatus*

(Swarup, 1959a)와 은어 *Pleciglossus altivelis* (Aliah et al., 1990) 3배체화시의 보고와 마찬가지로 잡종 3배체군의 외과립층 수는 2개로 나타났다. 이에 따라서 잡종 3배체군의 외과립층 두께 백분율은 잡종군, 미꾸라지군 및 미꾸리군에 비해 작았으며 잡종 3배체군의 망막 두께 역시 잡종군, 미꾸라지군, 미꾸리군의 망막 두께에 비해 작았다.

잡종 3배체군에서의 시각세포층 두께의 망막 두께에 대한 백분율은 39.94%로 잡종군의 37.02%에 비해 1.08배 컸으며 이와 유사한 결과로 3배체 은어는 2배체 은어에 비해 시각세포층이 증가한 바 있다 (Aliah et al., 1990). 2배체 은어인 경우 시각세포층의 간체 (rod)와 추체 (cone)의 핵 수는 3배체 은어에 비해 많게 나타나며, 이런 이유로 인해 은어 3배체는 은어 2배체에 비해 시각의 정확성이 낮아진다고 지적된 바 있다 (Aliah et al., 1990). 이와 같은 2배체에 대한 3배체의 불리한 측면은 3배체 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*에서도 나타나, 3배체 무지개송어는 stress를 쉽게 받는 경향을 보임으로서 3배체 무지개송어를 2배체 무지개송어와 혼합 사육시 3배체 무지개송어는 2배체 무지개송어보다 먹이경쟁에서 뒤떨어지는 단점을 보이고 있다 (Aliah et al., 1990; Lincoln and Bye, 1984).

잡종 3배체군의 잡종군에 비한 망막 내과립층 horizontal cell 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피 그리고 망막신경절 신경세포층 신경세포 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서의 증가는 적혈구 세포 및 핵에서 잡종군에 대한 잡종 3배체군의 증가 결과와 유사한 경향이었으며, 잡종 3배체군의 잡종군에 대한 이러한 망막 내과립층 horizontal cell 핵 및 망막신경절 신경세포층 신경세포 핵에서의 크기 증가는 역시 3배체화에 따른 염색체 반수체 증가에 기인된 것으로 생각된다 (Thorgaard, 1986; Aliah et al., 1990; 박 등, 1996; 박 등, 1997b). 잡종 3배체군의 시개 과립층내 신경세포 핵 역시 3배체화에 따른 염색체 반수체 증가에 기인되어 잡종 3배체군의 잡종군에 대한 시개과립층내 신경세포 핵의 장축에서의 증가는 1.23배, 단축에서의 증가는 1.25배, 표면적에서의 증가는 1.54배 및 부피에서의 증가는 1.93배로 나타나, 이를 3배체 은어의 2배체 은어에 대한 시개과립층내 신경세포 핵의 장축에서의 증가 1.39배, 단축에서의 증가 1.36배, 표면적에서의 증가 1.88배 및 부피에서의 증가 2.54배와 비교시 다소 낮았다 (Aliah et al., 1990).

잡종 3배체군의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 세포 및 핵의 크기는 각각의 잡종군에 비해 커, 망막 내과립층 horizontal cell, 망막신경절 신경세포층 신경세포 및 시개과립층 신경세포에서의 3배체화에 따른 핵 크기 증가와 마찬가지로 경향인



반면, 잡종 3배체군의 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵 수, 즉 세포 수는 잡종군에 비해 적었다. 이와 같은 잡종 3배체군의 잡종군에 대한 세포 수 감소 양상은 본 연구의 망막 외과립층 수에서도 역시 보여지고 있는 것으로, 이러한 양상은 stickleback인 경우 2배체는 3배체에 비해 전신관 (pronephric duct)의 세포 수가 1.5배 크게 그리고 은어인 경우 2배체는 3배체에 비해 trunk kidney 2차 근위뇨세관 핵 수가 1.5배 크게 나타나고 있다 (Swarup, 1959a; Aliah et al., 1990). 이와 같이 어류에서 3배체화에 따른 세포 및 핵 크기 증가에 반한 세포 수 감소 결과는 여타 3배체 어류에서 적혈구 핵 및 세포 크기와 적혈구 수와의 관계를 고려시 동일하게 나타나는 현상으로, 이러한 현상은 어류 3배체는 2배체에 비해 배수화에 기인되어 세포 및 핵 크기 증가에도 불구하고 거대화가 일어나지 않는 이유를 잘 반영하고 있다 (Ueno, 1984; Aliah et al., 1990; 박과 박, 1994).

본 연구 결과 일부 3배체 어류를 2배체 어류에 비교시 나타나는 경향과 동일하게, 미꾸라지군과 미꾸리군간 잡종 3배체군은 잡종군에 비해 적혈구 세포 및 핵 크기, 망막 내과립층 horizontal cell 핵 크기, 망막신경절 신경세포층의 신경세포, 시개과립층의 신경세포 핵 및 trunk kidney 2차 근위뇨세관 세포 및 핵 크기에서 증가를 보인 반면 망막 외과립층 수와 2차 근위뇨세관 핵 수에서 감소를 보였다. 이러한 잡종 3배체의 일부 조직에서의 세포 및 핵 크기 증가, 세포 수 감소 특성은 염색체 분석법, 핵 DNA 함량의 microfluorimetry법, flowcytometry로의 핵 DNA 함량 측정법, 세포 및 핵 크기 측정법, 인의 수 판별법 및 세포 수 측정법과 아울러 미꾸라지와 미꾸리에서의 잡종, 3배체 및 잡종 3배체 판별시 적용 방법으로 가능할 것이며, 여타 어류의 3배체와 잡종 3배체를 대상으로 본 연구에서 수행된 방법과 마찬가지로 3배체와 잡종 3배체에서의 특성 파악시, 파악된 특성 자체는 역시 그 3배체와 잡종 3배체 판별의 한 방편이 될 수 있으리라 사료된다.

## 인용문헌

- Aliah RS, Yamaoka K, Inada Y, Taniguchi N (1990) Effects of triploidy on tissue structure of some organs in ayu. Bull Japan Soc Sci Fish 56: 569-575.
- Allen SK Jr, Stanley JG (1978) Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Trans Amer Fish Soc 107: 473-478.
- Benfey TJ, Sutterlin AM, Thompson RJ (1984) Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. Can J Fish Aquat Sci 41: 980-984.
- Chevassus B (1983) Hybridization in fish. Aquaculture 33: 245-262.
- Gray AK, Evans MA, Thorgaard GH (1993) Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. Aquaculture 112: 125-142.
- Kim DS, Nam YK, Park I-S (1995) Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*M. anguillicaudatus*). Aquaculture 135: 257-265.
- Kim K-K, Bang IC, Kim Y, Nam YK, and Kim DS (1996) Early survival and chromosomes of intergeneric hybrids between Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and spotted halibut *Verasper variegatus*. Fish Sci 62: 490-491.
- Komaru A, Uchimura Y, Ieyama H, Wada KT (1988) Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. Aquaculture 69: 201-209.
- Lincoln R, Bye V (1984) Triploid rainbows show commercial potential. Fish Farmer 7: 30-32.
- Phillips RB, Zajicek KD, Ihssen PE, Johnson O (1986) Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquaculture 54: 313-319.
- Sezaki K, Watabe S, Hashimoto K (1988) Haematological parameters and erythrocyte enzyme activities associated with increase in ploidy status of the spinous loach, *Cobitis biwa* Jordan and Synder. J Fish Biol 32: 149-150.
- Swarup H (1959a) Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L). J Genet 56: 143-155.
- Swarup H (1959b) The oxygen consumption of diploid and triploid *Gasterosteus aculeatus* (L). J Genet 56: 156-160.
- Takashi H (1982) An Atlas of Fish Histology. Kodansha Ltd, Tokyo, pp. 147.
- Thorgaard GH (1986) Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 57: 57-64.
- Thorgaard GH, Scheerer PD, Zhang J (1992) Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies for fishes. Mol Mar Biol Biotech 1: 251-256.
- Ueno K (1984) Induction of triploid carp and their haematological characteristics. Jap J Genet 59: 585-591.

- Wohlfarth GW (1994) The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. *Aquacul Fish Manage* 25: 781-788.
- 김동수, 박인석, 남윤권 (1999) 미꾸리 역교배체 생산 방법. 대한민국 발명특허 제0243027호, 대한민국 특허청.
- 김동수, 방인철, 전세규, 김연환 (1988) 인체용 마취제인 염산리도카인이 수 종의 양식어류에 미치는 효과. *한국어병학회지* 1: 59-64.
- 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, 85 pp.
- 박인석, 김병기, 김종만, 최경철, 김동수 (1996) 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)와 은연어 (*O. kisutch*)간의 잡종 및 잡종 3배체 생산. *한국양식학회지* 9: 133-140.
- 박인석, 김봉석, 임재현, 박효민, 남윤권, 정창화, 김동수 (1997a) 미꾸리, *Misgurnus anguillicaudatus*의 생존을 향상을 위한 역교배체 생산. *한국양식학회지* 10: 363-371.
- 박인석, 김치홍, 최경철, 김동수 (1997b) 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*와 산천어, *O. masou*간의 잡종 및 잡종 3배체 생산. I. 세포유전학적 연구. *한국양식학회지* 10: 39-47.
- 박인석, 김형배 (1994) 3배체 산천어 (*Oncorhynchus masou*) 유도. *한국양식학회지* 7: 176-192.
- 박인석, 김형배, 손진기, 김동수 (1994) 3배체 참돔 (*Pagrus major*)의 생산. *한국어류학회지* 6: 71-78.
- 박인석, 박기영 (1994) 산천어, *Oncorhynchus masou* 2배체와 3배체간의 혈액학적, 생리학적 특징. *한국양식학회지* 7: 193-201.
- 박인석, 최경철, 김동수 (1997c) 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*와 산천어, *O. masou*간의 잡종 및 잡종 3배체 생산. II. 성비 및 계측형질 특징. *한국양식학회지* 10: 49-54.