

BSPN00245-703-3

연어과 어류의 생산 기술 연구
(왕연어 및 잡종 3배체)

Study on the Production Techniques for
Salmonids(King salmon and Allotriploid)

1994. 6

연구 기관
한국해양연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 연어과 어류의 생산 기술 연구 (왕연어 및 잡종 3배체)의 최종 보고서로 제출합니다.

1994년 6월

주관연구기관명: 한국해양연구소

총괄연구책임자: 허 형 택

연 구 원: 김종만 손진기

박철원 전중균

김형배 명정구

박인석 김병기

김형선 홍경표

김익겸 이근학

박호영

연 구 조 원: 박용주 김민석

노봉호 최희정

김연실

요 약 문

I. 제 목

연어과 어류의 생산 기술 연구
(왕연어 및 잡종 3배체)

II. 연구 개발의 목적 및 필요성

1980년대 들어와 본격적으로 시작된 해면 양식 산업은 주로 온수성 어류인 방어, 참돔을 중심으로 수행되어 왔다. 그러나 우리 나라의 겨울철 연안 수온이 10℃ 이하로 내려 가기때문에 방어와 같은 온수성 어종의 월동이 불가능하여 동절기에는 이러한 시설이 이용되지 못하였다. 이러한 점을 극복하기 위하여 연어, 송어와 같은 냉수성 어종의 양식 실험이 이루어져 최근 은연어의 실험은 성공적으로 이루어진 바 있다.

잡종화는 잡종 유도시 사용된 친어들보다 유용한 획득형질 즉 잡종강세를 얻기 위하여 실시되고 있다. 무지개송어와 은연어의 잡종은 무지개송어에 비해 IPN virus에 강하고 은연어에 비해 취급시 비늘 탈락이 적으므로 질병 감염에 강할 것으로 예상된다. 그러나 이러한 잡종은 초기 생존율이 매우 낮아 이들 잡종을 3배체화한 잡종3배체가 필요시된다.

본 연구는 태평양 연어류 중에서 가장 대형종인 왕연어를 대상으로 육상 사육, 해수 순치 및 해상 사육 기술을 개발하고 해상 사육용 종묘의 대형화를 위하여 염색체 분석기술을 비롯하여 연어류의 잡종 및 잡종 3배체를 생산하는 기술을 개발하는데 그 목적이 있다.

III. 연구 개발의 내용 및 범위

본 연구는 연어, 송어류 양식 기술개발에 관한 연구 사업 (1987.10-1992.12)에서 축적한 기술을 바탕으로 왕연어의 사육기술 개발과 잡종 및 잡종3배체 유도 기술을 개발하기 위한 과제로 1993년 10월부터 1993년 4월까지 실시되었다. 은연어와 무지개송어의 잡종, 잡종3배체 생산실험을 하였고 왕연어의 해면 가두리 양식 기술 개발을 위하여 해수 순치 실험, 해상 사육 실험이 시도되었다.

또한 이들의 염색체 분석을 위하여 조직배양을 통하여 C-banding 및 G-banding 기술을 개발하였다.

한편, 무지개송어와 은연어로부터의 잡종 및 잡종3배체의 초기생존율을 조사하였으며, 무지개송어, 은연어, 잡종 및 잡종3배체의 적혈구 핵, 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피를 측정하였다. 또한 잡종 및 잡종3배체의 염색체수와 핵형을 조사하였으며 아울러 생존성 있는 잡종3배체의 외형을 친어로 사용된 무지개송어 및 은연어와 비교하였다.

IV. 연구 결과

1. 어장 환경

치악수산은 연중 수온이 9.2 - 17.0℃(평균 13.4℃)로 유지되었고, 수질이 좋은 용천수 및 하천 복류수가 초강 100 - 150 l 유입되는 곳으로 스틸헤드 송어의 육상 사육 실험에 적합한 곳이었다.

해상 가두리 실험이 이루어진 춘무 시험어장은 10월 중순 부터 수온이 20℃ 이하로 하강하여 왕연어의 사육이 가능하였고 사육기간중 수온 범위가 10

-20℃였고 6월까지 약 8개월이 사육 가능한 기간이었다. 가두리가 위치한 곳은 태풍의 피해가 적고 조류 소통도 좋은 곳이었다.

2. 해상사육

왕연어를 해상 가두리에서 사육한 결과 일일성장율이 1.1%로 은연어(1.0%), 스틸헤드송어(1.2%)와 거의 비슷한 성장율을 나타내었다. 사료 효율은 왕연어가 66.7%로 스틸헤드송어(65.9%)와는 비슷하였으며 은연어(70.8%)보다는 낮았다.

3. 염색체분석

무지개송어를 중심으로 신장조직 배양을 통한 염색체 분석을 실시하였다. 특히 염색체의 수적 이상 및 다양한 구조적 결함을 알아보기 위해서는 G-banding이 효과적이었고 어류 염색체의 미세한 구조의 분석에 C-banding 기술의 응용 가능성을 타진하였다.

4. 잡종 및 잡종3배체

경제성이 높은 어종인 무지개송어와 은연어를 대상으로 두 종간의 장점을 갖춘 신품종을 개발하기 위하여 두 종간의 잡종 및 잡종3배체를 유도하였다.

그 결과 잡종의 부화율은 51.7%로 여타 대조군에 비해 낮았으나, 잡종3배체의 부화율은 77.6%로 무지개송어 3배체와 유사한 부화율을 보였다. 또한 부화 2개월 후의 생존율은 잡종인 경우 1.7%로 매우 낮았으나 잡종3배체는 54.5%로 무지개송어 3배체의 56.6% 생존율과 비슷하였다. 잡종의 세포 및 핵의 크기는 양친으로 사용된 두 종의 중간을 보였으며, 잡종3배체의 세포

및 핵의 크기는 잡종에 비해 크게 나타났다.

한편, 잡종의 염색체수는 60 개로 나타나 $n=30$ 의 염색체수를 가진 무지개 송어 난자와 $n=30$ 의 염색체수를 가진 은연어 정자와 교배된 개체만이 생존력을 가지는 것으로 나타났다. 잡종3배체의 경우 그의 염색체수는 90-93 개로 Robertsonian형의 전좌에 의한 염색체 다형현상을 보여주었다.

4. 종합건의

이상에서 살펴본 바와 같이 왕연어는 은연어와 마찬가지로 우리나라 연안의 해면양식 대상종으로 개발이 가능하다고 생각된다. 단 해수 사육을 개시하는 시점에서의 종묘 크기가 작으면 수확기까지 평균 2-3kg으로 성장이 어려우므로 종묘 대형화를 위한 사육 기술 확립이 필요하다. 따라서 사육기술 확립과 더불어 스폴트의 대형화를 위하여 다음과 같은 연구가 계속될 필요가 있다.

첫째, 잡종 및 잡종3배체 유도

둘째, 전용 사료 개발

셋째, 해면 양식사업의 자동화

넷째, 어류 유전자 분석기술의 고도화

ABSTRACT

I. Title

Study on the Production Techniques for Salmonids.

(King salmon and Allotriploid)

II. Objectives and significance

Since early 1980's marine finfish culture in Korea has been specialized with few warmwater fishes such as yellow tail and red sea bream. However, low temperature of Korean coastal waters, which occasionally drops below 10 in winter, makes it difficult for the warmwater fishes to overwinter. To ease this restriction, coldwater fishes such as salmon and trout have been introduced into Korean waters. Recently, coho salmon was successfully cultured in sea water using floating net pens.

In this study, our goal was on the development of culturing techniques for king salmon in sea water.

Hybridization was performed to obtain the heterosis(hybrid vigour) from the parent fish. Hybrid between female rainbow trout and male coho salmon, however, have been revealed lower early survival rate than their parents used, expected resist to disease and IPN virus. To increase the early survival rate of hybrid induction of allotriploid was necessary.

III. Contents and scope

To development the newly introduced salmon species in sea water culture, study on the sea cage culture of king salmon has been carried out from December 1993 to May 1994. The experimental organisms used king salmon which were not introduced in Korean waters before. Coho salmon and steelhead trout were also reared to compare their growth performance.

We also tried to develop chromosome analysing techniques using G-banding and C-banding through tissue culture.

To development the techniques for hybrid and allotriploid between coho salmon and rainbow trout, some experiment has done at rainbow triout fish farm(Chiac Fisheries Co.) and KORDI.

Induction of hybrid and allotriploid between female rainbow trout and male coho salmon was performed. Early survival rate and erythrocyte size were measured. Chromosome number and karyotype were analysed and comparision of external morphology of allotriploid to rainbow trout and coho salmon was performed.

IV. Results of the study

1. Environments of culture ground

Freshwater culture of king salmon was carried out at Chiac Fisheries Co.. Monthly water temperature ranged from 9.2°C to 17.0°C (mean 13.4°C) and underground water was supplied at the rate of 100 -

150 l/sec., whichs were considered to be adequate for culture of cold-water fishes.

Seawater cage culture was conducted at the Chungmu Experimental Fish Culture Station from Dec., 1993 through May 1994. The station is well protected from high wave activities and has moderate water temperature during the study period.

2. Seawater cage culture

Daily growth rate of king salmon(1.1%) were similar with that of coho salmon(1.0%) and steelhead trout(1.2%). King salmon showed lower food conversion rate(66.7%) than coho salmon(70.8%). At the end of experiment, king salmon remained 0.8kg, while coho salmon and steelhead trout reached 1.3kg and 1.6kg, respectively.

3. Cytogenetics

To develop the accuracy of chromosome analysis, we analyzed the chromosome of rainbow trout using kidney tissue culture technique. Especially, we used G-banding method to know chromosomal abnormality in number and structure, and we found it was effective in fish chromosome analysis. We also found that C-banding would be utilized to detect some structural deformations in fish.

4. Hybrid and allotriploid

Hybrid and allotriploid of female rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and male coho salmon(*O. kisutch*) were produced by artificial propagation and monitored for survival through early life stage.

Hatching rate and survival rate of allotriploid at two months after hatching was 77.6% and 54.5% respectively, and these hatching rate and survival rate certainly exceeded that of hybrid.

Cell and nuclear sizes of the erythrocyte of hybrid were intermediate of their parents and those of allotriploid were larger than their hybrid. The somatic chromosome number of viable hybrid was $2n=60$ and that of allotriploid was 90-93 with chromosomal polymorphism. Allotriploid karyotype was constituted of one genome of rainbow trout and two genomes of coho salmon used as parents.

5. Recommendation

Results of this study indicate that the king salmon appears to be suitable species for the sea cage culture. To produce large size salmon in sea water culture, follows are needed:

- 1) development of techniques for hybrid and allotriploid
- 2) development of diet for salmonids
- 3) development of automatic system for cage culture
- 4) development of genetics and breeding science in fish

목 차

표목차	13
그림목차	15
제1장 서론	17
제2장 재료 및 방법	19
제1절 어장환경	19
1. 어장의 위치와 규모	19
2. 어장의 물리·화학적 특성	19
가. 한국해양연구소	19
나. 치악수산	19
다. 충무시험어장	19
제2절 해상사육	21
제3절 염색체분석	22
제4절 무지개송어와 은연어간 잡종3배체	27
1. 초기생존율	27
2. 적혈구 계측	27
3. 염색체수 및 핵형	29
제3장 결과 및 고찰	30
제1절 어장환경	30
1. 어장의 위치와 규모	30
2. 어장의 물리·화학적 특성	31
가. 한국해양연구소	31

나. 치약수산	31
다. 충무시험어장	31
제2절 해상사육	33
제3절 염색체분석	38
제4절 무지개송어와 은연어간 잡종3배체	41
1. 초기생존율	41
2. 적혈구 계측	43
3. 염색체수 및 핵형	44
참고문헌	50

CONTENTS

List of table	14
List of figure	16
Chapter I. Introduction	17
Chapter II. Materials and methods	19
Section 1. Environment of culture ground	19
1. Location	19
2. Physiochemical characteristics	19
a. KORDI	19
b. Chiac Fisheries Co.	19
c. Chungmu Experimental Fish Culture Station	19
Section 2. Seawater cage culture	21
Section 3. Cytogenetics	22
Section 4. Allotriploid between rainbow trout and coho salmon	27
1. Early survival rate	27
2. Measurement of erythrocyte	27
3. Chromosome number and karyotype	29
Chapter III. Results	30
Section 1. Environment of culture ground	30
1. Location	30
2. Physiochemical characteristics	31

a. KORDI	31
b. Chiac Fisheries Co.	31
c. Chungmu Experimental Fish Culture Station	31
Section 2. Seawater cage culture	33
Section 3. Cytogenetics	38
Section 4. Allotriploid between rainbow trout and coho salmon	41
1. Early survival rate	41
2. Measurement of erythrocyte	43
3. Chromosome number and karyotype	44
References	50

표 목 차

- 표 1. 신장조직 배양을 위한 배양액의 조성
- 표 2. G-banding을 위한 반응시약의 조성
- 표 3. C-banding을 위한 반응시약의 조성
- 표 4. 왕연어의 해상 가두리 사육결과
- 표 5. 왕연어, 은연어 및 스틸헤드송어의 해상가두리에서의 성장비교
- 표 6. 신장 배양의 분석
- 표 7. 각 실험군의 부화율과 초기생존율
- 표 8. 무지개송어, 은연어, 잡종 및 잡종3배체의 적혈구 크기 비교

LIST OF TABLES

- Table 1. Composition of supplemented media for Kidney tissue culture.
- Table 2. Components of reagent for G-banding.
- Table 3. Components of reagent for C-banding.
- Table 4. Results of growth experiment of king salmon during sea-water cage culture
- Table 5. Comparison of growth of king salmon, coho salmon and steelhead trout cultured at sea, cage
- Table 6. Analysis of Kidney culture.
- Table 7. Data of hatching success and early survival rate
- Table 8. Comparison of erythrocyte size among rainbow trout, coho salmon, their hybrid and allotriploid

그림목차

- 그림 1. 시험어장의 위치
- 그림 2. 본 실험에 사용된 성숙 무지개송어(a)와 은연어(b)의 외형.
- 그림 3. 충무 시험어장의 표층(1.5m)의 수온 변화.
- 그림 4. 해상 가두리에서 사육한 왕연어, 은연어 및 스틸헤드송어의 체중 성장 비교.
- 그림 5. 무지개송어 암컷과 은연어 수컷간 갑종3배체의 염색체 증기상.
- 그림 6. 무지개송어(a), 갑종3배체(b) 및 은연어(c)의 외부형태.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Map showing the experimental fish farms.
A. KORDI, B. Chiac Fisheries Co.,
C. Chungmu Experimental Fish Culture Station.
- Fig. 2. External morphology of matured rainbow trout(a) and coho salmon(b) used in this experiment.
- Fig. 3. Fluctuation in water temperature at surface(1.5m) in Chungmu Experimental Fish Culture Station.
- Fig. 4. Comparison of body weight change of king salmon, coho salmon and steelhead trout during seawater cage culture
- Fig. 5. Metaphase of allotriploid between female rainbow trout and male coho salmon.
- Fig. 6. External morphology of rainbow trout(a), allotriploid(b) and coho salmon (c).

제 1장 서론

1977년 이후 각 연안국이 200해리의 경제 수역을 선포하고 난 뒤 많은 원양 어장을 상실하게 되었고 연안 어장도 매립 간척공사, 도시와 공단의 팽창 등으로 점차 오염되고 축소되고 있다. 그러므로 2000년대의 동물성 단백질의 공급을 원활한 공급을 위하여, 특히 수산물의 생산량 증가를 위해서는 연안 어장의 환경적 보전과 아울러 자원 증강 사업 및 양식 어업의 개발은 필수적이라 할 수 있다.

1960년대에 들어와 개발되기 시작한 우리 나라의 양식 산업은 대부분 패류, 조류등 무척추 동물을 중심으로 발달해 왔으며 어류양식은 1980년대에 와서야 발전하기 시작하였다 어류 양식사업은 최초 해상 가두리에서 일시 축양 후 판매하는 수준의 사업이었지만 80년대 중반에 육상 배양장에서 참돔, 넙치, 조피볼락 등 일부 어종의 중요 생산이 가능하게 됨에 따라 육상, 해상 시설에서의 완전 양식으로 발달해 왔다. 그러나 대부분의 양식 대상종이 온수성이었기때문에 수온이 10도전후로 하강하는 겨울철에는 성장을 거의 기대하지 못하거나 일부 어린 개체는 대량 폐사를 하는 어려움이 있어왔다. 이러한 저수온기를 최대한 활용할 수 있는 대상종은 역시 연어, 송어류를 중심으로한 냉수성 어종이라 할 수 있다. 온수성 어종과 냉수성 어종을 함께 사업 대상으로 선정하여 운영의 묘를 피할 경우 일년 내내 실질적인 성장을 기대할 수 있는 해상 가두리에서의 이모작화를 피할 수 있다.

냉수성 어종의 양식은 한국 해양 연구소에서 1984년부터 은연어를 대상으로 시작되어 1990년부터는 민간 업체로의 기술 이전이 시작되었으며 1992년부터는 매년 30-40톤의 실질적인 생산 실적을 올리고 있다. 태평양 연어류

중에서 가장 대형종이라 할 수있는 왕연어의 양식 기술을 개발하고 좋은 유전형질 획득을 위한 잡종 생산이나 해상 사육용 종묘 크기를 대형화시키기 위한 잡종3배체 생산 기술을 확립하면 현재 우리나라에서 시장을 점차 넓혀가고 있는 연어, 송어류의 양식 산업이 활성화되고 다양한 양식용 품종을 확보함으로써 어민 소득 증대에 기여하리라 판단된다.

또한 본 연구는 무지개송어와 은연어 두 종간의 교잡종을 유도하여 각종의 우량형질이 어떻게 표현되는가를 관찰함과 아울러 종간 잡종은 초기 생존율이 매우 낮다는 점을 감안하여 (Scheerer and Thorgaard, 1983) 이들의 잡종3배체를 생산할 수 있는 기술을 확립함으로써 궁극적으로 성장이 빠르며, 운반 및 질병에도 잘 견디고, 사육이 용이하며 맛과 육질이 좋고, 더우기 불임으로 인하여 산란기에도 성성숙 과정 없이 계속 성장할 수 있는 등 경제성이 월등한 신품종 어류를 개발하고자 하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

제1절 어장환경

1. 어장의 위치와 규모

왕연어의 사육 실험 및 잡종, 잡종3배체 생산 실험을 위하여 그림 1과 같이 육상 및 해상의 3개소에서 실험을 행하였다. 왕연어의 발안란 부화, 치어 사육과 은연어와 무지개송어의 잡종, 잡종3배체 생산 실험 등 육상 사육 실험은 강원도 원주군에 위치한 치악수산에서 하였고, 해상가두리에서의 사육 실험은 경남 통영군 충무에 위치한 시험어장에서 각각 실시하였다.

2. 어장의 물리·화학적 특성

가. 해양연구소

실험수조의 수온 측정을 위하여 1일 2회 봉상온도계로 측정하였으며, 산소는 사료 공급후 1시간만에 측정하였다. 또 수질 측정은 2주에 1회씩 수질 검사기(DREL/2000, Hach Co., U. S. A.)를 이용하였다.

나. 치악수산

수온은 매일 오전 9시와 오후 5시에 봉상온도계로 측정하였으며, 사육 탱크의 산소농도는 주기적으로 측정하였다.

다. 충무 시험 어장

시험 어장의 1개 정점에서 수심 1.5m 수층의 수온, 비중과 투명도를 매일 오후 2시에 측정하였다.

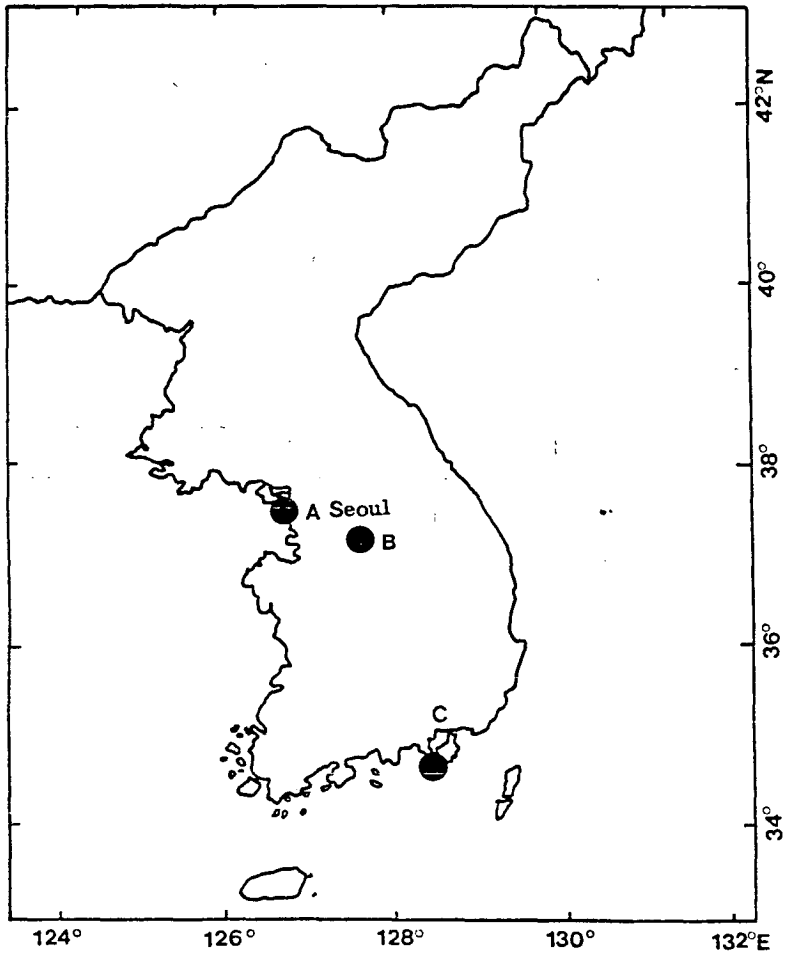


그림 1. 시험 어장의 위치.

Fig. 1. Map showing the experimental fish farms.

A. KORDI, B. Chiac Fisheries Co.,

C. Chungmu Experimental Fish Culture
Station.

제2절 해 상 사 육

실험에 사용한 왕연어, 은연어 및 스틸헤드송어는 강원도 원주군 치악 수산의 육상 콘크리트 수조에서 사육하고 있던 무리중 스폴트화한 개체를 선별하여 4일간(스틸헤드송어는 8일간)의 순치 과정을 거쳐 해상 가두리로 옮겼다. 해상가두리로 옮겨 먹이에 길들인 후 실험 시작시 (1993년 12월 15일)의 평균 체중은 왕연어가 평균 150.8g, 은연어가 243.2g, 스틸헤드송어가 252.2g이었다.

실험은 경남 통영군 산양면 저도 북쪽만에 위치한 한국해양연구소 가두리 시험어장에서 실시하였으며 5m×5m×5m가두리에 실험구마다 152kg씩 되게 왕연어는 1,014마리, 은연어는 629마리, 스틸헤드송어는 606마리씩 수용하였다.

사료로는 냉동 전갱이, 고등어, 눈퉁멸 등 소형 잡어를 초퍼에 갈아 주었으며 1일 1-2회 투여 하였다. 가두리 그물은 방오제를 처리하여 부착 생물의 부착을 막았다. 계측은 1 - 2개월마다 각 실험구에서 각각 20-30마리씩 무작위 추출하여 아미노 안식향산 메칠로 마취시킨 후 가랑이체장(이하 체장), 체중을 측정하였다.

실험 결과에서 증중량(G), 일일성장율(R), 일일사료공급율(E), 사료계수(증육계수, C) 및 사료 효율은 아래 식에 의하여 구하였다.

$$\text{증중량}(G, \text{Kg}) = (W_2 + W_3) - W_1$$

$$\text{일일성장율}(R, \%) = \left[10 \frac{\frac{G}{\text{일}}}{W} - 1 \right] \times 100$$

$$\text{일일사료공급율}(E, \%) = R \times C$$

$$\text{사료계수}(C) = F/G$$



$$\text{사료효율} = G/F \times 100$$

W1 : 실험 시작시 총 중량(Kg)
W2 : 실험 종료시 총 중량(Kg)
W3 : 폐사어의 총 중량(Kg)
N : 사육 일수(실험일수)
F : 사료공급량(건중량, Kg)

제3절 염색체분석

냉수성어종인 송어(*Oncorhynchus mykiss*)를 대상으로 강원도 원주군 신태면 지역에 위치한 치악수산에서 년 2 회(93. 5. 7, 93. 12. 7)에 걸쳐 총 100尾를 한국해양연구소 생물공학 연구그룹 실내 수조실에 옮겨 키우며 실시하였다. 세포 배양 전에 어체에 손상을 주지 않고 자극을 줄여 손쉽게 실험에 사용하기 위해 Siwicki(1984) 방법으로 마취를 하였다. 마취를 끝낸 어체를 단기배양과 장기배양법을 실시 하였다.

배양방법에 있어 단기배양방법과 장기배양방법으로 분류하여 실험하였는데 단기배양에 있어서 신장조직은 Shreck(1990)의 방법을 변형하여 TC-199 배양액에 FCS(Fetal Calf Serum)을 첨가하지 않은 실험구와 20% 첨가한 실험구로 나누어 72시간 배양 후 세포활성도를 분석하였다(표 1).

표 1. 신장 조직 배양을 위한 배양액의 조성

Table 1. Composition of supplemented media for Kidney tissue culture

종 류	용 량	비 고
TC-199	80%	Cat.No.12350-013(GIBCO)
FCS(Fetal Calf Serum)	20%	Cat.No.240-6000AG(GIBCO)
Penicillin	100IU/ml	Cat.No.600-5140AG(GIBCO)
Streptomycin	100ug/ml	Cat.No.600-5140AG(GIBCO)

사용한 배양액은 표 1과 같으며 주배양액(main medium)인 TC-199 medium을 MEM(Minimum essential medium, Cat.No. 320-2570AJ, GIBCO)과 BEM(Basal medium eagle, Cat.No. 320-1375AG, GIBCO)과 교체하여 세포활성도를 분석하였다.

조직의 단기배양시 배양완료 2시간전에 콜히친처리를 하며 용량은 혼합배양액이 10ml일 경우 0.3ml 주입, 5ml일 경우 0.2ml을 주입했다. 장기배양시에는 120시간 배양하며 배양완료 4시간 전에 0.3ml 콜히친 처리를 하였다. 콜히친 처리 후 얻어진 세포배양액을 시험관에 옮긴 후, 원심분리(1,500 r.p.m./10min)하여 상층액을 제거했다. 즉 잔류하는 세포 덩어리에 멸균 피펫으로 저등장 용액(Kcl용액 0.075M = 0.5592g Kcl + 100ml 증류수)을 서서히 희석하여 총희석액 함량이 10ml 되게하여 염색체의 활성을 유도시킨후, 원심분리하여 상층액을 제거했다.

저등장액 처리 후 세포 덩어리에 멸균 피펫으로 고정액(Fixation 용액 = Acetic acid(glacial) 100ml + Methyl Alcohol 300 ml = CH₃COOH 100ml + CH₃OH 300ml)을 소량씩 희석시킨 후 20분간 실온에 방치하여 10분간 원심분리

(1,500/r.p.m./10min)한 다음, 상층액을 제거하고 신선한 고정액으로 희석하여 원심분리(1,500/r.p.m./10min)하였는데, 상기 처리과정을 세포가 정확히 육안으로 관찰시까지 반복하여 세포용액만을 분리했다. 냉장보관된 슬라이드(혹은 ethyl alcohol (80~90%)과 함께 4°C로 유지하여 보관된 슬라이드)를 준비하여 각 슬라이드당 세포부유액을 2~3방울 적하하여, 상온에서 3일간 건조시켰고 동시에 slide warmer(100V, 65°C, 제일산업과학)로 병용하여 실시하였다.

G-banding 분석은 상온에서 3일간 건조된 슬라이드를 0.005% trypsin 용액에 2분간 침적한 후 증류수로 세척하여 건조한 후, 5% Giemsa 용액에 15분간 침적한 후 수돗물로 슬라이드글라스 뒷면을 서서히 세척한 후 건조시켰다.

완충용액(Buffer solution)은 Soerensen 용액과 Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco, Cat.No. 450-1600EA)을 병용하여 Trysin 용액과 Giemsa 용액을 제조하였다(표 2).

C-banding 분석은 7일간 상온에서 건조시킨 슬라이드를 0.2N HCl 용액에 30분간 침적하였다가 증류수로 세척하여 건조시킨 후 0.07N, Ba(OH)₂·8H₂O 용액에 7분간 37°C의 온수조에 침적 후 세척하여 상온에서 건조하였다.

건조된 슬라이드를 60°C의 2 x SSC용액에 120분간 침적하였다가 증류수로 세척하여 건조시킨 후, 슬라이드를 6% Giemsa-용액에 10분간 염색하였는데, 염색상태에 따라 Giemsa-용액에 침적시간을 조절하였다(표 3).

사진촬영 및 분석은 염색체 분석으로 이용이 된 슬라이드는 광학현미경(x 100, NIKON)으로 관찰하여 중기(metaphase)염색체 상에 Immersion oil($n_e=1.518$ or $n_p=1.515$, 23°C)을 1방울 떨어뜨린 후 1000배의 렌즈의 흑벽저감도 필름(Fuji, Ilford PAN, ASA 25)으로 촬영하였다. 아울러 핵형분석은 염색체의 중심체(centromere)가 자리잡은 위치에 따라 그 형태가 달라지게 되므로, 완(arm) 길이의 비는 r::장완(long arm)/단완(short arm)의 형태를 Levan 등(1964)의 분류방법에 의해 네 종류로 분류하여 분석하였다.

(1) 중심염색체(metacentric chromosome)

$r = 1.0 - 1.5$ 로 중심립은 염색체의 가운데 위치.

(2) 아중심염색체(submetacentric chromosome)

$r = 1.6 - 3.0$ 으로 중심립은 염색체의 가운데보다 약간 위에 위치.

(3) 정점염색체(acrocentric chromosome)

$r = 7.0$ 으로 중심립은 염색체의 한쪽 끝에 위치.

(4) 말단염색체(telocentric chromosome)

$r = \infty$ 로 단완이 거의 찾아보기 어려울 정도이거나, 없는 경우가 다.

표 2. G-banding을 위한 반응시약의 조성

Table 2. Components of reagent for G-banding.

Soerensen 완충 용액(pH 6.8)	$\text{KH}_2\text{PO}_4(1/15\text{Mol.})$ 9.0727을 1 증류수에 희석. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1/15\text{Mol.})$ 11.866g을 1 증류수에 희석 KH_2PO_4 용액 50.8ml와 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 용액 49.2ml을 혼합하여 50% NaOH 용액으로 pH 6.8로 조정
Trypsin 용액 (5%)	Sorensen 완충액 99ml + trypsin 1ml = 100ml 혹은 Dulbecco's Buffered saline 95ml + trypsin 5ml
Giemsa 용액	Giemsa 5ml + sorensen 완충액 95ml = 100ml Giemsa 5ml + Dulbecco's Buffer saline 95ml

표 3. C-banding을 위한 반응시약의 조성

Table 3. Components of reagent for C-banding

0.2N HCl	HCl 8.3ml + 491.5ml 증류수
0.07N Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O	Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O 22.08g + 977.9ml 증류수
2 X SSC	Sodium chloride 0.3M + 0.015M sodium citrate s.c 8.82g + s.c 17.54g + 1000ml 증류수
Soerensen 완충 용액(pH 6.8)	KH ₂ PO ₄ (1/15Mol.) 9.0727g을 1l 증류수에 희석 Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O(1/15Mol.) 11.866g을 1l 증류수에 희석. KH ₂ PO ₄ 용액 50.8ml와 Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O용액 49.2ml 을 혼합하여 50% NaOH용액으로 pH 6.8로 조정
Giemsa 용액	Giemsa 용액 5ml + soerensen 완충액 95ml = 100ml

결과 분석은 유사분열의 경우 중기염색체를 중점적으로 분석하였다. 염색체 핵형은 3가지 방법으로 분류하는데, 첫째, 수동측정으로 염색체의 길이, 완(arm)의 비(Levan, 1964)와 중심립의 위치에 따라 콤파스를 사용하는 방법, 둘째, 사진 판독기를 통해 촬영된 염색체 구조를 파악하여 측정하는 방법으로 현재는 Image recognition system인 cytoscan(영국 IRS, 등록번호 1984637)을 이용한 완전자동 측정법과 셋째, 촬영된 염색체구조를 제도하여

병력식 측정판(100cm x 45cm)에 삽입하는 반자동식 “pencil-Follower” 방법이 사용되고 있다.

본 실험분석은 상기 광학현미경 촬영과 병용하여 Cytoscan을 이용하였다.

제4절 잡종 및 잡종 3배체

1. 초기생존율

친어로 사용된 무지개송어 암컷, 은연어 수컷은 염색체수 $2n=61$ 의 염색체 다형(chromosomal polymorphism)을 나타내는 건강한 개체(그림 2)로부터 난자와 정자를 채취하여 실험에 사용하였다. 인공수정에 의해 무지개송어 암컷과 은연어 수컷간의 잡종을 유도하였으며 Kim *et al.* (1986, 1988)의 방법에 의거 잡종3배체 및 무지개송어 3배체를 유도하였다. 각 실험군을 대상으로 부화를 측정 및 부화후 1개월, 부화후 2개월에서의 초기생존율을 계산하였다.

2. 적혈구 계측

무지개송어 무지개송어 3배체, 무지개송어 암컷과 은연어 수컷간의 잡종 및 잡종3배체와 은연어의 적혈구 핵, 세포크기를 측정하기 위해 전장 약 10 cm 내외의 실험군 각 개체의 미부 정맥으로부터 적혈구를 채취한 후 슬라이드에 도말하여 고정한 다음 Giemsa 혹은 May-Grunbaldt Giemsa 용액으로 염색하였다. 각 개체당 100개 이상의 적혈구를 대상으로 현미경(x1,000)하에서 세포 및 핵의 장, 단경을 micrometer로 측정하였으며 이들의 표면적과 부

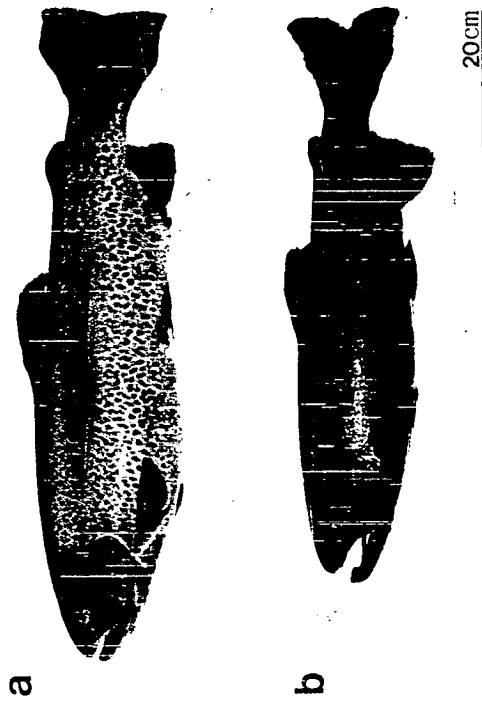


그림 2. 본 실험에 사용된 성숙 무지개송어(a)와 은연어(b)의 외형.
Fig. 2. External morphology of matured rainbow trout(a) and coho salmon(b) used in this experiment.

피는 Sezaki and Kobayashi(1978) 및 Lemoine and Smith(1980)의 방법으로 계산하였다.

3. 염색체 수 및 핵형

각 실험군의 염색체 제작은 Klingerman and Bloom(1977)의 방법으로 50 개 내외의 발안란을 대상으로 실시하였으며 핵형분석은 Levan *et al.*(1964)의 기준에 의거하였다.

전장 10cm의 parr 단계 무지개송어, 은연어, 이들의 잡종 및 잡종3배체와 무지개송어 3배체의 외형을 서로 비교하였으며 무지개송어, 은연어 및 이들의 잡종3배체의 외형은 사진촬영하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 어장환경

1. 어장의 위치와 규모

가. 한국해양연구소

한국해양연구소의 수조실에는 폐쇄순환여과식 시스템으로 수조를 설치하고 사육수가 여과 탱크로 유입되어 자갈과 판라이트를 통과하면서 물리, 생물학적 여과가 되도록 하였다. 수조는 2501유리 수조를 6개 연결하여 한세트로 사용하였으며 총 수량은 2.5톤이었다.

나. 치악 수산

본 어장은 용천수 또는 하천 복류수를 이용하고 있으며 어장의 총 면적은 2,650m(약 803평)이다. 사육 시설은 성어 사육조가 2x36m크기의 수조가 4개, 3x36m가 10개, 4x36m가 5개가 있으며 부화실 및 치어 사육동의 크기는 144m(약 44평)으로 여기에는 직경 4m의 치어 탱크 5개와 부화기가 있다. 또한 사육수의 부족을 해소하기 위하여 하천 복류수를 펌핑할 수 있는 모터가 3대가 가동되고 있고 각 수조에는 산소 공급용 수차가 설치되어 있다.

다. 충무시험어장

경남 통영군 산양면 저림리의 북쪽 지선에 위치한 가두리 시험 어장에는 5m×5m×5m, 10m×10m×7m, 10m×10m×5m 규격의 가두리가 여러개 설치되어 있으

며, 섬의 북쪽만에 위치하고 있어 태풍이나 높은 파도의 영향을 받지 않는 곳이다. 평균 수심은 15m정도이고 조류 소통은 좋은 편이지만 최근에 설치된 인근 양식장의 영향으로 조류 소통에 어느 정도의 방해를 받기도 한다.

2. 어장의 물리·화학적 특성

가. 해양연구소

한국해양연구소의 수조실의 수온은 온도 자동 조절장치(thermo-control)에 의하여 연중 16-17℃를 유지 할 수 있다. 용존 산소는 물의 순화과함께 공기를 폭기시켜주었기 때문에 항상 7.0-9.3mg/l 범위로 풍부하였다.

나. 치악 수산

본 어장은 연중 수온 변화가 적어 연어, 송어류의 해상 사육 종묘생산에 적합한 어장이었으며, 사육 수량은 초당 100-150 1가 유입되고 수질 상태도 양호하였다.

다. 충무 시험어장

충무시험 어장의 연중 수온변화는 그림 3에 나타내었다. 왕연어 등 실험에 사용할 스피트를 치악수산에서 충무시험어장으로 종묘를 옮긴 시기에는 표층 수온이 이미 20℃ 이하로 하강한 상태였으며 그후 점차 수온은 하강하여 1993년 12월에는 10.8 - 13.8℃, 1994년 1월에는 9.1 - 11.0℃를 유지하였다. 2월에는 최저 9.1℃까지 하강하였다가 이후 서서히 수온이 상승하기 시작하여 3월에는 9.8 - 10.7℃, 5월에는 13.8 -16.0℃였다. 94년 겨울에는 예년에 비하여 수온이 조금 낮은 경향을 보였으나 매년 수온 변화의 경향은 거의 비슷하게 나타나므로(한국해양연구소 1990) 충주부근 해역에서의 연어 송어류 사육 가능 기간은 10월말부터 이듬해 6월 말까지의 8개월로 판단되었다. 실험 기간동안 투명도는 3.0 - 5.5m의 범위였다.

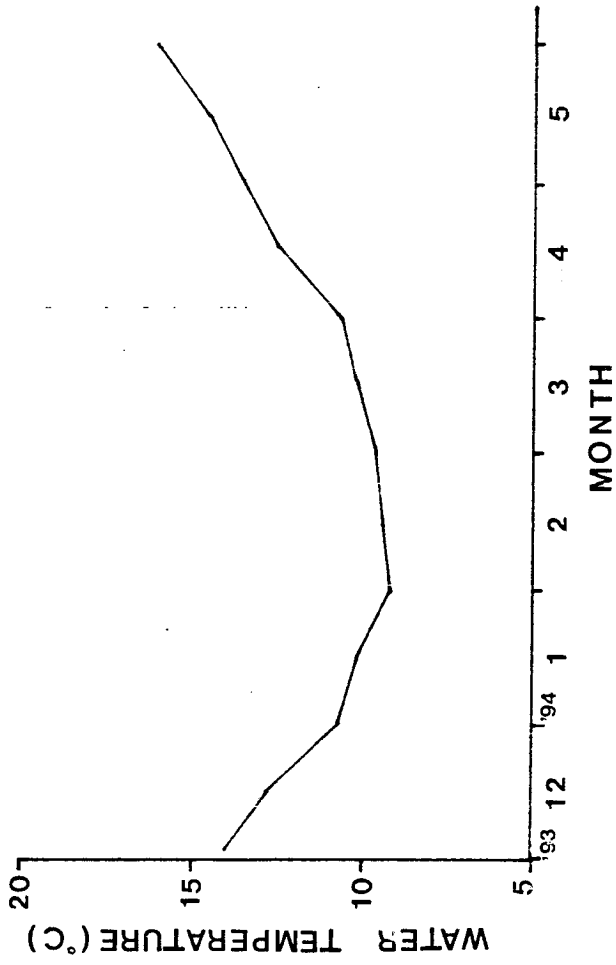


그림 3. 충무 시험어장의 표층(1.5m)의 수온 변화.
 Fig. 3. Fluctuation in water temperature at surface(1.5m) in Chungmu Experimental Fish Culture Station.

제2절 해 상 사 육

1993년 12월 15일부터 1994년 5월 19일까지 왕연어의 해상 가두리에서의 사육 실험 결과는 표 4, 그림 4에 나타내었다. 실험 시작시 체중은 평균 150g(n=29)이었고 1994년 2월에는 225 - 475g(평균 313.3g, n=30), 3월에는 350 - 680g(평균 475.4g, n=25)으로 성장하였고 실험 완료한 5월19일에는 평균 826.1g(630 - 1250g, m=14)이었고 이후 빠른 성장을 나타내어 6월에는 평균 1.2kg전후로 성장하였다.

실험 기간중의 생존율은 96.1 - 99.8%를 유지하여 전 기간을 통하여 93.3%를 나타내었다.

사료는 건중량으로 계산하였을 때 전 실험 기간을 통하여 하루에 체중의 1.3 - 2.3 %를 투여하였으며, 사료계수는 0.8 - 1.5범위 였다. 일일 성장률은 개체 크기가 작았던 실험 초기에 1.5%으로 비교적 높은 성장율을 나타내다가 1-3월 저수온기를 거치면서 0.8%로 낮아졌다가 다시 0.9%로 빨라지는 경향을 나타내었다.

왕연어의 155일간의 사육 결과를 같은 시험 어장의 가두리, 같은 밀도, 같은 조건에서 비교 사육한 은연어, 스틸헤드송어의 사육 결과와 비교해 보았다(표 5, 그림 4). 세 종의 생존율은 모두 90% 이상이었으며 사육 기간 중 대량 폐사를 수반하는 어병은 발생하지 않았으나, 수온 상승과 함께 피부 상처를 통한 세균의 2차감염으로 인한 사망 개체가 확인되었다.

실험 기간 전 기간 중 일일 사료 급여율은 왕연어가 1.7%, 은연어가 1.4%, 스틸헤드송어가 1.8%였으며 사료 효율은 은연어가 70.8%로 세종 중 가장 높았으며 왕연어와 스틸헤드송어는 각각 66.7%, 65.9%로 비슷하였다. 사료효율이 전년도의 실험 결과(韓國海洋研究所, 1990; 한국해양연구소, 1992)보다 낮게 나타난 것은 이번 실험기간 중에는 배합 사료를 섞지 않아 먹이 투여시 해수 중에서 풀어져 유실되는 양이 많았기 때문으로 생각된다.

표 4. 왕연어의 해상 가두리 사육결과

Table 4. Results of growth experiment of king salmon during seawater cage culture

Period		Des.15, 1993 - Feb.1, 1994	Feb. 2, 1994 - Mar.21, 1994	Mar. 22, 1994 - May.19, 1994
Initial	Number of fish	1,014	1,012	984
	Total weight (kg)	152.9	317.1	467.8
	Mean body length(g)	22.6	29.7	31.6
	Mean body weight(g)	150.8	313.3	475.4
Final	Number of fish	1,012	984	946
	Total weight (kg)	317.1	467.8	781.5
	Mean body length(g)	29.7	31.6	37.8
	Mean body weight(g)	313.3	475.4	826.1
Mortality	Number of Fish	2	28	38
	Weight (kg)	0.5	11.0	24.7
Survival rate (%)		99.8	97.2	96.1
Increment (kg)		164.7	161.7	338.4
Dry weight of feed(kg)	Raw feed	240.6	282.9	473.1
	Formulated diet	0	0	0
	Total	240.6	282.9	473.1
Daily feeding rate (%)		2.3	1.4	1.3
Daily growth rate (%)		1.5	0.8	0.9
Feed coefficient		1.5	1.7	1.4
Food conversion rate (%)		68.5	57.2	71.5

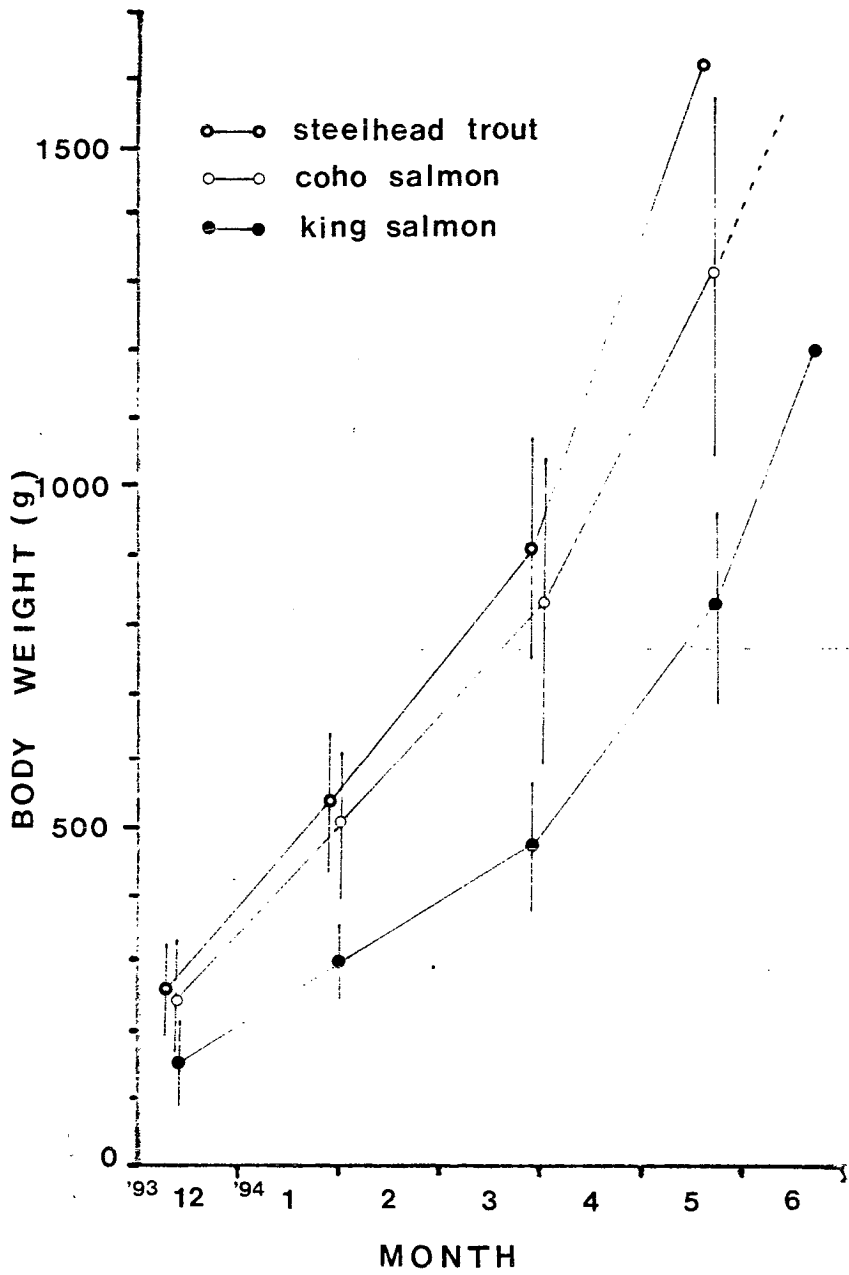


그림 4. 해상 가두리에서 사육한 왕연어, 은연어 및 스틸헤드송어의 체중 성장 비교.

Fig. 4. Comparison of body weight change of king salmon, coho salmon and steelhead trout during seawater cage culture.

표 5. 왕연어, 은연어 및 스틸헤드송어의 해상가두리에서의 성장비교
 Table 5. Comparison of growth of king salmon, coho salmon and steelhead trout cultured at sea cage

Period		Des.15,1993 - May 19,1994 (155days)		
Experimental group		King salmon	Coho salmon	Steelhead Tr.
Initial	Number of fish	1,014	629	606
	Total weight (kg)	152.9	152.7	152.8
	Mean body length(g)	22.6	25.6	25.9
	Mean body weight(g)	150.8	243.2	252.2
Final	Number of fish	946	578	556
	Total weight (kg)	781.5	763.2	916.7
	Mean body length(g)	37.8	44.4	45.6
	Mean body weight(g)	826.1	1,320.5	1,648.8
Mortality	Number of Fish	68	51	50
	Weight (kg)	36.2	48.6	45.9
Survival rate (%)		93.3	91.9	91.7
Increment (kg)		664.8	659.1	809.8
Dry weight of feed(kg)	Raw feed	996.6	931.4	1,229.7
	Formulated diet	0	0	0
	Total	996.6	931.4	1,559.7
Daily feeding rate (%)		1.7	1.4	1.8
Daily growth rate (%)		1.1	1.0	1.2
Feed coefficient		1.5	1.4	1.5
Food conversion rate (%)		66.7	70.8	65.9

만약 가두리 크기를 대형으로 하고 배합 사료를 섞어 습식 펠릿을 만들어 투여할 경우에는 사료의 허실을 줄일 수있어 사료 효율을 높힐 수 있을 것으로 생각된다. 일일 성장율은 세 종이 1.0 - 1.2% 범위로 비슷하였다. 이상의 결과에서 볼 수있듯이 왕연어는 은연어나 스틸헤드송어와 마찬가지로 우리 나라 연안에서 사육이 가능한 품종으로 판단되었다. 단지 본 실험의 결과와같이 가을 해상 사육을 위한 종묘 자체가 작으면 수확기에도 평균 체중이 2kg이 안되어 상품성이 떨어지므로 가능하면 육상 사육을 마치는 10월에 체중이 150g 전후의 스폴트로 성장시키는 것이 바람직하다고 할 수 있다. 왕연어 뿐 만 아니라 은연어의 경우도 수확기인 6월에 평균 3kg 이상이 되도록 할려면 대형 스폴트가 필요하며 그러기 위하여 불임화시킨 종묘의 확보기술이 필요하리라 생각된다.

사육 실험 기간중 세 종의 체중 변화는 그림 4에서 보는 바와 같이 실험 시작시 종묘 자체가 컸던 은연어나 스틸헤드송어가 왕연어에 비하여 전반적으로 빠른 성장을 나타내었다. 93년 12월 실험 시작시 평균 체중이 150.8g이었던 왕연어는 성장 속도가 느릴 뿐만 아니라 1994년 5월에도 평균 체중이 826.1g으로 1kg이 채되지 않아 4월에 이미 평균 체중이 1kg을 넘어선 은연어나 스틸헤드송어보다 소형으로 나타났다.

우리 나라 남해안에서 왕연어를 양식하고자 할 때에는 은연어나 무지개송어 등과 마찬가지로 수온이 10℃ 이하로 하강하는 10월부터 이듬해 6월까지의 사이에 사육이 이루어지며 판매기간은 우리 나라의 연어 소비 시장이 아직 완전히 형성되지 않아 정확히 말할수는 없으나 체중이 1kg이상으로 성장하는 3월 말경부터 약 2 개월간이라 할 수 있겠다.

제3절 염색체분석

배양액의 경우 포유동물에서 사용하는 MEM, Eagle's MEM, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), TC-199, Basal medium eagle(BME)에서 어류의 생리 수준을 비교하여 배양액의 NaCl량이 6800~8000mg/ℓ을 함유한 BME, MEM과 TC-199을 본 실험에서 이용하였으며 1차 분석(표 6)은 TC-199로 실험하였다. 배양온도는 5℃, 10℃, 15℃, 20℃로 예비실험을 한 결과 20℃에서 세포증식이 양호하여 20℃로 고정하여 실험하였는데 냉수성 어종인 송어의 적정 사육 수중온도에 비교해 볼 때 조금 높은 온도였다. 변온 동물인 어류의 세포배양에는 배양온도가 큰 차이가 나는데 해산어 중 볼락류의 경우에는 20℃가 적당하지만 담수어인 붕어 등의 세포 배양온도는 25℃~30℃로 차이가 있는 것으로 나타났다(Hoar et al. 1979).

표 6. 신장 배양의 분석
Table 4. Analysis of Kidney culture.

순번	슬라이드번호	체중	기관	분석 방법
1	4	235 M*	신장	세포배양 (FCS제외)
2	9	218 F*	"	"
3	98	269 F	"	"
4	104	370 F	"	"
5	223	281 M	"	세포배양(FCS 포함)
6	339	370 F	"	"
7	419	281 M	"	"
8	487	350 F	"	"
9	529	306 M	"	"
10	551	241 F	"	"
11	581	254 M	"	"

* M = Male, F = Female.

배양조건은 CO₂가 5%, 습도 95%로 3일간 배양한 세포 중 FCS을 포함하지 않은 배양액의 경우 세포의 활성은 급격히 떨어지고 있는 반면 FCS가 포함된 배양액은 분열지수 1.5% 이상인 정상 발달을 하였다. 1차 분석에서 나타난 FCS을 함유치 않은 배양배지의 세포는 오염율이 높은 것으로 보아 해독작용 측면에서도 FCS첨가가 필요한 것으로 사료된다. FCS의 첨가량은 20%로 제한하여 실험하였는데, Hartley 와 Horne(1983)의 결과와 일치하였다.

(G-Banding 분석)

무지개 송어의 세포유전연구는 종래 압착법 방법을 사용하였는데 유전물질이 중복이되는 분석 기술상의 문제로 인해 지금은 사용하지 않고 실험동물을 증식시키면서 실시할 수 있는 세포 배양방법을 개발중에 있으며 G-Banding 분석은 신장조직 배양중에서 양호한 염색체 증기를 자동영상 분석기로 작업하였다.

분석 결과, 60개 및 61개의 염색체 다형현상을 확인하였는데 2n=60인 개체는 44개의 중심(meta) 또는 아중심(Submetacentric), 16개의 아말단(Subtelocentric) 또는 차단(acrocentric) 염색체로 구성되었고, 2n=61인 개체는 43개의 중심 또는 아중심, 18개의 아말단 또는 차단 염색체로 구성되었다.

현재 우리나라에서 사육되고있는 무지개 송어의 정상 염색체수는 2n=60인 개체가 수입되었을 것으로 추측되나 분석된 개체중 2n=61인 개체와 2n=60인 개체가 실험분석에 나타나 수입시 이미 2n=60 및 61의 염색체를 가진 발안난이 도입되었을 것으로 사료된다.

(C-banding 분석)

이형 염색질(Heterochromatin)에 관한 분석은 1970년 Pardue와 Gall이

DNA의 방사능 핵산을 세포융합 연구 도중 발견하여 1970년대 이후 인류유전과 실험동물 연구분야에서는 성염색체(sex-chromosome)분석에 이형염색질을 규명하여 응용하고 있다. (Chen and Ruddle, 1971)

세포조작을 거친 신품종과 신기능생물의 유전적인 다형현상과 기형, 사산 등에 의한 생산성 저하에 대한 유전적 규명 방법인 C-Banding은 이형염색질을 구성하는 유전자를 규명하는 염색기술로써 이형염색질의 특징은 유전적으로 불활성(Muller and Painter, 1932)이며, DNA 합성속도는 진정염색질(Euchromatin)보다 늦다(Lima de faria, 1959).

반면 이형염색질은 DNA sequence가 반복될 때 생성(Craig-Holmes and Shaw, 1971)하며 DNA 량은 진정염색질 보다 3~4배가 많다. (Lima de faria, 1959) 이형염색질은 염색체의 동원체(centromere) 부위에 위치(Fig.13)하고 있으며, 전체 게놈(Genome)의 약 20%을 차지하고 있다(Hsu and Arrighi, 1971).

이런 특이한 유전물질인 이형 염색질을 분석하는 기술은 산, 알칼리 용액과 염산을 첨가하여 Giemsa염색을 하는 변형방법이 개발되었다. 실험방법 중에서 염산은 슬라이드 표면의 단백질 층을 분리하는 작용과, NaOH 용액보다 역가가 적은 가성소다(Barium hydroxide)가 DNA을 변성시키는 화학작용을 하고 있다(Hsu and Arrighi, 1971). 이형염색질의 유전적 생성은 변성에 의해 급속히 반복하는 핵산 sequence가 재생하고, 이와같은 반복되는 유전코드들이 짧은 거리를 두고 증폭 반복하여 purin과 pyrimidine염기를 구성하고 있다(Hsu and Arrighi, 1971).

Arrighi와 Hsu(1971)의 실험방법은 Hansen(1973)이나 Schnedl과 Czaker(1974)의 방법은 차이가 있는데 Hansen(1973)이 모든 상동염색체(Autosome)에서 C-Banding을 확실히 구별했는데 반해 Schnell과 Czaker(1974)는 만족할 만한 결과를 얻지 못했다. X-염색체의 동원체 부위(centromere region)에는 염색이 안되는 것을 발견했는데(Hansen, 1973,

Schnedl and Czaker, 1974), Seth와 Kunze(1974)는 상동염색체와 성염색체의 동원체 부위에 염색이 이루어진 것을 보고하고 있다. 원래 성염색체인 Y-염색체의 이형염색질은 이형염색질과 진정 염색질 사이의 동원체 부위와 단완(short arm)에 자리잡고 있다. (Hansen, 1973; Popescu, 1973) 이러한 사실로 볼 때 단완(short arm)의 끝이 말단 이형염색질로, Y-염색체의 장완(long arm)은 진정 염색질로 구성되어있다고 사료된다.

대부분의 유전검사와 각종 생물공학 기법을 활용하여 생산되는 실험동물들은 수적인 이상 뿐만아니라 다양한 구조적인 결함을 나타내는데 통상적인 G-banding 분염법으로는 충분한 수의 분열세포를 얻기 힘들며, 관찰되는 염색체의 크기도 작아서 염색체의 미세한 구조적 결함을 발견해내기도 매우 어렵다. 그러나 C-banding분석과 함께 세포분열 전기-전증기의 가늘고 긴 염색체에 Giemsa 또는 라이트염색을 시행하는 고정도 염색체 분염법으로 미세한 구조이상의 검출이 가능하다. 특히 methotrexate synchronization 을 이용한 고정도분염법은 배양성공율이 높고 각 염색체당 band 수도 많아 구조적인 결함을 찾아내는 데는 훨씬 유리하다(Ronne, 1985).

제4절 잡종 및 잡종3배체

1. 초기생존율

무지개송어, 무지개송어 3배체, 무지개송어와 은연어간의 잡종3배체, 잡종 및 은연어의 부화율 및 부화후 1개월과 2개월의 초기 생존율은 표 7과 같다. 무지개송어, 은연어의 부화율은 각각 86.0%, 80.3%인 반면 무지개송어와 은연어의 잡종은 51.7%로 낮은 부화율을 나타내었다. 무지개송어 3배체의 부

화율은 78.7%로 무지개송어에 비해 다소 낮았으며 잡종3배체의 부화율은 77.6%로 잡종의 부화율에 비해 높은 부화율을 나타내었다. 모든 실험군에서 부화시 1개월의 초기 생존율은 부화후 2개월에 비해 다소 낮게 나타났으며, 특히 무지개송어 암컷과 은연어 수컷의 잡종은 부화후 1개월에 8.2%의 매우 낮은 초기 생존율을 나타내었다. 반면 이들의 잡종3배체와 무지개송어 3배체는 각각 76.9%와 80.2%로 무지개송어와 은연어의 부화후 1개월의 초기 생존율 88.8% 및 80.9%에 비해 다소 낮았으며, 부화후 2개월의 초기생존율은 무지개송어 3배체와 잡종3배체가 각각 89.6 및 91.4%로 무지개송어 및 은연어의 94.3% 및 91.0%와 유사하였다. 부화시부터 부화후 2개월까지의 초기생존율은 잡종의 경우 1.7%로 매우 낮은 반면 잡종3배체는 56.6% 및 54.5%의 초기 생존율을 보였는데, 무지개송어의 71.9% 보다는 낮았으나 은연어의 59.1%와는 유사하였다.

표 7. 각 실험군의 부화율과 초기 생존율

Table 7. Data of hatching success and early survival rate

Exp. Group	Hatching rate (%)	Early survival rate (%)*		Total (%)
		1 month	2 month	
RT	98/114(86.0)	87/ 98(88.8)	82/87(94.3)	82/114(71.9)
RT-3n	96/122(78.7)	77/ 96(80.2)	69/77(89.6)	69/122(56.6)
Allc-3n	121/156(77.6)	93/121(76.9)	85/93(91.4)	85/156(54.5)
Hybrid	61/118(51.7)	5/ 61(8.2)	2/ 5(40.0)	2/118(1.7)
CS	110/137(80.3)	89/110(80.9)	81/89(91.0)	81/137(59.1)

* Survival rate from hatching

RT, rainbow trout ; CS, coho salmon

2. 적혈구 계측

무지개송어, 은연어, 무지개송어 암컷과 은연어 수컷의 잡종 및 잡종3배체의 적혈구 핵 및 세포 크기 측정 결과는 표 8과 같다. 적혈구 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 무지개송어는 $14.30\mu\text{m}$, $8.78\mu\text{m}$, $92.16\mu\text{m}^2$, $543.81\mu\text{m}^3$ 을 은연어는 $15.52\mu\text{m}$, $9.08\mu\text{m}$, $110.85\mu\text{m}^2$, $672.93\mu\text{m}^3$ 을 각각 나타내었다. 잡종3배체는 모계 기원의 부수적인 반수체 증가로 인한 적혈구 세포의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서의 증가를 보여 $20.26\mu\text{m}$, $13.13\mu\text{m}$, $204.37\mu\text{m}^2$ 및 $1828.57\mu\text{m}^3$ 을 나타내었다.

표 8. 무지개송어, 은연어, 잡종 및 잡종 3배체의 적혈구 크기 비교

Table 8. Comparison of erythrocyte size of rainbow trout, coho samon, their hybrid and allotriploid

		Major axis (μm)	Minor axis (μm)	Surface area (μm^2)	Volume (μm^3)
Cell*	RT	14.30 ± 0.58	8.78 ± 0.21	92.16 ± 6.87	543.81 ± 49.36
	Hybrid	14.91 ± 0.56	8.32 ± 0.17	96.71 ± 5.91	540.32 ± 47.21
	Allo-3n	20.26 ± 1.53	13.13 ± 0.72	204.37 ± 24.72	1828.57 ± 103.49
	CS	15.52 ± 0.52	9.08 ± 0.32	110.85 ± 8.16	672.93 ± 77.25
Nucleus*	RT	6.82 ± 0.31	3.91 ± 0.16	19.94 ± 1.03	52.78 ± 4.39
	Hybrid	7.27 ± 0.28	3.83 ± 0.18	20.39 ± 1.54	54.12 ± 5.77
	Allo-3n	10.63 ± 0.47	7.76 ± 0.41	60.73 ± 7.78	331.63 ± 47.58
	CS	7.84 ± 0.36	4.09 ± 0.15	25.20 ± 1.88	68.85 ± 8.52

* Values are means \pm SD

RT, rainbow trout ; CS, coho salmon

적혈구 핵의 장축, 단축, 표면적 및 부피에서 무지개송어는 $6.82\mu\text{m}$, $3.91\mu\text{m}$, $19.94\mu\text{m}^2$, $52.78\mu\text{m}^3$ 을 은연어는 $7.84\mu\text{m}$, $4.09\mu\text{m}$, $25.20\mu\text{m}^2$, $68.85\mu\text{m}^3$ 를 각각 나타내었으며 잡종은 $7.27\mu\text{m}$, $3.83\mu\text{m}$, $20.39\mu\text{m}^2$, $54.12\mu\text{m}^3$ 로 이들의 중간을 나타내었다. 잡종3배체는 적혈구 세포 크기에서의 증가와 마찬가지로 적혈구 핵의 크기도 증가하여 장축이 $10.63\mu\text{m}$, 단축은 $7.76\mu\text{m}$, 표면적이 $60.73\mu\text{m}^2$, 부피는 $331.63\mu\text{m}^3$ 을 나타내었다.

3. 염색체 수 및 핵형

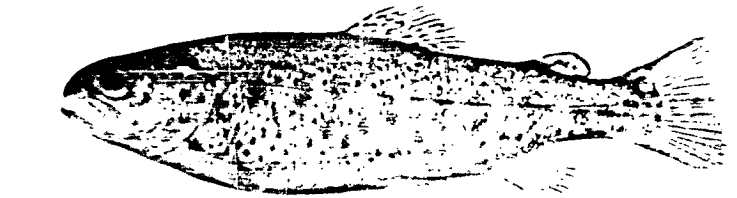
무지개송어 암컷과 은연어 수컷으로부터 유도된 잡종의 염색체 수는 $2n=60$ 으로 나타났다. 이의 핵형분석 결과 암, 수 모두에서 무지개송어 난자로부터 기인된 22개의 metacentric 또는 submetacentric 염색체, 7개의 subtelocentric 또는 acrocentric 염색체 및 1개의 subtelocentric 염색체인 성염색체와 아울러 은연어 정자로부터 기인된 heteromorphic한 성염색체가 존재하지 않는 23개의 metacentric 또는 submetacentric 염색체와 7개의 acrocentric 염색체로 구성되어 있었다. 그러나 무지개송어 암컷과 은연어 수컷의 잡종3배체의 염색체 분석결과 $3n=90-93$ 의 염색체 다형현상을 보였으며, arm number의 수는 모두 157개로 나타났다. 그림 2는 무지개송어 암컷과 은연어 수컷의 잡종3배체의 중기염색체상으로 염색체수는 $3n=93$ 이며 $2n$ 의 무지개송어 염색체와 n 의 은연어 염색체로 구성되었다(그림 5).

유도된 무지개송어 암컷과 은연어 수컷의 잡종3배체는 외형상 이들의 잡종과 유사하였으며, 무지개송어 및 은연어와 비교시 입, 등지느러미, 가슴지느러미, 꼬리지느러미, 항문지느러미, 배지느러미 및 미병에서 크기 및 모양이 무지개송어와 은연어의 중간형질을 나타내었다(그림 6).

어류에서종간 잡종 (interspecific hybrid)의 형성은 우량 형질을 가진 두 종간의 교배를 통하여 단기간 내에 최소의 노력으로 산업성있는 획득형질, 즉 잡종강세(heterosis)를 얻기위하여 시도되고 있다(Ihssen *et al.*, 1990)



그림 5. 무지개송어 암컷과 은연어 수컷간 잡종3배체의 염색체 중기상.
Fig. 5. Metaphase of allotriploid between female rainbow trout
and male coho salmon.



a



b



c

그림 6. 무지개송어(a), 잡종3배체(b) 및 은연어(c)의 외부형태.
Fig. 6. External morphology of rainbow trout(a), allotriploid(b)
and coho salmon (c).

특히 어류 양식 산업에서의 이러한 중간 잡종 유도는 암수간에 성장, 외형 및 색깔 등 산업적 차이를 나타내는 종인 경우 이들로부터 단성 집단 (monosec population)의 생산을 위하여, 혹은 중간 잡종에 기인된 불임성 개체의 생산을 위하여 시도되고 있다 (Chevassus, 1983; Ihssen *et al.*, 1990). 그러나 유도된 중간잡종의 초기 생존율은 매우 낮게 나타나 이러한 낮은 초기생존율을 극복하기 위한 방편으로 이들 중간잡종과 염색체공학을 중복사용하여 유도되는 잡종3배체(allotriploid)가 중간 잡종의 생존율을 증가에 이요되고 있다 (Chevassus *et al.*, 1983; Scheerer and Thorgaard, 1983).

연어과 어류중 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)는 현재 우리 나라에서 대량 사육중인 어종으로서 그간 많은 사육 기술이 축적되어 있고 일부 유전 육종학적 측면에서의 품종개량도 이루어져 있는 종이다 (Kim *et al.*, 1986, 1988). 은연어 (*O. kisutch*)는 최근 미국에서 발안란이 도입되어 사육이 실시되고 있는 냉수성 어종으로서 맛이 좋고 대형으로 무지개송어에서 초기 폐사를 일으키는 Infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus에 강한 장점들을 지니고 있으나 심한 비늘 탈락에 의한 운반시의 어려움 및 질병 감염과 아울러 현재 무지개송어 양식여건과 비교시 사육 방법이 잘 정착되어 있지 못하다는 단점이 있다. 아울러 은연어는 담수 사육시 당년 10 월까지 150~200 g으로 성장이 국한되는 어려움이 있으나 해수에 순치후 육성 수온의 한계인 다음해 6 월경까지 2 kg 이상으로 성장시킬수 있는 대형 어종으로서 해상가두리에서 방어나 넙치 등의 온수성 어류 양식이 불가능한 저수온기에 이들의 대체 양식으로 유망한 어종이다 (Kim and Park, 1990; Kim *et al.*, 1989; Parsons *et al.*, 1986).

본 연구 결과 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종의 적혈구 세포 및 핵의 크기는 사용된 무지개송어와 은연어의 중간을 나타내었으며 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종 3배체는 사용된 무지개송어와 은연어의 적혈구 세포 및

핵의 크기에 비례하여 3 배체의 특성인 크기 증가를 보였다. 그러나, 적혈구 세포 및 핵의 크기 비교는 그 미소한 차이 및 관찰시의 오차로 인하여 정확성을 기할수 없음을 고려, 이를 보완할 수 있는 flow cytometry 에 의한 DNA 함량 측정 등이 필요하리라 사료된다.

무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종의 부화율은 대조군의 부화율을 기준 시 40~80%에 해당하는 결과가 보고된 바 있으며 본 연구 결과 역시 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종의 부화율은 대조군 무지개송어의 부화율의 60.1%, 대조군 은연어 부화율의 64.4%에 해당하여 여타 연어과 어류 잡종화시의 부화율 견리과에 비해 비교적 높은 부화율을 나타내었다 (Chevassus, 1979). 그러나, 이러한 비교적 높은 부화율은 부화후 2 개월 내에 1.7%의 매우 낮은 생존율을 보였으며 이러한 낮은 생존율은 특히, 부화후 1 개월 이내에 심하게 나타났다. 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종의 이러한 매우 낮은 초기 생존율은 매우 낮은 발안율과 동시에 부화가 이루어지지 않는 결과 및 1 년 이내에 단지 다수의 개체만이 생존한다는 결과로 보고되고 있다 (Chevassus, 1979; Parsons *et al.*, 1986).

무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종 3 배체는 부화율 및 부화후 1 개월, 부화후 2 개월의 초기 생존율에 있어 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종에 비해 높은율을 보였으며 이러한 높은 율은 잡종 3 배체의 발생능력이 거의 정자 공여종의 유해한 유전자 정도에 좌우되는 것인데 반해 배수화시의 2 조의 모계염색체가 정상 난발생을 가능케 함에 기인된 것이다 (Arai, 1988; Scheerer and Thorgaard, 1983).

무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종 3배체는 염색체수 $3n=90\sim 93$ 개의 염색체 다형현상을 나타내었다. 그러나, 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종은 염색체수 $2n=61$ 의 개체는 발견되지 않고 모두 염색체수 $2n=60$ 의 개체만이 생존성이 있었다. 이는 잡종의 경우 배우자 수준의 비상보성은 극복되는 반면 염색체수 $2n=61$ 인 개체는 염색체상의 비상보성으로 인해 발생초기에 거의

치사되는 것으로 사료된다. 그러나, 염색체수 $2n=60$, $2n=61$, $2n=62$, $2n=63$ 의 무지개송어의 암컷과 은연어 수컷 잡종3배체에서 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종에서 나타나는 초기치사가 극복되는 것은 생존성있는 무지개송어, 은연어의 유도3배체와 마찬가지로 Robertsonian 전좌에 기인되는 것이며 아울러 이들 잡종 3배체가 모계로부터의 유전자를 배가시켜 정자 전체 계층에서의 외부유전자 즉 정자 유전자의 비를 감소시키 때문인 것으로 사료된다 (Arai, 1988; Kim and Park, 1990; Kim *et al.*, 1990).

잡종은 외부형질에서 사용된 종의 중간 형질을 따르나 일부 형질에서는 사용된 암, 수종 어느 한쪽을 닮게 나타나고 있어 차후 이들을 대상으로 외부형질 및 계측형질적 측면에서의 조사가 필요시된다 (Bhownmick *et al.*, 1981; Dunham *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1988; Park, 1992). 아울러 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종3배체는 높은 생존율을 나타내므로 차후 이들을 대상으로 성비 조사와 아울러 성비에 따른 염색체수 조사를 실시하여 무지개송어 암컷과 은연어 수컷 잡종 3 배체에서 염색체 재비열이 수컷 자봉 3 배체의 사용된 친어 2 종으로부터의 잡종강제, 즉, 성장을 증가, 내병성 증가, 비늘탈락 억제, 맛과 육질 개선 및 불임성 조사 등의 경제성 분석이 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 韓國海洋研究所. 1990. 연어, 송어類 養殖技術에 關한 研究(III). 海洋研究 報告書, BSPG 00044-160-3. 서울, 411p.
- 한국해양연구소. 1992. 해상 사육용 신품종 송어의 개발. 해양연구보고서, BSPG 00173-524-3. 서울, 73p.
- Arai, K., 1988. Viability of allotriploids in salmonids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 54 : 1695~1701.
- Bhownmick, R.M., R.K. Jana, S.D.Gupta, G.V.Kowtal, and M.Rout, 1981. Studies on some aspects of biology and morphometry of the intergenic hybrid, *Catla catla* Haml 1 ton × *Laboo rohita* Haml 1 ton produced by hypophysation. Aquaculture, 23 : 367~371.
- Chen, T. R., Ruddle, F.H. 1971. Karyotype analysis utilizing differentially stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes. Chromosoma(Berl.), 34(1):51-72.
- Chevassus, B., 1979. Hybridization in salmonids: results and perspectives. Aquaculture, 17 : 113~128.
- Chevassus, B. 1983. Hybridization in fish. Aquaculture, 33 : 245~262.
- Chevassus, B., R. Guymard, D. Chourrout, and E. Quillet, 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. Genet. Sel. Evol., 15 : 519~532.
- Craig-Holmes, Ann P. mShaw, Margery W. 1971. Polymorphism of human constitutive heterochromatin. Science, 174:702-704.
- Dunham, R.A., R.O. Smitherman, M.J. Brooks, M. Benchankan, and J.A. Charppell, 1982. Paternal predominance in reciprocal

- channel-blue hybrid catfish. *Aquaculture*, 29 : 389~396.
- Hansen, K.M. 1973. Heterochromatin(C bands) in bovine chromosomes. *Hereditas* 73 Nr.1, 65-70.
- Hartley, S. E., M.T.Horne.1983. A method for obtaining mitotic figures from blood leukocyte cultures of rainbow trout. *J.of Fish Biology*. 22:77-82,
- Hoar, W. S., Randall, D. J., J. R. Brett L. 1979. *Fishphysiology*, Academic press. Inc.
- Hsu, T. C., F. E. Arrighi. 1971. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosome. *Chromosoma(Berl.)* 34. 3:243-253.
- Ihssen, P.E., L.R.Mckay, I.McMillan, and P.B.Phillips, 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes : cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 119 : 698~717.
- Kim, D.S. and I.-S. Park, 1990. Chromosomal polymorphism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Kor. J. Ichthyol.*, 2 : 211~216.
- Kim, D.S., I.-B Kim and Y.G.Baik, 1988. Early growth and gonadal development of triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *J. Aquat.* 1 : 41~51.
- Kim, D.S., J.-M.Kim, and I.-S.Park, 1990. Chromosomal polymorphism in diploid and induced triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *J. Aquat.* 3 : 145 ~153.
- Kim, J.-M, J.-G.Myoung, P.-K.Kim, and H.T.Huh, 1989. Experimental culture of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in Korean waters, *Ocean Research*, 11 : 17~21.
- Klingerman, A.D. and S.E. Bloom, 1977. Rapid chromosome preparations

- from solid tissues of fishes. J. Fish. Res. Bd. Can., 34 : 266
~269.
- 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. Sanberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes, Hereditas, 52 : 201~220.
- Lima-De-Faria, A. 1959. Differential uptake of tritiated thymidine into hetero and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6:457-466.
- Muller, H. J., Painter, T. S. 1932. The differentiation of the sex chromosomes of *Drosophila* into genetically active and inert regions. Z. indukt. Abstamm. Vererb. lehre. 62:316-365.
- Pardue, M.L., and Gall, J.G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science. 168:1356-1358.
- Park, I.-S, 1992. Induced hybrid and allotriploid between *Misgurnus anguillicaudatus* and *M. mizolepis* (Teleostomi: Cobitidae). Ph. D. Thesis, Natn. Fish, Univ. Pusan, 84pp.
- Parsons, J.E., R.A., R.A. Busch, G.H. Thorgaard, and P.D. Scheer, 1986. Increased resistance of triploid rainbow trout \times coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. Aquaculture, 57 : 337~343.
- Popescu, C.P. 1973. L'heterochromatine constitutive dans le caryotype bovine normal et abnormal. Ann. Genet. 16 Nr. 3, 183-188.
- Ronne, M. 1985. Double synchronization of human lymphocyte culture: Selection for high-resolution banded metaphases in the first and second division. Cytogenet Cell Genet 39:292-295.

- Scheerer, P.D. and G.H., Thoragaard, 1983. Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40 : 2040~2044.
- Schnedl, W. ; Czaker, R. 1974. Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat, and sheep chromosomes(Bovidae). *Cytogenet. Cell Genet.*13, 246-255.
- Seth, P,K. ; Kunze, W.P. 1974. Differential chromosomal staining in *Bostaurus* (cattle). *Cytologia* 39 Nr.2, 373-378.
- 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 .
- Shreck C. B. 1990. *Methods for fish biology* American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA.
- Sumner, A. T., Evans, H. J, Buckland, R. A. 1973. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. *Expt. Cell Res.* 81:214-222.
- Swicki, A. 1984. New anaesthetic for Aquaculture, 38:171-176.