

자성발생성 2배체 메기 *Silurus asotus*의 생산

임재현¹ · 조효중² · 남윤권² · 김동수² · 박인석^{1*}

¹군산대학교 해양과학대학 해양생명과학부, ²부경대학교 수산과학대학 양식학과

Production of Gynogenetic Diploid in the Far Eastern Catfish, *Silurus asotus*

Jae Hyun Im¹, Hyo Jong Cho², Yoon Kwon Nam², Dong Soo Kim² and In-Seok Park^{1*}

¹ Faculty of Marine Life Science, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

² Department of Aquaculture, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Received November 16, 2000; accepted January 30, 2001

ABSTRACT

Meiotic gynogenesis was optimized in the far eastern catfish, *Silurus asotus*, using both UV-irradiated heterospecific sperm and thermal shock treatment. Eggs were activated with the sperm of mud loach (*Misgurnus mizolepis*) which had been irradiated with UV at dose levels ranged from 1,020 to 15,000 ergs/mm². By examining haploidy incidence and survival of the embryos, the optimal dose for genetic inactivation of the sperm was proven to be 7,020 ergs/mm². Combination of the initial treatment timing (5 min post fertilization) and duration of cold shock (40 mins at 4°C) yielded 92.4% of hatching success. Restoration of diploid status was verified using karyological analysis. The sex ratios of offsprings from control crosses and gynogenetic groups were different: control group showed no deviation from 1:1 ratio ($P > 0.05$), while gynogenetic groups displayed all femaleness ($P < 0.05$). This result indicates that genetic sex determinism of far eastern catfish is based on the XX-XY system (female homogamety), and this advance also has implication on the production of genetically improved all-female far eastern catfish stock.

Key words : catfish, female homogamety, gynogenetic diploid, monosex population.

* To whom correspondence should be addressed. Corresponding author's present address: Division of Ocean Science, College of Ocean Science and Technology, Korea Maritime University, Pusan

606-791, Korea. This research was supported by Korea Research Foundation Grant to I.-S. Park, Fishery Genetics and Breeding Laboratory, Contribution Number KRF-2000-044-H00002.

서 론

어류를 대상으로 한 인위적인 자성발생성 반수체 유도는 Oppermann (1913)에 의하여 brown trout *Salmo trutta*에서 이루어졌다. 이후 X선 조사된 정자와 수정후 활성화 시 낮은 비율의 자성발생성 2배체가 잉어 *Cyprinus carpio*, weatherfish *Misgurnus fossilis*와 sterlet *Acipenser ruthenus*에서 유도되었다. 특히, 저온 처리에 의한 수정란의 활성화는 weatherfish에서 자성발생성 2배체의 유도율을 증가시킨 바 있다 (Thorgaard and Allen, 1987). 어류는 비교적 짧은 생활사, 미분화된 성염색체에 기인된 배수체의 정상적인 생존력 그리고 어류 자체의 체외수정으로 인한 난과 정자의 손쉬운 조작방법 등으로 인해, 어류를 대상으로한 자성발생성 2배체에 관한 연구가 현재까지 활발히 이루어고 있다 (Thorgaard, 1986). 아울러 최근에는 자성발생 유도시 정자의 불완전 불활성화에 기인된 정상 2배체 출현 가능성을 배제하기 위해, 타 종 정자를 사용한 미꾸리 *Misgurnus anguillicaudatus*, 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis*, 참돔 *Pagrus major*, *Gnathopogon caurulescens*, 넙치 *Paralichthys olivaceus*, 메기 *Clarias macrocephalus*, sole *Solea solea* 및 *paddlefish Polydon spathula*에서의 자성발생성 2배체가 유도된 바 있다 (Mims et al., 1997; Fujioka, 1998; Nam et al., 1999).

자성발생성 2배체중 감수분열 억제성 자성발생성 2배체 (meiotic gynogenetic diploid)는 순계 생산에 유용한 방법일 뿐만 아니라 동유전자 계통의 형성에 유용하다 (Thorgaard, 1986). 다수의 어종에서 발견되듯이, 만약 성결정 기구가 암컷이 동형접합체 (homogamete)인 경우 자성발생에 의한 이들 자손의 제 1 세대는 전 암컷 단성 집단이 형성될 수 있으며, 역으로 자성발생을 통하여 전 암컷 집단이 형성된다면 자성발생시 사용된 어류의 성결정 기구가 암컷 동형접합체임을 유추할 수 있다 (Thorgaard and Allen, 1987). 전 암컷 자성발생성 2배체는 잉어 *Cyprinus carpio*, 초어 *Ctenopharyngodon idella*, 무지개송어 *Salmo gairdneri*, 은연어 *Oncorhynchus kisutch*, 홍연어 *O. gorbuscha* 및 넙치에서 보고되고 있다 (Refstie et al., 1982; Kim et al., 1994; Jeong et al., 1996).

메기 *Silurus asotus*는 분류학상 메기 목 (Siluriformes) 메기 과 (Siluridae)에 속하는 어종으로, 우리나라의 전 하천에 서식하며 일본, 중국을 비롯한 동북아시아 담수계에 널리 분포하고 있다 (Kim, 1997). 본 종은 맛이 좋아 예로부터 우리나라에서 식용으로 널리 이용되고 있다. 우리나라의 자연산 메기 생산량은 산업화와 수질 오염에 기인된

자연 환경 악화로 인하여 연간 생산량이 1985년에 1,000여톤을 상회하던 것이 1995년에 371톤으로 크게 감소된 반면, 양식산 메기의 연간 생산은 1986년부터 꾸준한 증가 추세를 보여 1995년에는 1,700여톤의 생산고를 나타냄으로서 메기 총생산량에 있어 양식산이 거의 전량을 차지하고 있는 실정이다 (MAF, 1996). 그러나 이러한 근간의 메기 양식 생산고의 증가와는 상반되게, 현재 메기 양식산업 여건은 점차로 악화되어 침체국면에 처해 있는 실정이다.

메기류에 있어 *Ictalurus punctatus* (Goudie et al., 1995), *Rhamdia sapo* (Valcárcel et al., 1994) 및 *Clarias gariepinus* (Volckaert et al., 1994)를 대상으로한 자성발생이 연구되어 있으나, 본 연구에 사용된 메기를 대상으로한 자성발생에 관한 보고는 아직까지 전무한 실정이다. 이러한 점을 고려, 본 연구는 메기를 대상으로 우수 품종의 순계 설정과 동일 clone 집단을 만들어 단기간 내에 양식생산성 향상을 이루기 위한 연구의 일환으로, 메기와는 다른 종의 정자를 사용하여 감수분열 억제성 자성발생 2배체를 유도하였다. 또한 자성발생성 유도를 위한 적정 조건의 조사와 유도된 개체들의 염색체 조사를 실시하였으며, 유도된 자성발생 각 개체들을 대상으로 성비를 조사·분석하여 메기에서의 성결정 기구를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

타 종 정자에 의한 메기 *Silurus asotus* 감수분열 억제성 자성발생성 2배체를 생산하기 위하여, 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 수컷과 버들치 *Rhynchocypris oxycephalus* 수컷을 사용하였다. 메기 자성발생성 2배체 유도에 효과적인 타 종 정자를 우선 파악한 후, 메기에서 감수분열 억제에 효과적인 조건을 조사하였다. 아울러 생산된 메기 자성발생성 2배체를 대상으로 염색체 조사 및 성비를 조사하였다.

친어의 산란 유도 및 실험군 설정

전라북도 정읍에 위치한 호남 내수면 어업 영농조합의 노지에서 사육중인 성숙 메기를 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 성숙 메기 친어의 평균 전장 및 평균 체중은 암·수 각각 34.0 ± 1.5 cm, 272.2 ± 4.3 g 및 26.0 ± 0.7 cm, 80.9 ± 1.2 g 이었다. 실험에 사용된

미꾸라지 수컷은 충청남도 서천에 위치한 서천 담수어 수 집소에서 구입한 성숙 개체들로, 이들의 평균 전장 및 평균 체중은 각각 12.0 ± 0.3 cm, 8.9 ± 0.4 g 이었다. 실험에 사용된 버들치 수컷은 전라북도 완주군 구이면 동적골의 산간 계곡에서 채집된 후 군산대학교 해양생명과학부 수산 유전육종학 사육실에서 3대째 사육중인 성숙 개체로, 이들의 평균 전장과 평균 체중은 각각 8.3 ± 0.4 cm, 7.3 ± 0.6 g 이었다. 본 연구 수행시의 사육 수온은 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

성숙한 메기 암컷과 수컷, 그리고 성숙 미꾸라지 수컷의 인공 산란을 유도하였다. 인공 산란 유도를 위해 human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma, USA)와 lutening hormone releasing hormone analogue (des-Gly¹⁰[D-Ala⁶] LHRH-Ethylamide, LHRHa) (Sigma, USA)를 복강 주사하였다. 성숙 메기 암컷은 2,000 IU hCG/kg BW와 50 µg LHRHa/kg BW를 병행 처리하였으며, 산란 유도 호르몬 주사후 12시간부터 2시간 간격으로 Kim et al. (1988b)의 방법에 따라 100 ppm의 염산리도카인/1,000 ppm NaHCO₃로 마취후 배란을 확인하였다. 메기 수컷과 미꾸라지 수컷도 인공 배정을 위해 메기 암컷에서 수행된 산란 유도 호르몬 처리 방법과 동일하게 처리하였으며, 단지 산란 유도 호르몬 농도만 각각 1/2로 하였다.

마취된 메기 암컷의 복부를 가볍게 압박하여 채란 하였으며, 채란 된 난의 난질을 확정하였다. 메기, 미꾸라지 및 버들치의 수컷 정액 사용 시점은 메기 암컷에서 최적의 성숙 난을 얻을 수 있는 시간과 일치하도록 하였다. 메기 수컷과 미꾸라지 수컷인 경우 Kim et al. (1994)의 방법에 따라 각각을 복부 절개 후 성숙 정소를 적출 후 50 ml 용량의 비이커에 옮겨 안과용 곡가위로 세절하여 정액을 수집하였고, 버들치 수컷인 경우 산란 유도 호르몬 처리 없이 직접 정액을 착출하였다. 세절 및 착출된 정액은 Dulbecco's phosphate buffered saline (Difco, USA)으로 1:40 배율로 희석하여 수정에 사용하였다. 수정은 습식법으로 하였으며 수정 후 사육수로 세란 하여 petridish에 수정난을 부착시켰다. 대조군으로 메기군, 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종 (hybrid)군, 메기 암컷×버들치 수컷 잡종군, 그리고 자성발생이 가능한 잡종군 유도시 사용된 타 종 정자에 의한 자성발생성 2배체군을 설정하였다.

잡종의 초기 생존율 조사

메기군, 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종군 및 메기 암컷×버들치 수컷 잡종군을 대상으로 부화시까지 생존율을 조사

하였다. 즉, 직경 13 cm의 petridish에 각 실험군 당 300 개 내외의 난을 부착시켜 메기군의 부화시까지 3시간 간격으로, 수정후 초기와 중기 단계에서는 저 배율의 해부현미경 (MC 80 DX, Zeiss, Germany)으로 정상 발생 유무를 조사하였고 수정후 말기 단계에서는 사란의 백탁 여부로 생존 수정난을 조사하였다. 생존율은 실험 시작시 사용한 각 실험군의 수정난 수에 대한 각 실험군의 생존 수정난 수의 백분율로 계산하였다. 각 실험군은 3회 반복 실험하였다.

Hertwig 효과 조사

미꾸라지 정자에 의한 메기 자성발생성 2배체 유도를 위해, 미꾸라지 정자 불활성화를 위한 Hertwig 효과를 조사하였다. 1차 실험 (trial I)과 2차 실험 (trial II)은 각각 2회 반복 실시하였다. $13 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 설정된 BOD incubator 내에서 10 W의 UV-lamp (Sankyo Denki, Japan)를 15 cm 높이에서 조사하였다. 희석된 미꾸라지 정액을 각 petridish (Φ 90 × H 26 mm) 바닥에 1 mm 두께가 되도록 도포하였으며 희석 정액에 균일한 자외선 조사를 위해 petridish가 놓여지는 교반기 표면을 aluminum foil로 밀착 부착시킨 후 교반하였다. 자외선 농도 (erg/mm^2)는 radiometer (UVP, USA)로 측정하였으며, 본 실험 조건에서 단위 자외선 조사 농도가 $60 \text{ erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ 인 것을 고려, 자외선 조사시간을 조절하여 자외선 조사 총 농도가 1,020 ~ 15,000 erg/mm^2 범위가 되도록 하였다.

약 100개의 메기 난이 수용된 petridish에 각 자외선 조사 농도별로 자외선 조사가 끝난 정자를 각각 첨가 후 수정시켜 자성발생성 반수체군들을 설정하였다. 빛에 의한 광제할 방지를 위해 (Valcárcel et al., 1994) 자외선 조사 후 수정까지의 모든 작업은 암조건하에서 실시하였으며 최초 수정 시점은 난의 세정을 위해 사육수를 첨가하는 시간으로 정하였다. 각 자외선 농도에서 미꾸라지 정자에 의한 Hertwig 효과는 자성발생성 반수체가 높은 생존율을 보이는 발생단계에서, 그리고 높은 빈도의 반수체 증후군 (haploid syndrome)을 보이는 발생 단계에서 각각 조사하였다. 자성발생성 반수체군의 반수체 증후군 발생 빈도와 생존율을 최초 처리 난 수에 대한 각각의 백분율로 계산하여, 정자 불활성을 위한 적정 자외선 농도를 결정하였다. 아울러 부화 직전에 뚜렷한 반수체 증후군을 보이는 자성발생성 반수체군과 메기군을 대상으로 미세 편셋을 사용하여 난각을 제거한 후, 해부현미경 하에서 저 배율로 관찰후 사진 촬영하였다.

자성발생성 2배체 유도 조건 조사

미꾸라지 정자에 의한 자성발생성 2배체 메기를 유도하기 위하여, 예비 실험을 통해 결정한 적정 자외선 농도로 불활성된 미꾸라지 정자로 메기 난을 수정시킨 후 수정후 3분, 5분 및 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4°C로 저온 처리하였다. 저온 처리가 종료된 수정난은 수온 24 ± 0.5°C에서 부화시켰다. 대조군인 메기군, sham 대조군인 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종군 및 미꾸라지 정자를 불활성화 시켜 수정한 자성발생성 2배체군의 각 처리 조건별 초기 생존율을 조사하였다. 초기 생존율 측정 항목은 생존율, 부화율 및 기형율로서 생존율은 수정후 27시간에서의 생존율 = (생존 난 수/실험 시작시 처리 난 수) × 100, 부화율은 수정후 27시간에서부터 부화시까지의 부화율 = (부화된 개체 수/수정후 27시간에서의 생존 난 수) × 100, 그리고 기형율은 기형율 = (부화직후 기형 개체 수/총 부화 개체 수) × 100 으로 계산하였다. 각 실험은 3회 반복 실험하였다. 각 처리 조건별로 나타난 초기 생존율 측정 항목을 고려하여 가장 적절한 처리 조건을 파악하였으며, 파악된 처리 조건으로 자성발생성 2배체를 대량 생산하였다.

자성발생성 2배체의 염색체 조사

본 실험에 사용한 메기군 암컷, 미꾸라지 수컷 그리고 자성발생성 2배체군의 염색체 조사를 실시하였다. 염색체 수 조사 및 핵형 분석을 위해 각각 20마리 이상의 개체를 사용하였으며, 부화 직후의 자어는 solid method (Klingerman and Bloom, 1977)로, 성체는 신장직접법을 사용하여 실시하였다. 염색체 수는 생물현미경 (Axioskop, Zeiss, Germany) 하에서 각 개체당 10여개의 판독 가능한 중기 분열상을 대상으로 계수 하였고 선명한 분열상을 사진 촬영하여 핵형도를 작성하였다. 핵형 분석은 Levan et al. (1964)의 방법에 의거하였다.

자성발생성 2배체의 생식소 및 성비 조사

메기군과 자성발생성 2배체군의 자어는 지하수가 공급되는, 규격 50×35×25 cm (W×L×H)인 용량 45 l의 반순환 여과식 사각 수조에서 각각 사육하였다. 메기군과 자성발생성 2배체군의 성비는 부화후 6주와 부화후 10주에 각 100마리씩을 대상으로 2회 반복하여 조사하였다. 부화후 6주의 각 표본 개체는 중성 포르말린에 고정시킨후 머리 부분과 항문뒤 꼬리 부분을 제거한 후 Bouin's 액에 24

시간 재고정 하였다. 아울러 formic acid와 sodium citrate로 고정된 표본을 탈칼슘화 시켰다. 기존의 paraffin 절편법을 사용하여 4~6 μm 두께의 조직 절편을 만들었으며, Harris's hematoxylin과 eosin-phloxine B를 병행 염색하여 생물현미경 하에서 검정하여 암·수를 판별하였다. 부화후 10주의 각 개체는 표본 즉시 복부 절개후 생식소를 적출하여, slide glass에 놓은 후 cover glass를 덮어 압착법으로 현미경 하에서 검정하여 암·수를 판별하였다.

통계 분석

본 실험에서 나타난 결과의 통계 처리는 컴퓨터 통계처리 프로그램인 minitab을 사용하여 각 실험 결과의 유의성을 검정하였으며, 대조군에 대비한 자성발생성 2배체의 성비는 χ^2 -test로 그 유의성을 검정하였다.

결 과

잡종의 초기 생존율

메기 *Silurus asotus*군, 메기 암컷×미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 수컷 잡종군 및 메기 암컷×버들치 *Rhynchocypris oxycephalus* 수컷 잡종군을 대상으로 3회에 걸친 생존율 조사 결과는 Figure 1과 같다. 메기군은 수정후 24시간까지 96.99%의 생존율을 보였으나, 수정후 27시간의 4~5 체절기에서의 생존율은 90 ± 0.9%로 낮아졌다. 메기군의 수정후 30시간에서의 생존율은 89 ± 0.7%이었고 부화시기인 수정후 33시간에서의 생존율은 86 ± 0.5%이었다. 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종 역시 메기군에서의 결과와 유사하게 수정후 18시간까지는 93~98%의 높은 생존율을 보였으나 수정후 21시간 이후부터는 생존율이 감소하여 수정후 21시간에는 85 ± 0.6%, 수정후 24시간에는 80 ± 0.7% 그리고 수정후 27시간에는 전체적으로 발생이 정지되었다. 메기 암컷×버들치 수컷 잡종군의 생존율 역시 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종의 생존율과 비교시 유사한 양상을 보여 수정후 9시간까지 93~98%의 생존율을 보였으나 생존율 감소가 더욱 빨리 나타나 수정후 12시간에는 53 ± 0.4%의 생존율을 보였고, 이후 점진적인 생존율 감소를 나타내어 수정후 21시간인 낭배 후기에 발생이 정지되었다. 본 연구 결과, 버들치 정자는 메기 자성발생성 2배체 유도시 사용될 수 있는 이종 정자로는 부적절하였다.

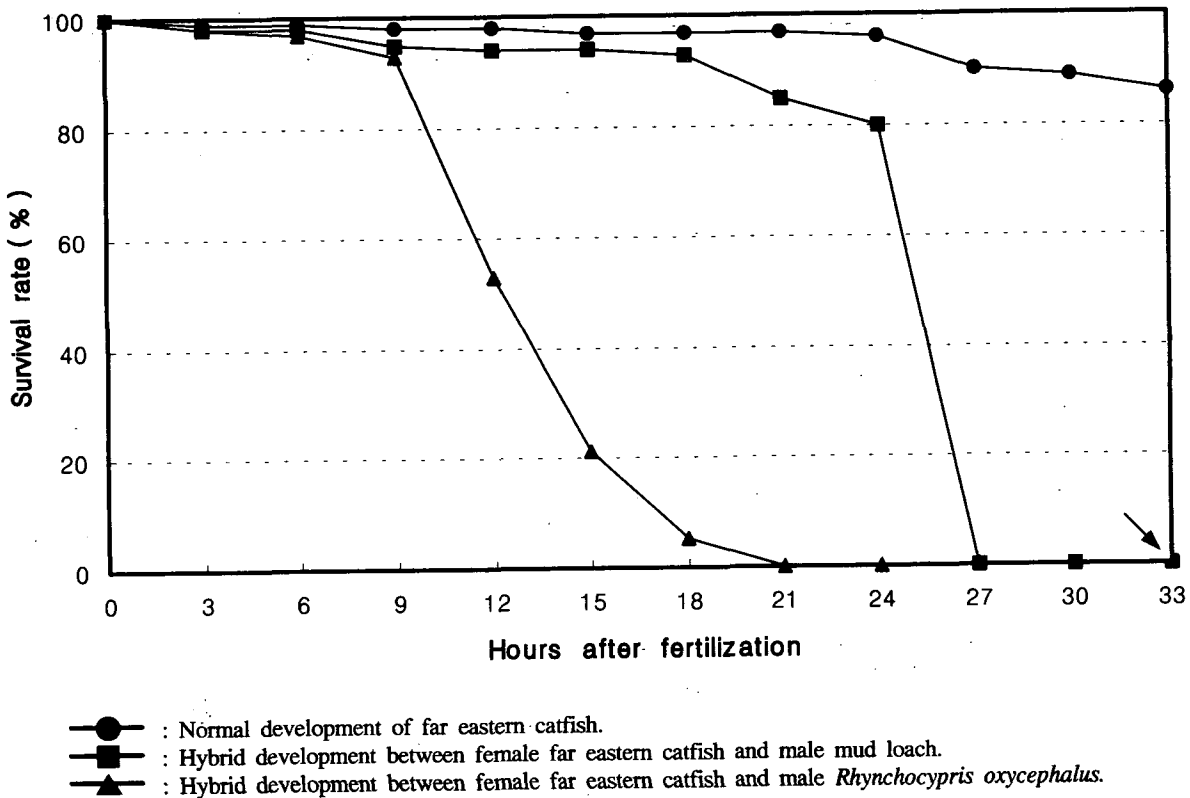


Figure 1. Survival curves of the normal, hybrid eggs between female far eastern catfish and male mud loach, and hybrid eggs between female far eastern catfish and male *Rhynchocypris oxycephalus*. Arrow indicates the period when the normal far eastern catfish embryos hatched out.

Hertwig 효과

미꾸라지 정자를 여러 조사량의 자외선 처리후 메기난과 수정한 자성발생성 반수체군의 수정후 24시간에서의 생존율과 메기군의 발생에 비해 늦은 발생을 보이는, 수정후 40시간에서의 반수체 증후군 발생 빈도를 2회 반복하여 조사한 결과는 Figure 2와 같다. Figure 2의 trial I 인 경우, 자외선을 처리하지 않을 시 $30 \pm 1.1\%$ 의 생존율을 보였으나 $1,020 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $68.2 \pm 2.7\%$ 로 생존율이 증가하였으며 $3,000 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $26.1 \pm 2.0\%$ 로 그 생존율이 감소하였다. $4,980 \sim 15,000 \text{ erg/mm}^2$ 의 자외선 농도에서는 $41.5 \sim 48.2\%$ 의 생존율을 보였다. 반수체 증후군 빈도는 자외선을 처리하지 않을 경우 $2.8 \pm 0.1\%$ 인 반면 $1,020 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 반수체 증후군 빈도가 $59.3 \pm 2.1\%$ 로 증가하였다. $3,000 \text{ erg/mm}^2$ 의 자외선 농도에서는 $63.4 \pm 3.7\%$ 의 반수체 증후군 빈도를 보였으며 $4,980 \sim 15,000 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $87.3 \sim 94.6\%$ 의 높은 반수체 증후군 빈도를 나타내었다.

Figure 2의 trial II 인 경우, trial I 과 비교시 거의 유

사한 경향을 나타내었다. 자외선을 처리하지 않을 시 $27.8 \pm 1.3\%$ 의 생존율은 $10,980 \text{ erg/mm}^2$ 와 $15,000 \text{ erg/mm}^2$ 의 각각 $17.6 \pm 0.5\%$, $11.9 \pm 0.3\%$ 의 낮은 생존율 그리고 $7,020 \text{ erg/mm}^2$ 에서의 $37.5 \pm 1.7\%$ 의 높은 생존율을 제외하고는 여타 자외선 처리농도에서의 생존율 $20.3 \sim 31.2\%$ 수준과 유사하였다. 반수체 증후군 빈도는 자외선을 처리하지 않을 시 수정후 40시간에 모두 나타나지 않은데 반해, $1,020 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $56.8 \pm 2.2\%$, $3,000 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $62.1 \pm 2.9\%$, $4,980 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 $90.9 \pm 4.6\%$ 의 반수체 증후군 빈도를 보여 자외선 처리농도 증가에 따라 반수체 증후군 빈도가 증가하였다. $7,020 \sim 15,000 \text{ erg/mm}^2$ 에서는 반수체 증후군 빈도가 $82.0 \sim 86.0\%$ 로 비교적 안정상태를 보였다. 생존율과 반수체 증후군 빈도에서의 결과를 고려시 미꾸라지 정자 불활성화를 위한 적정 자외선 농도는 $7,020 \text{ erg/mm}^2$ 혹은 $9,000 \text{ erg/mm}^2$ 로 판명되었다. 메기군과 반수체 증후군을 보이는 자성발생성 반수체의 부화 직전 외형은 Figure 3과 같다. 메기군은 정상 외형을 보인 반면 (Fig. 3a), 반수체 증후군은 정상 메기 외형에 비해,

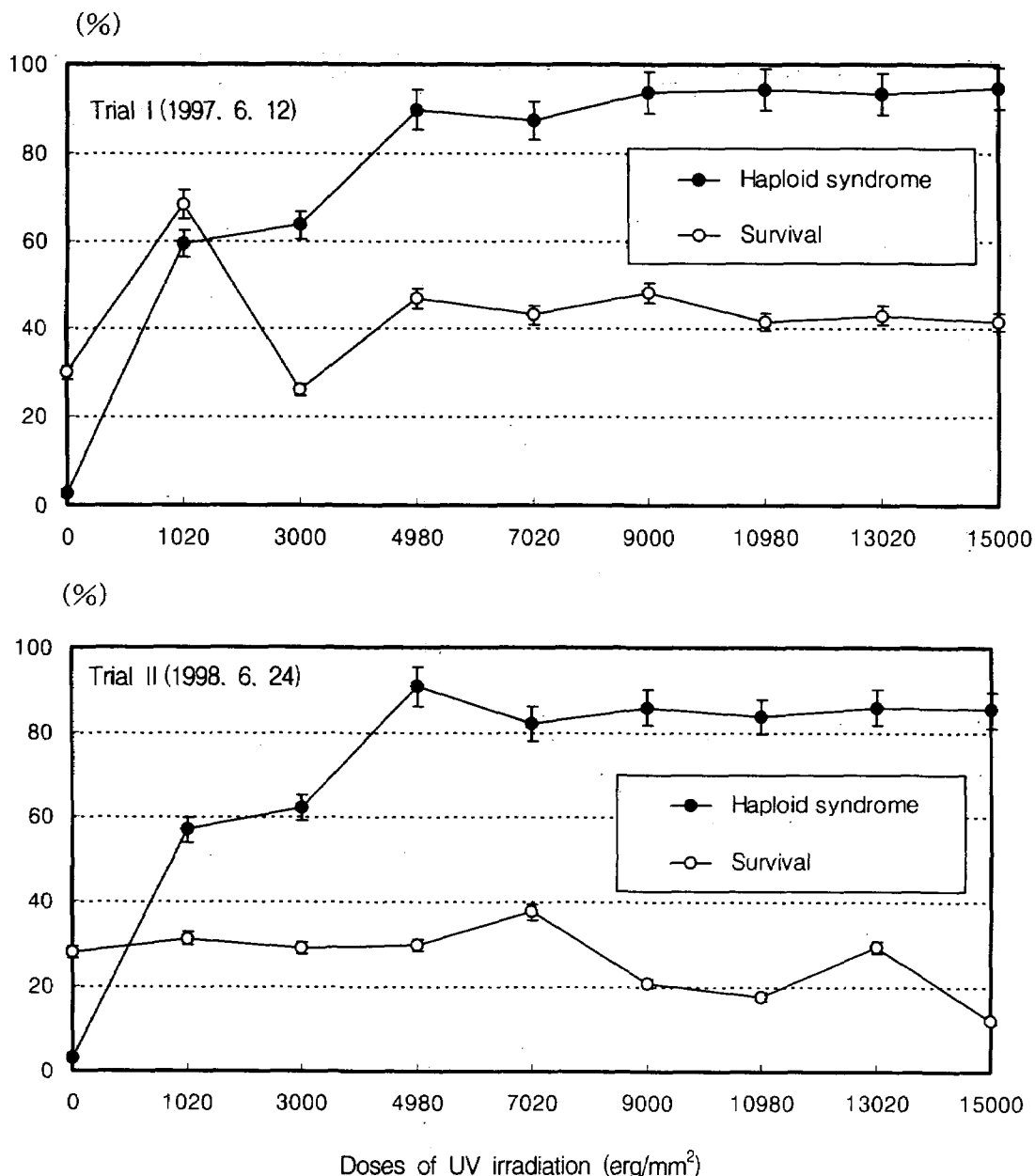


Figure 2. Changes in survival of embryos and haploid syndrome of far eastern catfish eggs fertilized with UV-irradiated mud loach sperm. Survival measured at 24 hrs after fertilization and incidence of haploid syndrome measured at 40 hrs after fertilization. Vertical bars represent mean \pm s.d..

두꺼우면서 체장이 짧은 몸통, 짧으면서 만곡된 꼬리, 작고 미분화된 두부, 작은 난황낭 및 난황낭과 몸통 전반부 사이의 큰 강소 존재등 복합 증세를 보였다 (Fig. 3b).

자성발생성 2배체 유도 조건

9,000 erg/mm²의 자외선 조사된 미꾸라지 정자에 의한 자

성발생성 2배체 유도를 위해 수정후 3분, 5분, 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4°C로 수정난을 저온 처리한 결과는 Table 1과 같다. 수정후 27시간의 생존율은 대조군인 메기군은 90.4% 이었고 sham 대조군인 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종군은 0% 이었다. 불활성화된 미꾸라지 정자로 수정한 자성발생성 반수체군의 수정후 27시간에서의 생존율은, 동일 최초 처리시간 군에서 그 처리시간이 30분, 40분 그리고 50

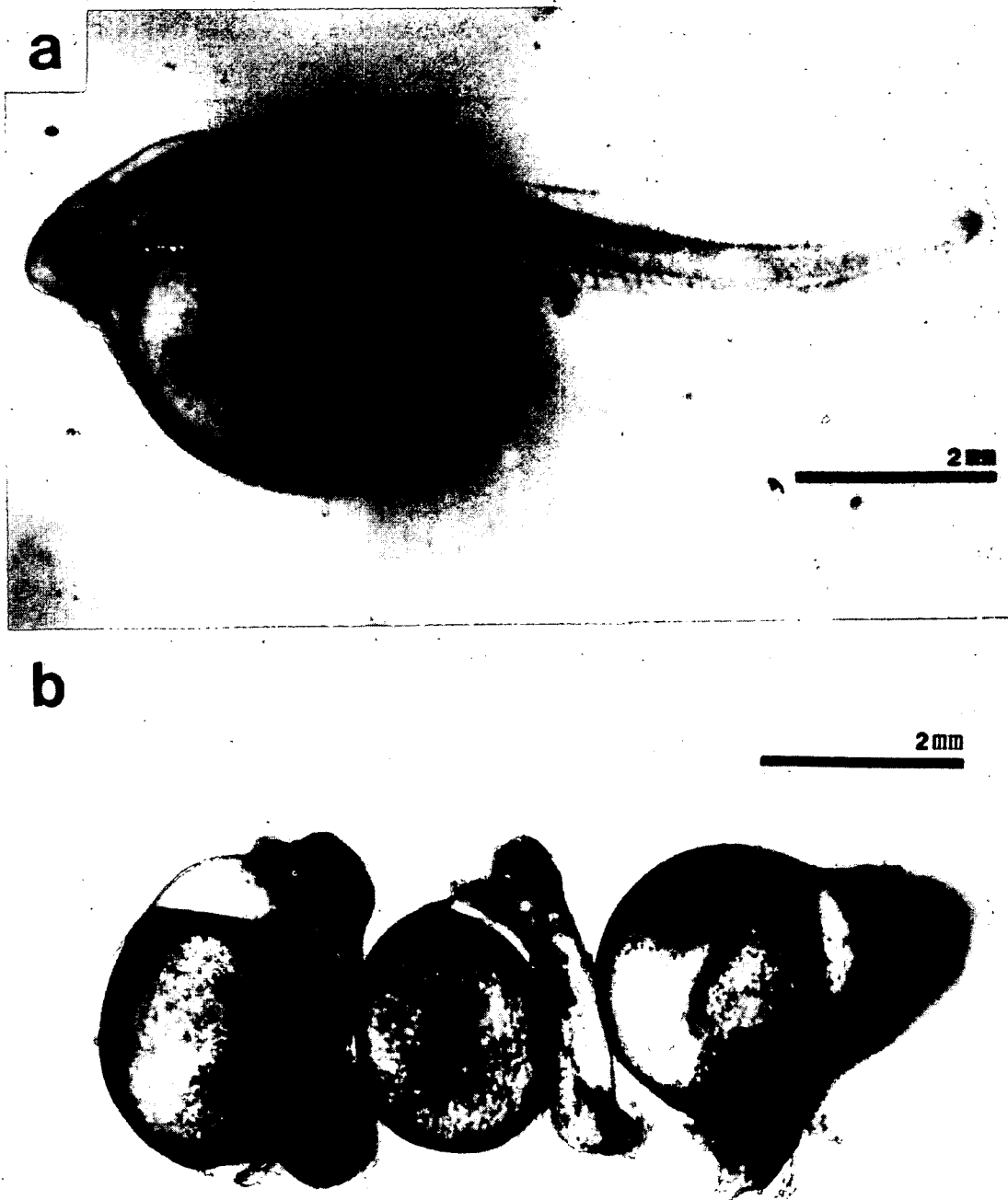


Figure 3. Embryos at just before hatching of normal (a) and gynogenetic haploid (b) of far eastern catfish fertilized with UV-irradiated mud loach sperm. The chorion was removed to observe the detailed of morphology. Note gynogenetic haploid (b) with abnormal retina, short curved caudal vertebrae, short tail and distorted yolk sac or haploid syndrome.

Table 1. The Impact of a Cold Shock of 4°C Applied at 3, 5 or 7 min after Fertilization and Lasted for 30, 40 and 50 min on the Survival of Embryos, Hatching Rate and Abnormality in Far Eastern Catfish Eggs Fertilized with UV-Irradiated Mud Loach Sperm^{*1}

Exp. Group ^{*2}	Time of Treatment (min) ^{*3}	Duration Time (min)	Survival of Embryos (%) ^{*4}	Hatching (%) ^{*5}	Abnormality (%)
Intact control		Untreated	90.4 ± 7.6	76.4 ± 5.3	6.8 ± 0.4
Gynogenetic control		Untreated	0	0	0
Gynogens	3	30	31.3 ± 2.5 ^a	51.8 ± 3.1 ^c	15.1 ± 0.6 ^b
		40	27.4 ± 1.9 ^a	63.7 ± 2.9 ^b	18.4 ± 0.8 ^b
		50	21.8 ± 1.2 ^b	44.2 ± 2.0 ^c	27.9 ± 1.1 ^a
Gynogens	5	30	28.2 ± 1.7 ^a	84.8 ± 4.1 ^a	11.8 ± 0.4 ^c
		40	26.5 ± 1.5 ^a	92.4 ± 3.9 ^a	12.5 ± 0.5 ^c
		50	16.5 ± 1.0 ^b	71.6 ± 3.0 ^b	19.6 ± 0.8 ^b
Gynogens	7	30	26.6 ± 1.6 ^a	23.9 ± 1.7 ^d	10.0 ± 0.3 ^c
		40	19.0 ± 0.8 ^b	29.2 ± 1.5 ^d	15.8 ± 0.6 ^b
		50	11.7 ± 0.4 ^c	21.5 ± 1.8 ^d	17.4 ± 0.7 ^b

^{*1} Data (mean ± SD) were based on three replicate treatment. Means with different superscripts within a column were statistically different at $P < 0.05$.

^{*2} Intact control: far eastern catfish sperm mediated; gynogenetic control: mud loach sperm mediated.

^{*3} Time to start cold shock treatment after fertilization.

^{*4} Survival of embryos at 27 hours after fertilization.

^{*5} Hatching from the number of live embryos at 27 hours after fertilization.

분으로 길어질수록 낮아졌으며, 수정후 저온 처리의 최초 처리시간이 짧을수록 높아지는 경향을 보였다.

부화율은 대조군이 76.4%, sham 대조군이 0%를 나타내었으며 4°C로 저온 처리한 각 실험군중 수정후 5분에 30분간 및 40분간 처리군은 각각 84.8%, 92.4%의 높은 부화율을 보였으며($P < 0.05$), 수정후 5분에 50분간 처리군은 71.6%의 부화율을 보였다. 기형율은 대조군이 6.8%, sham 대조군이 0%인 반면, 4°C 저온 처리한 각 실험군에서는 수정후 최초 처리시간이 짧을수록 그리고 처리시간이 길어질수록 기형율이 증가하는 경향을 보였다. 생존율과 부화율을 고려시 불활성화된 미꾸라지 정자로 수정한 자성발생성 반수체의 유전자 배가를 위한 효과적인 조건은 수정후 5분에 4°C로 각각 30분간 및 40분간 처리하는 것임이 밝혀졌다. 따라서 차후 실험에서 자성발생성 2배체는 수정후 5분에 4°C로 40분간 저온 처리하여 생산하였다.

자성발생성 2배체의 염색체

Figure 4의 a는 본 실험에 사용된 메기 암컷의 중기 분열

상으로서 염색체 수는 $2n = 58$ 이었으며, 핵형은 12쌍의 중부염색체 (metacentrics), 12쌍의 차중부염색체 (submetacentrics) 및 5쌍의 단부염색체 (acrocentrics)로 구성되었다. Figure 4의 b는 본 실험에 사용된 미꾸라지 수컷의 염색체 중기 분열상으로서 염색체 수는 $2n = 48$ 이었으며, 핵형은 6쌍의 중부염색체, 2쌍의 차중부염색체 및 16쌍의 단부염색체로 구성되었다. Figure 4의 c는 자성발생성 2배체군의 중기상으로서 본 실험에 사용된 메기 암컷의 염색체 수 및 핵형과 동일하였다. 자성발생성 2배체 핵형에는 미꾸라지 정자의 불활성으로 기인되어, 미꾸라지의 염색체를 발견할 수 없었다.

자성발생성 2배체의 생식소 및 성비

Figure 5의 a는 부화후 10주의 메기 대조군 암컷 난소 squash 상으로 주변인기 난(oocyte in the perinucleus stage)으로 구성되었으며, Figure 5의 b는 부화후 10주의 메기 대조군 수컷 정소 squash 상으로 다수의 섬유상 조직과 정원세포(spermatogonia)로 구성되었다. 자성발생성 2

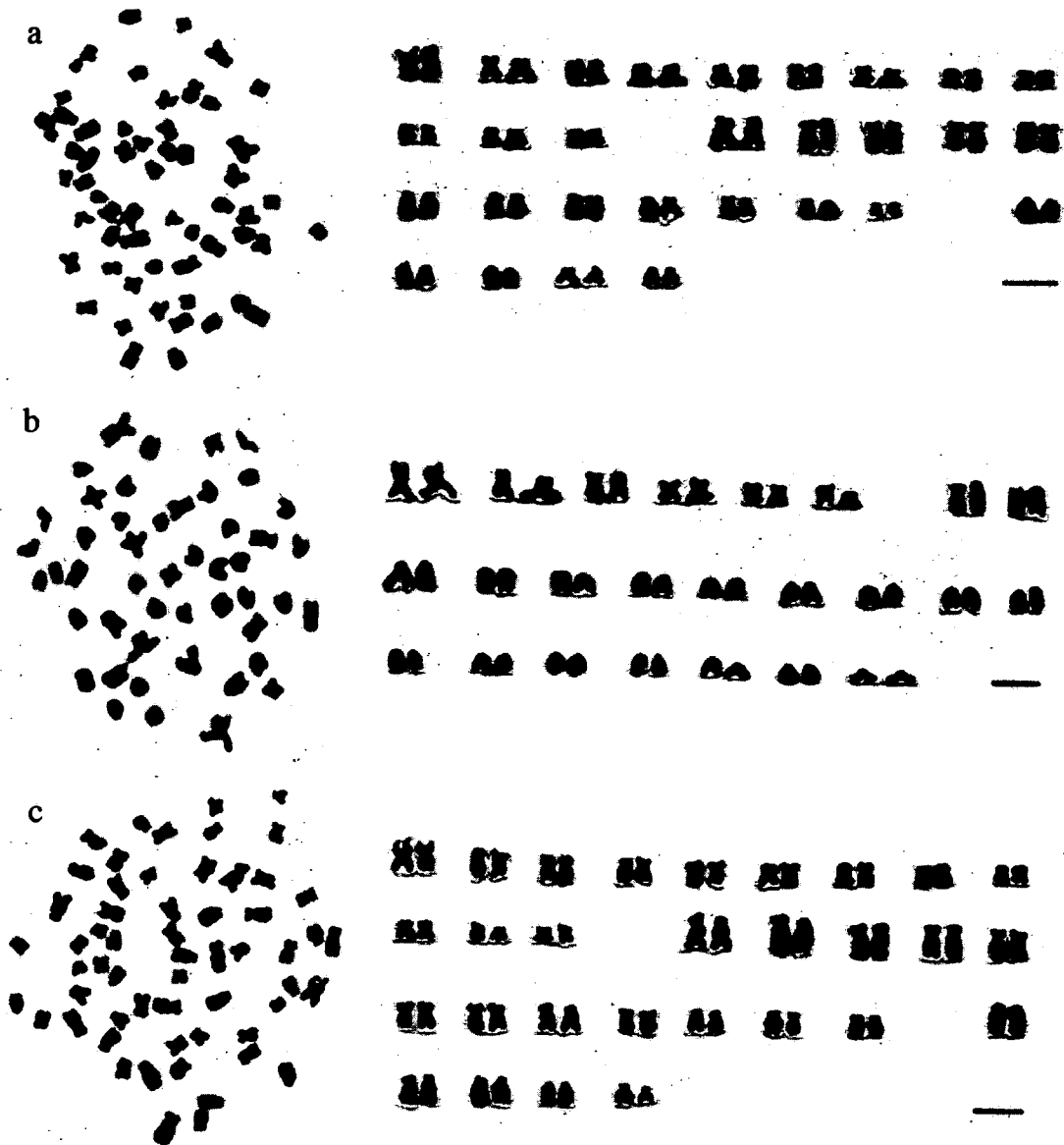


Figure 4. Metaphases and idiograms of female far eastern catfish (a), male mud loach (b) and all female gynogenetic diploid far eastern catfish (c). Bars are 10 μ m.

배체의 생식소는 대조군 메기 암컷과 유사한 squash 상을 보였다. 부화후 10주의 메기 대조군 암·수의 성비는 서로 유사한 반면 ($P>0.05$), 부화후 10주의 자성발생성 2배체는 모두 암컷이었다 ($P<0.05$) (Table 2). Figure 5의 c는 부화후 6주의 메기 대조군 암컷의 난소 조직상으로 난소내관 (endoovarian canal)이 존재하였으며 난은 주변인기 단계 이었다. Figure 5의 d는 부화후 6주의 자성발생성 2배체 생식소의 조직상으로 난소로 나타났으며, Figure 5c의 부화후 6주의 메기 대조군 암컷과 같은 조직상 특징을 보였다. 부

화후 6주의 메기 대조군 암·수의 성비는 서로 유사한 반면 ($P>0.05$), 부화후 6주의 자성발생성 2배체는 모두 암컷이었다 ($P<0.05$) (Table 2). 본 실험 결과 메기의 성결정 기구는 암컷 동형접합체임이 밝혀졌다.

고 찰

어류의 암컷이 동형접합체 성을 가진다면, 자성발생을

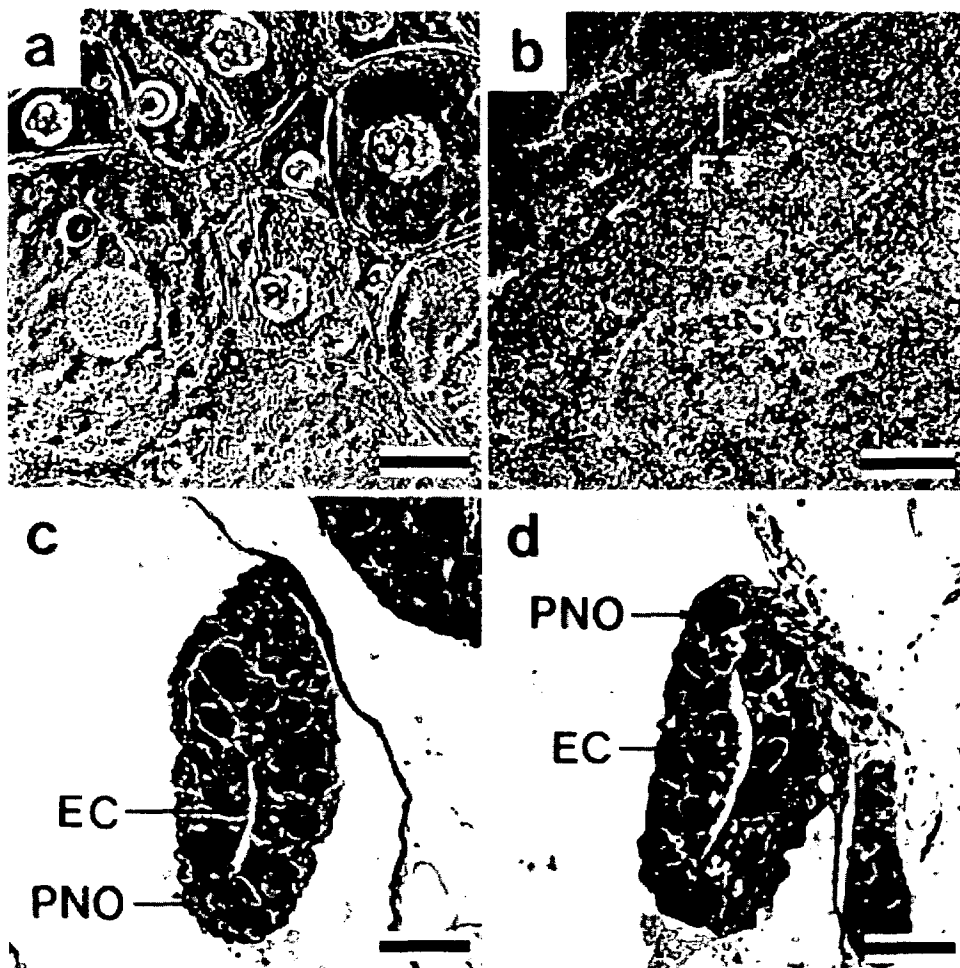


Figure 5. Squash preparation at 10 weeks after hatching (a, b) and histological section at 6 weeks after hatching (c, d) of the gonads in gynogenetic diploid and control *Silurus asotus*. a, c: control female (scale bars represent 40 and 50 μm , respectively), b: control male (scale bar represents 150 μm), d: gynogenetic diploid female (scale bar represents 50 μm). EC: endoovarian canal, FT: fibrous tissue, PNO: oocyte in the perinucleolus stage, SG: spermatogonia.

통하여 전 자성 집단을 형성할 수 있다 (Ihssen et al., 1990). 어류 자성발생을 유도하기 위해 우선 정자를 불활성 시켜 수정하여야 하는바, 자외선 조사는 X선과 ^{60}CO 의 γ 선에 의한 이온화방사와 더불어 정자의 유전적 불활성

화에 효과적이다. 아울러 자외선 조사는 취급시 간편함, 안정성과 아울러 자성발생 2배체 생산시 이온화 방식에 비해 높은 사망을 나타내지 않는 장점 등으로 인해 정자의 유전적 불활성화시 효과적으로 사용되고 있으며 (Thorgaard and

Table 2. Sex Ratios of Control and Gynogenetic Diploid Far Eastern Catfish

Age (weeks after hatching) ^{*1}	Exp. group	Replication	Sex ratio (%) ^{*2}		Female (%)
			Female	Male	
6	Control	1	52 ^a	48 ^a	52
		2	49 ^a	51 ^a	49
	Gynogenetic diploid	1	100 ^b	0 ^b	100
		2	100 ^b	0 ^b	100
10	Control	1	49 ^a	51 ^a	49
		2	53 ^a	47 ^a	53
	Gynogenetic diploid	1	100 ^b	0 ^b	100
		2	100 ^b	0 ^b	100

^{*1} Sex ratio determined by histological analysis at 6 weeks after hatching and gonad squash method at 10 weeks after hatching, respectively.

^{*2} Values with different superscripts in each column indicate significant differences from expected 1:1 ratio (χ^2 -test, $P < 0.05$).

Allen, 1987), 특히 자외선에 의한 DNA 불활성화시 그 탁월한 효과로 인해, Arai et al. (1992)은 난의 DNA 불활성화에서도 자외선을 사용한 바 있다.

본 실험의 메기 *Silurus asotus* 자성발생 유도에 사용된 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 정자 불활성화의 적정 자외선 조사 농도는 7,020 ~ 9,000 erg/mm²로 판명되었으며, 이는 미꾸라지와 근연종인 미꾸리 *M. anguillicaudatus* 정자의 불활성화를 위해 6,000 ~ 9,000 erg/mm²의 자외선 조사 농도가 필요로 한다는 Suzuki et al. (1985)의 보고와 비교시, 적정 자외선 조사 농도에서 유사한 결과이다. 반면, Kim et al. (1993)이 넙치 *Paralichthys olivaceus* 자성발생 2배체 유도를 위하여 사용한 미꾸라지 정자 불활성화를 위한 적정 자외선 조사 농도 3,600 erg/mm²와 비교시, 적정 자외선 농도에서 본 실험과 차이가 있었다. 이는 각 연구시 사용된 미꾸라지 정자의 불활성화 조건 즉, 자외선 조사 처리시의 정자 회석 배율 및 처리 조건의 차이에 의한 것으로도 사료되나, 사용된 미꾸라지 수컷 계통간의 차이에 기인되었을 가능성도 배제할 수 없다. 버들치 정자의 불활성화를 위한 적정 자외선 조사 농도 결정은, 불활성화된 버들치 정자로 수정한 메기 난 즉, 잡종의 초기 사망율이 매우 높아 어려웠다. 이러한 높은 초기 사망율은 잡종 유도에 사용된 메기와 미꾸라지 자체의 중간 특이성에 기인한 것으로 사료되며, 버들치 정자를 사용한 자성발생 2배체 또한 이런 이유로 인하여 유도할 수 없었다.

어류에서 제 2 감수분열 억제 즉, 제 2 극체 방출 억제는 저온 처리, 고온 처리, 수압 처리 및 화학적 처리로 가능한데 (Hssen et al., 1990; Park et al., 1996), 본 실험에서 수정후 3분, 5분 및 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4°C로 저온 처리를 한 결과, 수정난의 생존율과 기형율은 최초 처리 시간 및 처리 지속 시간에 대하여 각각 반비례 및 비례하는 경향성을 보였다. 반면, 부화율은 각 상이한 최초 처리 시간 및 처리 지속 시간에 따른 별다른 경향성이 발견되지 않았으며, 생존율, 부화율 그리고 기형율을 고려시 제 2 극체 방출 억제를 위한 효과적인 처리 조건은 수정후 5분, 4°C에서 30분간 및 40분간 저온 처리하는 것으로 나타났다.

본 실험에서와 같이 자성발생 2배체 생산시 타 종의 정자를 불활성화 시켜 자성발생 2배체를 유도하는 기법은, 타 종 정자에 의한 잡종 개체의 부화전 사망으로 인하여 타 종간의 잡종 유도가 불가능한 경우, 동 종 정자에 의한 유전적 간섭을 억제할 수 있어 보다 정확한 자성발생 개체를 유도할 수 있다 (Mims et al., 1997; Fujioka, 1998). 본 실험에서와 같이 타 종의 정자에 의한 전 암컷 자성발생

유도는 미꾸리 (Suzuki et al., 1985), 참돔 *Pagrus major* (Sugama et al., 1990), 넙치 (Kim et al., 1993)와 paddlefish *Polyodon spathula* (Mims et al., 1997)에서 이루어진 바 있다. 본 실험에 사용한 미꾸라지 수컷의 염색체와 메기 암컷의 염색체 수는 Kim et al. (1988a, 1995)의 연구 결과와 마찬가지로 각각 $2n = 48$ 및 $2n = 58$ 이었으며 핵형 역시 각각 동일한 결과를 보였다. 핵형과 염색체수에 있어 본 실험에서 유도된 자성발생 2배체들을 메기 암컷과 비교시 동일하였으며 특히, 자성발생 2배체의 각 염색체에서 미꾸라지의 염색체는 발견되지 않는 점을 고려시 미꾸라지 정자 핵은 완전히 불활성화 되었음을 확인할 수 있었다. 메기는 암·수간 이형의 성 염색체는 존재하지 않아 (Kim et al., 1988a) 자성발생 개체들의 성을 염색체 분석만으로 판별하기는 곤란하나 만약, 메기의 성 염색체를 판별할 수 있는 방법이 개발되어 자성발생 개체들에 적용된다면 자성발생 개체들의 성을 염색체 분석만으로도 판별할 수 있으리라 사료된다.

본 실험에서 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 사육 수온 조건하에서 성비 조사를 위해 선택한 시기인 부화후 6주와 부화후 10주는, Choi (1992)가 보고한 메기에서 25°C 사육 수온 조건에서 부화후 6일(전장 1.5 cm)에 생식소의 분화가 일어난다는 결과를 고려시, 성비 측정을 위하여 적절한 조사 시기였다. 본 실험의 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 사육 수온 조건하에서 부화후 6주와 부화후 10주의 암·수 성비는 대조군인 경우 암컷:수컷 비율이 약 1:1 이었다. Choi (1992)의 연구 결과인 25°C 사육 조건으로 부화후 40일에 암·수 성비 비율 1.1:1과 본 실험의 성비 결과를 비교시, 비록 사육 수온은 1°C 내외로 차이가 있으나, 암·수 비율이 거의 동일함을 알 수 있었다. 부화후 6주 및 10주에서의 대조군의 암·수 성비가 1:1인 것에 반하여 유도된 자성발생 2배체에 있어서는 모두 암컷 개체만이 관찰되어, 본 실험에 사용된 메기의 성결정 기구는 XX-XY형의 암컷 동형접합자임을 확인할 수 있었다.

유도된 전 암컷 자성발생 2배체를 인위적으로 성전환 시켜 가짜 전 수컷을 생산한 후, 이들 가짜 전 수컷 집단과 정상 암컷을 교배하여 전 암컷 집단을 생산한 연구가 무지개송어 *Salmo gairdneri*, Atlantic salmon *Salmo salar*, silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* 및 넙치에서 보고되고 있다 (Kim et al., 1994). 본 실험에 사용된 메기를 대상으로한 연구로는 암컷화 호르몬 17β -estradiol을 처리해서 생리학적인 성 전환을 얻은 연구 결과만이 현재까지 보고되어 있을 뿐 (Choi, 1992), 전 암컷인 자성발생 2배체를 대상으로한 생리학적 성전환 유도 그리고 이렇게

유도된 가짜 전 수컷과 정상 암컷과의 교배 즉, 유전학적 성전환에 의한 전 암컷 생산은 아직까지 전무한 실정이다. 따라서 이러한 점을 고려 앞으로 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

어류 유전육종 (genetics and breeding) 기법중 염색체공학 (chromosome engineering) 기법을 사용한 고부가가치 품종의 창출은, 단시간에 적은 경비로 양식 생산고의 향상을 도모할 수 있는 방법이다 (Thorgaard and Allen, 1987; Jeong et al., 1996). 이러한 염색체공학 기법중, 본 연구 결과 생산된 자성발생성 2배체 메기와 마찬가지로 자성발생 기법에 의해 생산된 자성발생성 2배체는 만약 대상 어류가 암컷 동형접합체일 경우 전 암컷으로 나타나, 성장 및 외형상 형태, 색깔 등의 형질에서 암컷이 수컷에 비해 월등할 경우 양식 산업적으로 적용될 수 있다. 아울러 자성발생성 2배체는 철갑상어 알, 낚시 미끼용 연어과 난과 같이 산업성 있는 어란의 생산에 이용될 수 있고, 수컷의 조기 성숙에 기인한 작은 크기 및 육질 저하 등의 제반 문제를 제거할 수 있어 수산·양식산업에서 과거부터 사용되고 있다 (Ihssen et al., 1990; Kim et al., 1994).

Gomlesky et al. (1979)이 보고한 바와 같이 자성발생 2배체 개체들이 정상적인 생식 능력을 보임을 고려, 본 연구 결과 유도된 자성발생 2배체 개체의 생식 능력에 관한 평가가 차후 있어야 할 것으로 사료된다. 아울러, 본 연구 결과 생산된 감수분열 억제성 자성발생 2배체 메기를 대상으로 세대를 걸친 순계 확립을 위해 DNA fingerprint에 의한 표식, 확인 및 검정이 필요할 것이다. 차후, 메기 자성발생 전 암컷과 자연산 대조군과의 성장 비교가 역시 필요하며 이러한 성장 비교 결과는 현재의 메기 양식산업에서 암·수간 성장 불균형으로 인한 제반 문제들이 많음을 감안시, 이를 해결하기 위한 한 방안이 될 것이라 기대된다.

인 용 문 헌

- Arai K, Masaoka T and Suzuki R (1992) Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. *Nippon Suisan Gakk.* 58: 1197-1201.
- Choi GC (1992) Indoor culture and sex reversal with 17 β -Estradiol in Far Eastern catfish, *Silurus asotus* (Teleostomi: Siluridae). MS. Thesis, Nat. Fish. Univ. Pusan. 37pp.
- Fujioka Y (1998) Survival, growth and sex ratios of gynogenetic diploid honmoroko. *J. Fish Biol.* 52: 430-442.
- Gomlesky BI, Il'yasova VA and Cherfas NB (1979) Investigation of radiation-induced diploid gynogenesis in carp (*Cyprinus carpio* L.). IV, Gonad state and evaluation of reproductive ability in carp of gynogenetic origin. *Genetika* 15: 1643-1650.
- Goudie CA, Simco BA, Davis KB and Liu Q (1995) Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. *Aquaculture* 133: 185-198.
- Ihssen PE, McKay LR, McMillan I and Phillips PB (1990) Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 698-717.
- Jeong CH, Moon YB, Park I-S and Kim DS (1996) F₂ production of gynogenetic diploid in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 9: 287-291.
- Kim B-S, Moon YB, Jeong CH, Kim DS and Lee Y-D (1994) Evaluation of fertility of artificial induced gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 7: 151-158.
- Kim DS, Kim I-B, Huh HT and Park I-S (1988a). Cytogenetic analysis of catfish, *Silurus asotus* (Teleostomi: Siluriformes). *Ocean Res.* 10: 33-37.
- Kim DS, Bang IC, Chun SK and Kim YH (1988b) Effects of the anaesthetic lidocaine on some fishes. *J. Fish Pathol.* 1: 59-64.
- Kim DS, Kim JH, Jo J-Y, Moon YB and Cho KC (1993) Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Genetics* 15: 179-186.
- Kim DS, Jo J-Y and Lee T-Y (1994) Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture* 120: 263-270.
- Kim DS, Nam YK and Park I-S (1995) Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and

- cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture* 135: 257-265.
- Kim IS** (1997) Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Freshwater Fishes. Ministry of Education, Korea, vol. 37. 631pp.
- Klingerman AD and Bloom SE** (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34: 266-269.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA** (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Mims SD, Shelton WL, Linhart O and Wang C** (1997) Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *J. World Aquat. Soc.* 28: 334-343.
- Ministry of Agriculture and Forestry** (1996) Statistical yearbook of agriculture, forestry and fisheries. Korea, 31000-51023-26-01. 478pp.
- Nam YK, Choi GC and Kim DS** (1999) Blocking the 1st cleavage in mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *J. Aquacult.* 12: 167-173.
- Oppermann K** (1913) Die entwicklung von forelleneiern nach befruchtung mit radiumbestrahlten samenfäden. *Arch. Microsc. Anat.* 83: 141-189.
- Park I-S, Kim PK, Kim JM, Choi GC and Kim DS** (1996) Production of hybrid and allotriploid between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*O. kisutch*). *J. Aquacult.* 9: 133-140.
- Refstie T, Stoss J and Donaldson E** (1982) Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture* 29: 67-82.
- Sugama K, Taniguchi N, Seki S, Nabeshima H and Hasegawa Y** (1990) Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 56: 1427-1433.
- Suzuki R, Oshiro T and Nakanishi T** (1985) Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 48: 45-55.
- Thorgaard GH** (1986) Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57: 57-64.
- Thorgaard GH and Allen SK, Jr** (1987) Chromosome manipulation and markers in fishery management. In *Population Genetics and Fisheries Management*, N. Ryman and F.M. Utter, eds., University of Washington Press, Seattle, pp. 319-331.
- Valcárcel A, Guerrero G and Maggese MC** (1994) Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of the catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae), and its photoreactivation. *Aquaculture* 128: 21-28.
- Volckaert FAM, Galbusera PHA, Hellemans BAS, Van den Haute C, Vanstaen D and Ollevier F** (1994) Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*) I, Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks. *Aquaculture* 128: 221-233.