

## Gene Mapping을 위한 제1난할저지형 자성발생 2배체 넙치 생산 및 microsatellite genetic marker에 의한 확인

강 정하, 이 상준, 김 경길\*, 이 종윤\*\*

국립수산과학원 생명공학연구단 · \* 국립수산과학원 어류육종센터 ·  
\*\*국립수산과학원 서해수산연구소

### 서론

유전자 표지에 의한 선발 (Marker Assisted Selection, MAS)은 생물의 유전정보를 최대한 이용하여 형질을 개선하고자 하는 새로운 분자육종법으로 기존의 육종과 접목하여 육종효과를 극대화 할 수 있는 기술이다. 이를 위해서는 다양한 genetic marker에 의한 linkage map이 작성되어야 하고 그 재료가 되는 mapping family가 있어야 한다. 효과적인 mapping을 위해 가장 빠르게 inbred line을 생산할 수 있는 방법이 어류인 경우 제시가 되고 있고 그것이 제1난할 저지에 의한 double haploid 생산인 것이다. 본 연구에서는 넙치 gene mapping의 일환으로 우선적으로 mapping line의 구축을 위해 제1난할저지형 자성발생 2배체 넙치 생산을 시도하였고, 유전자 marker에 의해 성공 여부를 확인하였다.

### 재료 및 방법

참돔 성숙 정자를 유전적 불활성화를 위해 0.9% 생리식염수에 50배 희석한 후 샤알레에 0.5~1.0ml 얇게 펴고 실온에서 총 자외선량 4,800ergs/mm<sup>2</sup>가 되도록 조사하여 불활성 정자를 유도하였다.

성숙된 어미 친어에서 양질의 난을 인위적으로 채집한 후 불활성 정자와 인공수정 시킨 후 배양수온 (17°C)과 압력처리 조건 (620 kg/cm<sup>2</sup>, 6분)을 고정시킨 후 압력처리 시점을 검토하기 위해 수정 후 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75분이 각각 경과하였을 때 수정란에 가압 처리하여 제1난할저지를 위해 적절한 압력처리 시기를 조사하였다.

제1난할저지를 유도하여 성공적으로 double haploid임을 확인하기 위한 유전자 분석에는 5개의 microsatellite genetic marker를 사용하였고, 유도된 개체들의 genotype을 ABI 3100, gene-scan 및 genotyper software에 의해 결정하였다.

## 결과 및 요약

Double haploid 유도를 위한 제1난할저지 시기는 배양수온 17°C를 기준으로 하였을 때 수정 후 55분과 60분경에 압력을 처리한 실험구에서 가장 좋은 배체발생을 및 부화율을 얻었으며, 65분 이후 압력처리 실험구에서는 배체발생 이전에 모두 사망하였고 45분경에 압력처리 실험구에서는 반수체 출현율이 높음을 알 수 있었다.

Double haploid 유도 확인을 위해 우선 현미경 관찰에 의한 발생단계를 살펴 보았다. 그 결과, 대조군인 경우 수정후 80분 경과부터 2세포기로 발생하였고 120분 경부터 4세포기가 나타나기 시작했으나, 제1난할이 저지된 실험구의 수정난은 대조군보다 조금 늦게 난할이 시작되어 수정 후 100분경부터 2세포기 난할이 시작되었고 160분 경과 이후부터 4세포기로 발생하는 것으로 보아 제1난할이 저지되었음을 알 수 있었다.

또한 유전자 분석에 의해 double haploid 확인을 위해 넵치 microsatellite DNA marker를 이용하여 생산된 개체들의 유전자형을 분석하였고 그 결과, 사용한 5개의 locus에서 유도된 전 개체가 homozygote임을 확인하였다.

## 참고문헌

- Yamamoto Eiichi. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 173: 235-246
- Coimbra M.R.M., O. Hasegawa, K. Kobayashi, S. Koretsugu, E. Ohara, N. Okamoto. 2001. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder. Fisheries Science 67: 358-360
- Kocher T.D., W-J, Lee, H. Sobolewska, D. Penman, B. McAndrew. 1998. A genetic linkage map of a Tilapia. Genetics 148: 1225-1232