

## 4 배체 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)의 유도\*

김동수 · 노충환 · 남윤권

부산수산대학교 양식학과

### Induction of Tetraploid Cyprinid Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*\*

Dong Soo KIM, Choong Hwan NOH, and Yoon Kwan NAM

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

#### ABSTRACT

A tetraploid cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* was induced by applying heat shock. The efficiency of inductions changed with the time of initiation of treatment and the duration of treatment. The highest incidence of tetraploid was obtained at the treatment of 41 °C for 3 min, 28 min after fertilization. Ploidy level was estimated by kariological examination and flow cytometric analysis. The tetraploid cyprinid loach had 4n=100 chromosomes, while the diploid had 2n=50. The erythrocytic volume of the tetraploid was 1.65 times larger than that of the diploid. The DNA content of the tetraploid and diploid showed 6.547 pg/cell and 3.067 pg/cell, respectively.

#### 서 론

염색체 공학 기법을 통한 배수체 유도는 최근 단위 노력당 양식 생산량의 증대를 위한 방편으로 크게 각광 받고있다(Cassani et al. 1990 ; Thorgaard 1986). 그러나 제 2 극체 방출 억제제를 통한 3 배체 및 잡종 3 배체의 유도는 물리화학적 처리를 수행해야하는 번거로움과 대량 종묘 생산의 어려움 등으로 인해 일부 어종을 제외하고는 산업적인 측면에서 어려움을 겪고 있다(Bidwell et al. 1985 ; Chourrout et al. 1986). 이에 2 배체와 단순 교배를 통해 3 배체를 얻기 위한 방편으로 4 배체 유도가 시도되고 있다(Aldridge et al. 1990).

4 배체는 일반적으로 난의 발생 과정 중 제 1 난할을 억제함으로써 유도되며 현재까지 무지개송어(Chourrout et al. 1986), 차닐메기(Bidwell et al. 1985), 틸라피아(Don and Avtalion 1988), 초어(Cassani et al. 1990), 대두어(Aldridge et al. 1990) 및 기타 몇몇 연어과 어류(Myers et al. 1986)에서 유도된 바 있다. 그러나 오직 Chourrout 등(1986)에 의해 유도된 무지개송어 4 배체만이 생식 능력을 갖는

\* 본 논문은 1992년도 교육부 학술연구 조성비(유전공학, 과제번호 108-1)에 의해 수행되었음.

것으로 평가받고 있으며 대부분 유도된 4 배체는 높은 초기 사망율 및 기형율과 아울러 염색체 mosaicism 및 상동 염색체의 mispairing으로 인한 불임이 보고되고 있다(Bidwell et al. 1985).

미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)와 미꾸라지(*M. mizolepis*)는 미꾸리 속에 속하는 어류로서 맛과 영양가가 우수하여 우리 나라에서 크게 각광 받고 있다. 이중 미꾸리는 시각적 측면에서 보기가 좋고 인기가 있어 경제성이 높고, 맛이 우수하여 미꾸라지보다 선호되고 있으나 미꾸라지에 비해 성장이 느리고 고수온 및 질병에 약한 단점을 지니고 있어 양식어종으로서의 정착에 어려움이 있다. 이에 미꾸리와 미꾸라지간의 우량 형질을 갖춘 신 품종 어류의 개발을 위해 미꾸리와 미꾸라지 간의 잡종 3 배체가 유도되어 우수한 외형과 빠른 성장률이 보고된 바있다(박 1992). 본 연구에서는 잡종 3 배체를 양식 대상으로 정착시키기 위한 연구의 일환으로 단순 교배를 통해 잡종 3 배체를 생산하고자 우선 미꾸리 4 배체를 유도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 친어 관리 및 산란 유도

실험에 사용된 친어는 부산수산대학교 어류육종학 실험실 및 부산수산대학교 양어장에서 사육 중인 개체를 사용하였으며 Kim 등(1992)의 방법에 의거 HCG (human chorionic gonadotropin)와 잉어 뇌하수체를 주사하여 인공 산란을 유도하였다.

### 2. 4 배체 유도

수정 후 24 분부터 2 세포기 직전인 수정 44 분 후까지를 몇 개의 구간으로 나누어 41 °C의 온도로 1, 2 및 3 분간 고온 처리를 행한 후 각 처리 시간 별 부화율, 생존율 및 4 배체 유도율을 구하였다.

### 3. 4 배체 분석

#### 3-1. 부화율, 초기 사망율 및 기형율

4 배체의 유도시의 부화율, 초기 사망율 및 기형의 빈도를 정상 대조군과 비교하였다.

#### 3-2. 염색체

유도된 4 배체의 염색체 수 및 그의 핵형을 분석하기 위해 Klingerman과 Bloom(1977)의 방법에 의거 부화된 개체의 염색체를 분석하였다.

#### 3-3. 세포 및 핵의 크기

4 배체의 세포와 핵의 크기는 난황이 흡수된 개체로부터 적혈구 세포를 채취하여 Giemsa 염색하거나 May grunbaldt-Giemsa 염색을 한 후 1,000×현미경 하에서 각 개체 당 20 개의 세포를 계수하여 그 크기를 측정하였다.

#### 3-4. Flow cytometry

실험군의 DNA 함량 측정을 위하여 각 처리군으로부터 난황이 흡수된 개체를 단세포로 분리하여 propidium iodide(PI ; Sigma) 염색을 한 후 FACSTAR(Becton Dickinson Immunocytometry System, BDIS ; Mountain View(A) flow cytometry)를 이용하여 100,000 개의 세포 내 정보를 수집하여 BIDS의 Consert 50 program에 의해 DNA 함량을 측정하였다. 이때 대조군으로는 인간 백혈구와 닭의 적혈구를

사용하였다.

## 결 과

### 1. 4 배체 유도

Fig. 1에서 보듯이 41°C, 3분 고온 처리를 가한 결과 수정 후 28분 및 42분에서 생존율이 급격히 증가되는 양상을 보였고 41°C의 고온 처리에 의해 4 배체가 성공적으로 유도되었다.

41°C 고온으로 수정 29분 후 3분간 처리한 실험군에서 6.4%의 빈도로 4 배체가 유도되었고 54.3%의 부화율과 86.8%의 초기 생존율을 보여 본 종의 4 배체 유도에 있어서 최적 처리 조건으로 나타났다(Table 1).

### 2. 4 배체 분석

#### 2-1. 염색체

Klingerman과 Bloom (1977)의 solid-technique에 의거 염색체를 분석한 결과 미꾸리 이배체는  $2n=50$ , 4 배체는  $4n=100$  개의 염색체를 가지고 있었으며 염색체 수 및 핵 형에 있어 다형 현상 및 성 염색체를 찾아볼 수 없었다(Fig. 2).

#### 2-2. 세포 및 핵의 크기

미꾸리의 적혈구 장축은 11.22  $\mu\text{m}$ , 단축은 7.14  $\mu\text{m}$  이었으며 표면적 및 부피는 각각 68.93  $\mu\text{m}^2$  및 356.46  $\mu\text{m}^3$ 이었다. 적혈구 핵의 장축은 5.07  $\mu\text{m}$ , 단축은 2.82  $\mu\text{m}$ 이었으며 핵 표면적 및 핵 부피는 각각 11.23  $\mu\text{m}^2$ 과 21.18  $\mu\text{m}^3$ 이었다. 이에 비해 4 배체의 세포의 장축은 14.45  $\mu\text{m}$ , 단축은 8.82  $\mu\text{m}$ , 표면적은 100.10  $\mu\text{m}^2$  그리고 부피는 589.50  $\mu\text{m}^3$ 으로 나타났다. 또한 유도된 4 배체 핵의 장축은 7.10  $\mu\text{m}$ , 단축은 4.10  $\mu\text{m}$ , 표면적은 22.82  $\mu\text{m}^2$  그리고 부피는 53.79  $\mu\text{m}^3$ 이었다(Fig. 3, Table 2).

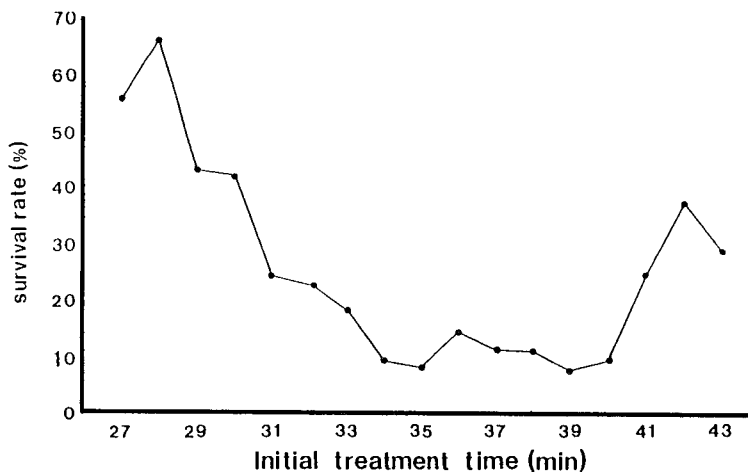


Fig. 1. Survival rate of *M. anguillicaudatus* eggs after heat shock at 41°C for 3 min.

Table 1. Effects of 41 °C heat shock on the eggs of cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* for the rates of hatching, early survival and tetraploidy

Initial time after fertilization(min)	Duration (min)	Hatching rate (%)	Early Survival rate (%)	Induction rate of 4n (%)
24	1	64/170 (37.6)	62/64 ( 96.9)	2/170 (1.2)
	2	29/160 (18.1)	23/29 ( 79.3)	0/160 (0.0)
	3	85/242 (35.1)	52/85 ( 61.2)	0/242 (0.0)
29	1	55/200 (27.5)	49/55 ( 89.1)	3/200 (1.5)
	2	86/185 (46.5)	64/86 ( 74.4)	5/185 (2.7)
	3	76/140 (54.3)	66/76 ( 86.8)	9/140 (6.4)
34	1	76/140 (54.3)	76/76 (100.0)	2/140 (1.4)
	2	28/191 (14.7)	17/28 ( 60.7)	5/191 (2.6)
	3	20/159 (12.6)	6/20 ( 30.0)	2/159 (1.3)
39	1	26/175 (14.9)	21/26 ( 80.8)	1/175 (0.6)
	2	8/148 ( 5.4)	2/8 ( 25.0)	0/148 (0.0)
	3	7/164 ( 4.3)	1/7 ( 14.3)	0/164 (0.0)
44	1	100/178 (56.2)	95/100 ( 95.0)	1/178 (0.6)
	2	23/170 (13.5)	14/23 ( 60.9)	2/170 (1.2)
	3	27/185 (14.6)	5/27 ( 18.5)	5/185 (2.7)



Fig. 2. Metaphase chromosomes of diploid(a) and tetraploid(b) *M. anguillicaudatus*.

4 배체 미꾸리의 유도

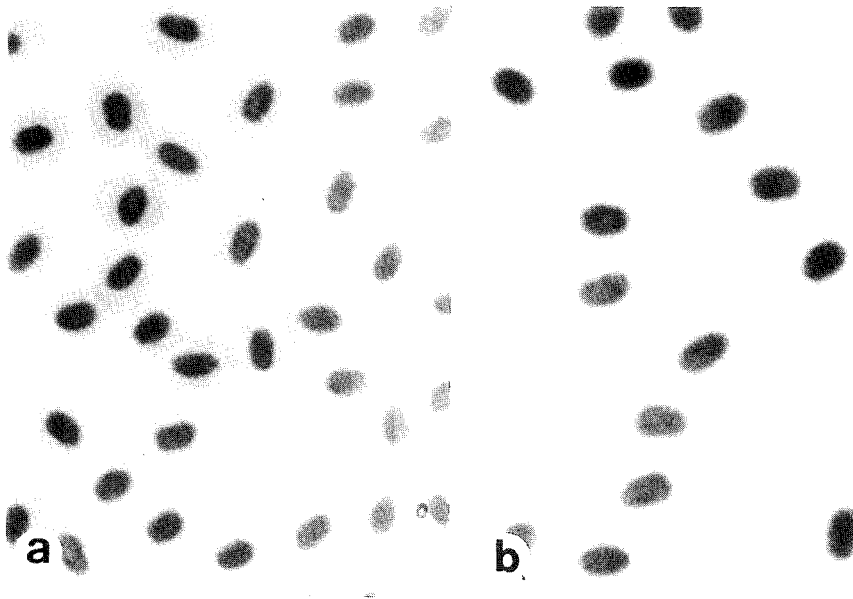


Fig. 3. Microphotographs of diploid(a) and tetraploid(b) erythrocytes of *M. anguillicaudatus*.

Table 2. Erythrocytic measurements of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

Item	2n	4n	Ratio of 4n to 2n
Cell			
major axis ( $\mu\text{m}$ )	11.44 $\pm$ 0.63	14.45 $\pm$ 0.48	1.28
minor axis ( $\mu\text{m}$ )	7.64 $\pm$ 0.76	8.82 $\pm$ 0.37	1.23
surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	68.93 $\pm$ 11.05	100.10 $\pm$ 5.12	1.45
volume ( $\mu\text{m}^3$ )	356.46 $\pm$ 36.01	589.50 $\pm$ 49.91	1.65
Nucleus			
major axis ( $\mu\text{m}$ )	5.07 $\pm$ 0.03	7.10 $\pm$ 0.24	1.40
minor axis ( $\mu\text{m}$ )	2.82 $\pm$ 0.16	4.10 $\pm$ 0.31	1.45
surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	11.23 $\pm$ 0.57	22.82 $\pm$ 1.26	2.03
volume ( $\mu\text{m}^3$ )	21.18 $\pm$ 2.29	53.79 $\pm$ 5.46	2.54

2-3. DNA 함량 측정 (flow cytometry)

Fig. 4는 4 배체의 flow cytometry data로서 미꾸리 2 배체는 대조군으로 사용된 인간의 DNA 함량의 43.8%의 genome size로 3.067 pg/cell, 그리고 유도된 4 배체는 인간 genome size의 93.5%의 DNA 함량을 보여 6.543 pg/cell로 나타났다(Table 3).

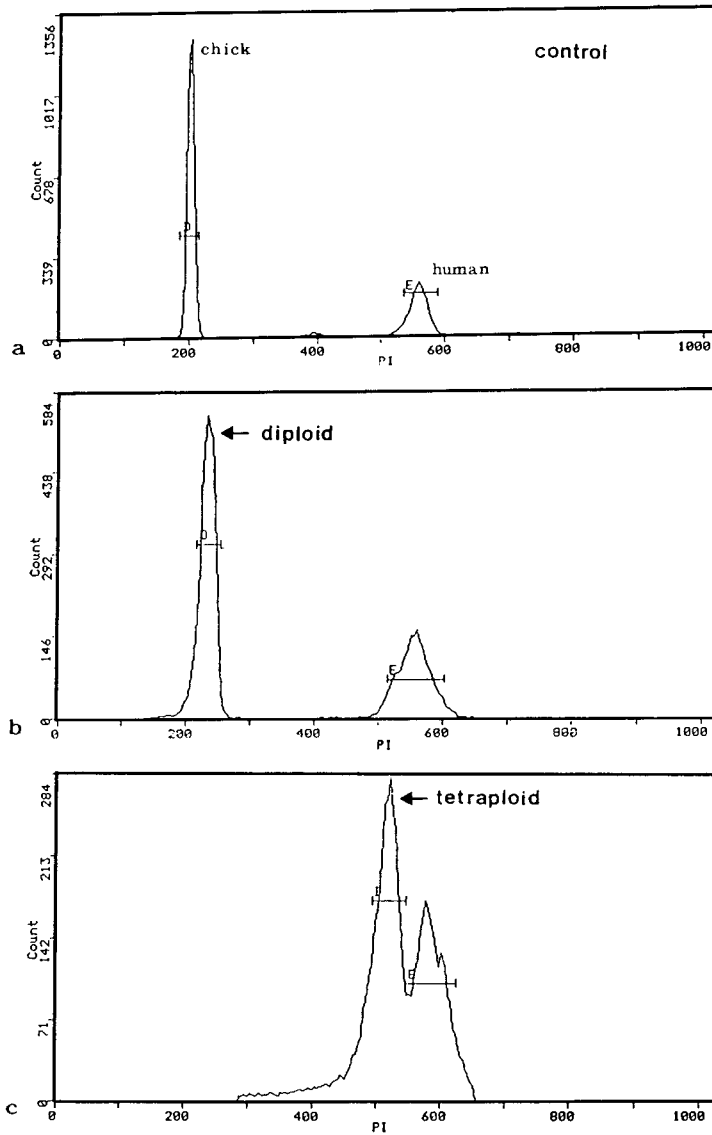


Fig. 4. Flow cytometric analysis of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus* : control(a), diploid(b) and tetraploid(c).

Table 3. DNA content of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

Species	Mean peak of sample	Mean peak of standard	Mean ratio of peak (loach/human)	pg/cell
2n	255.2	582.5	0.4381	3.067 ± 0.060
4n	546.0	584.2	0.9350	6.543 ± 0.071

## 논 의

본 연구에서는 미꾸리 수정란에 열 처리하여 4 배체를 얻을 수 있었고 이때 사용된 41℃ 고온 처리는 Thorgaard 등(1981)이 무지개송어 4 배체 유도에 사용한 온도보다 비교적 높았으나 Bidwell 등(1985)이 차벌 메기의 4 배체 유도를 위해 사용한 40~43℃보다는 약간 낮았다. 그러나 차벌메기의 경우에도 41℃ 온도 조건에서 가장 높은 4 배체 유도율을 보인 바 있어 41℃가 온수성 어류 수정란의 제 1 난할 억제에 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 열대성 어류인 틸라피아는 11℃의 처리 온도에서 4 배체가 유도된 바 있어(Don and Avtalion 1988), 앞으로 본종의 적정 제 1 난할 처리 조건을 확립하기 위한 저온 및 수압 처리 등 물리적 처리 조건을 확립하여야 할 것이다.

본 연구에서 미꾸리 4 배체 유도를 위한 효과적인 최초 처리 시간은 수온 25℃에서 수정 후 28 분으로 나타나 본 종의 제 1 난할이 수정 후 약 50 분만에 이루어 지는 것으로 볼 때(Suzuki et al. 1985), 제 1 난할의 억제는 kariokinesis가 cytokinesis 보다 유효한 것으로 판단되었다. 그러나 본 연구에서 얻어진 4 배체 유도율이 처리 조건에 따라 0.6~6.4%로 나타나 앞으로 4 배체율을 높이기 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이 배체 미꾸리는  $2n=50$ 의 염색체를 갖고 있었으며 유도된 4 배체는  $4n=100$  개의 염색체로 구성되어 있었다. 염색체 수 및 핵 형에 있어 염색체 다형 현상과 암수 간의 heteromorphic 한 성 염색체는 나타나지 않았다. 또한 유도된 미꾸리 4 배체의 세포 크기는 2 배체에 비해 약 2 배 정도 증가되는 것으로 나타나 최근 일본에서 발견된 자연산 4 배체 미꾸리와 동일하였다(Arai et al. 1991). 이 결과는 앞으로 자연산 4 배체 미꾸리의 진화 과정을 유추하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. Propidium iodide (PI) 강도를 DNA 함량으로 환산시 미꾸리 DNA 함량은 3.07 pg/cell로 기존에 보고된 3.1 pg/cell 과 유사하였다(Hinegardner and Rosen 1972 ; Park and Chung 1985). 또한 본 연구에서 유도된 4 배체 미꾸리의 세포당 DNA 함량은 거의 2 배체의 2 배로 나타나 DNA 함량 측정에 있어 그 정확도와 신속도 등을 고려할 때, flow cytometry가 배수화 판별 및 DNA 함량의 측정에 매우 유용할 것으로 사료된다.

본 연구에서 유도된 4 배체 미꾸리는 거의 기형이거나 발생 초기에 폐사하는 양상을 보였다. Chourrout 등(1986)은 생존력 있는 무지개송어 4 배체를 수정란을 수압처리하여 얻은 바 있고 Don과 Avtalion (1988)도 유도된 틸라피아 4 배체가 생존력이 있음을 보고하고 있다. 그러나 그 외 연구자들에 의해 유도된 4 배체 어류는 모두 생존력이 없거나 생존력이 있더라도 산업적으로 중요한 생식 능력이 없는 것으로 보고되고 있다. Arai 등(1991)은 일본에서 자연산 4 배체 미꾸리를 발견하여 그의 생식 능력까지도 보고한 바 있어 앞으로 미꾸리와 미꾸라지 간의 잡종 3 배체를 단순 교배에 의해 생산하기 위한 필수 조건인 생존력 있는 4 배체의 생산을 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

4 배체 미꾸리를 생산하기 위해 수정란에 여러 범위의 자극 온도와 수정 후로부터의 경과시간, 그리고 처리 시간에 따라 그 효율을 조사하였다.

4 배체 생산에 가장 효율이 좋은 조건은 수정 후 28 분에 3 분간 온도 41℃에 처리하는 것으로 나타났고, 정상 2 배체의 염색체 수가  $2n=50$ 으로 나타난 반면 4 배체의 염색체 수는  $4n=100$ 으로 확인되었다.

또한 4 배체의 적혈구의 용적은 2 배체 보다 1.65 배나 더 컸으며 4 배체와 2 배체의 DNA

함량은 각각 6.547 및 3.067 pg/cell로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Aldridge, F. J., R. Q. Marston and J. V. Shireman, 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture* 87 : 121~131.
- Arai, K., K. Matsubara and R. Suzuki, 1991. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Nippon Suisan Gakkai-shi* 57 : 2167~2172.
- Bidwell, C. A., C. L. Chrisman and G. S. Libey, 1985. Polyploidy induced by heat shock in Channel Catfish. *Aquaculture* 51 : 25~32.
- Cassani, J. R., D. R. Maloney, H. P. Allaire, and J. H. Kerby, 1990. Problems associated with tetraploid induction and survival in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture* 88 : 273~284.
- Chourrout, D., B. Chevassus, F. Krieg, A. Happe, G. Burger, and P. Renard, 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72 : 193~206.
- Don, J. and R. R. Avtalion, 1988. Production of viable tetraploid tilapias using the cold shock technique. *Bamidgeh*, 40 : 17~21.
- Hinegardner, R. and D. E. Rosen., 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.* 106 : 621~644.
- Kim, D. S., J. H. Kim and I. S. Park., 1992. Induced and multiple spawnings by human chorionic gonadotropin injection of the loach, *Misgurnus mizolepis*. *J. Aquat.* 5 : 109~115.
- Klingerman, A. D. and S. E. Bloom, 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd.. Can.* 34 : 266~269.
- Myers, J. M., K. W. Hershberger, and R. N. Iwamoto, 1986. The Induction of tetraploidy in salmonids. *J. World Aquat. Soc.* 17 : 1~7.
- Park, E. H. and C. Y. Chung, 1985. Genome and nucleic size of Korean cobitid fishes (Teleostomi : Cypriniformes). *Kor. J. Genet.* 7 : 111~118.
- Suzuki, R., T. Oshiro and T. Nakanishi, 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 48 : 45~55.
- Thorgaard, G. H., M. E. Jazwin, and A. R. Stier, 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110 : 546~528.
- Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57 : 57~64.
- 박인석, 1992. 미꾸리와 미꾸라지의 잡종 3 배체에 관한 연구. 부산수대 박사 학위 논문, 부산, pp. 1~84.