

성전환 및 염색체 공학 기법을 이용한 초수컷(Y_Y) 및 초암컷(Δ Y_Y) 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 생산*

I. 성전환된 XY 암컷으로 부터 자성발생성 이배체 유도

김동수 · 최윤희 · 노충환 · 남윤권

부산수산대학교 양식학과

Production of Supermale (Y_Y) and Superfemale (Δ Y_Y) Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Sex Reversal and Chromosome Manipulation*

I. Induction of Gynogenetic Diploid from XY Female

Dong Soo Kim, Yoon Hee Choi, Choong Hwan Noh and Yoon Kwon Nam

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

ABSTRACT

The present study was performed to produce supermales and superfemales in *Oreochromis niloticus* by combination of induced sex reversal and diploid gynogenesis.

More than 95% of female was obtained by oral administration of 17 β -estradiol (480 mg/kg diet) to the eutheroembryonic larvae of this species. The result of progeny tests with XY pseudofemales showed that incidences of male progeny were ranged from 71.4% to 73.7%. Proportion of male from XY pseudofemale was not significantly different ($P > 0.05$) from that of χ^2 (1 : 3), but it was significantly different ($P < 0.01$) from that of χ^2 (1 : 1). Gynogenetic diploids were produced by applying cold shocks 3 min after insemination to the eggs of XY pseudofemale sperms were genetically inactivated by ultraviolet rays of 4,050 erg/mm². Fertilization rates of gynogenetic diploids were not different from that of their controls, however, hatching rates and early survival rates were slightly lower than those of controls. In the cytogenetic studies, there was no difference in the size of cell and nucleus between the gynogenetic diploids and the controls. At 80 days after hatching, frequencies of gynogenetic male were higher than those of gynogenetic female ($P < 0.01$) in their population.

* 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

서 론

어류 양식에 있어 생산성 향상을 위해 우량 형질을 가진 순계 친어를 확립하는 것이 필수적이거나 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)는 중간 교배가 잘 이루어지고 잡종 개체도 생식 능력을 갖는 등 원산지에서 조차 유전적으로 순수한 종을 찾기가 힘든 실정이다(Wohlfarth and Hulata 1983).

자성발생성 이배체 유도 기법은 수컷의 유전 물질 없이 암컷의 유전 물질만으로 생존력 있는 개체를 생산해 내는 것으로 자성발생성 이배체 및 이의 F_1 은 생리학, 병리학 및 유전학적 연구에 중요한 실험 재료로 사용될 뿐만 아니라 단기간에 유전적으로 안정된 순계를 확립할 수 있어 어류 양식에 이용될 수 있다(김 등 1993a). 자성발생성 이배체 유도는 이온화 및 비이온화 방사선 조사에 의해 유전적으로 불활성화된 정자를 정상 난자와 수정시킨 후 제2극체 방출을 억제하거나 제1난할을 억제시킴으로써 유전 물질을 이배체화 시킨다. 이에 틸라피아의 자성발생성 이배체 유도에 관하여는 저온, 고온 및 수압 처리 방법을 사용하여 제2극체 방출을 억제 시키는 법(Don and Avtalion 1988; Hussain et al. 1991, 1993)과, 제1난할을 억제시키는 방법(Hussain et al. 1991, 1993)이 보고 되어 있다.

본 연구에서는 단 한번의 자성발생성 이배체 유도도 유전적으로 동일한 순계 암컷(XX) 및 초수컷 나일틸라피아(YY)를 동시에 생산하기 위해 성전환 기법으로 XY 암컷을 유도한 후, 이들 유도된 XY 암컷으로 부터 자성발생성 이배체를 유도하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 친어 유지

실험어는 일본으로 부터 도입하여 부산수산대학교 양어장에서 사육중인 체중 100~200 g의 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*를 사용하였다. 암컷과 수컷을 4 : 1의 비율로 200 ℓ 용량의 유리 수조에 수용한 후 수온을 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 반유수식으로 사육하였다. 사료로는 뱀장어 사료에 약간의 생사료를 섞어 제조한 반죽 사료 및 시판되는 잉어 펠렛 사료와 개구리밥 등을 충분히 공급하였고, 하루 1회 바닥 청소를 실시하였다.

2. 인공 수정, 부화 및 자어 사육

온도와 광량을 조절하여 난의 성숙을 유도하였으며 암컷과 수컷의 산란 행위와 충분히 돌출된 생식공 관찰을 통하여 성 성숙을 확인한 후 암컷이 자연 산란하기 직전 수조에서 꺼내어 복부 압박법으로 채란하였다. 정소를 적출하여 세절한 후 약간의 생리 식염수로 충분히 섞어 모은 정자를 습식법으로 난과 수정시켰다. 인공 부화 장치는 Rothbard와 Pruginin (1975), Rothbard와 Hulata (1980)의 Zuger-jar technique을 본 실험에 맞게 개조하여 사용하였으며 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 사육 수온을 유지하면서 수정난을 부화시켰다. 수정율은 포배기까지 생존한 개체에 대한 전체 수정난수의 백분율로 나타내었고, 부화율은 전체 수정난수에 대한 부화 개체수를 백분율로 나타내었다. 부화 자어는 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지한 170 ℓ 용량의 순환 여과식 나무 수조에 그물망을 띄워 사육하였으며 초기 생존율은 부화 후 8일째 전체 부화 개체수에 대한 생존 개체수의 백분율로 나타내었다.

3. XY 암컷 유도

3-1. 성전환 처리

성전환 처리를 위한 사료는 17 β -estradiol (Sigma USA)을 김 등(1993b)의 방법에 따라 뱀장어 사료에 섞어 제조하였으며, 이를 치어에 30일간 공급하여 성전환을 유도하였다.

3-2. XY 암컷의 자손 검정

성전환된 XY 암컷에 대한 자손 검정은 이들을 정상 수컷(XY)과 교배시켜 자손을 얻은 후 부화 80 일째에 치어들의 복부를 절개하고 생식소를 적출하여 슬라이드글라스에 압착한 후 암수를 구분하는 방법으로 실시하였다. 정상 암수 네쌍을 교배시킨 대조군에 대하여 동일한 방법으로 자손 검정을 실시하였다.

4. XY 암컷으로 부터 자성발생성 이배체 유도

4-1. 정자 불활성화

정자 DNA의 불활성화를 위한 자외선의 적정 농도를 조사하기 위해 수컷의 생식소를 적출하여 세절한 후 모아진 정액을 약간의 생리 식염수로 충분히 섞어준 다음 capillary pipet으로 상등액을 뽑아 페트리디쉬에 얇은 층으로 깔고 회전원판 위에 놓은 다음 김 등(1993a)의 방법에 따라 자외선 처리 후 수정율과 반수체 유도율을 조사하여 적정 Hertwig 효과를 나타내는 자외선 조사선량을 측정하였다. 이후 예비 실험에서 얻어진 적정 농도의 자외선을 조사하여 정자 불활성화를 유도하였다. 난은 성숙한 친어가 자연 산란을 하기 직전에 사육조에서 꺼내어 복부 압박법으로 채란하였고 준비된 정자로 인공 수정시켰다.

4-2. 제2극체 방출 억제

자외선으로 불활성화시킨 정자와 수정된 난의 제2극체 방출을 억제하기 위해 수정란을 25 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 incubation한 후에 김 등(1990)의 방법을 약간 수정하여 제2극체 방출을 억제시켰으며, 부화 80 일째에 상기 3-2의 방법과 동일한 방법으로 성비를 분석하여 대조군의 성비와 비교하였다.

4-3. 자성발생성 이배체 판별

자성발생성 이배체 판별을 위해 대조군과 실험군을 대상으로 세포 크기를 조사하였다. 실험어 미병부의 미부정맥으로 부터 혈액을 채취하여 슬라이드글라스에 도말하고 99.5%의 에탄올로 충분히 고정한 후 May-Grünbaldt Giemsa 또는 Giemsa 용액으로 염색하였다. 각 개체당 12개씩의 적혈구를 측정하였으며, 적혈구 세포와 핵의 장경 및 단경을 광학 현미경($\times 1,000$)하에서 micrometer로 측정하였다. 표면적은 장경(a) \times 단경(b) $\times\pi/4$ (Sezaki and Kobayashi 1978), 부피는 4(a/2) \times (b/2) $^2\times\pi/3$ (Leimon and Smith 1980)의 공식에 준해 계산하였다.

5. 통계 분석

성전환 처리군 및 자성발생성 이배체 자손들의 성비에 대하여 χ^2 -test를 실시하였다.

결 과

1. XY 암컷 유도

1-1. 성전환율

부화 후 첫먹이 시기부터 30일간 17 β -estradiol을 반죽 사료에 섞어 경구 투여하여 암컷으로 성전환을 유도한 반복 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. 첫번째 실험은 한쌍의 친어로 부터 나온 자어들을 대상으로 성전환을 유도한 결과로서 분석한 84마리가 모두 암컷으로 100% 유도율을 보였고, 두번째 실험은 실제 양어장에서 대량 처리한 결과로 95%의 암컷 유도율을 나타내었다. 대조군의 성비는 예상 성비인 1:1로 나타났으며, 모든 실험군에서 intersex는 관찰되지 않았다.

Table 1. Sex ratios in control and feminized populations of *Oreochromis niloticus*

	No. of fish sexed	No. of males	No. of females	Percent female
Control	80	42	38	47.5 ^a
Exp.-1	84	0	84	100.0 ^b
Exp.-2	20	1	19	95.0 ^b

^a. not significant ($P > 0.01$) against χ^2 (1:1).

^b. highly significant ($P < 0.01$) against χ^2 (1:1).

1-2. XY 암컷의 자손검정

대조군으로서 정상 암컷 및 수컷 네쌍을 교배하여 얻은 자손 검정 결과를 Table 2에 나타내었다. 네번의 교배 결과 이들의 수컷율은 각각 51.2%, 52.8%, 55.6%, 52.3%로 네번의 결과를 종합하면 207마리 중 암컷이 98마리, 수컷이 109마리로 수컷율이 52.7%로 나타나 예상 성비 1:1에 대해 유의한 차이는 없었다($P < 0.01$).

Table 2. Progeny test of control fish, *Oreochromis niloticus*

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Total
No. of samples	82	36	45	44	207
No. of females	40	17	20	21	98
No. of males	42	19	25	23	109
Percent male	51.2	52.8	55.6	52.3	52.7
$\chi^2(1:1)$	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
$\chi^2(1:3)$	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

성전환된 암컷 XY-1을 2마리의 다른 수컷과 교배하여 얻은 자손 검정 결과는 Table 3에 나타내었다. 두번의 교배 결과 수컷율은 각각 72.6%, 70.7%로 평균 수컷율이 71.4%였으며 XX 유전자형 가지는 암컷을 친어로 사용했을 경우 예상되는 성비인 1:1에 대해서는 유의하였으나($P < 0.01$) XY 암컷을 친어로 사용했을 경우 예상되는 성비인 1:3에 대해서는 유의차가 없는 것으로 나타나 암컷 1의 성 유전자형이 XY임을 알 수 있었다.

성전환된 암컷 XY-2를 대상으로 3마리의 서로 다른 수컷과 교배하여 얻은 자손 검정 결과를 Table

성전환 및 염색체 공학 기법을 이용한 초수컷(YY) 및 초암컷(Δ YY) 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 생산

4에 나타내었다. 첫번째 및 두번째 교배 결과 각각의 수컷율은 70.9% 및 70.2%로 1:1 성비에 대한 χ^2 test 결과 $P < 0.01$ 수준에서 유의하였으나 1:3 성비에 대해서는 $P > 0.05$ 수준에서 유의차가 없었다. 세번째 교배 결과에서는 분석된 11마리 중 수컷이 10마리로 수컷율이 90.9%였고 각각의 경우 예상되는 성비인 1:1 및 1:3 대해 모두 유의한 것으로 나타났다($P < 0.01$). 그러나 세번의 교배를 합친 결과에서는 평균 수컷율이 71.9%로 1:1 성비에 대해서 $P < 0.01$ 수준에서 유의차가 있었으나 1:3 성비에 대해서는 유의차가 없어($P > 0.05$) 암컷 2의 성 유전자형 역시 XY임을 알 수 있었다.

Table 3. Progeny test of pseudofemale (XY-1), *Oreochromis niloticus*

	Control	Mating number		
		Exp. 1	Exp. 2	Total
No. of samples	80	62	92	154
No. of females	42	17	27	44
No. of males	38	45	65	110
Percent male	47.5	72.6	70.7	71.4
$\chi^2(1:1)$	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01
$\chi^2(1:3)$	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Table 4. Progeny test of pseudofemale (XY-2), *Oreochromis niloticus*

	Control	Mating number			Total
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
No. of samples	80	127	47	11	185
No. of females	42	37	14	1	52
No. of males	38	90	33	10	133
Percent male	47.5	70.9	70.2	90.9	71.9
$\chi^2(1:1)$	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
$\chi^2(1:3)$	< 0.01	> 0.05	> 0.05	< 0.01	> 0.05

성전환된 암컷 XY-3 및 XY-4 두마리에 대하여 정상 수컷과 교배하여 얻은 자손들의 성비를 검정한 결과는 Table 5에 나타내었다. XY-3 및 XY-4의 수컷율은 각각 73.7%, 72.7%로 나타났다. 두 개체 모두 1:1 성비에 대해 $P < 0.01$ 수준에서 매우 유의하게 나타났으며 1:3 성비에 대해서는 $P > 0.05$ 수준에서 유의차가 없어 암컷 3 및 4 또한 XY 유전자형을 가지는 성전환된 암컷임을 알 수 있었다.

Table 5. Progeny test of pseudofemales (XY-3 and XY-4), *Oreochromis niloticus*

	No. of size	No. of females	No. of males	Percent male
Control	80	42	38	47.5 ^a
XY-3	38	10	28	73.7 ^b
XY-4	22	6	16	72.7 ^b

^a not significant ($P > 0.05$) against $\chi^2(1:1)$.

^b highly significant ($P < 0.01$) against $\chi^2(1:1)$ and not significant ($P > 0.05$) against $\chi^2(1:3)$.

2. XY 암컷으로 부터 자성발생성 이배체 유도

2-1. 정자 불활성화

나일틸라피야, *O. niloticus* 정자의 DNA를 불활성화 시키기 위해 90 erg/mm² sec의 자외선을 0~60 초 동안 15초 간격으로 조사한 결과 수정률은 99.4%, 98.2%, 98.6% 및 95.9%로 대조군의 100%와 유의한 차이가 없었으나 부화율은 15초 처리군에서 22.1%로 대조군 86.3% 보다 낮게 나타났으며 30초 처리군에서는 부화율이 22.1%에서 6.3%로 급격히 떨어지고 반수체 유도율은 41.2%에서 100%로 증가하였다. 4,050 erg/mm²의 자외선을 조사한 실험군에서는 부화율이 11.6%로 나타났고 100% 반수체 유도율을 보였다. 5,400 erg/mm²에서는 부화율 8.4% 그리고 반수체 유도율 91.7%로 나타났다. 대조군에서는 수정률과 부화율 모두 정상적이었고 반수체는 유도되지 않았다. 이상의 결과 본 실험에서는 *O. niloticus* 정자의 DNA 불활성화를 위한 적정 자외선 처리선량은 4,050 erg/mm²인 것으로 나타났다(Table 6).

Table 6. Effects of UV irradiation for inactivation of spermatozoan DNA of *Oreochromis niloticus* on fertilization, hatching and haploidy

Dose (erg/mm ²)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Haploidy (%)
0	100.0	86.3	0
1,350	99.4	22.1	41.2
2,700	98.2	6.3	100.0
4,050	98.6	11.6	100.0
5,400	95.9	8.4	91.7

2-2 제2극체 방출억제

2마리의 XY 유전자형을 가지는 성전환 암컷 3 및 4로 부터 얻은 난에 UV로 불활성화된 정자를 수정시킨 후 저온 처리를 하여 제2극체 방출을 억제시킨 결과 수정율은 각각 94.8% 및 88.5%로 대조군과 차이가 없었으나 부화율은 32.1%로 대조군에 비해 매우 낮게 나타났으며 초기 생존율 또한 66.7%, 및 36.8%로 대조군에 비해 낮게 나타났다(Table 7).

Table 7. Effects of cold shock for gynogenetic diploid induction on fertilization, hatching and early survival rates of *Oreochromis niloticus*

	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Early survival rate (%) ^a
Control	88.4	78.4	72.6
Exp. 1 (XY-3)	94.8	32.1	66.7
Exp. 2 (XY-4)	88.5	*	36.8

^a up to 8 days after hatching.

* data were not checked.

2-3 자성발생성 이배체의 세포 크기

XY 암컷으로 부터 유도된 자성발생성 이배체의 분석을 위하여 어체의 미부정맥으로 부터 채혈한 적혈구 세포 및 핵의 크기 측정 결과, 대조군 세포의 장경, 단경, 표면적 및 부피는 각각 10.0±0.1 μm, 7.1±0.2 μm, 54.7±0.8 μm², 254.3±7.6 μm³이며 핵의 장경, 단경, 표면적 및 부피는 4.8±0.2 μm, 2.9±0.1

성전환 및 염색체 공학 기법을 이용한 초수컷(YY) 및 초암컷(Δ YY) 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 생산

μm , $11.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$, $21.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^3$ 이었다. 자성발생성 이배체 세포의 장경, 단경, 표면적 및 부피는 $10.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $6.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $55.9 \pm 4.5 \mu\text{m}^2$, $258.7 \pm 34.4 \mu\text{m}^3$, 그리고 핵의 장경, 단경, 표면적 및 부피는 $4.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $2.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $11.1 \pm 0.4 \mu\text{m}^2$, $21.7 \pm 1.3 \mu\text{m}^3$ 로 정상 이배체와 자성발생성 이배체 사이에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 성에 따른 차이 역시 관찰되지 않아 적혈구 크기에 있어서 자성발생성 이배체는 정상 이배체와 동일한 것으로 나타났다(Table 8).

Table 8. Comparison of erythrocyte size of control and gynogenetic diploid, *Oreochromis niloticus***

	Control	Gyno-2n	Ratio of gyno-2n/con.
Cell [†]			
Major axis (μm)	10.0 ± 0.1^a	10.3 ± 0.3^a	1.03
Minor axis (μm)	7.1 ± 0.2^a	6.9 ± 0.4^a	0.97
Surface area (μm^2)	54.7 ± 0.8^a	55.9 ± 4.5^a	1.02
Volume area (μm^3)	254.3 ± 7.6^a	258.7 ± 34.4^a	1.02
Nucleus [†]			
Major axis (μm)	4.8 ± 0.2^a	4.9 ± 0.1^a	1.02
Minor axis (μm)	2.9 ± 0.1^a	2.9 ± 0.1^a	1.00
Surface area (μm^2)	11.1 ± 0.2^a	11.1 ± 0.4^a	1.00
Volume area (μm^3)	21.5 ± 0.6^a	21.7 ± 1.3^a	1.01

* values are means \pm SD.

** maternal parent's genotype is XY.

[†] significant at $P > 0.05$.

2-4 자성발생성 이배체의 성비 분석

2마리의 XY 유전자형을 가지는 성전환된 암컷 3 및 4로 부터 유도된 자성발생성 이배체의 성비를 분석한 결과는 Table 9에 나타내었다. XY-3의 자성발생성 이배체는 수컷율이 86.8%로 예상되는 1:1 성비에 대해 $P < 0.01$ 수준에서 매우 유의하게 나타났으나 대조군은 수컷율이 73.7%로 예상되는 1:3 성비에 대해 $P > 0.05$ 수준에서 유의차가 없는 것으로 나타났다. XY-4의 자성발생성 이배체는 수컷율이 58.8%로 예상 성비인 1:1에 대해 유의하지 않았으며, 대조군은 수컷율이 72.7%로 1:3 성비에 대해 유의차가 없는 것으로 나타났다.

Table 9. Progeny test between control and gynogenetic diploid from pseudofemale, *Oreochromis niloticus*

	Control			Gynogenetic diploid		
	Exp. 1	Exp. 2	Total	Exp. 1	Exp. 2	Total
No. of samples	38	22	60	38	17	55
No. of females	10	6	16	5	7	12
No. of males	28	16	44	33	10	43
Percent male	73.7	72.7	73.3	86.8	58.8	78.1
χ^2 (1:1)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05	< 0.01
χ^2 (1:3)	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

고 찰

어류의 성전환은 Yamamoto (1969)가 일본산 송사리에 대해 처음으로 성공한 이래 호르몬 처리에 의해 자성화 혹은 응성화 하는 다양한 기법이 보고되어 있다(Hunter and Donaldson 1983; Yamazaki 1983). 성전환 효율은 사용되는 호르몬의 종류, 농도, 처리 방법, 최초 처리 시간 및 처리 기간 등에 의해 크게 좌우되며 특히 최초 처리 시간은 성분화 시기와 밀접한 관계가 있다(Hunter and Donaldson 1983; Nakamura and Iwahashi 1982). 일반적으로 틸라피아의 성분화는 부화 후 2~6주 사이에 이루어지며(Guerrero 1982; Rothbard et al. 1983), 그 중 나일틸라피아(*O. niloticus*)의 경우 15~20 일째에 성분화가 이루어지는 것으로 보고된 바 있다(김 등 1988). 본 종의 경우 암컷으로의 성전환은 Oestron을 100~200 ppm의 농도로 사용하여 70%의 암컷 유도율(Tayamen and Shelton 1978), diethylstilbestrol (DES)을 25~100 ppm의 농도로 사용하여 62%~90%의 암컷 유도율이 보고된 바 있다(Tayamen and Shelton 1978). 이렇듯 틸라피아에 있어 암컷으로의 성전환이 수컷으로의 성전환 보다 어려운 이유는 난소의 분화 시기가 정소의 분화 시기에 비해 늦기 때문인 것으로 알려져 있다(Hopkins et al. 1979; Jensen and Shelton 1979). 그러나 김 등(1993b)은 100% 암컷을 유도한 바도 있어 앞으로 틸라피아의 생리학적인 성전환에 있어 생화학적인 기작을 밝히기 위한 노력이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 김 등(1993b)의 방법에 의거하여 17 β -estradiol을 480 ppm의 농도로 경구 투여 하여 성전환을 실시한 결과 95%~100% 암컷 유도율을 보여 김 등(1993b)의 방법이 본 종의 암컷으로 성전환에 효과적이었다.

수컷이 기능적으로 성전환된 것으로 보이는 XY 암컷 네 마리(XY-1, 2, 3, 4)를 대상으로 자손 검정을 실시한 결과 수컷율이 71.4%~73.7%로 예상 성비인 1:3에 대하여 유의차가 없게 나타났다($P > 0.01$). 따라서 수컷의 유전자형을 가지는 성전환된 나일틸라피아 암컷은 정상적으로 생식 능력을 지니며 이들의 자손은 암, 수 비율이 1:3으로써 본 종의 성결정 메카니즘은 암컷 동형 접합(female homogamety)인 것으로 나타나 Scott 등(1989)의 결과와 일치하였다.

정자의 불활성화를 위해서는 이온화 및 비이온화 방사선이 이용되고 있다. 이 중 X 혹은 γ 선을 조사한 정자를 사용할 경우 배의 핵형에서 이수체가 발생하거나 부계 염색체의 잔여물이 오염되어 있는 것이 관찰된 바 있다(Chourrout and Quillet 1982; Onozato 1982; Thorgaard et al. 1985). 그러나 자외선을 조사한 경우 이러한 현상이 관찰되지 않아(Don and Avtalion 1988; Hollbecq et al. 1986; Jaylet and Ferrier 1978; Onozato 1984; Pogany 1971), 최근 어류의 정자를 불활성화 시키기 위한 수단으로 자외선이 널리 사용되고 있다. 국내에서도 이미 비이온화 방사선인 자외선을 이용하여 감성돔, 넙치 및 미꾸라지의 정자를 유전적으로 불활성화시켜 자성발생성 이배체 어류를 생산한 바 있다(김 등 1993a). 틸라피아의 자성발생성 이배체를 유도하기 위한 적정 UV 농도는 나일틸라피아에서 3,600~3,720 erg/mm² (Casayuran-Danting 1992), *O. aureus*에서 12,280~27,630 erg/mm² (Don and Avtalion 1988), *O. mossambicus*와 red tilapia에서 17,640~25,200 erg/mm² (Varadaraj 1990; Pandian and Varadaraj 1990)인 것으로 보고되어 있으며 본 연구 결과에서 나일틸라피아 정자를 불활성화 시키기 위한 적정 농도는 2,700~4,050 erg/mm²인 것으로 나타나 기존의 연구 결과와 유사하였다.

자성발생성 이배체 유도는 제2극체 방출 억제(Don and Avtalion 1988; Hussain et al. 1991, 1993; Penmann et al. 1987) 또는 제1난할 억제 방법(Hussain et al. 1991, 1993)을 이용한다. 본 연구에서 저온 처리로 제2극체 방출을 억제하여 36.8%, 66.7%의 초기 생존율을 보여 동종에 대한 Hussain 등

(1993)의 연구 결과에서 나타난 13%~24%에 비해 높게 나타나 자성발생성 이배체 유도율을 높일 수 있는 효과적인 처리 방법으로 사료된다.

XY 암컷으로 부터 유도된 자성발생성 이배체의 성비 분석 결과 XY-4의 자손들은 암컷과 수컷의 비율이 1:1.4로 χ^2 (1:1)에 대해 $P > 0.05$ 수준에서 유의차가 없었으나 XY-3의 경우 1:6.6으로 χ^2 (1:1)에 대해 $P < 0.01$ 수준에서 매우 유의하게 나타났다. 이는 기본 성결정 메카니즘(XX-XY 형) 외에 틸라피아에서 거론되고 있는 autosomal influence (Avtalion and Hammerman 1978; Hammerman and Avtalian 1979; Mair et al. 1991a, b; Wohlfarth and Wedekind 1991), polygenic 및 multifactorial 성결정 메카니즘(Lester et al. 1989; Mair et al. 1990)의 영향을 생각해 볼 수도 있으나 본 연구에서 자성발생성 이배체 암수간에 생존율이 차이가 날 가능성도 전혀 배제할 수는 없다.

앞으로 본 연구 결과 유도된 자성발생성 2배체를 대상으로 이들 자손 세대의 성장, 질병 저항성 및 여타 경제성 있는 형질에 대한 분석이 필요할 것으로 사료된다. 또한 제2세대의 자성발생성 이배체 유도율 통해 우량 유전 형질의 축적을 피해야 할 것이며, 나아가 제1난할 역제를 통한 완벽한 동형 접합성 개체를 생산하기 위해 동형 접합성 clone 틸라피아를 생산하기 위한 연구가 아울러 수행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 틸라피아의 생산성 향상을 위한 유전 육종학적 연구의 일환으로 성전환 기법과 자성발생성 이배체 유도 기법을 통해 순계의 암컷 및 수컷을 확립하고자 실시하였다.

*O. niloticus*를 대상으로 17β -estradiol을 480 ppm의 농도로 경구 투여하여 수컷을 암컷으로 성전환시킨 결과 95%~100%의 높은 성전환 유도율을 보였다. 유도된 XY 암컷 4마리를 수컷을 달리하여 자손 검정을 실시한 결과 71.4%~73.7%의 수컷 출현 빈도를 보여 χ^2 (1:1)에 대해 $P < 0.01$ 수준에서 높은 유의차를 보였으나 χ^2 (1:3)에 대해서는 $P > 0.05$ 수준에서 유의차가 없었다. 또한 이들 성전환된 XY 암컷으로 부터 유도된 난을 $4,050 \text{ erg/mm}^2$ 의 자외선으로 불활성화시킨 정자와 수정 3분 후 저온 처리하여 자성발생성 이배체를 유도했다. 자성발생성 이배체의 수정율은 대조군과 차이가 없었으나 부화율 및 초기 생존율은 대조군 보다 약간 낮았다. 부화 후 80일째 자성발생성 이배체의 성비 조사 결과 수컷이 암컷보다 출현 빈도가 높게 나타났으며($P < 0.01$), 자성발생성 이배체의 세포 및 핵의 크기는 정상 이배체와 동일하였다.

본 연구에서 유도된 자성발생성 이배체 틸라피아는 우량 형질의 순계 확보를 가능하게 함으로써 틸라피아 양식 산업의 생산성 향상을 꾀할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Avtalion, R. R. and I. S. Hammerman, 1978. Sex determination in *Sarotherodon* (Tilapia). 1. Introduction to the theory of autosomal influences. *Bamidgeh* 30: 110-115.
- Casayuran-Danting, M. J. C., 1992. Optimization of UV irradiation treatment and cryopreservation of *Oreochromis niloticus* spermatozoa for induced gynogenesis. M. S. Thesis, Stirling Univ., Stirling, U. K.

- Chourrout, D. and E. Quillet, 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout : Sex and survival of progenies, production of all triploid populations. *Theor. Appl. Genet.* 63 : 201–205.
- Don, J. A and R. R. Avtalion., 1988. Production of F₁ and F₂ diploid gynogenesis tilapias and analysis of the “Hertwig curve” obtained using ultraviolet irradiated sperm. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 253–259.
- Guerrero, R. D., 1982. Control of tilapia reproduction. In : *The Biology and Culture of Tilapias* (Pullin, R. S. V. and R. H. Lowe-McConnells, eds.). International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila pp. 309–316.
- Hammerman, I. S. and R. R. Avtalion, 1979. The sex ratio as a tool for the determination of genotype - a model of autosomal influence. *Theor. Appl. Genet.* 55 : 177–187.
- Hollebecq, M. G., D. Chourrout, G. Wohlfarth and R. Billard, 1986. Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV irradiated sperm in common carp. *Aquaculture* 54 : 69–76.
- Hopkins, K. D., W. L. Shelton and C. R. Engle, 1979. Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture* 18 : 263–268.
- Hunter, G. A. and E. M. Donaldson, 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In : *Fish Physiology Vol. IX.* (Hoar W. S., D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds.). Acad. press, New York pp. 223–303.
- Hussain, M. G., A. Chatterji, B. J. McAndrew and R. Johnstone, 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theor. Appl. Genet.* 81 : 6–12.
- Hussain M. G., D. J. Penman, B. J. McAndrew and R. Johnstone, 1993. Suppression of the first cleavage of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. - a comparison of relative effectiveness of pressure and heat shock. *Aquaculture* 111 : 263–270.
- Jaylet, A. and V. Ferrier, 1978. Experimental gynogenesis in the new species *Pleurodeles waltlii* and *P. poireti*. *Chromosoma*, Berlin 69 : 81–92.
- Jensen, G. H. and W. H. Shelton, 1979. Effects of estrogens on *Tilapia aurea* : implications for production of monosex genetic male tilapia. *Aquaculture* 16 : 233–242.
- Leimon, H. L., Jr. and L. T. Smith, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock . *Trans. Am. Fish. Soc.* 109 : 626–631.
- Lester, L. J., K. S. Lawson, T. A. Abella and M. S. Palada, 1989. Estimated heritability of sex ratio and sexual dimorphism in tilapia. *Aquacult. Fish. Manage.* 20 : 369–380.
- Mair., G. C., A. Scott, D. J. Beardmore and D. O. F. Skibinski, 1991a. Sex determination in the genus *Oreochromis*. 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). *Theor. Appl. Genet.* 82 : 144–152.
- Mair., G. C., A. Scott, D. J. Beardmore, and D. O. F. Skibinski, 1991b. Sex determination in the genus *Oreochromis*. 2. Sex reversal, hybridization, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* (L.). *Theor. Appl. Genet.* 82 : 144–152.

- Mair, G. C., J. A. Beardmore and D. O. F. Skibinski, 1990. Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species. In : Proc. 2nd Asian Fish. Forum. Tokyo, April 7-22, 1989 (Hirano, R. and I. Hanyu, eds.). Asian Fish Soc., Manila pp.555-558.
- Nakamura, M. and M. Iwahashi, 1982. Studies on the practical masculinization in *Tilapia mossambica* by the oral administration of androgen. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 : 763-769.
- Onozato, H., 1982. The "Herwig effect" and gynogenesis in chum salmon, *Oncorhynchus keta* eggs fertilized with ^{60}Co γ ray irradiated milt. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 : 1237-1244.
- Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmon eggs using hydrostatic pressure, Aquaculture 43 : 91-97.
- Pandian. T. J. and K. Varadaraj, 1990. Development of monosex female *Oreochromis mossambicus* broodstock by intergrating gynogenetic technique with endocrine sex reversal. J. Exp. Zool. 255 : 88-96.
- Penman, D. J., M. S. Shah J. A. Beardmore, and D. O. F. Skibinski, 1987. Sex ratios of gynogenetic and triploid tilapia. In : Proceeding of the World Symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture Vol.II. (Tiews, K., ed.). Bordeau pp.267-276.
- Pogany, G. C., 1971. Effect of sperm ultraviolet irradiation on the embryonic development of *Rana pipiens*. Develop. Biol. 26 : 336-345.
- Rothbard, S., E. Solnik, S. Shabbath, R. Amado, and I. Grabie, 1983. The technology of mass production of hormonally sex-reversed all male tilapias. In : Proceeding of the International Symposium on Tilapia in Aquaculture (Fishelson, L. and Z. Yaron, eds.). Tel-Aviv Univ., Tel-Aniv pp.425-434.
- Rothbard, S. and G. Hulata, 1980. Closed system incubator for cichlia eggs. Prog. Fish-cult. 42 : 203-204.
- Rothbard, S. and Y. Pruginin, 1975. Induced spawnig and artificial incubation of tilapia. Aquaculture 5 : 315-321.
- Scott, A. G., D. J. Penman, J. A. Beardmore, D. O. F. Skibinski, 1989. The "YY" supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture, Aquaculture 78 : 237-251.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi, 1978. Comparison of erythrocyte size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 44 : 851-854.
- Tayamen, M. M. and W. L. Shelton, 1978. Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). Aquaculture 14 : 349-54.
- Thorgaard, G. H., P. D. Scheerer and J. D. Parsons, 1985. Residual paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout : implications for gene transfer. Theor. Appl. Genet. 71 : 119-121.
- Varadaraj, K., 1990. Dominant red colour morphology used to detect contamination in batches of *Oreochromis mossambicus* (Peters) gynogens. Aquacult. Fish. Manage. 21 : 163-172.
- Wohlfarth, G. W. and G. Hulata, 1983. Applied genetics of tilapias. ICLARM Studies and Reviews 6. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila pp.1-25.
- Wohlfarth, G. W. and H. Wedekind, 1991. The heredity of sex determination in tilapias. Aquaculture

92 : 143-156.

Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In : Fish Physiology Vol. III. (Hoar, W. S. and D. J. Randall, eds.). Academic Press, New York pp.117-175.

Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish culture. Aquaculture 33 : 329-354.

김 동 수 · 김 종 현 · 조 재 윤 · 문 영 봉 · 조 기 채, 1993a. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 자성 발생성 이배체 유도. 한국유전학회지 15 : 179-186.

김 동 수 · 방 인 철 · 김 인 배, 1988. 나일틸라피아의 성분화와 호르몬에 의한 성전환. 한국양식학회지 1 : 53-66.

김 동 수 · 조 재 윤 · 방 인 철, 1993b. 17β -estradiol에 의한 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 성전환. 한국양식학회지 6 : 125-132.

김 동 수 · 최 경 철 · 박 인 석, 1990. 3배체 나일틸라피아 생산에 관하여. 한국양식학회지 3 : 135-144.