

가금류 정자 세포의 배수성 유기를 위한 세포 유전학적 연구

김철욱 · 손시환 · 전익수¹

진주산업대학교 국제축산개발학과

A Cytogenetic Study on Induction of Diploid Spermatozoa in Poultry

C.W. Kim, S.H. Sohn, and I.S. Jeon¹

Department of International Livestock Husbandry, Chinju National University,
Chinju, Korea 660-758

ABSTRACT

In order to produce polyploid quail, the patterns of spermatogenesis and induction of diploid spermatozoa were analyzed by administration of spindle fiber inhibitor agent, Colcemid at the dose level of 37 μg /100 g BW was injected intraperitoneally to 50 Japanese quail males for 3 consecutive days. Five to 20 days after the first colcemid injection, the metaphase spreads from mitotic spermatogonia, primary spermatocyte and secondary spermatocyte were observed. By cytogenetic analysis, 9.4% of spermatogonia and spermatocyte cells in germ cells from the treated males was found to be polyploid cells. As compared with colcemid treated, the males with non-treated colcemid had only 2.3% polyploid cells in germ cells. The induction of diploid germ cells was highest in 10 days after the first colcemid injection and was lowest in 5 days after the first colcemid injection. These results suggested that between 10 to 15 days before maturation of the spermatozoa, the male germ cells were most sensitive to colcemid treatment. Spindle fiber inhibitor agent was also more sensitive to mitotic division of spermatogonia than meiotic division of primary and secondary spermatocyte.

(Key words: Japanese quail, polyploid, spermatozoa, chromosome)

서론

가금의 능력 개량을 위한 연구가 여러 방향에서 다양하게 진행되어 왔고, 또한 지금까지 상당한 개량의 결과를 얻었다고 할 수 있다. 가금의 유전적 개량은 集團 遺傳學과 量的遺傳學(quantitative genetics)적 방법을 바탕으로 한 개량이 그 주를 이루어 왔으며, 이

러한 방법에 의하여 괄목할 만한 개량의 성과를 얻고 있다. 더불어 최근에는 세포적 차원에서 유전 물질을 직접 확인하고 조작하는 細胞 遺傳學의 발달과, 이러한 유전 물질들을 DNA의 수준에서 인위적으로 조절하고 자 하는 分子 遺傳學의 발달이 급속히 진행되어 가금의 능력 개량에 새로운 접목을 시도하고 있는 추세이다.

세포 유전학적 연구 중 배수성 증가에 관한 연구는

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

¹ 축산기술연구소(Livestock Research Institute, RDA)

식물에 있어 다배수체들이 정상 개체에 비해 높은 생산 능력을 가져올 수 있다는 것이 옥수수, 벼 등 여러 품종들에서 입증된 바 있고, 또한 이를 이용한 다배수체 생산을 위한 육종 체계도 정립되었다(Gustafson과 Qualset, 1975; Asay, 1977). 염색체 수의 배가가 유전자 작용의 배가로서 생산성과 결부된다는 결과에 따라, 동물에서도 염색체 수의 배가로 다배수성 개체의 생산이 능력의 개량과 결부될 것이라는 기대가 지금까지의 관심거리이다. 그러나 동물은 식물과 다른 생리적 특성에 따라 해결해야 할 난제들이 많아서 매우 어려운 과제로 여겨 왔지만, 최근 닭을 위시한 가금류에서는 극히 낮은 빈도이나 자연 발생적으로 3배체의 발생과 인위적으로 이의 유기가 가능하였고, 또한 이러한 개체들이 정상 2배체의 개체에 비해 다소의 생산 능력이 높다고 밝힌 바도 있다.

Bloom(1970)이 닭에 있어서 1/10,000정도의 빈도로서 자연 상태에서 3배수성 개체가 생성된다는 사실을 밝힌 이래, Miller 등(1971), Abdel-Hameed와 Shoffner(1971), Mong 등(1974) 및 Fehcheimer(1990)도 자연 발생적으로 다배수성 배자의 생성 가능성이 매우 높음을 제시하였다. 한편 Lodge와 Fehcheimer(1974), Telloni 등(1976), Wooster 등(1977), 및 Shoffner(1982)는 배자 혹은 생식 세포에 인위적으로 화학 물질이나 X-ray 등을 처리함으로써 개체 내 다양한 이상 염색체의 발현 양상을 보고하였고, Wang과 Shoffner(1980)와 Wang 등(1980,1983)은 인위적으로 개체 내에 화학 물질을 주사하여, 난자 생성 과정의 감수분열 단계를 조절하여 2배수성 난자를 유도하거나 또는 수컷 개체에 이러한 처리로서 배수성 정자 생성을 유도하여, 각 정상 개체와 수정을 시도함으로써 약 12% 정도의 다배체 생성을 확인할 수 있었다고 하였으며, 이들 3배수성 배자로부터 소수의 개체 생산도 얻는 획기적인 결과를 보고하였다. 국내에서도 여정수(1988)와 여정수 등(1989,1990)이 Rhode종 암컷을 이용하여 인위적 배수성 증가를 시도한 바, 배수성 난자를 유기할 수 있는 TM의 주입량과 주입 적기를 결정한 바 있고, 이를 정상 정자와의 수정을 통해 4수의 3배체 개체 생산에도 성공한 바 있다. 특히 이들 다배수성 개체들의 성장 효과가 정상 개체에 비해 주령에 따라 무려 21~88%나 빨랐음을 제시

하였다.

이와 같은 배수성 유기를 위한 많은 연구 결과가 보고되었음에도 불구하고 가금에 있어 배수성 증가에 따른 발생학적 양상 및 생리적 변화, 표현형적 발현 양상에 대해 밝혀진 사실이 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 가금류 중 유전적 시험에 용이하게 공시할 수 있는 일본산 메추리(Japanese quail)에 대해 다배체 유기에 따른 생식세포의 세포 유전학적 발현 양상을 고찰하고자, 우선 성숙된 수컷에 일정량의 분열 억제제를 투여하여 정자 형성 과정 중 이에 미치는 영향과 배수성 정자 세포들의 유기 양상을 분석하였다.

재료 및 방법

가금류의 정자 형성 과정 중 배수성 세포들의 유기 양상을 분석하고자 25~30주령된 일본산 메추리 수컷 50수를 공시하여 본 시험에 이용하였다. 분열 억제제 투여에 따른 배수성 정자 세포의 유기 양상을 비교·고찰하기 위하여 체중 100 g당 37 μ g의 colcemid를 3일간 연속 복강 주사하고 이후 5일째, 10일째, 15일째 및 20일째 정소 세포들의 감수분열 양상과 자연 상태에서의 정소 세포들의 분열 양상을 살펴보았다. 정소 세포들의 염색체 분석 방법은 손시환 등(1990)이 제시한 방법을 다소 수정하여 다음과 같이 실시하였다.

염색체 분석을 위한 각 개체들은 0.2% colchicine, 0.3 mL을 복강 주사한 후 2시간이 지난 다음 도살하였다. 도체로부터 양쪽 정소를 절단하고 분할한 후 내층 조직을 약 3 mm³정도 분리하여 세절하였다. 절편화된 조직을 2.2% sodium citrate용액 하에서 미세한 가위와 수술용 칼로서 잘라 으깨고 현탁화 시킨 후 약 5분간 정착시켰다. 부유된 현탁액 약 0.5 mL 정도를 8 mL의 0.7% sodium citrate용액에 첨가한 후, 고루 섞어 37℃ 배양기에 10분간 저장 처리(hypotonic)하고 이들을 10분간 1,000 rpm으로 원심분리시켰다. 원심분리 후 세포 침지물로부터 부유액은 제거하고 여기에 3:1 methanol과 acetic acid을 혼합한 고정액 5 mL로서 고정 처리(fixation)하였다. 고정된 세포 현탁액을 다시 원심분리시킨 후 동일한 방법으로 2~3회 정도 반복 고정시키고, 마지막 부유액을 제거한 후 10방울 정도의 신선한 고정액을 혼합한 후 잘 섞

고 슬라이드 상에 4~5방울 떨어뜨려 도말 건조시켰다. 자연 건조된 슬라이드를 4% Giemsa 용액으로 5분간 염색 후, 저 배율($\times 100$)로부터 고 배율($\times 1000$)로 각 정원세포들의 中期像, 제 1 정모세포들의 중기상 및 제 2 정모세포들의 중기상 양상들을 검경하고 분석하였다.

결과 및 고찰

정상 정소 세포들의 경우 정원세포들은 지속적 유사분열이 진행되어 모두 2배체(diploid)의 염색체 상태가 되어야 하고, 제1 감수분열 중기 상태에서의 제1 정모 세포들은 chiasma junction을 지닌 반수체(haploid)의 tetrad가 나타날 것이며, 제2 감수분열 중기 시에는 제2 정모세포가 반수체의 염색체 양상을 보여야만 한다. 그러므로 방추사(spindle fiber) 형성을 억제할 수 있는 물질인 alkaloid계의 colchicine이나 이의 유도 물질인 colcemid를 적량 생체 내에 처리함으로써 가축의 생리 현상에 큰 영향을 주지 않고 세포분열의 일시적 중지로 염색체 수의 배가를 유도할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 정자 형성과정 중 정원세포의 유사분열 중지 상태에서 또는 감수분열 중 염색체 수가 반감되는 제1 감수 분열 중기나 제2 감수 분열 중기 상태에서 방추사를 억제시켜, 2n 상태의 정자를 인위적으로 유기·생성하고자 하는 것이다. 이러한 정

자와 정상 난자(n)의 수정시 3배체(3n)의 생성이 가능하고, 동일한 방법으로 배수성 난자(2n)를 유기시켜 이와 수정시 4배체(4n)의 개체 생산이 가능할 것으로 사료된다(Figure 1).

Colcemid 처리에 따른 처리 시간별 정원세포의 배수성 유기 양상은 Table 1에, 제 1 정모세포들의 배수성 유기율은 Table 2에, 그리고 제 2 정모세포들의 배수성 유기 양상은 Table 3에 제시된 바와 같다. 또한 본 실험에서 유기된 배수성 염색체들과 정상 염색체들의 中期像으로 Figure 2에서는 정상 정원세포(2n)의 중기상과 4배수성(4n) 정원세포의 중기상을, Figure 3 은 제1 정모세포의 정상 n tetrad와 2n tetrad를, Figure 4 는 제2 정모세포의 정상 n 염색체의 중기상과 2n 염색체의 중기상을 나타내었다.

분석 결과 colcemid 처리에 따른 총 595개의 정소 세포 중 56개인 9.4%가 배수성 세포로 유기된 반면, colcemid를 투여하지 않은 대조구에서는 불과 2.3%만이 배수성 정소세포를 나타내어 colcemid 처리에 따른 배수성 정자의 유기 가능성을 시사하고 있다.

Colcemid 처리 후 5일째 정소에서의 배수성 유기율 양상은 분열 억제제로 인한 정자형성 과정 중 정소세포에 거의 영향이 없는 것으로 나타난 바, 이는 정원세포로 성숙되기 5일 이전의 대부분 원시 정세포들은 colcemid의 처리 영향을 거의 받지 않는 것으로 생각된다. 반면 처리 후 10일째 부터 이의 영향이 정원세포

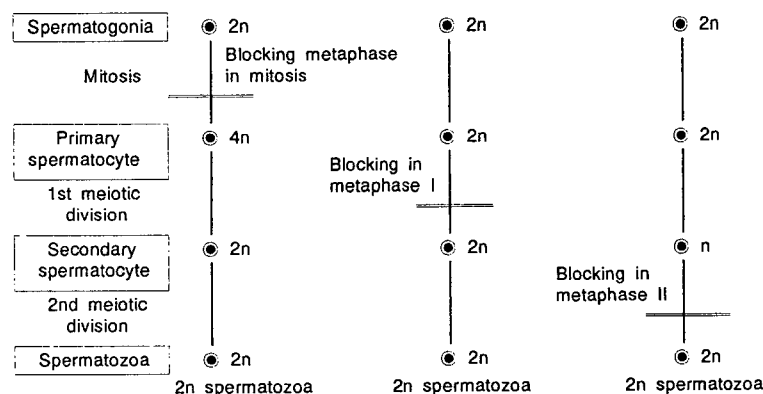


Figure 1. Diagram of production system of diploid spermatozoa in spermatocytogenesis.

Table 1. Number of mitotic metaphase spreads from spermatogonia

Karyotypes	Control(non colcemid treated)	Treated with administration of 37 g colcemid /100 g body weight				Treated total
		Chromosome prepared after				
		5 days	10 days	15 days	20 days	
n	0	0	1(1.7%)	0	0	1(0.4%)
2n(normal)	20(90.9%)	7(100%)	47(78.3%)	74(83.1%)	89(89%)	217(84.8%)
3n	0	0	0	3(3.4%)	0	3(1.2%)
4n	2(9.1%)	0	11(18.3%)	11(12.4%)	11(11%)	33(12.9%)
8n	0	0	1(1.7%)	1(1.1%)	0	2(0.8%)
Polyploid total	2(9.1%)	0	13(21.7%)	15(16.9%)	11(11%)	39(15.2%)

Table 2. Number of first meiotic metaphase spreads from primary spermatocyte

Karyotypes	Control(non colcemid treated)	Treated with administration of 37 g colcemid /100 g body weight				Treated total
		Chromosome prepared after				
		5 days	10 days	15 days	20 days	
n(normal)	56 (100%)	23 (95.8%)	56 (94.6%)	84 (97.6%)	87 (90.6%)	250 (94.3%)
2n	0	1 (4.2%)	3 (5.4%)	2 (2.4%)	9 (9.4%)	15 (5.7%)
Polyploid total	0	1 (4.2%)	3 (5.4%)	2 (2.4%)	9 (9.4%)	15 (5.7%)

Table 3. Number of second meiotic metaphase spreads from secondary spermatocyte

Karyotypes	Control(non colcemid treated)	Treated with administration of 37 g colcemid /100g body weight				Treated total
		Chromosome prepared after				
		5 days	10 days	15 days	20 days	
n(normal)	52 (98.1%)	5 (100%)	33 (94.3%)	20 (100%)	14 (100%)	72 (97.3%)
2n	1 (1.9%)	0	2 (5.7%)	0	0	2 (2.7%)
Polyploid total	1 (1.9%)	0	2 (5.7%)	0	0	2 (2.7%)

의 유사분열에서 부터 시간이 지남에 따라 제 1 정모세포의 감수 분열로 진행됨을 보여주고 있는데, 본 처리로부터 관찰된 총 154개의 정원세포 및 제1 정모세포, 제2 정모세포 중 18개가 다배수성 정자세포로 유기되어 11.7%의 유기율로 처리 중 가장 높은 유기 빈도를 나타내었다. 한편 제1 정모세포들의 2n tetrad는

처리 후 20일째 가장 높게 나타나는데, 이는 정자형성 과정 기간과 매우 일치되는 양상을 나타내는 것으로 처음 colcemid의 영향을 받는 정원세포들이 진행 기간에 따라 발현되는 결과로 볼 수 있을 것 같다.

인위적으로 가금류의 배수성을 유기하기 위한 연구로서는 Wang과 Shoffner(1980)가 난자 형성과정 중

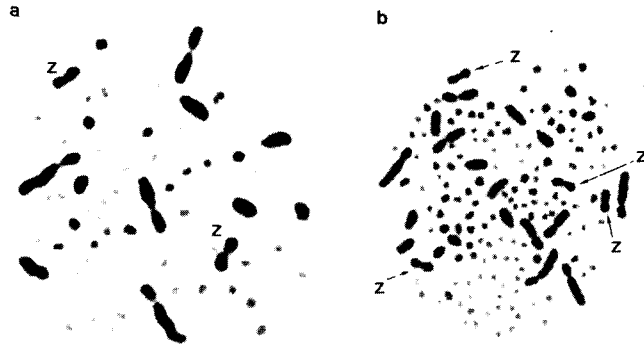


Figure 2. Metaphase spreads of a) diploid spermatogonia(2n), and b) tetraploid spermatogonia(4n) in mitosis.

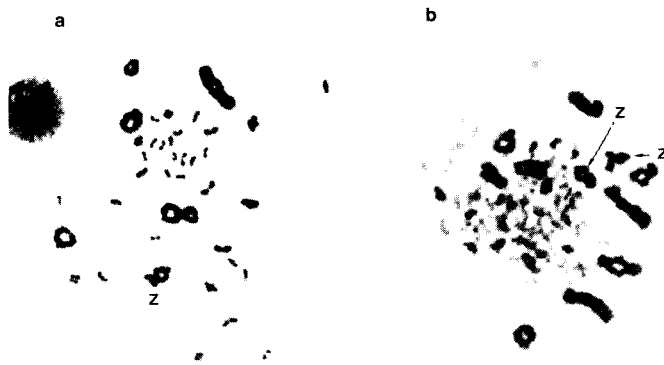


Figure 3. Metaphase spreads of a) n tetrad and b) 2n tetrad primary spermatocyte.



Figure 4. Metaphase spreads of a) haploid(n) and b) diploid(2n) secondary spermatocyte.

적절한 배란시각의 인지와 colcemid의 투여로서 수정란 대비 5.8%의 3배수성 수정란을 유기한 바 있고, 또한 90개의 처리된 수정란 중 5개가 3배수성 개체로 발생된 획기적 결과를 도출한 바 있다. 이후 국내에서도 여정수 등(1990)이 Rhode종 암컷을 이용하여 배란 4시간 전에 적절한 양의 TM처리로서 264개의 수정란 중 4마리의 3배수성 개체(3A+ZZW)생산에 성공하였고, 이들 개체에 대한 생산 능력을 분석·발표하였다. 그러나 수컷에 대한 배수성 유기를 위한 연구들은 상대적으로 많지 않은 실정이고, 특히 본 연구에서의 같은 정자 형성과정 중 각 형성 단계별 세포들의 유기양상 고찰은 거의 시도되지 않은 것으로 알고 있다. 본 시험과 대비할 수 있는 최적의 연구결과로서는 Wang 등(1980)이 닭에 있어 정자세포의 배수성을 유기하고자, 본 실험과 동일한 처리 방법으로 연속 3일간 체중 1 kg당 0.37 mg colcemid를 투여하고, 처리 후 일정 기간별로 이들 개체로부터 정액을 채취하여 flow microfluorometric analysis를 통해 DNA함량을 조사하여 배수성 유기 유무를 검증한 발표이다. 이들의 분석 결과 처리 후 10~12일째 채취 정액 중 14~25%가 2 배수성(2n) DNA함량을 지니는 것으로 유기양상을 보고하고, 반면 처리 후 5~9일째는 전혀 2 배수성 DNA의 검출이 되지 않으므로 분열 억제제로 인한 2 배수성 정자세포의 형성은 최소 정모세포로 형성되기 10일 이전의 원시 정세포가 주로 민감하게 영향받음을 시사하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 분석된 세포 유전학적 결과와 매우 일치되는 양상으로서 colcemid처리 후 10일째의 배수성 정자세포 유기율인 11.7%와 거의 유사한 경향을 나타내고, 처리 후 5일째의 매우 낮은 유기율과 상응하는 결과이다.

이상의 결과로서 가금류에 있어 분열 억제제 투여에 의한 정자 세포의 배수성 유기는 정자 형성과정 개시 최소 10~15일 이전의 원시 정세포에 주로 이의 영향이 미치는 것으로 나타나고, 특히 제 1, 2 감수 분열 중의 방추사의 억제로 인한 배수성의 유기보다는 정원세포들의 유사분열 중 방추사 형성의 억제에 보다 민감하게 작용하여 배수성 정모세포를 형성하는 것으로 생각된다. 2배수성으로 유기된 정자세포가 정상 난자(n)와 수정될 때 이론적으로 3배체의 생성이 가능하고, 아울러 동일한 방법으로 유기된 이배수성 난자

(2n)와의 수정될 때 4배체(4n)의 생성이 가능하다. 본 시험에서 유기된 정원세포나 제1 정모세포 또는 제2 정모세포가 정상적 정자완성과정(spermiogenesis)을 거쳐 정자로서의 수정 능력을 보유할 수 있을지에 대한 검증이 우선적으로 선행되어야 하겠고, 이후 수정란의 정상 발육과 개체로서의 발생 여부가 또 다른 어려운 과제로 생각된다.

적 요

본 연구는 일본산 메추리(Japanese quail)에 대해 다배체의 유기를 목적으로 성숙된 수컷에 일정량의 분열 억제제를 투여하여, 정자 형성과정 중 이에 미치는 영향과 배수성 정자 세포들의 유기 양상을 분석하고자 하였다. 시험은 25~30주령된 메추리 수컷 50수를 공시하고 체중 100 g당 37 g의 colcemid를 3일간 연속 복강 주사한 후 5일째, 10일째, 15일째 및 20일째 정소 세포들의 감수분열 양상을 살펴보고자 각 정원세포들의 中期像, 제 1 정모세포들의 중기상 및 제2 정모세포들의 중기상의 양상들을 분석하였다.

분석 결과 colcemid 처리에 따른 전체 정소 세포 중 9.4%가 배수성 세포로 유기된 반면, colcemid를 투여하지 않은 대조구에서는 2.3%만이 배수성 정소 세포를 나타내어 colcemid 처리에 따른 배수성 정자의 유기 가능성을 시사하고 있다. Colcemid 처리 후 10일째 11.7%의 다배수성 정자세포 유기율을 나타내어 처리 중 가장 높은 유기율을 보인 반면, 정원세포로 성숙되기 5일 이전의 대부분 원시 정세포들은 colcemid의 처리 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 가금류에 있어 분열 억제제 투여에 의한 정자 세포의 배수성 유기는 정자 형성과정 개시 최소 10~15일 이전의 원시 정세포에 주로 이의 영향이 미치는 것으로 나타나고, 제1, 2 감수 분열 중의 방추사의 억제로 인한 배수성의 유기보다는 정원세포들의 유사분열 중 방추사 형성의 억제에 보다 민감하게 작용하여 배수성 정모세포를 형성하는 것으로 생각된다.

(색인 : 메추리, 배수체, 정자세포, 염색체)

인용문헌

- Abdel-Hameed F, Shoffner RN 1971 Intersexes and sex determination in chickens. *Science* 172:962-964.
- Asay KH 1977 Forage and range program. Logan, Utah. 24th Grass Breed. Work Plann. Conf, Tifton, Georgia
- Bloom SE 1970 Trisomy-3,4 and triploidy(3A+ZZW) in chicken embryos. *Science* 170:457-458
- Fechheimer NS 1990 Chromosomes of chickens. *Adv in Vet Sci & Comp Med* 34:169-207.
- Gustafson JP, Qualset CO 1975 Genetics and breeding of 42-chromosome triticales. *Crop Sci* 15:810-813.
- Lodge JR, Ax RL, Fechheimer NS 1974 Chromosomes aberrations in embryos from *in vivo* aged chicken sperm. *Poultry Sci* 53:1816-1819.
- Miller RC, Fechheimer NS, Jaap RC 1971 Chromosomes abnormality in 16~18 hour chick embryos. *Cytogenetics* 10:121-136.
- Mong SJ, Snyder MO, Fechheimer NS, Jaap RG 1974 The origin on triploidy in chick embryos. *Can J Genet Cytol* 16:317-322.
- Shoffner RN 1982 Chromosome variants in birds. *Bionature* 2:1-13.
- Telloni RV, Jaap RG, Fechheimer NS 1976 Cytogenetic and phenotypic effects of a chromosomal rearrangement involving the Z-chromosomal and a micro-chromosome in the chicken. *Poultry Sci* 55:1886-1896.
- Wang N, Shoffner RN 1980 Induction of heteroploidy in *Gallus domesticus*. *Mutation Res* 69:263-273.
- Wang N, Shoffner RN, Otis JS, Kimbery M 1983 The induction of chromosomal structural changes in male chickens by the alkylating agents triethylene melamine and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res* 96:53-66.
- Wang N, Sheppard JR, Wang T, Shoffner RN 1980 The induction and detection of diploid spermatozoa in *Gallus domesticus*. *Mutation Res* 73:279-290.
- Wooster WE, Fechheimer NS, Jeep RG 1977 Structural rearrangement of chromosomes in the domestic chicken: experimental production by X-irradiation of spermatozoa. *Can J Genet Cytol* 19:437-446.
- 손시환, 이경희, Fechheimer NS 1990 일본산 메추리의 핵형연구. *한국가금학회지* 17:269-274.
- 여정수 1988 닭에서 2배수성 난자의 생성에 관한 연구. *한국가금학회지* 15:67-71.
- 여정수, 정선부, 오봉국, 정일정 1989 염색체의 배수성 증가에 의한 닭의 신품종 개발 1. 다 배수성 배아의 생산. *한국축산학회지* 31:309-313.
- 여정수, 정선부, 오봉국, 정경진 1990 염색체의 배수성 증가에 의한 닭의 신품종 개발 2. 다 배수성 개체의 생산. *한국축산학회지* 32:567-572.