

- 단 보 -

체세포분열 억제성 자성발생 2배체 메기, *Silurus asotus* 유도

임재현 · 방인철¹⁾ · 노충환²⁾ · 박인석*

군산대학교 해양생명과학부 · ¹⁾순천향대학교 해양생명공학과,
²⁾한국해양연구원 자원연구본부

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

Jae-Hyun Im, In-Chul Bang¹⁾, Choong-Hwan Noh²⁾ and In-Seok Park*

Faculty of Marine Life Science, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

¹⁾Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

²⁾Marine Resources Laboratory, Korean Ocean Research & Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Ansan 425-600, Korea

Mitotic gynogenesis was induced in the far eastern catfish, *Silurus asotus* using UV-irradiated heterospecific sperm and cold shock treatment. Eggs were activated with the sperm of mud loach, *Misgurnus mizolepis* which had been irradiated with UV at dose of 9,000 ergs/mm². To determine the optimum duration required to prevent the first cleavage, a cold shock at 4°C with duration of 20, 30 or 40 min was applied to the eggs 50 min after activation. To induce diploidization of mitogenesis, the most effective protocol was to apply cold shock to 50-min old (after activation) eggs at 4°C for 30 min.

Key words: *Silurus asotus*, Mitotic gynogenetic diploid, UV-irradiated, Heterospecific sperm, Cold shock

서 론

어류 양식산업에 있어 유전육종(genetics and breeding) 기법중 하나인 염색체공학(chromosome engineering)의 적용은, 단기간에 적은 비용으로 양식 생산고 향상의 극대화를 기할 수 있는 한 방편이다(Thorgaard and Allen, 1987). 자성발생은 정자 불활성에 의한 모계 유전자만으로 발생이 이루어지는 염색체공학 기법으로서 자성발생 대상 어류의 성결정 기작이 암컷 동형접합성(female homogamety)인 경우 전암컷 단성 집단을 생산 할 수 있으며 단기간 내에 우수한 품종의 순계 획득과 유전적으로 동일한 clone 집단을 만들 수 있다(Thorgaard and Allen, 1987; 정 등, 1996). 본 연구는 현재까지 메기류에 있어서

자성발생에 관한 연구가 *Ictalurus punctatus*, *Rhamdia sapo* 및 *Clarias gariepinus*에서만 보고되고(Volckaert et al., 1994) 본 연구에 사용한 메기, *Silurus asotus*에 대한 보고는 아직까지 전무한 실정임을 고려, 타 종 정자 사용에 의한 메기 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체의 유도 조건을 검토하였다.

타종의 정자를 사용한 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체 메기를 생산하기 위하여, 임(1999)에 의해 잡종 형성이 이루어지지 않음이 구명된 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 수컷을 사용하였다. 실험에 사용된 천어로는 전라북도 정읍에 위치한 호남내수면어업 영농조합의 노지에서 사육 중인 성숙 메기를 사용하였으며, 본 실험에 사용된 메기 천어의 평균 전장 및 평균 체중은 각각 34.0±1.5 cm,

*Corresponding author : ispark@hanara.kmaritime.ac.kr

272.2±4.3 g이었다. 미꾸라지 수컷은 충청남도 서천에 위치한 서천담수어 수집소에서 성숙 개체들을 구입하여 사용하였으며, 이들의 평균 전장 및 평균 체중은 각각 12.0±0.3 cm, 8.9±0.4 g 이었다. 본 연구 수행시의 사육 수온은 24±0.5℃를 유지하였다.

성숙한 메기 암컷과 성숙 미꾸라지 수컷을 군산대학교 해양생명과학부 유전육종학 사육실로 운반하여 순환여과 사육조에서 안정 및 순치 시킨 후 인공 산란을 유도하였다. 성숙한 메기 암컷 1 마리와 성숙한 메기 수컷과 성숙한 미꾸라지 수컷 각 3 마리씩을 pooling하여 사용하였다. 인공산란 유도를 위해 human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma, USA)와 lutenizing hormone releasing hormone analogue (LHRHa), des-Gly¹⁰ [D-Ala⁶] LHRH-Ethyl-amide (Sigma, USA)를 복강 주사하였으며, 이때 성숙 메기 암컷에는 2,000IU hCG/kg body weight (BW)와 50 µg LHRHa/kg-BW를 병행 처리하였다. 암컷에 있어서 최적의 배란 시간을 알기 위하여, 산란 유도 호르몬주사 후 12시간부터 2시간 간격으로 김 등(1988)의 방법에 따라 100 ppm의 염산리도카인/1,000ppm NaHCO₃로 마취 후 가벼운 복부 압박으로 채란 가능 여부를 조사하여 확인하였다. 메기 수컷과 미꾸라지 수컷의 인공 배정 방법은 메기 암컷에서 수행된 산란 유도 호르몬에 의한 방법과 동일하게 하였으며, 단지 처리 산란 유도 호르몬의 농도만을 각각 ½ 농도로 하였다.

메기 암컷의 채란은 친어를 마취시킨 후 생식공 부위를 거저로 잘 닦아낸 후 채란하였다. 미꾸라지 수컷의 정액 사용 시점은 메기 암컷에서 최적의 성숙난을 얻을 수 있는 시간으로 정하였으며, 친어의 복부를 절개하여 성숙 정소를 적출한 후 50 ml 용량의 비커에 옮겨 안과용 꼭자가위로 세절하여 정액을 수집하였다. 세절한 정액은 Dulbecco's phosphate buffered saline (Difco, USA)으로 1:40 배율로 희석하였다. 희석된 미꾸라지 정자는 임(1999)의 방법에 따라, 정자 불활성에 가장 효과적인 조사 농도인 9,000 erg/mm²로 조사하였다. 불활성화된 미꾸라지 정자를 채란된 메기 난에 수정하였으며, 수정 후 사육수로 세란하여 각 petridish에 약 100개의 메기 수정난을 부착시켰다. 최초 수정 시점은 난의 세정을 위해 24±0.5℃의 사육수를 첨가하는 시간으로 정하였다. 이후, 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체를 유도하기 위하여, 수정 후 수온 24±0.5℃에서 발생중인 수정난을 수정 후 50분에 4℃로 20분, 30분, 40분간 저온 처리하였으며 대조군은 무처리 하였다.

처리가 종료된 수정난은 다시 정상 사육수인 수온 24±0.5℃로 유지되는 지하수 유수 항온수조에 옮겨 부화시까지 사육하였다.

체세포분열 억제성 자성발생 2배체의 각 처리 조건별 초기 생존율을 조사하였다. 초기 생존율 측정 항목은 생존율, 부화율 및 기형률로, 생존율은 수정 후 27시간에서의 생존율=(생존 난 수/실험 시작시 처리 난 수)×100로, 부화율은 수정 후 27시간에서부터 부화시까지의 부화율=(부화된 개체 수/수정 후 27시간에서의 생존 난 수)×100로, 그리고 기형률은 기형률=(부화직후 기형 개체/총 부화 개체 수)×100 으로 계산하였다. 각 처리 조건별 나타난 초기 생존율 측정 항목을 고려하여 가장 적절한 처리 조건을 파악하였으며, 파악된 처리 조건으로 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체를 대량 생산하였다. 2번에 걸친 실험을 실시하였으며, 관련 결과들을 평균하였다. 본 실험에서 나타난 결과의 통계 처리는 컴퓨터 통계처리 프로그램인 minitab과 SPSS를 사용하여 각 실험 결과의 유의성 검증을 실시하였다.

불활성화된 미꾸라지 정자에 의한 체세포분열 억제성 자성발생 2배체 유도를 위해 수정 후 50분에 각각 20분, 30분, 40분간 4℃로 저온 처리한 결과는 Fig. 1과 같다. 수정 후 27시간에서의 생존율은 대조군이 91.4%, 20분간 저온 처리군이 25.2%, 30분간 저온 처리군이 16.7% 그리고 40분간 저온 처리군이 3.6%이어서 저온 처리시간이 길어 질수록 낮은 생존율을 보였다(P<0.05). 수정 후 50분에 20분간 저온 처리군과 40분간 저온 처리군에서는 생존 개체가 없는 반면, 수정 후 50분에 30분간 저온 처리시의 부화율과 기형률은 각각 15.8%, 61.5% 이었으며 이때 대조군의 부화율과 기형률은 각각 78.1%, 4.5% 이었다. 이상의 결과를 고려시 본 실험 조건하에서 체세포분열 억제성 자성발생 2배체의 효과적인 유도 조건은 부화시까지 높은 생존율을 보인 수정 후 50분에 4℃로 30분간 처리로 파악된다. 제 1 난할을 억제키 위해 효과적인 조건으로 파악된 본 실험의 수정 후 50분에 4℃ 저온으로 30분간 처리 조건은, 박과 임(2000)이 메기 수정난을 대상으로 본 연구에서 사용된 부화 조건 수온과 동일한 24℃하에서 최초 난할 시간 50분 그리고 18.5±1.2분의 체세포 분열주기 조사 결과와 비교시, 자성발생성 반수체 유전자를 배가하기 위한 적정 처리시간이었음이 판명되었다. 그러나 본 실험보다 더욱 높은 율의 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체를 생산하기 위해서는 처리 강도 즉, 저온 처리 조건인 수온

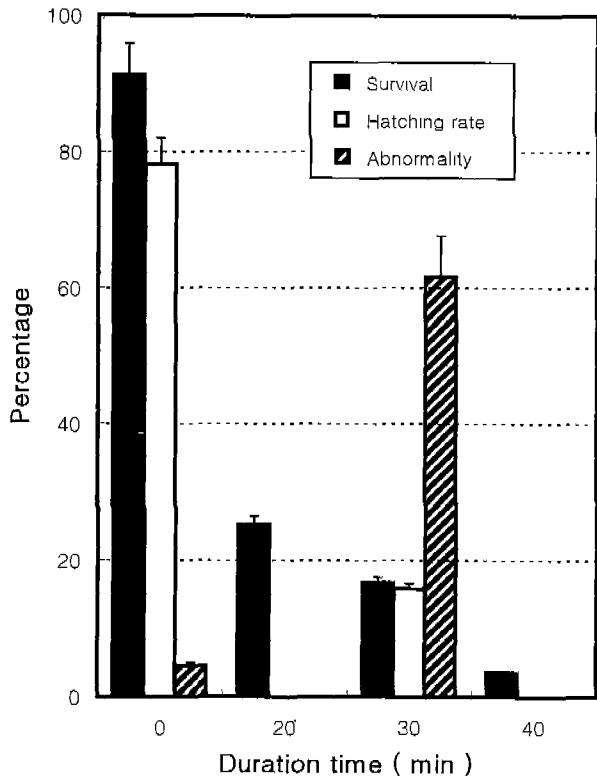


Fig. 1. Effect of cold shock of 4°C applied at 50-min old (post-activation) eggs for a duration of 20, 30 or 40 min on survival, hatching and abnormality of mitotic gynogenetic diploid catfish, *S. asotus*. Hatching success, and survival and abnormality of the gynogens at 27 hours (post-activation) are indicated.

을 달리하여 그 효과를 조사함이 필요하리라 사료된다.

최근에는 자성발생 유도시 정자 불활성화가 완전하지 못함에 기인된 정상 2 배체의 출현 가능성을 배제하기 위해서, 본 연구에서 사용한 방법과 같은 타종의 정자를 사용한 자성발생 2배체가 미꾸리 *Misgurnus anguillicaudatus*, 미꾸라지 *M. mizolepis*, 참돔 *Pagrus major*, *Gnathopogon caurulescens*, 넙치 *Paralichthys olivaceus*, 메기 *Clarias macrocephalus*, sole *Solea solea* 및 paddlefish *Polyodon spathula*에서 유도된 바 있다(Mims et al., 1997; Fujioka, 1998; Nam et al., 1999). 비록 본 연구에서 유도된 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체가 낮은 부화율과 높은 기형률을 나타내었으나, 이들의 근친 교배시 2 세대의 짧은 세대 교번을 통해서 완전한 동형접합성 계통이 이루어짐과 이들을 이용한 유전적 clone을 생산할 수 있다는 점을 고려하여 그 의의성이 크다고 할 수 있다.

앞으로 본 연구 결과 생산되어진 체세포분열 억제성 자

성발생 2 배체 메기를 대상으로 한 순계 설정 및 clone 형성을 위하여 DNA fingerprint에 의한 검정을 수행하여야 하며, 아울러 자성발생 2 배체 개체들이 생식 능력을 보인다는 김 등(1994)의 보고를 고려시 차후, 본 연구에서 생산되어진 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체 개체들의 생식 능력에 관한 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 메기에 있어서 암컷 동형접합성(임, 1999)에 기인된 체세포분열 억제성 자성발생 전암컷 개체들을 대상으로 한 대조군과의 성장 비교가 필요하며, 전암컷이 자연 집단보다 성장이 우수할 경우 체세포분열 억제성 자성발생 2 배체는 현재 메기 총 생산량을 좌우하고 있는 메기 양식산업(해양수산부, 1999)에서 가장 문제시 되고있는 암·수간의 성장 불균형에 기인된 문제점들을 해결하기 위한 방안이 될 것이라 사료되어 진다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 한국학술진흥재단 협동연구과제(과제번호 KRF-2000-044-H00002) 지원에 의해 수행되었음. 본 논문을 면밀히 검토, 수정하여 주신 익명의 심사자들에게 감사드립니다.

참고 문헌

- Fujioka, Y., 1998. Survival, growth and sex ratios of gynogenetic diploid honmoroko. *J. Fish Biol.*, 52 : 430-442.
- Mims, S. D., W. L. Shelton, O. Linhart and C. Wang, 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *J. World Aquat. Soc.*, 28 : 334-343.
- Nam, Y. K., G. C. Choi and D. S. Kim, 1999. Blocking the 1st cleavage in mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *J. Aquacult.*, 12 : 167-173.
- Thorgaard, G. H. and S. K. Allen Jr, 1987. Chromosome manipulation and markers in fishery management. pp. 319-331. (in) *Population Genetics and Fisheries Management*, (ed.) N. Ryman and F. M. Utter. University of Washington Press, Seattle.
- Volckaert, F. A. M., P. H. A. Galbusera, B. A. S. Hell-emans, C. Van den Haute, D. Vanstaen and F. Ollevier, 1994. Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*) I. Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks. *Aquaculture*, 128 : 221-233.

- 김동수 · 방인철 · 전세규 · 김연환, 1988. 인체용 마취제인 리도카인이 수 중의 양식어류에 미치는 효과. 한국어병학회지, 1:59-64.
- 김봉석 · 문영봉 · 정창화 · 김동수 · 이영돈, 1994. 유도된 자성발생성 2 배체 숫컷 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생식 능력 평가. 한국양식학회지, 7:151-158.
- 박인석 · 임재현, 2000. 메기, *Silurus asotus*의 염색체공학을 위한 온도 의존적 mitotic interval (τ_0) 결정. 2000년도 한국어류학회 추계 학술 발표대회 요약집, pp. 11-12.
- 임재현, 1999. 자성발생성 2 배체 메기 *Silurus asotus*의 생산. 군산대학교 대학원 석사학위 청구논문, 67 pp.
- 정창화 · 문영봉 · 박인석 · 김동수, 1996. 자성발생성 2 배체 넙치의 제 2세대 생산. 한국양식학회지, 9:287-291.
- 해양수산부, 1999. 연도별 해양수산통계 (어업생산량 및 업종별 생산액), 해양수산부 통계자료실.