

은어 2종류의 자성발생 2배체의 유도과 Isozyme 유전자에 의한 배수성의 확인

손진기[†]

강릉대학교 생명과학대학 해양생물공학부

Induction of Two Types of Gynogenetic Diploid of Sweet Fish, *Plecoglossus altivelis* and Verification by Isozyme Marker

Jin-Ki Son[†]

Department of Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University,
Kangnung 210-702, Korea

요약: 은어의 자성발생 2배체를 유도하기 위해 자외선에 의한 정자의 유전적 불활성화 및 수정 난의 제 2감수분열과 제 1난할을 저지하기 위한 조건을 검토했다. 정자에 3,000~14,000 erg의 자외선을 조사하였는데 그 결과 3,000 erg를 조사한 시험구에서 89.3%의 높은 생존율을 보였으나 선량이 증가될수록 생존율이 저하했으며 7,000 erg의 자외선을 조사했을 때 생존율이 다시 회복되었다. 따라서 은어의 자성발생 2배체 유도시 정자를 유전적으로 불활성화시키기 위해서는 7,000 erg가 최적 선량인 것으로 나타났다. 제 2극체 방출 저지형 자성발생 2배체를 유도하기 위해서는 자외선을 조사한 정자와 정상 난을 수정시켜 수정 5~8분 후에 15~30분간 1~2°C의 저수온 처리를 한 결과 수정 5~5.5분 후에 15~17.5분간 처리한 시험구의 생존율이 비교적 높고 안정적이어서 제 2감수분열 저지를 위한 유효 조건으로 판명되었다. 제 1난할 저지형 자성발생 2배체의 유도를 위해서는 수정 70~95분 후에 수정 난을 30분간 저수온에 처리한 결과 모든 시험구의 생존율이 현저하게 낮아 생존율의 개선을 위해서는 처리방법과 강도에 대한 재검토가 필요하며 또 난 질을 유지시킬 수 있는 방안도 강구되어야 할 것이다.

ABSTRACT: This study was made to optimize the conditions needed to produce two types of gynogenetic diploids in the sweet fish, *Plecoglossus altivelis*. Firstly, ultraviolet (UV) ray doses between 3,000 erg to 14,000 erg/mm² were tested to inactivate sperm genetically. Based on the appearance of the haploid syndromes in the embryo, a dose of UV ray 6000~7000 erg was required to inactivate sperm genetically. Then, cold shock treatment at 1~2°C for 15~30 min were conducted to retain the 2nd polar body in inseminated egg. The best elapsed time before the start of the cold shock was examined between 5~8 min. The experiments in which began 5 min after insemination, at 1~2°C during 17.5 min gave 21.2% survival rate and 89.7% normal eyed embryo rate. The gynogenetic diploid produced by suppression of the first cleavage, a considerably high number of heteroploids appeared and high mortality was observed at the metamorphosis stage, so further investigation is needed. The production of gynogenetic diploids were confirmed by GPI isozyme marker. The heterozygous type in Gpi-1 locus was observed in the meiotic-G2N as a result of gene-centromere recombination during meiosis. The heterozygous type was never observed in mitotic-G2N and showed segregation into two homozygous types at Gpi-1 locus.

Key words: Sweet fish, Chromosome manipulation, Gynogenetic diploid.

서론

자성발생 2배체는 수정시 자성전핵이 응성전핵과 융합하지 않고 자성 핵에서만 유래하는 핵을 갖는 개체로 발생하는

것으로서 이러한 자성발생 2배체는 제 1대에 대부분의 유전자좌가 동형 접합형이 되기 때문에 유전적 순화 속도가 빨라서 단기간에 근교계나 순계의 생산을 위한 방법으로서 극히 유효하며 또 수컷형 단성집단의 생산을 위한 기술로서도 기대된다 (Purdom, 1976; Chermas, 1981; Chourrout, 1982). 또한 자성발생 2배체는 모든 유전자가 동형 접합형이 되기 때문에 열성의 악성 유해 유전자가 발현하여 집단에 현재화하므로 이들을 쉽게 제거할 수도 있다 (Onozato, 1983).

[†]교신저자: 강원도 강릉시 지변동 산 123번지, 강릉대학교 생명과학대학 해양생물공학부 (우) 210-702 (전) 033-640-2411 (팩) 033-640-2411 e-mail: sonjk@knusun.kangnung.ac.kr

어류에서는 1969년 Purdom에 의해 넙치의 자성발생 2배체의 생산에 성공한 이래 최근에는 많은 유용 어류에서 자성발생 2배체의 유도가 시도되어 연어과(Chourrout, 1980; Refstie, 1983; Onozato & Yamaha, 1983)와 잉어과(Nagy et al., 1978; Hollebecq et al., 1986; Komen et al., 1988; Sumantadinata et al., 1990)등의 여러 어류에서 대량 생산에 성공했으며 해산어에서도 참돔(Sugama et al., 1990)과 넙치(Tabata et al., 1986)에서 자성발생 2배체의 유도에 성공하여 현재는 산업적 유용성에 대한 검토가 이루어지고 있다.

자성발생 2배체의 유도 원리에 관해서는 Purdom (1983), Chourrout (1986) 등의 총설이 있는데 그 요점은 2가지로서 하나는 정자에 자외선 또는 감마선을 조사하여 유전자를 불활성화 시키는 것이고 다른 하나는 수정 난의 제 1감수분열, 제 2감수분열 그리고 제 1난할을 저온, 고온 또는 고수압의 물리적 자극에 의해 저지하는 것이다. 정자의 유전자를 불활성화 시키기 위한 자외선은 어종이나 정자의 크기에 따라 그 효과가 다르기 때문에 대상 어종에 대해서는 반드시 적정 선량을 규명하여야 한다. Taniguchi 등 (1988)은 은어의 정자를 유전적으로 불활성화 시킬 수 있는 적정 선량은 8,400erg라고 보고했다. 또 수정 난의 각 분열을 저지하기 위해서도 처리 방법, 처리 개시시간, 처리 지속시간 그리고 처리의 강도를 정확하게 결정하는 것이 매우 중요하다. 이들 조건 역시 어종이나 난의 크기에 따라 그 효과가 다르기 때문에 높은 생존율의 자성발생어를 유도하기 위해서는 대상 종의 생물학적 특성에 적합한 조건의 규명이 필요하다. 어류의 경우 제 1감수분열은 난소의 낭포내에서 일어나기 때문에 그 저지가 곤란하여 아직 유도에 성공하지 못했지만 분열이 산란 후에 일어나는 패류에서는 제 1감수분열을 저지하여 3배체의 유도에 성공했다(Fujino et al., 1987).

본 연구는 유전학적 및 육종학적 가치가 큰 자성발생 2배체를 대량으로 생산하기 위해 단시간에 대량의 난을 처리할 수 있는 저수온으로 은어의 자성발생 2배체의 유도를 시도하여 제 2극체 방출 저지형 자성발생 2배체 (극체형-G2N, meiotic-G2N)와 제 1난할 저지형 자성발생 2배체 (난할형-G2N, mitotic-G2N)의 유도 조건에 대해서 검토했다. 또한 은어에서 유전자와 동원체의 재조합율이 100%인 Gpi-1의 유전자좌를 marker로 유도된 은어의 자성발생 2배체를 확인했다.

재료 및 방법

실험에 사용한 어미 은어는 경북 울진군 왕피천과 영덕군 오십천의 산란장에서 투망으로 포획했으며 포획한 어미는

경북 내수면 연구소로 수송하였다. 정자는 수컷의 배를 압박했을 때 정액이 밖으로 유출되는 완속된 개체만을 골라 채정했으며 정자가 부족할 시에는 복부를 절개하여 생식소를 들어내어 생리식염수에서 세절한 후 유출된 정자를 사용하였다. 은어의 난은 성숙한 암컷의 배를 압박하는 방법으로 복수의 어미로부터 채란하였으며 채란된 난은 한 실험구에 1~2g씩을 사용하였다.

1. 정자의 유전적 불활성화

채집된 정자는 은어용 생리식염수(NaCl 0.79g%, KCl 0.048g%, NaHCO₃ 0.002g%)로 약 100배 희석시켜 이중 일부는 자성발생의 유도를 위해 자외선을 조사하였으며 나머지 정자는 무처리로 정상의 난과 수정시켜 자성발생의 대조구(2N-cont)로 사용하였다. 희석시킨 정자는 자외선이 균일하게 조사될 수 있도록 페트리디쉬에 8ml정도 넣어서 두께가 1mm가 되게 하여 진탕하면서 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 실험은 2회에 걸쳐서 실시했는데 1차 실험에서는 77erg/mm²/sec의 자외선을 60~180초 조사하여 총선량이 각각 4,600 erg, 6,000 erg, 7,700 erg, 9,000 erg, 10,000 erg, 12,000 erg, 14,000 erg가 되도록 7개의 실험구로 나누어 조사했다. 2차 실험에서는 1차 실험의 결과를 바탕으로 유효한 범위의 자외선량을 집중적으로 검토하기 위하여 각 실험구별 선량의 범위를 더 좁게 하여 3,000 erg, 3,800 erg, 4,600 erg, 5,400 erg, 6,000 erg, 7,000 erg, 7,700 erg, 8,500 erg, 9,000 erg등의 9개의 실험구로 나누어 정자에 조사했다. 자외선을 조사한 정자는 정상의 난과 수정을 시킨 후 流水에 두고 관리했으며 수생균에 감염되지 않도록 2일 간격으로 4ppm의 malachite green을 이용해 약욕하였다. 각 실험구의 생존율은 배체가 형성되는 수정 3일 후에 전체 난중 생존한 난만을 계수했으며 또 정상율은 발안이 되는 수정 6일 후에 생존배중에서 반수체 증후군이 발현된 개체의 비율로 판단했다.

2. 제 2감수 분열 저지

제 2극체 방출 저지형 자성발생 2배체를 유도하기 위해서 은어의 수정 난의 제 2감수분열 저지를 위한 조건을 검토했다. 먼저 정자에 77 erg/mm²/sec의 자외선을 90초간 조사(7,000 erg)한 정자와 정상의 난을 수정시킨 후 수정란을 2mm 두께의 유리판에 부착하였다. 제 2감수분열의 저지를 위한 처리 개시시간과 처리 지속시간을 검토하기 위해서 수정 후 5분, 5.5분, 6분, 6.5분, 7분, 7.5분, 8분에 1~2°C의 저수온에 각각 15분, 17.5분, 20분, 22.5분, 25분, 27.5분, 30분간을 침적시켰다. 처리가 끝난 수정 난은 17°C의 流水에 두고 배체

가 형성되는 수정 3일 후에 각 실험구의 생존율을 조사했으며 정상율은 수정 6일 후의 발란기에 전체 생존배중 반수체 증후군이 나타나지 않은 정상배의 비율로 구했다.

3. 제 1난할 저지

제 1난할저지형 자성발생 2배체를 유도하기 위해 수정 난의 제 1난할을 저지하기 위한 적정 처리 개시시간을 검토했다. 생리식염수로 희석한 정자를 7,000 erg의 자외선을 조사하여 은어의 정상란과 수정시켜 유리판에 부착시킨 후 수정 70분, 75분, 80분, 85분, 90분, 95분 후에 각각 1~2°C의 저수온에 30분간 침적시켰으며 처리가 끝난 수정란은 17°C의流水에 두고 관리하였다. 각 실험구의 생존율은 배체가 형성되는 수정 3일 후에 전체 배에 대한 생존 배의 비율로 구했다.

4. 전기영동에 의한 isozyme 유전자 검출

자성발생 2배체의 배수성 확인을 위한 유전적 marker를 개발하기 위하여 Seki 등(1988)의 방법에 따라 단백질 전기영동으로 isozyme 유전자를 검출하였다. 어미의 유전자형을 파악하기 위하여 어미의 근육에서 추출된 단백질을 수평 전분겔법을 이용하여 전기영동 하였다. 자성발생 2배체는 약 1개월간 사육하여 전장이 약 1.8cm가 되었을 때 개체를 파쇄한 후 단백질을 추출하여 전기영동에 사용하였다. 영동이 끝난 겔은 Taniguchi & Numachi(1978)의 방법에 따라 염색하여 isozyme 유전자를 검출하였다. 검출된 isozyme 유전자중에서 polymorphic 하며 또 G-C 재조합율이 거의 100%인 Gpi-1의 유전자좌를 marker 유전자로 채택하여 자성발생 2배체의 배수성을 확인했다.

결 과

1. 적정 자외선량

1차 실험에서는 7개의 실험구로 나누어 각 실험구에 4,600~14,000 erg의 자외선을 조사했다 (Table 1). 각각의 자외선량으로 조사한 정자를 정상란과 수정시켜 무처리로 발생시켰다. 처리가 끝난 수정란은 15°C와 17°C의流水에 두고 관리했다. 각 실험구의 생존율은 배체가 형성되는 수정 3일 후에 전체 수정란에 대한 생존배의 비율로 계산하였으며 그 결과는 Table 1에 나타냈다. 2N-cont는 자외선을 조사하지 않은 정상란의 정자와 수정시켜 정상 발생시킨 대조구이다. Table 1에 나타낸 것과 같이 자외선을 조사하지 않은 정상란의 정자와 수정시킨 후 15°C와 17°C의 수온에서 유지시킨 2N-cont구의 생존율이 각각 5.5%와 22.2%에 불과해 자연상태보다 현저히

Table 1. Effect of sperm inactivation genetically at various UV dosages(3,000~14,000erg) on survival rate of developing eggs

Dose of UV irradiation (erg/mm ²)	Survival rate ¹⁾	Survival rate ²⁾	Survival rate ³⁾
2N-cont	5.5	22.2	86.7
3,000			89.3
3,800			78.7
4,600	8.5	15.5	75.2
5,400			42.8
6,000	29.6	32.3	24.5
7,000			50.2
7,700	18.9	26.1	14.2
8,500			9.7
9,000	9.2	8.9	5.0
10,000	5.8	2.4	
12,000	5.8	4.5	
14,000	4.4	5.2	

¹⁾ This group were the first experiment(maintained in 15°C).

²⁾ This group were the first experiment(maintained in 17°C).

³⁾ This group were the second experiment.

낮은 생존율을 보였다. 대조구의 생존율이 낮았음에도 불구하고 6,000 erg를 조사한 실험구에서는 약 31%의 생존율을 보였으며 7,700 erg의 자외선을 조사한 실험구에서도 평균 22.5%의 생존율을 보여 대조구보다도 높은 생존율을 보였다. 이것은 복수의 암컷으로부터 채집한 난의 난질에 개체차가 심했으며 이들 난질이 각 실험구별로 고르지 못했기 때문이라고 생각한다. 한편 자외선량이 7,700 erg를 초과하면 생존율은 9% 이하로 현저하게 감소하여 이 이상의 강도는 정자의 유전적 불활성화를 위해 유효하지 못한 것으로 드러났다. 수정후 15°C와 17°C에서 유지시킨 두 실험구의 생존율이 약간의 차이를 보였으나 이러한 차이가 수온에 의한 것이라는 명확한 증거는 발견하지 못했다.

2차 실험에서는 위와 같은 1차 실험의 결과를 바탕으로 3,000 erg~9,000 erg의 자외선을 9개의 실험구로 나누어 각 실험구에 조사하는 자외선의 강도의 범위를 좁혀서 집중적으로 검토했으며 그 결과는 Table 1에 나타냈다. 3,000 erg의 자외선을 조사하여 정상란과 수정시킨 실험구의 생존율이 89.3%로 높은 생존율을 보였으나 자외선량이 증가될수록 생존율도 감소하여 5,400 erg를 조사한 실험구에서는 42.8%로 생존율이 현저하게 저하했으며 6,000 erg를 조사한 실험구에서는 24.5%까지 감소했다. 그러나 7,000 erg를 조사한 실험구에서는 생존율이 다시 회복하여 50.2%의 생존율을 보였다. 그리고 7,700 erg를 조사한 실험구에서는 14.2%의 생존율을

보여 생존율이 현저하게 감소했다. 3,000 erg의 자외선을 조사한 실험구가 가장 높은 생존율을 보였지만 실제로는 이들 중 대부분의 난이 부화까지 이르지 못하고 도중에 발생을 정지했으며 또 그 중의 많은 난들이 자외선의 영향으로부터 벗어나 반수체 증후군이 관찰되지 않았다. 그러나 생존율이 다시 회복하는 구간인 6,000~7,000 erg의 실험구에서는 생존율도 높았으나 거의 모든 난이 반수체 증후군을 나타냈다. 따라서 6,000~7,000 erg의 자외선량의 조사가 은어의 정자를 유전적으로 불활성화시키기 위한 유효 조건으로 판명되었다.

2. 제 2극체 방출 저지형 자성발생 2배체의 유도 조건

제 2극체 방출 저지형 자성발생 2배체의 유도 조건을 규명하기 위해 제 2감수분열 저지를 위한 처리 개시시간과 처리 지속시간을 검토했다. 7,000 erg의 자외선을 조사한 정자와 정상 난을 수정시킨 후 수정 5~8분 후에 1~2°C의 저수온에 처리를 개시하여 각각 15~30분간 처리를 지속했다. 수정 3일 후와 6일 후에 조사한 각 실험구의 생존율과 정상율은 Table 2에 나타났다. 각 실험구의 생존율을 보면 수정 5분 후에 처리를 개시한 실험구에서는 17.5분간의 처리구가 21.2%의 생존율을 보여 이번 실험에서 가장 높은 생존율을 보였으며 그중 89.7%가 반수체 증후군이 나타나지 않은 정상 배였다. 처리 지속시간이 20분을 초과하면 생존율과 정상율이 현저하게 감소했다. 수정 5분 30초 후에 처리를 개시한 경우도 처리 지속시간이 15분과 17분 30초구에서는 각각 16.3%와 15.8%의 생존율을 보였으며 정상율도 78.4%와 85.2%를 나타냈다. 처리 지속시간이 20분 이상이 되면 생존율과 정상율이 저하하여 5분구와 유사한 경향을 보였다. 따라서 생존율과 정상율이 비교적 높고 안정적인 수정 5분 후와 5.5분 후에 17.5분간의 처리구가 수정란의 제 2감수분열 저지를 위한 최적 조건으로 판단된다. 수정 6분 후 또는 그 이후에 처리를 개시한 실험구도 처리 지속 시간이 17분 30초를 초과했을 경우는 생존율과 정상율이 현저하게 저하했다. 한편 처리 지속 시간이 20분을 초과하면 생존율이 감소하여 25분 이상의 실험구에서는 처리 개시시간에 관계없이 생존배가 거의 관찰되지 않았다.

3. 제 1난할 저지형 자성발생 2배체의 유도 조건

제 1난할 저지형 자성발생 2배체의 유도 조건을 검토하기 위해 7,000 erg의 자외선을 조사한 정자와 정상란을 수정시켰으며 수정란은 수정 70~95분 후에 처리를 개시하여 1~2°C 저수온에 30분간 지속시켰으며 각 실험구의 생존율은 Table 3에 나타났다. 수정 75분 후에 처리를 개시한 실험구가 3.79%

Table 2. Survival rates at 3rd day after insemination and normal eyed embryo rate at the 6th day after insemination (in parenthesis) of meiotic-G2N. Treatment temperature was 1~2°C in this time

Start time(min)	Duration(min)						
	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0
5.0	13.1 (87.7)	21.2 (89.7)	10.9 (54.7)	4.6 (12.0)	0.8	0.8	0.0
5.5	16.3 (78.4)	15.8 (85.2)	12.5 (46.3)	6.1	0.4	0.3	0.0
6.0	12.7 (34.7)	7.7 (25.4)	10.3 (18.5)	4.3	1.5	0.0	0.0
6.5	12.8 (67.8)	14.3 (55.0)	6.9 (35.4)	3.6	2.4	0.0	0.0
7.0	12.7 (18.7)	10.7 (5.0)	6.2	8.4	2.3	0.5	0.0
7.5	11.5 (84.7)	10.1 (84.2)	6.0	3.9	4.5	0.0	1.2
8.0	12.4 (0.0)	9.6 (0.0)	6.7	2.0	3.0	0.9	0.0

*Survival rate is the percentage of alive embryos from the total number of eggs.

*Normal rate is the percentage of normal eyed embryos from surviving embryos.

*Normal eyed embryos were identified by the lack of haploid syndrom.

Table 3. Survival rates at 3rd day after insemination of mitotic-G2N. Treatment temperature was 1~2°C in this time

Start time (min)	Duration (min)	Survival rate (%)
70	30	0
75	30	3.79
80	30	0
85	30	0
90	30	0.32
95	30	0.26

의 생존율을 보였을 뿐 그 외의 실험구에서는 생존배가 거의 관찰되지 않아서 이번에 설정한 조건이 유효하지 못했다.

4. Isozyme 유전자에 의한 배수성의 확인

은어의 GPI 효소 유전자에서는 Gpi-1과 Gpi-2의 2개의 유전자좌가 검출되었으며 2N-cont(대조구), 극체형-G2N 그리고 난할형-G2N의 전기영동상은 Fig. 1에 나타났다. 극체형-G2N에서는 모친의 대립 유전자가 동형 접합형(AA, BB)인 경우

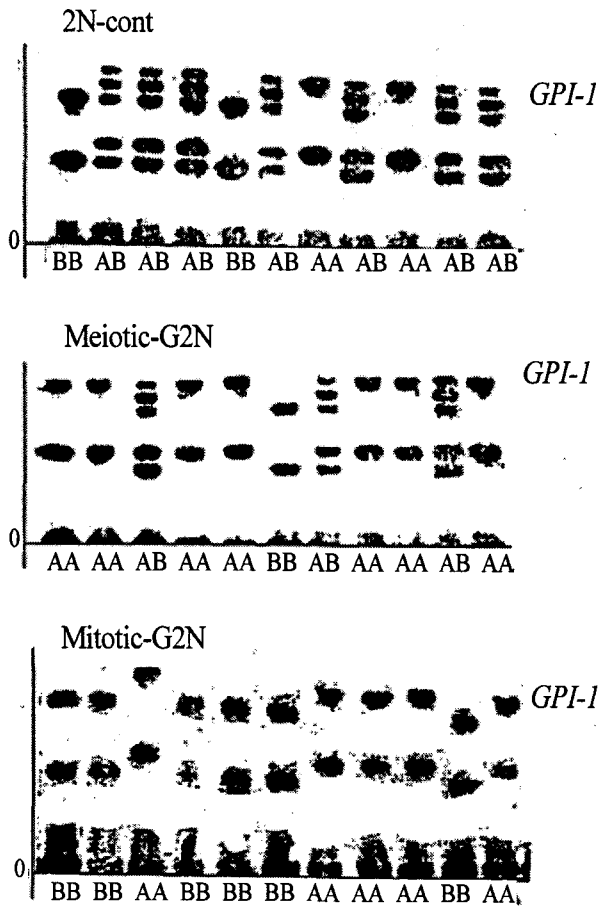


Fig. 1. Electrogram of Gpi-1 locus illustrating the genotype distribution in normal diploids(2N-cont) produced by normal sperm, and meiotic-G2N and mitotic-G2N induced by UV irradiated sperm of sweet fish.

home형의 자성발생 2배체가 유도되었으며, 또 모친의 대립 유전자가 이형 접합형(AB)인 경우 자성발생 2배체는 대립 유전자가 모두 AB형의 hetero형이 출현하여 극체형-G2N이 성공적으로 유도된 것으로 확인되었다. 난할형-G2N의 경우 이형 접합형(AB)의 모친을 사용했음에도 불구하고 유도된 자성발생 2배체에서는 이형 접합형의 유전자는 출현하지 않고 모든 개체의 대립 유전자가 AA형과 BB형의 서로 다른 2개의 동형 접합형으로 분리되어 출현하였다. 또한 이들 자성발생 2배체의 확인을 위해 AA형의 숫컷과 BB형의 암컷을 어미로 사용한 실험구를 별도로 사육한 후 전기영동을하여 isozyme 유전자형을 확인한 결과 부친 유래의 유전자형(AA)은 출현하지 않고 오직 모친 유래의 유전자형(BB)만 출현하였다. 따라서 자외선에 의해 정자가 유전적으로 불활성화되었으며 또 난할형-G2N이 성공적으로 유도된 것이 확인되었다.

고 찰

자성발생 2배체를 유도하기 위해서는 1) 정자의 유전자를 불활성화 시키기 위한 조건, 2) 세포분열 저지를 위한 처리 방법, 3) 처리 개시시간, 4) 처리 지속시간 및 처리의 강도를 정확히 결정하는 것이 가장 중요하다. 정자의 유전자 (DNA)를 불활성화하기 위해서는 자외선, 감마선 그리고 X선이 쓰이는데 일반적으로 자외선이 취급이 간편해서 가장 많이 쓰이지만 투과력이 약하기 때문에 균일하게 조사해야 한다. 그리고 정자에 자외선을 조사할 경우는 약한 선량에서는 생존율이 높으나 선량을 증가할수록 생존율이 계속 저하해간다. 그러나 어느 선량을 초과하면 생존율이 다시 회복하는데 이러한 현상을 Hertwig 효과라고 하며 정자의 유전자를 불활성화 시키는데 필요한 적정 선량을 결정하기 위한 중요한 지표가 된다. 이번 연구에서도 이러한 Hertwig 효과가 나타나 3,000 erg에서는 89.3%의 높은 생존율을 보였으나 선량이 증가하면서 생존율도 감소하여 5,400 erg에서는 현저하게 감소했다. 그러나 7,000 erg의 자외선을 조사한 실험구에서 생존율이 다시 회복하여 50.2%의 생존율을 보였다. 따라서 은어의 정자의 유전자를 불활성화 시키기 위해서는 생존율이 회복하는 7,000 erg의 자외선량이 가장 유효한 것으로 사료된다. 그러나 Taniguchi 등(1986)은 은어의 정자의 유전자를 불활성화 시키기 위해서는 8,000 erg 이상의 선량이 필요하다고 보고하여 이번의 연구 결과와 차이를 보였는데, 이러한 차이가 지리적 품종간의 특성에서 기인하는 것인지는 정확하게 규명하지 못했다. 지금까지 여러 종의 어류에서 정자를 유전적으로 불활성화 시키기 위한 적정 선량이 확립되었는데 비단잉어의 경우는 10,000 erg (Taniguchi et al., 1986), 참돔 3,000erg (Sugama et al., 1990) 그리고 연어과 어류는 14,000 erg (Chourrout, 1982; Onozato & Yamaha, 1983)가 유효한 것으로 보고되었다. 10,000 erg를 조사하는 비단잉어는 정자의 핵이 은어보다 2배 정도 크기 때문에 정자의 핵의 크기와 자외선의 강도가 상관이 큰 것으로 나타났다. 그리고 자연에서 정상적인 산란을 할 경우 생존율이 90% 이상이나 이번 연구에서 자연과 똑같은 조건으로 수정시킨 2N-cont구에서는 생존율이 5.5%와 22.2%로 아주 낮았다. 이것은 산란기가 거의 끝나갈 무렵에 실험을 했기 때문에 포획된 어미의 난이 과숙되어 난질이 극도로 악화되었다는 것을 의미하고 있다. 또한 동일한 난을 사용했음에도 불구하고 생존율이 5.5%와 22.2%로 많은 차이가 있었는데 이것은 복수의 개체로부터 채란한 난이 골고루 섞이지 않았으며 수정 작업시 이물질이 유입된

것으로 생각된다.

처리 방법에 대해서는 Taniguchi 등(1986, 1988)에 의해 저수온 처리와 고수압 처리에 의한 유도 조건이 이미 검토되어 처리 개시시간에 대해서는 수정 온도가 19°C인 경우 제 2감수분열의 저지를 위해서는 수정 5분 후, 그리고 제 1난할의 저지를 위해서는 수정 80분 후가 유효한 것으로 보고되었다. 이번 연구에서도 이 시간을 중심으로 검토했는데 이번 연구의 결과도 제 2감수분열의 저지를 위해서는 수정 5분 후와 5.5분 후가 생존율이 가장 높아 유효한 것으로 확인되었다. 한편 냉수성 어종인 무지개 송어의 경우 제 2감수분열을 저지하기 위해서는 26~29°C가 최적 온도로서 26°C의 경우는 20분간의 처리가 유효했으며 29°C의 경우는 10분간의 처리가 가장 유효했다 (Thorgaard et al., 1981). 그리고 송사리 (Naruse et al., 1985)나 잉어 (Hollebecq et al., 1986)와 같은 온수성 어류에서는 40°C 이상의 고수온으로 처리하여 제 2감수분열의 저지에 성공했다.

난할형-G2N의 유도를 위해서 이번에 설정한 조건은 생존율이 1% 이하로서 유효하지 못했다. 난할형-G2N의 유도를 위해서 처리 수온은 검토하지 않고 오직 한가지 수온 조건(1~2°C)에 대해서만 검토했는데 은어의 최적 수온은 연어과와 같은 냉수성 어종보다는 높고 또 송사리나 틸라피아와 같은 온수성 어종보다는 낮기 때문에 제 1난할을 저지하기 위해서는 저수온이나 고수온 모두 유효할 것으로 생각하며 또한 이번 실험에서도 생존율에 있어서 수온의 영향이라 할 수 있는 명확한 결과를 얻지 못했기 때문에 보다 폭 넓은 범위의 수온에 대한 전면적인 검토가 필요하다고 생각된다. Streisinger 등 (1981)은 고수온 처리와 고수압 처리에 의해 Zebra fish의 난할형-G2N의 유도에 성공했지만 고수온 처리의 경우는 제 1유사분열의 전기에, 고수압 처리는 제 1유사분열의 중기에 실시했다. 따라서 은어의 경우도 제 1유사분열뿐만 아니라 제 2유사분열의 저지도 검토할 필요가 있다.

자성발생의 확인을 위한 isozyme 유전자에서는 부친 유래의 대립 유전자는 출현하지 않아서 정자의 유전적 불활성화를 위한 자외선 조사는 유효한 것으로 판명되었다. Isozyme 유전자에 의한 극체형-G2N의 확인을 위해서는 모친의 유전자형이 hetero일 것과 제 2감수분열 분리형 빈도(y)가 1인 유전자좌를 marker로 사용해야 한다. 은어의 경우는 Gpi-1 유전자좌의 y가 거의 1이기 때문에 극히 유효한 marker이다 (Taniguchi et al., 1986). 극체형-G2N의 유전자형은 hetero형이 높은 빈도로 출현하여 극체형-G2N 집단에서 예측된 유전자형 분포와 거의 일치하여 극체형-G2N이 성공적으로 유도된 것이 확인되었다. 난할형-G2N의 유전자형 분포는 산란에 사

용한 모친중 많은 개체의 유전자형이 hetero형이었음에도 불구하고 모든 자어의 대립 유전자는 동형 접합형이어서 유도된 자성발생 2배체가 난할형-G2N인 것으로 확인되었다. 자성발생의 확인에 isozyme 유전자를 marker로 사용하게 됨으로서 이 분야의 연구가 더욱 발전될 것으로 기대한다.

인용문헌

- Cherfas NB (1981) Gynogenesis in Fishes. In Kirpichnikov (ed.) Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag, Berlin and New York, pp 255-273.
- Chourrout D (1980) Thermal induction of diploid gynogenesis and triploid in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reproduction Nutrition Development* 20: 727-733.
- Chourrout D (1982) Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. *J Exp Zool* 223: 175-181.
- Chourrout D (1986) Techniques of chromosome manipulation in rainbow trout : a new evaluation with karyology. *Theor Appl Genet* 72: 193-206.
- Fujino K, Kamamura M, Mito R, Arai K (1987) Overdominance of survivals at phosphogluconate dehydrogenase locus in triploid pacific abalone populations. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 1759-1764.
- Hollebecq MG, Chourrout D, Wohlfarth GW, Billard R (1986) Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV-irradiated sperm in common carp. *Aquaculture* 54: 69-76.
- Komen J, Duynhouwer J, Richter CJJ, Huisman (1988) Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L). I. Effects of genetic manipulation of sexual products and incubation condition of eggs. *Aquaculture* 69: 227-239.
- Nagy A, Rajki K, Horvath L, Csanyi V (1978) Investigation on carp *Cyprinus carpio* gynogenesis. *J Fish Biol* 13:215-224.
- Naruse K, Ijiri K, Shima A, Egami N (1985) The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool* 236: 335-341.
- Onozato H, Yamaha E (1983) Induction of gynogenesis with ultraviolet ray in four species of salmoniformes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49: 693-699.
- Purdum CE (1976) Genetic techniques in flatfish culture. *J Fish Res Bd Canada* 33: 1088-1093.
- Purdum CE (1983) Genetic engineering by the manipulation of

- chromosomes. *Aquaculture* 33: 287-300.
- Refstie T (1983) Induction of diploid gynogenesis in Atlantic salmon and rainbow trout using irradiated sperm and heat shock. *Can J Zool* 61: 2411-2416.
- Seki S, Taniguchi N, Jeon SL (1988) Genetic divergence among natural populations of ayu from Japan and Korea. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 559-568.
- Streisinger G, Walker N, Dower D, Knauber D, Singer F (1981) Production of clones of homozygous diploid Zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293-296.
- Sugama K, Taniguchi N, Seki S, Nabeshima H, Hasegawa Y (1990) Gynogenetic diploid production in the red bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1427-1443.
- Sumantadinata K, Taniguchi N, Sugama K (1990) The necessary condition and the use of ultraviolet irradiated sperm from different species to induce gynogenesis of Indonesian common carp. In: *The 2nd Asian Fisheries Forum, Manila, Philippines*. pp, 539-542.
- Tabata K, Gorie S, Taniguchi N (1986) Verification by isozyme gene marker for gynogenetic diploidization and triploidization in hiramé, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Genetics and Breeding Science* 11: 35-41.
- Taniguchi N, Numachi K (1978) Genetic variation of 6-phosphogluconate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and glutamic oxaloacetic transaminase in the river of Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 44: 1351-1355.
- Taniguchi N, Kijima A, Fukai J, Inada Y (1986) Condition to induce triploid and gynogenetic diploid in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Nippon Suisan Gakkaishi* 52: 49-53.
- Taniguchi N, Kijima A, Takegami K, Yamasaki I (1986) Color, growth and maturation in ploidy manipulated fancy carp. *Aquaculture* 57: 321-328.
- Taniguchi N, Seki S, Fukai J, Kijima A (1988) Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1483-1491.
- Thorgaard GH, Jazwin ME, Stier AR (1981) Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans Amer Fish Soc* 110: 546-550.