메기, *Silurus asotus* 암컷 집단 생산

1. 감수분열 억제성 자성발생 2배체

임재현, 박사과정
군산대학교 대학원 수산과학과
Tel) 051-410-4321 Fax) 051-405-4322
E-mail) jhim512@kunsan.ac.kr

1. 서 론

척추동물을 대상으로한 실험적인 처녀생식(parthenogenesis)은 양서류에서 최초로 보고된 바, 개구리 류인 *Rana temporaria*와 두꺼비 류인 *Bufo vulgaris*간 교배시 정자는 난을 활성화는 시키지만 유전적으로는 수정에 관여않는 자성발생이 유도되었으며, 저온처리시 제 2 감수분열 억제에 기인된 자성발생성 2배체가 생산된바 있다(Ihssen *et al.*, 1990). 어류를 대상으로 인위적인 자성발생성 반수체 유도는 Oppermann (1913)에 의하여 brown trout *Salmo trutta*에서 이루어졌다. 이후 잉어 *Cyprinus carpio*, weatherfish *Misgurnus fossilis*, sterlet *Acipenser ruthenus*에서 자성발생성 2배체가 유도된바, 낮은 비율의 자성발생성 2배체는 난이 X선 조사된 정자와 수정후 활성화시 유도되었다. 특히, 저온처리에 의한 수정난의 활성화는 weatherfish에서 자성발생성 2배체의 유도율을 증가시킨바 있다(Thorgaard and Allen, 1987).

어류는 비교적 짧은 생활사, 대부분 미분화된 성염색체에 기인한 배수체의 정상적인 생존력 그리고 어류 자체의 체외수정으로 인한 난과 정자의 손쉬운 조작 방법 등으로 인해, 어류를 대상으로한 자성발생성 2배체가 현재까지 활발히 연구되고 있다(Thorgaard, 1986). 아울러 최근에는 자성발생 유도시 정자 불활성화의 불완전에 기인된 정상 2배체의 출현 가능성을 배제하기 위해, 타종의 정자를 사용한 미꾸리 *Misgurnus anguillicaudatus*, 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis*, 참돔 *Pagrus major*, *Gnathopogon caurulescens*, 넙치 *Paralichthys olivaceus*, 메기 *Clarias macrocephalus*, sole *Solea solea* 및 paddlefish *Polydon spathula*의 자성발생성 2배체가 유도된바 있다(Nam *et al.*, 1999).

자성발생 유도시 감수분열 억제성 자성발생성 2배체(meiotic gynogenetic diploid)는 순계 생산에 유용한 방법이며 동일한 유전자형을 가지는 계통인 동유전자계통의 형성에 유용하다(Thorgaard, 1986). 이와 더불어 자성발생성 2배체의 또 다른 양식산업적 적용은 단성집단의 생산이다(Thorgaard and Allen, 1987). 다수의 어종에서 발견되듯이, 만약 성결정기구가 암컷이 동형접합체(homogamete)인 어류의 경우 자성발생에 의한 이들 자손의 제 1 세대는 전암컷 집단이 형성될 수 있으며, 역으로 자성발생을 통하여 전암컷 집단이 형성된다면 자성발생시 사용된 어류의 성결정 기구가 암컷 동형접합체임을 유추할수 있다. 전암컷 자성발생성 2배체는 잉어, 초어 *Ctenopharyngodon idella*, 무지개송어 *Salmo gairdneri*와 은연어 *Oncorhynchus kisutch*, 홍연어 *O. gorbuscha*, 넙치에서 보고되고 있다(Kim *et al.*, 1994).

메기 *Silurus asotus*는 분류학상 메기 목(Siluriformes) 메기 과(Siluridae)에 속하는 어종으로, 우리 나라의 전 하천에 서식하며 일본, 중국을 비롯한 동북아시아 담

수계에 널리 분포하고 있다(Kim, 1997). 본 종은 우리나라에서 예로부터 맛이 좋아 식용으로 널리 이용되고 있다. 우리나라에서 메기 생산량은, 산업화와 수질오염에 기인된 자연 환경 악화로 인해, 자연산 메기의 연간 생산량이 1985년에 1,000여톤을 상회하던 것이 1995년에 371톤으로 크게 감소된 반면, 양식산 메기의 연간 생산은 1986년부터 꾸준한 증가 추세를 보여 1995년에는 1,700여톤의 생산고로 메기 총생산량에 있어 양식산이 거의 전량을 차지하며 소비되고 있는 실정이다(Ministry of Agriculture and Forestry, 1996). 그러나 이러한 근간의 메기 양식 생산고의 증가와는 상반되게, 메기 양식산업 여건은 점차로 악화되어 현재, 메기 양식산업은 침체국면에 처해있는 실정이다.

메기류에 있어 *Ictalurus punctatus, Rhamdia sapo* 및 *Clarias gariepinus*를 대상으로한 자성발생이 연구되어 있으나, 본 연구에 사용된 메기를 대상으로한 자성발생에 관한 보고는 아직까지 전무한 실정이다. 이러한 점을 고려, 본 연구는 메기를 대상으로 단기간 내에 우수한 품종의 순계와 동일 clone 집단을 만들어 메기 양식생산성 향상을 이루기 위한 연구의 일환으로, 메기와는 다른 종의 정자를 사용하여 감수분열 억제성 자성발생 2배체를 유도하였다. 또한 자성발생성 유도를 위한 적정 조건의 조사와 유도된 개체들의 염색체 조사를 실시하였으며, 유도된 자성발생 각 개체들을 대상으로 성비를 조사·분석하여, 메기에서의 성결정 기구를 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

타 종 정자에 의한 메기 *Silurus asotus* 감수분열 억제성 자성발생성 2배체를 생산하기 위하여, 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 수컷과 버들치 *Rhynchocypris oxycephalus* 수컷을 사용하였다. 메기 자성발생성 2배체 유도에 효과적인 타 어종 정자를 파악한 후, 메기에서 감수분열 억제에 효과적인 조건을 조사하였다. 생산된 메기 자성발생성 2배체를 대상으로 염색체 조사 및 성비를 조사하였다.

2-1. 친어의 산란 유도 및 실험군 설정

전라북도 정읍에 위치한 호남 내수면어업 영농조합의 노지에서 사육중인 성숙 메기를 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 성숙 메기 친어의 평균 전장 및 평균 체중은 암·수 각각 34.0±1.5 ㎝, 272.2±4.3 g 및 26.0±0.7 ㎝, 80.9±1.2 g 이었다. 실험에 사용된 미꾸라지 수컷은 충청남도 서천에 위치한 서천 담수어 수집소에서 구입한 성숙 개체들로, 이들의 평균 전장 및 평균 체중은 각각 12.0±0.3 ㎝, 8.9±0.4 g 이었다(그림 1). 실험에 사용된 버들치 수컷은 전라북도 완주군 구이면 동적골의 산간 계곡에서 채집된 후 군산대학교 해양생명과학부 수산유전육종 사육실로 이송하여 3대째 사육중인 성숙 개체로, 이들의 평균 전장과 평균 체중은 각각 8.3±0.4 ㎝, 7.3±0.6 g 이었다. 본 연구 수행시의 사육 수온은 24±0.5℃를 유지하였다.

성숙한 메기 암컷과 수컷, 그리고 성숙 미꾸라지 수컷을 산소 운반 후 순환여과 사육조에서 잠시 안정 및 순치 시킨 후 인공 산란을 유도하였다. 인공 산란 유도를 위해 human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma, USA)와 lutenizing hormone releasing hormone analogue

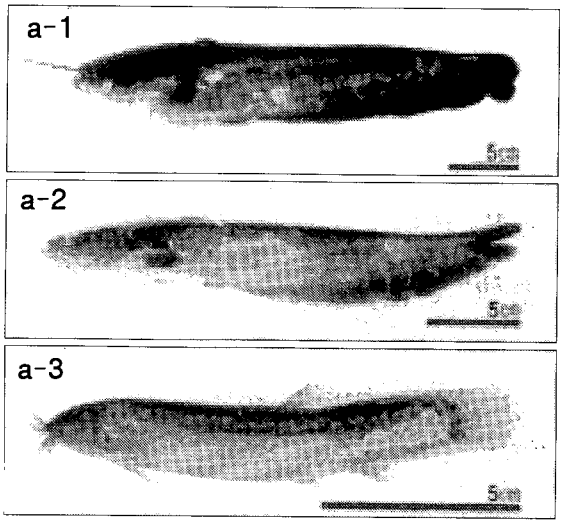
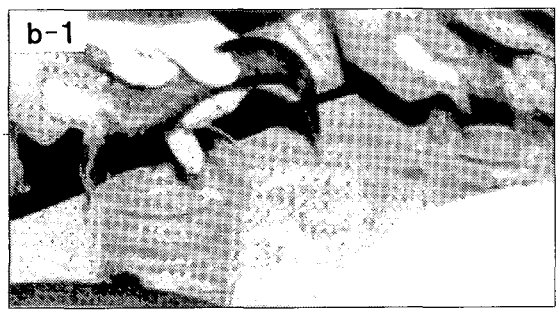


그림 1. 본 실험에 사용된 메기 암컷(a-1), 메기 수컷(a-2) 및 미꾸라지 수컷(a-3).

(des-Gly^{10}[D-Ala^{6}] LHRH-Ethylamide, LHRHa) (Sigma, USA)를 23G×1″ 주사바늘이 달린 5cc 용량 일회용 주사기를 사용하여 복강 주사 하였다. 성숙 메기 암컷을 대상으로 2,000 IU hCG/kg BW와 50 ㎍ LHRHa/kg BW로 병행 처리 하였으며, 산란 유도 호르몬 주사 후 12시간부터 2시간 간격으로 100 ppm의 염산리도카인/1,000 ppm $NaHCO_3$로 마취후 배란을 확인하였다. 메기 수컷과 미꾸라지 수컷의 인공 배정을 위해 메기 암컷에서 수행된 산란 유도 호르몬 처리 방법과 동일하게 처리 하였으며, 단지 처리 산란 유도 호르몬 농도만 각각 ½로 하였다.

마취된 메기 암컷의 복부를 가볍게 압박하여 채란하였으며, 채란된 난의 난질을 확정하였다. 메기, 미꾸라지 및 버들치의 수컷 정액 사용 시간은 메기 암컷에서 최적의 성숙난을 얻을 수 있는 시간과 일치하도록 하였다. 메기 수컷과 미꾸라지 수컷인 경우 각각을 복부 절개 후 성숙 정소를 적출 후 50 ㎖ 용량의 비이커에 옮겨 안과용 곡가위로 세절하여 정액을 수집하였고(그림 2), 버들치 숫컷인 경우 산란 유도 호르몬 처리없이 직접 정액을 착출하였다.

세절 및 착출된 정액은 Dulbecco's phosphate buffered saline (Difco, USA)으로 1:40 배율로 희석하여 수정에 사용하였다. 수정은 습식법으로 하였으며 수정 후 사육수로 세란하여 petridish에 수정난을 부착시켰다. 대조군인 메기군, 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종(hybrid)군, 메기 암컷×버들치 수컷 잡종군, 그리고 자성발생이 가능한 잡종군으로부터 파악된 타 종 정자를 사용한 자성발생성 2배체군을 설정하였다.



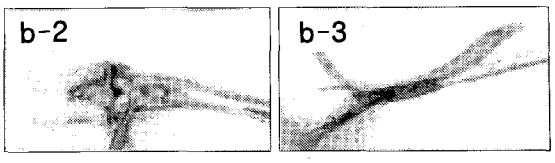


그림 2. 메기의 채란 광경(b-1) 및 메기(b-2), 미꾸라지(b-3) 정소 적출 광경.

2-2. 잡종의 생존율 조사

메기군, 메기 암컷×미꾸라지 숫컷 잡종군 및 메기 암컷×버들치 숫컷 잡종군을 대상으로 메기군의 부화시까지 생존율을 조사하였다. 즉, 직경 13 ㎝의 각 petridish에 각 실험군 당 300개 내외의 난을 부착시켜 메기군의 부화시까지 3시간 간격으로, 수정후 초기와 중기 단계는 저 배율의 해부현미경(MC 80 DX, Zeiss, Germany)으로 정상 발생 유무를 조사하였으며 수정후 말기 단계에서는 사란의 백탁 여부로 생존 수정난을 조사하였다. 생존율은 각 실험군의 생존 수정난 수를 실험 시작시 사용한 각 실험군의 수정난 수에 대한 백분율로 계산하였다. 각 실험군을 대상으로 3 반복 실험하였다.

2-3. Hertwig 효과 조사

미꾸라지 정자를 사용한 메기 자성발생성 2배체 유도를 위해, 정자 불활성화를 위한 Hertwig 효과를 우선 조사하였다. 1차 실험(trial Ⅰ)은 1997년 6월 12일에 2반복 실시하였으며, 2차 실험(trial Ⅱ)은 1998년 6월 24일에 역시 2반복 실시하였다. 13±0.5℃로 설정된 BOD incubator (Jedo Tech. Co., Korea) 내에서 10W의 UV-lamp (Sankyo Denki, Japan)를 15 ㎝ 높이에서 조사하였다. 희석된 미꾸라지 정액을 각 petridish (90×26 ㎜) 바닥에 1 ㎜ 두께가 되도록 도포하였다. 희석 정액에 균일한 자외선 조사를 위해 petridish가 놓여지는 slide shake (Chang Shin Co., Korea) 표면을 aluminum foil로 밀착 부착시켰으며 slide shake의 속도를 단계 4 조건으로 교반하였다. 자외선 농도(erg/㎟)는 radiometer (UVP, USA)로 측정하였으며, 본 실험조건에서 단위 자외선 조사 농도가 60 erg/㎟ · sec인 것

을 고려, 자외선 조사 시간을 조절하여 자외선 조사 총 농도가 1,020~15,000 erg/㎟ 범위가 되도록 하였다 (그림 3).

자외선 조사가 끝난 정자는 각 조사 농도별로 약 100개의 메기 난이 수용된 petridish에 각각 첨가 후 수정시켜 자성발생성 반수체군들을 설정하엿다. 자외선 조사후 수정까지의 모든 작업은 빛에 의한 광재활을 방지를 위해 암조건하에서 실시하였다. 최초 수정 시간은 난의 세정을 위해 사육수를 첨가하는 시간으로 정하였다. 각 자외선 농도에서 미꾸라지 정자에 의한 Hertwig 효과는 자성발생성 반수체가 높은 생존율을 보이는 발생단계에서, 그리고 높은 빈도의 반수체 증후군(haploid syndrome)을 보이는 발생 단계에서 각각 조사하였다. 자성발생성 반수체군의 반수체 증후군 발생 빈도와 생존율을 최초 처리 난 수에 대한 각각의 백분율로 계산하여, 정자 불활성을 위한 적정 자외선 농도를 결정하였다. 아울러 부화직전에 뚜렷한 반수체 증후군을 보이는 자성발생성 반수체군과 메기군을 대상으로 미세 핀셋을 사용하여 난각을 제거한 후, 해부현미경 저배율 하에서 관찰후 사진 촬영하였다.

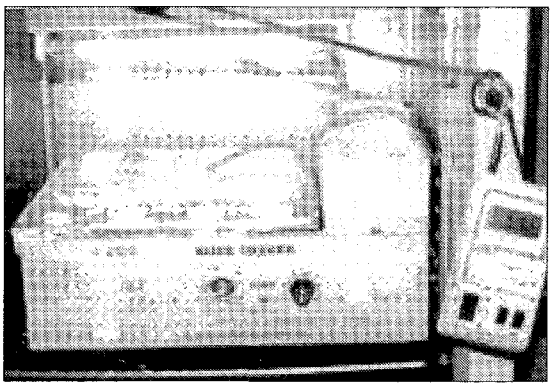


그림 3. UV 조사 광경.

2-4. 감수분열 억제성 자성발생성 2배체

적정 자외선 농도로 불활성화 시킨 미꾸라지 정자에 의한 자성발생성 2배체 메기를 유도하기 위하여, 파악된 적정 자외선 농도로 불활성된 미꾸라지 정자로 메기난을 수정후 24±0.5℃인 지하수 유수 항온수조에서 부화시켰다. 발생중인 수정난을 수정후 3분, 5분 및 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4℃ 저온 처리 하였다(그림 4).

저온 처리가 종료된 후 역시 수온 24±0.5℃로 부화시켰다. 대조군인 메기군, sham 대조군인 메기 암컷×미꾸라지 수컷 잡종군 및 미꾸라지 정자를 불활성화 시켜 수정한 자성발생성 2배체군의 각 처리 조건별 초기 생존율을 조사하였다. 초기 생존율 측정 항목은 생존율, 부화율 및 기형율로 생존율은 수정후 27시간에서 생존율 = (생존난/실험 시작시 처리난)×100으로, 부화율은 수정후 27시간에서 부터 부화시까지의 부화율 = (부화된 개체수/수정후 27시간에서의 생존난)×100 으로, 그리고 기형율은 기형율=(부화직후 기형 개체/총 부화 개체수)×100 으로 계산하였다. 각 처리 조건별로 나타난 초기 생존율 측정 항목을 고려하여 가장 적절한 처리 조건을 파악하였으며, 파악된 처리 조건으로 자성발생성 2배체를 대량 생산하였다.

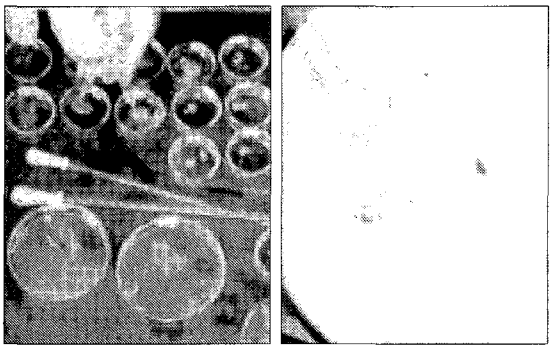


그림 4. 자성발생성 2배체 저온 처리 광경.

2-5. 염색체 조사

본 실험에 사용한 메기군 암컷 그리고 자성발생성 2배체군과 더불어 본 실험시 사용된 미꾸라지 수컷의 염색체 조사를 실시하였다. 염색체 수 조사 및 핵형 분석을 위해 각각 20마리 이상의 개체를 사용하였으며, 부화 직후의 자어는 solid method (Klingerman and Bloom, 1977)로, 그리고 성체는 신장직접법을 사용하여 실시하였다. 염색체 수는 생물현미경(Axioskop, Zeiss,

Germany) 하에서 각 개체당 10여개의 판독 가능한 중기분열상을 대상으로 계수하였고 선명한 분열상을 사진 촬영하여 핵형도를 작성하였다. 핵형 분석은 Levan *et al.* (1964)의 방법에 의거하였다.

2-6. 생식소 및 성비 조사

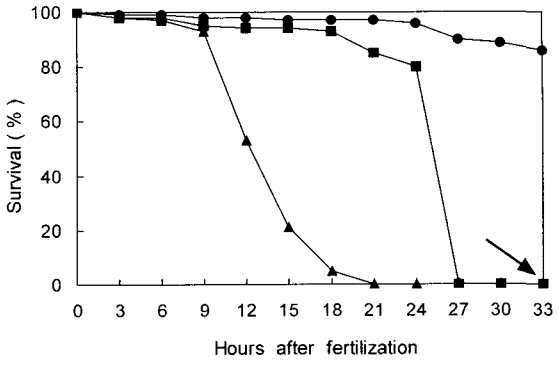
메기군과 자성발생성 2배체군으로 부터의 자어는 지하수가 공급되는, 규격 50×35×25 ㎝(W×L×H)인 용량 45 ℓ의 반 순환 여과식 사각 수조들에서 사육하였다. 메기군과 자성발생성 2배체군의 성비는 부화후 6주와 부화후 10주에 각 50마리를 대상으로 2반복 조사하였다. 부화후 6주의 각 표본 개체는 중성 포르말린에 고정후 머리 부분과 항문 뒤 꼬리 부분을 제거한 후 Bouin's 액에 24시간 재고정 하였다. 아울러 formic acid와 sodium citrate로 고정된 표본을 탈칼슘화 시켰다. 기존의 paraffin 절편법을 사용하여 4~6 ㎛ 두께의 조직절편을 만들었으며, Harris's hematoxylin과 eosin-phroxine B를 병행 염색하여 생물현미경 하에서 검경하여 암·수를 판별하였다. 부화후 10주의 각 표본 개체는 표본 즉시 복부 절개후 생식소를 적출하여, slide glass에 놓은후 cover glass를 덮어 압착법으로 생물현미경 하에서 검경하여 암·수를 판별하였다.

2-7. 통계 분석

본 실험에서 나타난 결과의 통계 처리는 컴퓨터 통계처리 프로그램인 minitab을 사용하여 각 실험 결과의 유의성을 검정 하였으며, 대조군에 대비한 자성발생성 2배체의 성비는 χ^2-test로 그 유의성을 검정하였다.

3. 결 과

메기 *Silurus asotus*군, 메기 암컷×미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 수컷 잡종군 및 메기 암컷×버들치 *Rhynchocypris oxycephalus* 수컷 잡종군을 대상으로 3회에 걸친 생존율 조사 결과는 그림 5와 같다. 메기군은 수정후 24시간까지 96~99%의 생존율을 보였으나, 수정후 27시간의 4~5 체절기에서의 생존율은 90±0.9%로 낮아졌다. 메기군의 수정후 30시간에서의 생존율은 89±0.7%이었으며 부화시기인 수정후 33시간에서의 생존율은 86±0.5%이었다. 메기 암컷×미꾸라지 숫컷 잡종 역시 메기군에서의 결과와 유사하게 수정후 18시간까지는 93~98%의 높은 생존율을 보였으나 수정후 21시간 이후부터는 생존율이 감소하여 수정후 21시간에는 85±0.6%, 수정후 24시간에는 80±0.7% 그리고 수정후 27시간에는 더 이상의 발생이 진전되지 않고 모두 사란이 되었다. 메기 암컷×버들치 숫컷 잡종군의 생존율 역시 메기 암컷×미꾸라지 숫컷 잡종의 생존율과 비교시 유사한 양상을 보여 수정후 9시간까지 93~98%의 생존율을 보였으나 생존율 감소 시기가 더욱 빨리 나타나 수정후 12시간에는 53±0.4%의 생존율을 보였고, 이후 점진적인 생존율 감소를 나타내어 수정후 21시간인 낭배 후기, 배체 발생 초기에서 발생이 정지되었다.



—●— : Normal development of catfish
—■— : Hybrid development between female catfish and male mud loach
—▲— : Hybrid development between female catfish and male *Rhynchocypris oxycephalus*

그림 5. 암컷 메기와 수컷 버들치 간 잡종과 암컷 메기와 수컷 미꾸라지 잡종의 생존율. 화살표는 정상 메기의 부화 시기임.

미꾸라지 정자를 자외선 각 처리농도로 처리후 메기난과 수정한 자성발생성 반수체군의 수정후 24시간에서의 생존율과 수정후 40시간에서의 반수체 증후군 발생 빈도를 2반복으로 조사한 결과는 그림 6과 같다.

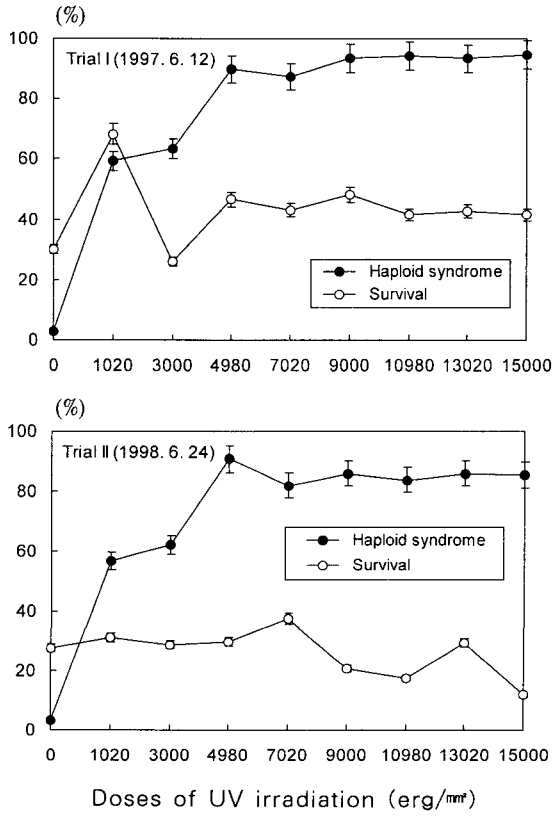


그림 6. UV-조사된 미꾸라지 정자로 수정된 메기 난의 반수체 증후군과 생존율. 생존율은 수정후 24시간에, 반수체 증후군은 수정후 40시간에 측정함. 수직 bar는 평균±표준편차.

그림 6의 trial Ⅰ인 경우, 자외선을 처리하지 않을시 30±1.1%의 생존율을 보였으나 1,020 erg/㎟에서는 68.2±2.7%로 생존율이 증가하였으며 3,000 erg/㎟에서는 26.1±2.0%로 그 생존율이 감소하였다. 4,980~15,000 erg/㎟의 자외선 농도에서는 41.5~48.2%의 생존율을 보였다. 반수체 증후군 빈도는 자외선을 처리하지 않을 경우 2.8±0.1%인 반면 1,020 erg/㎟에서는 반수체 증후군 빈도가 59.3±2.1%로 증가하였다. 3,000 erg/㎟의 자외선 농도에서는 63.4±3.7%의 반수체 증후군 빈도를 보였으며 4,980~15,000 erg/㎟에서는 87.3~94.6%의 높은 반수체 증후군 빈도를 나타내었다.

그림 6의 trial Ⅱ인 경우, trial Ⅰ과 비교시 거의 유사한 경향을 나타내었다. 자외선을 처리하지 않을시 27.8±1.3%의 생존율은 10,980 erg/㎟와 15,000 erg/㎟의 각각 17.6±0.5%, 11.9±0.3%의 낮은 생존율 그리고 7,020 erg/㎟에서의 37.5±1.7%의 높은 생존율을 제외하고는 여타 자외선 처리농도에서의 생존율 20.3~31.2% 수준과 유사하였다. 반수체 증후군 빈도는 자외선을 처리하지 않을시 수정후 40시간에 모두 치사한것에 반해, 1,020 erg/㎟에서는 56.8±2.2%, 3,000 erg/㎟에서는 62.1±2.9%, 4,980 erg/㎟에서는 90.9±4.6%의 반수체 증후군 빈도를 보여 자외선 처리농도 증가에 따라 반수체 증후군 빈도가 증가하였다. 7,020~15,000 erg/㎟에서는 반수체 증후군 빈도가 82.0~86.0%로 다소의 높음과 낮음을 보이며 안정상태를 보였다. 생존율과 반수체 증후군 빈도에서의 결과를 고려시 미꾸라지 정자 불활성화를 위한 적정 자외선 농도는 7,020 erg/㎟ 혹은 9,000 erg/㎟로 규명되었다.

버들치 정자를 자외선 각 처리 농도로 처리후 메기 난과 수정한 자성발생성 반수체의 수정후 21시간에서의 생존율은, 자외선을 처리하지 않을시 모두 치사하였으나(그림 5) 1,020~15,000 erg/㎟의 자외선 농도에서는 25.0~45.0%의 생존율을 보였다. 그러나 이러한 생존율은 수정후 24시간에는 모두 치사하여 0%이었다. 반수체 증후군에 의한 Hertwig 효과 조사는 조사시간인 수정후 21시간에 자성발생성 반수체 발생난이 낭배기 후기 단계이어서 파악이 어려웠다. 버들치 정자의 자외선에 의한 불활성화 적정 자외선 농도 설정 연구는 자성발생성 반수체 수정난의 발생초기에서의 사망 및 늦은 발생으로 인한 반수체 증후군 파악의 어려움에 기인되어 불가능하였다. 메기군과 반수체 증후군을 보이는 자성발생성 반수체의 부화직전 외형은 그림 7과 같다. 메기군은 정상 외형을 보인 반면(그림 7의 a), 반수체 증후군은 정상 메기 외형에 비해, 두꺼우면서 체장이 짧은 몸통, 짧으면서 만곡된 꼬리, 작고 미분화된 두부, 작은 난황 및 난황과 몸통 전반부 사이의 큰 강소 존재등 복합 증세를 보였다(그림 7의 b).

자외선 조사로 불활성화된 미꾸라지 정자에 의한 감수분열 억제성 자성발생성 2배체 유도를 위해 수정

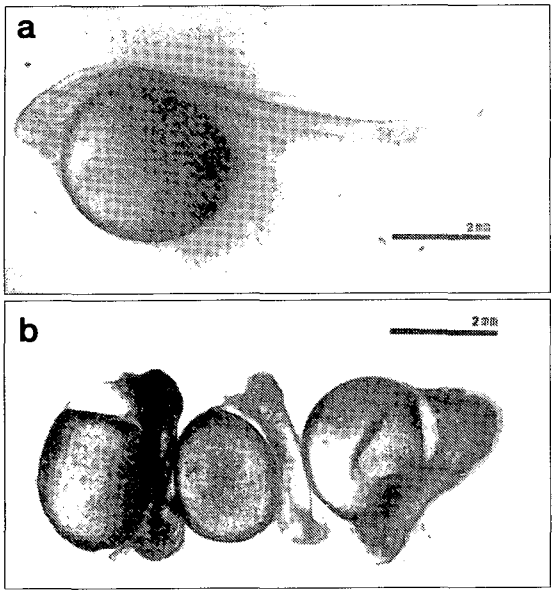


그림 7. 메기 정상 2배체(a)와 UV-조사된 미꾸라지 정자에 의한 자성 발생성 반수체(b)의 부화 직후 외형. 자성발생성 반수체는 비정상적인 안구, 짧고 만곡된 뒷 척추, 짧은 꼬리와 난황 이상의 반수체 증후군을 보임.

후 3분, 5분, 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4℃로, 자외선 9,000 erg/㎟ 농도로 조사된 미꾸라지 정자로 수정된 메기 자성발생성 반수체 난을 저온 처리한 결과는 표 1과 같다. 수정후 27시간에 생존율은 대조군인 메기군은 90.4% 이었고 sham 대조군인 메기 암컷×미꾸라지 숫컷 잡종군은 0%이었다. 불활성화된 미꾸라지 정자로 수정한 자성발생성 반수체군의 수정후 27시간에서의 생존율은, 동일 최초 처리시간 내에서 그 처리시간이 30분, 40분 그리고 50분으로 길어질수록 낮아졌으며, 수정후 저온 처리의 최초 처리시간이 빠를수록 높아지는 경향을 보였다. 부화율은 대조군이 76.4%, sham 대조군이 0%를 나타내었으며 4℃로 저온 처리한 각 실험군중 수정후 5분에 40분간 처리군은 92.4%, 30분간 처리군은 84.8%로 높은 부화율을 보였으며($P<0.05$), 50분간 처리군은 71.6%의 부화율을 보였다. 기형율은 대조군이 6.8%, sham 대조군이 0%인 반면, 4℃ 저온 처리한 각 실험군에서 수정후 최초 처리시간이 빠를수록 그리고 처리시간이 길어질수록 기형율이 증가하는 경향을 보였다. 생존율과 부화율을 고려시 불활성화된 미꾸라지 정자로 수정한 자성발생성 반수체의 유전자 배가를 위한 최적 조건은 수정후 5분에 4℃로 30분간 및 40분간 처리임이 밝혀졌다. 따라서 자성발생성 2배체의 대량생산은 수정후 5분에 4℃로 40분간 저온 처리 조건으로 하였다.

그림 8의 a는 본 실험에 사용된 메기 암컷의 중기상으로서 염색체 수는 2n=58이었으며, 핵형은 12쌍의 중부염색체(metacentrics), 12쌍의 차중부염색체(submeta centrics) 및 5쌍의 단부염색체(acrocentrics)로 구성되었다. 그림 8의 b는 본 실험에 사용된 미꾸라지 숫컷의 염색체 중기상으로서 염색체 수는 2n=48 이었으며, 핵형은 6쌍의 중부염색체, 2쌍의 차중부염색체 및 16쌍의 단부염색체로 구성되었다. 그림 8의 c는 자성발생성 2배체군의 중기상으로서 본 실험에 사용된 메기 암컷의 염색체 수 및 핵형과 동일하였다. 자성발생성 2배체 핵형에는 미꾸라지 정자의 불활성으로 기인되어, 미꾸라지의 염색체를 발견할수 없었다.

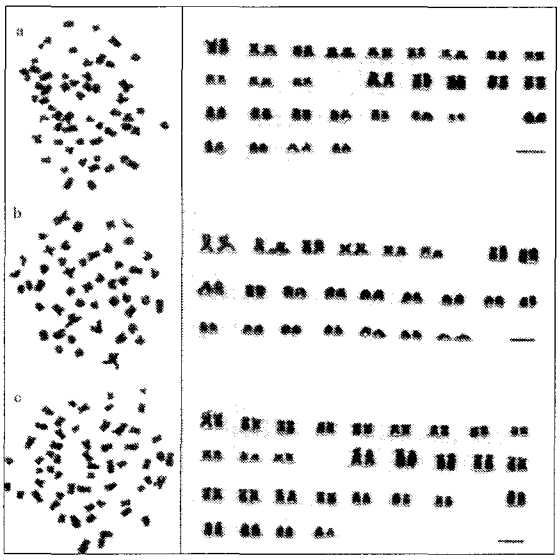


그림 8. 암컷 메기(a), 수컷 미꾸라지(b)와 전암컷 자성발생 2배체 메기(c)의 중기상과 핵형도. Bar는 10㎛임.

표 1. UV-조사된 미꾸라지 정자로 수정된 메기의 난에 수정후 3, 5, 7 분에 4℃ 저온처리를 30, 40, 50분간 처리시 생존율, 부화율과 기형율에 미치는 영향

Exp. group*1	Time of treatment (min)*2	Duration time (min)	Survival of embryos (%)*3	Hatching (%)*4	Abnormality (%)
Intact control		Untreated	90.4	76.4	6.8
Gynogenetic control		Untreated	0	0	0
Gynogens	3	30	31.3[a]	51.8[c]	15.1
		40	27.4[a]	63.7[c]	18.4
		50	21.8	44.2	27.9
Gynogens	5	30	28.2[a]	84.8[b]	11.8
		40	26.5[a]	92.4[b]	12.5
		50	16.5	71.6[c]	19.6
Gynogens	7	30	26.6[a]	23.9	10.0
		40	19.0	29.2	15.8
		50	11.7	21.5	17.4

*1 Data (mean±SD) were based on three replicate treatment. Means with differnt superscripts within a column were statiscally different at $P < 0.05$.

*2 Intact control: catfish sperm mediated; gynogenetic control: mud loach sperm mediated.

*3 Time to start cold shock treatment after fertilization.

*4 Survival of embryos at 27 hours after fertilization.

*5 Hatching from the number of live embryos at 27 hours after fertilization.

표 2는 대조군인 메기군과 자성발생성 2배체군의 성비를 부화후 6주와 부화후 10주에 각각 2반복으로 조사한 결과이다. 부화후 10주에 squash상으로 메기 생식소를 판별한 결과 대조군인 암컷 적출 난소는 주변인기 난으로 구성되었으며 대조군인 수컷 적출 정소는 다수의 섬유상 조직과 정원세포로 구성되어 있었다. 부화후 10주의 자성발생성 2배체는 모두 대조군 암컷과 유사한 단계의 squash상을 보였다. 부화후 10주의 메기 대조군 암·수의 성비는 서로 유사한 반면(P>0.05), 부화후 10주의 자성발생성 2배체는 모두 암컷이었다(P<0.05). 부화후 6주의 메기 대조군인 암컷에서의 조직상은 난소내 난소내관이 존재하였으며 난은 주변인기 상태였다. 부화후 6주의 자성발생성 2배체 암컷의 조직상 난소 특징은 부화후 6주의 메기 대조군 암컷의 조직상과 일치하였다. 부화후 6주의 메기 대조군 암·수의 성비는 서로 유사한 반면(P>0.05), 부화후 6주의 자성발생성 2배체는 모두 암컷이었다

표 2. 대조군과 자성발생 2배체 메기의 성비

Age (weeks after hatching)*1	Exp. group	Replication	Sex ratio (%)*2		Female (%)
			Female	Male	
6	Control	1	52[a]	48[a]	52
		2	49[a]	51[a]	49
	Gynogenetic diploid	1	100[b]	0[b]	100
		2	100[b]	0[b]	100
10	Control	1	49[a]	51[a]	49
		2	53[a]	47[a]	53
	Gynogenetic diploid	1	100[b]	0[b]	100
		2	100[b]	0[b]	100

*1 Sex ratio determined by histological analysis at 6 weeks after hatching and gonad squash method at 10 weeks after hatching, respectively.

*2 Values with different superscripts in each column indicate significant differences from expected 1:1 ratio (χ^2-test, P<0.05).

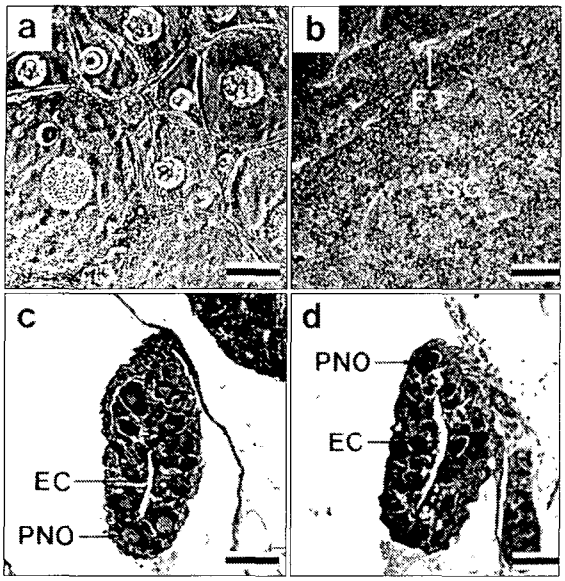


그림 9. 자성발생성 2배체 메기와 대조군의 부화후 10주의 압창상(a,b)과 부화후 6주의 조직절편상(c, d). a, c: 대조군 암컷(scale bar는 각각 40㎛, 50㎛); b: 대조군 수컷(scale bar는 150㎛); d: 자성발생 2배체 암컷(scale bar는 50㎛). EC: 난소내 강소; FT: 섬유상조직, PNO: 주변인기 난모세포, SG: 정모세포

($P<0.05$). 본 실험 결과 메기의 성결정 기구는 암컷 동형접합체임이 밝혀졌다.

4. 고 찰

어류를 대상으로 자성발생 적용시, 만약 그 적용 대상 어류의 암컷이 동형접합체 성을 가진다면, 전암컷 집단을 형성할 수 있다(Ihssen *et al.*, 1990). 어류 자성발생을 유도하기 위해 우선 정자를 불활성시켜 수정하여야 하는바, 자외선 조사는 X선과 ^{60}CO의 γ선에 의한 이온화방사와 더불어 정자의 유전적 불활성화에 효과적이다. 아울러 자외선 조사는 취급시 간편함, 안정성과 아울러 자성발생성 2배체 생산시 이온화방사에 비해 높은 사망을 나타내지 않는 장점 등으로 인해 정자의 유전적 불활성화시 효과적으로 사용되고 있으며(Thorgaard and Allen, 1987), 특히 자외선의 DNA 불활성화시 그 탁월한 효과로 인해, Arai *et al.* (1992)은 최근에 난자의 DNA 불활성화에서도 자외선을 사용한바 있다.

본 실험의 메기 *Silurus asotus* 자성발생 유도에 사용된 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 정자 불활성화의 적정 자외선 조사 농도는 7,020~9,000 erg/㎟로 규명되었으며, 이는 미꾸라지와 근연종인 미꾸리 *M. anguillicaudatus* 정자의 불활성화를 위해 6,000~9,000 erg/㎟의 자외선 조사 농도가 필요로 한다는 Suzuki *et al.* (1985)의 보고와 비교시, 적정 자외선 조사 농도에서 유사한 결과이다. 반면, Kim *et al.* (1993)이 넙치 *Paralichthys olivaceus* 자성발생 2배체 유도를 위하여 사용한 미꾸라지 정자 불활성화를 위한 적정 자외선 조사 농도 3,600 erg/㎟과 비교시, 적정 자외선 농도에서 본 실험과 차이가 있었다. 이는 각 연구시 사용된 미꾸라지 정자의 불활성화 조건 즉, 자외선 조사 처리시의 정자 희석 배율 및 처리 조건의 차이에 의한 것으로도 사료되나, 사용된 미꾸라지 수컷 계통간의 차이에 기인된 가능성도 배제할 수 없다. 버들치 정자의 불활성화를 위한 적정 자외선 조사 농도 결정은, 불활성화된 버들치 정자로 수정한 메기 난 즉, 잡종의 초기 사망율이 잡종유도에 사용된 메기와 미꾸라지 자체의 종간 특이성으로 인하여 매우 높아 어려웠으며, 버들치 정자를 사용한 자성발생성 2배체 또한 이런 이유로 인해서 유도할수 없었다.

어류에서 제 2 감수분열 억제 즉, 제 2 극체 방출 억제는 저온 처리, 고온 처리, 수압 처리 및 화학적 처리로 가능한 것으로(Ihssen *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1996), 본 실험에서 수정후 3, 5 및 7분에 각각 30분, 40분 및 50분간 4℃로 저온 처리를 한 결과, 수정난의 생존율과 기형율은 최초 처리 시간 및 처리 지속 시간에 대하여 각각 반비례 및 비례하는 경향성을 보였다. 반면, 부화율은 각 상이한 최초 처리 시간 및 처리 지속 시간에 있어서 별다른 경향성이 발견되지 않았으며, 생존율, 부화율 그리고 기형율을 고려시 제 2 극체 방출 억제를 위한 적정 처리 조건은 수정후 5분

에 4℃ 저온 처리로 30분간, 40분간 이었다. 본 실험의 메기 제 2 극체 방출 억제 조건을 Choi and Kim (1996)가 보고한 메기 3배체 유도시 처리 조건인 수정 후 5분에 0.2~1.0℃로 30~45분간 처리가 부화율, 생존율과 3배체 유도율을 고려시 3배체 유도에 가장 적절한 조건이었던 결과와 비교시, 두 실험간 처리 수온의 차이 그리고 부화율과 생존율 조사 시기가 서로 상이하여 직접 비교는 어렵다. 그러나 각각의 실험시 사용된 여타 조건과 비교시 각 실험에서의 최적인 제 2 극체 방출 억제 조건이었으며, 두 실험간 약 3℃ 정도의 처리 수온 차이에도 불구하고, 두 실험 모두 최초 처리 시간과 처리 지속 시간에서 유사성을 보였다.

본 실험에서와 같이 자성발생 2배체 생산시 이종의 정자를 불활성화 시켜 자성발생 2배체 개체를 유도하는 기법은, 이종간의 잡종 유도가 불가한 경우 이종 정자에 의한 잡종 개체의 부화전 사망으로 인하여 동종 정자 간에서 나타날 수 있는 유전적 간섭을 억제할 수 있어 보다 확실한 자성발생 개체를 유도할 수 있음이 여러 연구에서 보고되고 있다. 본 실험에서와 같이 타종의 정자에 의한 전암컷 자성발생은 미꾸리 (Suzuki *et al.*, 1985), 참돔 *Pagrus major* (Sugama *et al.*, 1990), 넙치(Kim *et al.*, 1993)와 paddlefish *Polyodon spathula*에서 이루어 진 바 있다. 본 실험에서 사용한 미꾸라지 숫컷의 염색체와 메기 암컷의 염색체 수는 2n=48 및 2n=58 이었다. 본 실험에서 유도된 감수분열 억제성 자성발생 2배체 개체들을 메기 암컷과 비교시 핵형과 염색체 수에 있어서 동일하였으며 특히, 감수분열 억제성 자성발생 2배체의 각 염색체에서 미꾸라지 수컷 정자 핵의 완전한 불활성화로 인한 자성발생에 기인되어, 미꾸라지의 염색체는 발견되지 않았다. 메기는 암·수간 이형의 성 염색체는 존재하지 않아 자성발생 개체들의 성을 염색체 분석 만으로 판별하기는 곤란하나 만약, 메기 암·수간에서 성 염색체를 판별할 수 있는 방법이 개발되어 자성발생 개체들에 적용된다면 자성발생 개체들의 성을 염색체 상 만으로도 판별할수 있으리라 사료된다.

본 실험에서 24±0.5℃ 사육 수온 조건하에서 부화 후 6주와 부화후 10주에 실시한 성비조사는, Choi (1992)가 보고한 메기에서 25℃ 사육 수온 조건에서 부화후 6일(전장 1.5 ㎝)에 생식소의 분화가 일어난다는 결과를 고려시, 정확한 성비 측정을 위하여 적절한 조사 시기였다. 본 실험의 24±0.5℃ 사육 수온 조건하에서 부화후 6주와 부화후 10주의 암·수 성비는 대조군인 경우 거의 암컷:수컷 비율이 1 : 1이었다. Choi (1992)의 연구 결과인 25℃ 사육 조건으로 부화후 40일에 암·수 성비 비율 1.1:1과 본 실험의 성비 결과를 비교시, 비록 사육 수온은 1℃ 내외로 차이가 있으나, 암·수 비율이 거의 동일함을 알수 있었다. 부화후 6주 및 10주에서의 대조군의 암·수 성비가 1 : 1인 것에 반하여 유도된 자성발생 2배체에 있어서는 암컷 개체만이 관찰되어, 본 실험에 사용된 메기의 성결정 기구는 XX-XY형의 암컷 동형접합자임을 확인할수 있었다.

유도된 전암컷 자성발생 2배체를 인위적으로 성전환 시켜 가짜 숫컷을 생산한 후, 이들 성 전환된 자성발생성 2배체 즉, 전 가짜 숫컷과 정상 암컷을 교배하여 전암컷 집단을 생산한 연구가 무지개송어 *Salmo gairdneri*, Atlantic salmon *Salmo salar*, silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* 및 넙치에서 보고되고 있다(Kim *et al.*, 1994). 이러한 점과 더불어, 본 실험에 사용된 메기를 대상으로는 암컷화 호르몬 17β-estradiol을 처리해서 생리학적인 성 전환을 얻은 연구 결과만이 현재까지 보고되어 있을 뿐(Choi, 1992), 전암컷인 자성발생 2배체를 대상으로한 생리학적 성전환 유도 그리고 유도된 전 가짜 숫컷과 정상 암컷과의 교배에 의한 유전학적 성전환에 의한 전암컷 생산은 아직까지 전무한 실정이다. 따라서 앞으로 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

어류 유전육종(Genetics and breeding) 기법중 염색체 공학(chromosome engineering) 기법에 의한 고부가가치 품종의 창출은, 단시간에 적은 경비로 양식 생산고의 향상을 기할수 있는 방편이다(Thorgaard and Allen, 1987). 이러한 염색체공학 기법중 본 연구에서 생산된 자성발생성 2배체 메기와 마찬가지로, 자성발생 기법

에 의해 생산된 자성발생성 2배체는 만약 대상어류가 암컷 동형접합체일 경우 전암컷으로 나타나, 성장 및 외형상 형태, 색깔등의 형질에서 암컷이 숫컷에 비해 월등할 경우 양식산업적으로 적용될 수 있다. 아울러 자성발생성 2배체는 철갑상어 알, 낚시 미끼용 연어과 난과 같이 산업성있는 어란의 생산에 이용될 수 있고, 숫컷의 조기 성숙에 기인한 작은 크기 및 육질 저하 등의 제반 문제를 제거할 수 있어 수산·양식산업에서 예전부터 사용 되어지고 있다(Ihssen *et al.*, 1990).

Gomlesky *et al.* (1979)가 보고한 바와 같이 자성발생 2배체 개체들이 정상적인 생식 능력을 보임을 고려, 본 연구 결과 유도된 자성발생 2배체 개체의 생식 능력에 관한 평가가 차후 있어야 할것으로 사료된다. 아울러, 본 연구 결과 생산된 감수분열 억제성 자성발생 2배체 메기를 대상으로 세대를 걸친 순계 및 clone 형성을 위해 DNA fingerprint에 의한 표식, 확인 및 검정이 필요할 것이다. 메기에서 암컷동형접합체에 기인된 자성발생성 전암컷을 대상으로 암·수 균등한 성비를 보이는 대조군과의 성장 비교가 역시 필요하며 차후, 이러한 성장 비교 결과는 현재의 메기 양식산업에서 암·수간 성장 불균형으로 인한 제반 문제들이 많음을 감안시, 이를 해결하기 위한 한 방편이 될것이라 기대된다.

본 연구는 Korea Research Foundation Grant (Contribution No. KRF-2000-044-H00002)에 의해 수행되었음. 출처: 임재현·조효종·남윤권·김동수·박인석, 2001. 자성발생성 2배체 메기 *Silurus asotus*의 생산. Korean J. Genetics 23: 89-101.

인 용 문 헌

1. Arai, K., T. Masaoka and R. Suzuki, 1992. Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. *Nippon Suisan Gakk.* 58: 1197-1201.
2. Choi, G.C., 1992. Indoor culture and sex reversal with 17β-Estradiol in Far Eastern catfish, *Silurus asotus* (Teleostomi: Siluridae). MS. Thesis, Nat. Fish. Univ. Pusan. 37 pp.
3. Choi, N.J. and S.W. Kim, 1996. Triploid induction and growth of Fareastern catfish, *Silurus asotus*. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency* 52: 25-36.
4. Gomlesky, B.I., V.A. Il'yasova and N.B. Cherfas, 1979. Investigaion of radiation-induced diploid gynogenesis in carp (*Cyprinus carpio* L.). IV, Gonad state and evaluation of reproductive ability in carp of gynogenetic origin. *Genetika* 15: 1643-1650.
5. Ihssen, P.E., L.R. McKay, I. McMillan and P.B. Phillips, 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 698-717.
6. Kim, B.-S., Y.B. Moon, C.H. Jeong, D.S. Kim and Y.-D. Lee, 1994. Evaluation of fertility of artificial induced gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 7: 151-158.
7. Kim, D.S., J.H. Kim, J.-Y. Jo, Y.B. Moon and K.C. Cho, 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Genetics* 15: 179-186.
8. Kim, I.S., 1997. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Freshwater Fishes. Ministry of Education, Korea, vol. 37. 631 pp.
9. Klingerman, A.D. and S.E. Bloom, 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34: 266-269.
10. Levan, A., K. Fredga and A.A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
11. Ministry of Agriculture and Forestry, 1996. Statistical yearbook of agriculture, forestry and fisheries. Korea, 31000-51023-26-01. 478 pp.
12. 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.
13. Oppermann, K., 1913. Die entwicklung von forell-

eneiern nach befuchtung mit radiumbestrahlten samenfäden. *Arch. Microsc. Anat.* 83: 141-189.

14. Park, I.-S., P.K. Kim, J.M. Kim, G.C. Choi and D.S. Kim, 1996. Production of hybrid and allotriploid between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*O. kisutch*). *J. Aquacult.* 9: 133-140.
15. Sugama, K., N. Taniguchi, S. Seki, H. Nabeshima and Y. Hasegawa, 1990. Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 56: 1427-1433.
16. Suzuki, R., T. Oshiro and T. Nakanishi, 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 48: 45-55.
17. Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57: 57-64.
18. Thorgaard, G.H. and S.K. Allen Jr, 1987. Chromosome manipulation and markers in fishery management. In *Population Genetics and Fisheries Management*, N. Ryman and F.M. Utter, eds., University of Washington Press, Seattle, pp. 319-331.