



## 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)의 응성발생성 처녀생식: II. 응성발생성 이배체 유도 및 생존능력 평가

남윤권\*, 방인철<sup>1</sup>, 노충환<sup>2</sup>, 조영선, 김동수  
부경대학교 양식학과/해양수산형질전환생물 연구소,  
<sup>1</sup>순천향대학교 해양생명공학과, <sup>2</sup>한국해양연구원 생물자원본부

## Intraspecific Androgenesis in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*): II. Diploid Restoration and Viability Assessment

Yoon Kwon Nam\*, In-Chul Bang<sup>1</sup>, Choong Hwan Noh<sup>2</sup>, Young Sun Cho and Dong Soo Kim  
Department of Aquaculture & Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO),  
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea  
<sup>2</sup>Marine Resources and Research Department, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan 426-744, Korea

Intraspecific diploid androgenesis was achieved in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) by the inhibition of the first mitotic division using combined thermal treatment. A combined thermal treatment (heat shock at 40.5 °C for 120 sec followed by cold treatment at 1 °C for 45 min) applied to the 1st metaphase of cell division (28 min post insemination at 25 °C) successfully recovered viable androgenetic diploidy. Mean hatching success of the androgenetic diploid group was 29.6%, and the average yield out of total eggs taken was about 7% assessed at 1 week of age. However, relatively large variations in the yield of diploid androgenesis were observed among different egg batches used as cytoplasmic donors. Successful diploidization was confirmed by flow cytometric analysis, and parthenogenic reproduction in a paternal exclusive manner was verified with transgene dosage. Significant mortality was found in most androgenetic groups especially from hatch to 1 month of age, although such mortality was stabilized later.

**Keywords:** Diploid androgenesis, Mud loach, Parthenogenic reproduction, Viability

### 서 론

제1난할 억제 기법(blocking of the first mitotic division)은 어류 인공 처녀생식(induced artificial parthenogenesis)과 4배체(genome duplication; tetraploidy) 유도에 핵심적인 기술로서 온도나 수압 등을 이용하여 제1세포기에서 제2세포기로의 배 발생(embryonic development)을 잠정적으로 정지시키고, 이때 수정란의 염색체 조(chromosome set)가 배가(doubling)되도록 하는 기술이다(Thorgaard, 1986; Arai, 2001). 특히 응성발생성 처녀생식(induced androgenesis)의 경우 정자의 반수체 유전물질만을 이배체로 복원시킴으로써 정자 반수체의 모든 유전자 좌위(loci)를 복제, 동형접합(homozygous)화할 수 있고 이를 통해 요구되는 특정 형질을 다음세대에서 바로 고정할 수 있는 장점이 있다(Bercsenyi et al., 1998; Kirankumar and Pandian, 2003). 때

문에 본 기술은 고도의 순계 또는 복제 어류 계통을 이용하고자 하는 많은 연구에서 중요시되며, 뿐만 아니라 특수 유용 유전체의 복원(genome-restoration) 및 동형접합성 대립유전자의 분리를 위한 방편으로서도 그 응용 범위가 확대되고 있다(Zhang et al., 2000; Babiak et al., 2002a; Kirankumar and Pandian, 2004; David and Pandian, 2006).

그러나 자성발생성 이배체 유도와는 달리 응성발생성 이배체 어류의 유도는 아직 그 유도 효율이 매우 낮은 실정으로서 이는 1) 단황난인 어류의 난을 대상으로 한 완벽한 유전물질 제거의 어려움, 2) 난자 유전물질의 불활성화시 난황 단백질 및 RNA 전구체 파괴에 따른 배발생 능력의 저하, 3) 서로 다른 종의 배우자를 이용할 경우 세포질과 핵간의 불안정성(nuclear-cytoplasmic instability, NCI) 그리고 4) 유도된 개체들의 높은 기형률 및 낮은 초기 생존 능력에 기인한다(Bercsenyi et al., 1998; Babiak et al., 2002b). 따라서 세포질이 거의 없는 정자를 대상으로 유전물질의 제거를 통해 유도되는 자성발생성 이

\*Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

배체에 비해 훨씬 낮은 수율이 보고되고 있다(Bongers et al., 1994; Babiak et al., 2002b). 이에 효율적인 웅성발생성 이배체 어류 시스템을 개발하기 위해서는 첫째, 동일종의 난자를 이용할 경우(intraspecies androgenesis) 처녀생식의 성공여부를 손쉽게 분석할 수 있는 분자 표지가 요구되며, 반면 다른 종의 난자를 이용할 경우 NCI 효과를 최소화하면서 잡종 유전자형이 생존할 수 없는 적절한 종의 선택이 요구된다. 둘째, 유전적으로 불활성화된 난자를 대상으로 최적의 제1난할 억제 조건이 재검정 되어야 하고 셋째, 제1난할 억제를 위해 처리된 고온 및 수압 자극에 의한 장애 효과가 부화 후에도 일정 기간 동안 지속되므로 처리효과의 정확한 평가를 위해서는 생존 능력에 관한 충분한 자료가 확보되어야만 한다.

이에 본 연구는 우리나라 주요 담수 식용 어종이자 어류 유전자 및 염색체 조작 모델로서 많은 장점을 지니고 있는 미꾸라지(*Misgurnus mizolpis*)를 대상으로 종래의 미꾸라지의 이종간 웅성발생성 처녀생식(interspecies androgenesis) 유도에서 관찰된 낮은 유도효율(약 4%; Nam et al., 2002)을 개선하기 위한 연구의 일환으로 동일 종내 미꾸라지 웅성발생성 처녀생식 기술을 개발하고자 하였다. 본 연구의 선행연구로서 미꾸라지를 대상으로 형질전환 유전자 표지를 이용, intraspecies haploid androgenesis를 최적화한 바 있으며(Nam et al., 2006), 이에 본 논문에서는 제1난할 억제를 통해 웅성발생성 미꾸라지의 이배체 복원을 유도하고 유도된 웅성발생성 이배체들의 초기 및 후기 생존능력을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 I: 난자 유전물질의 불활성화 및 온도 자극을 통한 이배체 복원

실험에 사용된 미꾸라지는 부경대학교 양식학과에서 유지하던 5년산 친어군으로서 평균 어체중(body weight BW) 45±13 g의 암컷들과 15±5 g의 수컷 친어들을 이용하였다. 성숙된 친어들로부터 Kim et al. (1994)의 방법에 따라 태반성 성선자극 호르몬(HCG)을 이용하여 산란유도를 수행하였다. 복부 압박법에 의해 난자와 정자를 확보하였다. 산란 유도된 8마리 암컷으로부터 난의 색과 크기 등을 기준으로 상위 난질을 보이는 4마리의 암컷에서 얻은 알을 이용하였으며, 정자시료는 5마리 수컷에서 얻은 정액을 혼합하여 실험에 이용하였다. 난자의 유전물질을 불활성화 시키기 위해 Nam et al. (2006)의 방법에 의거하여 자외선(UV) 처리를 수행하였다. UV 농도는 10,800 ergs/mm<sup>2</sup>를 이용하였으며 불활성화된 난 약 3,000개당 50 µl의 희석된 정액(1:30 in saline)을 이용, 습식법을 통해 인공수정을 실시하였다. 배 발생은 25 °C 항온 수조에서 수행하였으며 제1난할의 증기 분열상인 수정 28분 후 Nam et al. (2004)의 방법에 의거하여 고온 자극(40.5 °C 2분)과 저온 자극(1 °C 45분)을 병행한 온도 처리를 수행하였다. 제1난할 억제 처리가 끝난 수정란들

은 25 °C의 항온 수조에서 부화까지(수정 후 24~27시간) 배 발생을 유도하였다. 이배체 복원 효율을 평가하기 위해서 각 처리구당 3반복구를 설정하여 웅성발생성 반수체 대조군, 웅성발생성 이배체 처리군 및 무처리 이배체 대조군의 부화율 및 난황흡수기(부화 후 36시간)까지의 초기 생존율을 분석하였다.

### 실험 II: 암컷 친어에 따른 웅성발생성 이배체 유도 효과 분석

다양한 미꾸라지 암컷 친어들로부터 난을 확보하고 서로 다른 난질들이 웅성발생성 이배체 유도에 미치는 영향을 분석하였다. 연구실에서 유지하고 있던 서로 다른 계통 및 채집에 의해 확보한 16마리의 암컷(어체중 36~61 g)으로부터 인공산란 기법을 통해 각각 난을 확보하고 상기 조건에서와 같이 난자 불활성화 및 웅성발생성 이배체 유도를 실시하였다. 이때 인공수정에 이용한 정자 시료는 성숙한 총 12마리의 수컷으로부터 얻은 혼합 정액 시료를 사용하였다. 각 수정군을 대상으로 무처리 이배체 대조군 및 웅성발생성 이배체군을 설정하였으며 각 군은 3,000±120개의 난을 포함토록 하였다. 인공수정, 온도 처리, 부화 유도, 부화율 및 초기 생존율 분석은 상기 실험 I과 동일하게 수행하였고, 각 실험군별로 3반복 관찰 자료를 확보한 후 사용한 암컷 친어별 웅성발생성 이배체 유도 효율을 비교하였다.

### 실험 III: 웅성발생성 이배체의 성장구간별 생존율 분석

웅성발생성 이배체의 생존능력을 평가하기 위해서 유도된 웅성발생성 이배체 개체들의 난황흡수 후부터의 초기 및 후기 생존율을 분석하였다. 실험 I 및 II의 결과를 바탕으로 3마리의 암컷과 3마리의 수컷으로부터 얻은 배우자들을 이용하여 웅성발생성 이배체 유도를 실시하고 난황 흡수가 완료된 개체들을 대상으로 1주, 2주, 3주 및 4주째 초기 생존율을 분석하였다. 이후 1개월 간격으로 부화 4개월까지 후기 생존율을 3회 조사하였다. 난황흡수의 완료 시점에서 무작위로 선발된 36미씩을 각각 50 L 수조에 3반복구로 수용하여 생존율을 분석하였으며 수온은 25±1 °C를 유지하였고 여타 실험사육 조건은 Kim et al. (1994)의 방법에 의거하였다.

### 실험 IV: 웅성발생성 개체의 flow cytometry 분석

유도된 웅성발생성 개체들의 효과적인 이배체 복원 여부를 확인하기 위해서 flow cytometry를 이용한 미꾸라지 세포당 DNA 함량을 측정하였다. 전어체 치어 시료들을 homogenization 완충용액(10 mM Tris pH 7.8, 5 mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl)에서 마쇄한 후 20 µm mesh를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포들을 50 µg/ml propidium iodide가 포함되어 있는 염색 용액(1x PBS pH 7.6, 0.01% NP 40)에서 1시간 염색한 후 WinBryte HS flowcytometer (BioRad, USA)를 이용하여 세포당 평균 DNA 함량을 분석하였다. 대조구로서 반수체군, 미꾸라지 정자(1.4 pg/cell), 그리고 정상 이배체의 혈구

세포(2.8 pg/cell)를 이용하였다. 아울러 부화 2개월 이상된 어류를 대상으로 할 경우는 미부정맥으로부터 혈구세포를 채취하여 homogenization과정 없이 상기 언급된 방법을 이용하여 flow cytometry분석을 실시하였다.

### 실험 V: 표지를 이용한 인공처녀 생식 분석

형질전환 유전자 표지를 이용하여 부계 유전, 즉 부계 반수체의 duplication을 확인하였다. 실험에 사용한 형질전환 어류들은 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter construct들이 이식되어 있는 동형접합성(homozygous) 형질전환체로서 본 계통의 자세한 유전학적 특성은 Nam et al. (1999, 2000)에 기술되어 있다. 실험 I의 결과를 바탕으로 본 형질전환 수컷으로부터 얻은 정자 시료와 3마리의 일반 암컷으로부터 유전물질이 불활성화된 난자를 얻어 상기 조건대로 음성발생성 이배체를 유도하였으며 유도된 음성발생성 이배체군 및 일반 대조군을 대상으로 부화 23개월째 flow cytometry를 통해 정확한 이배체 임이 확인된 각 12마리 개체를 대상으로 transgene dosage를 분석하였다. 각 개체의 지느러미(fin)로부터 Nam et al. (1999)의 방법에 의거하여 genomic DNA를 추출하였으며 추출된 genomic DNA 2 µg을 대상으로 dot blot hybridization분석을 실시하였다. 추출된 genomic DNA 시료를 이용하여 positively charged nylon membrane (Roche, Germany)에 dot blot apparatus (Bio-Rad)를 이용하여 3반복 spotting을 실시하였으며 CAT-transgene probe (Nam et al., 2000)를 이용하여 hybridization을 실시하였다. Hybridization과정을 포함하여 stringent washing 및 signal detection과정 모두 제조사(DIG Non-radioactive DNA Labeling and Detection kit, Roche)의 instruction manual에 의거하여 수행하였다. Internal control로서 미꾸라지 growth hormone gene probe (Nam et al., 2002)를 이용하여 CAT transgene signal을 normalization하였다. 부계 음성발생성 처녀생식을 확인하기 위해서 음성발생성 이배체(doubled transgene dosage; homozygous at transgene loci)와 bi-parental 자손(heterozygous transgene dosage)에서 얻어진 signal들을 image analysis software인 Quantity-one (Bio-Rad)으로 분석하였다.

### 통계처리 분석

실험 I에서 음성발생성 이배체 유도 효율을 평가를 위해 조

사한 부화율 및 초기 생존율의 실험군간 유의성 검정은 분산분석(ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 이용하여  $P < 0.05$  수준에서 평가 하였다. 실험 III의 음성발생성 이배체의 생존율 분석은 student's t-test분석을 통해 대조군 이배체와의 생존율과 비교하였고( $P < 0.05$ ), 실험 V의 transgene dosage 분석 역시 Student's t-test를 이용하여 처녀생식군과 bi-parental군이 보이는 transgene signal간의 유의차( $P < 0.05$ )를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 온도 처리에 의한 음성발생성 이배체 유도

본 연구의 실험 I에서 자외선 조사에 의해 유도된 난자 유전물질 제거 효과는 평균 85% 이상으로 나타나(figures not shown) 선행 연구인 Nam et al. (2006)의 결과와 유사하였으며 효과적인 UV처리가 이루어졌음을 알 수 있었다. 제1난할 중기 분열상의 억제제를 통해 생존력이 있는 이배체로의 복원을 유도한 결과, 무처리 이배체 대조군은 90% 이상의 부화율을 보인 반면 10,800 ergs/mm<sup>2</sup>의 UV 조사만을 받은 음성발생성 반수체군은 51.4%의 평균 부화율을, 그리고 동일 농도의 UV 및 온도처리가 수행된 음성발생성 이배체군은 29.6%의 평균 부화율을 나타내었다(Table 1). 음성발생성 이배체군은 무처리 대조군과는 달리 부화후에도 유의적으로 높은 초기 폐사율을 보였다. 대조군의 경우 부화 자어 중 평균 87.5%가 난황 흡수기까지 생존하였으나 음성발생성 이배체군은 단지 37.5%만이 정상적인 발달을 보였고 나머지 개체들은 난황 흡수를 완료하지 못한채 대부분 폐사하였다. 이는 여타 여러 어종에서 관찰된 바와 같이 제1난할 억제를 위해 이용된 온도 자극에 의한 영향이 가장 주된 원인이었을 것으로 판단되나(Pandian and Koteeswaran, 1998) 난자의 유전물질 제거과정에서 유발된 potential aneuploidy 및 hypodiploidy의 출현, 또는 잔존하는 소량의 모계 염색체 절편에 의한 정상적인 세포분열의 저해 역시 원인을 배제할 수는 없다(Corley-Smith et al., 1996; Marengpmo and Onoue, 1998; Tanck et al., 2001). 뿐만 아니라 음성발생성 이배체 유도시 정자의 반수체 유전자 좌위들을 동형접합화하는 과정에서 야기되는 열성 형질(recessive traits)의 축적 역시 높은 초기 사망률의 한 원인으로 작용했으리라 판단된다(Lin and Dabrowski, 1998; Paschos et al., 2001). 부화 1주일째 음성발생성 이배체군으로

**Table 1.** Percent hatching, early survival, incidence of 2N and yield of intraspecific androgenesis in mud loach<sup>1</sup>

Genotype	Hatching success (%) <sup>2</sup>	Early survival rate (%) <sup>2</sup>	Incidence of diploidy (%) <sup>3</sup>
Normal diploid control	91.2±5.8 <sup>a</sup>	87.5±6.8 <sup>a</sup>	100±0.0 <sup>a</sup>
Androgenetic haploid	51.4±9.2 <sup>b</sup>	-	7.1±2.7 <sup>b</sup>
Androgenetic diploid	29.6±8.1 <sup>c</sup>	37.2±5.4 <sup>b</sup>	98.1±2.1 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Mean±SDs are based on at least three replicate examinations. Means with same letters within a column did not differ significantly at  $P=0.05$  based on ANOVA.

<sup>2</sup>Hatching success and early survival up to yolk sac absorption were estimated as percentages of eggs inseminated and hatched larvae, respectively.

<sup>3</sup>Ploidy estimation was carried out using flow cytometry with 1-week-old fish for diploid groups, while the score for androgenetic haploid group was based on the examination of external morphology at 1 day post hatching.

부터 3회에 걸쳐 무작위로 선발한 총 54개체들을 대상으로 flow cytometry를 수행한 결과 aneuploidy peak를 보이는 1마리의 개체를 제외하고 53개체에서(98.1%) 정확한 이배체 DNA 함량이 확인되어 효과적인 이배체 복원이 이루어진 것으로 나타났다 (Table 1; peaks not shown). 그러나 제1난할 억제 처리를 하지 않은 반수체 군에서도 정상 이배체가 7.1%의 비율로 관찰됨에 따라 웅성발생성 이배체군에 속한 생존 개체들 모두가 처녀생식에 의한 웅성발생성 이배체는 아님을 시사하고 있다. 이처럼 반수체군에서 낮은 빈도로 출현하는 이배체 개체들은 유전물질의 제거를 위한 UV처리가 100% 모든 난자를 불활성화 시키지 못하기 때문이며 이와 유사한 결과들이 본 어종 및 여타 어종에서 관찰된바 있다(Maremgpmo and Onoue, 1998; Tanck et al., 2001; Nam et al., 2006).

### Cytoplasmic donor별 웅성발생성 이배체의 유도 효율

상기 실험결과를 바탕으로 다양한 암컷 친어들로부터 얻은 난자(cytoplasmic donor)를 이용하여 웅성발생성 이배체 유도 효율을 조사하였다. 웅성발생성 이배체 수율(yield)을 아래의 계산식에 의해 평가한 결과 동일한 온도 처리 조건임에도 불구하고 사용한 난에 따라 웅성발생성 이배체 수율은 서로 많은 차이를 나타내었다.

웅성발생성 이배체 수율(yield) = [부화율(%) × 난황 흡수기까지의 생존율(부화자어에 대한 백분율) × 난황흡수기부터 부화 1주일까지의 생존율(%) × 이배체 출현 빈도(부화 1주일째 flow cytometry 분석; group별 1220미 분석)]

실험에 사용한 암컷 친어별로 무처리 이배체 대조군의 부화율은 5894%로 다양하게 나타났으며(histograms in Fig. 1a) 이때 각각의 동일한 난군(egg batch)을 이용하여 웅성발생성 이배체 유도를 수행할 경우, 최초 처리 난 수에 대한 웅성발생성 이배체 수율은 0.05% (암컷 no. 5)에서 10.3% (암컷 no. 3)까지 사용한 egg batch들간 큰 차이를 나타내었다(line drawing in Fig. 1a). 본 실험에서 비록 무처리 대조군의 부화율과 웅성발생성 이배체 수율간의 정량적 비례 관계는 관찰되지 않았지만, 대조군 이배체의 부화율이 낮아질수록 웅성발생성 이배체 유도효율은 급격히 감소하는 뚜렷한 결과가 관찰되었다. Fig. 1b를 통해서 상기 자료를 개체간 구분 없이 무처리 대조군의 부화율(X 축)에 대한 웅성발생성 이배체 수율의 각 반복 관찰치(Y 축)로 표현하였으며, Fig. 1b에서 보듯이 대조군의 부화율이 70% 이하일 경우 웅성발생성 이배체의 성공적인 유도는 거의 불가능한 것으로 나타났다. 또한 대조군 부화율이 70% 이상에서도 웅성발생성 이배체 수율은 대조군 부화율의 변화에 매우 민감한 상관관계를 나타내었으며, 이에 웅성발생성 이배체 수율이 7% 이상 확보되기 위해서는 대조군의 부화율이 90%에 근접해야만 가능한 것으로 관찰되었다(Fig. 1b). 이러한 결과는 친어

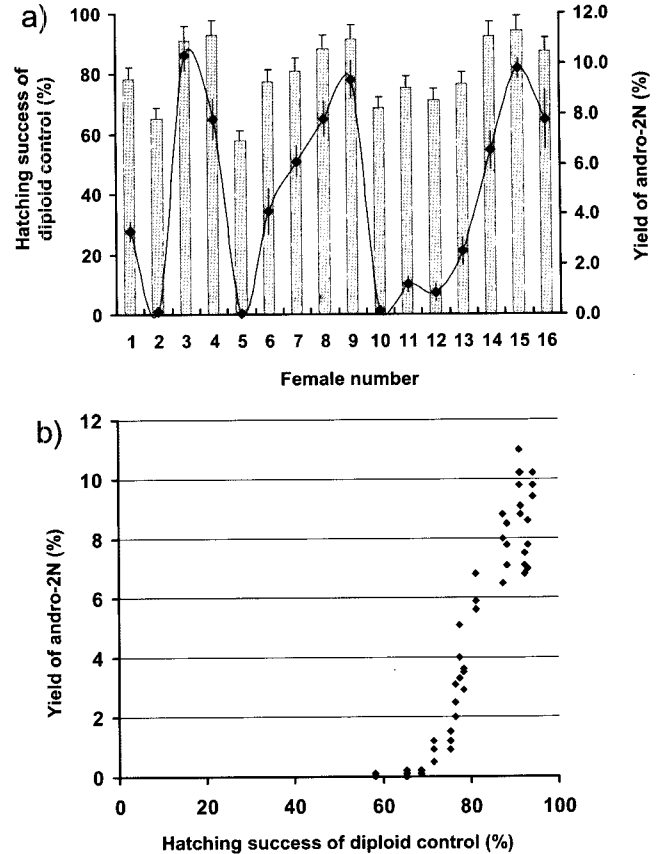


Fig. 1. Maternal influences on the yield (%) of diploid intraspecific androgenesis in mud loach. UV-inactivated egg batches from 16 independent females were separately inseminated with the pooled sperm from 9 males, and subjected to thermal treatment for blocking the 1st cleavage. a) Yields (mean±SDs based on triplicate examinations per cross) of diploid androgenesis at 1 week of age (line drawing) addressed for each female with the comparison of percent hatching for the non-treated control group (histograms) from the same female. b) Percent yields represented as function of the hatching success in diploid control groups without data separation into each female group. Details for calculating the yield of androgenesis can be referred to the equation in Materials and Methods.

의 계통과 난질에 따라 웅성발생성 이배체 유도 성적이 크게 영향을 받는 것으로 알려진 잉어의 실험에서와 유사하였고 (Bongers et al., 1995), 특히 본 어종의 경우는 웅성발생성 이배체 확보를 위해서 최소한으로 요구되는 난질에 대한 임계점이 존재할 수 있음을 잘 시사하고 있다.

### 웅성발생성 이배체의 생존율

웅성발생성 이배체 미꾸라지들의 난황흡수 후 생존율을 분석한 결과, 웅성발생성 이배체군은 모든 조사 시점에서 무처리 대조군에 비해 유의적으로 낮은 생존능력을 보였다(Table 2). 웅성발생성 이배체군은 난황 흡수 후에도 높은 폐사율을 나타내었는데 특히 많은 폐사가 분석기간의 초기에 집중되는 경향을 나타내었다. 난황 흡수 후 1주일째 일반 이배체 대조군의 경우, 평균 97.2%의 높은 생존율을 보인 반면 웅성발생성 이배체

**Table 2.** Percent survival of androgenetic diploid mud loaches along with normal diploid controls as function of age

Age	Normal diploid control	Androgenetic diploid
1 week	98.1±1.6 <sup>a</sup>	69.4±7.3 <sup>a</sup>
2 week	95.4±1.6 <sup>a</sup>	54.6±5.8 <sup>a</sup>
3 week	91.7±2.8 <sup>a</sup>	48.1±4.2 <sup>a</sup>
4 week	88.9±2.8 <sup>a</sup>	38.9±7.3 <sup>a</sup>
2 month	85.2±1.6 <sup>a</sup>	37.0±4.2 <sup>a</sup>
3 month	84.3±3.2 <sup>a</sup>	34.3±4.2 <sup>a</sup>
4 month	83.3±2.8 <sup>a</sup>	34.3±4.2 <sup>a</sup>

Fish were allocated into replicate tanks after yolk sac absorption (see Materials and methods).

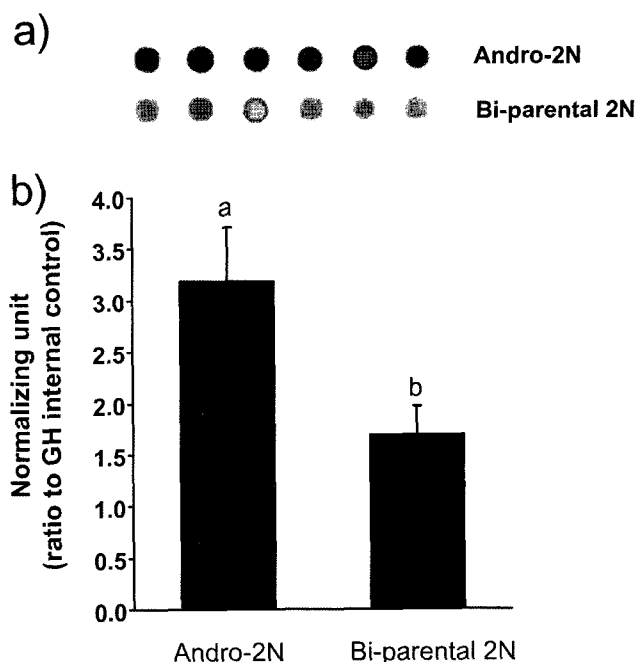
Means with same letters within a row were not significantly different at P=0.05 based on student's t-test.

군은 유의적으로 낮은 69.4%의 생존율을 나타내었다(P<0.05). 그 이후에도 역시 2주, 3주 및 4주째까지 각 구간별로 6.5~14.5%의 폐사가 추가로 발생하였고, 이에 부화 1개월째 누적 폐사율은 일반 대조군이 12%인 반면 용성발생성 이배체는 61%에 달하는 높은 수치를 나타내었다. 그럼에도 불구하고 부화 1개월 이후부터는 용성발생성 이배체군의 생존율이 안정화되는 경향을 나타내어 부화 4개월까지 더 이상의 높은 폐사율(0~2.8%)은 관찰되지 않았고 대조군의 폐사율(0~3.7%)과도 통계적인 유의성을 나타내지 않았다(P>0.05). 그러나 난황 흡수부터 부화 4개월까지 용성발생성 이배체의 최종 생존율(34.3%)은 대조군 생존율(83.3%)의 41%에 해당하는 것으로 나타났다(Table 2).

본 생존율 수치를 이전 실험결과들과의 직접적인 정량 비교는 어려우나 종래 다른 어종들에서도 역시 용성발생성 이배체 어류들의 초기 생존율 저하를 보고하고 있어 유사한 경향을 나타내었다(Bercsenyi et al., 1998; Babiak et al., 2002b). 이러한 처녀생식 계통의 생존율 저하는 동형접합성 획득시 이형접합 상태에서는 표현되지 않는 열성유전자들(recessive genes)이 동형접합화되면서 야기되는 현상으로 판단되며 아울러 특히 초기 자치어 상태에 집중되는 높은 폐사율은 제1난황 여체를 위해 사용된 온도 처리의 장애 효과(adverse effect)가 부화 후에도 상당기간 지속될 수 있음을 나타내고 있다. 염색체 조작시 가해지는 수압, 저온 자극 및 고온 처리 등 자체가 배 발생 및 부화 후 초기 생존율 저하에 영향을 끼친다는 것은 미꾸라지 뿐만 아니라 여타 어종에서 널리 보고된 바 있다(Thorgaard, 1986; Kim et al., 1994). 비록 용성발생성 이배체의 초기 생존율 저하에도 불구하고 안정기에 접어든 후기 생존율의 경우 대부분 실험군에서 대조군과 유의성이 없는 것으로 나타나 생존율이 고려된 용성발생성 이배체 최적 계통의 선발 연구가 필요함을 잘 보여 주고 있다.

**Transgene dosage를 이용한 용성발생성 이배체 분석**

형질전환 유전자 표지를 이용하여 용성발생성 처녀생식을 통해 생산된 이배체 개체들의 부계 유전물질의 배수화(반수체 염색체의 duplication)를 분석하였다. 동형접합성 CAT-transgenic



**Fig. 2.** Transgene dosage assessment in androgenetically derived homozygous (Andro-2N) and bi-parental hemizygous (Bi-parental 2N) mud loaches. a) Representative dot blots showing the difference in hybridization signal between homozygous and hemizygous fish. b) Densitometric analysis of the hybridized signals using the GH gene probe as a normalization control. Statistical difference was found between androgenetic diploid and bi-parental diploid groups based on student's t-test (P<0.05).

수컷으로부터 얻은 정자와 일반 암컷(non-transgenic)으로부터 얻은 불활성화된 난자와의 용성발생성 처녀생식을 유도하였으며 부화 후 2~3개월 사이에 있는 용성발생성 이배체 후보개체들을 대상으로 CAT 형질전환 유전자 좌위의 복제에 의한 형질전환 유전자의 세포당 copy 수(transgene dosage) 증가(homozygous화)를 분석하였다(Fig. 2). 용성발생성군 및 양친을 이용하여 생산한 일반 이배체군(bi-parental 2N)으로부터 각 12마씩을 대상으로 분석한 결과 용성발생성 이배체군 및 대조군 모두에서 dot blot hybridization 분석 시 모든 개체에서 형질전환 유전자의 전달이 관찰되어 실험에 사용한 형질전환 수컷의 동형접합성 상태를 잘 반영하고 있었다(photographs not shown). 그러나 분석에서 검출된 형질전환 유전자의 검출 강도는 용성발생성 이배체군과 일반 대조군에서 서로 다르게 나타남으로써 부계 반수체 염색체 조(chromosome-set)의 복제에 의한 용성발생성 처녀생식 효과를 잘 보여주었다(Fig. 2a). 모계 유전물질의 관여 없이 정자 반수체의 이배체화를 통해 생성된 용성발생성 형질전환체들은 예상대로 형질전환 유전자 좌위에 동형접합인 형태를 나타낸 반면 형질전환 수컷과 일반 암컷간의 교배에 의해 생성된 대조군들은 transgenic hemizygous 상태를 나타내었다(see Nam et al., 2002). GH gene을 내부 대조군 유전자로 이용하여 CAT-형질전환 유전자의 검출 강도를 normalization한

결과 음성발생성 이배체군의 검출 강도는 대조군에서 관찰된 강도에 비해 2배에 달하는 수치를 나타내어 예상과 일치하였다 (Fig. 2b). 그러나 Fig. 2b에서 보듯이 internal control을 이용 normalization을 수행했음에도 불구하고 개체별 검출 강도의 편차가 비교적 크게 나타나 형질전환 유전자 copy수에 관한 정량적인 정밀 측정은 불가능하였다. 이는 blot hybridization 방법 자체가 갖는 검출 감도의 한계에서 기인한 것으로 판단되며 (see Cho et al., 2005) 따라서 향후 real-time PCR 등을 이용한 보다 정밀한 정량 분석이 뒤따라야 할 필요가 있다.

본 연구결과를 통해 동일 종내 생존력 있는 미꾸라지 음성발생성 이배체 유도가 가능하였으며 우수한 세포질 공여자를 선발하여 이용한다면 종래의 잉어 난을 이용할 경우 나타난 낮은 음성발생성 수율을 개선할 수 있는 음성발생성 이배체 유도가 가능할 것으로 판단된다. 그러나 아직 난자 유전물질의 불완전한 불활성화로 인해 야기되는 일부 bi-parental개체들의 출현, 그리고 낮은 초기 생존율 문제는 향후 보다 정밀한 배우자 조작 및 우수계통의 선발 등을 통해 해결해야 할 과제로 남아 있다. 또한 유도된 음성발생성 이배체들을 대상으로 생존율 외에 여타 여러 형질들에 관한 평가(생식능력 등)와 아울러 미토콘드리아 DNA의 유전 여부 역시 평가되어야 할 것이다.

## 요 약

우리나라 주요 담수어종인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)를 어류 염색체 조작 모델로 개발하기 위한 연구의 일환으로 동일 종내 음성발생성 이배체 유도 조건을 개발하고 유도된 음성발생성 이배체의 생존능력을 평가하였다. 자외선(UV; 10,800 ergs/mm<sup>2</sup>)을 이용하여 난자의 유전물질을 불활성화시키고 인공수정 28분 후(제1난할 중기)에 온도처리(고온 자극 40.5 °C 120초 후 저온 자극 1 °C 45분)를 통해 제1난할을 억제하였다. 본 온도처리를 통해 생존력 있는 음성발생성 이배체들이 유도되었고(평균 부화율, 26.9%), 부화 후 1주일째를 기준으로 평균 음성발생성 이배체 수율은 최초 처리난의 7%내외로 나타났다. 그러나 음성발생성 이배체 유도 효율은 cytoplasmic donor의 질에 크게 영향을 받음이 관찰되어 사용한 암컷 친어별로 큰 편차가 관찰되었다. Flow cytometry 분석에 의해 생존력 있는 음성발생성 개체들의 이배체 복원이 확인되었으며 아울러 형질전환 표지를 이용하여 동형접합성 개체 유도의 가능성이 확인되었다. 음성발생성 이배체들은 일반대조군 이배체에 비해 낮은 생존능력을 보였으며 특히 부화 후 1개월까지 유의적으로 낮은 생존율을 나타내었다. 그러나 후기 생존능력은 일반 이배체군과 유사하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지역대학우수과학자 지원 사업에 의하여 연구되었음(KRF-2005-202-F00041).

## 참고문헌

- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197, 205–228.
- Babiak, I., S. Dobosz, H. Kuzminski, K. Goryczko, S. Ciesielski, P. Brzuzan, B. Urbanyi, A. Horvath, F. Lahnsteiner and J. Piironen, 2002b. Failure of interspecies androgenesis in salmonids. *J. Fish. Biol.*, 61, 432–447.
- Babiak, I., S. Dobosz, K. Goryczko, H. Kuzminski, P. Brzuzan and S. Ciesielski, 2002a. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*, 57, 1229–1249.
- Bercsenyi, M., I. Magyary, B. Urbanyi, L. Orban and L. Horvath, 1998. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome*, 41, 573–579.
- Bongers, A. B. J., E. P. C. in't Veld, K. Avo-Hashema, I. M. Bremmer, E. H. Eding, J. Komen and C. J. J. Richter, 1994. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture*, 122, 119–132.
- Bongers, A. B. J., J. B. Abraca, Z. Doulabi, E. H. Eding, J. Komen and C. J. J. Richter, 1995. Maternal influence on development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 137, 139–147.
- Cho, Y. S., B. N. Choi, E.-M. Ha, K. H. Kim, S. K. Kim, D. S. Kim and Y. K. Nam, 2005. Shark, *Scyliorhinus torazame* metallothionein: cDNA cloning, genomic sequence and expression analysis. *Mar. Biotechnol.*, 7, 350–362.
- Corley-Smith, G. E., C. J. Lim and B. P. Brandhorst, 1996. Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*, 142, 1265–1276.
- David, C. J. and T. J. Pandian, 2006. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. *Theriogenology*, 65, 1048–1070.
- Kim, D. S., J.-Y. Jo, and T.-Y. Lee, 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture*, 120, 263–270.
- Kirankumar S. and T. J. Pandian, 2004. Interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm. *Genome*, 47, 66–73.
- Kirankumar, S. and T. J. Pandian, 2003. Production of androgenetic tiger barb *Puntius tetrazona*. *Aquaculture*, 228, 37–51.
- Lin, F. and K. Dabrowski, 1998. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.*, 49, 10–18.
- Maremgpmo, M. G. and Y. Onoue, 1998. Ultraviolet-induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile x blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner). *Aquaculture Res.*, 29, 359–366.
- Nam, Y. K., C. H. Noh and D. S. Kim, 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture*, 172, 229–245.

- Nam, Y. K., C. H. Noh and D. S. Kim, 2006. Intraspecies androgenesis in mud loach (*Misgurnus mizolepis*): I. Optimization of the egg inactivation and haploid androgenesis using transgene marker. *J. Aquacult.*, 19 (in press)
- Nam, Y. K., G. C. Choi and D. S. Kim, 2004. An efficient method for blocking the 1st mitotic cleavage of fish zygote using combined thermal treatment, exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Theriogenology*, 61, 933–945.
- Nam, Y. K., Y. S. Cho, H. J. Cho and D. S. Kim, 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture*, 209, 257–270.
- Nam, Y. K., Y. S. Cho, Y. J. Chang, J.-Y. Jo and D. S. Kim, 2000. Generation of transgenic homozygous line carrying the CAT gene in mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Fish. Sci.*, 66, 58–62.
- Pandian, T.J. and R. Koteeswaran, 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384, 167–243.
- Paschos, I., L. Natsis, C. Nathanailides, I. Kagalou and E. Koletas, 2001. Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda). *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 195–198.
- Tanck, M. W. A. P. Palstra, M. van der Weerd, C. P. Leffering, J. J. van der Poel, H. Bovenhuis and J. Komen, 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genome*, 44, 743–751.
- Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, 57, 57–64.
- Zhang, H., B., Robison, G. H. Thorgaard and S. S. Ristow, 2000. Cloning, mapping and genomic organization of a fish C-type lectin gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1494, 14–22.

---

원고접수 : 2006년 8월 30일

수정본 수리 : 2006년 11월 6일