

# 닭에서 2배수성 卵자의 生成에 關한 研究

呂 政 秀

嶺南大學校 畜産學科

(1988. 5. 19. 接受)

## Induction of the Diploid Ovum in Chicken

Yeo, Jung Sou

Department of Animal Science, Yeungnam University, Gyeongsan Korea

(Received May. 19, 1988)

### SUMMARY

In order to induce the diploid gamete(ovum) under suppression of meiosis in oogenesis for production of polyploid chicken, this experiment checked meiosis time through regular ovulation and response of inhibitor (Tri-ethylen Melamine) to meiosis.

The results obtained was follows;

- \* Meiosis of oogenesis was 2-4 hours before ovulation.
- \* Response of inhibitor to meiosis was effective at 0.3mg triethylen melamine per kg body weight.
- \* Fertility was highly decreased by influence from inhibitor.
- \* 66% of fertilized eggs was triploid(3n) through fertilization induced diploid ovum (2n) with normal sperm(n).

### I. 結 論

家畜의 能力改良을 위한 연구는 最近 遺傳因子 造作 (Genetic engineering) 단계에서 多樣하게 進行되고 있지만 家畜의 遺傳子가 기능이 매우 복잡하고 다양하기 때문에 획기적인 연구결과가 아직 없는 실정이다.

그러나 Comings 와 Okada(1971), Shoffner 등(1972), Shoffner(1975)가 自然狀態에서 아주 낮은 빈도(약 1/10,000)이지만 遺傳物質의 總合體인 染色體의 구성이 3 쌍으로 이루어진 3배수성(triploid, 3n) 닭을 確認하고, 이들이 정상개체(diploid, 2n)보다 체중에서 상당히 增加되는 사실이 밝혀졌다. 이로 인하여 染色體의 倍數性を

인위적으로 增加시키므로 생산량이 증가된다는, 植物을 대상으로 한 研究結果들을 감안할 때 인위적인 3배수성 개체의 생산이 家畜의 能力改良에 크게 기여할 것으로 기대되어져 왔다.

그후 Wang 과 Shoffner(1980), Wang 등(1982)은 닭에서 染色體 倍數性 增加試驗을 통하여 胚兒狀態의 수정란에서 12% 정도의 3배體를 관찰할 수 있었으며 이들을 부화하여 5수의 3배體닭을 生産하였다.

이어서 Shoffner 와 Guise(1984)는 多倍數性 個體의 生産에 問題點으로서 2n狀態의 配偶子(gamete) 生産, 不均衡의 인·配偶子間的 結合, 多倍數性 個體의 生理的 適應性에 대한 問題點을 提示하고 이러한 生理的·遺傳的 機轉을 正確히 밝혀드리로서 家畜의 能力改良에 획기적인 結果가 創出될

“이 논문은 1987년도 문교부 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”

것이라고 지적하였다.

그러므로 본 연구는 家畜의 能力改良을 위한 多倍數性 (polyploid) 個體 生産에 目的을 두고 遺傳, 生理的인 機轉의 規명이 容異한 닭의 卵子生成過程 (oögenesis)의 染色體數가 半減되는 減數分裂 (meiosis) 段階를 人爲的으로 抑制하여 多倍數性 個體 生産의 基本인 2倍數性 配偶子 (卵子)의 大量生産機轉을 밝히고자 한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

各 個體의 排卵時間을 正確히 推定하기 위하여 매일 産卵時間이 일정한 時期인 産卵피크의 Leghorn 암탉을 使用하였다.

### 2. 減數分裂 時期와 減數分裂抑制劑의 反應

正常的인 卵子生成過程中 減數分裂 時期를 推定하기 위해서 排卵時間을 起點으로 역 (逆) 으로 每時間別 減數分裂抑制劑인 TEM (Triethylen Melamine)을 注射하여 TEM量과 減數分裂時間을 推定하였다.

이때 Fig. 1에서와 같이 減數分裂 I에서 TEM의 影響이 있었던 個體에서 얻어진 受精卵은 3A+

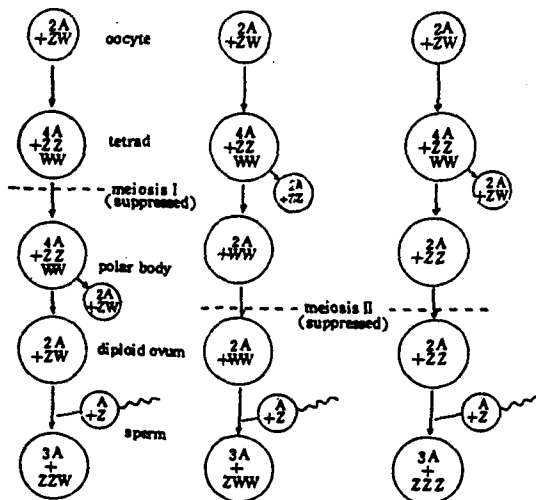


Fig. 1. Production of diploid ovum under suppression at meiosis I and II in oögenesis

ZZW의 胚兒로 判明되고 減數分裂 II에서 TEM의 影響이 있었을 경우는 3A+ZZZ, 또는 3A+ZWW의 胚兒가 되므로서 2倍數性 配偶子 (卵子)의 生産을 判別하게 된다.

### 3. 2倍數性 卵子의 生成

排卵된 時間을 起點으로 減數分裂時間이 推定되고 減數分裂에 TEM의 反應이 決定된 後, 每5分間隔으로 産卵週期를 觀察하여 正確한 排卵時刻를 判明하였다. 이를 根據로 正確한 減數分裂 I과 II의 時期를 밝히고 TEM의 影響을 더욱 正確히 規明하므로서 大量의 受精卵의 染色體 分析을 통하여 2倍數性 卵子 (2n) 生産을 把握할 수 있다.

### 4. 染色體 分析

受精卵을 37.5°C에서 24時間 培養하고 鷄卵의 凍단부를 1cm크기로 과각하여 0.05% colchicine 0.33cc를 胚兒에 注入시킨 後 37.5°C에서 1時間 더 培養시킨다. 그리고 鷄卵을 完全破殼하여 胚兒를 分離시키고 0.45% sodium citrate 溶液에 20分 低張處理를 하여 methanol : acetic acid (3:1) 固定液에 處理後 slide에 도말, 染色하였다.

## III. 結果 및 考察

減數分裂時間의 推定은 卵子生成過程에서 TEM 處理로 2倍數性 卵子를 生産하는데 重要한 要素이다. 그러므로 排卵時間이 일정한 個體를 對象으로 Fig. 2에서와 같이 排卵時間 前 每時間別로 減數分裂 抑制劑를 目的으로 TEM量을 多樣하게 注入한 結果, 암탉의 體重 kg당 0.2mg이하의 TEM量을 處理한 境遇는 受精率에 影響이 없었으나 TEM量이 0.5mg以上으로 排卵 2~4時間前의 注入의 境遇에는 거의가 無精卵이 나타났고 排卵 5時間以前 處理에서는 많은 受精卵을 얻을 수 없었다. 여기서 TEM의 影響은 排卵前 4時間 부터 2時間사이에 卵子生成에 크게 影響하고 있음을 알수가 있어 個體의 差異는 있으나 大部分의 個體에서는 減數分裂이 排卵前 2-4時間前에 일어남을 알수 있었다.

TEM處理後 다음날에 生成된 鷄卵을 培養하여

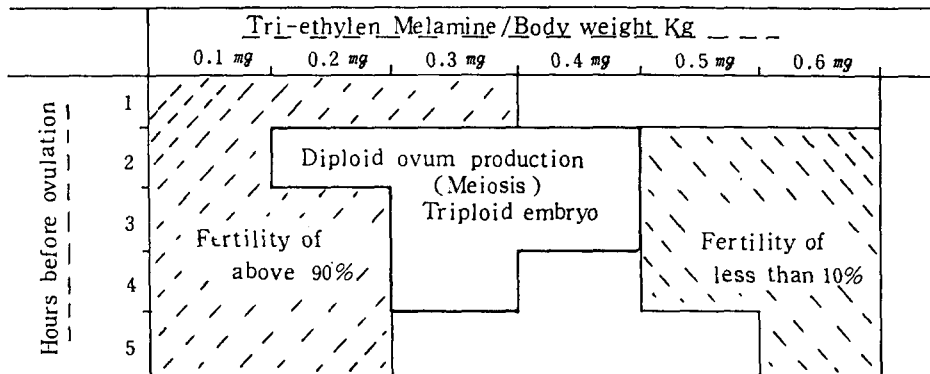


Fig. 2. Fertility and diploid ovum production at stage of meiosis suppressed by 6 dosages of Tri-ethylen Melamine (TEM)

胚兒의發育이 계속되는 受精卵의 染色體를 分析한 結果는 排卵時間 前 2~3時間에 0.2~0.4 mg의 TEM을 處理한 境遇에서만 少數의 3倍數性 胚兒

를 觀察할 수 있었다 (Fig.3). 이러한 3倍數性 胚兒는 卵子生成過程 中에 減數分裂에서 TEM의 影響을 받아 減數分裂이 抑制된 2倍數性 卵子(2n)



Fig. 3. Chromosome spread(A) and karyotype(B) of triploid(3n) embryo

와 正常的인 精子(n)의 受精으로 나타나는 結果인 것이다.

이 結果에서 卵子生成過程 中 減數分裂의 時期와 TEM의 反應을 推定할 수 있었으나 2回의 減數分裂 時期가 明確히 區別되지 못하였고 受精率에 影響이 最小化되면서 卵子生成에 影響을 주는 TEM의 量이 正確히 判斷지을 수 없었다. 그러나 이러한 結果를 토대로 產卵週期가 일정한 白色 Leghorn의 減數分裂時期를 把握할 수 있었고 TEM의 量은 2倍數性 卵子를 얻을 수 있었던 水準(0.2~0.4 mg/體重kg), 卽 in vivo 狀態의 染色體分析方法에서 生體에 影響이 없이 細胞分裂에만 影響을 주는

TEM水準 (Shoffner 等, 1967; Snyder等, 1975; Zimmerman, 1967)인 體重 kg當 0.3 mg을 合理的인 注入量으로 決定할 수 있었다.

1,2次 減數分裂의 時間을 規明함과 同時에 適定 TEM影響에 의한 2倍體性 卵子 大量生産을 위해서 體重 kg當 0.3 mg의 TEM을 0.05% 溶液으로 만들어서 排卵時間이 正確한 個體에 排卵前 2, 3時間前에 腹腔에 注射하여 大量으로 確保한 鷄卵의 實驗結果는 Table 1과 같았다.

일정한 產卵週期를 보인 132數의 白色 Leghorn 個體에서 120個의 鷄卵을 얻었다. 이때 모든 鷄卵을 24時間 37.5°C에서 培養한 後 染色體分析을 통하여

Table 1. Production of diploid ovum(triploid embryo) under suppression at meiosis I and II in oögenesis

| Before ovulation | Tem suppression |                 | Chromosomally analyzed eggs(%) |               |               |             |
|------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|---------------|---------------|-------------|
|                  | Eggs/chicks     | Fertile eggs(%) | Total                          | 2n            | 3n            | Abnor.      |
| 3hrs             | 52/58           | 20(38.46)       | 16                             | 2<br>12.5 %   | 13<br>81.3 %  | 1<br>6.25 % |
| 2hrs             | 68/74           | 26(38.24)       | 22                             | 8<br>36.4 %   | 12<br>54.6 %  | 2<br>9.09 % |
| Total            | 120/132         | 46(38.33)       | 38                             | 10<br>26.31 % | 25<br>65.79 % | 3<br>7.89 % |

胚兒를 發見할 수 있었던 受精卵은 46個로 38%의 受精率로 TEM處理가 안된 對照區의 90%에 比해서 相當한 受精率의 低下를 招來하였다.

染色體分析은 38 胚兒에서 3倍數性(3n) 胚兒가 66%로서 대단히 높은 頻度로 나타났고 奇形의 染色體像이 8%程度, 正常胚兒인 2倍數性은 26%였다. 또한 Table 2에서 3n 胚兒中 排卵 3時間前 TEM處理에서는 3A+ZZW의 染色體像을 가진 胚兒만 觀察되어 모든 2倍數性 卵子가 減數分裂 I에서 TEM의 影響으로 生成된 것임을 알수가 있었다. 그리고 排卵 2時間前 TEM處理에서는 3倍

數性 胚兒 中 減數分裂 I의 TEM 影響에서 나타나는 3A+ZZW 染色體像이 9個이고 減數分裂 II의 影響에서 나타나는 3A+ZWW 2個, 3A+ZZZ 1個의 染色體像을 觀察하였다. TEM影響이 미친 減數分裂期間은 1次의 分裂이 1-2時間 程度로 길고 2次分裂은 상당히 짧은 것으로 觀察되어졌다.

이러한 結果에서 2n의 受精卵은 처음부터 胚兒로 成長할 수 있는 것이기 때문에 TEM處理에 의한 受精率 低下 原因은 2倍數性 卵子(2n)와 單數性 精子(n)와의 受精時에 遺傳的·生理的인 不均衡에서 正常的인 受精이 이룩되지 못했거나 受精이

Table 2. Relationship between TEM Suppression and induced diploid gametes

| Kinds of triploid | Suppressed time before ovulation | Number of embryos | Postulation of TEM suppression | Expected time of <sup>a</sup> meiosis |
|-------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 3A + ZZW          | 2 hrs                            | 9                 | Meiosis I                      | 1 ~ 2hrs(long)                        |
|                   | 3 hrs                            | 13                | "                              |                                       |
| 3A + ZWW          | 2 hrs                            | 2                 | Meiosis II                     | 10~20Mins(Short)                      |
|                   | 3 hrs                            | 2                 | "                              |                                       |

되었다 하더라도 發育中止가 되는 경우로 判斷할 수가 있다. 그리고 減數分裂 I, II時期의 明確한 區分은 排卵前 2~3時間에 大部分 減數分裂 I이 일어나고 있으며 排卵前 2時間을 前後한 짧은 時刻에 減數分裂 II가 일어나고 있음을 判斷할 수 있다.

이렇게 減數分裂 II가 짧은時間에 일어나는 現象은 배等(1987)이 精子形成過程에서 그리고 Sturkie(1975)가 指摘한 바가 있었다. 또한 Shoffner와 Guise(1985)가 주장한 2n의 卵子와 正常(n) 精子 結合時 遺傳的이거나 生理的인 不均衡狀態에서 惹起되는 受精率의 低下는 Wang等(1980,1982)의 報告와 一致하였으나 이들 結果에서 減數分裂 I

II時間의 推定이 不明確하였고 3倍數性 胚兒의 生成頻度가 13%로 낮았는데 이는 排卵時刻의 正確한 推定이 이뤄지지 못하므로써 TEM影響時間 判斷이 未洽한데 起因된 것으로 思料된다.

本 結果를 土臺로 大量的 3n 受精卵生産으로 非正常인 3倍數性 受精卵의 孵化過程 中 여러 問題點을 克服하여 3倍數性 個體가 生産되면 家畜의 能力改良에 큰 期待를 할 수 있으리라 믿는다.

#### IV. 摘 要

白色 Leghorn 암탉의 卵子生成過程 中 減數分

裂을 抑制하여 2倍數性 卵子(2n)의 生産에 根據한 多倍數性 家畜生産과 能力改良의 基礎研究인 本實驗에서 減數分裂時期는 排卵前 2~4時間이고 이 때에 體重 kg當 0.3 mg의 TEM (Tri ethylene

melamin)을 腹腔에 注入하여 受精率 38%의 鶏卵을 얻었고 이들中 66%가 TEM의 影響으로 2n의 卵子가 生成되어 正常精子와의 結合으로 3倍數性(3n)의 胚兒로 나타났다.

## V. 引用文獻

1. Bloom, S.E., 1970. Trisomy-3,4 and triploidy(3A+ZZW) in chicken embryos: Autosomal and sex chromosomal nondisjunction in meiosis. *Science*: 457-458.
2. Comings, D.E. and R.A.Okada, 1971. Triple chromosome pairing in triploid chickens. *Nature(London)* 231; 119-121.
3. Shoffner, R.N., A. Krishan, G.J. Haiden, R.K.Bammi and J.S. Otis, 1967. Avian chromosome methodology. *Poultry Science*, 46; 333-334.
4. Shoffner, R.N., N. Wang and J.S.Otis, 1972. Gametogenesis in triploid chickens. *Genetics*, 71 (2); 59.
5. Shoffner, R.N., 1975. Heteroploidy and chromosomal rearrangements in *Gallus domesticus*. *Genetics Lecture*, vol.4, Oregon State University Press; 177-188.
6. Shoffner, R.N. and K.Guise, 1984. Genetic-biotechnological characterization and perservation of poultry germ plasma. Annual Report of the Minnesota Cooperative Region Project, NC-168.
7. Snyder, M.D., N.S.Féchheimer and R.G. Jaap, 1975. Incidence and origin of heteroploidy especially haploidy in chick embryos from intraline and interline matings. *Cytogenet. Cell Genet.*, 14; 63-75.
8. Sturkie, P.D., 1975. Avian physiology. 3rd edition, Springer-Verlag, New York; 331-347.
9. Wang, N., R.N. Shoffner, J.S. Otis and K.M. Cheng, 1982. The induction of chromosomal structural changes in male chickens by the alkylating agents; tri-ethylene melamine and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 96; 53-66.
10. Wang, N. and R.N. Shoffner, 1980. Induction of heteroploidy in *Gallus domesticus*. *Mutation Research*, 69; 263-273.
11. Zimmerman, A.M. and S. Zimmerman, 1967. Action of colcemid in sea urchin eggs. *J. Cell Biology*, 34; 483-488.
12. 배인수, 강태석, 여정수, 정유열. 1987. 닭 精子細胞에서 染色體 構造의 變化. 영남대학교 자원문제연구논문집. 제6권1호: 29-33.