

황복, *Takifugu obscurus* (Teleostomi : Tetraodontiformes)의 세포유전학적 연구

박인석 · 김형선* · 김은실* · 김정혜 · 박철원*
군산대학교 해양자원육성학과, *한국해양연구소 해양생물공학연구그룹

Cytogenetic Analysis of River Puffer, *Takifugu obscurus* (Teleostomi : Tetraodontiformes)

In-Seok PARK, Hyung-Sun KIM*, Eun-Sil KIM*, Jung-Hye KIM and Chul-Won PARK*

Department of Marine Living Resources, Kunsan National University, Kunsan 573-360, Korea

*Marine Biotechnology Research Group, KORDI, Ansan P. O. Box 29, Ansan 425-600, Korea

The cytogenetic analysis of river puffer, *Takifugu obscurus* belongs to Family Tetraodontidae, was performed. The chromosome number of *T. obscurus* was 44 and the fundamental number was 64. Heteromorphic sex chromosomes were not found. The mean cellular size and nuclear size were $11.01 \times 7.95 \mu\text{m}$ and $4.05 \times 3.15 \mu\text{m}$, respectively. The mean surface area and volume in cell and nucleus were $68.76 \mu\text{m}^2$ and $366.00 \mu\text{m}^3$, $10.06 \mu\text{m}^2$ and $21.36 \mu\text{m}^3$, respectively. The number of erythrocyte of both female and male was $12 \sim 13 \times 10^5/\text{ml}$. Gill tissues from diploid individuals had cells with one or two nucleoli. These cytogenetic studies should be used for cytotaxonomy and as a valuable estimation of polyploidy to come in *T. obscurus*.

Key words : river puffer, *Takifugu obscurus*, chromosome, cellular and nuclear size, nucleolus

서 론

황복, *Takifugu obscurus*은 분류학적으로 복어목 (Tetraodontiformes), 참복과 (Tetraodontidae)에 속하는 어류로 우리나라의 금강, 한강 및 임진강 등의 서남 연안과 하천하류, 황해, 동중국해와 남중국해, 특히 우리나라의 서해안에서 중국 남부로 흐르는 강의 중하류와 바다에 분포하는 한국 특산종이다 (Chyung, 1977). 황복은 봄철에 하천으로 소상하여 산란하며 최근 고급 어종으로 각광받기 시작한 이후 남획 및 번식장 파괴등으로 인하여 자원량이 급격히 감소하였으며 종 보존 및 새로운 양식품종의 개발을 위한 연구가 시도되고 있다 (Jang, 1996; KORDI, 1995).

염색체공학 (chromosome engineering) 기법 중 3배체 (triploid)화는 유도 3배체가 불임을 나타내므로 유도 3배체의 성적성숙기에 높은 생식소지수를 성장에 재회수하여 사용할 수 있으며, 성숙에 연관된 여타 나쁜 부수효과를 제거할 수 있다 (Kim et al., 1994, 1995; Lincoln and Scott, 1984; Park et al., 1994).

아울러 어류 배수화는 세포 크기 증가는 물론 인의 크기와 수, 염색체수 증가를 야기하나 적혈구수는 2배체에

비해 감소를 보이고 있다 (Aliah et al., 1991; Park and Park, 1995; Sezaki et al., 1988; Ueno, 1984). 그러므로 염색체수 조사, 인의 수 조사, 적혈구의 세포 및 핵 크기 측정과 적혈구수 조사는 배수화의 수준을 판별할 수 있는 방편으로 사용될 수 있다 (Kim et al., 1994; Park and Kim, 1994; Thorgaard, 1986).

본 연구는 황복에 대한 분류학적 연구 및 차후 황복의 양식산업화에 필요한 염색체공학의 적용을 위한 연구의 일환으로 추진되었으며, 황복 2배체를 대상으로 염색체수 조사, 핵형분석, 인의 수 계수 그리고 적혈구 세포 및 핵 크기 조사와 적혈구수 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

황해와 연결된 서해 임진강 중류에서 봄철 산란기에 채포된 황복, *Takifugu obscurus* 친어로부터 인공종묘 생산된 체중 100~200 g인 황복 30마리 (암컷 16마리, 수컷 14마리)를 분석에 사용하였다. 모든 표본은 생식소압착법 (Park et al., 1993)에 의해 암·수성을 구별하였다.

염색체의 제작은 Kim et al. (1982)의 방법에 의거

본 연구는 한국해양연구소에서 수행된 농림수산특정연구사업과제 "황복종묘 대량생산 및 증·양식기술개발 (BSPG 00225-876-3)" 연구의 일부로 이루어진 것임.

Table 1. Results of karyotypic analysis of *Takifugu obscurus*

Number and sex of specimens	Cells examined	Karyotypes*			2n	Fundamental number (FN)
		M	SM	T		
16 (♀)	318	4	16	24	44	64
14 (♂)	294	4	16	24	44	64

* M : metacentric; SM : submetacentric; T : telocentric.

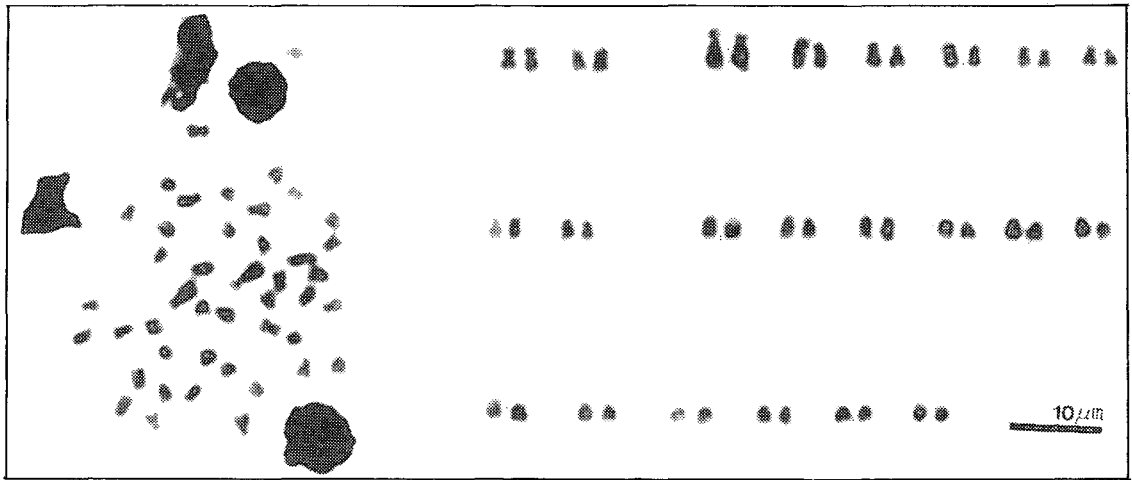


Fig. 1. Metaphase and idiogram of *Takifugu obscurus*.

신장직접법으로 하였다. 황복 각 개체에 colchicine (Sigma, USA)을 1~10 $\mu\text{g/gBW}$ 로 복강주사 하였으며 주사 후 3~4시간에 표본하였다. 신장조직을 적출 후 상온의 0.075 M KCl에서 세절하였으며 상등액을 원심분리 (800 rpm, 10분)하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하였으며 신선한 methanol-acetic acid (3 : 1) 용액에 2번 고정하였다. 슬라이드는 평상의 공기건조법으로 제작하였으며 Gurr's-R 66 Giemsa (BDH, UK)로 염색하였다. 염색체수 판별과 핵형분석을 위해 각 표본당 최소한 20개 이상의 계수 가능한 중기상을 관찰하였다. 제작이 잘된 중기상은 $\times 1,000$ 의 배율로 사진촬영하였다. 각 염색체를 대상으로 fundamental number (FN)를 측정하였으며 역시 각 염색체의 상대길이 (relative length)와 완비 (arm ratio)가 백분율로 각각 측정되었으며 핵형분석은 Levan et al. (1964)의 기준에 의하였다.

세포와 핵 크기 측정을 위해 적혈구를 사용하였다. 각 표본의 미병부위 복대정맥으로부터 heparin처리된 일회용 1 ml 주사기 (22G \times 1 $\frac{1}{4}$)로 채혈하였다. 혈액 smear는 평상의 방법에 의하였으며 Giemsa 용액 혹은 MayGrünwaldt-Giemsa 용액으로 염색하였다. 최소한 120개의 적혈구를 관찰하였으며 적혈구 세포의 장축, 단축과 그들 핵의 장축, 단축을 $\times 1,000$ 배율의 현미경 하에서 eye micrometer로 측정하였다. 적혈구 핵 및 세포에서의 측정

결과를 기준으로 3가지 parameter를 결정하였다 : 장축/단축 (a/b); 표면적 (S) = $a^2b/4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978); volume (V) = $4\pi (a/2) (b/2)^2/3$ (Lemoine and Smith, 1980). 적혈구수는 Thoma Zeiss's haemacytometer로 평상의 방법으로 계수하였다.

아가미조직의 일부를 절취후 methanol-acetic acid (3 : 1) 용액에 하루 이상 고정후 Kligerman and Bloom (1977)의 방법으로 slide를 제작하였으며 인을 파악키 위해 Gold (1984)의 방법으로 염색하였다. 각 개체당 2장의 slide를 제작하였으며 slide당 50개의 세포를 대상으로 nucleoli/cell을 계수하였다.

결 과

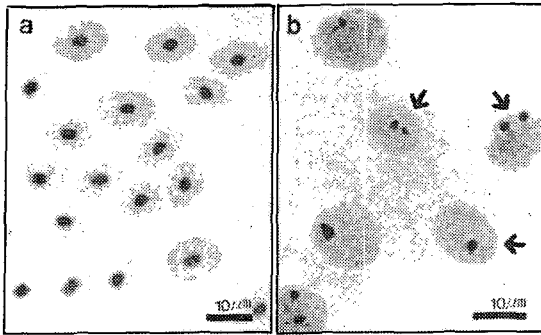
황복의 염색체수는 $2n=44$ 로 자연발생적 3배체는 발견할 수 없었으며 fundamental number (FN)은 64개로 나타났다 (Table 1). 암·수에서 염색체는 공히 22쌍으로 이루어졌으며 암·수간 이형의 성염색체는 발견할 수 없었다 (Table 1 and Fig. 1). 1번과 2번의 염색체쌍은 중부염색체로 상대길이는 5.72, 4.43 그리고 완비는 1.07, 1.16으로 각각 나타났다. 염색체쌍 3번, 4번, 5번, 6번, 7번, 8번, 9번 그리고 10번은 차중부염색체로 상대길이는 4.40~8.90, 완비는 1.47~3.00으로 나타났다. 염색체쌍

Table 2. Chromosome characteristics of karyotypes of *Takifugu obscurus*

Chromosome pair No.	Relative length (%)		Arm ratio ¹		Type ²	Chromosome pair No.	Relative length (%)		Type ²
	Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	
1	5.72	0.51	1.07	0.09	M	12	5.06	0.49	T
2	4.43	0.42	1.16	0.08	M	13	4.53	0.40	T
3	8.90	0.78	3.00	0.18	SM	14	4.20	0.38	T
4	6.49	0.58	1.77	0.11	SM	15	4.16	0.40	T
5	5.35	0.34	1.47	0.10	SM	16	3.92	0.34	T
6	4.78	0.41	1.85	0.12	SM	17	3.90	0.29	T
7	4.63	0.37	1.86	0.09	SM	18	3.60	0.27	T
8	4.53	0.40	1.80	0.08	SM	19	3.17	0.25	T
9	4.49	0.42	1.63	0.09	SM	20	3.02	0.29	T
10	4.40	0.35	1.72	0.01	SM	21	3.02	0.28	T
11	4.93	0.32			T	22	2.79	0.19	T

¹ Long arm/short arm² M : metacentric; SM : submetacentric; T : telocentric.**Table 3. Comparison of erythrocyte size of *Takifugu obscurus***

	Major axis (μm)	Minor axis (μm)	Ratio of major axis/minor axis	Surface area (μm^2)	Volume (μm^3)
Cell*	11.01 \pm 0.63	7.95 \pm 0.45	1.38	68.76 \pm 6.75	366.00 \pm 55.64
Nucleus*	4.05 \pm 0.49	3.15 \pm 0.27	1.29	10.06 \pm 1.81	21.36 \pm 5.44

* Values are means \pm SD.**Fig. 2. External morphology of erythrocyte (a) and silver stained gill tissue (b) of *Takifugu obscurus*. Arrows indicate nucleoli silver stained gill tissue.**

11번에서 22번까지의 12개 염색체쌍은 상대길이 2.79~5.06인 단부염색체로 나타났다 (Fig. 1 and Table 2).

Table 3과 Fig. 2-a는 계측된 적혈구의 세포 및 핵 크기 평균과 그들의 외형이다. 적혈구 세포의 장축, 단축은 각각 11.01 μm , 7.95 μm 로 장축/단축의 비는 1.38로 나타났다. 적혈구 세포의 장축, 단축에 따르는 표면적과 부피는 각각 68.76 μm^2 , 366.00 μm^3 으로 나타났다. 적혈구 핵의 장축, 단축에 따르는 표면적과 부피는 각각 10.06 μm^2 , 21.36 μm^3 으로 나타났다.

암·수에서 적혈구수는 공통적으로 12~13 $\times 10^5/\text{mL}$ 로

나타났다. Fig. 2-b에서 나타난 바와같이 2배체 황복의 아가미조직은 인염색 결과 1개 혹은 2개의 인을 보유하고 있었다.

고 찰

염색체가 보고된 어류중 Tetraodontiformes에 속하는 어류는 약 2%로, 이들 Tetraodontiformes는 최소의 염색체수를 보이는 *Sphaerichthyo osphromonides*의 2n=16에서 최고 염색체수를 보이는 *Channa gachua*의 2n=78까지 염색체 분류군에서 고위군 (higher level group)에 포함되며 이들 염색체 고위군은 대체로 2n=48을 보이며 염색체 분류군의 56%를 차지한다 (Ojima, 1983).

황복은 염색체수 2n=44, FN=64로 Miyaki et al. (1995)이 보고한 염색체 결과 복섬 (*Takifugu niphobles*: 2n=44; FN=64), 줄복 (*T. pardalis*: 2n=44; FN=66), 흰점복 (*T. poecilonotus*: 2n=44; FN=64), *T. radiatus* (2n=44, FN=66), 자주복 (*T. rubripes*: 2n=44; FN=66), 까치복 (*T. xanthopterus*: 2n=44; FN=66)과 비교시 염색체수에 있어 같았으며 FN은 복섬과 동일하게 나타났다. 아울러 황복 역시 여타 참복과 어류와 동일하게 (Miyaki et al., 1995) 이형의 성염색체는 나타나지 않았다.

참복과 어류는 일본과 동중국해에서 자연발생적 잡종이 발견되고 일부 참복종에서는 인위적으로 잡종이 유도

되는 점은 이와 같은 염색체 유사성에 기인된 것으로 (Miyaki et al., 1995) 차후 참복과 어류의 정확한 분류를 위하여는 DNA 함량측정과 DNA 염기분석과 아울러 계통분석 차원에서 관련 연구가 필요시 된다.

특히 차중부염색체인 염색체쌍 번호 3은 상대길이가 8.9%, 완비가 3.00으로 다른 황복의 염색체쌍과 비교시 비교적 크며 특징적으로 나타나고 있다. 이러한 3번 염색체가 차중부염색체로 상대적으로 크게 나타남은 참복과 어류 염색체의 marker로 지정할 수 있으며 (Miyaki et al., 1995) 또한 이러한 큰 차중부염색체는 *T. chrysopterus* 인 경우 centric fusion에 의한 결과임이 역시 보고되고 있다 (Arai and Nagaiwa, 1976). 3배체 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*에서 3개의 큰 중부염색체 (Kim et al., 1990), 3배체 산천어, *Oncorhynchus masou*에서 부수체가 존재하는 3개의 큰 말단염색체 (Park and Kim, 1994)가 이들 3배체 어류 확인의 표식자로 사용될 수 있음을 고려 본 연구의 염색체쌍 번호 3은 차후 황복의 배수화시 그 수준을 평가할 수 있는 표식자로 역시 사용될 수 있으리라 사료된다.

본 연구의 황복 적혈구 세포 및 핵 크기를 Park et al. (1994)이 보고한 동일한 해산어인 참돔, *Pagrus major* 적혈구의 세포 및 핵 크기와 비교시 황복의 적혈구 세포의 장·단축은 참돔 적혈구 세포의 장·단축에 비해 크게 나타난 반면 적혈구 핵의 장축에서는 황복에 비해 참돔이, 적혈구 핵의 단축에서는 참돔에 비해 황복이 다소 크게 나타났다. 단경에 대한 장경의 비는 참돔이 적혈구 세포 및 적혈구 핵에서 각각 1.41, 1.39로 황복의 적혈구 세포 및 적혈구 핵에서의 비 1.38, 1.29에 비해 크게 나타나 참돔의 적혈구형태가 황복의 적혈구형태에 비해 장축으로 다소 신장됨을 보였다.

Teleostei는 Agnatha와 Elasmobranchii에 비해 적혈구 크기가 비교적 작으며 Teleostei 자체내에서도 적혈구수에 있어 다양하게 나타나고 있다 (Harder, 1975). *Salvelinus fontinalis*는 $10.1 \times 10^5/m\ell$ 의 적혈구수, *Cyprinus carpio*는 $8.4 \times 10^5/m\ell$ 의 적혈구수 (Albritton, 1952; Jung, 1956), 산천어, *Oncorhynchus masou*는 $1.3 \times 10^5/m\ell$ 의 적혈구수 (Park and Park, 1995)가 나타나고 있으며 본 연구 결과 황복의 적혈구수는 $12 \sim 13 \times 10^5/m\ell$ 로 비교적 높게 나타나고 있다. 이러한 비교적 높은 적혈구수는, Tetraodontidae에 속하는 1종의 반수체 DNA 함량이 0.4 pg으로 여타 어류의 DNA 함량에 비해 낮게 나타남 (Gause, 1981)을 고려시 황복의 낮은 DNA 함량에 기인된 것으로 사료되므로 차후 본 종을 대상으로 DNA 함량 파악이 필요하리라 사료된다.

어류에서 인형성부위 (nucleolar organizer region)는 반수체 한조의 일정 염색체에 존재하는 것으로 2배체 간기 (interphase) 세포에서 인형성부위의 인접 및 분리에 따라 인형성부위가 각각 1개 내지 2개로 나타난다 (Park and Kim, 1994). 이러한 인형성부위는 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*를 위시한 연어속에서 대부분 보고되고 있으며 산천어 역시 2배체는 1~2개의 인형성부위가 나타나고 있다 (Park and Kim, 1994). 특히 산천어 3배체는 1, 2 및 3개의 인형성부위가 나타나고 있어 본 연구에서의 황복 2배체의 1~2개 인형성부위 조사 결과는 차후 황복 배수체 파악에 유용하리라 사료된다.

요 약

황복, *Takifugu obscurus*의 염색체수는 $2n=44$ 로 fundamental number는 64이었으며 암·수간 이형의 성염색체는 나타나지 않았다. 적혈구 세포 및 핵의 장·단축은 각각 $11.01 \times 7.95 \mu m$, $4.05 \times 3.15 \mu m$ 로 나타났다. 이에 따르는 적혈구 세포 및 핵의 표면적 및 부피는 각각 $68.76 \mu m^2$, $366.00 \mu m^3$ 과 $10.06 \mu m^2$, $21.36 \mu m^3$ 로 나타났다. 암·수에서 적혈구수는 공통적으로 $12 \sim 13 \times 10^{15}/m\ell$ 이었다. 2배체 황복 아가미조직은 1개 혹은 2개의 인형성부위가 존재하였다. 이상의 황복을 대상으로한 연구결과는 황복의 세포분류학적 연구 및 차후 황복의 양식산업화시 도래될 수 있는 염색체공학에 기본자료로 유용할 것이다.

참 고 문 헌

- Albritton, E. C. 1952. Standard values in blood, Saunders, Philadelphia and London, Tab. 4 and 44.
- Aliah, R. S., Y. Inada, K. Yamaoka and N. Taniguchi. 1991. Effects of triploidy on hematological characteristics and oxygen consumption in ayu. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 57, 833~836.
- Arai, R. and K. Nagaiwa. 1976. Chromosomes of Tetraodontiform fishes from Japan. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, (A), 2, 59~72.
- Chyung, M. -K. 1977. The fishes of Korea. Iljisa Publ. Co., Seoul, 727 pp.
- Gause, G. G. 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag, Netherlands, 213 pp.
- Gold, J. R. 1984. Silver staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. Copeia, 1984, 133~139.
- Harder, W. 1975. Anatomy of fishes. E. Schweizerbart'sche

- Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, 301 pp.
- Jang, S. I. 1996. Induced ovulation by using human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone analogue plus pimozide in yellow puffer, *Takifugu obscurus*. J. Aquacult., 9, 3~10 (in Korean).
- Jung, T. 1956. Zur Kenntnis der Ernährungsbiologie der im Raum Zwischen Harz Heide vorkommenden Hirudineen. Zool. Jb., Physiol., 66, 79~128.
- Kim, D. S., E. -H. Park and J. S. Kim. 1982. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes (Teleostomi : Siluriformes). Kor. J. Genet., 4, 57~68.
- Kim, D. S., G. C. Choi and I. -S. Park, 1990. Triploidy production of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Aquacult., 3, 135~144 (in Korean).
- 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.
- Kim, D. S., Y. K. Nam and I. -S. Park. 1995. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*M. anguillicaudatus*). Aquaculture, 135, 257~266.
- Kligerman, A. D. and S. E. Bloom. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. J. Fish. Res. Board Can., 34, 266~269.
- KORDI. 1995. Development of technique on the seeding mass production and propagation of river puffer, *Takifugu obscurus*. BSPG 00225-876-3. Minst. Agricul. Fish., Seoul, 244 pp.
- Lemoine, H. L. and L. T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans. Amer. Fish. Soc., 109, 626~631.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas, 52, 201~220.
- Lincoln, R. F. and A. P. Scott. 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol., 25, 385~392.
- Ojima, Y. 1983. Fish cytogenetics. Sukeyosa., 453 pp.
- Miyaki, K., O. Tabeta and H. Kayano. 1995. Karyotypes in six species of puffer fishes Genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). Fisheries Science, 61, 594~598.
- Park, I. -S. and H. -B. Kim, 1994. Induction of triploid cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. J. Aquacult., 7, 207~223 (in Korean).
- Park, I. -S., H. -B. Kim, H. T. Huh and S. C. Kim, 1993. Masculinization of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) by treatments of 17 α -methyltestosterone. Ocean Res., 15, 29~36 (in Korean).
- Park, I. -S., H. -B. Kim, J. -K. Son and D. -S. Kim, 1994. Triploidy production of red seabream, *Pagrus major*. Korean J. Ichthyol., 6, 71~78 (in Korean).
- Park, I. -S. and K. Y. Park, 1995. Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid in cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. J. Aquacult., 8, 21~29 (in Korean).
- Sezaki, K. and H. Kobayashi. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44, 851~854.
- Sezaki, K., S. Watabe and K. Hashimoto. 1988. Haematological parameters and erythrocyte enzyme activities associated with increase in ploidy status of the spinous loach, *Cobitis biwae* Jordan and Snyder. J. Fish Biol., 32, 149~150.
- Thorgaard, G. H. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57, 57~64.
- Ueno, K. 1984. Induction of triploid carp and their haematological characteristics. Jap. J. Genet., 59, 585~591.

1997년 1월 10일 접수

1997년 5월 7일 수리