

노래미 (*Hexagrammos agrammus*)와 쥐노래미 (*H. otakii*)의 세포유전학적 연구

심미아 · 노재구 · 남윤권 · 김동수*
부경대학교 양식학과

Cytogenetic Analysis of Spotty Belly Greenling (*Hexagrammos agrammus*) and Greenling (*H. otakii*)

Mi A SIM, Jae Koo NOH, Yoon Kwon NAM and Dong Soo KIM*
Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Cytogenetic analysis was conducted to obtaining informations for genetic improvement of spotty belly greenling (*Hexagrammos agrammus*) and greenling (*H. otakii*) in aquaculture. Erythrocytes of spotty belly greenling were slightly larger than those of greenling ($p < 0.05$). The nuclear volume of spotty belly greenling erythrocytes averaged $15.14 \pm 0.92 \mu\text{m}^3$ while that of greenling averaged $14.61 \pm 0.15 \mu\text{m}^3$; the difference was not significant ($p > 0.05$). Consequently, genome size of spotty belly greenling was also slightly larger than those of greenling. DNA content per cell of spotty belly greenling and greenling were 2.15 pg and 2.10 pg, respectively. The modal chromosome number of both greenling species were same as $2n=48$ and karyotypes were also identical as 2 metacentrics, 11 submetacentrics and 11 acrocentric pairs ($FN=74$). There was no evidence of polymorphism including aneuploidy or sex-related heteromorphism for all specimens examined. The nuclear organizer regions (NORs) were localized on a small acrocentric chromosome pair in both species. Spotty belly greenling showed large sizes of active rRNA coding regions in their chromosomes. However, greenling examined only small sizes of active rRNA coding regions with dimorphism.

Key words: Cytogenetic analysis, Karyotypes, Nuclear organizer regions, *Hexagrammos agrammus*, *H. otakii*

서 론

어류에 있어서 유전학적 종의 동정 (genetic stock identification)은 유전 진화학적 측면에서 종간의 유연 관계를 밝히는데 있어서 뿐만 아니라, 수산 자원화학적 측면 및 유전 공학 기법에 의한 품종 개량을 위한 기초 자료를 얻는데 있어서 대단히 중요하다 (Cruz et al., 1982). 어류의 세포 및 핵의 크기는 일반적으로 DNA 함량에 비례하여 그 크기가 증가하며 (Szarski, 1976), genome size는 종에 따라 고유한 양을 갖고 있으나, 어류의 경우에는 종간에 심한 차이를 나타내고 있어 유연 관계를 규명하는데 중요한 의미를 내포하고 있다 (Hinegardner and Rosen, 1972; Szarski, 1976; Gold and Amemiya, 1987). 뿐만 아니라 염색체 수 및 그의 핵형 역시 종에 따라 고유한 수 및 형태를 가지고 있어 세포 유전학적 분석에 매우 유용한 자료로 이용되고 있다.

노래미 (*Hexagrammos agrammus*)와 쥐노래미 (*H. otakii*)는 양복락목 (Scorpaeniformes) 쥐노래미과 (Hexagrammidae)에 속하는 어류로, 동중국해 및 우리나라 연근해에 널리 분포하는 연안 정착성 어류이다. 이들 어류들은 전장 30 cm에서 50 cm까지 성장하는 종으로 영양가가 높고 DHA가 많이 들어 있을 뿐 아니라 맛이 좋아 횡감으로 널리 이용되고 있다. 그러나 최근 자연 환경 및 어업 여건의 악화로 인하여 자연산의 생산량이 크게 감소되고 있어 양식에 의한 생산량의 증대가 절실히 요구되고 있으나, 아직까지 종묘 생산에서 양성까지의 체계적인 양식 기술이 확립되어

있지 않아 양식 생산량이 매우 낮은 실정이다. 노래미와 쥐노래미는 고수온과 저수온에서 성장이 가능하므로 우리나라와 같이 겨울철에 수온이 낮거나 여름철에 고수온인 지역에서 양식 대상 어종으로 적합하다. 따라서 종묘 생산 등 양식 기술이 확립되면 양식 대상종으로 그 가치가 매우 높을 것으로 전망되며, 우량 유전 형질을 가진 어류의 양식 산업화를 위하여 계획적이고 집중적인 기술 개발이 절실한 실정이다.

이에 본 연구는 노래미와 쥐노래미의 유전적인 종 동정의 확립과 염색체 조작을 통한 배수체 및 중간 잡종들과 유전공학 기법의 접목에 의한 우량 품종 개발을 위한 유전 육종학적 연구의 기초 자료를 얻고자, 최근 양식 대상으로 대두되고 있는 두 어종을 대상으로 적혈구 세포와 핵의 크기, DNA 함량, 핵형 분석 등의 세포유전학적 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험어

본 연구에 사용된 노래미 (*Hexagrammos agrammus*)와 쥐노래미 (*H. otakii*)는 거제, 통영, 마산 등 남해 연안에서 채포된 개체들이었다.

적혈구 계측

노래미와 쥐노래미 암수 각 10마리의 미부정맥에서 채혈한 혈액을 슬라이드에 도말하고 95% ethanol로 고정한 다음 Giemsa 용액으로 염색하였다. 각 개체 당 100개 이상의 적혈구 세포와 핵

*Corresponding author: dongskim@pknu.ac.kr

의 장 (a), 단축 (b)을 현미경 하에서 eyepiece micrometer로 측정하여, 표면적 (S) = $ab\pi/4$ 와 부피 (V) = $4(a/2)(b/2)^2\pi/3$ 를 계산하였다 (Sezaki and Kobayashi, 1978). 두 종간 적혈구 세포 및 핵 크기 비교는 student t-test를 수행하였다.

DNA 함량 (flow cytometry)

혈액을 채취한 후 1×10^6 개의 적혈구 세포를 1 mL의 PI 염색액 (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1% NP40, 50 μ L/mL propidium iodide)에 넣어 15~30분 동안 실온에서 염색하고, flowcytometer (Bio Rad Co., USA)를 이용하여 DNA 함량을 측정하였다 (Kent et al., 1988). DNA 함량 대조군으로는 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)의 적혈구와 정자를 혼합 염색하여 비교, 계산하였다 (Kim et al., 1995).

염색체 수 및 핵형 분석

Kim 등 (1982)의 방법에 의거 신장 조직으로부터 염색체 표본을 작성하여 5% Giemsa 용액에 염색하였다. 현미경 ($\times 1,000$) 하에서 관찰하기 좋은 중기 분열상의 염색체를 대상으로 염색체 수를 계수하였고 사진 촬영 후 idogram을 작성하여 핵형을 분석하였다.

Nucleolar organizer region (NOR) 분석

염색체 상의 NOR을 분석하기 위해 판독이 선명한 중기 분열상의 염색체 표본에 50% $AgNO_3$ 와 gelatin solution (2% gelatin, 1% formic acid)을 2:1로 섞은 염색 시약을 떨어뜨리고 커버글라스를 덮은 후 70°C에서 60초 동안 반응시키고 물로 씻어준 후 광학 현미경 ($\times 1,000$) 하에서 염색체상의 NOR을 관찰하였다.

결 과

적혈구 세포와 핵의 크기

적혈구 세포의 크기 측정 결과, 노래미는 적혈구 세포의 장, 단축이 각각 $9.76 \pm 0.27 \mu m$, $6.35 \pm 0.07 \mu m$ 로, 쥐노래미의 $9.17 \pm 0.05 \mu m$, $6.24 \pm 0.04 \mu m$ 보다 크게 나타났다. 이에 따라 적혈구 세포의 표면적과 부피 역시 노래미가 $48.62 \pm 1.74 \mu m^2$, $213.67 \pm 7.51 \mu m^3$ 로 쥐노래미 적혈구 세포의 표면적 $44.85 \pm 0.44 \mu m^2$, 부피 $187.57 \pm 2.45 \mu m^3$ 보다 큰 것으로 나타났다. 또한 핵의 크기에 있어서도 노래미가 쥐노래미 보다 큰 것으로 나타났다 (Table 1).

DNA 함량 분석

Flow cytometry를 이용하여 미꾸라지의 정자 ($n=1.4$ pg)와 적혈구 ($2n=2.8$ pg)를 대조군으로 노래미와 쥐노래미의 DNA 함량을 분석한 결과, 노래미의 세포당 DNA 함량은 2.15 ± 0.04 pg, 쥐노래미는 2.10 ± 0.03 pg으로 나타났다 (Fig. 1).

염색체 수 및 핵형 분석

노래미의 염색체 수는 $2n=48$ 이었으며, 핵형 분석 결과 2쌍의

Table 1. Comparisons of erythrocyte and nuclear size of *Hexagrammos agrammus* and *H. otakii*

Item	Cell size*		Nucleus size*	
	<i>H. agrammus</i>	<i>H. otakii</i>	<i>H. agrammus</i>	<i>H. otakii</i>
Major axis (μm)	9.76 ± 0.27	$9.17 \pm 0.05^{**}$	3.99 ± 0.17	$3.62 \pm 0.07^{**}$
Minor axis (μm)	6.35 ± 0.07	6.24 ± 0.04	2.73 ± 0.10	2.65 ± 0.06
Surface area (μm^2)	48.62 ± 1.74	$44.85 \pm 0.44^{**}$	8.56 ± 0.46	$7.64 \pm 0.36^{**}$
Volume (μm^3)	213.67 ± 7.51	$187.57 \pm 2.45^{**}$	15.14 ± 0.92	$14.61 \pm 0.15^{**}$

*Mean \pm SD.

**Means differ at $P < 0.05$.

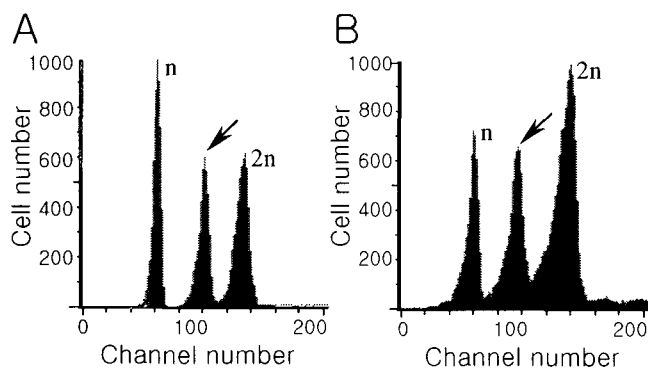


Fig. 1. Histogram of flow cytometric analysis of (A) *Hexagrammos agrammus* (arrowed) and (B) *H. otakii* (arrowed). DNA content was calculated compare with mud loach sperm (n) and erythrocyte (2n).

metacentric chromosome, 11쌍의 submetacentric chromosome, 그리고 11쌍의 acrocentric chromosome으로 이루어져 fundamental number (FN)는 74였다 (Table 2; Fig. 2A). 쥐노래미의 염색체 수는 노래미와 마찬가지로 $2n=48$ 이었으며, 핵형 또한 노래미와 동일하게 구성되어 있었다 (Table 2; Fig. 2B). 이들 두 종의 염색체 분석에서 모두 암수간 염색체의 수적 차이나 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었으며, 또한 개체간 염색체 다형 현상도 볼 수 없었다.

Table 2. Distribution of chromosome numbers in *Hexagrammos agrammus* and *H. otakii*

Species	Sex	No. of Specimen analyzed	Frequency of chromosome number					Total cell counted
			45	46	47	48	49	
<i>H. agrammus</i>	Female	4	3	8	11	96	2	120
	Male	4	1	8	10	97	4	120
<i>H. otakii</i>	Female	4	0	2	9	95	14	120
	Male	4	0	2	8	96	14	120

Nucleolar organizer region (NOR) 분석

Ag-NOR staining법에 의해 염색체상의 NOR을 분석한 결과, 노래미와 쥐노래미 모두 1쌍의 acrocentric chromosome의 short

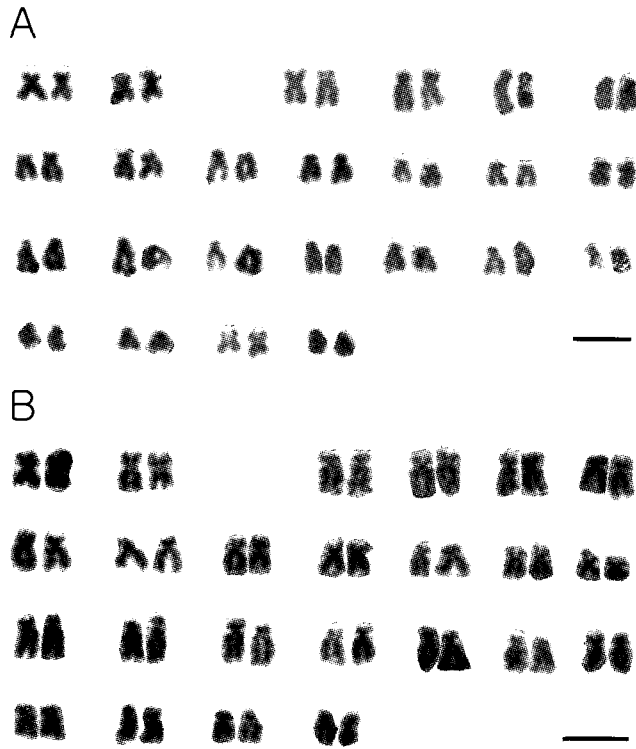


Fig. 2. Idiogram of *Hexagrammos agrammus* (A) and *H. otakii* (B). Bars are 5 μm.

arm에서 NOR이 확인되었으며, NOR의 크기는 쥐노래미에 비하여 노래미에서 더 크게 나타났다 (Table 3; Fig. 3).

Table 3. Frequency distributions of NORs in *Hexagrammos agrammus* and *H. otakii*

Species	Sex	No. of specimen analyzed	No. of Ag-stained metaphases	No. of cells with different numbers of Ag-stained NORs			
				0	1	2	3
<i>H. agrammus</i>	Female	4	133	5	22	103	3
	Male	4	135	4	20	108	3
<i>H. otakii</i>	Female	4	100	3	18	74	5
	Male	4	101	3	14	83	1

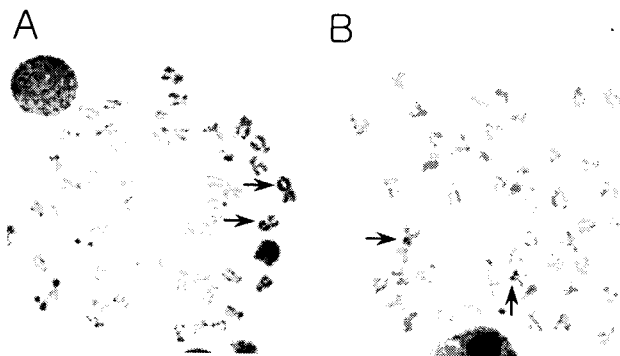


Fig. 3. Ag-NOR stained metaphase of *Hexagrammos agrammus* (A) and *H. otakii* (B). Arrows indicate NORs.

고찰

적혈구 세포 및 핵의 크기 조사는 세포 유전학적 분석에 있어 가장 쉬운 방법으로 특히, 배수체의 판단 기준 및 잡종의 세포 유전학적 특성을 밝히는데 유용하게 사용될 수 있다 (Benfey et al., 1984). 본 연구 결과 노래미가 쥐노래미보다 적혈구 세포 및 핵의 크기 모두 약간 큰 것으로 나타났으며 따라서 이러한 결과들은 노래미와 쥐노래미의 양식 생산성 향상을 위한 배수체 및 잡종 유도시 그 판단 기준으로 이용될 수 있을 것이다 (Table 1). 세포 당 DNA 함량 조사 결과 노래미는 2.15 pg으로 인간에 비해 30.4%, 쥐노래미는 2.04 pg으로 30.0% 밖에 되지 않았으며, 미꾸라지의 2.8 pg, 잉어의 3.6 pg 보다 genome 크기가 작은 것으로 나타났다 (Fig 1). 세포 및 핵의 크기와 DNA 함량과의 비교에 있어 세포 및 핵의 크기 큰 노래미가 DNA 함량이 많아 이들 두 종 역시 DNA 함량의 증감이 핵 크기 변화와 일치하는 진화적 양상을 보였다 (Szarski, 1976; Wolters et al., 1982). 모든 생물 종은 각각의 고유한 DNA 함량을 가짐으로 flow cytometry를 이용한 직접적인 DNA 함량 측정은 그 정확도 및 신속도 등을 생각할 때 중간 확인 및 진화 과정 규명 뿐 아니라 배수체의 판별 등에 매우 편리하고 유용하게 이용할 수 있을 것이다 (Thorgaard et al., 1982; Wolters et al., 1982).

노래미와 쥐노래미의 염색체 핵형 분석 결과, 두 종 모두 2n=48, FN=74의 같은 핵형을 나타내었다 (Fig. 2). 쥐노래미에서 암수간 DNA 함량이 암컷 2.11 ± 0.07 pg, 수컷 2.09 ± 0.04 pg으로 약간의 차이를 보였으나 노래미, 쥐노래미 모두 암수간 염색체의 수적 차이나 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었으며, 또한 개체간 염색체 다형 현상도 관찰되지 않았다. NOR 염색 결과 역시 두 종 모두 한 쌍의 acrocentric chromosome 단완에서 NORs이 나타나는 유사성을 보였다 (Fig. 3). NOR 분석은 대부분의 어류의 경우 반수체당 한 개의 NOR을 갖음으로 배수체 판별에 매우 유용하다 (Fontana, 1994). 이와 같은 노래미와 쥐노래미의 염색체 수와 핵형 분석, NOR 분석에서 나타난 유사성은 진화적으로 DNA의 함량의 변화에도 불구하고 염색체 상에서 변화는 최소화 하는 경향 (Ida et al., 1991; Park et al., 2000)으로 생각되며, 이들 두 종이 유전적으로 매우 가까운 근연종임을 나타낸다. 또한 DNA 함량 및 NOR 범위 등에서 보이는 약간의 차이는 아마도 많은 DNA 함량을 가진 원시 조상종이 좁은 생태학적 서식지에서 진화가 진행되는 과정에서 DNA 감소가 일어난다는 진화 가설 (Ohno et al., 1968; Hinegarder and Rosen, 1972; Park and Chung, 1985)에 비추어 볼 때, DNA 함량이 많고, 크기가 큰 NOR을 갖는 즉, 더 많은 rRNA의 복사본을 갖고 있는 노래미가 쥐노래미보다 원시종이었을 것으로 추정할 수 있다. 그러나 보다 정확한 중간 진화 과정을 밝히기 위해서는 다양한 banding 방법의 적용에 의한 염색체의 미세 분석 등의 세포유전학적 연구와 함께 미토콘드리아 DNA, microsatellite loci 분석에 의한 DNA typing, 유전자 염기서열 분석 등 분자생물학적인 연구들이 더해져야 할 것으로 생각되며, 이러한 자료들은 본 연구 결과와 더불어 노래미와 쥐노래미의 유전공학 기법의 적용 및 우량 품종 개발을 위한

유전 육종학적 연구의 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

요 약

노래미와 쥐노래미의 유전적인 종 동정의 확립과 우량 품종 개발을 위한 유전 육종학적 연구의 기초 자료를 얻고자, 최근 양식 대상어로 대두되고 있는 두 어종을 대상으로 적혈구 세포와 핵의 크기, DNA 함량, 핵형 분석 등의 세포유전학적 연구를 수행하였다. 노래미의 적혈구 세포의 크기는 장, 단축이 각각 $9.76 \pm 0.27 \mu\text{m}$, $6.35 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 로, 쥐노래미의 $9.17 \pm 0.05 \mu\text{m}$, $6.24 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 보다 크게 나타났으며, 표면적과 부피 역시 노래미가 $48.62 \pm 1.74 \mu\text{m}^2$, $213.67 \pm 7.51 \mu\text{m}^3$ 로 쥐노래미의 적혈구 세포 표면적 $44.85 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$, 부피 $187.57 \pm 2.45 \mu\text{m}^3$ 보다 큰 것으로 나타났다. 또한 노래미의 DNA 함량은 $2.15 \pm 0.04 \text{pg}$, 쥐노래미는 $2.10 \pm 0.03 \text{pg}$ 으로 핵의 크기와 유사한 양상을 나타내었다. 노래미와 쥐노래미의 염색체 수는 48개로 동일한 핵형으로 구성되어 있었으며, NOR 분석 결과 역시 두 종에서 1쌍의 acrocentric chromosome의 short arm에서 NOR이 확인되었다. 성별에 따른 염색체의 수적 차이나 heteromorphic한 염색체, 그리고 개체간 염색체 다형 현상은 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 BK21과 NRL 연구비 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Benfey, T.J., A.M. Sutterlin and R.J. Thompson. 1984. The use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 980~984.
- Cruz, T.A., J.P. Thorpe and R.S.V. Pullin. 1982. Enzyme electrophoresis in *Tilapia zilli*: a pattern for determining biochemical genetic markers for use in tilapia stock identification. *Aquaculture*, 29, 311~329.
- Fontana, F. 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37, 888~892.
- Gold, J.R. and C.T. Amemiya. 1987. Genome size variation in North American minnows (Cyprinidae). II. Variation among 20 species. *Genome*, 29, 481~489.
- Hinegardner, R. and D.E. Rosen. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.*, 106, 621~644.
- Ida, H., N. Oka and K.-I. Hayashigaki. 1991. Karyotypes and cellular DNA contents of three species of the subfamily Clupeinae. *Jap. J. Ichthyol.*, 38, 289~294.
- Kent, M., R. Chandler and S. Wachtel. 1988. DNA analysis by flow cytometry. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47, 88~89.
- Kim, D.S., E.H. Park and J.S. Kim. 1982. Karyotypes of nine species of Korean catfishes (Teleostomi: Siluriformes). *Kor. J. Genetics*, 4, 57~68.
- 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, 257~265.
- Ohno, S., U. Wolf and N.B. Atkin. 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas*, 59, 169~187.
- Park, E.H. and C.Y. Chung. 1985. Genome and nuclear sizes of Korean cobitid fishes (Teleostomi: Cypriniformes). *Kor. J. Genetics*, 7, 111~118.
- Park, I.-S., Y. Choi, Y.H. Kim, Y.K. Nam and D.S. Kim. 2000. Flow cytometric and cytogenetic studies in *Rhynchocypris oxycephalus* and *R. steindachneri*. *J. Aquacult.*, 13, 193~196.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41, 851~854.
- Szarski, H. 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Inter. Rev. Cytol.*, 44, 93~112.
- Thorgaard, G.H., P.S. Rabinovitch, M.W. Shen, G.A.E. Gall, J. Propp and F.M. Utter. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, 29, 305~309.
- Wolters, W.R., C.L. Chrisman and G.S. Libey. 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus rafinesque*. *J. Fish Biol.*, 20, 253~258.

2002년 9월 13일 접수

2002년 11월 25일 수리