

범가자미에 대한 유전학적 동정

김경길 · 김 윤 · 남윤권* · 김동수*

국립수산진흥원 어류양식과
*부산수산대학교 양식학과

Genetic Stock Identification of Spotted Flounder, *Verasper variegatus* from Yecheon, Korea

Kyung Kil KIM, Yoon KIM, Yoon Kwan NAM*, and Dong Soo KIM*

National Fisheries Research and Development Agency, Yangsan-gun,
Kyungsangnam-do 626-900, Korea

*Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan,
Nam-gu, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

Cell size, DNA content, chromosome and PCR-based mitochondrial 12S rRNA gene analyses were conducted to obtain basic informations for genetic stock identification of spotted flounder (*Verasper variegatus*) from Yecheon, Korea.

The mean erythrocytic and nuclear volumes of spotted flounder were 211.10 μm^3 and 23.03 μm^3 , respectively. The haploid DNA content of this species was 0.79 pg/cell which correspond to 46.5 % of carp and to 22.6 % of mammals. Spotted flounder had the $2n=46$ acrocentric chromosomes but no heteromorphic sex chromosomes was found. Mitochondrial DNA gene for 12S ribosomal RNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and the PCR products were subjected to digestion with 15 restriction endonucleases. Restriction enzyme analyses revealed that *Ava* I, *Mae* II, *Sma* I and *Xba* I had one restriction site in the mitochondrial 12S rRNA gene segment of spotted flounder, while *Mae* I had two. Segments of 12S rRNA gene from mitochondria in spotted flounder were sequenced and compared with channel catfish and human as controls. The 12S rRNA gene of this species was more similar to that of channel catfish than to human's.

서 론

어류에 있어서 유전학적 종의 동정 (genetic stock identification)은 수산 자원학적인 측면 뿐만 아니라 유전 공학 기법에 의한 품종 개량을 위한 기초 자료를 얻는데 있어서 대단히 중요하다 (Cruz et al. 1982). 그간 종의 동정을 위하여는 체형, 비늘, 연조수 및 척추골수의 계측 및 계수 등 형태 학적인 조사가 주를 이루었으나 최근에는 세포 크기, 염색체 수 및 핵형, DNA 함량등의 세포 유전

학적인 조사와 isozyme, mitochondrial DNA (mtDNA), mtDNA의 특정 유전자 (cytochrome b gene, cytochrome b oxidase gene, 12S ribosomal RNA gene)의 분석에 의한 유전학적인 동정 (genetic stock identification)이 시도되고 있다 (Nei 1972; Brown 1983; Kocher et al. 1989).

어류의 세포 및 핵의 크기는 일반적으로 DNA 함량에 비례하여 그 크기가 증가하므로 세포 유전학적인 측면에서 매우 중요시 되고 있다 (Szarski 1976). 특히 배수체에 있어서 세포 및 핵의 크기 측정은 배수체의 판별에 매우 유용하게 사용되고 있다 (Wolters et al. 1982; Purdom 1983). 또한 genome size는 종에 따라 고유한 양을 갖고 있을 뿐만 아니라 하등한 생물로부터 고등 척추 동물에 이르기까지 진화 정도에 따라 일반적으로 증가하며 (Bachmann et al. 1972), 특히 어류의 genome size는 포유류와 달리 종 간에 매우 심한 차이를 나타내고 있어서 유연 관계를 규명하는데 중요한 의미를 내포하고 있다 (Pedersen 1971; Hinegardner and Rosen 1972; Szarski 1976). 특히 염색체 수 및 그의 핵형은 종에 따라 고유한 수 및 형태를 가지고 있어 세포 유전학적 분석을 통한 종의 분석에 매우 유용한 자료로 이용되고 있다 (Gold 1979).

한편, mtDNA는 핵 DNA에 비해 작은 크기인 16~19 kb 정도의 환상 2 중 구조로 되어 있으며 모계 유전 물질로 알려져 있다. 또한 핵 내외의 환경 변화에 따라 핵 DNA보다 진화 속도가 5~10 배 빠른 특징을 근거로 환경 적응 문제와 관련하여 근연 종간 또는 자매종 및 잡종에 대한 연구에 많이 이용되고 있다 (Brown et al. 1979; Brown 1983). 그러나 어종에 따라서는 mtDNA를 분리하기 어려울 뿐만 아니라 restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의한 유전적인 변이를 찾아볼 수 없는 경우도 있다 (Smith et al. 1989; Carr and Marshall 1991). 이러한 RFLP의 문제점에 대해 최근 유전자의 염기 서열을 직접 분석하기 위한 molecular cloning의 연구가 이루어지고 있다 (Beckenbach et al. 1990; Johansen et al. 1990).

그러나 cloning 기법은 매우 고도의 기술을 요구할 뿐만 아니라 노동력이 많이 요구되는 작업으로 집단간의 동정이나 분석을 위해서 여러가지 제약이 따르고 있다. 따라서 Kocher 등 (1989)은 척추 동물에 있어서 mtDNA cytochrome b gene의 highly conserved regions에 상응하는 primer를 제작 하여 이 primer를 이용 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 다량어의 mitochondrial genome의 307 bp를 증폭하고 이 gene의 염기 서열을 밝혀 종내에 있어 집단내 및 집단간의 유전자 다형 현상을 밝힌 바 있다. 그 후 Bartlett 와 Davidson (1991)은 tuna species 에서, Carr과 Marshall (1991)은 Atlantic cod (*Gadus morhus*)에서 cytochrome b gene을 이용하여 유전적인 종의 동정에 대하여 연구한 바 있다. 또한 Whitmore 등 (1992)은 차널메기 (*Ictalurus punctatus*)와 largemouth bass (*Micropterus salmoides*)에서 PCR 기법에 의한 mtDNA의 12S ribosomal RNA gene segment를 대상으로 염기 서열을 직접 분석함으로써 어류의 유전적인 종의 동정에 12S ribosomal RNA gene의 사용이 가능하다는 것을 제시한 바 있다.

범가자미, *Verasper variegatus*는 가자미목 (Order Pleuronectida) 붕넛치과 (Family Pleuronectidae) 범가자미속 (Genus *Verasper*)에 속하는 어류로서 우리 나라 서남부 및 일본 중부 이남 연해에 분포하고 있다 (Chung 1977). 본 종은 연안의 사니질에 서식하고 먹이는 주로 갑각류를 섭취하며 크기는 전장 60 cm, 체중 5.0 kg 정도 까지 성장하는 대형종으로 양식 대상으로 매우 가능성이 큰 어류이다. 따라서 본 연구에서는 범가자미의 세포 크기, 염색체 수와 핵형, DNA 함량 등의 세포 유전학적인 조사 및 mtDNA의 12S rRNA gene을 분석하여 본 종에 대한 genetic stock identification을 확립함으로써 gene bank의 기초 자료 및 앞으로 예상될 수 있는 외국 계통의 도입에 따른 교배에 의한 gene contamination에 대비한 자료로 활용코져 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에 사용된 범가자미 *Verasper variegatus*는 전남 여천군 근해에서 수집한 것을 사용하였다 (Fig. 1, Fig. 2).

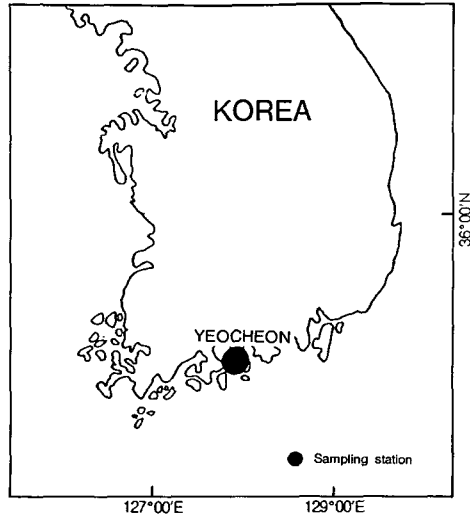


Fig. 1. A map showing the location of sampling site.

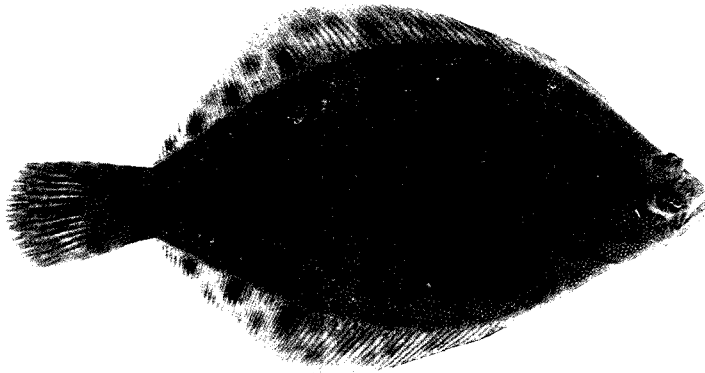


Fig. 2. External morphology of spotted flounder, *Verasper variegatus*.

2. 방 법

2-1. 세포 유전학적 조사

세포 및 핵의 크기는 각 개체로부터 채집된 말초 혈액을 슬라이드에 도말한 후 고정시켜 May-Grünbaldt Giemsa 또는 Giemsa 용액으로 염색하여 각 개체당 100 개 이상의 적혈구 세포를 측정하였다. 측정 항목은 세포의 장경 및 단경 그리고 핵의 장경 및 단경으로 현미경 1,000 배하에서 micrometer를 이용하여 측정하였으며, Sezaki와 Kobayashi (1978)의 방법에 의거 세포와 핵의 표면적 및 부피를 계산하였다. DNA 함량은 Labarca와 Paigen (1980)의 방법에 따라 각 개체 당 1 ml의 혈액을 채취하여 세포수를 계수한 후 Hoechst 33258 로 염색하여 형광 분광 광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 연어 정자 DNA type III를 표준 DNA로 사용하였다. 염색체 분석은 Kim 등 (1982)의 방법을 약간 수정하여 신장 조직으로부터 염색체 표본을 만들어 Giemsa 용액으로 염색한 후 염색체 수와 핵형을 관찰하였다. 아울러 각 개체당 가장 관찰하기 좋은 중기 분열상 200 개를 선택하여 염색체 수를 계수하였으며 핵형 분석은 1,000 배로 현미경 사진을 찍어 idiogram을 작성하였고 염색체의 분류는 Levan 등 (1964)의 방법에 의거하였다.

2-2. mtDNA의 12S rRNA gene 분석

1) DNA의 분리

범가자미 및 차넬메기의 신선한 간, 비늘 또는 혈액을 채취하여 각각 100 mM tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액에 넣고 proteinase K (200 µg/ml)를 처리하여 42 °C로 4~24 시간 동안 digestion한 후 DNA를 분리하여 PCR 시료로 사용하였다.

2) PCR 기법에 의한 mtDNA의 12S rRNA gene의 증폭

분리된 DNA를 50 µl의 PCR cocktail (50 mM KCl, 10 mM tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.01 % gelatin, 200 µM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1 µM each primer, 2.5 units Taq polymerase)에 넣은 후, 12S rRNA gene 의 증폭을 위하여 PCR machine (Omnigene Hybaid Co.)로 94 °C에서 1분, 50 °C에서 1분, 72 °C에서 1분의 순으로 30 cycle 실시하였다. 이 때 사용한 primer는 Whitmore 등 (1992)이 사용하였던 합성된 oligonucleotide R1091 과 R1478 였다.

3) 제한 효소 지도 작성

PCR products 의 제한 효소 지도 작성을 위한 제한 효소 처리는 9 µl PCR products에 1 µl manufacturer's designated buffer, 10 units의 제한 효소를 처리하여 37 °C에서 최소 3 시간 DNA 를 자른 후 2 % agarose gel로 전기 영동하여 분석하였다. 이 때 사용한 molecular weight size marker는 1 kb ladder와 123 bp ladder 였다.

4) 개체간 변이 조사

범가자미의 여천산 집단내 변이를 조사하기 위하여 동일한 방법으로 DNA를 분리, 12S rRNA gene을 증폭한 후 제한 효소 (Ava I, BamH I, EcoR I, Hind III, Kpn I, Mae I, Mae II, Mlu I, Nde I, Sac I, Sal I, Sph I, Sma I, Xba I 및 Xho I)의 분석을 실시하여 개체간 restriction fragment의 다형 현상을 조사하였다.

5) 염기 서열 분석

Hultman 등 (1990)의 방법을 약간 수정하여 mtDNA의 12S rRNA gene segment의 염기 서열을 분석하였다.

결 과

1. 세포 및 핵의 크기

범가자미의 세포 및 핵의 크기를 Table 1에 나타내었다. 세포 크기는 장축이 $10.2 \pm 0.18 \mu\text{m}$, 표면적이 $50.34 \pm 1.78 \mu\text{m}^2$, 부피가 $211.10 \pm 11.30 \mu\text{m}^3$ 였으며 핵의 크기는 장축이 $4.26 \pm 0.24 \mu\text{m}$, 표면적이 $10.74 \pm 1.13 \mu\text{m}^2$, 부피가 $23.03 \pm 3.59 \mu\text{m}^3$ 였다.

Table 1. Erythrocytic measurements of spotted flounder, *Verasper variegatus*

Items	Size (mean \pm SD)	
	Cell	Nucleus
Major axis (μm)	10.20 ± 0.18	4.26 ± 0.24
Minor axis (μm)	6.29 ± 0.12	3.20 ± 0.16
Surface area (μm^2)	50.34 ± 1.78	10.74 ± 1.13
Volume (μm^3)	211.10 ± 11.30	23.03 ± 3.59

2. DNA 함량 측정

범가자미의 haploid DNA content는 0.79 pg/cell로 잉어의 46.5%, 포유류의 22.6% 였다 (Table 2).

Table 2. Genome size of spotted flounder, *Verasper variegatus*

Species	Genome size (pg)	Related amount of DNA (%)
Spotted flounder	0.79	—
Carp*	1.7	46.5
Mammal**	3.5	22.6

* From Hinegardner and Rosen (1972).

** From Atkin et al. (1965).

3. 염색체 수 및 핵형

범가자미의 염색체 수는 Table 3에서 보는 바와 같이 $2n=46$ 개 였다. 핵형은 Fig. 3과 같이 46 acrocentric chromosomes으로 구성되어 있었으며, 암수간 heteromorphic 한 염색체 쌍을 찾아볼 수 없어 성 염색체는 존재하지 않는 것으로 나타났다.

Table 3. Chromosome counts of spotted flounder, *Verasper variegatus*

Sex	No. of specimen examined	Frequency of chromosome count				
		44	45	46	47	48
Female	8	12	21	160	3	1
Male	8	9	18	163	3	1

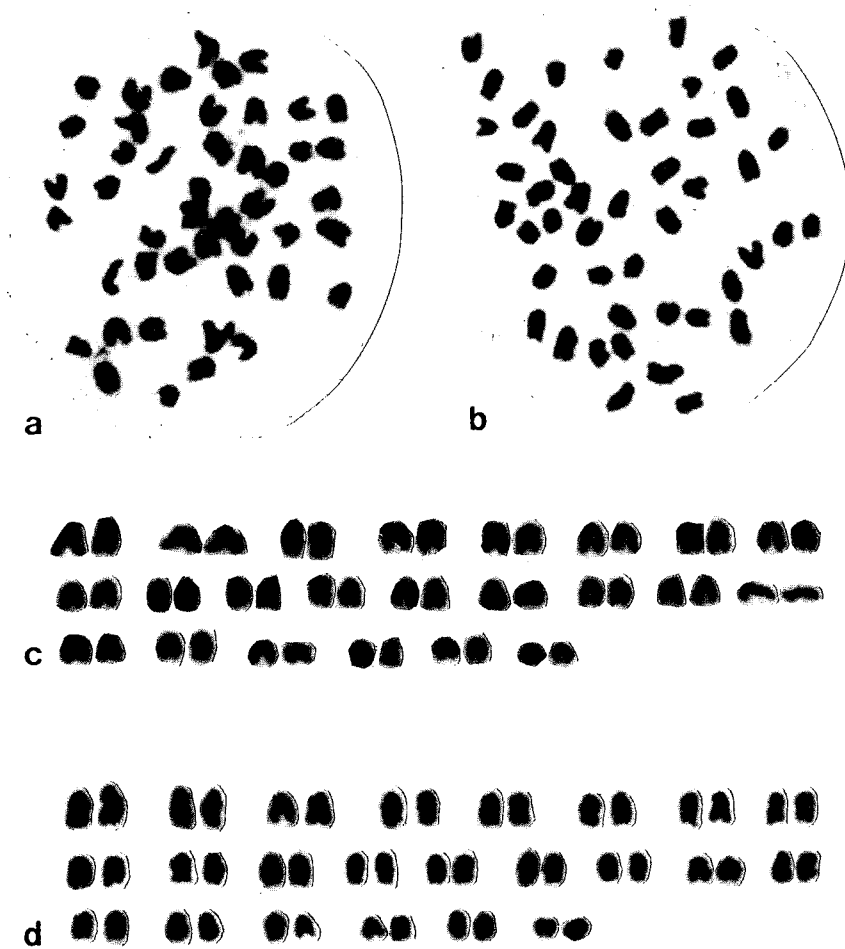


Fig. 3. Metaphases and idiograms of female (a & c) and male (b & d) spotted flounder, *Verasper variegatus*.

4. PCR 기법에 의한 mtDNA의 12S rRNA gene의 증폭

PCR을 이용 범가자미의 mtDNA의 12S rRNA gene segment를 증폭하여 전기 영동한 결과는 Fig 4와 같다. 범가자미의 mtDNA의 12S rRNA gene segment의 분자량과 대조군으로 사용한 차널메기의 mtDNA의 12S rRNA gene segment 분자량은 대체로 같은 것으로 나타났다.

범가자미에 대한 유전학적 동정

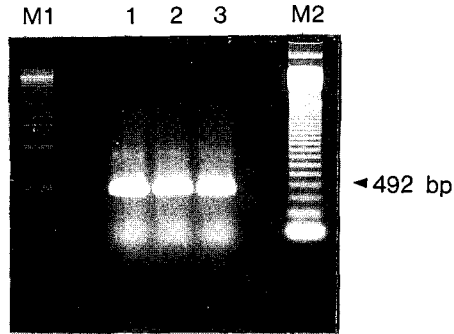


Fig. 4. Segments of the mitochondrial gene for 12S rRNA amplified by polymerase chain reaction. Lane 1, channel catfish, *Ictalurus punctatus* ; lane 2, olive flounder, *Paralichthys olivaceus* ; lane 3, spotted flounder, *Verasper variegatus* ; M1, 1 Kb ladder ; M2, 123 bp ladder.

5. 제한 지도 작성

PCR로 증폭한 범가자미의 mtDNA의 12S rRNA gene segment를 제한 효소로 처리한 결과는 Fig. 5 및 Table 4 와 같다. 범가자미의 증폭된 mtDNA의 12S rRNA gene segment에 관하여 *Ava* I, *Mae* II, *Sma* I 및 *Xba* I 는 1 개의 restriction site가, *Mae* I 은 2 개의 restriction site가 있는 것으로 나타났다. 반면, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Mlu* I, *Nde* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sph* I 및 *Xho* I 에서는 restriction site가 관찰되지 않았다.

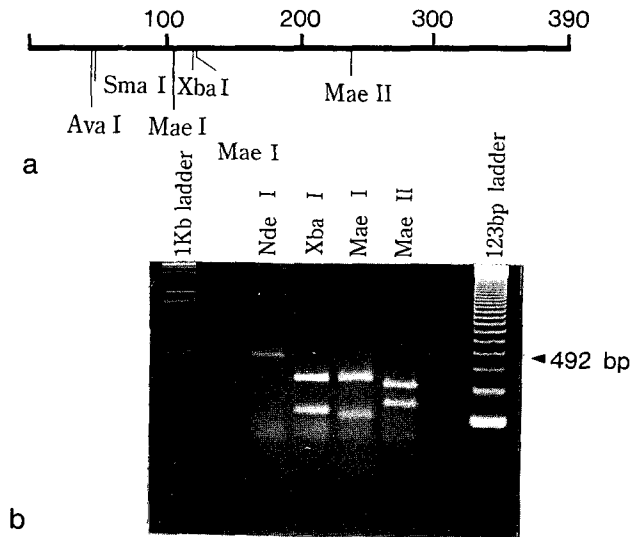


Fig. 5. Restriction enzyme analyses and sequence-predicted restriction sites in the 12S rRNA gene segments of mitochondrial DNA from spotted flounder, *Verasper variegatus*. (a) Predicted restriction sites. (b) Segments of 12S rRNA gene digested with selected restriction endonucleases and displayed on a 2% electrophoretic gel. Kb, kilobases ; bp, base pairs.

12S rRNA SEQUENCE COMPARISONS

R1091		
Human ^a	┆	
Channel catfish ^b	TGCTTAGCCCTAAACCTCAAC-AGTTA-AATCAACAAAC-TGCTGCCAGAACACTAGAGCCACAGCTTAAAACT	74
Channel catfish	TGCTTAGCCCTAAACCCAGAT-GTACTCTTACACACA--C-ATC-CGCCCGGGTACTAGGCAC-AGCTTAAACC	71
Channel catfish	TGCTTAGCCCTAAACATTGATTGTACTCTTACACACA--C-ATC-CGCCCGGGTACTAGGCAC-AGTITAAACC	72
Spotted flounder	TGCTTAGCCCTAAACATTGTTA--CCACACACTCTATATCCGCCCGGGAAATTACGAACATCAGTITAAACC	74
	***** *	
Human ^a	CAAAGGACCTGGCGGTCITCATATCCCTCTAGAGAGCCCTGTTCTGTAATGGATAAACCCCGATCAACCTCACCAC	151
Channel catfish ^b	CAAAGGACTTGGCGGTCITCAGACCCACCAGAGAGGACCTGTTCTATAACCGATAACCCCGGTTAAACCTCACCAC	148
Channel catfish	CAAAGGACTTGGCGGTCITCAGACCCACCAGAGGACCTGTTCTATAACCGATAACCCCGGTTAAACCTCACCAC	149
Spotted flounder	CAAAGGACTTGGCGGTCITTAACATCCACCTAGAGAGGACCTGTTCTATAACCGATAACCCCGGTTAAACCTCACCCT	151
	*** ** *	
Human ^a	CTCTTGCT---CAGCCTACAT--ACCGGCATCTTCAGCAAAACCCTGATGAAGGTAACAAGTAAGCCAA--CGTAC	222
Channel catfish ^b	TTCTTGTTATCCGGCCTATAT--ACGGCGTGTGACCTTACCCCTGTAAGTAAACA-GTAGTAAGCAAAAATGGGGG	222
Channel catfish	TTCTTGTTATCCGGCCTATATATACCGCGTGTGACCTTACCCCTGTAAGGCTTAAAC-AGTAAAGCAAAAATGGGCC	225
Spotted flounder	CCCTTGTTTATCCGGCCTATAT--ACCACCGTGTGACCTTACCCCTGTGAAGGCTTTACAAGNAAAGNAANATTGGCA	226
	*** *	
Human ^a	CCAGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTTAGCCCATGAGGTG-GCAAGAAATGGGCTACATTTTC--TACCCAGAAA	296
Channel catfish ^b	CCGCCAAAACCGTCAGGTTGAGGTTAGCGTACGAAAGTGTGGAAGAAATGGGGACATTTTCTATAC-CTAGAAT	298
Channel catfish	C-GCCCCAAAACCGTCAGGTCGAGGTGNGGTCGGAAGTG-GGAAGAAATGGGCTACATTTTCTATAC-CTAGAAT	299
Spotted flounder	CAGCCCCAAA--CGTCAGGTGAGGTTAGTGAATGA-GAGGGGAAGANNGGNTTACTTTTGTAAAC-ATNGCAA	300
	* *	

Fig. 6. Sequences of mitochondrial 12S rRNA gene segments from spotted flounder and channel catfish aligned with that of a human. Bases are adenine (A), cytosine (C), guanine (G) and thymine (T). Dashes indicate base deletions ; asterisks denote identical homologous bases. ^arefer to Anderson et al. 1991 ; ^brefer to Whitmore et al. 1992.

Table 4. Restriction enzyme analyses of the 12S rRNA gene in spotted flounder and channel catfish as amplified by polymerase chain reactions

Enzymes ^a	Restriction site ^b	Site location ^c	
		Spotted flounder	Channel catfish
Ava I	C pyCGPuG	45	43
Mae I	C TAG	104, 119	291
Mae II	A CGT	236	233
Sma I	CCC GGG	47	45
Xba I	T CTAGA	118	

^a The following enzymes found no cutting sites in the 12S rRNA gene segments : BamH I, EcoR I, Hind III, Kpn I, Mlu I, Nde I, Sac I, Sal I, Sph I and Xho I.

^b Vertical bar=place where enzyme cuts the site ; Py=any pyrimidine ; Pu=any purine.

^c Location site of restriction site 12S rRNA sequences in Fig. 6.

6. 개체간 변이

여천산 범가자미의 restriction site의 변이를 조사한 결과, 본 연구에서 조사된 개체들간 restriction site에 따른 다형 현상은 관찰되지 않았다.

7. PCR products의 염기 서열 분석

범가자미의 mtDNA의 12S rRNA gene segment를 염기 서열 분석 한 결과를 대조구인 인간과 차넬메기와 함께 Fig. 6에 나타내었다. 대략 각 segment의 300 bp를 비교한 결과, 범가자미는 차넬메기와 identity가 81.8 %, 인간과는 67.7 % 정도로 차넬메기의 mtDNA의 12S rRNA gene과 매우 높은 유사성을 보임을 알 수 있었다.

고 찰

세포 및 핵의 크기 조사는 세포 유전학적 분석에 있어서 가장 손쉬운 방법으로 특히 배수체의 판단 기준 및 잡종의 세포 유전학적 특성을 밝히는데 유용하게 사용되고 있어 Benfey (1989)는 자연계에 존재하는 다배체의 어류 및 인위적으로 유도된 배수체 어류에서 세포 크기를 조사한 바 있다. 또한 미꾸라지와 미꾸리간에서 유도된 잡종의 세포크기 변화는 양친의 중간을 나타냄이 보고되고 있다 (박 1992). 본 조사에서 밝혀진 범가자미의 적혈구와 핵의 평균 부피는 각각 211.10 μm^3 와 23.03 μm^3 으로 앞으로 범가자미를 이용한 배수체 및 잡종 유도시 그 판단 기준으로 이용될 수 있을 것이다.

어류에 있어서 genome size의 변이는 종에 따라 0.1 pg ~ 124 pg 으로 매우 다양함이 보고되고 있다 (Hinegardner and Rosen 1972). 범가자미의 haploid DNA content는 0.79 pg로 Hinegardner와 Rosen (1972)이 보고한 붕넛치과의 *Glyptocephalus zachirus*의 0.84 pg, *Eopsetta jordani*의 0.75 pg, *Lyopsetts axilis*의 0.73 pg, *Pseudopleuronectes americanus*의 0.70 pg와 유사하여 앞으로 여타 양식 어종 간의 확인 및 진화 과정 규명에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Patro와 Prasad (1981)는 가자미목 어류의 염색체를 조사한 후 이들의 핵형을 비교하여 대다수 붕넛치과 어류의 염색체 수 및 핵형이 48 acrocentric chromosomes 이고 arm number는 48 이 가장 primitive한 form으로 제안하였다. 본 조사 결과 범가자미의 염색체 수는 2n=46, 핵형은 모두 acrocentric chromosomes, arm number는 46으로 나타나 상기 연구자의 추측과 다르게 나타났으며,

이러한 염색체 수 및 그 핵형의 차이는 염색체 소실에 의한 변이로 추정된다. 한편 Fukuoka 와 Niiyama (1970)는 범가자미와 같은 속에 속하는 노랑가자미, *Verasper moseri*의 염색체수는 $2n=46$, 핵형은 2 submetacentric chromosomes과 44 acrocentric chromosomes, arm number는 48로 보고한 바 있어 앞으로 노랑가자미에 대한 세포 유전학적 분석을 실시, 두 종간의 염색체 진화에 의한 기작을 밝혀야 할 것으로 사료된다.

어류의 mtDNA에 대한 조사는 간 또는 생식소로부터 전체의 mitochondrial genome을 분리한 후 제한 효소의 처리에 의하여 절단된 restriction site의 분석을 통해 이루어져 왔다 (Avisé et al. 1986; Billington and Hebert 1991). 그러나 최근에는 PCR 기법을 이용하여 소량의 혈액, 비늘 및 지느러미로도 충분한 양의 mtDNA를 증폭시킬 수 있다고 보고한 바 있다 (Rogers et al. 1990; Wright and Monos 1990). 본 연구에서도 10 mg 미만의 간 또는 소량의 혈액 및 비늘로부터 mtDNA 12S rRNA gene의 증폭을 위한 충분한 양의 DNA를 얻을 수 있었으며 어체를 죽이지 않고도 특정 gene의 분석에 의하여 유전학적인 종의 동정 및 개체간 집단간 유전적 변이의 분석이 가능하게 되었다.

본 연구에서는 PCR 기법을 이용하여 범가자미와 대조군으로 차널메기의 mtDNA의 12S rRNA gene을 증폭하여 전기 영동 한 결과 분자량이 Whitmore 등 (1991)이 시료로 이용한 차널메기 및 largemouth bass의 분자량과 일치하여 PCR에 의한 12S rRNA gene의 증폭이 정확하게 이루어 졌음을 알 수 있었고 아울러 어류에 있어서도 포유류와 마찬가지로 mtDNA의 12S rRNA gene이 매우 잘 보존되어 있는 것으로 생각된다.

범가자미 mtDNA의 12S rRNA gene segment를 대상으로 한 제한 효소 분석 결과, 개체간 차이는 나타나지 않아 Whitmore 등 (1992)의 결과와 일치하였다. Fig. 5 및 Table 4에서 보듯이 본 종의 12S rRNA gene segment에 관하여 5 종류의 제한 효소 (Ava I, Mae I, Mae II, Sma I 및 Xba I)에서 1 개 이상의 restriction site가 관찰되었다. 이 중 Ava I 과 Sma I 은 차널메기, yellow bass (*Morone mississippiensis*)와 유사한 site에 1 개의 restriction site를 갖고 있었고, Xba I의 경우 largemouth bass, bluegill (*Lepomis macrochirus*), white bass (*Morone chrysops*) 및 longear sunfish (*Lepomis megalotis*)와 마찬가지로 1 개의 restriction site가 관찰되었으며 Mae II는 차널메기, largemouth bass 및 본 종 모두 1 개의 restriction site를 갖고 있었다. 반면 Mae I 은 차널메기의 경우 1 개, largemouth bass의 경우 3 개의 restriction site가 존재하는 것으로 보고되어 있으나 (Whitmore et al. 1992), 범가자미의 경우 2 개의 restriction site가 관찰되어 가장 많은 차이를 나타내었다. 이와 같이 mtDNA의 12S rRNA gene의 PCR product를 대상으로 한 제한 효소 분석은 비교적 정확하고 신속한 종간 변이 분석이 가능한 것으로 나타나 앞으로 여타 양식 어종 간 유전적인 종의 동정 및 유전적 다형 현상 분석에 유용하게 적용 될 수 있을 것으로 생각된다.

PCR product의 염기 서열 분석은 고도의 기술과 경비가 요구되나 종과 집단의 유전적 진화의 연구에 있어서 대단히 중요하다. Whitmore 등 (1991)은 차널메기, largemouth bass 및 인간의 mtDNA 12S rRNA gene segment의 염기 서열을 비교한 결과, 유사도가 largemouth bass와 차널메기는 78.4%, 차널메기와 인간은 75.0%로 보고하였다. 본 연구에서는 범가자미와 함께 차널메기의 mtDNA 12S rRNA gene segment의 염기 서열을 Anderson 등 (1981)이 연구한 인간의 mtDNA 12S rRNA gene segment와 유사도를 비교한 결과, 범가자미와 인간은 67.7%인데 비해 범가자미와 차널메기는 81.8%로 나타났다. 따라서 본 연구와 같은 염기 서열 분석에 의한 유전적인 동정은 앞으로 어류의 자원화적인 측면 뿐 만이 아니라 양식 산업에 있어서 종간 및 집단간의 식별, 유전적으로 우수한 종의 보존 및 앞으로 다칠 생물 자원 협약 등 제 국가간 문제에도 유용하게 응용될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 국내 여러지역에 서식하는 범가자미에 대한 유전학적인 동정이 이루어진

다면 우량 형질의 보존 및 선발 육종 등의 유전 육종학적인 관점에서 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

범가자미, *Verasper variegatus*에 대한 유전학적 동정을 위하여 세포 크기, DNA 함량, 염색체 수 및 핵형분석 등의 세포유전학적 조사와 PCR 기법을 이용한 mtDNA 12S ribosomal RNA gene의 분석을 실시하였다.

본 종의 적혈구와 핵의 평균 부피는 각각 $210.10 \mu\text{m}^3$ 와 $23.03 \mu\text{m}^3$ 였으며, haploid DNA content는 0.79 pg/cell 로서 잉어의 46.5 %, 포유류의 22.6 %로 나타났다. 염색체 수는 46 개로 모두 acrocentric 염색체로 구성되어 있었으며, heteromorphic한 성 염색체는 관찰되지 않았다.

PCR 기법을 이용하여 증폭된 범가자미 mtDNA의 12S rRNA gene segment는 대략 390 bp로 나타났고, 12S rRNA gene의 PCR product를 제한 효소로 처리한 결과, *Ava* I, *Mae* II, *Sma* I, *Xba* I는 1개의 restriction site가, *Mae* I는 2개의 restriction site가 관찰되었다. 범가자미 mtDNA의 12S rRNA gene segment의 염기 서열을 인간과 차넬메기와 비교한 결과, identity가 차넬메기 와는 81.8 %, 인간과는 67.7 % 였다.

참 고 문 헌

- Anderson, S., A. T. Bankier, G. T. Barrell, M. H. L. deBruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Standen and I. G. Yong. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457~465.
- Atkin, N. B., G. Mattison, W. Becak and S. Ohno. 1965. The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptiles, and birds. *Chromosome* 17:1~10.
- Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders and L. S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4350~4354.
- Bachmann, K., O. B. Goin and C. J. Goin. 1972. Nuclear DNA amounts invertebrates. *Brookhaven Symp. Biol.* 23:419~450.
- Bartlett, S. E. and W. S. Davidson. 1991. Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:309~317.
- Beckenbach, A. T., W. K. Thomas and H. Sohrabi. 1990. Intraspecific sequence variation in the mitochondrial genome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genome* 33:13~15.
- Benfey, T. J. 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1682:33pp.
- Billington, N. and P. D. N. Hebert. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:80~94.

- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA, p 62~68. In: M. Nei and R. K. Koehn (Eds). *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, MA. USA
- Brown, W. M., M. George, Jr. and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1967~1971.
- Carr, S. M. and H. D. Marshall. 1991. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhus*) by the polymerase chain reaction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:48~52.
- Chung, M. K. 1977. The fishes of Korea. Il Ji Sa Pub. Co., Seoul, pp. 210~218.
- Cruz, T. A., J. P. Thorpe and R. S. V. Pullin. 1982. Enzyme electrophoresis in *Tilapia zillii*: a pattern for determining biochemical genetic markers for use in tilapia stock identification. *Aquaculture* 29:311~329.
- Fukuoka, H. and H. Niiyama. 1970. Notes on the somatic chromosomes of ten species of pleuronectid fishes. *C. I. S.* 11:18~19.
- Gold, J. R. 1979. Cytogenetics. p. 353~405. In: W. S. Hoar et al., *Fish physiology*, Vol. 8. Academic Press, London.
- Hinegardner, R. and D. E. Rosen. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.* 106:621~644.
- Hultman, T., S. Bergh, T. Moks and M. Uhlen. 1991. Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro-amplified plasmid DNA. *Biotechniques* 10:84~93.
- Johansen, S., P. H. Guddal and T. Johansen. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res.* 18:411~419.
- Kim, D. S., E.-H. Park and J. S. Kim. 1982. Karyotypes of nine species of Korean catfishes. *Kor. J. Genet.* 4:57~68.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Willson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6196~6200.
- Labarca, C. and K. Paigen. 1980. A simple rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:344~352.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201~220.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283~292.
- Patro, R. and R. Prasad. 1981. Chromosomal studies in five indian flatfishes. *Copeia* 1981:498~503.
- Pedersen, R. A. 1971. DNA content, ribosomal gene multiplicity, and cell size in fish. *J. Exp. Zool.* 177:65~78.
- Purdom, C. E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33:287~300.
- Rogers, B. B., L. C. Alpert, E. A. Hine and G. J. Buffone. 1990. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 136:541~548.
- 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.
- Smith, P. J., A. J. Birley and C. A. Bishop. 1989. Mitochondrial DNA in the Atlantic cod,

- Gadus morhua*: lack of genetic divergence between eastern and western populations. J. Fish. Biol. 34:369~373.
- Szarski, H. 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. Inter. Rev. Cytol. 44: 93~112.
- Whitmore D. H., T. H. Thai and C. M. Craft. 1992. Gene amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. Tran. Am. Fish. Soc. 121:170~177.
- Wolters, W. R., C. L. Chrisman and G. S. Libey. 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus Puntatus*. J. Fish Biol. 20:253~258.
- Wright, D. K. and M. M. Manos. 1990. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. p. 153~158. In: M. A. Innis et al. (Eds). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic, New York.
- 박인석, 1992. 미꾸리와 미꾸라지의 잡종 및 잡종 3배체에 관한 연구. 부산수대 박사 학위 논문. 부산. 84pp.