

강도다리(*Platichthys stellatus*)에 대한 세포유전학적 연구

정효선 · 김연경 · 김현철² · 노재구² · 이정호² · 김동수^{1*}

부경대학교 해양용 LMO 위해성 평가 센터, ¹부경대학교 해양바이오신소재학과, ²국립수산과학원 육종연구센터

Cytogenetic Analysis of Starry Flounder *Platichthys stellatus* from Korea

Hyo Sun Jung, Youn Kyoung Kim, Hyun Chul Kim², Jae-Koo Noh², Jong-Ho Lee² and Dong Soo Kim^{1*}

Risk Assessment Center of Marine Living Modified Organisms, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Marine Bio-Materials & Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Genetics and Breeding Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Geoje 656-842, Korea

Cytogenetic analysis was conducted to obtain basic information for chromosome manipulation of starry flounder *Platichthys stellatus*. Nuclear surface area and volume of erythrocyte were $7.60 \pm 0.93 \mu\text{m}^2$ and $12.80 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$, respectively. The haploid DNA content of the species was 0.66 pg/haploid cell which correspond to 93% of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A karyotype analysis was also carried out with the species using conventional staining and Ag-NOR banding techniques. It was consisted of 48 acrocentric chromosomes and inter-sex or intra-individual polymorphism was not detected in all specimens analyzed. The NOR regions, appearing a terminal position of the short arm of the smallest acrocentric pairs.

Key words: Starry flounder, Cell and nuclear sizes, Genome size, Karyotype, Ag-NORs

서 론

어류의 염색체 조작을 통한 자성발생성 2배체 생산은 단기간에 순계를 확립할 수 있는 장점이 있고, 특히 그의 성결정 기작이 암컷동형접합성(XX female)일 경우 유도된 자성발생성 암컷을 생리학적으로 성전환 기법으로 생산한 가짜 수컷과 대조군 암컷을 교배시킴으로서 전 암컷집단을 손쉽게 생산할 수 있는 이점이 있어 많은 양식어류에 적용되어왔다(Kim et al., 1993). 넓치, *Paralichthys olivaceus*는 우리나라를 포함한 동북아시아에서 선호되고 있는 양식어종으로 최근에는 칠레 등 중남미에서 새로운 양식대상종으로 각광받고 있어 우리나라에서는 Golden Seed Project (GSP) 사업을 통해 우량넓치의 종묘를 전세계에 수출하기 위한 계획을 수립하고 2013년부터 그간 국립수산과학원 육종센터에서 선발육종기법을 통하여 생산한 '킹넵치(KingNupchi)'의 불임종묘를 수출하기 위한 연구를 수행하고 있다(NFRDI, 2013).

그간 자성발생성 2배체는 감성돔 또는 참돔의 정자를 불활성화시켜 유도한 바 있다(Kim et al., 1993; Yamamoto, 1999). 그러나 상기 어종들은 모두 봄에 산란하는 종으로 이들 종의 정자를 이용하는데 제한이 있으므로 이를 해소하기 위한 적절한 어종의 선택이 필요하다.

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 가자미목(Pleuronectiformes), 가자미과(Pleuronectidae)에 속하는 저서성 어류로, 우리나라 동해안 및 일본 중부 이북, 러시아 및 미국 캘리포니아 만에 이르는 저수온대에 분포하는 대형종으로서 강한 내병성 및 광염성 등의 특징 때문에 최근 우리나라에서 양식 생산량이 점차 증가되고 있다(Nam et al., 2008; Kim, 2012).

이에 본 연구에서는 저수온기 넓치의 자성발생성 2배체 유도에 강도다리의 정자를 이용하고자 본 종에 대한 세포의 크기와 DNA 함량 등을 조사하였고, 본종이 넓치와 잡종이 유도(Nam et al., 2008) 되는 점을 감안, 염색체에 대한 핵형 분석과 아울러, Ag-NOR banding을 실시함으로써 불완전한 처리에 의해

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0431>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(4) 431-434, August 2014

Received 7 April 2014; Revised 23 May 2014; Accepted 27 May 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5914 Fax: +82. 51. 629. 5908

E-mail address: dongskim@pknu.ac.kr

두 중간 잡종 또는 잡종 3배체가 유도되었을 시, 넙치의 염색체와 쉽게 구별할 수 있는 마커 염색체를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

세포유전학적 분석을 위하여 거제도의 민간양식장과 부산시 남천동의 수산시장에서 구입한 어체중 350-500 g의 강도다리 14마리를 사용하였다.

세포 및 핵의 크기 분석

적혈구의 세포와 핵 크기를 측정하기 위해 강도다리의 미병부 미부정맥으로부터 말초혈액을 채취한 후 슬라이드에 도말하여 95% ethanol에서 5분간 고정한 다음 5% Giemsa 염색 용액에서 15분간 염색하였다. 적혈구 세포와 핵의 장경(a) 및 단경(b)을 광학현미경에서 micrometer로 측정하였다. 표면적은 $(a) \cdot (b) \cdot \pi / 4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978), 부피는 $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \pi / 3$ (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였다.

DNA 함량 분석

DNA 함량을 분석하기 위해 Flowcytometry를 수행하였다. 강도다리의 꼬리지느러미를 면도칼로 세절한 후 nucleic extraction buffer (Partec, Germany)을 250 μ L 넣고 20분간 암실에서 반응시킨 뒤, staining buffer (Partec, Germany)를 1 mL 첨가하여 암실에서 1시간 동안 반응하였다. 염색한 시료를 30 μ m 체로 거른 뒤 PartecPA-II flowcytometer (Partec, Germany)로 DNA 함량을 측정하였다.

염색체 분석

강도다리의 염색체 수 판별 및 핵형 분석을 위해 신장직접법 (Kim et al., 1982)을 이용하였다. 실험군에 colchicine을 5-10 μ g/g 체중의 용량으로 복강 주사하고 4-5시간 방치한 후 신장을 적출 세절한 후 상온에서 저장액(0.075 M KCl)에 처리하고 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸쳐 고정하였다. 슬라이드 표본은 공기건조법으로 작성되었으며, 작성된 슬라이드 표본은 5% Giemsa 염색 용액에 15분간 염색하여 광학 현미경에서 중기 염색체 상을 관찰하였다. 각 슬라이드 당 10여개의 판독 가능한 염색체 중기 분열상을 대상으로 계수

하였으며, 분열상이 뚜렷한 시료를 대상으로 사진 촬영하여 핵형을 분석하였다.

염색체의 Nuclear organizer regions (NORs) 분석

강도다리의 염색체 NORs를 분석하기 위해 Goodpasture and Bloom (1975)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다.

결과 및 고찰

어류의 적혈구 세포 및 핵의 크기 조사는 배수체의 판단 기준 및 잡종의 세포유전학적 특징을 연구하는데 유용하게 이용되고 있다(Benfey, 1989). 이에 강도다리의 세포 및 핵의 크기를 측정된 결과 적혈구 세포 장축은 $8.12 \pm 1.15 \mu\text{m}$, 단축은 $5.60 \pm 0.63 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적은 $35.58 \pm 6.01 \mu\text{m}^2$, 부피는 $134.07 \pm 34.36 \mu\text{m}^3$ 였다. 또한 적혈구 핵의 장축은 $3.88 \pm 0.71 \mu\text{m}$, 단축은 $2.53 \pm 0.25 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적은 $7.60 \pm 0.93 \mu\text{m}^2$, 부피는 $12.80 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$ 로 관찰되었다(Table 1). 이를 Kim et al. (1993)이 보고한 넙치와 비교 시 적혈구 세포의 표면적 및 부피는 85-87% 정도로서 앞으로 본종을 이용하여 자성발생성 넙치 생산 시 이를 분석할 수 있는 하나의 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다.

DNA 함량은 종에 따라 고유하며 진화 정도에 따라 일반적으로 증가하고, 단시간에 정확하게 그 함량을 분석할 수 있는 장점이 있어 종 고유의 특성을 분석하는데 유용하게 사용되고 있다(Byrappa, 2003). 따라서 앞으로 넙치의 자성발생성 개체를 유도 시 적절치 못한 조건에 의해 유도된 잡종 또는 잡종 3배체를 DNA 분석을 통해 선별하기 위해 이미 보고되어 있는 넙치 (0.71 pg/haploid cell; Animal genome size database, 2014)를 대조군으로 하여 측정된 결과, 강도다리의 DNA 함량은 0.66 pg/haploid cell로 확인되어(Table 2) 넙치의 93%로서 앞으로 자성발생성 넙치, 넙치와 강도다리간 잡종 및 잡종 3배체의 DNA 함량 분석에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

Fig. 1a와 1b는 강도다리의 암컷 및 수컷의 중기분열상이다. 강도다리 암컷 2마리, 수컷 5마리를 대상으로 각 개체당 10개 이상의 중기분열상을 분석한 결과, 강도다리의 염색체 수는 $2n=48$ 그리고 핵형은 차단부염색체가 24쌍이었다. 암수간 염색체수의 차이는 없었으며, 개체간 및 세포간 염색체 다형현상도 관찰되지 않았다(Fig. 1c - 1d). 그러나 암수 모두 가장 작은 1쌍의 차단부 염색체의 단완 부위가 매우 큰 것이 관찰 되었으

Table 1. Comparison of cell and nuclear sizes of *Platichthys stellatus*

	Cell	Nucleus
Major axis (μm)	8.12 ± 1.15	3.88 ± 0.71
Minor axis (μm)	5.60 ± 0.63	2.53 ± 0.25
Surface area (μm^2)	35.58 ± 6.01	7.60 ± 0.93
Volume (μm^3)	134.07 ± 34.36	12.80 ± 1.75

Table 2. Genome size of *Platichthys stellatus* determined by flow cytometry

Specis	Fish No.	Channel value of mean	C/V	C-value (pg/haploid cell)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1	113.64	10.47	
	2	111.04	9.59	
	3	105.51	16.42	
	4	116.7	7.7	
	Mean	111.72		0.71 ¹
<i>Platichthys stellatus</i>	1	101.71	10.44	
	2	102.25	11.21	
	3	100.32	13.88	
	4	111.12	9.31	
	Mean	103.85 ± 4.91		0.66

¹ <http://www.genomesize.com/>

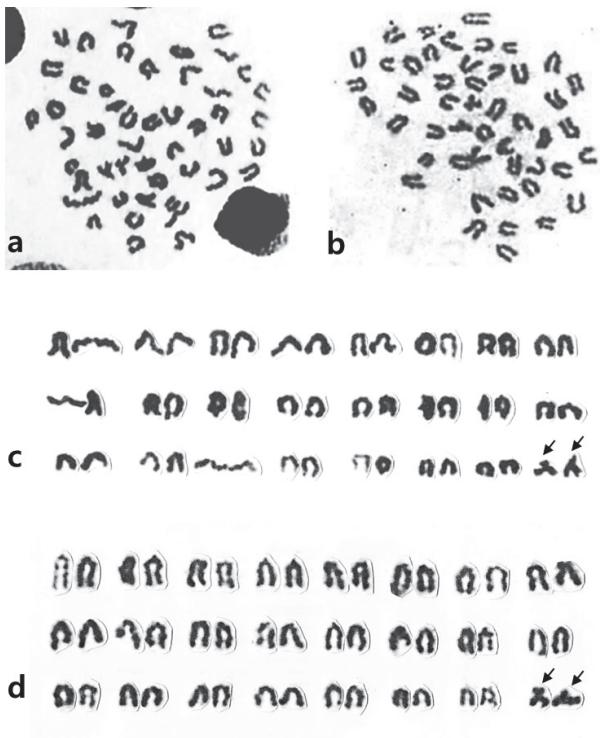


Fig. 1. Metaphase and idiogram of female (a & c) and male (b & d) *Platichthys stellatus*. Arrows indicate large short armed chromosomes.

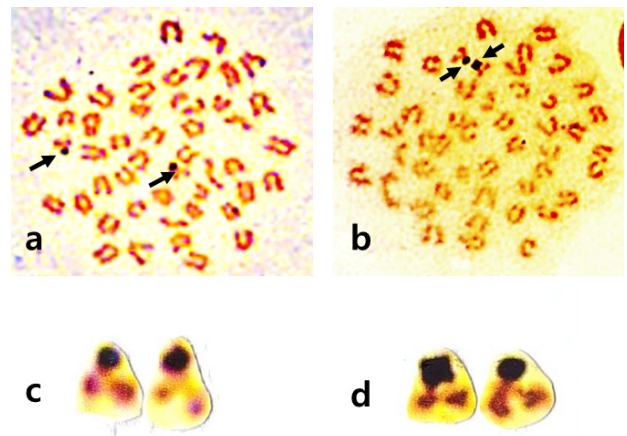


Fig. 2. Silver-stained metaphases of female (a) and male (b) *Platichthys stellatus* and partial karyotype of Ag-NOR positive chromosome pairs (c & d). Arrows indicate silver-stained NORs signal.

염색체를 분석한 결과, 일반염색에 의하여 진하게 염색되는 한 쌍의 작은 차단부 염색체의 단완 부위는 NOR positive 부분인 것으로 확인되었다. 따라서 앞으로 중국산 강도다리에 대하여 Ag-NOR banding을 통해 재분석을 하여야 할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청의 지원과제 수출용 킹넵치의 배수체 종자개발(과제번호213004-04-1-1SB220)에 의해 수행되었습니다.

나 Ag-NOR banding 결과 그 부위가 매우 진하게 염색되어 인형성 부위인 것으로 판명되었다(Fig. 2).

중국산 강도다리의 경우 Li (2009)는 2n=48이며 46 단부 염색체와 1 쌍의 차중부 염색체로 구성되어 있다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 Ag-NOR banding 방법을 통하여 이들

References

- Animal Genome Size Database, 2014. Vertebrates-Fishes haploid C-value. Retrieved from <http://www.genomesize.com> on March 27.
- Benfey TJ. 1989. A bibliography of triploid fish 1943 to 1988. Can Tech Rep Fish Aqua Sci 1682, 33.
- Byrappa V. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. Curr Opin Genet Dev 13, 588-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2003.09.001>.
- Goodpasture C and Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53, 37-50.
- Kim DS, Park EH and Kim JS. 1982. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes (Teleostomi:Siluriformes). Kor J Genet 4, 57-68.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB and Cho KC. 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. Gene & Genomics 48, 179-186.
- Kim PK. 2012. Growth performance and digestive characteristics of starry flounder *Platichthys stellatus* on the moist and extruded pellets. Kor J Fish Aquat Sci 45, 679-685.
- Lemoine HLJr and Smith LT. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans Fish Soc 109, 626-631.
- Li D. 2009. Studies on karyotype and digestive physiology of *Platichthys stellatus* Pallas. M.S. Thesis, Ocean University of China, Qingdao, China.
- Nam MM, Byun SG, Lee BI, Lee JH and Kim YC. 2008. Morphological characteristics of the hybrids of female flounder *Paralichthys olivaceus* and male starry flounder *Platichthys stellatus*. Kor J Ichthyol 20, 258-290.
- NFRDI. 2013. Olive flounder *Paralichthys olivaceus* Golden Seed project report. Golden Seed project report, 24-36, 1-533.
- Sezaki K and Kobayashi H. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. Bull Jap Soc Sci Fish 41, 851-854.
- Yamamoto E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Aquaculture 173, 235-246.