

# 한국산 연어류에서 Genetic Marker 개발을 위한 생화학적 연구

홍경표 · 명정구 · 손진기 · 박철원  
한국해양연구소

## A Biochemical Study for the Development of Genetic Marker on Salmonids in Korea

Kyung-Pyo HONG · Jung-Goo MYOUNG · Jin-Ki SON and Chul-Won PARK  
Korea Ocean Research and Development Institute,  
Ansan P. O. Box 29, Korea

For the purpose of genetic stock identification of three species of salmonid fishes and their hybrid, lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase(MDH), isocitrate dehydrogenase(IDH),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase( $\alpha$ -GPDH), malic enzyme(ME), 6-phospho-gluconate dehydrogenase(6-PGD), phosphoglucose isomerase(PGI) and phospho-glucomutase(PGM) from skeletal muscle, liver, heart and gill tissues in all three species were analyzed. Chum and masu salmon showed no polymorphic patterns in all isozyme loci, however rainbow trout were found to have polymorphic patterns at MDH-B, LDH and IDH loci. Especially, significant differences were found at MDH-B loci between the three species and the IDH patterns of rainbow trout were also different from the other two species. These loci therefore can be utilized as efficient genetic markers for the identification of hybrids and improve the efficiency of fish breeding.

There was no difference except PGI between diploid and triploid isozyme patterns but PGI showed some potential as a marker for triploid in masu salmon.

### 서 론

우리나라의 주요 수산자원인 연어과 어류의 유전생화학적 연구는 유전적 특징을 파악함은 물론 유용유전자의 검색 및 이의 활용을 위해 중요하다. 지금까지 어류의 유전학적 연구는 거의 세포 및 염색체 수준에서 이루어져 왔으며 근래에 와서 mitochondrial DNA 연구가 활발하게 진행되고 있다(Wilson *et al.*, 1985; Lansman *et al.*, 1981; Birt *et al.*, 1986; Palva *et al.*, 1989).

동위효소 연구는 transferrin 연구와 더불어 전통적으로 어류의 유전학적 연구에 활용되어 왔는데, 특히 어류의 지역집단 및 개체군 판별에 중요한

key로 이용되어 왔으며(May *et al.*, 1975; Okazaki, 1982), 교잡종(hybrid)의 유전현상 분석에도 널리 이용되고 있을 뿐만 아니라(May *et al.*, 1980; Arai, 1984) 최근에는 배수체(ploidy) 어류의 판정에도 활용되고 있다(Croier and Moffett, 1989).

현재 3 배체 어류의 판정을 위해 사용하고 있는 방법으로는 핵형분석, 세포핵 크기 측정, 적혈구 핵의 크기 또는 microdensitometric analysis를 통한 적혈구 DNA 함량 측정, flow cytometry를 이용한 세포의 DNA 함량 측정 등이 있으나, Crozier and Moffett(1989)는 brown trout의 기름지느러미 조직의 PGI pattern을 3배체 판정에 이용한 바 있다.

본 연구에서는 우리나라의 하천으로 회귀하는

연어를 비롯하여 우리나라의 주요 양식대상 냉수성 어종인 무지개송어 및 산천어를 중심으로 동위효소의 pattern을 분석하여 우리나라의 연어류에 대한 유전적 기초자료로 삼고자 하였으며, 3배체 어류의 판정에 동위효소를 marker로 활용할 수 있는지의 가능성을 검토해 보고자 산천어 2배체와 3배체 어류의 근육 추출물에 대한 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

실험어류는 1990년과 1991년에 우리나라의 동해안으로 회귀한 연어와 1991년 12월 교잡실험에 친어로 사용한 무지개송어(암컷) 및 산천어(수컷) 각각 20마리 및 이듬해 5월 5cm 전후의 교잡종 부화자어 30마리를 무작위로 추출하였다. 또한 양양내수면연구소에서 1992년 11월에 수온처리에 의해 생산한 산천어 3배체 및 대조군(2n)을 1993년 7월에 각각 30마리씩 실험하였다. 이들 어류의 생체로부터 간, 심장, 아가미 및 골격근 조직을 적출하고 dry ice에 급속동결하여 보관하였으며, 이들에 동량의 증류수를 첨가하여 균질한 다음 3,000 rpm으로 4℃에서 원심분리하여 상등액을 시료로 하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase(MDH), isocitrate dehydrogenase (IDH),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase( $\alpha$ -GPDH), malic enzyme(ME), 6-phosphogluconate dehydrogenase(6PGD), phosphoglucose isomerase(PGI)와 phosphoglucomutase(PGM) 등 8개의 동위효소에 대한 분석을 하였다.

전기영동은 13% 전분겔을 사용하였으며 전기영동용 buffer는 Shaw and Prasad(1970) 및 Clayton and Tretiak(1972) 등의 방법을 사용하였다. 각 효소의 염색은 전개를 마친 겔을 2mm 두께로 수평 절단하여 해당 염색용액(Shaw and Prasad, 1970)으로 15~60분간 실온에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Lactate dehydrogenase(LDH; EC, 1.1.1.27)

LDH는 그 유전현상과 subunit의 구조에 대해 가장 잘 알려진 효소가운데 하나이며, 독립된 A와 B loci의 제어를 받는다. 일반적으로 LDH-A는 골격근

에서 우세하며 LDH-B는 상이한 subunit에 의해 좌우되며 다섯개의 variants가 보고된 바 있다(Okazaki, 1982; Wright and Atherton, 1970). 이들 LDH-A와 B loci의 duplication에 의해 LDH-A<sub>1</sub>과 A<sub>2</sub> 그리고 LDH-B<sub>1</sub>과 B<sub>2</sub>형이 각각 존재하는데, 본 실험에서는 골격근의 LDH-A loci를 분석하였다. 무지개송어는 LDH-A<sub>1</sub> loci에서 산천어는 LDH-A<sub>2</sub> loci에서 그 variant를 확인할 수 있었다(그림 1). 연어에서는 LDH-A<sub>2</sub>로써 식별이 가능하며, 본 실험의 교잡종의 경우 LDH-A<sub>1</sub> loci에서만 활성이 나타났다. 또한 무지개송어에서는 본 실험시 A<sub>2</sub> loci에서 다형현상을 볼 수가 없었으나 연어에서는 LDH-A<sub>2</sub> loci에서 aa형과 ab형이 나타나는데 이때 b 유전자의 빈도(gene frequency)는 0.01 이하로 상당히 낮은 것으로 밝혀진 바 있다(명, 1992).

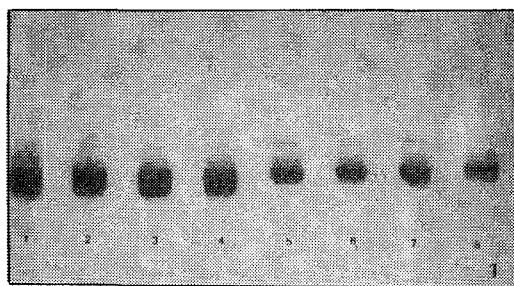


Fig. 1. LDH patterns of skeletal muscle extract in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and masu salmon(*Oncorhynchus masou*).

### 2. Malate dehydrogenase(MDH; EC, 1.1.1.37)

연어과 어류에서 MDH는 A형과 B형의 두가지 supernatant형이 존재하는 것으로 알려져 있으며(Utter and Hodgins, 1972), A형은 간 조직에서, B형은 골격근 조직에서 우세하게 나타난다. 특히 연어(*Oncorhynchus keta*)에서는 골격근 조직의 MDH-B loci의 b 유전자의 빈도에서 중간, 지역집단간의 차이를 보이고 있으며 개체군 판별의 주요 marker로 보고되어 있다(Okazaki, 1982).

본 연구에서는 중간교배에 사용된 무지개송어와 산천어의 근육, 간, 심장, 아가미 및 혈청 등 각 조직별 MDH의 pattern을 분석하였다(그림 2). 무지개송어 및 산천어의 종내 조직간의 MDH pattern의 비교에서 전체적으로 약간의 차이를 나타내고 있으며, 특히 근육 조직에의 B loci에서 산천어는 모

두 aa형의 동형접합이었으나 무지개송어에서는 aa 및 ab 형으로 b 유전자의 빈도가 높게 나타났으며 bb형의 동형접합도 나타났다. Utter and Hodgins (1972)에 의하면 무지개송어의 MDH-B loci에서 aa, ab, bb 형의 출현율은 9:6:1로 나타난다고 하였는데, 본 연구 결과와 거의 일치하고 있다.

한편, Allendorf(1975)에 의하면 MDH는 연어류에서 A와 B형의 subunit로 존재하는데, A형은 뇌와 간에서 우세하게 나타나며 B형은 근육에서 우세하여 B' 혹은 B형으로 존재한다고 발표한 바 있다.

심장조직의 MDH pattern에서 이들 두 종간에는 이동도에서 차이를 나타내었으나 혈청, 간 및 아가미 조직에서는 차이가 없었다.

교잡종 F<sub>1</sub>에 대한 분석을 실시한 바 교잡종은 MDH-B loci에서 모두 aa형의 동형 접합으로 나타나 앞으로 산천어 aa형과 무지개송어 bb형의 동형 접합체를 친어로 하여 교잡종을 생산한다면 이들의 유전현상을 더욱 정확히 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

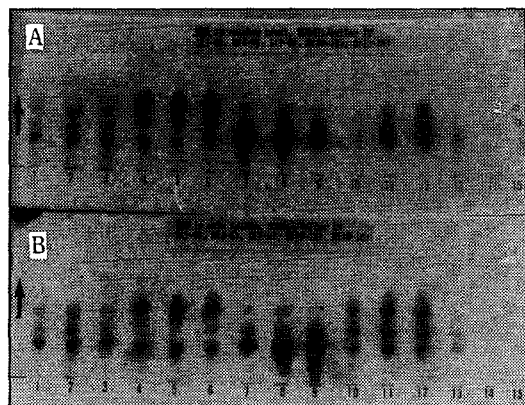


Fig. 2. Comparison of MDH patterns on various tissues in rainbow thout(A) and masue salmon (B). Serum(1~3), muscle(4~6), liver(7~9), heart(10~12), gill(13~15)

### 3. Isocitrate dehydrogenase(IDH; EC, 1.1.1.42)

IDH는 IDH-1, -2, -3등의 세 loci가 알려져 있으며, 골격근에서는 IDH-3가 우세하게 나타난다(Okazaki, 1982). 이는 이량체적 구조(dimeric structure)를 가지며 gene duplication이 보고되어 있다(Allendorf, 1975).

본 교잡실험에서 사용된 무지개송어에서는 *abb*, *aabb* 및 *bbbb* 형이 관찰되었으며 *aaaa* 형은 나타나지 않았다.

(Fig. 3, 1~4). 반면 산천어의 경우에는 모두 *aaaa* 형으로 b 유전자의 출현이 전혀 없었고 다형현상도 관찰되지 않았다(Fig. 3, 5~8). 또한 이들의 교잡종에서도 b 유전자는 전혀 나타나지 않았다.

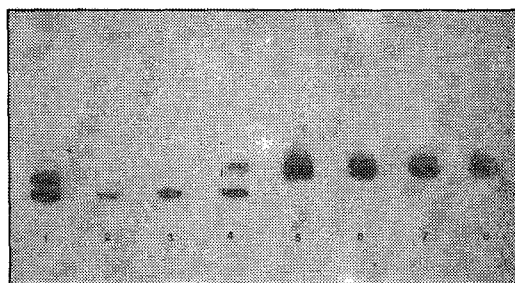


Fig. 3. IDH patterns of skeletal muscle extract in rainbow trout(1~4) and masu salmon(5~8).

### 4. $\alpha$ -Glycerophosphate dehydrogenase( $\alpha$ -GPDH; EC, 1.1.1.8)

$\alpha$ -GPDH는 세개의 loci를 가지는데  $\alpha$ -GPDH-1과 -2는 심장조직에서 우세하게 나타나며  $\alpha$ -GPDH-3은 심장 및 골격근 조직에서 우세하게 나타난다. 이는 골격근에서 이량적유전성향(dimeric inheritance)에 기인하여 세가지 표현형을 나타내는데 무지개송어에서는 이동거리에 따라 *ab*(100/100) 형이 나타났으며, 연어 및 산천어에서는 *aa*(100/100) 형의 동형접합형과 *ab* 형이 나타났으며, 이들 세 종간에 뚜렷한 유전자 빈도의 차이는 확인하지 못하였다. 또한 2배체와 3배체의 염색강도에서도 별다른 차이를 보이지 않아서 이들 어종간의 genetic marker로는 적당하지 않은 것으로 사료된다.

### 5. Malic enzyme(ME; EC, 1.1.1.38 or 1.1.1.39)

골격근육 조직의 ME-1의 pattern에 있어서 산천어와 무지개송어는 두종 모두 두개의 band를 공통적으로 가지고 있으며 종간의 차이는 없었다.

### 6. 6-phosphogluconate dehydrogenase(6-PGD; EC, 1.1.1.44)

6-PGD는 간장과 골격근 조직에서 IDH와 마찬가지로 이량체적 구조(dimeric structure)를 가진다(Okazaki, 1982). 본 실험 결과 골격근 조직에서의 세 종간의 차이는 발견할 수 없었으며 교잡종도 모두 *aa* 형이었고 b 유전자는 확인할 수 없었다.

산천어에서는 골격근 및 간장조직에서 단일 band 인 *aa*형으로 나타났으며 2배체와 3배체간의 차이도 식별할 수가 없었다. 골격근보다는 간 조직에서 활성이 높게 나타났으며(Fig. 4), 이 때 골격근과 간 조직의 이동거리가 상이하게 나타났는데 이는 단순히 이동속도의 차이로 사료된다.



Fig. 4. 6-PGD patterns of skeletal muscle and liver tissues in masu salmon(1~4, skeletal muscle; 5~8, liver).

7. Phosphoglucose isomerase(PGI; EC, 5.3.1.9)

PGI는 PGI-1, -2, -3의 세가지 loci가 나타나며 이중 PGI-3는 *aa*, *ab* 및 *bb* 형이 있고 *c*유전자도 관찰되나 항상 이량체적 구조를 나타낸다(Okazaki, 1982). 본 실험의 경우 2 배체 및 3배체 산천어의 골격근 조직만을 분석하였는데, 동형접합의 개체는 볼 수가 없었고 *ab*형만 나타났으며(그림 5), 개체간에 염색속도 및 염색 강도에서 약간의 차이를 확인할 수 있었다. 이는 3배체 어류의 판정에 PGI를 활용할 수 있다는 가능성을 시사하는데 아직까지는 그 효율이나 정확성을 단정지을 수는 없으나, 향후 각각 다른 동형접합의 친어(예를 들면, *aa* × *bb*)를 이용한 계획적인 교배일 경우에 보다 정확한 판별을 할 수 있을 것으로 판단된다.

Crozier and Moffett(1989)는 brown trout(*Salmo trutta* L.)에서 3배체 판정을 위해 기름지느러미 조직의 PGI-3를 분석하여 3배체에서 extra maternal PGI-3(110) gene의 retention으로 인한 염색강도의 차이를 규명한 바 있다. 본 실험의 결과로 보아 *aa* (100/100)와 *bb*(110/110)인 동형접합의 친어를 각각 사용하여 F<sub>1</sub> 3배체를 생산한다면 정확한 염색강도의 차이를 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

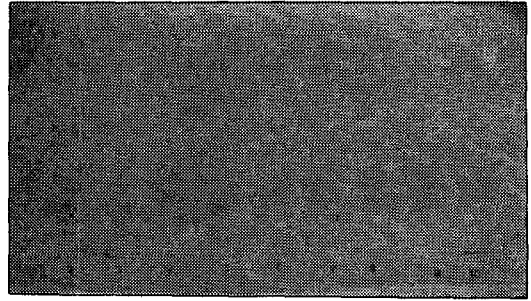


Fig. 5. PGI patterns of skeletal muscle extract in diploid and triploid of masu salmon.

8. Phosphoglucumutase(PGM; EC, 2.7.5.1)

PGM은 무지개송어에서 단량체적 구조(monomeric structure)를 가지며(Utter and Hodgins 1972) *aa*, *ab* 형이 존재한다.

본 연구결과 산천어의 경우 골격근 조직의 PGM pattern은 모두 *ab*형으로 나타났으며(Fig. 6) 종내의 변이는 발견되지 않았다.

이상과 같이 본 연구는 중간교배에 사용된 우리나라의 대표적인 연어과 어류인 산천어 및 무지개송어를 중심으로 하여 효소유전자를 분석하여 각종의 유전적 특징과 유전현상을 규명하고 이를 토대로 이들 종 및 계통군의 식별을 위한 genetic marker를 찾아보고자 하였으며, 또한, 배수체 어류(3배체) 유도시 유도결과의 효율적인 판별을 위해 동위효소를 marker로 활용할 수 있는지의 가능성을 타진해 보고자 8개의 동위효소에 대한 분석을 실시하였다.

전자의 경우 몇 가지 특정 isozyme pattern은 종 특이적 pattern을 나타내었는데, 특히 LDH, MDH 및 IDH 등은 골격근 조직의 형태에서 이들 어종간의 유전적 marker로써 유용한 것으로 사료되며, 후자의 경우 PGI를 제외한 isozyme에서는 별다른 차이점을 발견하지 못하였으나 향후 계획적인 육종 사업을 실시할 경우 PGI는 marker로써 어느 정도 활용 가능성이 있을 것으로 나타났다.

연어류의 isozyme에 관한 연구는 외국에서는 May et al.(1979), Allendorf(1975), Utter et al.(1972), Okazaki(1982) 등 수많은 연구가 이루어져 있으나 우리나라의 경우는 명(1992)의 우리나라의 동해안으로 소상하는 연어(*Oncorhynchus keta*)의 개체군 식별 대한 연구를 제외하고는 전무한 실정이다. 최근에 와서는 mitochondrial DNA를 genetic marker로 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있는데,

앞으로 이들 방법을 상호 보완하여 활용한다면 한층 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

이 밖에도 무지개송어의 산란시기와 IDH-2 loci가 상관을 가진다는 보고도 있어(Leary *et al.*, 1989) 동위효소 loci의 질적(qualitative) 및 양적형질(quantitative trait)과의 상관관계를 분석해 보면 어류의 경제적 형질에 관여하는 유용유전자의 검색에 크게 기여할 것으로 예상된다.

또한 이들 genetic marker를 어류의 육종에 이용한다면 많은 잇점을 살릴 수가 있는데(Moav *et al.*, 1976), 종의 식별은 물론 유전적 검증에 필요한 노력을 절감하여 능률적인 실험 계획을 수립할 수 있고 가계선발에 기초자료로 이용할 수 있어 어류육종의 효율을 제고하는데 크게 기여할 것으로 사료된다.

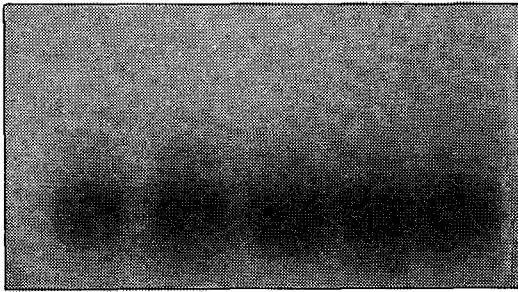


Fig. 6. PGM patterns of skeletal muscle extract in masu salmon.

## 요 약

연어, 산천어, 무지개송어 등 우리나라의 연어과 어류에 있어서 종의 식별 및 3배체 어류의 판정에 동위효소를 genetic marker로 활용할 수 있는지의 가능성을 타진하고자 LDH, MDH, IDH,  $\alpha$ -GPDH, ME, 6-PGD, PGI 및 PGM 등 8개 동위효소에 대하여 골격근 조직을 중심으로 분석을 실시하였다.

이중 골격근 조직의 MDH-B와 IDH loci에서 종간에 뚜렷한 차이를 나타내었으며 특히 MDH-B loci의 b 유전자의 출현빈도는 연어나 산천어에서는 거의 나타나지 않았으나 무지개송어에서는 매우 높게 나타났다. 또한 IDH도 무지개송어와 산천어간의 genetic marker로 유용할 것으로 보인다.

한편, PGI는 3배체 어류 생산시 친어를 상호 대립유전자(allele)의 동형접합(homozygote)인 개체를 사용할 경우 이의 효율적인 판정을 위한 새로운

marker로 활용할 수 있는 가능성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 다른 loci에서는 별다른 차이를 발견할 수가 없었다.

## 참 고 문 헌

- Allendorf, F.W. 1975. Genetic variability in a species processing extensive gene duplication: genetic interpretation of duplicated loci and examination of genetic variation in populations of rainbow trout. Ph. D. dissertation. Univ. Washington, Seattle, W. A.
- Arai, K. 1984. Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos. Hokkaido Univ. 31:1~94.
- Birt, T.P., I.M. Green and W.S. Davidson. 1986. Analysis of mitochondrial DNA in allotatric anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*. Can. J. Zool. 64:118~120.
- Clayton, J.W. and D.N. Tretiak. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. J. Fish. Res. Bd. Can., 29:1169~1172.
- Crozier, W.W. and I.J.J. Moffett. 1989. Application of electrophoretically detectable genetic marker to ploidy testing in brown trout (*Salmo trutta* L.) triploidised by heat shock. Aquaculture, 80: 231~239.
- Lansman, R.A. Lansman, R.O. Shade, J.F. Shapira, and J.C. Avise. 1981. The Use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. J. Mol. Evol., 17:214~226.
- Leary, R.F., F.W. Allendorf, and K.L. Knudsen. 1989. Genetic differences among rainbow trout spawnes on different days within a single season. The Prog. Fish-cult., 51:10~19.
- May, B., F. M. Utter, and F.W. Allendorf. 1975. Biochemical genetic variation in pink and chum salmon. J. Hered., 66:227~232.
- May, B., J.E. Wright, and Stoneking, 1979. Joint segregation of biochemical genetic loci in salmonidae: results from experiments with *Salvelinus* and review of the literature on other species. J. Fish. Res. Bd. Can., 36:1114~1128.

- May, B., M. Stoneking, and J.E. Wright. 1980. Joint segregation of biochemical loci in salmonidae. II. Linkage associations from a hybridized *Salvelinus* genome(*S. Namaycush* × *S. fontinalis*). *Genetics*, 95:707~726.
- Moav, R., T. Brody, G. Wohlfarth and G. Hulata. 1976. Applications of electrophoretic genetic markers to fish breeding. I. advantages and methods. *Aquaculture*, 9:217~228.
- Okazaki, T. 1982. Genetic study on population structure in chum salmon(*Oncorhynchus keta*). *Bull. Far Seas Fish. Res. Lab.*, No. 19:25~116.
- Palva, T. K., H. Lehtv'slaiho and E. T. Palva. 1989. Identification of anadromous and non-anadromous salmon stocks in Finland by mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, 81:237~244.
- Shaw, C.R. and R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes-A Compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4:297~320.
- Utter, F.M. and H. O. Hodgins. 1972. Biochemical genetic variation at six loci in four stocks of rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 101(3): 494~502.
- Wilson, G.M., W.K. Thomas, and A.T. Bekenbach. 1985. Intra- and inter-specific mitochondrial DNA sequence divergence in *Salmo*:rainbow, steelhead, and cutthroat trouts. *Can. J. Zool.* 63:2088~2094.
- Wright, J.E.Jr. and L.M. Atherton. 1970. Polymorphisms for LDH and transferrin loci in brook trout populations. *Trans. Am. Fish. Soc.* 99(1): 179~192.
- 명정구, 1992. 한국산 연어속(*Oncorhynchus* spp.) 어류의 형태학적 연구. 국립부산수산대학교 박사학위논문, 부산.
- 
- 1993년 11월 20일 접수  
1994년 1월 7일 수리