

잉어 (*Cyprinus carpio*)와 붕어 (*Carassius auratus*) 간 잡종의 세포유전학적 분석

남윤권 · 오승용 · 조재윤 · 김동수

부경대학교 양식학과

Cytogenetic Analysis of Induced Hybrid between Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Crucian Carp (*Carassius auratus*)

Yoon Kwon Nam, Sung-Yong Oh, Jae-Yoon Jo and Dong Soo Kim

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737

Cytogenetic analyses were carried out with induced hybrid between common carp (*Cyprinus carpio*) female and crucian carp (*Carassius auratus*) male. The erythrocytic measurement revealed that cellular and nuclear size of induced hybrids were intermediate between those of parental species. The modal chromosome numbers of common carp, crucian carp and its hybrid were same as $2n=100$. The DNA content of induced hybrids determined based on flow cytometry was 3.7pg/cell, which corresponding to intermediate value between the carp (3.6pg/cell) and crucian carp (3.8pg/cell).

Key words : *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, Hybrid, Cytogenetic analysis

서 론

어류 양식에 있어 인위적인 잡종 유도는 양친으로 사용되는 두 종간의 유용 형질들을 교배를 통해, 단기간내 산업성 있는 형질을 획득케 하는 잡종강세(heterosis, hybrid vigour)의 잇점을 얻기 위하여 시도된다(Chevassus, 1983 : Kim et al., 1995). 잉어(*Cyprinus carpio*)와 붕어(*Carassius auratus*)는 전세계에서 널리 양식되고 있는 어종들로서 이들 종간 잡종은 Kafuku and Matsushima (1968)에 의해 생존 가능한 잡종이 유도된 아래, 그 잡종 개체들이 생식 능력이 있음이 밝혀진 바있어 그간 교배를 통한 선발

육종을 중심으로 많은 연구들이 이루어지고 있다(Hulata, 1995). 양식 대상 종으로서 잉어와 붕어간 잡종은 성장률이 양친에 비해 향상되는 등 몇몇 연구 결과에서 그 잠재력을 인정받은바 있으나(Liu and Zhou, 1986) 이들 두 종간 생산된 잡종은 양친의 계통간 또는 사용한 친어에 따라 그 잡종강세의 정도 및 요구되는 형질의 획득 정도가 매우 다양하게 나타남이 보고된 바있다(Hulata, 1995).

이에 본 연구는 우리 나라 계통의 잉어와 붕어의 우량 품종을 개발하기 위한 유전 육종학적 연구의 일환으로 이들 두 종간 유도된 잡종을 대상으로 세포유전학적 특성을 규명하고자 하였다.

본 연구는 교육부 수산해양연구비 지원에 의해 수행되었음.

재료 및 방법

1. 실험어

본 실험은 부경대학교 양식학과 양어장에서 사육 중인 잉어(*Cyprinus carpio*)와 봉어(*Carassius auratus*), 그리고 이들로부터 인공 수정시켜 얻은 잡종 개체들을 대상 (Fig. 1)으로 세포유전학 분석을 실시하였다.

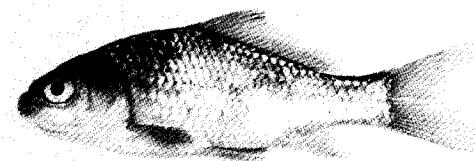


Fig. 1. External morphology of induced hybrid between *Cyprinus carpio* female and *Carassius auratus* male.

2. 적혈구 계측

잉어, 봉어 및 잉어와 봉어의 잡종의 적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하기 위하여 각 실험군에서 각각 무작위로 11마리씩을 선발, 각 개체의 미병 부위 미부정맥으로부터 혈액을 채취한 후 슬라이드에 도말하여 95% ethanol로 고정한 다음 Giemsa용액으로 염색하였다. 각 개체당 적혈구 세포 및 핵의 장, 단경을 현미경(×1,000) 하에서 micrometer로 측정하였다. 적혈구 세포 및 핵의 표면적은 장경(a) · 단경(b) · $\pi/4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978)로, 부피는 $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \pi/3$ (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였으며 실험군간 통계적 유의성 검정은 ANOVA test를 수행하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의적인 차이를 인정하였다.

3. 염색체수 조사

실험군의 염색체수 판별을 위하여 신장직접법 (Kim et al., 1982)을 이용, 각 실험군당 11마리를

대상으로 슬라이드 표본을 제작하여 염색체 중기분열상을 대상으로 계수하였다.

4. Nucleolar organizer region (NOR) 분석

잉어, 봉어 및 잉어와 봉어의 잡종의 NOR을 분석하기 위하여 각 실험군에서 20마리씩 임의 추출 사용하였으며, 각 개체의 미병 부위 미부정맥으로부터 혈액을 채취하여 슬라이드에 도말한 후 95% ethanol로 고정하여 사용하였다. 슬라이드에 gelatin 용액(2% gelatin in 1% formic acid) 200 μ l 와 50% silver nitrate 용액 100 μ l를 떨어뜨린 후 50°C 하에서 5분간 반응시키고 증류수로 3회 세척후 NOR수를 광학현미경(X1,000) 하에서 계수하였다.

5. Flow cytometry

유도된 잡종과 잉어 및 봉어의 DNA 함량을 분석하기 위해 flow cytometry를 수행하였다. 미부정맥으로부터 혈액을 채취후 $1\sim2 \times 10^6$ cells를 계수하여 1ml의 염색액(10mM Tris, 10mM NaCl, 0.1% NP40, 50 μ g/ml Propidium iodide, 100 μ g/ml RNase A)에서 3~5시간 동안 4°C 상태에서 염색하였다. 염색이 완료된 시료는 암실에서 WinBryte flow cytometer (BioRad, USA)를 이용하여 세포당 DNA 함량을 분석하였다. 이때 대조군으로 인간의 백혈구를 사용하여 실험군의 DNA 함량을 비교, 계산하였다.

결 과

1. 적혈구

유도된 잡종의 적혈구 세포에서의 장축 및 단축은 각각 13.47 μ m 및 8.07 μ m로서 양친으로 사용된 잉어(장축 13.11 μ m; 단축 7.63 μ m) 와 봉어(장축 13.86 μ m; 단축 8.19 μ m)의 중간 값을 나타내었고, 표면적과 부피의 경우도 잡종은 각각 85.44 μ m² 및 450.09 μ m³을 나타내어 잉어(표면적 82.41 μ m²; 부피 438.61 μ m³)와 봉어(표면적 86.11 μ m²; 부피 468.78 μ m³)의 중간값을 나타내었다.

적혈구 핵의 크기에 있어서도 역시 봉어, 잡종, 잉어의 순으로 나타났다. 잡종의 적혈구 핵의 장·단축은 각각 $5.52\mu\text{m}$ 및 $3.10\mu\text{m}$, 표면적과 부피는 각각 $13.47\mu\text{m}^2$ 및 $27.18\mu\text{m}^3$ 이었으며 이는 잉어(표면적 $13.42\mu\text{m}^2$; 부피 $26.38\mu\text{m}^3$)와 봉어(표면적 $13.51\mu\text{m}^2$; 부피 $27.35\mu\text{m}^3$)의 중간값에 속하였다(Table 1).

2. 염색체수 조사

각 실험군의 modal 염색체수를 분석한 결과, 잉어와 봉어 모두 $2n=100$ 으로 나타났으며 이들 두종간의 유도된 잡종의 경우 역시 $2n=100$ 이었다 (Fig. 2). 잉어, 봉어 및 잡종군 모두에서 암수간 heteromorphic한 성염색체는 관찰되지 않았고 또한 유의적인 염색체 다형현상 역시 관찰되지 않았다.

3. Nucleolar organizer region (NOR) 분석

Silver staining법을 통한 세포당 NOR 수를 분석한 결과 잉어는 세포당 1개가 19.8%, 2개가 80.3%로 나타났으며, 봉어 NOR의 수는 1개가 46.3%, 2개가 50.6%, 3개가 3.2%로 나타났다.

잉어와 봉어의 잡종 NOR의 수는 1개가 62.8%, 2개가 26.2%, 3개가 9.8%, 4개가 1.1%로 나타났다(Table 2).

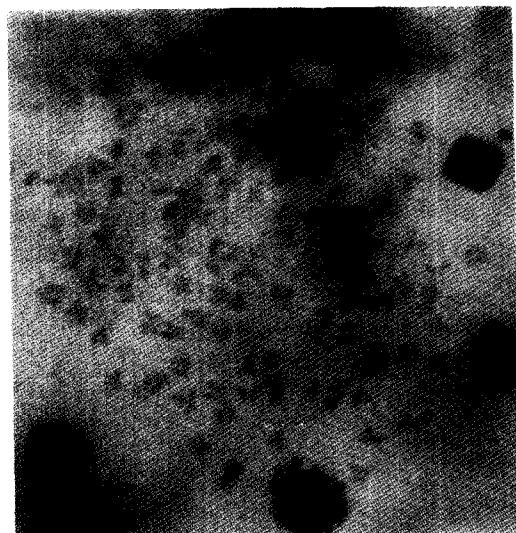


Fig. 2. Metaphase spread ($2n=100$) of induced hybrid between *Cyprinus carpio* female and *Carassius auratus* male.

Table 1. Comparison of erythrocytic size of *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, and its hybrid

Item	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Carassius auratus</i>	Hybrid
Cell			
Major axis (μm)	$13.11 \pm 0.20^{\text{a}}$	$13.86 \pm 0.09^{\text{b}}$	$13.47 \pm 0.14^{\text{ab}}$
Minor axis (μm)	$7.63 \pm 0.10^{\text{a}}$	$8.19 \pm 0.19^{\text{b}}$	$8.07 \pm 0.11^{\text{ab}}$
Surface area (μm^2)	$82.41 \pm 1.74^{\text{a}}$	$86.11 \pm 2.54^{\text{a}}$	$85.44 \pm 1.04^{\text{a}}$
Volume (μm^3)	$438.61 \pm 8.79^{\text{a}}$	$468.78 \pm 21.94^{\text{a}}$	$450.09 \pm 10.80^{\text{a}}$
Mucleus			
Major axis (μm)	$5.50 \pm 0.07^{\text{a}}$	$5.67 \pm 0.08^{\text{a}}$	$5.52 \pm 0.03^{\text{a}}$
Minor axis (μm)	$3.11 \pm 0.08^{\text{a}}$	$3.12 \pm 0.03^{\text{a}}$	$3.10 \pm 0.08^{\text{a}}$
Surface area (μm^2)	$13.42 \pm 0.38^{\text{a}}$	$13.51 \pm 0.30^{\text{a}}$	$13.47 \pm 0.43^{\text{a}}$
Volume (μm^3)	$26.38 \pm 1.09^{\text{a}}$	$27.35 \pm 0.85^{\text{a}}$	$27.18 \pm 1.19^{\text{a}}$

Means within a row superscribed with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 2. Frequency distributions of NOR from *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, and its hybrid

Species	No. of nucleoli/cell (%)			
	1	2	3	4
<i>Cyprinus carpio</i>	19.8 ± 3.1	80.3 ± 3.3	—	—
<i>Carassius auratus</i>	46.3 ± 14.1	50.6 ± 14.1	3.2 ± 0.9	—
Hybrid	62.8 ± 17.5	26.2 ± 14.7	9.8 ± 7.4	1.1 ± 1.3

Table 3. Genome size measurement of *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, and its hybrid

Species	Genome size (pg/cell)	Relative value to human (%)
<i>Cyprinus carpio</i>	3.6±0.12	52.0
<i>Carassius auratus</i>	3.8±0.12	53.9
Hybrid	3.7±0.13	52.7
Human	7.0	100.0

4. DNA 함량 분석

Flow cytometry를 이용, 각 실험군의 DNA 함량을 분석한 결과, 잉어의 DNA 함량은 3.6pg/cell, 봉어의 DNA 함량은 3.8pg/cell, 잉어와 봉어 잡종의 DNA 함량은 3.7pg/cell로 나타나 유도된 잡종은 genome size에 있어서 중간치를 나타내었다 (Table 3).

고 찰

잡종화 기법은 서로 다른 두 종간의 교접에 의해 두 종의 우수 형질들을 한개체에서 생산함으로써 단시간에 우량 형질을 확보하는 방법으로 유전육종학적 기법중 가장 전통적인 방법중 하나이다. 이러한 잡종개체 유도시 정확한 잡종 유도 여부 확인 및 유도된 잡종의 유전적 구성의 분석은 양친으로부터 genetic introgression의 양상을 규명하거나 유전적으로 우량한 잡종을 선발하는데 매우 중요시된다 (Chevassus, 1983).

유도된 잡종을 분석하기 위해서 세포유전학적 분석법이 가장 널리 사용되고 있으며 이중 적혈구 세포 및 핵 크기 측정, 염색체수 및 핵형 분석 그리고 DNA 함량 측정등의 방법이 주로 이용되고 있다. 적혈구의 세포 및 핵 크기 측정은 잡종의 분석법 중 가장 손쉬운 방법이나 유사한 크기의 적혈구에서 명확한 판별이 불가능하여 그 정확성에 한계가 있다 (Thorgaard, 1983). 본 연구에서 유도된 잉어와 봉어간 잡종은 적혈구 세포 및 핵의 크기에서 양친으로 사용된 잉어와 봉어의 중간값을 나타냄으로서 잡종의 특성을 잘 보여 주고 있으며 이는 이전의 다른 어종들간에서 유도된 잡종의 결과와 유사하였다 (Chevassus, 1983).

염색체수 조사 및 핵형 분석에 의한 잡종의 분석은 그 정확도가 높아 잡종의 유전적 구성을 밝히는데 가장 확실한 방법으로 여겨진다 (Kim et al., 1995). 본 연구에서 유도된 잡종은 $2n=100$ 의 염색체 수를 나타냄으로서 잉어 ($2n=100$)와 봉어 ($2n=100$)의 각각 반수체 합으로 잡종이 유도된 것으로 여겨진다. 차후 염색체 banding 및 fluorescence in situ hybridization (FISH)을 통해 보다 자세한 잡종의 유전 정보를 얻을 수 있으리라 판단된다.

Nucleolar organizer region (NOR) 분석은 Phillips et al. (1986)이 연어과 어류를 대상으로 배수체 판별을 위하여 silver staining을 이용하여 개발한 방법으로서 대부분 어류 세포의 경우 반수체당 1개의 NOR을 갖음을 바탕으로 하고 있다. 본 연구에서 NOR 분석 결과, 개체간 차이는 있으나 잉어의 경우 관찰한 적혈구 세포중 19.8% 가 1개, 80.3% 가 2개의 NOR을 갖고 있었으며, 봉어는 1개(46.3%), 2개(50.6%), 3개(3.2%)로 나타났고, 그리고 잡종은 1개 (62.8%), 2개(26.2%), 3개(9.8%), 4개(1.1%)로 나타났다. 봉어에서 3개, 잡종에서 3개와 4개가 낮은 비율로 관찰된 것은 매우 흥미로운 결과로서 이들 어종이 4배체 기원 어류인 때문으로 사료되나, 앞으로 보다 자세한 원인 규명에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

최근 어류 육종학 분야에서 많이 이용되고 있는 flow cytometry는 세포당 DNA 함량을 직접 분석하는 방법으로서 그 분석방법이 간편하며 정확도가 매우 높다는 장점을 갖고 있다 (Barlogie et al., 1980; Lovett et al., 1980; Murphy et al., 1986). 이에 유도된 배수체, 이수체 및 잡종의 분석에 사용된 바있고 어종간 진화 및 유연관계를 분석하는데도 용이하게 사용될 수 있음이 알려져 있다 (Allen and Stanley, 1983; Thorgaard et al., 1982). 본 연구에서 유도된 잉어와 봉어간 잡종은 잉어와 봉어의 DNA 함량의 중간값을 나타내므로 역시 정확한 잡종화가 이루어졌음을 알수 있었다.

요 약

잉어(*Cyprinus carpio*) 암컷과 봉어(*Carassius auratus*) 수컷간 유도된 잡종에 대한 세포유전학적 연구를 수행하였다. 유도된 잡종의 세포 및 핵의 크기는 양친의 중간값을 나타내었고, 염색체의 경우 잉어, 봉어 및 유도된 잡종 모두 $2n=100$ 으로 나타났다. Flow cytometry를 이용, 잡종의 genome size를 분석한 결과, 유도된 잡종은 3.7pg/cell를 갖음으로서 잉어(3.6pg/cell)와 봉어(3.8pg/cell)의 중간치를 나타내었다.

참 고 문 헌

- Allen, S. K., Jr. and J. G. Stanley, 1983. Ploidy of hybrid grass carp \times bighead carp determined by flow cytometry. Trans. Am. Fish. Soc., 112 : 431–435.
- Barlogie, B., B. Drewinko, J. Schumann, W. Gohoe, G. Dosik, J. Latreille, D. A. Johnston and E. J. Freireichi, 1980. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am. J. Med., 69 : 195–302.
- Chevassus, B., 1983. Hybridization in fish. Aquaculture, 33 : 245–262.
- Hulata, G., 1995. A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. Aquaculture, 129 : 143–155.
- Kafuku, T. and M. Matsushima, 1968. Studies on hybrids between carp and "Kawachi" crucian carp. II. Spawning of F1 reciprocal crosses. Bull. Freshw. Fish. Res. Lab., 18 : 21–40.
- 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., 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 (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquaculture, 135 : 257–265.
- Lemoine, H. L., Jr. and L. T. Smith, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans. Am. Fish. Soc., 109 : 626–631.
- Liu, Y. and G. Zhou, 1986. Cytological study on the gonadal development of F₁ hybrid produced by crossing *Carassius auratus* L. with *Cyprinus carpio*. Acta Hydrobiol. Sin., 10 : 101–103 (in Chinese with English summary).
- Lovett III, E. J., B. Schnitzer, D. F. Keren, A. Flint, J. L. Hudson and K. D. McClatchey, 1980. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Lab. Invest., 50 : 115–140.
- Murphy, W. M., R. W. Chandler and R. M. Trafford, 1986. Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histrological grading for the pathological evalution of transitional cell carcinomas. J. Urol., 135 : 694–697.
- Phillip, R. B., K. D. Zajicek, P. E. Ihssen and O. Johnson, 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquaculture, 54 : 313–319.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi, 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis bimaculata*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44 : 851–854.
- Thorgaard, G. H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In : Fish Physiology (eds. Hoar, W.S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M.). Vol. IXB, Academic Press, New York, pp. 405–434.
- 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.