

## 버들치, *Rhynchocypris oxycephalus*와 버들개, *R. steindachneri*의 Flow Cytometry 및 세포유전학적 분석

박인석 · 최 윤 · 김용호 · 남윤권\* · 김동수\*

군산대학교 해양생명과학부  
\*부경대학교 양식학과

### Flow Cytometric and Cytogenetic Studies in *Rhynchocypris oxycephalus* and *R. steindachneri*

In-Seok Park, Youn Choi, Yong Ho Kim, Yoon Kwon Nam\* and Dong Soo Kim\*

Faculty of Marine Life Science, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea  
\*Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Rhynchocypris oxycephalus* and *R. steindachneri* show very similar karyotypes:  $2n=50$  (FN=90), consisting of 12 metacentrics, 28 submetacentrics and 10 acrocentrics with a gradual decrease in chromosome size, but with significant differences in nuclear DNA content of 2.64 and 2.52 pg/nucleus, respectively ( $P<0.05$ ). Although the erythrocyte measurement and parameters of two species were similar, *R. oxycephalus* erythrocyte number was lower than that of *R. steindachneri*. Mode in karyological evolution within the genus *Rhynchocypris* shows an increase of nuclear DNA without apparent changes in karyotype and erythrocyte size.

Key words : Cytogenetic analysis, DNA content, *Rhynchocypris oxycephalus*, *R. steindachneri*

## 서 론

유연관계가 있는 종간에서 염색체 수 및 핵형 그리고 염색체 수 및 핵형과는 독립적으로 특이하게 나타나는 핵 DNA 함량은 종의 기본적 특성을 나타내어, 종의 진화 연구에 중요하다(Hinegardner and Rosen, 1972). 버들치, *Rhynchocypris oxycephalus*와 버들개, *R. steindachneri*는 분류학상 잉어과(Cyprinidae)내 황어아과(Leuciscinae)에 속하는 종들로, 버들치는 우리나라 서·남해안으로 유입되는 하천의 중·상류와 남부 동해안에 있는 하천 및 거제도에 분포하고, 버들개는 우리나라 동해안으로 유입되는 하천 가운데 강릉 남대천과 그 이북에 있는 하천에 분포한다(민과 양, 1986; 김, 1997). 본 연구는 전라북도 완주군 구의면 동적골 골안마을 산간계곡에서 채집된 후 군산대학교 해양생명과학부 수산유전육종학 사육실에서 3대째 사육한 버들치와 강원도 고성군 고성읍 간성의 북천에서

채집된 버들개를 대상으로 각각의 염색체 특성, DNA 함량, 적혈구 세포 및 핵 크기 및 이들의 적혈구 수를 조사하였다. 사용한 버들치 암컷, 수컷의 평균체중( $\pm$ SD)과 평균전장( $\pm$ SD)은 각각  $8.5\pm 1.0g$ ,  $10.2\pm 0.5cm$  및  $6.5\pm 0.9g$ ,  $9.2\pm 0.5cm$  이었으며, 버들개 암컷, 수컷의 평균체중( $\pm$ SD)과 평균전장( $\pm$ SD)은 각각  $16.3\pm 1.7g$ ,  $12.6\pm 1.1cm$  및  $15.4\pm 1.3g$ ,  $12.6\pm 1.4cm$  이었다. 버들치와 버들개의 확인 및 동정은 김(1997)의 기준에 의거하였고, 각각의 암·수 판정은 저배율의 해부현미경(Zeiss, Stemi 2000-C, Germany) 하에서 생식소 압착상의 관찰에 의하였다. 각 실험 결과는 일원 분산분석(one-way ANOVA test)을 실시하여 최소 유의차(LSD: least significant difference) 검정으로 평균간의 유의성( $P<0.05$ )을 검정하였다.

염색체 수 조사 및 핵형 분석을 위하여 Park *et al.* (1999)의 방법에 의거하여 버들치 22마리(암컷 12마리, 수컷 10마리)와 버들개 20마리(암컷 10마리, 수컷 10마리)를

대상으로 신장직접법을 사용하였고 슬라이드 표본 제작은 공기건조법으로 하였다. 각 슬라이드 표본에서 최소 20개 이상의 선명한 중기상을 대상으로 염색체 수 조사 및 핵형 분석을 실시하였으며, 선명한 염색체 중기상을 생물현미경(Zeiss, Axioskop, Germany)으로 사진촬영하였다. 핵형 분석은 Levan *et al.* (1964)의 기준으로 하였으며 염색체의 상대길이(%)와 완비(장완/단완, %)를 측정하였다. 버들치와 버들개의 염색체 중기상과 핵형 분석 결과, 버들치와 버들개 공통적으로 염색체 수는  $2n=50$ 으로서, 12개의 중부염색체, 28개의 차중부염색체 및 10개의 단부염색체로 핵형이 이루어졌으며, fundamental number (FN)는 90 이었다. 개체간 염색체 다형현상은 나타나지 않았으며, 버들치에서 암·수 간 이형의 성염색체는 발견할 수 없었다. 염색체 상대길이는 중부염색체에서 버들치, 버들개가 각각 4.52~3.18% 및 4.80~3.36% 이었고 차중부염색체에서 버들치, 버들개가 각각 5.56~3.25% 및 5.96~3.34% 이었으며 단부 염색체에서 버들치, 버들개가 각각 5.25~3.00%, 5.24~2.68%를 나타내었다. 두 종간 염색체 상대길이는 다소의 차이를 보였으며, 공통적으로 차중부 염색체인 7번, 8번, 9번 그리고 단부염색체 21번은 각각의 여타 동일 염색체군의 염색체들과 비교시 상당히 큰 상대길이를 나타내었다. 완비는 중부염색체에서 버들치, 버들개가 각각 1.18~0.99% 및 1.11~1.06%, 차중부염색체에서 각각 2.00~1.37% 및 2.06~1.57% 이었다. 버들치와 버들개에서의 염색체 수와 핵형은 강과 박(1973)이 보고한 결과와 동일하였으며 이 등(1987)이 보고한 버들치, 버들개에서의 상대길이 조사 결과와 유사한 경향을 보이고 있다. 두 종간에서 보다 면밀한 핵형 차이를 규명하기 위해 다양한 banding 방법의 적용이 필요한 것으로 생각된다.

버들치, 버들개의 적혈구 세포 및 핵의 크기 측정을 위하여 버들치, 버들개 각 10마리를 대상으로 미부정맥으로부터 혈액을 채취 후, 슬라이드에 도말하고 May-Grünbaldt Giemsa 용액으로 염색하였다. 세포 및 핵의 장축, 단축은 배율 1,000배의 생물현미경 하에서 접안 micrometer disc를 통하여 각 개체당 120개 이상의 적혈구를 대상으로 측정하였다. 측정된 세포 및 핵의 장축(a), 단축(b)을 기준으로 장축(a)/단축(b), 표면적(S)= $ab\pi/4$  (Sezaki and Kobayashi, 1978) 및 부피(V)= $4\pi(a/2)(b/2)^2/3$  (Lemoine and Smith, 1980)를 계산하였다. 적혈구 세포 및 핵의 장축은 버들치가 각각 14.47 $\mu\text{m}$ , 6.55 $\mu\text{m}$ , 그리고 버들개가 각각 14.22 $\mu\text{m}$ , 6.00 $\mu\text{m}$ 로 나타났으며 적혈

구 세포 및 핵의 단축은 버들치가 각각 9.17 $\mu\text{m}$ , 4.00 $\mu\text{m}$ , 그리고 버들개가 각각 9.28 $\mu\text{m}$ , 4.08 $\mu\text{m}$ 로 두 종간 서로 유사한 경향을 보였다. 이러한 경향은 적혈구 세포 및 핵의 표면적과 부피에도 반영되어, 적혈구 세포의 표면적과 부피는 버들치가 각각 104.11 $\mu\text{m}^2$  및 637.48 $\mu\text{m}^3$ , 버들개가 각각 103.70 $\mu\text{m}^2$  및 642.32 $\mu\text{m}^3$  이었으며 적혈구 핵의 표면적과 부피는 버들치가 각각 20.55 $\mu\text{m}^2$ , 54.88 $\mu\text{m}^3$ , 버들개가 각각 19.26 $\mu\text{m}^2$ , 52.59 $\mu\text{m}^3$  이었다. 단축에 대비한 장축의 비는, 세포에서는 버들치가 1.58배, 버들개가 1.53배로 서로 유사한 반면 핵에서는 버들치가 1.64배 그리고 버들개가 1.47배로 버들치의 핵이 버들개의 핵에 비해 다소 신장됨이 파악되었다( $P<0.05$ ). 적혈구 수를 Thoma Zeiss's haemocytometer를 사용하여 측정된 결과 적혈구 수는 버들치가  $14.7\times 10^5/\text{ml}$  (13.4~15.7 $\times 10^5/\text{ml}$ ) 이었으며 버들개는  $23.2\times 10^5/\text{ml}$  (21.5~25.1 $\times 10^5/\text{ml}$ ) 이었다. 세포 및 핵의 크기는 DNA 함량과 밀접하게 연관되어 있어 DNA 함량의 증감은 핵 크기 변화와 일치하는 양상을 보인다 (Szarski, 1979). 본 연구 결과 버들치, 버들개에서의 적혈구 세포 및 핵 크기는 다소 이러한 양상을 보였고 크기 증가 효과는 뚜렷하지 않았으나, 적혈구 수에 있어 버들개는 버들치에 비해 1.58배 증가를 보였다.

버들치와 버들개의 genome size를 측정하기 위하여 flowcytometry를 수행하였다. 버들치 암컷 20마리, 수컷 21마리 그리고 버들개 암컷 21마리, 수컷 19마리를 대상으로 적혈구의 세포 및 핵 크기 조사시와 동일한 방법으로 혈액을 채취한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 핵내 DNA 염색을 위해  $1\sim 2\times 10^6$  cell을 취하여 1ml의 PI 염색액(50 $\mu\text{l}/\text{ml}$  propidium iodide; 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$  bovine RNase A; 0.1% NP)와 혼합한 후 암냉 상태에서 60분간 방치하였다. 이때 핵 DNA 함량이 5.6 pg/cell로 판명된 3배체 붕어 *Carassius auratus* (김, 1998)의 혈구세포  $1\times 10^6$  cell을 혼합 염색하여 standard로 사용하였다. 염색이 완료된 시료는 암냉 상태로 유지하면서 WinBryte HS flowcytometer (BioRad, USA)로 각각의 버들치, 버들개의 DNA 함량을 측정하였으며, DNA analysis program을 이용하여 시료당 20,000개의 세포를 분석하여 3배체 붕어에 대한 상대 DNA 함량을 조사하였다. Table 1에 나타난 바와같이 DNA 함량은 동 종내에서 암·수간 서로 유사하였으며, 두 종간에서는 암·수 공히 버들치가 버들개에 비해 유의하게 높았다( $P<0.05$ ). 본 연구 결과를 강과 박(1973)이 microspectrophotometer를 사용하여 금붕어 간

**Table 1. Nuclear DNA content of *Rhynchocypris oxycephalus* and *R. steindachneri***

Species	DNA content (pg/nucleus)*	
	Female	Male
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i>	2.64 ± 0.03 (N=20)	2.63 ± 0.02 (N=21)
<i>R. steindachneri</i>	2.52 ± 0.02 (N=21)	2.51 ± 0.03 (N=19)
Triploid crucian carp (standard)**	5.60 ± 0.02	

\*Values are means ± SD. Values in a column indicate significant differences (P < 0.05).

\*\*Unknown sex.

조직에 기준한 버들치의 상대 DNA 함량 63% 그리고 버들개의 상대 DNA 함량 58%와 비교시, 두 연구간에서 standard로 사용된 붕어와 3배체 붕어와의 DNA 함량 차이 그리고 보고된 각 DNA 함량에서의 상대치와 절대치에서의 차이로 인해 직접 비교는 어렵다. 그러나, 버들개에 대한 버들치의 DNA 함량 증가 측면에서 강과 박(1973)의 결과인 1.08배, 그리고 DNA 함량 측정에서 정확도는 보이는 flowcytometry로 측정시의 본 연구 결과인 1.05배를 서로 비교시 유사성을 보이고 있다. Alfei *et al.* (1996)은 *Salmo fibreni*와 *S. trutta macrostigma*에서 flowcytometry 분석으로 DNA 함량을 조사한 결과, *S. fibreni*인 경우 암컷은 수컷에 비해 1.9%의 DNA 함량 증가를 보인 반면 본 연구의 버들치, 버들개의 DNA 함량에서는 각각의 암·수에서의 차이는 나타나지 않았다. 본 연구의 버들치와 버들개에서의 핵형 분석 결과와 DNA 함량 측정 결과를 고려시, 버들치와 버들개는 진화적으로 서로 DNA 함량의 변화를 동반하면서 세포 및 핵에서의 크기 변화, 염색체상의 변화는 최소화(Ida *et al.*, 1991) 되었을 것이라고 사료된다.

## 요 약

버들치, *Rhynchocypris oxycephalus*와 버들개, *R. steindachneri*에서의 flowcytometry에 의한 핵 DNA 함량 측정과 세포유전학적 분석을 실시하였다. 버들치와 버들개의 핵형은 2n=50 (FN=90)으로 12개의 중부염색체, 28개의 차중부염색체 및 10개의 단부염색체로 구성되어 유사하였으나, 핵 DNA 함량은 각각 2.64 pg/nucleus 및 2.52 pg/nucleus로 나타났다(P < 0.05). 두 종간 적혈구 핵과 세포 크기는 유사한 반면, 버들치의 적혈구 수는 버들개의 적혈구 수보다 적었다. 본 연구 결과는 버들치속, *Rhynchocypris* 어류인 버들치와 버들개간에서의 진화는 두

종간 핵형과 적혈구 크기의 명확한 변화 없이 핵 DNA 함량의 증가만이 이루어진 것을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(해양수산 과학 KIOS-97-F-05)에 의하여 수행된 일부 결과로, 연구비 지원에 감사드립니다. 또한, 본 논문을 세심하게 익명 심사하여 주신 두 분의 심사자들도 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- Alfei, L., D. Cavallo, P. Eleuteri, M. G. Grollino, P. T. Colombari, A. Ferri, A. Onali, and R. De Vita, 1996. Nuclear DNA content in *Salmo fibreni* in Lake Posta Fibreno, Italy. *J. Fish Biol.*, 48: 1051-1058.
- Hinegardner, R. and D. E. Rosen, 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Amer. Zool.*, 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.
- Lemoine, H. L. and L. T. Smith, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 109: 626-631.
- Levan, A., K. Fredga, and A. A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Park, I. -S., C. -H. Kim, and D. S. Kim, 1999. Karyotypes and cellular DNA contents of two species in the genus, *Lateolabrax* from Korea. *Fish. Sci.*, 65: 488-489.
- 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.
- Szarski, H., 1976. Cell size and nuclear DNA content

- in vertebrates. *Inter. Rev. Cyto.*, 44: 93-112.
- 강영선 · 박은호, 1973. 한국산 담수어류(잉어과) 몇종의 핵형과 DNA 상대량에 관한 연구. *한국동물학회지*, 16: 97-108.
- 김응오, 1998. 자연산 3배체 붕어 집단에 대한 유전학적 동정. *부경대학교 산업대학원 석사학위 청구논문*, 39pp.
- 김익수, 1997. *한국동식물도감*. 제 37권 동물편(담수어류), 교육부, 629pp.
- 민미숙 · 양서영, 1986. 한국산 버들치속 어류 2종의 분류 · 분포 및 지리적 변이에 관하여. *한국동물학회지*, 2: 63-78.
- 이금영 · 장선일 · 윤명자 · 노준노 · 전상린 · 강영희 · 板井降彦 · 君塚芳輝, 1987. 한국 및 일본산 버들치속(잉어과) 어류 4종의 핵형분석. *한국육수학회지*, 20: 49-60