

한국산 꺾지과 어류 3종의 세포유전학적 연구

방인철 · 남윤권* · 노충환** · 박준택*** · 한경호***

순천향대학교 생명과학부, *부경대학교 해양산업개발연구소

한국해양연구원, *여수대학교 양식학과

Cytogenetic Analysis of Three Centropomid Species in Korea

In Chul BANG, Yoon Kwon NAM*, Noh Choong HWAN**

Joon-Taek PARK*** and Kyoung-Ho HAN***

Department of Marine biotechnology, Soonchunhyang University, Choongnam 337-745, Korea

*Research Center for Ocean Industrial Development, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan Po-Box 29, Seoul 425-600, Korea

***Department of Aquaculture, Yosu National University, Chonnam 550-749, Korea

Cytogenetic characteristics of three species in Centropomidae (*Coreoperca herzi*, *C. kawamebari* and *Siniperca schezeri*) were evaluated, based on karyological analysis, erythrocytic measurement and genome size estimation using flow cytometry. Modal chromosome number of three species was same as $2n=48$. Karyotypes were $4SM+44A\cdot T$ ($NF=52$) for *Coreoperca herzi*, $6SM+42A\cdot T$ ($NF=52$) for *C. kawamebari* and $4SM+44A\cdot T$ ($NF=52$) for *Siniperca schezeri*. Heteromorphic sex chromosome was not found in both sexes of any species examined. Cellular and nuclear volumes of *Siniperca schezeri* were smaller than those of other two species. Average amounts of cellular DNA contents estimated by flow cytometry were well coincided with erythrocytic sizes. The estimated genome sizes were 1.83, 1.85 and 1.44 pg/cell for *C. herzi*, *C. kawamebari* and *S. schezeri*, respectively.

Key words: Centropomid species, Chromosomes, Genome size, Cell size

서 론

농어목 (Order Perciformes) 꺾지과 (Family Centropomidae)에 속하는 어류는 전세계적으로 22종이며, 우리 나라에는 2속 3종이 분포하고 있고, 이들 2속 중 꺾지속 (Genus *Coreoperca*)에 꺾지 (*Coreoperca herzi*)와 꺾저기 (*C. kawamebari*)가, 쏘가리속 (Genus *Siniperca*)에는 쏘가리 (*Siniperca schezeri*)가 속한다 (Nelson, 1994; Chyung, 1977). 이들 3종은 모두 우리나라 여러 하천 지역에 널리 분포하며, 특히 꺾지는 한국 특산종으로서 낙동강 이서에서 압록강까지 황해로 유입되는 여러 수역에 분포한다. 꺾저기는 쏘가리와 함께 서남해로 흐르는 하천 (특히 진천, 장흥)과 동해 남부에 흐르는 여러 하천에 분포하는 종이며, 우리나라뿐만 아니라 일본의 동경, 후지산 및 산양의 유라강, 큐슈의 지쿠센 상류 료오토 등지의 여러 하천에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Chyung, 1977).

꺾지과에 대한 세포유전학적 연구는 Park and Kang (1981)이 쏘가리 및 황쏘가리의 염색체와 DNA 함량을 비교한 바 있으며, 일본에 분포하는 꺾저기 집단에 대한 염색체 핵형이 Nogusa (1960)에 의해 이루어진 바 있다. 그러나 아직까지 국내에 서식하는 꺾저기 집단에 대한 세포유전학적 연구는 전혀 보고된 바 없음을 물론 우리나라 특산종인 꺾지에 대한 세포유전학적 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 우리나라에 서식하는 꺾지과 3종에 대한 염색체의 핵형, 적혈구 세포크기 및 genome size 조사를 통해, 차후 이들 종간의 인위적 잡종 유도시 또는 염색체 조작을 통한 배수체 유도시 이들의 분석에 활용될 수 있는 기초 세포유전학적 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

꺾지 (*C. herzi*)는 1994년 경남 산청군의 경호강 중류에서 채집한 개체들과 이들로부터 인공 종묘생산된 F₁들을 이용하였고, 꺾저기 (*C. kawamebari*)는 전남 장흥군의 탐진강 중류에서 어획된 표본을, 그리고 쏘가리 (*S. schezeri*)는 경남 산청군의 경호강 중류에서 채집된 표본을 실험실로 수송하여 세포유전학적 분석에 이용하였다.

2. 염색체 분석

염색체는 Kim et al. (1982)의 방법에 따라 신장 조직을 이용한 direct method로 표본을 작성하였다. 어류 1마리당 colchicine을 1~10 $\mu\text{g/g}$ 체중의 농도로 복강 주사하였으며, 4시간 경과 후에 신장을 적출하였다. 신장 조직은 가위로 잘라 0.075 M KCl에 15분간 처리한 후 2,000 rpm, 10분간 원심분리하였으며, methanol-glacial acetic acid (3 : 1)에 고정하여 냉장고에 보관한 다음 슬라이드 표본을 작성하여 5% Giemsa 용액에 염색하였다. 각 종당 생식소 조사에 의한 암·수 각 4마리씩 사용되었으며, 어류 1마리당 20개의 countable metaphase를 관찰하여 염색체 수를 조사하였으며, 핵형은 Levan et al. (1964)의 방법에 따라 분석하였다.

3. 적혈구 계측

꺾지, 꺾저기 및 쏘가리 10마리를 임의 추출하여 각 개체의 미병부 정맥으로부터 혈액을 채취한 다음, 슬라이드에 도말하여 100% ethanol로 고정한 후 May-Grunbaladt Giemsa 용액으로 염색하

였다. 각 개체당 120 ± 10 개의 적혈구를 측정하였으며, 적혈구 세포 및 핵의 장경 (a)과 단경 (b)을 광학 현미경 ($\times 1,000$)하에서 micrometer로 측정하였다. 표면적과 부피는 아래의 식으로 계산하였다.

표면적: $ab\pi/4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978)

부피: $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \cdot \pi/3$ (Lemoine and Smith, 1980)

4. Flow cytometry

적지, 적저기 및 쏘가리의 DNA 함량 측정을 위하여 각 종의 10마리로부터 미부정맥에서 $5 \mu\text{L}$ 의 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 70% 냉각 에탄올 1mL에 고정된 다음 DNA 함량을 측정할 때까지 냉장 보관하였다. 각 혈액 sample (1×10^6 cells)을 propidium iodide (PI) 용액 ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$ PI, 0.1% NP-40, 1 mg/mL RNase A in $1 \times \text{PBS}$)을 사용하여 실온에서 30분간 염색하였다. 염색이 완료된 후 WinBryte HS flowcytomer (Bio Rad Co., USA)를 이용하여 각 종간 비교하였다. 대조군들로서 이미 보고된 잉어 (*Cyprinus carpio*, 3.6 pg/cell), 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*, 2.8 pg/cell) 및 인간 백혈구 (WBC 7.0 pg/cell)를 사용하였으며 (Blackledge, 1977), 약 100,000개의 세포 내 정보를 수집하여 DNA Modfit Program (BioRad, USA)에 의해 DNA 함량을 측정하였다.

5. 통계 분석

적혈구 세포 및 핵의 표면적과 이들의 부피, 그리고 DNA 함량에서 각 종간 평균 차이의 통계적 유의성을 확인하기 위하여 일원 배치 분산분석 (one-way ANOVA)를 수행후 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 가설 검정을 위한 유의 수준은 $P=0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 염색체

적지과 어류 3종의 염색체 수는 Table 1에 나타난 바와 같이 modal number가 모두 $2n=48$ 로 동일하였다. 그러나 Fig. 1에서와 같이 핵형에 있어 적지 (*C. herzi*)는 4개의 submetacentrics (SM)와 44개의 acrocentrics (A) 또는 telocentrics (T)로 구성되어 있어 arm number (NF)가 52로 나타났다. 한편 적저기 (*C. kawamebari*)는 6개의 submetacentrics와 42개의 acrocentrics로 구성되어 있어 arm number가 54였다. 쏘가리속의 쏘가리 (*S. scherzeri*)는 4개의 submetacentrics와 44개의 acrocentrics로 구성되어 arm number가 52로 나타나 종간 핵형의 변이가 뚜렷하였다 (Fig. 1). 각 종들의 암·수간 heteromorphic한 성염색체는 발견할 수 없었다.

본 연구 결과 적지인 경우 2쌍의 submetacentric chromosome 중 1쌍의 염색체 크기가 다른 쌍의 염색체 크기의 2배에 달하여 (Fig. 1), 차후 배수체 또는 잡종 유도시 유도된 개체의 분석에 유용한 marker chromosome으로 활용될 수 있으리라 판단된다. 적저기는 submetacentric chromosome이 3쌍으로 나타나 다른 두 종보다 1쌍이 많아 흥미로운 결과를 보였으며, 일본산 적저기 핵형 48 acrocentric chromosome (Nogusa, 1960)과는 다른 6 submetacentric+42 acrocentric or telocentric chromosome을 나타내었다. 차후 지역적 격리에 기인된 이러한 일본산 적저기와 국내산 적저기를 대상으로 보다 자세한 핵형 분석이 요구되었다. 한편 본 연구결과에서 얻어진 경호강산 쏘가리 역시 한강에서 채집된 쏘가리의 염색체 결과 (Park and Kang, 1981) $2n=48$ (4SM+44A)와 동일하게 나타남으로써 염색체 수준의 집단간 또는 계통간 변이가 검색되지는 않았다.

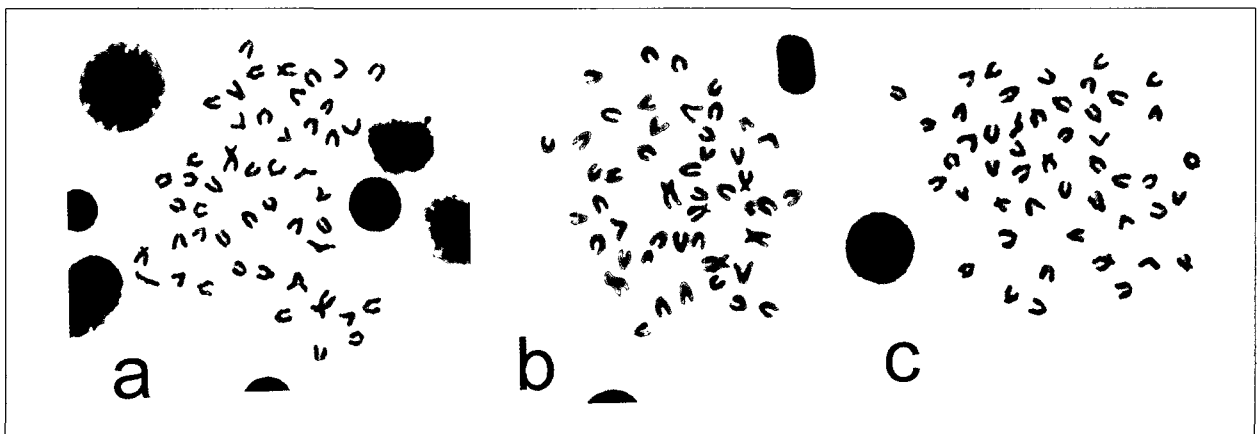


Fig. 1. Metaphase spreads of *Coreoperca herzi* (a), *C. kawamebari* (b) and *Siniperca scherzeri* (c).

Table 1. Distribution of diploid chromosome number of Centropomid fishes

Species	No. of fish	Distribution of diploid chromosome number										No. of the observed metaphase
		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
<i>Coreoperca herzi</i>	8	2	3	2	3	4	10	14	102	8	3	160
<i>C. kawamebari</i>	8	0	0	0	1	3	5	12	133	4	2	160
<i>Siniperca scherzeri</i>	8	0	1	0	3	4	13	11	124	3	1	160

Ohno (1974)는 어류 조상의 염색체 수는 $2n=48$ 이고 모두 acrocentric chromosome으로 구성되었을 것으로 가정한 바 있다. 본 연구 결과 3종 모두 $2n=48$ 이지만 핵형에 있어서는 모두 달라 차 후 이들 종간의 진화 과정을 추론하기 위하여 여러 banding법에 의한 보다 자세한 핵형 분석이 이루어져야 할 것이며, 아울러 보다 직접적인 증거를 추적하기 위해 mtDNA 및 DNA fingerprinting 기법 등의 중복 사용이 요구된다.

2. 적혈구 세포크기 및 DNA 함량

Fig. 2는 본 연구에 사용된 각 어종의 적혈구 형태를 나타내고 있으며, 이들의 적혈구 크기 측정 결과는 Table 2와 같다. 꺾지, 꺾저기 및 쏘가리의 적혈구 세포 장축은 각각 10.10, 10.36, 9.51 μm 로 나타나 쏘가리가 가장 작게 나타났다. 세포 단면에 있어서는 같은 경향이었으며 세포 및 핵의 표면적과 체적에 있어서는 꺾저기, 꺾지 및 쏘가리 순으로 크게 나타났다 ($P<0.05$).

꺾지과 어류 3종의 DNA 함량을 대조군과 비교한 결과는 Table 3 및 Fig. 3에 나타내었다. Table 3에서 보듯이 genome size (average cellular DNA content)는 꺾지가 1.826 ± 0.093 pg, 꺾저기가 1.849 ± 0.064 pg, 그리고 쏘가리가 1.439 ± 0.053 pg으로 나타나 꺾지와 꺾저기 간에는 큰 차이가 없었으나, 쏘가리는 이들에 비해 특히 작게 나타났다 ($P<0.05$). 포유류 (인간 백혈구)의 genome size 7.0 pg/cell과 비교할 경우 꺾지, 꺾저기 및 쏘가리의 genome size는 각각 26.1%, 26.4% 및 20.6%에 해당되었다. 어류에 있어 핵의 크기는 genome size 및 세포의 크기와 밀접하게 연관되어 있으며, 세포의 신진대사와도 상관관계가 있어 동물의 진화과정과 밀접한 연관이 있다 (Szarski, 1976; Park and Chung, 1985). 일반적으로

세포 및 핵의 특징적인 크기가 결정되는 기구는 알려져 있지 않으나 DNA 함량의 증감은 세포 및 핵의 크기의 증감과 일치되는 양상을 보인다 (Szarski, 1976; Kim et al., 1989). 본 연구에서도 세포 및 핵의 크기, 특히 핵의 부피에 따라 genome size도 결정되는 경향을 나타내었다. 따라서 이러한 결과로 볼 때 꺾지과 어류 3종간에는 배수화나 gene duplication 등의 기작은 일어나지 않고 진화가 이루어진 것으로 생각된다.

이상의 본 연구를 통해 얻어진 세포유전학적 자료들은 꺾지과 어류의 종간 분석 차원에서 유용할 것이며, 차후 꺾지과 어류의 잡종 유도시 종간 잡종의 genetic constitution (두 종의 반수체간 karyogamy)을 규명하기 위한 세포유전학적 지표를 제공할 수 있을 것이고, 아울러 인공 처녀 생식 및 배수체 조작의 분석을 위한 유용 기초 자료로 활용될 수 있으리라 판단된다.

요 약

한국산 꺾지과 어류 3종에 대한 세포유전학적 기초 자료를 얻기 위하여 염색체 핵형, 적혈구 세포 및 핵의 크기와 DNA 함량을 조사하였다. 꺾지 (*Coreoperca herzi*), 꺾저기 (*C. kawamebari*) 및 쏘가리 (*Siniperca schezeri*)의 핵형은 각각 $2n=48$ (4SM+44A, T), $2n=48$ (6SM+42A, T) $2n=48$ (4SM+44A, T)이었으며, 암·수간 heteromorphic한 성염색체는 발견할 수 없었다. 쏘가리의 적혈구 세포 및 핵의 표면적과 체적은 다른 2종보다 작았다. DNA 함량은 적혈구 세포 크기에서 같은 경향을 보여, 쏘가리가 1.47 pg/cell로 꺾지 (1.83 pg/cell) 및 꺾저기 (1.85 pg/cell)보다 유의하게 작았다.

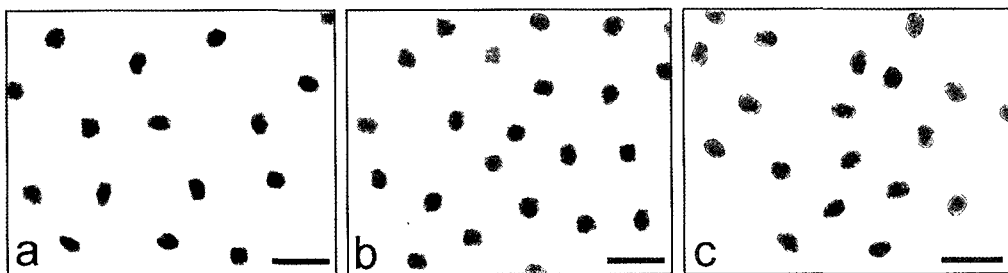


Fig. 2. Microphotograph of erythrocyte from *Coreoperca herzi* (a), *C. kawamebari* (b) and *Siniperca schezeri* (c). Bars indicate 10 μm .

Table 2. Erythrocytic measurements (mean \pm SD) of three Centropomid fishes

Species	Cell				Nucleus			
	Major axis (μm)	Minor axis (μm)	Surface area (μm^2)*	Volume (μm^3)*	Major axis (μm)	Minor axis (μm)	Surface area (μm^2)*	Volume (μm^3)*
<i>Coreoperca herzi</i>	10.15 \pm 0.84	8.61 \pm 0.77	68.71 ^a \pm 9.13	398.12 ^a \pm 82.70	3.96 \pm 0.47	3.22 \pm 0.38	10.04 ^a \pm 1.90	21.91 ^a \pm 6.67
<i>C. kawamebari</i>	10.36 \pm 0.73	8.44 \pm 0.79	68.84 ^a \pm 9.30	391.74 ^a \pm 88.60	4.05 \pm 0.34	3.25 \pm 0.38	10.34 ^a \pm 1.55	22.73 ^a \pm 5.97
<i>Siniperca schezeri</i>	9.51 \pm 0.90	7.86 \pm 0.80	58.68 ^b \pm 8.07	310.76 ^b \pm 70.67	4.15 \pm 0.49	2.84 \pm 0.37	9.27 ^b \pm 1.60	17.87 ^b \pm 4.82

* Means with different superscripts within a column are statistically different based on ANOVA followed Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Table 3. Genome size of three Centropomid fishes

Species	Genome size (pg/cell)*	Relative amount of genome size (%)		
		Mud loach 2.8 pg/cell**	Common carp 3.6 pg/cell**	Human WBC 7.0 pg/cell
<i>Coreoperca herzi</i>	1.826±0.093 ^a	65.4	50.8	26.1
<i>C. kawamebari</i>	1.849±0.064 ^a	66.1	51.4	26.4
<i>Siniperca schezeri</i>	1.439±0.053 ^b	51.4	40.0	20.6

* Means with different superscripts within a column are statistically different based on ANOVA followed Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

** Genome sizes of mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and common carp (*Cyprinus carpio*) can be referred to Blackledge (1997).

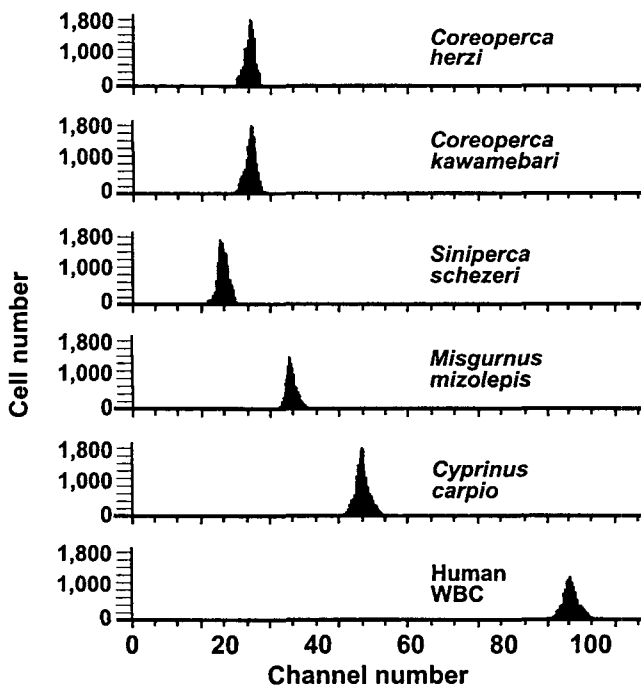


Fig. 3. Representative histograms showing the average DNA contents of three Centropomid species, based on flow cytometry.

감사의 글

이 논문은 1998년 순천향대학교 대학자체 학술연구조성비 및 해양수산부 수산특정연구개발사업비의 지원에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Blackledge, K.H. 1997. Genome quantitation and analysis in fishes. Ph. D. thesis, Purdue University, Indiana. 74 pp.
- Chyung, M.K. 1977. The Fishes of Korea. Ilji-sa, Seoul, 727 pp. (in Korean).
- Kim, D.S., E.-H. Park and J.S. Kim. 1982. Karyotypes of nine species of Korean catfishes. Kor. J. Genet. 4, 57~68.
- Kim, D.S., I.-G. Jeon and J. K. Lee. 1989. Karyotypes, DNA values and nuclear sizes of several scups (Teleostomi: Perciformes). Korean J. Ichthyol. 1, 35~41 (in Korean).
- Lemoine, H.L. Jr. and L.T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans. Am. Fish. Soc. 109, 626~631.
- Levan, A., K. Freda and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52, 201~220.
- Nelson, J.S. 1994. Fishes of the World (3rd Ed). John Willey & Sons, Inc., 600 pp.
- Nogusa, S. 1960. A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution. Memoirs of the Hyogo Univ. of Agriculture. 3, 1 p.
- Ohno, S. 1974. Animal Cytogenetics. Vol. 4, Protochordata, Cyclostomata and Pisces. Gebruder Borntraeger, Berlin. 92 pp.
- Park, E.-H. and C.Y. Chung. 1985. Genome and nuclear sizes of Korean cobitid fishes (Teleostomi: Cypriniformes). Kor. J. Genet. 7, 111~118.
- Park, E.-H. and Y.S. Kang. 1981. Karyotype and genome size of two variants of mandarin fish, *Siniperca schezeri* (Teleostei: Serranidae). Kor. J. Genet. 3, 63~68.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. Bull. Jap. Soc. Fish. Sci. 44, 851~854.
- Szarski, H. 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. Inter. Rev. Cytol. 44, 93~112.

2000년 11월 11일 접수

2001년 1월 8일 수리