



쉬리, *Coreoleuciscus splendidus* (Cyprinidae)의 세포유전학적 연구

김동수*, 송하연, 방인철¹, 남윤권
부경대학교 양식학과/해양수산형질전환생물연구소
¹순천향대학교 해양생명공학과

Cytogenetic Analysis of Korean Shinner, *Coreoleuciscus splendidus* (Cyprinidae)

Dong Soo Kim*, Ha Yeun Song, In-Chul Bang¹ and Yoon Kwon Nam

Department of Aquaculture/Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO), Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

Cytogenetic analyses of an endemic species, *Coreoleuciscus splendidus* (Cyprinidae) was performed including erythrocyte measurement, chromosome count and karyotyping, nucleolar organizing region (NOR) banding and flow cytometric analysis of genome size. *C. splendidus* had the same modal chromosome number of $2n = 48$ between sexes, however, displayed a sex-related dimorphism in their chromosome karyotypes. Males represented a pair of heteromorphic chromosomes which couldn't be seen in any female individuals, indicating that the sex determination mechanism of this species should be a typical XX-XY based male heterogamety (female = $10M+6SM+8A+XX$ vs male = $10M+6SM+8A+XY$). Other cytogenetic features such as Ag-NORs located in a pair of acrocentric chromosomes, estimated nuclear volume ($28 \mu m^3$) and cellular DNA content (2.4 pg/cell) suggest that genetic recombination might be the main driving force responsible for the evolution of this species rather than the polyploidy-based evolutionary process as in many other Cyprinidae species.

Keywords: *Coreoleuciscus splendidus*, Sex chromosome, XX-XY (male heterogamety), Cytogenetics

서 론

어류의 유전학적 성은 많은 어종에서 상염색체 또는 성염색체에 존재하며 여러 유전자의 작동에 의해 결정된다고 보고되어 있다 (Devlin and Nagahama, 2002). 그러나 암수간 실제 크기와 모양이 다른 이형의 성염색체가 존재하는 경우는 매우 드물어 이에 대한 세포유전학적 연구(karyotyping 등)가 이루어져 있는 1,700여종의 어류 중 단지 10% 정도의 어류 종만이 형태학적으로 특징적인 뚜렷한 성염색체를 갖는 것으로 보고되어 있다 (Arkhipchuk, 1995; Devlin and Nagahama, 2002). 이러한 암수간 미분화 이형 성염색체에 관해서는 여러 가지 가설들이 있으며 이중 잉어과 어류들은 유전 좌위(locus)의 점 돌연변이(point mutation) 보다는 배수성을 포함하는 유전자의 복제에 의해 진화했을 가능성이 제시되고 있다 (Ohno, 1974; Devlin and Nagahama, 2002). 염색체의 연구에 있어 banding염색법은 염색체 각각의 미세 분석을 가능하게 하므로 어류 성분화 기작을 연구하거나 어류 배수체 진화과정을 밝힐 수 있어 매우 중요한 세포 유전학적 분석 방법이다. 이중 silver stain banding

법은 다양한 어종에서 계통 분류학적 marker를 얻기 위해 사용되어 왔다(Kim et al., 2004; Lanfredi et al., 2001; Maria et al., 2002; Gold and Amemiya, 1987).

쉬리(*Coreoleuciscus splendidus*)는 잉어과, 모래무지아과에 속하는 한반도 고유종으로서 우리나라 많은 하천의 중 상류에 서식한다 (김, 1997). 본 어종은 그 성체 크기가 작고, 실내사육이 용이하며, 생활사가 비교적 짧고 인공 사료공급 시 성장이 자연환경보다 빠르며 수질에 대한 적응력이 뛰어난 것으로 알려져 있다(미발표 논문). 때문에 본종에 관한 유전적인 특수성과 적절한 계통(breeding line) 확립이 이루어진다면 어류 유전자 기능연구를 위시한 여러 척추동물 유전자(체)연구에 유용한 새로운 실험동물로서 개발 가능성이 매우 높다. 뿐만 아니라, 최근 국민 소득 증대와 여가생활 영위에 대한 사회적 관심이 증가되고 있으며, 본 어종 역시 국내 소비자에게 친숙한 새로운 관상어 품종으로도 그 가능성을 높게 평가 받고 있다.

이에 본 연구는 우리나라 고유어종인 쉬리를 새로운 어류 실험 동물로 개발하기 위한 연구의 일환으로 형태분류학적 특징적인 쉬리 집단을 대상으로 그 세포유전학적 특징을 분석하고자 하였으며, 아울러 본 연구에서 조사된 세포유전학적 자료를 토대로 본 어종의 진화과정에 관한 검토를 수행하고자 하였다.

*Corresponding author: dongskim@pknu.ac.kr

재료 및 방법

본 실험에 사용된 어류는 충청북도 괴산군 불정면 한천수역에서 채집된 개체들로서, 채집 후 부경대 유전육종학 실험실에서 잉어용 인공사료를 공급하며 분석 시까지 사육하였다. 분석에 사용된 어류의 평균 체장은 8.17 ± 0.31 cm, 평균 전 중량은 3.83 ± 0.48 g이었다. 암수의 성 판별은 생식소를 적출한 뒤 압박법으로 슬라이드 시료를 작성한 후 현미경하에서 생식소 조직을 검경 하였다(Fig. 1).

적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하기 위해 암수 각각 5마리를 택해, 각 개체의 미병 부위 미부정맥으로부터 말초혈액을 채취한 후 슬라이드에 도말하여 95% ethanol에서 5분간 고정한 다음 5% Giemsa 염색 용액(Fluka, Switzerland)에서 15분간 염색하였다. 각 개체 당 100개 이상의 적혈구를 측정하였으며, 적혈구 세포와 핵의 장경, 단경을 현미경($\times 1,000$) 하에서 eyepiece micrometer로 측정하였다. 표면적은 장경(a) x 단경(b) x $\pi/4$ (Sezaki and Kobayashi, 1978), 부피는 $4(a/2)(b/2)^2\pi/3$ (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였다. 적혈구 NORs 분석을 위해 암수 각각 5마리를 택해, 상기 방법에 의거 말초혈액을 슬라이드에 도말하여 95% ethanol로 고정한 후 Howell and Black (1979)의 방법에 의거 시료를 작성 하였다.

실험군의 염색체 수 판별 및 핵형 분석을 위해 신장직접법(Kim et al., 2004)을 사용하였다. 공기 건조법으로 슬라이드 표본을 작성하여 5% Giemsa 염색 용액(Fluka, Switzerland)에 15-30분간 염색하였고 광학 현미경($\times 1,000$) 하에서 중기 염색체 상을 관찰하였다.

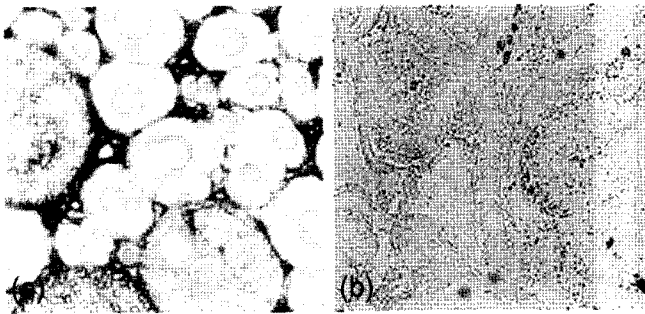


Fig. 1. Photomicrograph of ovary (a) and testis (b) prepared by squash method.

판독 가능한 염색체를 대상으로 염색체 수를 계수하고 분열상이 뚜렷한 시료를 대상으로 사진 촬영하여 핵형도를 작성하였다. 핵형분석은 Levan et al. (1964)의 방법에 의거하여 수행하였다.

염색체 nuclear organizer regions (NORs)를 분석하기 위해 상기에 설명한 중기염색체 분석 방법을 이용하여 슬라이드 표본을 작성한 후 50% AgNO₃와 gelatin solution (2% gelatin in 1% formic acid)을 2:1로 섞은 후 슬라이드 위에 염색액을 떨어뜨리고 커버글라스를 덮은 후 54°C의 slide warmer에서 90초 동안 말색 반응시킨 뒤 증류수로 세척한 후, 광학현미경($\times 1,000$) 하에서 염색체상의 NORs를 관찰하였다.

세포 당 DNA 함량을 분석하기 위해 적혈구 세포를 대상으로 flow cytometry를 수행하였다. 어체의 미부정맥으로부터 0.1~0.2 mL의 혈액을 채취하여 hemocytometer를 이용, $1\sim 2 \times 10^6$ cells/mL로 혈구 세포를 계수하여 75% ethanol에 고정하였다. DNA 염색을 위해 Cystain DNA 2 steps kit (Partec GmbH Münster, Germany) 2 mL에 준비된 표본 100 μ L를 첨가하여 혼합 후 15~30분간 암냉 조건에서 염색하였다. 염색이 완료되면 Partec PA-flowcytometer (Partec GmbH Münster, Germany)를 이용하여 DNA 함량을 측정하였다.

결과

적혈구 세포 및 핵의 크기 및 NORs 분석

쉬리 암컷 적혈구 세포의 표면적은 $54.05 \pm 1.26 \mu\text{m}^2$, 부피는 $238.66 \pm 13.34 \mu\text{m}^3$, 그리고 수컷 적혈구 세포의 표면적과 부피는 각각 $54.90 \pm 0.18 \mu\text{m}^2$ 및 $235.98 \pm 11.48 \mu\text{m}^3$ 로 나타나 암수간 차이는 관찰되지 않았다. 핵의 표면적과 부피 역시 암수간의 차이 없이 유사하게 나타났다(Table 1). 적혈구 NORs 분석 결과 암수 모두 세포 당 1~2개의 NOR이 나타났으며 빈도는 세포 당 1개가 21%, 2개가 71%로 1-2개가 92%로 대부분을 차지하였고 수컷은 각각 26 및 64%로 나타나 1~2개가 90%를 차지하여 전형적인 NOR signal 양상을 나타내었다(Table 2).

염색체 수, 핵형 및 염색체의 NOR 분석

쉬리 암컷의 modal 염색체 수는 $2n = 48$ 이었으며 핵형은 10쌍의 중부 염색체, 6쌍의 차중부 염색체 및 8쌍의 차단부 염색체 및 1쌍의 XX 성염색체로 구성되어 있었다. 수컷의 modal 염색체 수 역

Table 1. Comparison of cell and nuclear sizes of female and male *Coreoleuciscus splendidus*

Item	Cell		Nucleus	
	Female	Male	Female	Male
Major axis (μm)	10.43 ± 0.12	10.34 ± 0.11	5.42 ± 0.15	5.44 ± 0.18
Minor axis (μm)	6.62 ± 0.27	6.53 ± 0.16	3.15 ± 0.05	3.20 ± 0.09
Surface area (μm^2)	54.05 ± 1.26	54.90 ± 0.18	13.41 ± 0.24	13.12 ± 0.26
Volume (μm^3)	238.66 ± 13.34	235.98 ± 11.48	28.18 ± 0.64	28.13 ± 0.68

Table 2. Frequency distribution of erythrocyte nucleolar organizer regions of female and male *Coreoleuciscus splendidus*

Sex	No. of fish examined	No. of Ag-stained erythrocytes	No. of NORs / cell				
			0	1	2	3	4
Female	10	100	4	21	71	1	0
Male	10	100	5	26	64	2	1

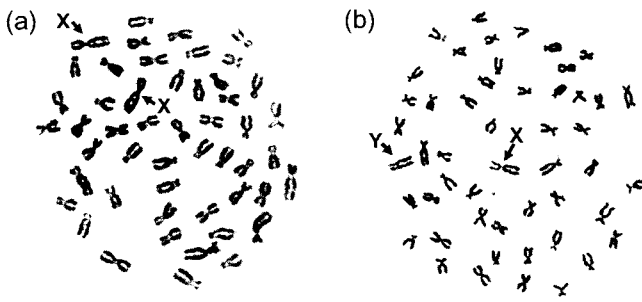


Fig. 2. Representative metaphase spreads of female (a) and male (b) *Coreoleuciscus splendidus*. Arrows indicate heteromorphic sex chromosomes.

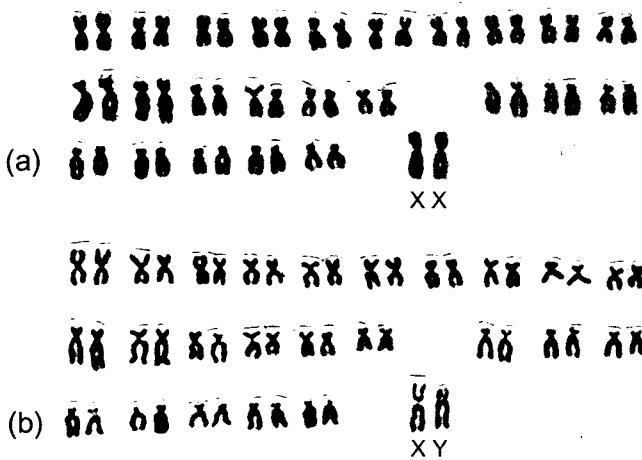


Fig. 3. Idiograms of female (a) and male (b) *Coreoleuciscus splendidus*.

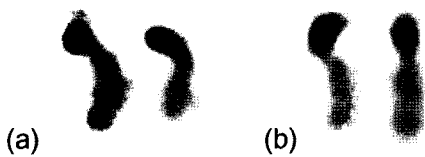


Fig. 4. Partial karyotypes of female (a) and male (b) *Coreoleuciscus splendidus* to show a pair of chromosomes displaying active Ag-NORs.

시 $2n=48$ 이었으며 핵형은 10쌍의 중부 염색체, 6쌍의 차중부 염색체 및 8쌍의 차단부 염색체와 1쌍의 XY성염색체로 구성되어 있었다 (Figs. 2, 3 and Table 3). 그러나 개체 간, 세포 간 염색체 다형 현상은 관찰되지 않았다. 쉬리의 암수 염색체 NORs 분석 결과 NORs의 위치는 1번 차중부 염색체 경상부에서 1쌍이 매우 진하게 염색되어 암수간 차이는 발견되지 않았다(Fig. 4).

Table 4. Cellular average DNA contents of female and male *Coreoleuciscus splendidus* as determined by flow cytometry

Specimen	Genome size (pg/cell)	Related value to mud loach sperm DNA (%)
Female	2.42 ± 0.07	172.86
Male	2.39 ± 0.05	170.71
Sperm	1.20 ± 0.03	85.71
Mud loach sperm*	1.40	100

*From Hardie and Hebert (2004)

DNA 함량 분석

Flow cytometry 분석으로 쉬리의 DNA 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 미꾸라지 정자(1.40 pg/cell)를 대조군으로 하여 측정된 결과 암컷은 2.42 ± 0.07 pg/cell, 수컷은 2.39 ± 0.05 pg/cell 그리고 정자의 DNA 함량은 1.20 ± 0.03 pg/cell로 나타나 암수간 통계적인 유의 차이는 나타나지 않았다.

고 찰

본 연구의 염색체 핵형 분석을 통해 쉬리는 뚜렷한 XX-XY형의 이형(heteromorphic) 성 염색체를 갖는 것으로 나타났다. 아직까지 국내에 보고된 국내 고유어종의 경우 이형의 성 염색체가 보고된 바 없고 특히 전세계적으로 현재까지 염색체수와 핵형이 분석된 잉어과 어류에서도 성염색체가 동정된 예는 극히 한정된 어종의 수에만 국한되어 있다(Arkhipchuk, 1995; Devlin and Nagahama, 2002). 잉어과 어류는 일반적으로 배수성의 기작에 의해 진화한 것으로 보고되어 있으며(Ohno, 1974), 이러한 일반적 사실과 다른 본 연구결과는 매우 흥미로운 정보로서 앞으로 잉어과 어류의 성 결정 기작 및 진화 연구에 새로운 정보를 제공할 수 있다고 판단된다. 더욱이 본 연구에서 사용한 실험 어종인 쉬리의 경우 국내 고유종으로써의 가치와 실험동물로서의 여러 장점들을 고려할 때, 잉어과 어류는 물론 척추동물의 최하위 분류군인 어류의 성 결정 기작에 관한 분자생물학적 및 유전생화학적 분석 모델로서도 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵과 세포의 크기는 DNA의 함량과 밀접한 관계가 있으며(Szarski, 1976), 적혈구 세포의 NORs는 일반적으로 2배체 중기상에서 1~2개 나타남이 보고되고 있다(Phillips and Ihssen, 1985; Gold, 1984). 본 연구 결과 쉬리의 세포크기는 기존 보고된 이배체 어류들의 그것(Hinegarder and Rosen, 1972) 과 큰 차이가 없어 본 종은 이배체 기원의 어종으로 생각되며 핵내 NORs의 수도 1~2개가 암수 공히 90% 이상을 차지하는 것도 이러한 가설을 입증 하는 것으로 생각된다.

어류의 DNA함량의 변이는 0.2 pg에서 248 pg의 다양함이 보고

Table 3. Chromosome counts of female and male *Coreoleuciscus splendidus*

No. of fish examined	Sex	No. of metaphase counted	Frequency of chromosome number				
			46	47	48	49	50
14	F	132	1	9	121	1	0
12	M	203	2	12	186	2	1
Total		335	3	21	307	3	1

되어 있으나 대체로 2.4 pg을 가진 종이 많이 발견 되고 있다(Hardie and Hebert, 2004). 그러나 본 종이 분류학적으로 속한 잉어과 어류의 경우 이들 보다 1.5~2배의 DNA 함량을 지닌 어종들이 발견 되고 있다. 그러나 본종의 경우 세포 당 DNA 함량이 2.6 pg으로 나타나 본종은 진화과정 중 배수성에 의한 진화 보다는 유전자 재조합 등 점 돌연변이가 진화의 기본 기작이었을 것으로 판단되며, 특히 세포 및 핵의 크기 그리고 염색체의 NOR 수 역시 이를 뒷받침 하고 있다. 앞으로 다양한 쉬리 집단에 대하여 세포유전학적 및 분자생물학적 분석을 통해 집단간 세포유전학적 변이를 분석함과 아울러 쉬리를 어류의 유전학적 성결정 기작 연구를 위한 계통 개발, genetic sexing marker 발굴 등이 뒤따라야 할 것이다.

요 약

우리나라 고유 담수 어종인 쉬리(*Coreoleuciscus splendidus*; Cyprinidae)를 대상으로 세포크기, 염색체 수 분석, 핵형 분석, 세포 당 DNA 함량 조사 등 세포유전학적 연구를 실시하였다. 쉬리 암, 수의 염색체 modal number는 모두 $2n = 48$ 로 나타났으나 암,수간 형태가 다른 성염색체(sex chromosome)가 관찰되었다. 쉬리 암컷은 10쌍의 중부염색체, 6쌍의 차중부염색체, 8쌍의 차단부염색체 그리고 XX 염색체로 나타났고, 반면 수컷은 10쌍의 중부, 6쌍의 차중부 및 8쌍의 차단부염색체와 함께 XY 성염색체를 나타냄으로써 전형적인 XX-XY의 성 결정 기작(sex determination mechanism)을 갖는 것으로 나타났다. 또한 쉬리는 1쌍의 Ag-NOR을 차단부 상동염색체에 갖고 있었고, 쉬리의 세포당 평균 DNA 함량은 flow cytometry 분석을 통해 2.4 pg/cell로 나타났다. 적혈구 세포 크기를 분석을 통해 핵 용적을 평가한 결과 암수 모두 $28 \mu\text{m}^3$ 를 나타내었다. 본 세포유전학적 분석 결과를 통해 본 어종은 진화과정 중 여러 잉어과 어류에서 관찰되는 배수성에 의한 진화 보다는 유전자 재조합 등 점 돌연변이가 진화가 기본 기작이었을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국대학 교육협의회 대학교수 국내교류 연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

Arkipchuk, V. V., 1995. Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. *Hydrobiol. J.*, 31, 55-65.
Devlin R. H. and Y. Nagahama, 2002. Sex determination and sex

- differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191-364.
Gold, J., 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia.*, 232, 5-11.
Gold, J. and C. Amemiya, 1987. Genome size variation in North American minnows (Cyprinidae). II. Variation among 20 species. *Genome*, 29, 481-489.
Hardie, D. C. and P. D. N. Hebert, 2004. Genome-size evolution in fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61, 1636-1646.
Hinegardner, R. and D. Rosen., 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.*, 106, 621-644.
Howell, W. M. and D. A. Black, 1979. Localization of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. *Copeia*, 544-546.
Kim, D. S., Y. K. Nam, J. K. Noh, C. H. Park and F. A. Chapman, 2004. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. *Ichthyol. Res.*, 52, 94-97.
Lanfredi M., L. Congiu and M. Garrido-Ramos, 2001. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Res.*, 9, 47-52.
Lemoine, H. L. Jr. 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. Sanberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 202-220.
Maria, A., A. Morescalchi, R. Lucia and S. Vincenzo, 2002. Cytogenetic and molecular studies in a lungfish, *Protopterus annectens* (Osteichthyes, Dipnoi). *Gene*, 295, 279-287.
Ohno, S. 1974. *Animal cytogenetics vol. 4, Cordata 1*. Gebrüder Borntraeger.
Phillips, R. B. and P. E. Ihssen, 1985. Chromosome banding in salmonid fishes; nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 27, 433-440.
Sezaki, K. and H. Kobayashi, 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41, 851-854.
Szarski, H. 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.*, 44, 93-112.
김익수, 1997. 한국동식물도감. 제37권 동물편(담수어류). 교육부, pp. 104-105.

원고접수 : 2007년 3월 5일

수정본 수리 : 2007년 5월 23일