

韓國產 사슴雙口吸蟲의 核型分析

全北大學校 獸醫寄生蟲學敎室

李宰求·金龍煥·朴培根

緒 論

韓國產 雙口吸蟲의 系統分類를 하기 위한 一環으로 韓牛의 第一 및 第二胃에 기생하는 雙口吸蟲의 優占種인 *Paramphistomum explanatum* (Creplin, 1849)의 生殖細胞의 核型分析을 遂行한데(李 등, 1986) 이어 이번 에 著者 등은 出現頻도가 그 다음인 사슴雙口吸蟲, *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790)의 生殖細胞에 대한 細胞學的 調查 研究를 試圖하였기에 이에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1986年 1月에서 1987年 4月 사이에 全州 屠畜場에서 屠殺되는 214마리의 韓牛의 第一 및 第二胃에 寄生하는 雙口吸蟲을 채집하여 0.9% 生理食鹽水에 넣어 Fukui(1922 & 1929) 및 Näsmark(1937)의 形態學的 分類方法으로 사슴雙口吸蟲인 *Paramphistomum cervi*를 同定, 선별하여 生殖細胞의 細胞學的 調查 研究를 試圖 하였다.

*P. cervi*의 精巢部位를 切取하여 Wróblewska(1969)와 李 등 (1986)의 方法에 準하여 TC 199(Gibco社) 속에 넣어 37°C에서 2時間 colchicine을 處理(0.2mg/ml)하였다. 精巢部位를 充分히 細切한 다음 0.075M KCl로서 10~15分間 處理를 한 다음 150g로 10分間 遠心 分離하여 上清液을 除去한 後 Karnoy solution(acetic acid/methyl alcohol; 1/3, v/v)으로 30分間 3번 固定시켜 細胞浮遊液을 約 70cm 높이 위에서 슬라이드그라스위에 滴下, 擴散, 自然乾燥시켰다. 그 다음 5% Giemsa 染色을 실시하여 位相差顯微鏡으로 200倍 視野에서 檢鏡한 後 1,000倍 視野로 擴大하여 染色體를 觀察, 撮影하여 Levan et al.(1964)의 方法을 適用, 動原體 위치에 의한 染色體의 分類를 시도하였다.

한편, 細胞浮遊液을 滴下 附着시킨 슬라이드그라스를 4~5時間 自然乾燥시킨 다음 Sumner(1972)의 方法을 適用하여 染色體의 動原體部位에 局所적으로 存在하는 異染色質(constitutive heterochromatin)을 特異적으로 染色하기 위하여 0.2N HCl에 20~30分間 處理한 다음 50°C로 加溫한 5% 水酸化바륨으로 處理하여 60°C

로 加溫한 2×SSC(0.03M 枸橼酸소듐을 함유한 0.3M 食鹽液)로 30~40分間 染色하였다.

結 果

*Paramphistomum cervi*의 細胞學的 所見

一般的으로 *P. cervi*의 生殖細胞는 8, 16, 32細胞群으로 되어 있으며, 이는 第一精母細胞, 第二精母細胞 및 精子細胞이다. 이 중에서 8細胞群은 다른 群에 비해 顯著하게 많이 分布하였으며 細胞內에서는 많은 絲狀體를 確認할 수 있었다.

총 254個體의 *P. cervi*에 대하여 生殖細胞의 染色體數를 觀察한 바 1,924個의 半數體性 染色體(haploid)와 32個의 二倍體性 染色體(diploid)를 確認할 수 있었다. 이들의 細胞를 細密하게 觀察하여 綜合分析 檢討한 結果 染色體數는 $n=9$, $2n=18$ 이었다(Fig. 1 및 2). 또 $n=9$ 인 減數分裂像에 있어서 接合期(zygotene), 太絲期(pachytene), 複絲期(diplotene), 移動期(diakinesis), 中期Ⅱ 및 後期(anaphase)를 볼 수 있었으며, 生殖細胞의 體細胞分裂에서 볼 수 있는 $2n=18$ 인 染色體도 認定할 수 있었다.

二倍體性 染色體에 있어서 大型 染色體는 確認되지 않았으나, 5雙의 中型 染色體와 4雙의 小型 染色體를 確認할 수 있었다(Table 1 및 Fig. 3). 한편, 半數體性 染色體는 5個의 中型 染色體와 4個의 小型 染色體로 되어 있었다.

그리고, 紡錘絲의 附着部位에 따라 染色體를 分類하는 Levan et al.(1964)의 方法을 適用하여 二倍體性 染色體를 크기의 順으로 No. 1에서 9까지 番號를 붙여서 나열하면 No. 1, 5는 中部着絲染色體(median region), No. 4, 6, 9는 亞中部着絲染色體(submedian region), No. 2, 3, 7, 8은 亞末端部着絲染色體(subtelocentric region)이었다. 그리고, 動原體指數(centromeric index)는 No. 5 染色體가 48.98%로서 9個중에서 動原體가 染色體의 가장 中央部位에 位置하며, No. 1 染色體는 38.89%, No. 9 染色體는 28.57%, No. 4 染色體는 27.27%, No. 6 染色體는 24.88%, No. 7 染色體는 24.39%, No. 8 染色體는 24.15%, No. 3 染色體는 23.08%, No. 2 染色體는 15.38%의 순이었다(Table 1). 生殖細胞가 有絲分裂할 때 出現하는 染色體는 倍

Table 1. Chromosome measurements and their classification in *Paramphistomum cervi*

No. of chromosome pair	Relative length ¹	Arm ratio ²	Centromeric index ³	Centromere ⁴ position
1	18.20±0.15	1.57±0.05	38.89	m
2	14.10±0.13	5.50±0.07	15.38	st
3	12.11±0.14	3.33±0.12	23.08	st
4	12.09±0.17	2.67±0.09	27.27	sm
5	10.72±0.19	1.04±0.04	48.98	m
6	8.25±0.09	3.02±0.07	24.88	sm
7	8.23±0.09	3.10±0.02	24.39	st
8	8.22±0.07	3.14±0.12	24.15	st
9	8.20±0.09	2.50±0.12	28.57	sm

Each value represents the means of 32 determinations with standard deviations.

¹. Length of each chromosome divided by total length of whole chromosomes. ². Length of long arm divided by short arm. ³. Length of short arm × 100 divided by total length of each chromosomes.

⁴. Centromere position according to the quantitation definition of Levan *et al.* (1964).

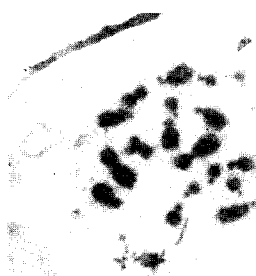


Fig. 1. The mitotic chromosomes(18) in cultured germ cells of *Paramphistomum cervi* prepared by modified air dry method.

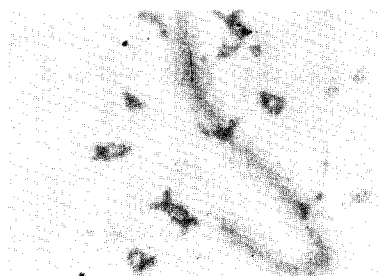


Fig. 2. The meiotic chromosomes(9) in cultured germ cells of *Paramphistomum cervi* prepared by modified air dry method.



Fig. 3. The karyotype plate made from the mitotic metaphase of *Paramphistomum cervi*.
A : Medium size B : Small size

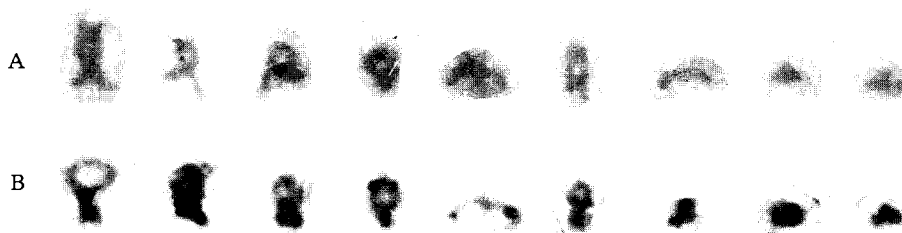


Fig. 4. The meiotic chromosomes(haploid) of *Paramphistomum cervi*.
A: Conventional karyotype of germ cell B: C-banded karyotype of germ cell

數體性相同染色體이었다.

분染法(C-banding)에 의한 精巢細胞의 半數體性 染色體는 核型을 構成하는 異染色質이 거의 모든 染色體의 動原體 部位에 存在하지만 No. 3, 5 染色體는 그 尖端에 眞性 染色體 보다 安定된 異染色質이 濃染되어 있었으며, No. 4 染色體는 動原體 遠位에 No. 6 染色體는 動原體 近位에 異染色質이 濃染되어 있었다. 한편, No. 2, 8 染色體의 異染色質은 크고 진하게 認定되었 다(Fig. 4).

考 察

일찌기 小林 및 佐藤(1915)에 의해서 우리나라 원숭이의 腸內에 寄生하는 *Rseudodiscus macaci*가 發見 報告된 이래, Fukui(1922 & 1929), 朱 등 (1968) 그리고 朱(1972)에 의하여 여러가지 雙口吸蟲이 發見 報告된 바 있다. 最近에 이르러 李 등 (1986)은 全州屠畜場에서 韓牛에 寄生하는 5種의 雙口吸蟲을 發見하였는데 그 出現頻度는 *Paramphistomum explanatum* 49.74%, *P. cervi* 48.08%, *Orthocoelium orthocoelium* 0.98%, *Fischoederius cobboldi* 0.89%, *Cotylophoron cotylophoron* 0.14%이라고 報告하였다.

雙口吸蟲은 蟲體와 內部器官의 모양이나 크기, 組織學的所見 등을 基礎로 하여 分類하고 있는데 地球上에 存在하는 雙口吸蟲은 그 數가 極히 많기 때문에 애매한 점이 많이 있다. 그러므로, 最近에 이르러 種의 類緣關係를 究明하기 위하여 細胞學的 研究方法이 導入 試圖되고 있는 것이다.

즉, Willmott(1950 a & b)가 *Gigantocotyle bathocotyle*의 染色體數는 $n=6$, *P. scotiae*는 $n=8$ 이라고 보고한 이래 Willey 및 Godman(1951), Dhingra(1955 a & b), Sey(1971), Subramanyam and Venkat-Reddy(1977), Kusano and Sakaguchi(1979), Moriyama et al.(1979 a & b) 등은 여러가지 雙口吸蟲의 染色體數를 調査하였으며, 韓國에서는 最初로 李 등(1986)은 *Paramphistomum explanatum*의 염색체수는 $n=9$, $2n=18$ 이라고 하였다.

*P. microbothrium*의 染色體數에 있어서 Sey(1971)는 $n=7$ $2n=14$, Mutafova(1983)는 $n=9$, $2n=18$ 이라고 보고하였다. 그리고 Mutafova(1983)는 이집트產 *P. microbothrium*의 動原體가 가장 中央에 있는 No. 5 中部着絲 染色體의 動原體 指數는 45.23%, No. 1 亞中部着絲 染色體의 것은 38.4%라고 하였다.

한편, Yamaguti(1971)는 *P. microbothrium*과 *P. cervi*를 synonym으로 생각한다고 하였다. 그러므로, 위의 假說을 받아 들어서 Sey(1971), Mutafova(1983) 및 本調査 結果를 檢討하면 染色體數에 있어서 差異가 認定된다. 그리고, *P. microbothrium*의 染色體는 動原體가 가장 中央에 있는 No. 5 染色體의 動原體 指數가 45.23%, No. 1 染色體는 38.24%(Mutafova, 1983)로

서 韓國產 *P. cervi*의 No. 5 48.98, No. 1 38.98와 比較할 때 약간의 차이점이 認定되었으나 *P. microbothrium*은 韓國產 *P. cervi*와 類似한 核型으로 構成되어 있다. 그러나, *P. microbothrium*과 韓國產 *P. cervi*와 같은 種이라고 確證을 내리기에는 아직 미흡한 점이 많이 있다. 그래서 著者 등은 分染法으로 이들을 比較하려 하였지만 *P. microbothrium*의 分染法의 結果가 보고되지 않았기 때문에 不可能하게 되었다.

이미 報告한 韓國產 *P. explanatum*(李 등, 1986)과 著者 등이 이번에 調査한 *P. cervi*의 半數體性 染色體의 分染法을 比較하면 No. 5 染色體는 모두 異染色質이 尖端에 濃染되어 있으나, No. 3 染色體는 *P. cervi*만 尖端에 異染色質이 濃染되어 있어 分類의 큰 指針이 될 수 있다. 또한 *P. cervi*는 No. 2, 8에, *P. explanatum*은 No. 3, 7에 크고 진한 異染色質이 각각 認定되어 種間에 뚜렷한 有意성을 인정할 수 있었다.

끝으로, 韓國產 雙口吸蟲의 보다 精確한 系統分類를 하기 위해서는 앞으로 電氣泳動法을 이용하여 여러가지 酵素의 泳動 패턴을 調査하여 自然集團에 있어서의 變異를 관찰하는 것이 타당하다고 생각된다.

結 論

韓國產 雙口吸蟲의 系統分類를 하기 위한 一環으로 이번에는 韓牛로 부터 *Paramphistomum cervi*를 채집하여 精巢部位를 colchicine(0.2mg/ml)으로 短時間 處理하는 Wróblewska(1969)와 李 등 (1986)의 自然乾燥法을 變形, 適用하여 核型을 分析하였다. 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 총 254 個體의 *P. cervi* 生殖細胞의 染色體數를 調査한 바 $n=9$, $2n=1,8$ 이며, 1924個 細胞의 半數體性 染色體, 32個 細胞의 二倍體性 染色體를 確認하였다. 그리고, 二倍體性 中期染色體는 中型 5雙과 小型 4雙으로 構成되어 있으며 Levan et al.(1964)의 分類法에 의하면 m 은 中型 2雙, sm 은 中型 1雙, 小型 2雙, st 는 中型 2雙, 小型 2雙이었으며, 染色體는 倍數體性 相同 染色體이다. 半數體性 染色體는 中型 5個와 小型 4個로 構成되어 있다.

2. 分染法에 의한 生殖細胞의 半數體性 染色體는 核型을 構成하는 異染色質이 거의 모든 染色體의 動原體 部位에 存在하지만, No. 3, 5 染色體는 染色體 尖端에 異染色質이 濃染되어 있으며, No. 4 染色體는 動原體 遠位에 No. 6 染色體는 動原體 近位에 異染色質이 濃染되어 있다. 한편, No. 2, 8 染色體의 異染色質은 크고 진하게 認定된다.

引 用 文 獻

朱鼎均·全銘鶴·宋壽復(1968) 韓國產 참개구리에 寄生하는 寄生蟲에 관한 調査研究. 釜山醫大誌, 5(2):

- 169-174.
- 朱鼎均(1972) 韓國產 黃牛에 寄生하는 雙口吸蟲에 關한 研究. 寄生蟲學雜誌, 10(1):34-43.
- Dhingra, O.P.(1955 a) Spermatogenesis of a digenetic trematode *Cotylophoron elongatum*. *Res. Bull. Panjab Univ. Zool.*, 64:1-10.
- Dhingra, O.P.(1955 b) Spermatogenesis of a digenetic trematode *Gastrothylax crumenifer*. *Res. Bull. Panjab Univ. Zool.*, 65:11-17.
- Fukui, T.(1922) Amphistomes of Japanese cattle(1, 2, 3, 4, 5, 6). *Jpn. J. Zool.*, 34:19-27, 70-74, 229-233, 588-596, 646-655, 748-755.
- Fukui, T.(1929) Studies on Japanese amphistomes parasites with revision of the group. *Jpn. J. Zool.*, 41:119-351.
- 小林晴次郎, 佐藤次郎吉(1915) さるに寄生する *Watsonius* について, 細菌學雜誌, 232:347-348.
- Kusano, H. and Sakaguchi, Y.(1979) Studies on chromosome of helminths(16) Chromosomes of four stomach flukes, *G. elongatus*, *P. gotoi*, *C. streptocorium*, *G. explanatum*. *Jpn. J. Parasitol.*, 28(suppl.):107.
- Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A.A.(1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Moriyama, N., Tinone, C. and Seto, T.(1979 a) Chromosomes of paramphistomes (1) The karyotype of *Calicophoron calicophorum*. *Jpn. J. Parasitol.*, 28(2):17.
- Moriyama, N., Tinone, C. and Seto, T.(1979 b) Chromosomes of paramphistomes (2) The karyotype of *Orthocelium streptocelium*. *Jpn. J. Parasitol.*, 28(suppl.):107.
- Mutafova, T.(1983) Studies on the caryotype of *Paramphistomum microbothrium*, Fiscoeder, 1901. *Khelmitologiya*, 16:37-41.
- Näsmark, K.E.(1937) A revision of the trematode family Paramphistomidae. *Zool. Bidrag Uppsala*, 16:301-565.
- 李宰求·姜昌源·李浩一(1986) 韓國產 *Paramphistomum explanatum* (Creplin, 1849)의 核型分析. 寄生蟲學雜誌, 24(1):42-48.
- Sey, O.(1971) Gametogenesis in *Paramphistomum microbothrium* Fiscoeder, 1901. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 21(1):93-106.
- Subramanyam, S. and Venkat-Reddy, P.(1977) A flame drying technique for mitotic chromosomes of the digenetic trematode, *Gigantocotyle explanatum*. *Egypt J. Genet. Cytol.*, 6(1):173-177.
- Sumner, A.T.(1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75(2):304-306.
- Wiley, C.H. and Godman, G.C.(1951) Gametogenesis, fertilization and cleavage in the trematode, *Zygocotyle lunata*(Paramphistomidae). *J. Parasitol.*, 37(3):283-296.
- Willmott, S.(1950 a) Gametogenesis, and early development in *Gigantocotyle bathycotyle*(Fiscoeder, 1901) Näsmark, 1937. *J. Helminthol.*, 24(1,2):1-14.
- Willmott, S.(1950 b) On the species of *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901 occurring in Britain and Ireland with notes on some material from the Netherlands and France. *J. Helminthol.*, 24(4):155-170.
- Wróblewska, J.(1969) Chromosome preparations from mouse embryos during early organogenesis: Dissociation after fixation, followed by air drying. *Stain Technol.*, 44(3):147-150.
- Yamaguti, S.(1971) Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vol. 1, *Keigaku Publ., Tokyo*.

=Abstract=

The Karyotype of *Paramphistomum cervi*(Zeder, 1790) from Korean Cattle

Jae Ku Rhee, Yong Hwan Kim and Bae Keun Park

Department of Veterinary Parasitology, Jeonbug National University, Jeonbug 520, Korea

As a series of systematic classification of paramphistomes, the worms in the rumen and reticulum were collected on 214 Korean cattle slaughtered at Jeonju abattoir from January, 1986 to April, 1987 and were classified by means of morphology.

Afterwards, the karyotype of *Paramphistomum cervi*(Zeder, 1790) was detected by means of modified air-drying method from germ cells of the worms. The results were summarized as follows:

1. In the chromosome number of 254 *P. cervi*, the haploid cell was $n=9$ and the diploid $2n=18$. The meiotic divisions were observed frequently; 1,924 haploid and 32 diploid cells were reliable. Nine pairs of mitotic chromosomes were homologous in the metaphase stage, and the chromosomes were composed of five medium-sized metacentrics(m), subtelocentrics(st) or submetacentrics(sm) and four small-sized subtelocentrics(st) or submetacentrics(sm). Meiotic metaphase was composed of five medium and four small chromosomes in size.

2. As a series of C-banding method, C-band was showed in centromeric region from all of the haploid germ cells. Whereas chromosome No. 3 and 5 included heterochromatin on the tip region, chromosome No. 4 on the distal region and No. 6 proximal region. And chromosomes No. 2 and 8 showed a remarkable C-band distinguished from other chromosomes.