

한국산 논우렁이(논우렁이과)의 세포학적 연구

朴甲萬 · 李俊相 · 宋鎬復 · 權伍吉

江原大學校 生物學科

= Abstract =

Cytological Studies of *Cipangopaludina chinensis malleata* (MESOGASTROPODA: Viviparidae) in Korea

Gap-Man Park, Jun-Sang Lee, Ho-Bog Song, Oh-Kil Kwon

Department of Biology, Kangweon National University

The chromosome of *Cipangopaludina chinensis malleata* Chunchon area in 1988 was analysed by using aceto-orcein squash techniques of spermatogonial tissues to obtain mitotic and meiotic chromosomes.

The chromosome cycle did not differ, in general, from that found in other snails. *C. chinensis malleata* has 18 diploid chromosomes and they were identified and classified into 2 groups. The mitotic chromosome complement of this species consists of 2 pairs of metacentric and 7 pairs of submetacentric chromosomes. Spermatogonial metaphase chromosomes range in length from 4.10 μm for the largest pair to 2.20 μm for the smallest pair.

서 론

논우렁이는 복족강, 중복족목, 논우렁이과, 논우렁이로 분류되는 담수권패류의 일종의 우리나라를 포함한 미국, 일본, 인도, 유럽 등 전세계적으로 분포(Patterson, 1965)하며 주로 연못, 논, 호수 등에 서식하면서 동기(冬期)에는 乾沓에서 월동하는 등 장기간에 걸쳐 건조함을 견디는 것이 다른 우렁이와 다른 점이다. 최근에는 과다한 농약의 오염으로 그 수가 점차 줄어들고 있다.

논우렁이는 자웅이체이며 卵形으로 中央部가 오목하고, 패각의 색깔은 짙은 갈색을 띠고 있다(Yoo, 1976).

La Cour(1942)등이 분류학적인 면에서 염색체를 이용, 여러 종을 분류하는데 커다란 의의가 있다고 보고한 이래 점차 장비 및 기술적인 발달로 계통분류학 및 유전학에 이르기까지 염색체를 이용한 연구가 활발히 추진되

어 왔다(Sharma, 1980). 한편 논우렁이과(Viviparidae)에 대한 세포학적 연구는 Franz(1932), Pollister 및 Pollister(1940, 1943), Inaba 및 Tanaka(1953), Ramamoorthy(1958), Rainer(1963), Patterson(1965) 등에 의해 이루어졌다.

현재 우리나라에는 논우렁이과에 2종이 서식한다고 알려져 있는데, 외부 형태상 패각의 차이로 다른 종으로 기록돼 있다. 실제로 대부분의 종들은 핵형 분석을 통해 종간의 차이를 밝힐 수 있다고 보고돼있다(White, 1978). 따라서 본 연구에서는 논우렁이과 중 춘천지역에 서식하고 있는 논우렁이의 염색체를 핵형분석을 통해 분석하였다.

실험재료 및 방법

본 연구의 재료는 1988년 4월부터 10월에 걸쳐 춘천 지역 연못 및 호수에 서식하고 있는 논우렁이를 채집하여 실시하였다. 채집된 재료는 중 동정을 위해 10% 중

Recived October 11, 1988

성 formalin으로 고정시켜 보관하였으며 나머지는 세포학적 연구를 위해 수조에서 기포발생기를 이용 계속 사용 하면서 실험재료로 사용하였다.

염색체의 표본제작은 크기가 30 mm이상의 숫눈을 사용하였으며 세포분열이 왕성하게 일어나고 있는 생식소(testis)를 절취하여 사용하였다. 표본제작은 살아있는 재료의 껍질을 조심스럽게 제거한 후 Carnoy solution (methanol 3: acetic acid 1)으로 전체를 즉시 고정시킨 다음 생식소 조직만을 핀셋으로 떼어내어 조직속으로 고정액이 신속히 침투하도록 여러조각으로 잘라, 조직약간을 슬라이드 글라스위에서 세포가 잘 유리되도록 잘게 자르고, 염색은 acetic orcein으로 약 20분간 조직이 마르지 않도록 wet chamber에서 하였다. 또 45% acetic acid를 이용하여 과도한 염색을 제거한 후 커버글라스를 덮고 압착법(La Cour, 1941)으로 표본을 만들었다. 이 방법은 La Cour(1941)의 방법을 약간 변형시켜 사용하였다. 남은 조직은 계속 실험재료로 사용키 위해 조직과 고정액을 10 : 1 정도로 넣어 보관하였다. 염색체의 관찰은 현미경으로 100배에서 유사분열 단계 및 감수분열시 염색체의 형태적변화와 중기 분열상을 관찰하였으며 사진은 oil immersion을 사용 1000배에서 green filter를 이용, ASA/32 film으로 촬영하였다.

염색체는 배수체 및 이배체의 중기단계시 수를 파악한 후 핵형분석을 위해 사진으로부터 염색체를 오래내어 염색체의 크기와 contromere index는

$$\frac{\text{Length of short arm}}{\text{Chromosome relative length}} \times 100 \text{으로 계산하였으}$$

며, 염색체 형태는 동원체의 위치를 중심으로 contromere index range가 46~49명 metacentric, 23~35이면 submetacentric (less metacentric)으로 분류하였다(Paris conference, 1971, 1975).

또 염색체의 전체길이와 단완의 길이를 자로재어 염색체의 상대적 길이를 계산하였다. 한편 본 종의 생식소 부위를 측정하기 위하여 내장낭을 절취하여 10% neutral formalin으로 고정하였으며, alcohol과정을 통해 탈수시키고 4 μ m 두께로 절편을 만들었다. 염색은 H&E로 이중염색을 한후 Canada balsam으로 봉하였다.

실험 결과

본 연구에 사용된 논우렁이는 외부형태학적으로 Yoo

(1976)의 도감을 참고로하여 논우렁이(*Cipangopaludina chinensis malleata*)로 분류하여 실시하였다. 외형상 특징으로는 체층(whorls)이 6층으로 되어 있었다(Fig. 1)

염색체는 early prophase에서는 약간 진하게 염색되면서 길고 풀어진 가닥으로 보였다(Fig. 2-a). Late prophase (Fig. 2-b)에서는 centromere가 나타나면서 염색체는 mid-prophase단계보다 더 짧아지면서 진하게 염색되며 또한 염색체의 가장자리가 매끄러워졌다. Early metaphase (Fig. 2-c)에서 염색체는 점차 응축을 하여 late prophase에서 보다 짧고 centromeric부위가

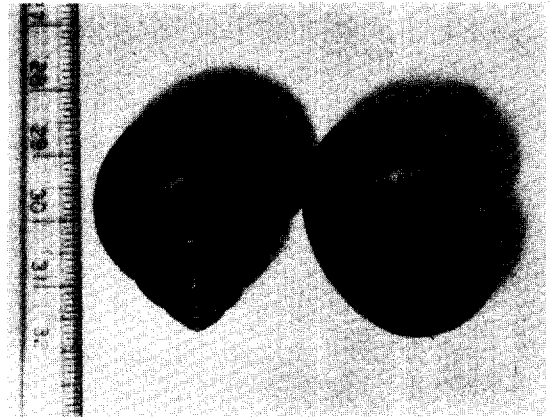


Fig. 1. Shell morphology of *Cipangopaludina chinensis malleata*.

Table 1. Length of chromosomes (μ m) in *C. chinensis malleata**

Chromosome No.	Relative length	
1	3.82	0.22
2	1.91	0.33
3	4.10	0.38
7	3.86	0.14
9	3.83	0.11
11	2.76	0.81
13	2.58	0.62
14	2.58	0.25
17	2.20	0.23

* Measurements were made from seven sets of chromosomes in *C. chinensis malleata*.

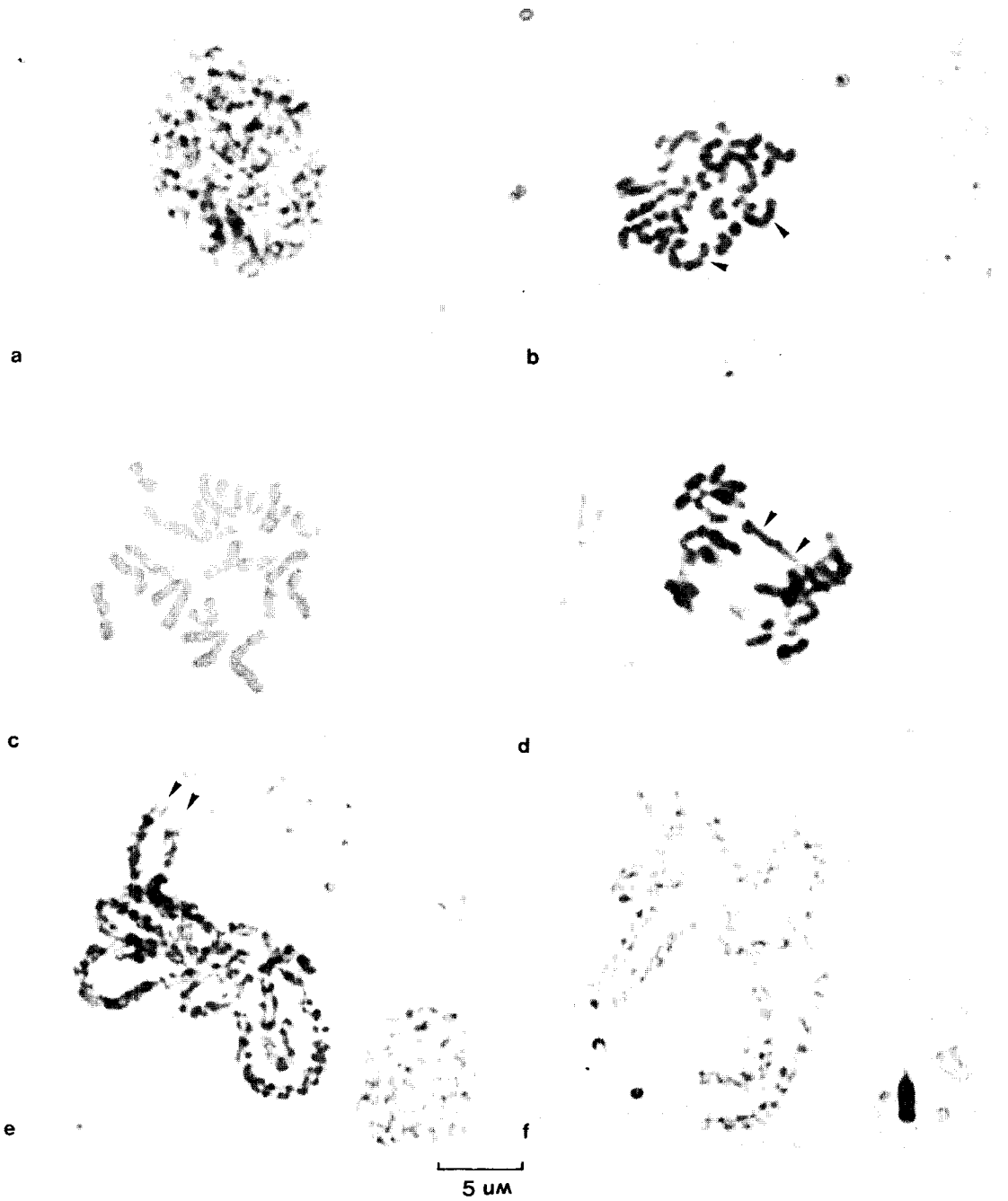


Fig. 2.

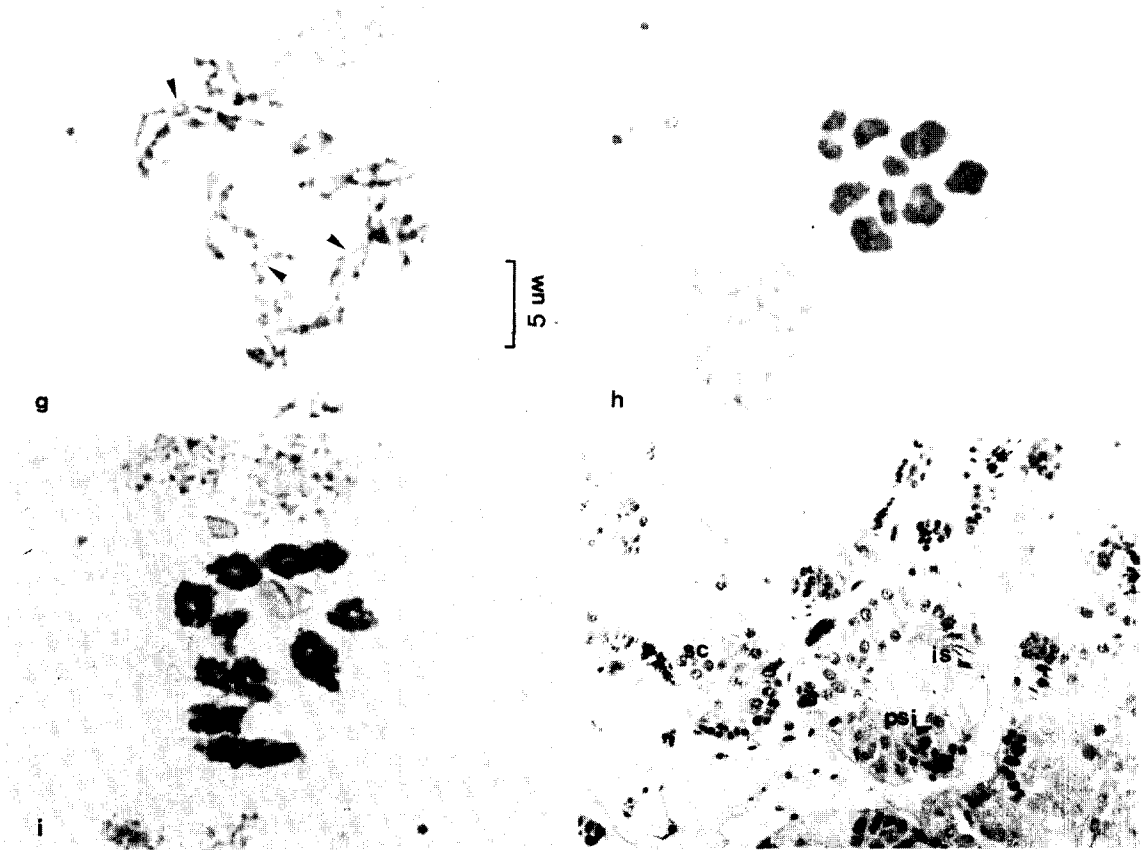


Fig. 2. Mitotic and meiotic chromosomes in spermatogenesis in *Cipangopaludina chinensis malleata*.

- a. Spermatogonial mitotic early prophase.
- b. Spermatogonial late prophase. Arrows denote centromeric regions.
- c. Spermatogonial metaphase.
- d. Spermatogonial early telophase. The arrows point to secondary constrictions in the lagging sister chromosome arms.
- e. Zygotene. The arrows indicate synopsis at the polarized ends, while most of the rest of the strands are not yet paired.
- f. Pachytene bivalents.
- g. Late diplonema. Arrows indicate chiasmata.
- h. Diakinesis.
- i. Metaphase I.
- j. Testis tissue. S.C, Spermatogenic cell. P.S.I, Primary spermatocyte in mitosis. I.S, Immature sperms.($\times 300$).

나타나면서 18개의 염색체도 쉽게 구별할 수 있었다. 이것을 통해 핵형분석도 가능하였다. Fig. 3은 논우렁이의 정소조직으로부터 얻어진 중기단계와 핵형을 나타낸 것이며 여기서 나타난 자료를 통해 (Table 1) 핵형을 도식화하여 그린 것이다(Fig. 4).

한편 18개 염색체 중 No.1~No.2는 동원체 계수가 거

의 49에 가까운 중부(medianly constricted) 염색체이고 No.3~No.9은 단원이 짧고 동원체 계수가 25에 가까운 차중부(submedianly constricted) 염색체로 단원이 서로 분리되어 나타났다. 염색체의 길이는 spermatogonial metaphase range에서 가장 긴 쌍이 3.82~4.10 μm 이며 가장 짧은 염색체 쌍은 1.91~2.20 μm 길이로

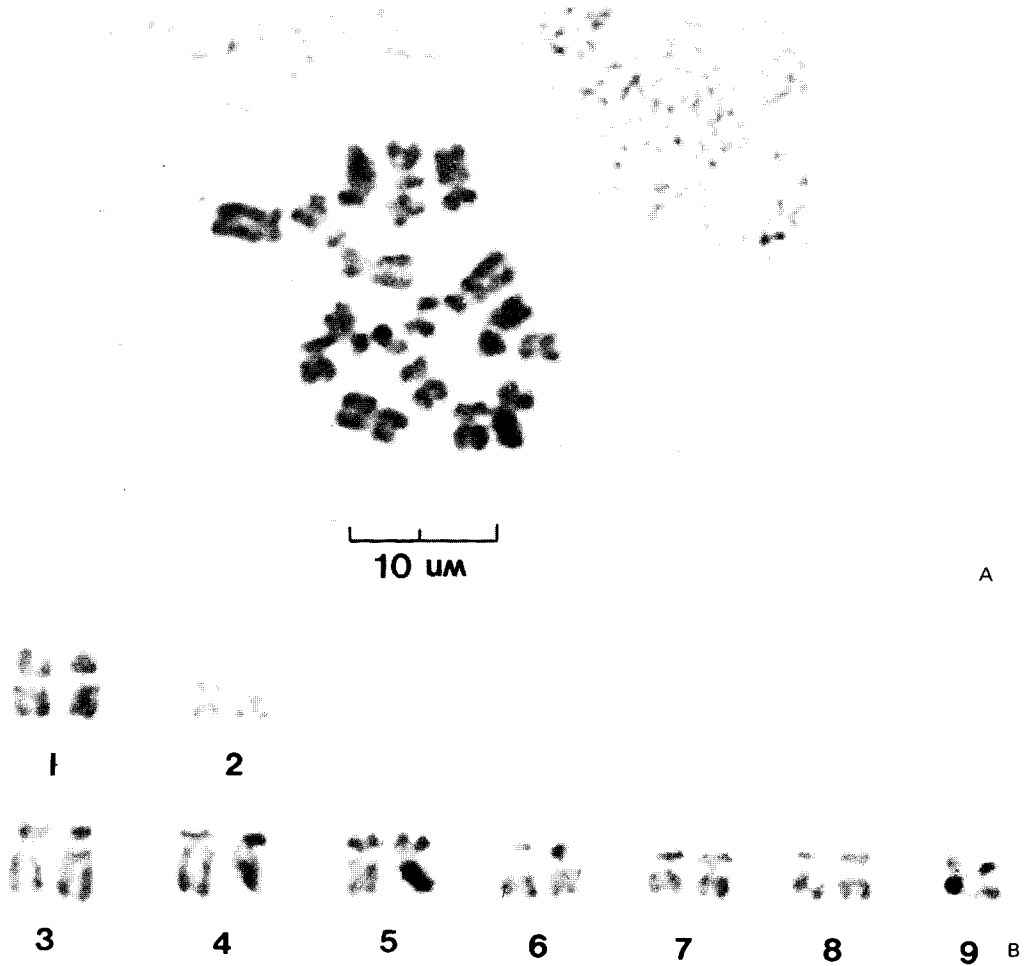


Fig. 3. Karyotype showing spermatogonial metaphase chromosomes(A). The homologous pairs have been arranged in decreasing order of length(B): metacentrics in the top row, submetacentric chromosome in the bottom row.

Table 2. Chromosome numbers reported in the Viviparidae

Species	Haploid No.	Diploid No.	Source	Reference
<i>Cipangopaludina chinensis malleata</i>	9	18	Korea	This Study
<i>Cipangopaludina malleata</i>	9	18	Japan	Inaba & Tanaka, 1953
<i>Cipangopaludina malleata</i>	9	18	U.S.A.	Pollister & Pollister, 1940, 1943
<i>Bellamya dissimilis</i>	—	22	India	Ramamoorthy, 1958
<i>B. dissgalensis</i>	—	22	India	Ramamoorthy, 1958
<i>Viviparus contectus</i>	7	14	Europe	Rainer, 1963
<i>V. ater</i>	9	—	Europe	Franz, 1932

나타났다(Table 1). 중기에서 분열이 계속되어 후기 그들의 centromere로 부터 반대쪽 양극으로 이동하였다. (Fig. 2-d)에 이르면 2 anaphasic groups의 염색체는

Zygonema 단계에서는 실모양의 염색체가 서로 다가와서 2개씩 한쌍으로 붙어버렸다. 상동 염색체의 pairing(synapsis)이 시작되고 나머지 strands는 다발형성(Bouquet formation)으로 아직 homologous strands의 pairing이 되며 염색체가 두선으로 굽어져서 매우 밀접하게 붙어버리며 단수(haploid number)로 나타났다(Fig. 2-f). Diplonema 단계에서는 짝을 이룬 상동 염색체가 서로 분리되면서 많은 교차(chiasmata)로 결합되었다. 가장자리가 불규칙한 것이 특징이며 염색

체의 길이를 따라 열려 있거나 고리를 형성하였다(Fig. 2-g).

Chiasmata가 끝나고 응축이 계속되어서 diakinesis에서 환, 막대, 그리고 많은 루우프모양을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2-f) 2가 염색체 중 환 모양(Fig. 5a~e)에서 2개의 chiasmata를 이루고 막대형(Fig. 5f)에서는 한개의 종결 chiasma가 남아 있었으며 multiple loop shaped(Fig. 5g~i)에서는 3개의 chiasmata를 가지고 있었다. 중기 염색체 I(Fig. 2-i)은 훨씬 더 응축되어 있으며 매끄러운 가장자리를 보이면서 chiasmata를 가지고 있었다.

또 눈우렁이의 내부 생식소 조직을 통해 자웅이체임을 알았다(Fig. 2-j). 생식소의 수정세관(seminiferous tube)속에는 原生生殖細胞(preordial germ cell)가 나타나는데, 이 세포가 분열하여 정원세포가 만들어진다. 실제로 수정세관속에는 수많은 정세포 및 미성숙 정자를 관찰할 수 있었다.

고찰

복족류(Gastropoda)에 대한 염색체 연구는 초기에는 주로 paraffin조직 절편등을 통해 염색체수를 밝혔으나

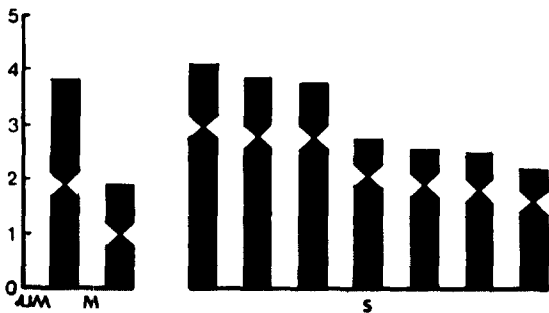


Fig. 4. Schematic representation of the karyotypes of *C. chinensis malleata*. M=Metacentric, S=Submetacentric chromosomes.

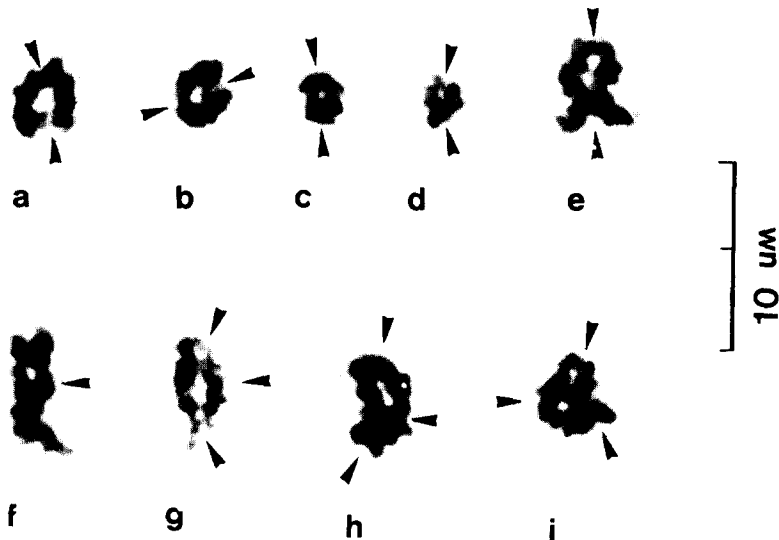


Fig. 5. Diakinesis bivalents of *Cipangopaludina chinensis malleata*. a~e. Ring-shaped bivalents, each with 2 chiasmata. f, Rod-shaped bivalent with 1 terminal chiasma. g~i. Multiple loop-shaped bivalent with 3 chiasmata. Arrows indicate positions of chiasmata.

점차 장비의 발달과 실험기술의 진전으로 많은 염색체 연구가 이루어지고 있다. Nishikawa(1962)는 Gastropoda의 365종을 세포학적인 연구를 통해 단지 96종에서 18개보다 적은 염색체를 가지며, 44종에서는 $n=14$ 의 haploid수를 가진다고 보고하였으며, 또 Patterson(1966)은 haploid 염색체수가 $n=7\sim 20$ 개의 범위에 속한다고 보고했다.

한편 Viviparid에 대한 연구는 Bellamyinae, Viviparidae, Lioplacine등에서 알려져 있는데, Bellamyinae科종들에서는 9개, Viviparidae科에서는 7~13개, Lipolacine科에서는 14개의 haploid염색체수를 가지는데 이들은 모두 haploid염색체수가 $n=7\sim 14$ 개의 범위에 속한다. 춘천지역에서 채집된 논우렁이(*Cipangopaludina chinensis malleata*)에서의 결과도 $n=9$ 로 나타나 이에 일치한다. Viviparid 패류에 대한 핵형분석은 Inaba 및 Tanaka(1953)등이 *Cipangopaludina malleata*에서 secting 방법으로 분석했으며, Ramamoorthy(1958)는 *Bellamyia dissimilis*와 *B. bengalensis*의 염색체의 크기와 형태를 보고 하였고, Rainer(1963)는 *Viviparus contectus*와 *V. ater*종에서 centromere 위치는 고려치 않고 단지 mitotic 중기 염색체의 길이를 통해 분석했는데 이들은 분석은 단지 부분적인 정보제공에 불과할 뿐이다(Table 2). 또 Patterson(1965)에 의하면 *Tulotoma angulata*에서 13개의 배수체를 가지는데 이중 3쌍은 metacentric, 7쌍이 submetacentric, 2쌍이 acrocentric, 그리고 성 염색체를 가진다고 보고되었다.

본 연구에서는 metacentric이 2쌍, submetacentric이 7쌍으로 분류되었다.

염색체 cycle은 spermatogenesis에서 실시되었으며 Patterson(1966)이 밝힌 육산패의 일종인 *Catinella vermeta*와 김(1987)등이 한국산 다슬기류 *Semisulcospira* spp)에서 염색체 cycle과 비교한 결과 커다란 차이점은 발견할 수 없었다.

본 연구를 토대로 앞으로 큰 논우렁이를 채집하여 외형상으로 분류된 2종을 염색체 cycle과 핵형을 통해 차이점을 밝히는 것이 과제로 남았다.

결 론

강원도 춘천지역에서 서식하는 논우렁이를 채집, 압

착법(squash-method)을 통해 세포학적인 관찰을 하였다. 실험 결과 논우렁이의 염색체는 $2n=18$ 으로 나타났으며, 핵형분석결과로는 2쌍의 metacentric과 7쌍의 submetacentric 염색체를 가지고 있었다. 염색체의 길이는 가장 긴쌍이 $3.82\sim 4.10\ \mu\text{m}$ 이며 가장 짧은 염색체쌍이 $1.91\sim 2.20\ \mu\text{m}$ 로 각각 나타났다. 또한 spermatogenesis동안에 일어나는 염색체 cycle도 관찰할 수 있었다.

REFERENCES

- Franz, V.,(1932) *Viviparus*; Morphometrie, Phylogenie und Geographie der Paludine. *Mediz-Naturw. Ges. Zu Jena, Denkschriften*, **18**:160
- Inaba, A. and H. Tanaka,(1953) Studies on the chromosome numbers of some freshwater gastropods. *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B., Div. 1*, **14**:213-220
- Kim Sung Soon, Kim Dong Chan, Chung Pyung-Rim, Chung Yong Jae, (1987) A cytological study on two species of genus *Semisulcospira* (Gastropoda: Pleuroceridae) in Korea. *Korean J. Malacol.* **3**(1):24~34
- La Cour, L.F., (1941) Acetic-orcein: A new stain fixative for chromosomes. *Stain Techn.*, **16**:169-174
- La Cour L.F. and Darlington, C.D., (1942) The handling of chromosome. *George Allen and Unwin Ltd., London*
- Nishikawa, S., (1962) A comparative study of the chromosomes in marine gastropods, with some remarks on cytotaxonomy and phylogeny. *J. Shimonosek. College Fisheries*, **11**(3):149-186
- Paris conference, (1971) Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics*, **11**:317-362
- Paris conference, (1975) Standardization in human cytogenetics (Ed. Bergsma, D.), *National Science Foundation, Washington, D.C.*
- Patterson C.M., (1965) The chromosome of *Tulotoma angulata* (Streptoneura: Viviparidae). *Malacologia*, **2**(2):259-265
- Patterson, C.M. and Burch, J.B., (1966) The chromosome cycle in the land snail *Catinella vermeta* (Stylomatophora: Succineidae). *Malacologia*, **3**(3):309-325
- Pollister, A.W. and Pollister, P.F., (1940) Distribution of males in the genus *Compeloma*, with a note on the chromosome numbers in Viviparidae. *Anat Rec.*, **78**(suppl):128

- Pollister, A.W. and Pollister, P.F., (1943) The relation between centriole and centromere in atypical spermatogenesis of viviparid snails. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **45**:1-48
- Rainer, M., (1963) Vergleichende Chromosomenmessungen an *Viviparus* arten (Prosobranchia), 23. *Jahresber. Schweizer. Ges. F. Vererbungsforsch.*, SS. G.: *Arch. d. Julius Klaus-Stiftung f. Vererbungsforsch.*, **38**(3/4):61-68
- Ramamoorthy, K., (1958) Chromosome of *Viviparus dissimilis* (Müller) and *Viviparus bengalensis* (Lamarck) (Prosobranchia-Gastropoda). *J. Zool. Sci. India* **10**(1):33-38
- Sharma, Arun Kumar (1980) Chromosome techniques: Theory and practice. *Butterworth & CO (Publishers) Ltd., London*
- White, M.J.D., (1978) Modes of speciation. p.455 *Freeman, San Francisco*
- Yoo, J.S., (1976) The Korean shells in color, pp52-53. *Iljisa, Seoul*
-