

북방대합 (*Spisula sachalinensis*) 생식세포의 미세구조

이정용[†] · 장윤정* · 장영진**

국립수산과학원 강릉수산종묘시험장, *동해지방해양수산청 수산관리과, **부경대학교 양식학과

Ultrastructure of Germ Cell during the Gametogenesis in Surf Clam, *Spisula sachalinensis*

Jeong Yong LEE, Yun Jeong CHANG* and Young Jin CHANG**

Kangnung Hatchery, NFRDI, Kangnung 210-807, Korea

*Fisheries Management Division., Donghae, MOMAF, Donghae, 240-716, Korea

**Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Ultrastructure of germ cell during gametogenesis of surf clam, *Spisula sachalinensis* were investigated by electron microscopic observations. Oogonia are oval in shape and 5-6 μm in diameter. They contain a large nucleus and have several mitochondria in the cytoplasm. Vitellogenic oocytes grew attached by a stalk to the germinal epithelium in the ovarian sac and their cytoplasm contained many yolk granules, lipid granules and mitochondria. Mature oocytes measuring 50-60 μm in diameter have a nucleus containing an electron dense nucleolus, and a lots of yolk granules, lipid granules, mitochondria, rough endoplasmic reticulum and cortical granules were present in the cytoplasm. The surface of the plasma membrane in mature oocytes was formed of microvilli approximately 1.5 μm long and enveloped in the vitelline layer. Spermatogonia are oval in shape and about 5 μm in diameter. Sprmatogonia develop into spermatocyte, spermatid and spermatozoon. The spermatozoon consisted of the head, midpiece and tail. The sperm head with diameter of about 1.5 μm was ovoid, and contained the nucleus which consisted of acrosome. The four mitochondria encircled the centrosome in midpiece. The flagellum measuring about 40 μm long had the classical 9+2 axoneme structure.

Key words: Surf clam, *Spisula sachalinensis*, Ultrastructure, Oogenesis, Spermatogenesis

서 론

일반적으로 조개류는 생식소가 소화맹낭과 족부 근육사이 에 수많은 관 (tube) 또는 주머니 모양의 기관으로 존재 하며 (Mackie, 1984; Lee et al., 1997; Lee et al., 1999), 산란기에 알과 정자를 수중으로 방란·방정하여 수정하는 체외수정종이다 (Franzen, 1977). 체외로 방출된 알은 용적이 체세포에 비하여 아주 크기 때문에 방향성 없이 움직이는 정자와 수정이 가능하며, 수정 후 발생을 위하여 세포질에는 지방과립, 글리코겐 등 에너지를 저장하고 있다 (Eckelbarger and Davis, 1996a). 또한 조개류의 정자는 크게 두부, 중편부 및 꼬리로 구분되며, 두부는 선단부에 모자모양의 첨체를 가지고 있고 중편부에는 4-5개의 미토콘드리아를 가지고 있다 (Longo and Dornfield, 1967). 그러나 조개류에 따라 정자 모양이 다양하기 때문에 많은 연구자들은 조개류 정자에 있어서 미세구조의 차이가 분류적 목적으로 이용 가능함을 보고하였다 (Franzen, 1956, 1977, 1983; Popham, 1979). 아울러 수중에서 다양한 종의 알과 정자가 존재하기 때문에 동일종 사이에는 수정을 위한 종특이성이 존재할 것으로 추측된다.

북방대합은 속초·강릉 연안 수심 8-20 m의 모래바닥에 서식하는 개랑조개과의 대형 조개류로 산업적으로도 매우

중요한 조개이며, 산란성기는 5-7월이다 (Lee et al., 1997).

이 연구는 북방대합의 생식세포 형성과정 중 형태적 특징을 파악하고, 알과 정자의 미세구조를 조사하며 아울러 분류학적 측면으로 적용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험에 사용된 북방대합은 2000년 3월, 6월, 9월 및 12월에 강원도 양양군 현남면 연안에서 형망으로 채취된 각장 7.8-9.5 cm, 전중 100.8-158.4 g 범위의 성숙개체 8마리였다. 채취된 재료는 활폐상태로 실험실로 옮겨 절개법으로 생식소 부위를 적출하여 조직표본을 제작하였다.

생식소 발달 단계에 따른 생식세포의 미세구조를 파악하기 위하여 3월, 6월, 9월 및 12월에 생식소의 일부를 채취하여 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2)으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 2시간 동안 전고정(pre-fixation)하였다. 이후 PBS로 10분간 세척한 다음, 1% osmium tetroxide (OsO4)로 4°C에서 2시간 동안 후고정(post-fixation)하였다. 고정이 끝난 재료는 다시 PBS로 세척하고 50-100%의 단계별 ethanol 농도에서 15분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 propylene oxide와 epon의 혼합물에 넣어 37, 45 및 60°C에서 각각 12, 24 및 48시간씩 중합시킨 다음, epon 812에 포매하였다. 포매된 생식세포의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)에 의해 두께

[†]Corresponding Author: jylee@nfrdi.re.kr

0.5 μm 로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포배 시료는 다시 70 nm 두께로 초박절 (ultrathin section)하였다. 초박절한 절편은 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM 1200 E-XII, 60-80 Kv, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

정자의 외부 미세구조를 관찰하기 위하여 주사전자현미경 표본을 제작하였다. 시료는 투과전자현미경 시료제작 방법과 같이 전고정 하였다. 이어 50-100%의 단계별 ethanol 농도에서 10분씩 탈수하고 탈수가 끝난 시료를 여과지 위에서 건조시킨 후 gold palladium coating (15-20 nm)하여 주사전자현미경 (DMS 940-A, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

결 과

난원세포 (oogonium, OG)는 난소소낭의 생식상피 (germinal epithelium, GE) 세포와 인접하여 분포하였으며, 직경 5-6 μm 의 타원형으로 주변에 조면소포체 (endoplasmic reticulum, ER)가 다량으로 관찰되었다 (Fig. A1). 이후 핵 (nucleus, N) 속의 염색질 (chromatin, CR)이 핵의 가장자리로 이동하고 핵주변에 작은 미토콘드리아 (mitochondrion, M)가 관찰되었다 (Fig. 1B). 난황형성기 난모세포 (oocyte, OC)는 서양배 모양으로 생식상피 세포 위에 붙어서 난황을 축적하였다 (Fig. 1C). 또한 난황형성기 난모세포에서는 이층의 단위막으로 둘러싸여 있는 핵의 중앙에 전자밀도가 높은 인 (nucleolus, NU)이 관찰되었으며, 세포질에는 전자밀도가 높은 다량의 난황과립 (yolk granule, YG)과 전자밀도가 낮은 지방과립 (lipid granule, LG) 및 미토콘드리아가 분포하였다 (Fig. 1D). 성숙 난모세포의 세포질에서는 다량의 난황과립, 지방과립, 미토콘드리아 및 조면소포체가 관찰되었으며 (Fig. 1E), 특히 세포질 표면 아래에는 난황 및 지방과립과 함께 전자밀도가 낮은 표층과립이 분포하였고, 표면에는 약 1.5 μm 의 미용모 (microvilli, MV)가 무정형의 물체와 결합하여 난황막 (vitelline envelope, VE)을 형성하고 있었다 (Fig. 1F).

정원세포 (spermatogonium, SG)는 정소소낭의 생식상피 (GE) 위에 여러 층으로 배열되어 있으며, 타원형의 세포질 내에 4 μm 전후의 핵을 가지고 있었고 핵내에는 여러 모양의 염색질이 산재하였다 (Fig. 2A). 이후 정모세포 (spermatocyte, SC) 시기에는 핵 주위에 많은 과립들이 관찰되었으며 (Fig. 2B) 핵경은 정원세포에 비해 작아져 2.5 μm 전후였으며, 핵내에는 염색질의 응축이 활발히 이루어지고 있었다 (Fig. 2C). 타원형에 가까운 정모세포는 서서히 원형의 정세포 (spermatid, ST)로 변하며, 핵내에는 응축 정도가 서로 다른 다양한 이형염색질들이 관찰되었다. 또한 정세포의 발달단계에 따라 핵의 전단부에는 다양한 형태의 침체포를 가지고 있었으며, 핵의 후단부에는 관상의

미토콘드리아와 중심체가 편모와 연결되어 있었다 (Fig. 2D). 이후 변태를 완료한 정자 (spermatozoon, SZ)는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 치밀한 핵질로 충만한 원추형 머리 (N)의 길이는 평균 1.5 μm 였으며, 앞부분이 함몰되어 선단에 침체 (acrosome, AC)가 존재하였다. 침체는 1.5 μm 의 침체간 (axial rod)이 침체막으로 싸여 침체포 (plasma membrane, PM)를 형성하고 있으며, 침체간의 초기부분에는 꽃받침 모양의 전자밀도가 높은 "basal ring" 같은 구조가 관찰되었다. 중편부에는 지름 0.6 μm 의 원형 미토콘드리아 (M) 4개가 머리부분과 수직으로 연결되어 있었으며, 중앙에 원단중심소체 (distal centriole, DC) 및 기부중심소체 (proximal centriole, PC)가 편모 (flagellum, F)와 연결되어 있었다 (Fig. 2E, F). 변태를 완료한 정자들의 편모는 일정한 방향으로 모여 있었으며 (Fig. 2G), 편모의 횡단면에서는 한 쌍의 중심 미세소관과 9쌍의 주변 미세소관을 가지는 전형적인 9+2 구조를 나타냈다 (Fig. 2H).

주사전자현미경으로 관찰한 정소소낭 속의 정자는 서로 엉켜서 변태중이었으며 (Fig. 3A), 편모를 가진 정자 (Fig. 3-B)의 머리는 타원형에서 점차 원형으로 변하고 (Fig. 3C), 이후 미토콘드리아와 침체가 형성된다 (Fig. 3D). 주사전자현미경으로 관찰한 정자의 머리는 직경 약 1.5 μm 의 머리 앞부분에 길이 약 1.5 μm 의 화살촉 모양의 침체가 관찰되었으며, 뒤부분으로 직경 약 1 μm 의 미토콘드리아가 편모와 연결되어 있었다 (Fig. 3E). 편모는 약 40 μm 였다 (Fig. 3F).

고 찰

연체동물중 조개류는 약 10,000종이 존재하며 (Eversole, 1989), 많은 번식생물학적 연구가 이루어져 있다. 특히 생식세포의 미세구조에 관하여 가리비류 (Lubet et al., 1987; Dorange and Le Penneec, 1989), 담치류 (Pipe, 1987) 및 굴류 (Daniels et al., 1973; Eckelbarger and Davis, 1996a,b) 등에서 많은 연구가 이루어졌으나 개량조개과에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

일반적으로 조개류의 생식소를 조직학적으로 관찰하면 성숙기 난소 소낭의 안쪽 벽에는 발달중인 난모세포가 분포하고 중심 내강에 성숙난이 분포하는데 (Eckelbarger and Davis, 1996a), 북방대합에서도 이러한 모습이 보고되었다 (Lee et al., 1997). 또한 북방대합의 성장기 난모세포도 난소소낭의 상피세포에 서양배 모양으로 연결되어 발달하고 있으며 (Lee et al., 1997), 이 연구에서도 난황형성기 난모세포는 생식상피 세포에 연결되어 있었으며, 상피세포와 연결된 부분에 지방과립 및 난황과립이 집중적으로 분포하는 것으로 보아 영양물질의 전달을 받아 난황을 축적하는 것으로 추측된다. 또한 난황형성기 난모세포는 전자밀도가 높은 인을 가진 핵이 이층의 단위막으로 둘러싸여 있으며, 세포질에는 전자밀도가 높은 난황과립과 전자밀도가 낮은

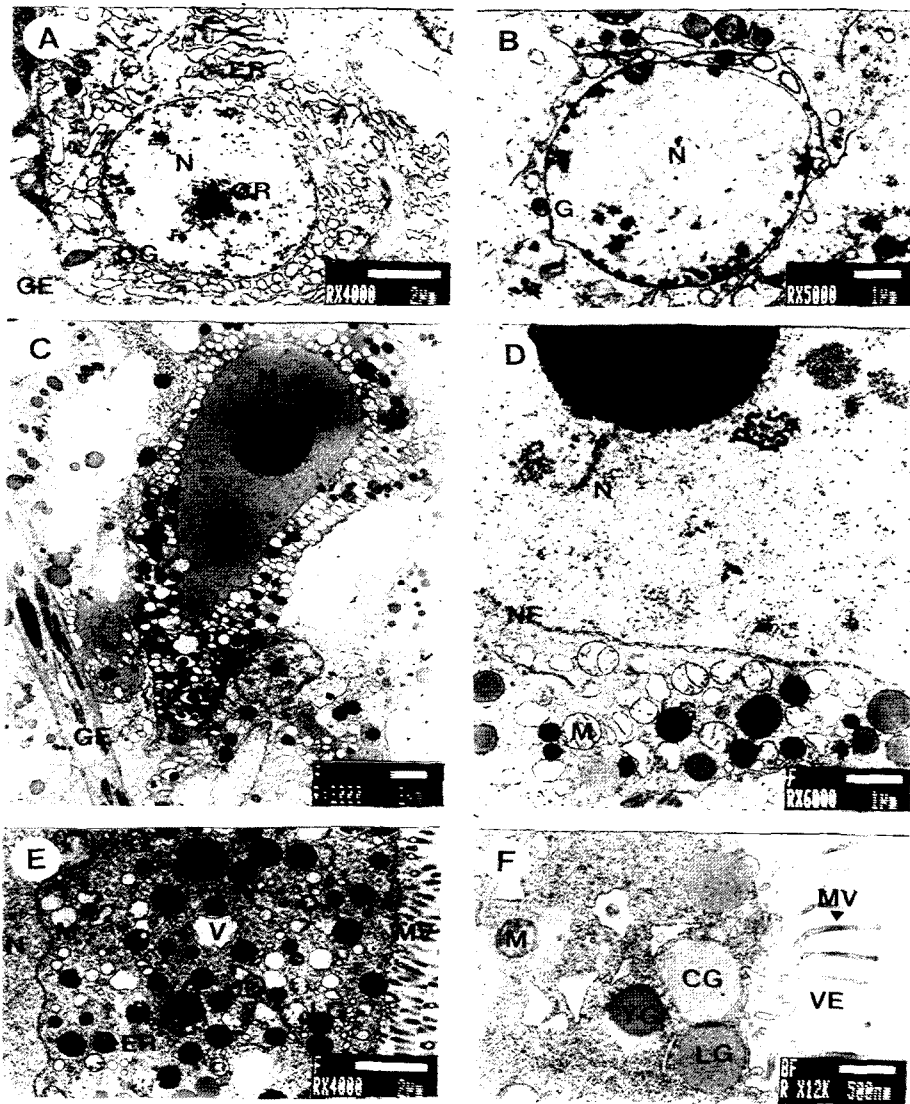


Fig. 1. Transmission electron micrographs of developing oocyte of *Spisula sachalinensis*. A and B, oogonium stage; C and D, vitellogenic oocyte; E and F, mature oocyte. CG, cortical granule; CR, chromatin; ER, endoplasmic reticulum; GE, germinal epithelium; LG, lipid granule; M, mitochondrion; MV, microvilli; N, nucleus; NE, nucleus envelope; NU, nucleolus; OC, oocyte; OG, oogonium; V, vacuole; VE, vitelline envelope; YG, yolk granule.

지방과립 및 미토콘드리아가 분포하였는데, 이는 민들조개, *Gomphina melanaegis* (Lee et al., 1999)와 유사하였다. 또한 본 연구 결과 성숙 난모세포의 세포질에서는 다량의 난황과립, 지방과립, 미토콘드리아 및 조면소포체가 관찰되었으며, 이러한 모습은 참가리비, *Patinopecten yessoensis* (Park, 1998)나 민들조개 (Lee et al., 1999)의 성숙 난모세포와 유사하였다. 그러나 세포질의 바깥쪽은 약 1.5 μm 의 비움모로 이루어진 난황막으로 둘러싸여 있어, 약 0.5 μm 의 민들조개 (Lee et al., 1999) 난황막보다 두꺼운 것으로 나타났다.

조개류의 정자는 정원세포, 정모세포, 정세포 그리고 정

자로의 변태과정을 거쳐 체외로 방출된다 (Hodgson and Bernard, 1986; Eckelbarger and Davis, 1996b; Kim and Yoo, 2000). 북방대합도 동일한 과정으로 발달하며, 조직학적으로 하나의 생식소관 내에 다양한 형태의 정자발달 단계가 관찰되는 것으로 알려져 있는데 (Lee et al., 1997), 이 연구에서도 같은 조직 내에 다양한 형태의 정자발달 단계가 관찰되었다.

참제첩, *Corbicular leana*의 정자는 타원형의 세포질내에 4 μm 전후의 등근핵을 가진 정원세포가 지름 2.5 μm 의 핵으로 응축된 정모세포를 거쳐 정세포로 발달하며, 이후 미토콘드리아와 첨체 및 꼬리가 형성되는 정자로의 변태과정

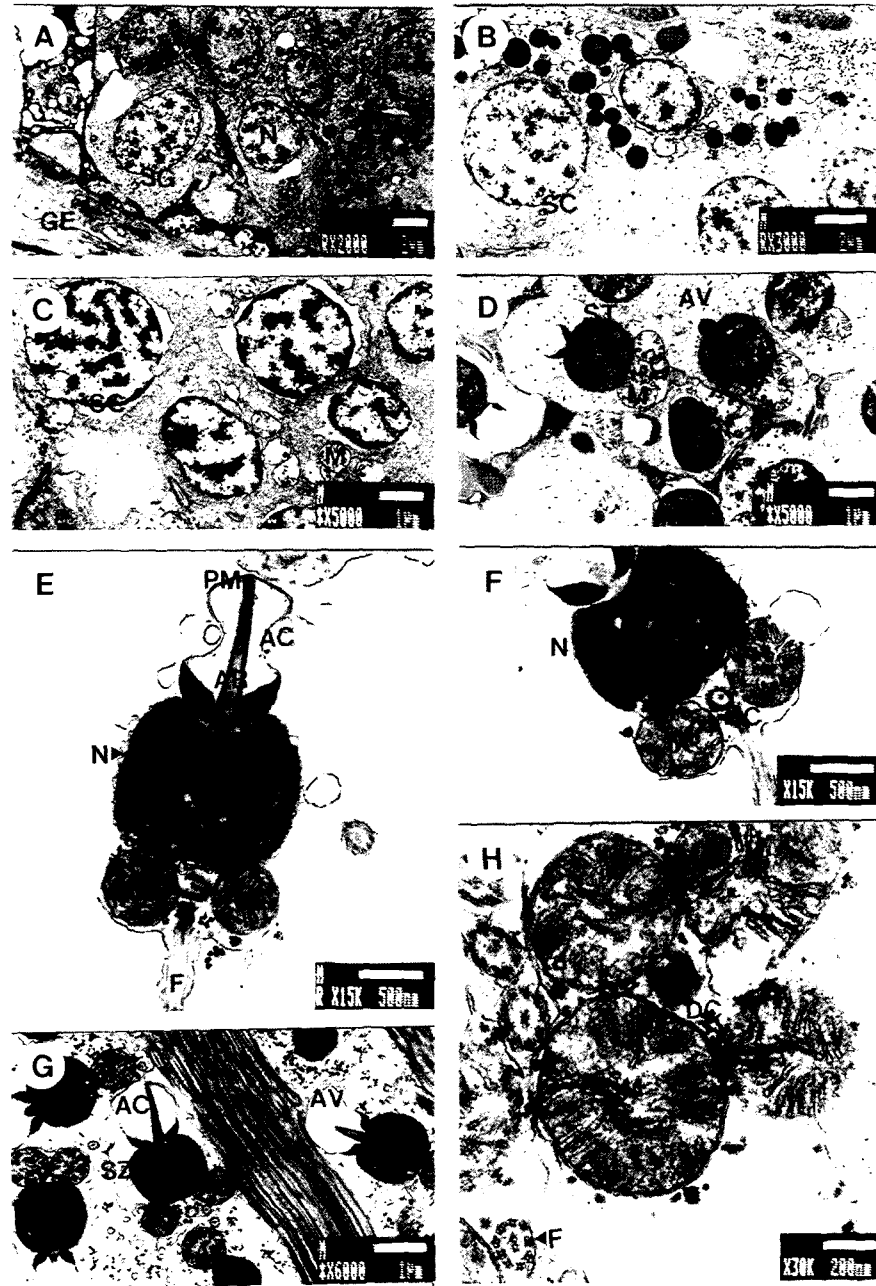


Fig. 2. Transmission electron micrographs of maturing spermatozoa of *Spisula sachalinensis*. A, section of spermatogonium; B and C, section of spermatocyte; D, section of spermatid; E, F and G, section of spermatozoa. AC, acrosome; AR, axial rod; AV, acrosomal vesicle; C, centrosome; DC, distal centriole; F, flagellum; GE, germinal epithelium; M, mitochondrion; N, nucleus; PC, proximal centriole; PM, plasma membrane; SC, spermatocyte; SG, spermatogonium; ST, spermatid; SZ, spermatozoon.

을 거친다 (Kim and Yoo, 2000). 이 연구에서 북방대합의 정자형성과정도 참새칩과 유사한 형태를 보임으로써 정자형성과정에는 차이가 없는 것으로 판단된다.

조개류의 정자 구조는 종의 진화와 관계 있으며, 분류학적 기준이 된다 (Popham, 1979). 또한 많은 연구자들이 조개류 정자에 있어서 미세구조의 차이를 분류적 목적으로

이용하였는데, Hughes (1965)는 정자형태에 따라 유대류의 계통 유연관계를 연구하였고, Franzen (1956)은 북조류의 계통 유연관계를 연구하였다.

일반적으로 조개류는 정자를 체외로 방출하여 수정하는 체외수정 종으로 (Franzen, 1977), 정자는 선단부에 모자 모양의 첨체를 가지고 있으며 중편부에는 4-5개의 미토콘

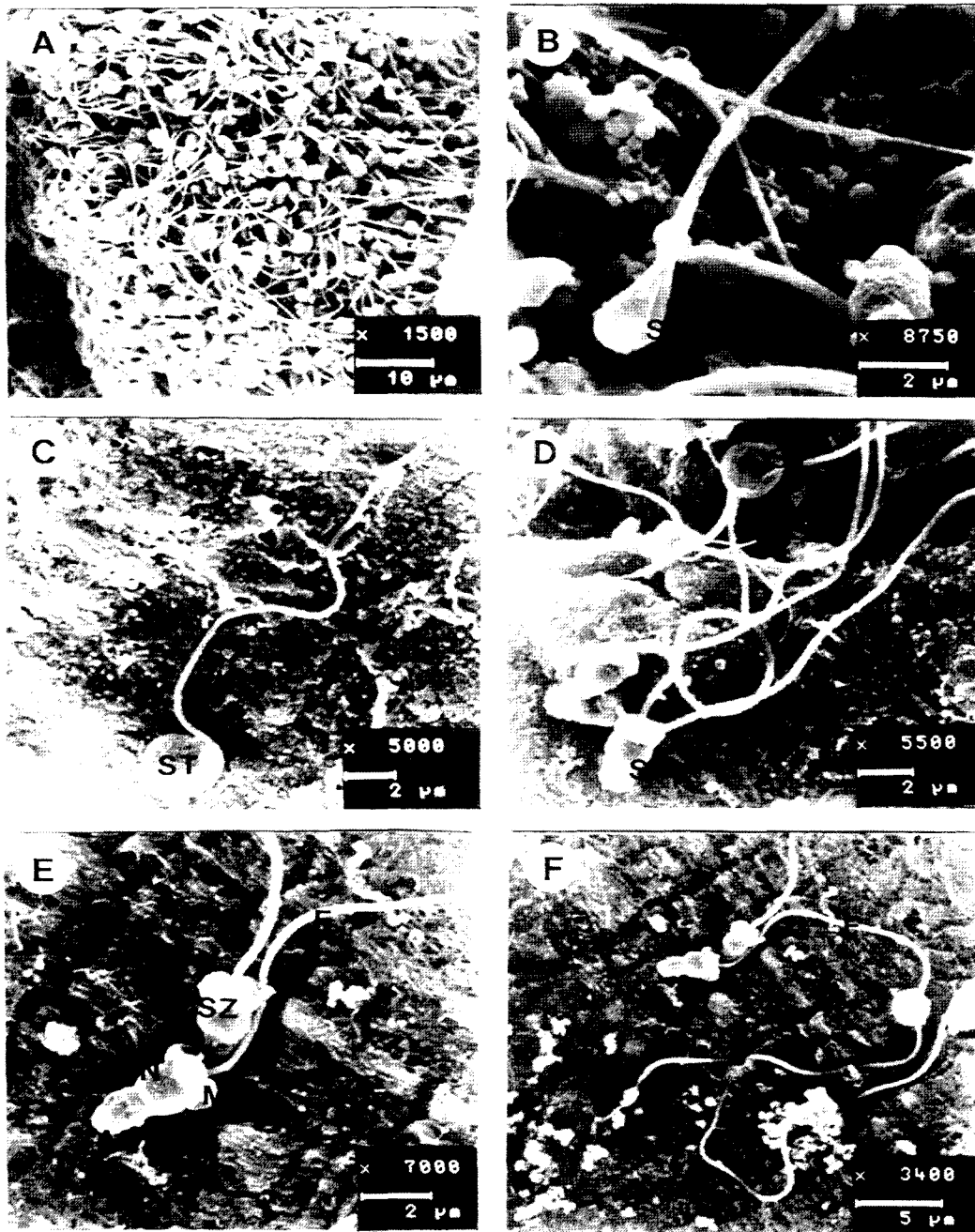


Fig. 3. Scanning electron micrographs of maturing sperm of *Spisula sachalinensis*. A, maturing spermatids in testicular tubule; B and C, spermatid; D, E and F, spermatozoon. AC, acrosome; F, flagellum; M, mitochondrion; N, nucleus; ST, spermatid; SZ, spermatozoon.

트리아를 가지고 있다 (Longo and Dornfield, 1967). 그러나 꼬리나 중편의 미세구조에서 약간의 차이보다는 핵의 모양, 특히 첨체의 모양에서 큰 차이를 보인다 (Popham, 1979).

북방대합 정자의 첨체는 화살모양의 첨체간이 첨체포로 싸여 있는 형태로 참가리비 (Park, 1998)나 민들조개 (Lee et al., 1999)의 첨체와는 차이를 보였으며, 핵질로 이루어

진 머리부분은 원형으로 원뿔형인 참가리비 (Park, 1998)나 민들조개 (Lee et al., 1999), 난원형인 진주담치, *Mytilus edulis* (Niijima and Dan, 1965)와는 차이를 보였다. 중편부에는 4개의 미토콘드리아를 가지고 있어 5개의 미토콘드리아를 가진 진주담치 (Niijima and Dan, 1965), 가무락, *Cyclina sinensis* (Chung et al., 1991) 및 버지니아굴, *Crassostrea virginica* (Eckelbarger and Davis, 1996)와는 차

이가 있었다. 그러나 전진운동을 위한 꼬리부는 다른 조개류와 같이 9+2의 전형적인 편모구조로 이루어져 있었다.

조개류 정자의 침체와 머리 형태는 난막에서의 차이로 나타나며, 정자의 침체 구조는 난모세포의 난막과 관련이 있다 (Hylander and Summers, 1977). 북방대합의 침체는 1.0 μm 의 침체간이 침체막으로 싸여 침체포를 형성하고 있어 1.5 μm 의 난황막으로 둘러싸여 있는 난자와 수정시 난막을 통과하기 쉬운 형태를 가지고 있었다. 참재첩은 약 3 μm 의 침체를 가지고 있으나 침체간은 관찰되지 않았으며 (Kim and Yoo, 2000), 버지니아굴에서는 침체간이 보고된 바 있다 (Daniels et al., 1973). Hylander and Summers (1977)는 *Chama macerophylla*와 *Spisula solidissima*의 정자에서 침체를 basal ring같은 전자밀도가 높은 부분과 침체의 중심부 및 전단부의 전자밀도가 낮은 두부분으로 구분하여 보고하였는데, 북방대합에서도 침체포 중심에 긴 원뿔모양으로 침체간이 형성되어 있었으며, 핵질과 인접한 지역에꽃받침 모양의 전자밀도가 높은 basal ring같은 구조가 관찰되었다.

이상과 같이 북방대합의 알과 정자는 수정을 위한 종특이적인 형태를 가지고 있으며, 특히 정자의 형태는 분류학적으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부에서 시행한 수산특정연구사업(과제번호 19980102)의 연구결과 일부이며, 연구비를 지원해 준 해양수산부에 감사드립니다.

참고 문헌

- Chung, E.Y., T.Y. Lee and C.M. An. 1991. Sexual maturation of the venus clam, *Cyclina sinensis*, on the west coast of Korea. J. Med. Appl. Malacol., 3, 125-136.
- Daniels, E.W., A.C. Longwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang. 1973. Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. Trans. Am. Microsc. Soc., 90, 275-282.
- Dorange, G. and M. le Penne. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. Mar. Biol., 103, 339-348.
- Eckelbarger K.J. and C.V. Davis. 1996a. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. Mar. Biol., 127, 79-87.
- Eckelbarger K.J. and C.V. Davis., 1996b. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. Mar. Biol., 127, 89-96.
- Eversole, A.G. 1989. Gametogenesis and spawning in North American clam populations: implications for culture, In: J.J. Manzi and W. Castagna, eds. Clam mariculture in North America. Elsevier, New York, pp. 75-108.
- Franzen, A. 1956. On spermiogenesis. Morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. Zool. Bidr. Upps., 31, 355-482.
- Franzen, A. 1977. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 123-128.
- Franzen, A. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete Res., 7, 199-214.
- Hodgson, A.N. and R.T.F. Bernard. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of *Mytilidae* (Mollusca, Bivalvia). Gamete Res., 15, 123-135.
- Hughes R.L. 1965. Comparative morphology of spermatozoa from the five marsupial families. Aust. J. Zool., 13, 533-534.
- Hylander, B.L. and R.G. Summers. 1977. An ultrastructural analysis of gametes and early fertilization in two bivalve molluscs, *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima*, with special reference to gametebinding. Cell Tiss. Res., 182, 469-489.
- Kim, J.H. and M.S. Yoo. 2000. Spermatogenesis and sperm morphology in marsh clams, *Corbicular leana* (Prime). J. Kor. Fish. Soc., 33, 171-175. (in Korean)
- Lee, J.Y., Y.J. Chang and C.S. Lee. 1997. Reproductive cycle of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Kor. Fish. Soc., 30, 132-138. (in Korean)
- Lee, J.Y., Y.J. Park and Y.J. Chang. 1999. Gonadal development reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (Bivalve; Veneridae). J. Kor. Fish. Soc., 32, 198-203. (in Korean)
- Longo, J.C and B.J. Dornfield. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. J. Ultrastruct. Res., 20, 462-480.
- Lubet, P., J.Y. Besnard, R. Faveris and R. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus*). Oceanis, 13, 265-290.
- Mackie, G.L. 1984. In: The Mollusca. Vol. 7 Reproduction. 5. Bivalves, Tompa, A.S., N.H. Verdonk and J.A.H. an Den Biggelaar, eds. Academic Press, London. pp. 351-418.
- Nijima, L. and J.C. Dan. 1965. The acrosome reaction in *Mytilus edulis*. 1. Fine structure of the intact acrosome. J. Cell Biol., 25, 243-248.
- Park, Y.J. 1998. Biological studies on aquaculture of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). Ph. D. Thesis, Cheju nat'l. Univ., 187 pp. (in Korean)
- Pipe, R.K. 1987. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis edulis*. Mar. Biol., 96, 519-528.
- Popham, J.D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. Malacol. Rev., 12, 1-20.

2002년 1월 21일 접수

2003년 3월 25일 수리