

## 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 정자의 미세구조

이 정 훈\*, 권 중 균<sup>1</sup>  
경남대학교 자연과학대학 자연과학부  
<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 전자현미경실

### Sperm Ultrastructure of *Bombina orientalis*

Jung-Hun Lee\* and Jung-Kyun Kwon<sup>1</sup>

Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Kyungnam University,  
Masan 631-701, Korea

<sup>1</sup>Electron Microscope Laboratory, College of Medicine, Hanyang University,  
Seoul 133-791, Korea

(Received November 16, 2005; Accepted December 13, 2005)

#### ABSTRACT

This study described the spermatozoa of the discoglossidae *Bombina orientalis* using light, scanning and transmission electron microscopes. Sperm head possess a crescent or leaf shape, with a moderately flexible head, and with a sharp anterior and posterior tips. The nucleus are a thick cone shaped in the widest middle part of nucleus, and a slender anterior and posterior of nuclear tips. The chromatin is not completely compact, but irregularly imbricated such as roof. Some nuclear lacunae, irregular in shape, are scattered within the nucleus. No neck and middle piece were developed. The flagellum is composed of 9+2 axoneme, axial rod and undulating membrane. The mitochondria were distributed only in cytoplasmic membrane around the nucleus. In particular, the nuclear rod contains bundles of fibers, the rod penetrating from anterior portion to the middle of the nucleus, is extended roughly two thirds of the nucleus such as eyelashes shaped.

**Key words** : Axial rod, Axoneme, *Bombina orientalis*, Nuclear rod, Undulating membrane

#### 서 론

양서강 무미류 정자의 대부분은 침체와 perforatorium, 미성숙한 경부에 ring 구조물, 그리고 파동막이라

불리는 얇은 세포질막과 axial rod를 보유한 편모를 가지고 있다 (Burgos & Fawcett, 1956; Pisano & Alder, 1968; Sandoz, 1974b; Furieri 1975; Rastogi et al., 1988; B ao et al., 1991; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996; Aguiar-Jr et al., 2003). 그림에도

본 연구는 2004년도 경남대학교 학술논문게재 연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

본 논문은 2005년 한국전자현미경학회 추계학술대회에 발표된 논문임.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jung-Hun Lee, Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea. Ph.: (055) 249-2243, FAX: (055) 224-6504, E-mail: jhlee@kyungnam.ac.kr

불구하고, 무미류 중에는 파동막을 가지고 있지 않고 (Delahoussaye, 1965; Fouquette & Delahoussaye, 1977; Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995; Garda et al., 2004), 오히려 잘 발달된 경부를 갖는 정자도 있다 (Sandoz, 1974b; Lee & Kwon, 1992; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995). 이러한 파동막의 존재는 생물 종들의 진화단계를 특징 지을 수 있는 중요한 증거로서 뿐만 아니라 종을 구별하는데도 중요한 key가 되며, 이러한 정자의 형태적 특징은 종의 유연관계를 밝히는데 매우 중요한 역할을 담당하리라 여겨진다. 또한 고등한 척추동물의 정자에서 어떤 형질들은 하등한 척추동물의 정자가 갖는 원시적인 특징을 여전히 보유하고 있는데, 이러한 형질은 체외수정과 체내수정을 행하는 생물종과의 관계를 모색하는데 많은 유익한 정보를 제공해 주리라 여겨진다.

앞서 기술한 많은 무미류 정자의 미세구조에 대한 연구 중에서 무당개구리과(Discoglossidae)의 *Discoglossus pictus* (Sandoz, 1974a, b), *Bombina variegata* (Furieri, 1975) 그리고 *Bombina orientalis* (Kwon & Lee, 1992; Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996)에 대한 정자구조를 투과전자현미경에 국한하여 제시된 바 perforatorium 위치 및 이에 대한 정확한 기재가 불분명하다. 따라서 본 연구에서는 무당개구리과(Discoglossidae)의 무당개구리(*Bombina orientalis*)에 대한 정자 형태를 광학 및 전자현미경(주사형과 투과형)을 이용하여 이들 구조를 재검토하고, 다른 무미류 종과 유미류 종과의 차이점을 알아보고자 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

본 연구의 사용된 무당개구리(*Bombina orientalis*)는 2004년 4, 5, 6월에 걸쳐 경남 무학산 만날재에서 수컷 10마리를 채집하여 사용하였다.

각 개체들은 채집 즉시 실험실로 운반하여 ether로 마취 한 후 즉시 정소를 적출하였다. 적출한 정소조직들은 미리 준비 해 둔 깨끗한 슬라이드 위에 정소조직을 올려놓은 다음 해부현미경(Model: SM-10) 하에서 핀셋으로 정소조직을 파쇄 하여 유출된 부유물질

을 슬라이드 상단에 도말하였다. 도말 후 10분정도 방치한 다음 즉시 3%-glutaraldehyde (4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 용액에 30~60분간 고정하였다. 고정이 끝난 후 슬라이드 상단의 상등액은 Millonig's Buffer(4°C, pH 7.4)로 1~2회 수세하였고, alcohol 농도 상승순서(70, 80, 90, 100%)로 탈수시킨 다음 광학현미경으로 정자의 구조를 관찰하였다. 광학현미경 사진 촬영이 끝난 프레파라트는 이온 증착기(Ion coater; Giko., IB-3)에서 금으로 3분 정도 코팅 한 다음 주사전자 현미경(ISI SX-40, FEG-SEM: S-4200)으로 각각 관찰하였다. 정자의 미세구조 관찰을 위하여 정소 조직들은 3%-glutaraldehyde (4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 수용액에 24시간 담가둔 후 동일한 완충액으로 수세한 다음 세절하였다. 세절 후 다시 3%-glutaraldehyde (4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 수용액으로 2시간 전 고정 하였고, 전 고정이 끝난 조직편 들은 완충액으로 2~3회 수세한 다음 1.33%-OsO<sub>4</sub>용액에 2시간 후 고정 하였다. 고정이 끝난 조직편 들은 다시 완충액으로 2~3회 수세 한 다음 알코올 농도 상승 순서로 탈수 하였고, 최종 propylene oxide로 치환한 다음 Epon 812로 포매하여 굳혔다. 포매가 끝난 조직편 들은 ultramicrotome (MT 6000; Sorvall, Dupont)을 이용하여 60~90 nm의 초박 절편을 얻어 uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 이중 염색하여 투과전자현미경(TEM: H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 무미류(Anuran)의 무당개구리과(Discoglossidae)에 속하는 무당개구리(*Bombina orientalis*)는 대부분 무미류의 특징을 가지고 있는 반면에 유미류의 특징도 일부 함께 가지고 있는 것으로 조사되었다.

### 1. 정자두부

본 연구에서 무당개구리의 정자두부 모양은 전 후방의 끝이 뾰족하고 다소 유연성을 갖는 초생달(crescent) 혹은 버들 잎(leaf) 모양의 특이한 구조를 취하고 있었다(Figs. 1, 2, 3). *Bombina variegata* 정자

의 핵은 곤봉상(Furieri, 1975), *Rana nigromaculata*, *R. dybowskii* 그리고 *R. rugosa* 3종의 정자핵은 양쪽 끝이 가늘고 뾰족한 원통형(Kwon & Lee, 1995), *Epipedobates flavopictus* 정자는 사상형(Garda et al., 2002) 그리고 *Bufo bufo gargarizans* 정자의 핵은 원통형이며, 염색질은 완전하게 농축되어져 있는 반면에(Kwon & Lee, 1995), 본 연구에서는 전·후방이 가늘고 핵의 중앙 부분이 다소 굵은 원뿔형(cone shaped)이었다(Figs. 1, 7). 염색질은 마치 널빤지 혹은 기와를 쌓아 놓은 듯한 구조로서 불규칙하게 횡으로 배열되어져 있었다(Figs. 1d, 4). 그리고 핵 내에는 불규칙한 형태의 nuclear lacunae들이 흩어져 있었고(Fig. 4b, c (arrowheads)), 이러한 구조는 Furieri (1975), Kwon과 Lee (1995) 및 Lee와 Kwon (1996) 등의 결과와 같았다. Dendrobatids *Epipedobates femoralis*와 *Colostethus* sp. 정자의 침체복합체는 원뿔형의 침체소포와 subacrosomal cone으로 구성되어져 있고, 두 개의 paraxonemal rod를 갖는 두 개의 편모는 하나의 mitochondrial collar에 의해 둘러 싸여져 있으며, 각각의 편모는 axial sheath에 의해 형성되어 있는 반면에 juxtapaxonemal fibers는 결여되어 있다는 점에서(Aguiar-Jr et al., 2003) 다른 무미류의 다른 종과 차이가 있다.

무미류 청개구리과 *Pseudis*속의 *Pseudis bolbodactyla*, *P. paradoxa*, *P. bolbodactyla*, 그리고 *P. tacantina* 정자의 침체소포는 핵 앞쪽의 전방부를 덮고 있으며, 형성한 섬유성의 아구조물을 가지고 있는 반면에, *Lysapsus laevis*는 subacrosomal cone은 매우 변형되어져 있고, 침체소포는 핵의 침단부위가 닫혀져 있다는 점에서 다소 차이를 보여주는데(Garda et al., 2004), 본 연구에서도 침체소포가 *Lysapsus laevis* (Garda et al., 2004) 정자와 마찬가지로 닫혀져 있었다(Fig. 4), *Epipedobates flavopictus* 침체소포는 원뿔형을, 그리고 subacrosomal cone은 침체소포와 핵 사이에 놓여져 있는 반면에 perforatorium은 존재하지 않은 점에서 *Epipedobates flavopictus*는 Ranoidea보다 Bufonoidea 내의 그룹에 속하다고 하였다(Garda et al., 2002)

한편 유미류의 *Hynobius nebulosus* (Picheral, 1979) 와 *H. leechii* (Kim et al., 1995)의 정자는 사상형으로 침체는 핵의 앞쪽으로 길게 신장되어 있고, 그 횡단면은 크로바 모양을 하고 있는데, Kim et al. (1995)들은

이러한 구조적 특징은 *Hynobius*에서 관찰되며 도롱뇽속의 특징으로 간주하였다. 대부분 유미류의 침체는 그 횡단면이 구형인데 반해 무미류는 고리형으로 유미류에 비해 작은 것으로 보고되었다(Lee & Jamieson, 1992; Kwon & Lee, 1993).

침체의 모양에 있어서, *Rana nigromaculata*, *R. dybowskii* 그리고 *R. rugosa* 정자(Kwon & Lee, 1995) 처럼 낱상의 구조를 취하고 있었으며, 이들 물질들은 균질하고 적당한 전자밀도를 가지고 있었는데, 이는 Furieri (1975), Kwon과 Lee (1995) 및 Lee와 Kwon (1996) 등과 동일한 결과를 나타내었다(Fig. 4),

Perforatorium의 구조물은 침체에서 핵 공간에 두모 형태를 취하는 구조물로서(Russel et al., 1986), 다수의 무미류(Burgos & Fawcett, 1956; Pisano & Adler, 1968; Reed & Stanley, 1972; Sandoz, 1974a, b; Furieri, 1975; Rastogi et al., 1988; Bao et al., 1991; Kwon & Lee, 1992; Lee & Jamieson, 1992, 1993; Lee & Kwon, 1992; Jamieson et al., 1993; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996)와 유미류(Baker, 1962, 1963; Baker & Biesele, 1967; Baker & Baker, 1970; Nicander, 1970; Kim et al., 1995; Lee & Kwon, 1996)에서 그것의 형태와 위치는 차이가 있음을 보여주고 있는데, *B. orientalis*의 섬유성 물질의 다발로 구성된 perforatorium은 핵의 침단에 내핵관(endonuclear canal)으로부터 빠져나와 있으며(Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996), 도롱뇽의 경우, subacrosomal space는 침체내막을 따라 주행하는 subacrosomal rod를 가지지만(Kim et al., 1995) 무당개구리는 subacrosomal rod를 가지고 있지 않다(Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996). 특히, 본 연구에서도 핵과 침체 사이의 이 구조물 나타나 있는데, 이는 Furieri (1975), Kwon과 Lee (1995) 그리고 Lee와 Kwon (1996) 등이 제시한 perforatorium 구조물과는 전혀 다른 유연성이 강한 섬유성 다발로 구성 되어져 있었다(Figs. 4, inset a, b, c, 5-9). 이 구조물은 *Bombina*와 *Alytes* (Furieri, 1975)의 경우와 마찬가지로 핵의 중간을 통과하며(Figs. 1-9, Text-fig. 1), 전방부는 끝이 잘린 듯한 원통형의 구조로서 후방부 쪽으로 갈수록 가늘어져서 마치 사람의 눈썹 털모양과 같은 형태를 취하며(Figs. 2, 3, 4), 핵과 마찬가지로 다소 유연성이 있음을 보여

주고 있다 (Figs. 2b, 3a, b). 이미 보고된 무당개구리의 정자구조 (Furieri, 1975; Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996)에서 제시된 핵과 침체사이의 구조물인 perforatorium은 척추동물에서 보여주는 perforatorium과 동일한 구조물이라기보다는 오히려 유연성이 강한 섬유성 구조물로서 Furieri (1975)가 제시한 구조물과 유사하며, 이 구조물이 핵내에 존재함으로 nuclear rod라고 보는 것이 타당하다고 여겨진다.

Ascapheids (Jamieson et al., 1993)와 discoglossids (Sandoz, 1974b; Furieri, 1975; Kwon & Lee, 1992)는 막대형으로 된 endonuclear perforatorium을 가지며, 그것은 유미류와 똑같은 특징을 보인다. *Hyla japonica* 정자의 perforatorium은 다른 무미류의 정자들에서 보여주는 미세섬유 대신에 미세소관으로 구성되어 있으며 (Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995), *Rana nigromaculata*, *R. dybowskii*, 그리고 *R. rugosa* 3종 모두는 perforatorium과 내핵관이 없다는 점에서 차이를 보이는데 (Kwon & Lee, 1995), Baccetti et al. (1980) 등은 액틴 섬유로 구성된 perforatorium은 침체반응이나 난 침투 시에 중요한 역할을 수행할 것으로 추측하였다.

뿔발상어류 정자는 나선형의 정자 두부가 직진운동에 대한 의미를 제공해 주는데, 즉 정자는 스크류 혹은 프로펠러와 유사한 방법으로 매질을 통과하여 전진하는데 이러한 연속적인 정자의 전진운동은 마치 긴 꼬리의 파상운동에 의해 정자의 전 후방으로 이동을 제공함으로써 정자의 회전운동을 제공해 주는데, 이러한 준다. 구조의 상관성과 운동성의 기능은 상당히 명확하다 (Stanley, 1971).

## 2. 정자 경부

정자 경부는 유미류에 있어서는 잘 발달되어 있지만 *Discolossus pictus* (Sandoz, 1974b)를 제외한 대부분의 무미류 정자들은 거의 발달되어 있지 않거나 단순화되어 있다는데, 본 연구에서도 정자 경부는 발달되어 있지 않았다. 유미류는 분류군에 따라 경부와 ring의 발달정도가 현저한 차이를 보이는데 진화된 분류군에서는 그 구조가 신장된 양상을 보이지만 (Baker & Beisele, 1967; Picheral, 1979) *Hynobius*를 포함한

하등한 분류군에서는 신장된 양상을 보이지 않는다 (Baker, 1962; Baker & Baker, 1970).

본 연구의 *B. orientalis*는 다른 무미류 정자에서와 마찬가지로 미성숙한 경부를 가지고 있었다는 점에서는 동일하나 무미류 정자 경부의 특징인 ring 구조물은 가지고 있지 않은 반면에 편모는 핵의 측면에 위치하며, axial rod의 전방 부분과 기부 중심체를 함유하고 있는데 (Fig. 9), 이러한 결과는 Kwon과 Lee (1995)에서도 같은 결과를 나타내었다.

## 3. 정자 꼬리

꼬리는 중요한 분류학적 특징을 나타내며, 무미류는 정자꼬리의 구조에 의해 3개의 그룹으로 나누어진다. 즉 축사, axial rod, 파동막으로 구성된 것 (Burgos & Fawcett, 1956; Baker, 1962, 1963; Baker & Beisele, 1967; Sandoz, 1974b; Furieri, 1975; Fouquette & Delahoussay, 1977; Rastogi et al., 1988; Báo et al., 1991; Kwon et al., 1993), 축사와 axial rod 만으로 구성된 것 (Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995) 그리고 단지 축사만을 보유한 정자이다 (Pisano & Adler, 1968; Poirier & Spink, 1971; Reed & Stanley, 1972; Garda et al., 2004). 그럼에도 불구하고, *Hyla japonica*는 축사, axial rod를 가지지만 파동막을 가지고 있지는 않다 (Lee & Kwon, 1992). Baker (1962)에 의하면, axial rod 기능은 supporting rod의 기능을 가진다고 하였다.

미토콘드리아는 대부분의 양서류에서 중편부에 분포하지만, 유미류의 *H. leechii* 정자는 핵 주위에 분포되어 있는데 이러한 양상은 하등한 유미류인 *Cryptobranchus*에서도 나타나는 것으로 보고되었다. 신장된 ring을 가진 다른 고등한 유미류의 정자에서는 미토콘드리아가 중편부에 배열되어 있어서 ring이 미토콘드리아의 분포에 영향을 주는 것으로 생각된다 (Kim et al., 1995). *Epipedobates flavopictus* 정자는 파동막 내에 존재하고 (Garda et al., 2002), *H. leechii* 정자는 protoplasmic bead 내에 존재하며, 그 위치는 핵과 연관이 있는 것으로 여겨지는 바 (Kim et al., 1995), 본 연구에서도 *Hynobius*와 *Cryptobranchus* 정자와 마찬가지로 미토콘드리아는 편모주위에 위치하지 않고 핵의 상단부를 둘러싸고 있는 cytoplasmic membrane

내에만 국한되어 존재하고 있었다(Figs. 4b, 7, 8, 10),

고등한 무미류의 경우, 축사를 둘러싸고 있는 미토콘드리아와 비교해 볼 때 axial rod에 인접한 미토콘드리아는 urodeles (Baker, 1962, 1963; Baker & Biesele, 1967), discoglossids (Sandoz, 1974b; Furieri, 1975; Kwon & Lee, 1992), myobatrachids (Lee & Jamieson, 1992) 그리고 caphids (Jamieson et al., 1993)에서 관찰되어 왔으며, cytoplasmic canal이 없는 미토콘드리아 초는 pipids에서 관찰되는 것으로 보고되었다(Reed & Stanley, 1972; Bernardini et al., 1986).

청개구리과 *Pseudis*속에 속하는 *Pseudis paradoxa*, *P. bolbodactyla*, *P. tacantins*, *P. minuta* 그리고 *Lysapsus laevis* 정자 모두는 축사의 외측 이중소관과 더불어 주변섬유를 가지고 있었다는 점에서는 동일하나, *P. minuta*는 핵 위쪽에 subacrosomal cone과 multilaminar structure를 가지는 반면에, *Pseudis paradoxa* group은 핵 위쪽에 granular material을 가지는 점에서 다소 차이를 나타내었고, *Lysapsus laevis*는 단지 subacrosomal cone의 잔여물만 가지고 있었다(Garda et al., 2004). 본 연구에서 주변섬유는 관찰되지 않았다.

본 연구에서 *H. leechii*와 *B. orientalis* (Lee & Kwon, 1996)과 마찬가지로 axial rod, 9+2 axoneme, 파동막을 가지고 있었는(Figs. 6, 7, 8, 10, Text-fig. 1), 이러한 관점에서 볼 때, 무미류 정자의 특징을 가지고 있는 반면에 유미류의 특징인 파동막을 가지고 있다는 점에서는 다소 차이를 나타내었다. 특히 본 연구에서는 다른 무미류 중에서 볼 수 없는 특이한 형태의 정자두부와 nuclear rod를 가지고 있다는 점에서 주목할 만하다.

## 참 고 문 헌

- Aguar Jr O, Garda AA, Lima AP, Colli GR, Bão SN, Recco Pimentel SM: Biflagellate spermatozoon of the poison dart frogs *Epipedobates femoralis* and *Colostethus* sp. (Anura, Dendrobatidae). J Morph 255 : 114-121, 2003.
- Baccetti B, Bigliardi E, Burrini AG: The morphogenesis of vertebrate perforatorium. J Ultrastr Res 71 : 272-287, 1980.
- Baker CL: Spermatozoa of Amphiumae; spermatelosis, helical motility and reversibility. J Tennessee Acad Sci 37 : 23-39, 1962.
- Baker CL: Spermatozoa and spermatelosis in *Cryptobranchus* and *Necturus*. J Tennessee Acad Sci 38 : 1-11, 1963.
- Baker KR, Baker CL: Urodele spermatelosis: A comparative electron microscope study. In: Baccetti B, ed, Comparative spermatology. pp. 81-87, New York Academic Press, 1970.
- Baker KR, Biesele JJ: Spermatelosis of a salamander *Amphiuma tridactylum* Cuvier. La cellule 67 : 91-118, 1967.
- Bão SN, Dalton GC, Oliveira SF: Spermiogenesis in *Odontoptrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. J Morphol 297 : 303-314, 1991.
- Bernardini G, Stipani R, Melone G: The ultrastructure of *Xenopus spermatozoon*. J Ultra Mol Struct Res 94 : 188-194, 1986.
- Burgos MH, Fawcett DW: An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenaum hensel*. J Biophysic Biochem Cytol 2 : 223-253, 1956.
- Dalahoussaye AJ: The comparative sperm morphology of the Louisiana Hylidae (Amphibia: Anura). Louisiana Acad Sci 29:140-152, 1965.
- Fouquette MJ, Delahoussaye AJ: sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, anura, Hylidae) and its bearing on genetic status. J Herpetol 11 : 387-398, 1977.
- Furieri P: The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). Monit Zool Ital 9 : 185-201, 1975.
- Garda AA, Colli GR, Aguiar Júnior O, Recco Pimentel SM, Bão SN: The ultrastructure of the spermatozoa *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on its evolutionary significance. Tissue & Cell 34 : 356-364, 2002.
- Garda AA, Costa GC, Colli GR, Bão SN: Spermatozoa of pseudinae (Amphibia, Anura, Hylidae), with a test of the hypothesis that sperm ultrastructure correlates with reproductive modes in anurans. J Morph 261 : 196-205, 2004.
- Jamieson BGM, Lee MSY, Long K: Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascaphus truei* (Ascaphidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic considerations. Herpetologica 49 : 52-65, 1993.
- Kim HH, Park WH, Lee YH: Ultrastructure of spermatozoa in urodeles, *Hynobius leechii* (Amphibia: Urodela). Korean J Electr Microsc 25 : 111-121, 1995.

- Kwon AS, Kim HJ, Lee YH: Fine structure of the neck of spermatozoa and spermiogenesis in *Bufo bufo gargarizans* (Amphibia, Anura). *Nature and Life* 23 : 95-105, 1993.
- Kwon AS, Lee YH: The fine structure of spermatozoa in *Bombina orientalis* (Anura, Amphibia). *Nature and Life* 22 : 15-22, 1992.
- Kwon AS, Lee YH: Comparative spermatology of anurans with special references to phylogeny. In: Jamieson BGM, Ausio J & Justine J L, ed, *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. pp. 321-332, *Mem Mus Nat Hist Nat*, 1995.
- Lee MSY, Jamieson BGM: The ultrastructure of the spermatozoa of three species of myobatrachid frogs (Anura: Amphibia) with phylogenetic considerations. *Acta Zoologica (Stockholm)* 73 : 213-222, 1992.
- Lee MSY, Jamieson BGM: The ultrastructure of the spermatozoa of bufonoid and hylid frogs (Anura: Amphibia): implication for phylogeny and fertilization biology. *Zoologica Scripta* 22 : 309-323, 1993.
- Lee YH, Kwon AS: Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). *Acta Zoologica* 73 : 49-55, 1992.
- Lee YH, Kwon AS: Ultrastructure of spermatozoa in urodela and primitive anura (Amphibia) with phylogenetic considerations. *Korean J System Zool* 12 : 253-264, 1996.
- Nicander L: Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In: baccetti B (ed) *Comparative spermatology*. pp. 47-56. Academic Press, New York, 1970.
- Picheral B: Structure of organisation du spermatozoide *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien, Urodele). *Arch Biol* 78 : 193-221, 1979.
- Pisano A, Adler R: Submicroscopical aspects of *Telmatobius hauthali schreiteri* spermatids. *Zeitschrift fur Zellforschung* 87 : 345-349, 1968.
- Poirier GR, Spink GC: The ultrastructure of testicular spermatozoa in two species of *Rana*. *J Ultras Res* 36 : 455-465, 1971.
- Rastogi RK, Bagnara JT, Iela L, Krasovich MA: Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pacymedusa dacnicolar*. IV. Spermatogenesis; a light and ultrasonic study. *J Morph* 197 : 277-302, 1988.
- Reed SC, Stanley HP: Fine structure of spermatogenesis in the South African clawed toad *Xenopus laevis* Daudin. *J Ultras Res* 41 : 277-295, 1972.
- Russell LD, Weber JE, Vigl AW: Characterization of filament within the subacrosomal space of rat spermatids during spermiogenesis. *Tissue Cell* 18 : 887-898, 1986.
- Sandoz D: Modifications in the nuclear envelope during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anura, Amphibia). *J Submicr Cytol* 6 : 399-419, 1974a.
- Sandoz D: Development of the neck region and the ring during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anura, Amphibia). In: Afzelius BA, ed, *The functional anatomy of the spermatozoon*. pp. 237-247, Oxford, Pergamon Press, 1974b.
- Stanley HP: Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi*: II. Late stages of differentiation and structure of the mature spermatozoon. *J Ultrastr Res* 36 : 103-118, 1971.

#### < 국문초록 >

본 연구는 무당개구리과(Discoglossidae)의 무당개구리(*Bombina orientalis*) 정자의 형태적 특징을 광학현미경과 주사 및 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 정자두부는 전 후방의 끝이 뾰족하고 다소 유연성을 갖는 초생달 혹은 버들 잎 모양의 특이한 구조를 취하고 있었다. 핵은 전·후방이 가늘고, 중앙 부분은 굵은 원뿔형이었다. 염색질은 완전하게 농축되어 있지 않고, 마치 널빤지를 겹쳐 놓은 듯한 지붕모양과 같은 형태로 불규칙하게 배열되어 있었다. 핵 내에는 불규칙한 형태의 nuclear lacunae들이 흩어져 있었다. 정자경부와 중편부는 발달 되어 있지 않았다. 편모는 9+2 구조의 axoneme, axial rod 그리고 undulating membrane을 가지고 있었다. 미토콘드리아들은 핵의 상단부를 둘러싸고 있는 protoplasmic bead내에만 극한되어 존재하고 있었다. 특히, 본 연구에서 핵의 전방부에서 중앙 부위로 주행하는 nuclear rod는 섬유성 다발로 구성되었으며, 마치 사람의 속눈썹 모양과 같은 형태를 취하며, 핵의 2/3까지 뻗쳐져 있었다.

## FUGURE LEGENDS

- Fig. 1 (a–d).** Light and scanning electron micrographs showing mature spermatozoa of *Bombina orientalis*. Sperm head possess a crescent or leaf shape (inset a, b, c), with a moderately flexible head, and with a sharp anterior and posterior tips. The nucleus are a thick cone shaped in the widest middle part of nucleus, with a sharply anterior and posterior of tips. Note projected nuclear rod (inset c, d). Ar, axial rod; N, nucleus; Nr, nuclear rod; Um, undulating membrane. 1a: light microscope; 1b–d: scanning electron microscope.
- Figs. 2–3.** Scanning electron micrographs of the dorsal (2a, b) and ventral (3a, b) views showing the nucleus, nuclear rod, axial rod and undulating membrane. (Figs. 2a, 3a and 3b): These sample were smeared on slide glasses at room temperature for 5 min., and washed in 0.1 M Milloing's buffer (pH 7.4). They were then fixed in 3% glutaraldehyde (0.1 M Milloing's buffer, pH 7.4) and dehydrated in a graded series of ethanol for 10 min., respectively. (Fig. 2b): This sample was smeared on slide glass at room temperature for 10 min., and washed in 0.1 M Milloing's buffer (pH 7.4), then fixed in 3% glutaraldehyde (0.1 M Milloing's buffer, pH 7.4), and dehydrated in a graded series of ethanol for 10 min. The nuclear rod (Nr) penetrates from anterior to the middle of the nucleus (N), which is extends roughly two-thirds of the nucleus such as eyelashes shape. Note collapsed nucleus (Fig. 2a), and axial rod adjacent at nuclear rod (Fig. 3a, b). Ar, axial rod; Cn, collapsed nucleus; N, nucleus; Nr, nuclear rod; Um, undulating membrane.
- Fig. 4.** Logitudinal (Fig. 4) and parasagittal sections (inset a–c) of the anterior sperm head, showing the nuclear rod and the axial rod in *Bombina orientalis* spermatozoa. The nucleus are a thick cone shaped in the widest middle part of nucleus, and a slender anterior and posterior of nuclear tips (Fig. 4). The chromatin is not completely compact, but irregularly imbricated such as roof (Fig. 4). Some nuclear lacunae (arrowheads; inset b, c), irregular in shape, are scattered within the nucleus. The nuclear rod penetrates anterior portion of the nucleus to the middle of the nucleus. Note the nuclear rod consists of bundles of fibers (Fig. 4, inset b, c). A, acrosome; Am, acrosomal membrane; Ar, axial rod; Cm, cytoplasmic membrane; Cv, clear vacuole; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Nr, nuclear rod; Um, undulating membrane. ◁, nuclear lacunae.
- Figs. 5–8.** Cross sections of the anterior and posterior of the sperm head in *B. orientalis*. The nucleus (N) was surrounded by the cytoplasmic membrane (Figs. 5–8). The nuclear rod (Nr) penetrates middle of the nucleus. The chromatin is not completely compact, but irregular arranged in the nucleus. The nuclear lacunae (arrowheads), irregular in shape, are scattered within the nucleus. The flagellum is composed of 9 + 2 axoneme (Ax), axial rod (Ar) and undulating membrane (Um). The mitochondria (M) distributed only in cytoplasmic membrane (Cm) around the nucleus. A, acrosome; Cm, cytoplasmic membrane; Nm, nuclear membrane.
- Fig. 9.** Parasagittal section of the sperm head of *B. orientalis*. Immatured neck contains only an anterior portion of the axial rod (Ar) and proximal centriole (Pc). Cm, cytoplasmic membrane; Cv, clear vacuole; N, nucleus; Nr, nuclear rod; Um, undulating membrane. Cm, cytoplasmic membrane; N, nucleus; Nr, nuclear rod.
- Fig. 10.** Cross section of the tip of posterior of the sperm head. Note the nucleus and nuclear rod was not observed. Ar, axial rod; Ax, axoneme; Cm, cytoplasmic membrane; M, mitochondria; Um, undulating membrane.
- Text–fig. 1.** Diagrammatic representation of horizontal sections of the sperm in *Bombina orientalis* based on scanning and transmission electron microscopy (such as Fig. 1c, Figs. 6, 8). a–a, Section passing through the separated head. Sperm head possess a crescent or leaf shape, with a moderately flexible head, and with a sharp anterior and posterior tips. The nuclear rod penetrating from anterior to the middle of the nucleus, is extended roughly two-thirds of the nucleus such as eyelashes shape (a). The chromatin is not completely compact, but irregularly arranged in the nucleus. Some nuclear lacunae, irregular in shape, are scattered within the nucleus. Numerous mitochondria and some cell organelles were distributed only in cytoplasmic membrane around the nucleus. The flagellum is composed of 9 + 2 axoneme, axial rod and undulating membrane (b). Note the nuclear rod had a globular shaped but the axial rod had trifoliate shaped in cross sections, respectively. Ar, axial rod; Ax, axoneme; Cm, cytoplasmic membrane; M, mitochondria; N, nucleus; Nm, nuclear membrane; Nr, nuclear rod; Um, undulating membrane. ◁, nuclear lacunae.













