

경골어류 황어아과 버들치의 난자형성과정

김동희, 장병수¹, 정한석², 등영건, 김 석³, 이규재*

연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실, 기초의학연구소, ³중앙연구소
¹한서대학교 보건학부 피부미용학과, ²건강증진대학원 수안재활복지학과

The Oogenesis of Chinese minnow, Leuciscinae, Teleostei

Dong-Heui Kim, Byung-Soo Chang¹, Han-Suk Jung²,
Yung-Chien Teng, Seok Kim³ and Kyu-Jae Lee*

Department of Environmental Medical Biology, Institute of Basic Medical Science, and
³Central Research Laboratory, Wonju College of Medicine, Yonsei University,
Wonju, Gangwon 220-701, Korea

¹Department of Cosmetology and ²Department of Chiropractic Rehabilitation,
Graduate School of Health Promotion, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

(Received July 13, 2009; Accepted September 23, 2009)

ABSTRACT

Chinese minnow, *Rhynchocypris oxycephalus* is a teleost belonging to Leuciscinae, Cyprinidae. The oogenesis and ultrastructure of egg envelope in Chinese minnow were investigated by light and electron microscopes.

The ovary was of white yellowish and ellipsoidal shape with the major axis 30mm and the minor axis 7mm. Cytoplasm of oogonia was basophilic and many nucleoli were located at inside of nuclear membrane. In primary oocytes, yolk vesicles were distributed only in the marginal area and egg envelope was not formed on the outside of an egg. In secondary oocytes, the egg envelope was formed and yolk vesicles in the cytoplasm were increased than the earlier stage. The basophilic substance of cytoplasm was changed to acidic. In case of matured egg, thickness of egg envelope and size of egg were increased. The yolk vesicles were changed to yolk mass in accordance with development. The outer surface of egg envelope was covered by microvilli-structures, and had a micropyle on the area of animal pole. Egg envelope consisted with 2 layers, an adhesive outer layer with microvilli-structures and fibrillar inner layer.

In conclusion, the oogenesis of Chinese minnow was characterized by the increase in cell size, the formation and accumulation of yolk, and the decrease of basophilic substance in the cytoplasm. The oogenesis of Chinese minnow seems to share common patterns in Cyprinidae, but these ultrastructural unique characters of egg envelope can be utilized in taxonomy of teleost.

Keywords : Chinese minnow, Oogenesis, Leuciscinae, Egg envelope

서 론

버들치(*Rhynchocypris oxycephalus*)는 잉어목(Cyprinifor-

mes), 잉어과(Cyprinidae), 황어아과(Leuciscinae)에 속하는 담수산 경골어류로 중국북부, 한국, 일본의 중남부에 분포하며 주로 산간 계류의 차가운 물, 강 상류에서 수서곤충이나 갑각류, 실지렁이 및 부착 조류를 먹고 산다. 산란기는 4월

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, 162, Ilsan-dong, Wonju, Gangwon-do 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, Fax: (033) 731-6953, E-mail: medbio@yonsei.ac.kr

중순에서 5월 중순으로 알려져 있다(Kim & Park, 2002).

어류의 난자형성과정은 수온, 광주기, 광도, 수질 등 환경 요인에 의해 결정되는데 이중 온도상승과 광량의 증가가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hatakeyama & Akiyama, 2007). 어류의 난자형성과정은 난소에서 이루어지며 난소는 한 쌍으로 체강상부의 좌우에 위치하며 난자형성 과정은 다수의 인(nucleolus)의 형성, lampbrush 염색체의 발달, 핵 내의 inclusion body의 발달, 난황을 포함한 다양한 형태의 소기관 축적 및 난막의 형성 등을 포함한 다양한 과정을 통하여 이루어진다(Guraya, 1986). 난원세포(oogonia)는 체세포 분열을 통하여 제1난모세포가 되며 제1난모세포는 난황이 없고 난황포(yolk vesicle)가 세포질 가장자리에서 형성되어 다당류를 축적하는 것으로 알려져 있으며(Lee et al., 1985), 제2감수분열과정 중에 난막 외층의 여포세포에서 합성된 물질이 미세용모를 통하여 세포질 안으로 들어오는 난황형성과정(vitellogenesis)이 이루어지고 후에 성숙란이 형성된 후 세포분열은 멈추고 산란 단계에 이르게 된다. 어류의 난자형성과정은 열대지역에 서식하는 경우 항상 이루어지고 있으나(Lee et al., 2008) 온대지역에 서식하는 경우 산란 직후 여름에 퇴행기로 들어가며 난자형성과정은 늦가을부터 시작하여 산란기인 봄에 절정을 이룬다(Singh et al., 2005). 경골어류의 난자에 대한 연구는 주로 수정란 난막의 미세구조에 대하여 이루어져 왔으며 과(Family) 또는 종(Species)에 따라 수정란 난막의 미세구조가 서로 달라종을 구별하는 분류학적 형질로 이용이 가능하다(Kim et al., 2002, 2005).

경골어류의 난자형성과정은 실험실 내에서 어류의 양어, 암수구별 및 산란이 매우 어렵기 때문에 양어 및 산란이 쉬운 몇몇 어종 또는 식용어류에서 집중적으로 연구되어 있는 실정이다. 특히 국내에 서식하는 어류의 난자형성과정은 피라미와 참붕어의 경우 밝혀져 있으며(Jang et al., 1995; Kim et al., 2007) 그 외의 어종은 많이 연구되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 국내의 하천에서 흔히 발견되는 버들치의 난자형성과정을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰함으로써 다른 종과의 차이점을 확인하고 이 종만이 가지는 수정란 난자의 난막 표면 및 내부구조와 난문의 유무를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

2009년 4월과 5월 사이에 강원도 원주시 흥업면 매지리 182번지 하천에서 채집하여 번식기에 들어간 포란된 암컷을 선별하여 실험재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 난소의 적출 및 조직처리

성숙한 버들치의 암컷을 해부하여 난소의 외부형태를 관찰하고 난소를 적출하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 10% formaldehyde로 4°C에서 24시간 고정된 후 흐르는 물로 12시간 세척하고 ethanol 농도 상승 순으로 탈수한 다음 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μm 두께로 자른 후 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 발생분화시기에 따른 난자형성과정을 관찰하였다.

2) 성숙란 채취

산란 직전의 포란된 암컷의 복부를 손가락으로 압력을 가하여 난소로부터 빠져나온 성숙란을 실험에 사용하였다.

3) 전자현미경 시료처리

성숙란 난막의 단면구조를 확인하기 위하여 난막을 분리하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 4시간 전고정한 후 동일 완충액으로 세척하여 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 후고정하였다. 동일 완충액으로 30분씩 3회 세척하고 ethanol 농도 상승 순으로 탈수시켜 propylene oxide로 치환하였다. 포매는 Epon 혼합액을 사용하였고 포매된 조직은 50~60 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고 1200EXII형 투과전자현미경(JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 주사전자현미경 시료의 경우 투과전자현미경의 경우와 같은 방법으로 고정한 후 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후 JFC 1100형 ion coater에서 20 nm의 두께로 금도금하였고 탁상용주사전자현미경(TM-1000, HITACHI, Japan)으로 성숙란 난막의 표면구조와 난문의 유무를 관찰하였다.

결과 및 고찰

버들치(*Rhynchocypris oxycephalus*)의 난소는 한 쌍으로 흐린 황색의 장타원형(장축 30 mm, 단축 7 mm)이었으며 부레와 창자 사이에 위치하고 있었다(Fig. 1). 난소 내에는 난원세포, 제1난모세포, 제2난모세포 및 난세포 등 다양한 분화단계의 생식세포들이 분포하고 있었다. 난원세포의 세포질은 hematoxylin으로 매우 강하게 파란색으로 염색되었고 핵막을 따라서 여러 개의 인들이 분포하고 있었다(Fig. 2). 발달함에 따라서 난원세포의 세포질은 난황이 만들어지기 시작하면서 일부 흐린 적색을 띠기 시작하였고 핵막 주위에는 띠 형태로 여전히 파란색을 띠고 있었다(Fig. 3). 초기시기의 제1난모세포는 난세포 세포질의 가장자리에 국한적으

로 난황포(yolk vesicle)들이 형성되기 시작하였으며 난막은 형성되기 시작하였으나 매우 얇게 관찰되었고 인은 파란색으로 관찰되어 쉽게 구별되었다. 핵 주변부에는 난황포가 관찰되지 않았고 난원세포에서 관찰되었던 짙은 파란색의 세포질은 흐려졌다(Fig. 4). 제1난모세포가 발달함에 따라서 난황포는 바깥 가장자리에서 안쪽으로 증식되어 증가하였고 난황포의 크기는 난막가장자리가 중앙부위보다 컸다. 난막은 eosin에 의해 염색되어 분홍색을 띠었고 난막 바깥쪽은 짙은 푸른색의 여포상피(follicular epithelium)로 싸여 있었다. 그러나 핵의 주변부는 아직 푸른색을 띠고 있었다(Fig. 5). 제2난모세포는 세포질이 전체적으로 호산성이었으며 난황포가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6). 성숙한 난자는 난자의 크기가 상당히 커졌으며 난막이 뚜렷하고 핵은 호산성을 띠었다. 또한 난황포는 더욱 발달하여 적색으로 염색된 구형의 난황괴(yolk mass)를 이루고 있었다(Fig. 7). 성숙난의 난막의 바깥쪽은 섬모가 배열된 것 같은 형태를 하고 있었다(Fig. 8).

난막 바깥쪽에 돌기구조물이 없는 것을 제외하면 잉어과(Cyprinidae)에 속하는 참붕어와 피라미, 카라신과(Characidae)에 속하는 glow-light tetra의 난자형성과정(Jang et al., 1995; Kim et al., 2007; Lee et al., 2008)과 매우 유사하였고 전체적인 난자형성과정은 과(Family)가 다르다고 하더라도 경골어류의 공통적인 특성으로 생각된다. 그러나 같은 속(Genus)에 속하는 9종의 난자형성과정에 대한 연구에 따르면 수환경 조건은 동일하지만 종간 난자형성과정은 서로 다른 것으로 보고된 바 있다(Motta et al., 2005). 따라서 과 수준 이하의 동일 속 수준에서의 연구도 이루어져야 할 것으로 생각한다.

난소 속에 분포하는 성숙난의 경우 주사전자현미경으로 관찰한 결과 여포상피에 싸여 거친 면을 보였으며(Fig. 9) 복부에 압력을 가하여 채취한 배란된 성숙난의 난막표면은 말미잘의 촉수 또는 포유류의 작은창자 내면에 분포하는 미세용모와 같은 형태를 하고 있었다(Fig. 10). 부착성의 수정란은 미세용모와 같은 구조물이 집착성이 있기 때문인 것으로 생각된다. 시클리드과(Cichlidae)의 수정란은 버들치와 마찬가지로 부착성 구조물을 가지고 있으나 형태는 그물형태로 완전히 다른 형태이며, 같은 시클리드과라고 하더라도 종에 따라서 부착성 구조물은 형태학적으로 서로 다른 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1993; Deung et al., 1997). 그러나 난막에 구조물이 존재하더라도 잉어과(Cyprinidae)의 zebrafish와 leopard danio의 경우에서처럼 비부착성인 경우도 있다(Kim et al., 1993, 1998). 또한 난소 내에 있던 성숙란과 압력을 가하여 얻은 성숙난의 난막은 여포상피의 유무 이외에 다른 형태학적 차이는 관찰할 수 없었다. 따라서 수정란의 미세구조를 분류형질로 이용할 경우 수정란은 매우 얻기 어렵기 때문에 복부에 압력을 가하여 얻은 완전

히 성숙한 무수정란의 미세구조를 이용할 수도 있을 것으로 사료된다.

수정란의 동물극 쪽에서 깔때기 형태의 난문을 관찰할 수 있었으며 난문형태를 이루기 위한 함몰된 부위의 난막도 다른 난막 부위의 표면과 같은 형태를 하고 있었다(Fig. 11). 난문의 존재는 다른 경골어류의 정자에서처럼 두부에 침체가 없을 것으로 생각되며 침체의 유무에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 난막을 수직절단하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과 모두 2층으로 미세용모 형태를 하고 있는 부착성 외층과 섬유상 띠가 위아래 각각 한 줄로 배열되어 있고 그 안에 섬유상 구조물과 전자밀도 약간 낮은 균일한 성분으로 구성된 내층으로 구성되어 있었다. 미세용모 형태의 부분은 전자밀도가 균일하여 다른 구조는 찾을 수 없었다(Fig. 12). 그러나 형태학적으로 내막과 난황막의 경계가 뚜렷하지 않아서 추가적인 연구가 더 필요하다.

이상과 같이 버들치의 난자형성과정은 난세포의 크기증가, 난황낭의 축적, 염기성 물질이 산성으로 전환, 난막 발달로 요약될 수 있으며 일반적인 다른 과의 담수경골어류와 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다. 그러나 난막의 미세구조적 표면 및 단면 구조는 이 종만이 가지는 종특이성이므로 분류학적 형질로 사용될 수 있으며 황어아과에 속하는 다른 어종이나 속(Genus) 이하의 어류에 대한 연구를 실시하여 비교평가해 볼 필요성이 있다. 지금까지 연구된 난자형성과정과 난막의 구조에 대한 연구는 주로 연 중 번식이 가능한 열대지역에 서식하는 어류에서 많이 이루어져 왔다. 그러나 국내에 서식하는 어류의 경우 1년 동안 조사를 해야 하기 때문에 채집과 실험에 많은 어려움이 있다. 따라서 국내어류에 대한 난자형성과정과 수정란의 형태, 난막의 미세구조에 대한 연구들이 많이 이루어지지 않고 있어 앞으로 분류체계에 따른 연구조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Deung YK, Reu DS, Kim DH: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convic cichlid and discus, Cichlidae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 27(4) : 417-432, 1997. (Korean)
- Guraya SS: Monographs in developmental biology, The cell and molecular biology of fish oogenesis. Karger 18 : 111-147, 1986.
- Hatakeyama R, Akiyama N: Annual reproductive cycle of a bitterling, *Tanakia tanago*, reared in an outdoor tank. Zoolog Sci 24(6) : 614-622, 2007.
- Jang SJ, Kim DH, Reu DS, Deung YK: A study on the oogenesis of *Pale chub (Zacco platypus)*. Korean J Electron Microscopy 25(3) : 63-74, 1995. (Korean)
- Kim DH, Lee KJ, Kim S, Deung YK: A study on the oogenesis of

- False dace (*Pseudorasbora parva*). Korean J Electron Microscopy 37(2) : 65-72, 2007. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Comparative ultrastructure of the fertilized egg envelope in three species, Cyprinidae, teleost. Korean J Electron Microscopy 28(2) : 237-253, 1998. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from dark sleeper, Eleotrididae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 32(1) : 39-44, 2002. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from *Hyphessobrycon serpae*, Characidae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 35(2) : 89-96, 2005. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Kim WJ, Deung YK: A comparative study on the ultrastructures of the egg envelope in fertilized eggs of angelfish (*Pterophyllum eimekei*) and zebrafish (*Brachydanio rerio*). Korean J Electron Microscopy 23(3) : 115-128, 1993. (Korean)
- Kim IS, Park JY: Freshwater fishes of Korea, Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul, p. 166, 2002. (Korean)
- Lee KJ, Chang BS, Teng YC, Kim DH: The oogenesis of Glowlight Tetra, Characidae, Teleost. Korean J Microscopy 38(4) : 315-319, 2008. (Korean)
- Lee TY, Kang YJ, Lee BD: Reproduction and population dynamics of marbled sole *Linmanda yokohamae*, 1. Reproduction. Bull Korean Fish Soc 18(3) : 253-261, 1985. (Korean)
- Motta CM, Capriglione T, Frezza V, Simoniello P, Tammara S, Filosa S: Oogenesis at subzero temperatures: a comparative study of the oocyte morphology in nine species of Notothenioids. Tissue Cell 37(3) : 233-240, 2005.

Singh AK, Kumar A, Singh JJ, Ram RN: Seasonal ovarian cycle in freshwater teleost, *Labeo rohita* (Ham.) in Tarai region of Uttaranchal. J Environ Biol 26(3) : 557-565, 2005.

< 국문초록 >

담수산 잉어과(Cyprinidae), 황어아과(Leuciscinae)에 속하는 버들치(Chinese minnow; *Rhynchocypris oxycephalus*)의 난자형성과정과 성숙난 난막의 미세구조를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

난원세포의 세포질은 호염기성이었고 핵 내에 다수의 인들이 분포하고 있었다. 제1난모세포의 경우 난황포가 단지 난세포 가장자리에만 배열되어 있었고 난막의 형성은 관찰되지 않았다. 제2난모세포에서는 난막이 형성되었고 제1난모세포에 비해서 난황포가 점점 핵 쪽으로 증식된 경향을 보였다. 발생이 진행됨에 따라서 호염기성 물질들은 점점 감소하는 경향을 보였고 후에 난막 주위에만 국한적으로 분포하였으며, 난막의 두께와 난자의 크기는 점점 증가되었다. 배란된 성숙난 난막의 표면은 미세용모와 같은 구조물들에 의하여 덮혀 있었고 동물극 쪽에 깔때기 형태의 난문이 발견되었다. 난막의 단면을 확인한 결과 부착성 외층과 섬유상 내층 모두 2층으로 구성되어 있었다.

이상과 같이 버들치의 난자형성과정은 난세포의 크기 증가, 난황양의 축적, 염기성 물질의 감소, 난막 발달 및 두께의 증가로 요약될 수 있으며 이 패턴은 잉어과의 공통적인 특징으로 생각된다. 그러나 배란된 성숙난 난막의 미세구조적 특징들은 이 종만이 가지는 독특이성으로 종을 분류하는 데 이용될 수 있다.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. The photograph of ovary (O) in Chinese minnow.

Fig. 2. A light micrograph of an oogonium in ovary ($\times 400$). N, Nucleus; C, Cytoplasm; Arrow, Nucleolus. The cytoplasm was basophilic.

Fig. 3. A light micrograph of an oogonium in ovary ($\times 400$). The color of cytoplasm is changing from basophilic to acidic. N, Nucleus.

Fig. 4. Primary oocyte ($\times 400$). N, Nucleus; Yv, Yolk vesicle. Egg envelope was not developed on egg outside. Yolk vesicle was distributed in marginal area only.

Fig. 5. Secondary oocyte in early stage ($\times 200$). N, Nucleus; Yv, Yolk vesicle.

Fig. 6. Secondary oocyte ($\times 200$). The yolk vesicle was increased than that of early stage, and egg envelope was more thicker. Yv, Yolk vesicle; Arrow, Follicular epithelium.

Fig. 7. A light micrograph of matured egg ($\times 200$). Ym, Yolk mass.

Fig. 8. A matured egg ($\times 200$). Arrow, Microvilli-like structure on the outside of egg envelope.

Fig. 9. A scanning electron micrograph of outer surface of matured egg in ovary (Scale bar= $6\mu\text{m}$). Microvilli-structure was covered by follicle epithelium (Fe).

Fig. 10. A scanning electron micrograph of outer surface in ovulated egg envelope (Scale bar= $4\mu\text{m}$).

Fig. 11. A scanning electron micrograph of micropyle (Scale bar= $20\mu\text{m}$). Note the micropyle (arrow).

Fig. 12. A transmission electron micrograph of ovulated egg envelope (Scale bar= $1\mu\text{m}$). The egg envelope consisted of 2 layers, an adhesive outer layer (OL) with microvilli-structures and fibrillar inner layer (IL).





