

경골어류 황어아과 버들치의 정자형성과정

김동희, 장병수¹, 김완중², 이명선³, 등영건, 김 석⁴, 이규재*
연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실, 기초의학연구소, ⁴중앙연구소
¹한서대학교 보건학부 피부미용학과, ²순천향대학교 자연과학대학 생명과학과,
³청주대학교 이공대학 유전공학과

The Spermatogenesis of Chinese minnow, Leuciscinae, Teleostei

Dong-Heui Kim, Byung-Soo Chang¹, Wan-Jong Kim², Myeong-Seon Lee³,
Yung-Chien Teng, Seok Kim⁴ and Kyu-Jae Lee*

Department of Environmental Medical Biology, Institute of Basic Medical Science, and
⁴Central Research Lab, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju,
Gangwon 220-701, Korea

¹Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea

²Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

³Department of Genetic Engineering, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received January 5, 2010; Revised March 18, 2010; Accepted March 20, 2010)

ABSTRACT

The ultrastructure of spermatogenesis and sperm in Chinese minnow, *Rhynchocypris oxycephalus* belonging to Leuciscinae was investigated by light and electron microscopes.

The whitish testis was located between intestine and air bladder. The size of testis was major axis 2.3 cm, minor axis 6 mm. The testis contained numerous testicular cysts, and spermatogenesis was non-synchronized in these testicular cysts. In the case of spermatogonium, the nucleus was comparatively large ellipsoidal, and mitochondria showed a marked development. The size of primary spermatocyte was smaller than that of spermatogonia, and secondary spermatocyte was smaller than primary spermatocyte. The chromatin of spermatocyte was highly condensed according to their development. The nucleus with electron-dense was round shape. In spermiogenesis, flagella started to be formed and chromatin was more condensed. The mitochondria were rearranged in a middle piece. The sperm was formed by loss of cytoplasm. The head of mature sperm was a spherical shape and have not acrosome. The microtubules of flagella were arranged 9+2 structure. Also, the tail of sperm have not lateral fins.

Keywords : Spermatogenesis, *Rhynchocypris oxycephalus*, Leuciscinae, Fish

서 론

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

formes), 잉어과 (Cyprinidae), 황어아과 (Leuciscinae)에 속하는 담수산 경골어류로 중국북부, 한국, 일본의 중남부에 분포하며 주로 산간 계류의 차가운 물, 강 상류에서 수서곤충

* 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

이나 갑각류, 실지렁이 및 부착 조류를 먹고 산다. 산란기는 4월 중순에서 5월 중순으로 알려져 있다(Kim & Park, 2002).

일반적으로 경골어류의 정자형성과정은 정소 내 정소낭(testicular cyst)에서 이루어지며(Chung, 2008; Kim et al., 2009a, b), 정소낭 내에서 성숙한 정자가 형성된 후 바로 체외로 방출되지만 큰 가시고기처럼 부정소를 가지고 있는 경우도 있다(Deung, 1999). 정자형성이 이루어지는 동안 Sertoli 세포는 생식세포를 둘러싸고 정소낭을 형성하기도 하며(van den Hurk et al., 1973; Gwo & Gwo, 1993), 인접한 생식세포간에 세포간교(intercellular bridge)를 형성하기도 한다(Billard, 1983). 또한 정자완성과정(spermiogenesis) 동안에 정세포의 세포질 잔사체(residual body)는 표면 쪽으로 배열된 후 정소낭의 내강 쪽으로 배출되고 결국 인접한 Sertoli 세포에 의해서 phagocytic vacuole이 형성된 후 세포내 소화에 의하여 제거된다(Sprando & Russell, 1988). 정소낭 내의 생식세포는 *Oryzias latipes*, *Liza aurata*, *Acanthopagrus schlegeli*, *Thalassoma duperrey*, *Cichlasoma managuensis* 및 *Anguilla japonica*처럼 동시에 분화하는 종과(Miura et al., 1991; Gwo & Gwo, 1993), *Salmo gairdneri*, *Mustelus palumbes*, *Cichlasoma managuensis*, *Coreoleuciscus splendidus* 및 *Microphysogobio yaluensis*처럼 동시에 분화하지 않는 종들이 있다(Billard, 1983; Rossouw & Vanessen, 1993; Kim et al., 2009a, c; Lee et al., 2009).

어류의 생식은 서식지의 기후 조건과 종에 따라 차이를 보일 뿐만 아니라 동종의 개체 간에도 생식 습성 혹은 서식 환경에 따라 서로 다르게 이루어지는 것으로 알려져 있다(Yoneyama & Iwasawa, 1985; Wolenski & Hart, 1987). 특히 정자형성과정은 광주기에 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다(Bayarri et al., 2009).

지금까지 일반적인 정자형성과정에 대한 연구는 일부 어종에서 이루어져 왔으나 실험실내에서 어류의 양어, 암수구별 및 산란이 매우 어렵기 때문에 양어 및 산란이 쉬운 몇몇 어종 또는 산업적 유용성에 따라서 식용어류에서 집중적으로 연구되어 왔으며 성숙한 정자의 미세구조를 분류체계에 따른 체계화가 전혀 이루어지지 않고 있다. 특히 국내 어종의 경우 채집의 어려움, 생태계 파괴에 의한 서식지 축소, 채집직후 생존가능성 희박, 실험실내 사육 및 암수구별의 어려움 등으로 연구가 활발하게 이루어지고 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 국내에서 우점종에 속하면서 아직 정자형성과정이 밝혀져 있지 않은 잉어과(Cyprinidae), 황어아과(Leuciscinae)에 속하는 버들치(*Rhynchocypris oxycephalus*)를 실험재료로 선정하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 정자형성과정을 밝히고 이 종만이 가지고 있는 정자의 미세구조적 특징을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

번식기인 2009년 4월과 5월 사이에 강원도 원주시 흥업면 매지리 182번지 하천에서 버들치를 채집하여 실험실내에서 기초사육을 하였으며 사육중 성숙한 수컷을 선별하여 실험재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 사육방법

pH 6.5 ± 0.5 및 $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 조정된 물이 담긴 수조($60 \times 45 \times 45 \text{ cm}$)에서 사육하였으며 기초양어수는 Fritz-guard(Fritz Co., Ltd., USA)로 상수의 염소를 제거시킨 후 사용하고 저면여과판을 이용한 생물학적 여과법으로 물을 정화하였다. 수조 바닥에 쌓인 배설물과 먹고 남은 사료는 2일 간격으로 1/3씩 환수시켜 제거하였다. 하루 10시간씩 낮 환경을 유지시켰고 먹이는 자외선으로 살균시킨 냉동장구벌레(Blood Worms™, Hikari Sales USA, Inc., USA)를 오전 9시와 오후 5시에 하루 2번씩 공급하였다. 수류발생은 측면여과기를 이용하였다.

2) 암수분리

채집한 버들치를 사육하는 동안 몸이 훌쩍하고 손으로 복부를 눌렀을 때 수정관이 나오거나 정액이 나오는 수컷을 선별하여 분리하였다.

3) 조직처리

(1) 광학현미경 시료

성숙한 버들치 수컷을 해부하여 정소의 외부형태를 관찰하고 정소를 적출하여 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)으로 조정된 10% 포르말린으로 4°C 에서 24시간 고정한 후 흐르는 물로 12시간 세척하였다. Ethanol 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중 염색하여 광학현미경으로 발생분화시기에 따른 정자형성과정을 관찰하였다.

(2) 전자현미경 시료

투과전자현미경 시료는 광학현미경 시료처리법과 동일한 방법으로 정소를 적출한 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 조성된 2.5% glutaraldehyde로 4°C 에서 4시간 동안 전고정한 후 동일 완충용액으로 20분간 2번 세척하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide로 90분간 실시하였고, 동일 완충용액으로 20분간 2번 세척한 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수시켜 propylene oxide로 치환하였다. 포매는 Epon 혼합액

을 사용하였고, 열중합 후 초박절편기(Reichert Ultracut E, Germany)를 이용하여 60~70 nm 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 JEM-1200EX II형(JEOL, Japan) 투과전자현미경으로 정자형성과정을 관찰하였다.

주사전자현미경용 시료의 경우 정자를 관찰하기 위하여 정소를 적출하여 막자사발에 넣어 분쇄한 후 생리식염수와 혼합하여 이 액상에 정자가 있다고 가정하고 전고정액을 첨가하여 고정시켰다. 2,800 rpm에서 2분간 원심분리하여 얻은 정자를 통상적인 주사전자현미경의 시료처리법에 따라 고정 및 탈수하여 hexamethyldisilazane으로 치환시킨 후 정자의 경우 4등분한 cover glass에 도말하고 정소의 경우 통채로 대기 중에서 건조한 후 JEM-6300(JEOL, Japan)과 TM-1000(Hitachi, Japan) 주사전자현미경으로 정자의 두부, 몸통, 꼬리의 일반형태 및 lateral fin의 유무를 관찰하였다.

결과 및 고찰

경골어류, 잉어과, 황어아과에 속하는 버들치의 정자형성 과정을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

버들치의 정소는 흰색으로 부레와 창자사이에 한 쌍이 위치하고 있었고 크기는 장축 약 2.3 cm, 단축 약 6 mm 정도로 팽창된 긴방추형이었다(Fig. 1). 정소의 단면을 광학현미경으로 관찰한 결과 각 정소낭마다 같은 분화시기에 있는 정원세포, 제1정모세포, 제2정모세포, 정세포 및 정자 등 생식세포들이 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 버들치의 경우 정자형성과정은 정소낭 내에서 동시에 분화하지 않는 종에 속한다. 정소낭과 정소낭 사이에는 미토콘드리아가 매우 잘 발달되어 있는 Leydig cell들이 분포하고 있었고(Fig. 3) 이 Leydig cell은 형태학적 특징으로 과립을 갖는 핵(vesicular nucleus), 관상 크리스테(tubular cristae)를 갖는 미토콘드리아, 아주 잘 발달된 활면소포체를 가지고 있다(Chung, 2008).

정자형성과정 초기의 정원세포는 한 개의 정소낭 내에 2~3개가 관찰되었고, 세포질은 전자밀도가 매우 낮았고 뚜렷한 인이 관찰되었다. 미토콘드리아는 핵막주위에 분포하고 있었다(Fig. 4). 발달함에 따라서 제1정모세포는 전자밀도가 약간 높아졌고 세포질내의 미토콘드리아는 정원세포에 비하여 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5). 제2정모세포는 염색질이 응축되어 보다 전자밀도가 높아졌으며 미토콘드리아가 더 적게 관찰되었다(Fig. 6). 체외수정하는 경골어류의 경우 수컷이 난자 근처에 정자를 방출함으로써 수정이 이루어지기 때문에 포유류의 정자처럼 암컷의 생식도관을 헤엄쳐 난자를 만날 필요가 없기 때문에 미토콘드리아의 수가 적은 것으로 생각된다. 정세포로 발달되면서 세포간 공간은

커졌고 핵 내의 염색질은 더 응축되었다(Fig. 7). 발생함에 따라서 정세포는 세포간극이 매우 커졌고 핵은 균질한 상태를 보였고 편모가 형성되고 있는 것이 확인되었다(Fig. 8). 핵은 점점 더 응축되어졌으며, 일부 핵에서는 부분적으로 낮은 전자밀도를 보이기도 하였다. 미토콘드리아는 꼬리가 형성되는 곳으로 한쪽에 모여 있었다(Fig. 9). 성숙한 정자의 두부는 원형이었고 침체(acrosome)는 발견되지 않았으며, 세포질은 거의 없었고 높은 전자밀도를 가지고 있었다(Fig. 10). 흰철갑상어(white sturgeon)의 경우처럼 두부에 침체를 보유하고 있는 종도 있으나(Cherr & Clark, 1984) 대부분의 경골어류는 침단체가 없는 것으로 알려져 있다. 중편부위는 5~7개의 미토콘드리아가 발견되었다. 일반적으로 미토콘드리아는 중편 속에 있는 것이 보통이나 Anguillidae의 어류는 중편이 없고 정자 두부의 측면에 붙어있으며 *Pantodon buchholzi*의 경우 미토콘드리아가 한 줄로 들어있는 판 9개가 서로 꼬여 축사를 감싸고 있는 경우도 있다(van Deurs and Lastein, 1973). 일반적으로 대부분의 경골어류는 중심립은 한 쌍이었으나 *Pantodon buchholzi*의 경우는 1개만 있다(van Deurs & Lastein, 1973). 또한 두 개의 중심립이 서로 이루는 각도는 어종마다 차이를 보인다(Lee, 1998; Lee & Kim, 1998).

정자의 편모는 일반적인 경골어류의 편모로 특징적인 것은 관찰되지 않았고 편모의 횡단면을 관찰한 결과 미세소관 배열은 역시 일반적인 9+2구조를 보였다(Fig. 10). 다른 대부분의 어류에서도 미세소관은 동일한 배열을 하고 있는 것으로 알려졌으나(Kim et al., 2009a, b; Lee et al., 2009), 뱀장어(*Anguilla australis*)의 정자는 편모의 미세소관 배열이 9+0 구조를 가지고 있다(Todd, 1976). 경골어류의 경우 종에 따라서 정자의 이동에 도움을 주는 lateral fin이 정자의 꼬리에 가지고 있는 경우도 있으나(Todd, 1976; Deung et al., 1999) 버들치의 정자에서는 관찰되지 않았다. 난태생어류인 platy(*Xiphophorus maculatus*)의 경우 꼬리 끝부분에 고리형태의 구조물을 가지고 있다(Kim et al., 2003).

성숙한 정자를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 머리는 직경 1.8~2.0 μm 정도인 구형이었으며 중편은 매우 짧고 둥근 형태였고 매우 긴 편모를 가지고 있었다(Fig. 11). 경골어류의 정자는 두부에 침체가 없어(Kim et al., 2003, 2009a, b; Lee et al., 2009) 난막을 뚫고 들어갈 수 없기 때문에 정자는 난막의 동물극 쪽에 위치한 난문(micropyle)을 통하여 난자내로 진입하여 수정하는 것으로 알려졌다(Brusle, 1981; Kim et al., 1999). 어류에서 정자의 두부형태는 신장형(Brusle, 1981), 탄환형(Kim et al., 2003), 리본형(Billard, 1983), 초승달형(Todd, 1976) 및 구형(Kim et al., 2009a, b) 등으로 다양하다. 담수산 뱀장어의 일종인 *Anguilla australis*와 *A. dieffenbachii*의 경우 특이하게 머리부분이 낮 모양이다(Todd, 1976).

이상과 같이 번식기인 4~5월에 채집된 버들치(*R. oxycephalus*)의 정자형성과정을 관찰한 결과 다른 경골어류의 경우와 매우 유사하였고 정소 전체에서 정소낭 속에서 동시에 분화되지 않아 다양한 단계의 생식세포들이 관찰되었다. 성숙한 정자의 형태 역시 구형의 첨체가 없는 머리와 짧은 중편은 다른 어종과 매우 유사하지만 lateral fin은 관찰되지 않았다. 본 실험은 번식기에 국한된 실험이었기 때문에 기온변화에 따른 년 중 생식주기에 맞추어 정소의 변화과정에 대한 연구도 추가적으로 필요하며 국내에 서식하는 황어아과의 어류는 야래, 백련어, 대두어 등 버들치 이외에 10종이 있으며 이들 중에 대한 미세구조적 비교실험을 통하여 같은 아강(subclass)내의 중간 차이점과 공통점에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bayarri MJ, Zanuy S, Yilmaz O, Carrillo M: Effects of continuous light on the reproductive system of European sea bass gauged by alterations of circadian variations during their first reproductive cycle. *Chronobiol Int* 26(2) : 84-99, 2009.
- Billard R: Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 233 : 265-284, 1983.
- Brusle S: Ultrastructure of spermatogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810(Teleostei, Mugilidae). *Cell Tissue Res* 217 : 415-424, 1981.
- Chung EY: Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). *Tissue and Cell* 40 : 195-205, 2008.
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of gametes in the three-spine stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus*. *Kor J Electron Microscopy* 29(2) : 177-178, 1999 (Korean).
- Gwo JC, Gwo HH: Spermatogenesis in the black porgy *Acanthopagrus schlegeli* (Teleostei: Perciformes: Sparidae). *Mol Rep Dev* 36 : 75-83, 1993.
- Kim DH, Deung YK, Kim WJ, Reu DS, Kang SJ: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes from three-spot gourami, pearl gourami and marble gourami, Belontiidae, Teleost, *Kor J Electron Microscopy* 29(3) : 343-351, 1999 (Korean).
- Kim DH, Lee KJ, Kim S, Teng YC: The Spermatogenesis of *Coreoleuciscus splendidus*, Cyprinidae, Teleost. *Kor J Microscopy* 39(3) : 227-236, 2009a (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: An ultrastructural study on the spermatogenesis of *Xiphophorus maculatus*. *Kor J Electron Microscopy* 33(4) : 267-274, 2003 (Korean).
- Kim IS, Park JY: Freshwater fishes of Korea, Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., 166, 2002 (Korean).
- Kim JG, Kim DH, Reu DS: A Study on the Reproductive Cells in Testes of *Microphysogobio yaluensis*. *Kor J Microscopy* 39(3) : 245-252, 2009b (Korean).
- Lee KJ, Chang BS, Teng YC, Kim S, Song MS, Joo KB, Kim DH: The Spermatogenesis of *Cichlasoma managuensis*, Cichlidae, Teleost. *Kor J Microscopy* 39 (3) : 219-226, 2009 (Korean).
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H: Introduction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin, *Zool Sci* 8 : 63-73, 1991.
- Rossouw GJ, Vanessen LD: Spermatogenesis in the male white-spotted houndshark, *Mustelus palubes* Smith. *South African J Sci* 89 : 244-246, 1993.
- Sprando RL, Russell LD: Spermiogenesis in the bluegill (*Lepomis macrochirus*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J Morphol* 198: 165-177, 1988.
- Todd PR: Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (Anguillidae), *Cell Tissue Res* 171 : 224-232, 1976.
- van Deurs B, Lastein U: Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost, *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. *J Ultrastruct Res* 42(5) : 517-533, 1973.
- Wolenski JS, Hart NH: Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish egg. *J Exp Zool* 243 : 259-273, 1987.
- Yoneyama H, Iwasawa H: Annual changes in the testis and accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Zool Sci* 2 : 229-237, 1985.

< 국문초록 >

경골어류 잉어과(Cyprinidae), 황어아과(Leuciscinae)에 속하는 버들치(*Rhynchocypris oxycephalus*)의 정자형성과정과 정자의 형태를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

버들치의 정소는 부레와 창자사이에 위치하고 있었고 장축 약 2.3 cm, 단축 약 6 mm 정도로 팽창된 긴방추형이었고 흰색을 띠고 있었다. 정자형성과정은 정소낭(testicular cyst)에서 이루어졌으며, 각 정소낭 내에서 다양한 분화시기의 생식세포가 분포하고 있었다. 정원세포는 전자밀도가 매우 낮고 미토콘드리아의 발달이 현저하였다. 제1정모세포는 원형으로 정원세포보다 크기가 작았고 제2정모세포는 제1정모세포보다 더 작아졌고 핵의 전자밀도는 더 높았다. 정세포의 초기발달시기에는 세포의 크기가 정모세포보다 작아졌고 두부의 전자밀도가 높아졌으며 편모가 형성되기 시작하였고 미토콘드리아는 핵 주변에 분포하였다. 정자완성과정 말기에는 핵의 염색질 응축이 뚜렷하였으며 핵은 세포질 한쪽에 치우쳐 있었고, 미토콘드리아는 편모 주변에 집중되었다. 완전히 성숙한 정자의 경우 두부형태는 구형이었고 두부에서 첨체는 관찰되지 않았으며 편모의 미세소관 배열은 9+2구조를 이루고 있었다. 또한 편모 양쪽으로 lateral fin은 관찰되지 않았다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Photograph of whitish testis (T) in *Rhynchocypris oxycephalus*.
- Fig. 2.** Light micrograph of testis section in *Rhynchocypris oxycephalus* ($\times 400$). Sg: Spermatogonia, PS: Primary spermatocyte, SS: Secondary spermatocyte, Sp: Spermatid, S: Sperm.
- Fig. 3.** A transmission electron micrograph of Leydig cell (L) (scale bar= $1\ \mu\text{m}$). N: Nucleus.
- Fig. 4.** A transmission electron micrograph of spermatogonia (scale bar= $1\ \mu\text{m}$). N: Nucleus, M: Mitochondria.
- Fig. 5.** An electron micrograph of primary spermatogonia (scale bar= $1\ \mu\text{m}$). N: Nucleus.
- Fig. 6.** An electron micrograph of secondary spermatocyte (scale bar= $1\ \mu\text{m}$).
- Fig. 7.** An electron micrograph of early spermatids (scale bar= $1\ \mu\text{m}$). N: Nucleus, Is: Intercellular space.
- Fig. 8.** An electron micrograph of spermatids (scale bar= $500\ \text{nm}$). N: Nucleus, F: Flagella.
- Fig. 9.** An electron micrograph of late spermatids (scale bar= $1\ \mu\text{m}$). N: Nucleus, M: mitochondria
- Fig. 10.** An electron micrograph of matured sperm (scale bar= $500\ \text{nm}$). N: Nucleus, M: Mitochondria, F: Flagella. The inset shows 9+2 pattern of microtubules in cross-sectioned flagellum (scale bar= $200\ \text{nm}$).
- Fig. 11.** A scanning electron micrograph of sperm (scale bar= $2\ \mu\text{m}$). Arrow: middle piece.





