

경골어류 시클리드과 *Golden severum*, *Convic cichlid* 및 *Discus*의 수정란 난막 미세구조 비교

등 영 건* · 류 동 석 · 김 동 회

*연세대학교 원주의과대학 기초과학교실 · 연세대학교 기초의학연구소, 청주대학교 생물학과

Comparative Ultrastructures of the Fertilized Egg Envelopes in *Golden severum*, *Convic cichlid* and *Discus*, Cichlidae, Teleost

Deung, Young Kun*, Dong Suck Reu and Dong Heui Kim

*Dept. of Basic Science and Institute of Basic Medicine · Wonju College of Medicine,
Yonsei Univ., Dept. of Biology, Chongju Univ.

(Received September 28, 1997)

ABSTRACT

The structures of the fertilized egg envelope in three species of cichlidae, golden severum (*Cichlasoma severum* var.), convic cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) and discus (*Symphysodon aequifasciatus*) were investigated by routine light and electron microscopies.

The fertilized eggs of all three species were of the non-transparent, ellipsoidal, adhesive and non-floted type. The egg envelopes have a single micropyle, which is thought to the pathway of sperm in the area of the animal pole. In golden severum, an outer surface of egg envelope was covered by a reticular layer, that of convic cichlid was covered by an amorphous reticular layer and that of discus was covered by a branched reticular layer. The fertilized egg envelopes consisted of two distinct layers; an adhesive outer layer and an inner layer, consisted of lamellae alternating with interlamellae of lower electron density, in all three species; an inner layer of golden severum was 15~17 layers, that of convic cichlid was 14~16 layers, and that of discus was 18~19 layers.

Key words : Fish, Cichlidae, Egg envelope, Fertilized egg, Ultrastructure

서 론

경골어강(Osteichthyes)의 농어목(Perciformes)에 속하는 시클리드과(Cichlidae)의 어류는 담수 및

기수에 1,300여종이 아프리카, 남아메리카, 중앙아메리카, 북아메리카 및 아시아에 분포하고 있으며 이중 900여종이 아프리카의 말라이호(Malawi), 빅토리아 호 및 탕가호(Tanganyika)에서 서식하고 있다. 주로 육식 및 잡식성으로 먹이를 씹거나 분쇄할 수 있는 인

두턱(pharyngeal jaw apparatus), 극조(spinous ray), 한 쌍의 외비공, 둥근형의 꼬리지느러미(rounded tail) 및 전출구(protractile mouth)를 보유하고 있는 것이 특징이며 눈이 매우 잘 발달되어 있다. 또한 마음에 드는 짝과 짝짓기를 하며 치어는 친어가 보살피는 특성을 보이는 것으로 알려졌다(Moyle와 Cech, 1996).

Golden severum (*Cichlasoma severum* var.)은 기아나(Guyanas)와 아마존(Amazon)의 하천에 분포하는 열대어로 전장은 17~20 cm 정도이고 수컷의 등지느러미와 볼기지느러미가 암컷에 비해 뾰족하며 산란기에는 수컷의 아가미 주위에 붉은 혼인색이 나타난다. 산란주기는 10~15일이며 1회에 500~700개의 침란성 및 부착성란을 산란하는데 적정수질은 pH 7.6, 24~27°C이다. Convic cichlid (*Cichlosoma nigrofasciatum*)는 black band fish라고도 불리우며 과테말라, 산살바도르, 파나마, 코스타리카에 분포한다. 전장은 10~12 cm 정도로 수컷은 등지느러미와 볼기지느러미가 길고 뾰족하며 산란기에는 몸의 측부가 붉은색을 띠기 때문에 암수구별은 용이하다. 산란주기는 10~15일이며 1회에 300~600개의 침란성 및 부착성란을 산란하는데 적정수질은 pH 7.0, 25~26°C이다. Discus (*Symphysodon aequifasciatus*)는 아마존강에 서식하는 어류로 열대어의 황제로 불리운다. 체표면에는 외분비선이 발달되어 있어서 치어의 먹이가 되는 액체를 분비하며 치어들은 이 분비되는 먹이를 먹고 성장한다. 전장은 15~25 cm 정도이며 암수구별은 매우 어렵고 산란주기는 치어를 키우지 않을 때는 7~12일이고 치어를 키울 때에는 15~18일 정도이며 1회에 100~400개의 침란성 및 부착성란을 산란한다. 적정수질은 pH 5.0~6.0, 28~32°C이다.

어류의 수정란은 비세포성인 난막에 의해 둘러싸여 있는데, 난막은 chorion (Hisaoka와 Battle, 1958), external membrane (Bell 등, 1969), capsule (Anderson, 1974), egg envelope (Wourms, 1976), egg membrane (Stehr와 Hawkes, 1979), outer envelope (Dumont와 Brummet, 1980), eggshell (Grierson과 Neville, 1981), zona radiata (Schmehl과 Graham, 1987; Jang 등, 1995) 및 zona pellucida (Hamazaki 등, 1989) 등 여러가지로 사용

되어 왔으나 external membrane과 capsule은 난막의 용어로 적합하지 않고 egg membrane은 난세포내의 세포막과 혼동의 가능성이 있으며 outer membrane은 막이 여러층으로 되어있는 경우 이중 바깥층만을 말하는 것인지 막전체를 말하는 것인지 불분명하고, 또한 zona radiata와 zona pellucida의 경우 수정란 및 발생중인 배자(embryo)에 사용하기 부적합하며 연구자에 따라 이들 용어를 섞어 사용하거나 또는 난세포와 여포세포사이에 미세융모에 의해 구멍이 뚫린 pore canal을 보유하고 있는 것은 zona radiata로, 난세포를 둘러싸고 있는 막중 일반염색시약으로 잘 염색되지않는 부분은 zona pellucida로 사용되고 있어 혼란가능성이 많기 때문에 현재 egg envelope로 사용하는 것이 가장 적합한 것으로 알려졌다(Yamagami 등, 1992).

난막은 발생중인 배자가 외부환경으로부터 받는 물리적인 충격 및 화학물질에 대해서 방어하고 확산에 의한 기체교환의 기능을 수행하며(Grierson과 Neville, 1981; Harvey 등, 1983; Cameron과 Hunter, 1984), 또한 동물극쪽에 난문(micropyle)을 가지고 있어서 침체가 없는 정자의 통로 역할을 하는데, 난문의 직경은 난막의 내측으로 들어갈수록 작아지기 때문에 다수정(polyspermy)을 제한하는 물리적인 장벽으로 작용한다(Brummet와 Dumont, 1979; Kobayashi와 Yamamoto, 1981; Hart와 Donovan, 1983; Wolenski와 Hart, 1987; Yoon 등, 1996; Ohta와 Nashirozawa, 1996).

어류의 난자는 수정이 되면 피질과립의 세포유출작용에 의해서 조밀한 과립과 입자, 섬유성 또는 막성 물질들이 방출되어 동물극에서 식물극쪽으로 위란강(perivitelline space)이 형성되는데(Ohta, 1985) 이것은 부분적인 난세포질의 부피감소 및 피층과립에서 방출된 입자로부터 형성된 삼투압에 의한 난막의 팽창 때문인 것으로 알려졌다(Yamamoto, 1961). 피질과립의 세포유출작용은 미세유리관(직경 15~20 μm)으로 찌르거나 화학물질(1% sodium taurocholate, 0.1% saponin, 0.5% monogen 등), 열, 광선, 전기 및 초음파충격에 의해서 미수정란에서도 유도될 수 있으며(Yamamoto, 1961) 칼슘이온의 농도 및 pH에 매우 의존적이다(Gilkey, 1983). Zebrafish의 경우

수정후 5분이 지나면 피질과립의 세포유출작용이 일어나는데 피질과립은 막에 의해서 둘러싸여 있는 것(직경 0.7~0.9 μm)과 막을 보유하지 않은 것 두 종류가 있으며(Donovan과 Hart, 1982), 위란강의 형성은 다수정에 대한 방어 및 배반형성에 관여한다(Donovan과 Hart, 1986).

난막은 발생기원에 따라 난세포로부터 만들어진 것은 1차난막, 여포세포로부터 만들어진 것은 2차난막, 또한 수란관과 같이 다른 생식기관에서 만들어진 것은 3차난막으로 구분되는데(Browder 등, 1991). 어류의 경우, 난막은 미세음모가 형성되기 시작할 때 1차난막이 만들어지며 미세음모가 여포세포를 완전히 관통한 후 여포세포로부터 만들어진 전자밀도가 높은 물질이 형성되어 1차난막에 침적됨으로서 2차난막이 형성된다(Wourms, 1976; Wourms와 Sheldon, 1976; Thiaw와 Mattei, 1991).

대부분 어류의 난막은 주로 당단백질로 이루어져 있으며(Cotelli 등, 1986; Brivio 등, 1991), 미세구조, 염색정도 및 화학적 조성에 따라 두 층(Flegler, 1977, Kobayashi와 Yamamoto, 1981) 또는 세 층(Anderson, 1974; Cotelli 등, 1986; Kim 등, 1993)으로 구성되어 있고, 이중 내층은 두껍고 외층은 1~2층으로 구성되어 있으며 얇다. 난생어류인 *Cynolebias melanotaenia*와 *Cynolebias ladigesti*의 난막은 세 층으로 구성되어 있는데 난세포의 크기가 250 μm 일 때 외층이 형성되기 시작하며 외층이 형성된 후 외층과 난세포의 표면 사이에 중층이 나타나고 난세포의 크기가 3,600 μm 가 되면 지질난황과 단백질이 축적되면서 난세포에 의해 내층이 형성된 후 각 층이 서로 융합되어 막을 형성한다(Wourms, 1976).

난막의 외부에는 여포세포로부터 형성되는 것으로 알려진(Anderson, 1974) 부속구조물들이 분포하고 있는 경우가 있는데 medaka 및 killifish의 난막에는 수정란이 부화될 때까지 긴 초자섬유로 된 부속구조물을 보유하고 있으며(Toshimori와 Yasuzumi, 1976), *Plecoglossus altivelis*의 난막에는 물질수송에서 여과기능을 수행하는 filament와 같은 부속구조물을 보유하고 있다(Anderson, 1974). 또한 zebrafish의 경우는 산란시 바닥에 떨어질 때 발생하는 충격을 완화

시키기 위한 것으로 생각되는 버섯모양의 부속구조물을 보유하고 있으며 angel fish처럼 돌이나 수초에 부착하기 위한 망상구조물을 보유하고 있는 것도 있다(Kim 등, 1993).

어류의 난막과 난분에 대한 연구들은 *Plecoglossus altivelis* (Toshimori와 Yasuzumi, 1976), *Hippoglossoides platessoides limandoides* (Lønning과 Davenport, 1980), chum salmon (Kobayashi와 Yamamoto, 1981), zebrafish (Hart와 Donovan, 1983), chinook salmon (Schmehl과 Graham, 1987), *Oryzias latipes* (Hamazaki 등, 1989), pipefish (Begovac와 Wallace, 1989), angelfish (Kim 등, 1993), 무지개 송어 (Yoon 등, 1996), 붉은 납줄개, *Rhodeus ocellatus ocellatus* (Ohta와 Nashirozawa, 1996), 카라신과 (Characidae) 어류인 head and tail light fish, black tetra 및 buenos aires tetra (Kim 등, 1996) 등에서 보고 되었으며 수정란의 크기와 난막의 구조는 환경의 물리·화학적 특성에 따라 다양하게 나타나고 (Stehr와 Hawkes, 1979; Berrada-Rkhami와 Gabrion, 1990) 서로 다른 과에서는 물론 같은 과, 같은 속에서도 종에 따라 난막의 구조와 단백질 조성이 다른 것으로 알려져 있다(Cotelli 등, 1986; Schmehl과 Graham, 1987; Riehl과 Greven, 1993). 또한 어류의 계통분류학적 위치 및 생태학적 군에 따라 차이를 보이기도 한다 (Ivankov와 Kurdyayeva, 1973). 대부분의 난막구조에 대한 연구는 주로 미수정란을 난소로부터 적출하여 연구된 것이 많고 수정란에 대한 연구는 실제 실험실내에서 어류의 양어, 암수구별 및 산란이 매우 어렵기 때문에 양어 및 산란이 쉬운 몇몇 어종에 집중적으로 연구가 되어있는 실정이다. 따라서 본 실험은 산란주기가 짧고 산란수가 많은 시클리드과 어류인 golden severum, convic cichlid 및 discus를 선정하여 이들 어류의 수정란 난막의 일반적인 특징인 침관성 및 부착성인 수정란이 어떤 형태학적 특징들을 가지고 있는지 알아보고 종의 기준이 되는 특징들을 확인하기 위해서 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 수정란 난막의 외부와 내부구조 및 난분의 형태를 관찰·비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) Golden severum과 convic cichlid

치어를 구입하여 pH 6.5 ± 0.5 및 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수조 ($120 \times 45 \times 60$ cm)에서 1년 이상 기초 양어하여 친어로 사용하였다. 양어수는 Fritz-guard (미국 Fritz사)로 상수의 염소를 제거시킨 후 사용하였고 하루에 농씩 환수시켰다. 하루 10시간씩 낮환경을 유지시켰고 먹이는 냉동 장구벌레와 Bit (독일 Tetra사)를 하루 두 번씩 오전 8시 30분과 오후 5시에 공급하였으며 자연적으로 짝지어진 산란력이 좋은 한 쌍을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) Discus

말레이시아, 페낭 (Penang)의 Lee Poh Soon씨로부터 야생종을 분양받아 pH 6.0 ± 0.5 및 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수조 ($120 \times 45 \times 60$ cm)에서 8개월 이상 기초 양어하여 친어로 사용하였다. 사육수는 golden severum과 convic cichlid의 경우와 같은 방법으로 염소를 제거시켜 사용하였고 하루에 농씩 아침과 저녁에 두 번 환수시켰다. 먹이는 소 심장과 껍질을 제거시킨 새우를 분쇄기로 갈아 1:1로 섞어 하루 두 번씩 오전 8시 30분과 오후 5시에 공급하였으며 자연적으로 짝지어진 번식 경험이 있는 쌍을 선별하여 친어로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 수정란의 채란

(1) Golden severum

기초양어수를 산호사에 통과시켜 물의 pH를 7.6 ± 0.3으로 만든 후 산란경험이 있는 성어 한 쌍을 선별하여 유리수조 ($90 \times 30 \times 45$ cm)에 옮겨 놓고 돌 (15×15 cm)을 산란상으로 이용하여 산란상에 산란시켜 놓은 수정란을 실험에 사용하였다.

(2) Convic cichlid

기초양어수를 사용하였으며 한 쌍을 선별하여 유리수조 ($60 \times 30 \times 45$ cm)에 옮겨 놓고 초별구이된 난화분을 산란상으로 이용하여 산란상 안에 산란시켜 놓은 수정란을 실험에 사용하였다.

(3) Discus

기초양어수를 활성탄에 통과시킨 후 증류수를 섞어 경도를 약 50 ppm ($100 \sim 110 \mu\text{s}$)으로 낮춘 후 이탄의 일종인 peat에 통과시켜 pH 5.5 ± 0.5 로 조정된 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 물을 하루에 아침과 저녁에 두 번 50%씩 환수시켰다. 사이가 좋은 한 쌍을 선별하여 유리수조 ($60 \times 45 \times 45$ cm)에 옮겨 놓고 산란상은 초별구이된 난화분을 이용하였으며 산란상 밖에 산란된 수정란을 실험에 사용하였다.

2) 조직처리

(1) 광학현미경 시료

수정란 중 난할과정을 수행하지 않은 수정란을 선택하여 광학현미경으로 난의 형태와 난문을 관찰하였다.

(2) 주사전자현미경 시료

광학현미경의 시료와 동일한 방법으로 선택된 수정란을 0.1 M 인산완충액 (pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C 에서 48시간 전고정한 후 동일 완충액으로 세척하여 2% osmium tetroxide (OsO_4)로 90분간 후고정하였다. 동일 완충액으로 30분씩 2회 세척하였으며 ethanol 농도 상승순으로 탈수시켜 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후 JFC 1100형 ion coater에서 20 nm의 두께로 금도금하여 JSM-6300형 주사전자현미경으로 20 kV에서 관찰하였다.

(3) 투과전자현미경 시료

수정란을 주사전자현미경과 동일한 방법으로 고정 및 탈수하여 propylene oxide로 치환하고 epon 혼합액에 포매한 후 50~60 nm로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM-1200 EX II형 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

경골어류인 시클리드과 3종의 수정란 난막구조를 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰·비교한 결과는 다음과 같다.

1. 광학현미경적 소견

3종의 수정란은 모두 황색의 불투명한 부착성 및 칩

란성란으로 golden severum의 수정란은 장축 1.85 ± 0.03 mm, 단축 1.46 ± 0.02 mm, convic cichlid의 수정란은 장축 1.78 ± 0.01 mm, 단축 1.42 ± 0.04 mm, 또한 discus의 경우 장축 1.46 ± 0.04 mm, 단축 1.23 ± 0.03 mm로 모두 타원형이었다 (Figs. 1, 3, 5). 난황낭내에는 많은 유적들이 분포하고 있었고 난막은 난황낭과 거의 밀착되어 위란강의 발달은 뚜렷하지 않았으며 난막 표면에 부속사는 관찰되지 않았다. 또한 3종 모두 동물극쪽에 정자의 통로로 보여지는 하나의 난문이 관찰되었다 (Figs. 2, 4, 6).

2. 전자현미경적 소견

1) 난문의 외부형태

3종 모두, 동물극쪽에 하나의 난문을 보유하고 있었으나 난문의 외부형태는 3종이 약간의 형태학적 차이를 보였는데 golden severum의 난문입구는 직경 약 $13 \mu\text{m}$ 정도의 다각형이었고 (Fig. 7), convic cichlid의 난문은 외부직경이 약 $13 \mu\text{m}$ 정도의 원형이었다 (Fig. 8). 또한 discus의 경우 외부직경이 약 $15 \mu\text{m}$ 정도로 약간 각이 있는 원형이었다 (Fig. 9). 난문의 내부직경은 3종 모두 $5.5 \sim 7 \mu\text{m}$ 정도의 원형으로 관찰되었다.

2) 난막의 표면형태

난막표면은 3종 모두, 망상구조층으로 덮여 있었으며 부속사는 관찰되지 않았다. 특히 convic cichlid의 경우 망상구조층이 golden severum (Fig. 10)보다 조밀한 것으로 나타났다 (Fig. 11). 또한 discus의 망상구조층은 굵은 섬유가 주축을 이루고 있었으며 이 주축으로부터 가는 섬유가 분지되어 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 12).

3) 난막의 내부형태

3종 모두, 난막은 2층으로 전자밀도가 높은 외층은 부속성 및 망상구조층으로, 내층은 전자밀도가 낮은 층으로 구분된 전자밀도가 높은 층으로 구성되어 있었는데 이 내층의 층상구조는 golden severum의 경우 15~17층, convic cichlid의 경우 14~16층, 또한 discus의 경우는 18~19층으로 서로 다르게 나타났다 (Figs. 13~15).

고 찰

본 실험에 사용된 시클리드과 3종의 수정란은 모두 황색의 불투명한 부속성 및 침란성으로 난황낭내에는 많은 유적들이 분포되어 있었고 난막은 난황낭과 거의 밀착되어 위란강의 발달은 뚜렷하지 않았으며 부속사는 관찰되지 않았는데 이들 수정란의 형태는 같은 과인 angelfish의 수정란 (Kim 등, 1993)과 매우 유사한 형태로 시클리드과의 공통적인 특징으로 생각된다.

유적은 어종에 따라 형태가 매우 다양한데 연어, 썬치 및 angelfish에서처럼 유적이 난황낭 내에 균질하게 분포하고 있는 경우도 있고 (Bell 등, 1969; Kim 등, 1986; Kim 등, 1993), 큰가시고기처럼 난 중앙에 집중되어 분포하고 있는 경우도 있으며 (Han과 Kim, 1989), bluegill처럼 큰 유적 하나가 난황낭 중앙에 위치하고 있는 것도 있다 (Kim과 Park, 1987). 또한 미꾸라지와 zebrafish의 경우 유적이 없는 것으로 알려졌다 (Kim 등, 1987; Kim 등, 1993).

바다에 알을 뿌리듯이 산란하는 잉어과인 zebrafish와 카라신과인 head and tail light fish, black tetra 및 buenos aires tetra의 경우 위란강은 산란시 발생하는 충격을 완화시켜 수정란을 보호하는 기능을 가진 것으로 생각되는 아주 잘 발달된 위란강을 보유하고 있는 것에 비해서 시클리드과의 경우 거의 발달되어 있지 않은 것은 알을 바위나 수초에 붙이는 산란 습성 때문에 충격흡수의 필요성이 적은 것으로 생각되며 (Kim 등, 1993; Kim 등, 1996), 난의 직경, 부피, 표면적 및 위란강의 크기는 어류의 수정란이 부화 시기까지 발생시간의 경과에 따라서 변화하는 것으로 알려졌다 (Lönning과 Davenport, 1980). 난문은 대부분 경골어류에서 침체가 없는 정자가 난막을 뚫지 못하기 때문에 정자의 통로 및 다정자수정을 방지하는 구조물로 알려졌는데 (Brummett와 Dumont, 1979; Kobayashi와 Yamamoto, 1981; Hart와 Donovan, 1983; Wolenski와 Hart, 1987) 본 실험에서 3종 모두 동물극쪽에 내부직경이 약 $5.5 \sim 7 \mu\text{m}$ 정도인 원형의 정자통로로 생각되는 하나의 난문이 발견된 것으로 보아 (Figs. 7, 9, 11) 정자의 두부에 침체가 없을 것으로 생각되며, 카라신과 어류의 경우에서처럼 난문 주위에 난막의 융기선이 난문을 중심으로 방사형으로

위치하고 있는 종도 있고(Kim 등, 1996) 어떤 종에서는 이 난문 주위에 섬유상의 구조물들이 분포하고 있어 정자가 난막내로 쉽게 들어올 수 있도록 도움을 주는 역할을 하는 것도 있다(Dumont와 Brummet, 1980). 어중에 따라 정자의 두부에 침체를 보유하고 있는 종도 있으며 정자에 침체를 보유하고 있으면서 난문도 같이 보유하고 있는 것도 있다. 특히 칠성장어의 경우, 정자는 침체를 보유하고 있으며 난막에 난문은 없는데 이 경우 정자는 동물극쪽에 분포하는 섬유상 다발의 기부를 통해서 난자내로 들어가는 것으로 알려졌다(Kille, 1960). 또한 흰철갑상어(white sturgeon)의 경우처럼 다수의 난문을 보유하고 있으면서 정자의 두부에 침체를 보유하고 있는 종도 있다(Cherr와 Clark, 1984). 아직 이들 난문과 침체 유무와의 상관관계는 정확히 밝혀지지 않았지만 어류는 담수에서 해수쪽으로 진화했을것으로 생각하고 있는 연구자도 있다(Cherr와 Clark, 1984).

3종 모두 광학현미경상에서는 난막의 표면에서 부속사는 관찰되지 않았지만 주사전자현미경으로 관찰한 결과 부착성의 망상구조층의 부착사가 관찰되었는데 convic cichlid의 경우 golden severum보다 더욱 조밀한 형태로 나타났다. 또한 discus의 경우 굵은 섬유가 주축을 이루고 있었으며 이 주축으로부터 가는 섬유가 분지되어 있는 것이 관찰되었다. 학공치의 경우 부속사가 동물극쪽에 4~6개, 식물극쪽에 11개가 있어서 난막은 비접착성이지만 수정란끼리 서로 엉겨붙어 해조류나 바위에 고착하는 성질을 가지고 있고(Kim 등, 1984), *Oryzias latipes*처럼 난막표면에 부착성 섬유와 비부착성 섬유 모두를 보유하고 있는 경우도 있는데 부착성 섬유는 14개의 구형 소단위체(globular subunit)로 구성되어있는 분자량이 55,000 Da인 소관벽(tubule wall)으로 싸여있고, 하나의 섬유로 된 것과 여러개의 섬유가 모여 다발을 형성하고 있는 것이 있다(Hart 등, 1984). 또한, 어떤 어종의 부속사들은 쉼물에 의해서 수위가 낮아졌을 때 수분손실을 방지하는 기능을 수행하기도 한다(Dumont와 Brummet, 1980). 칠성장어의 경우 난막은 식물극쪽으로 옹가 젤리층에 의해 둘러싸여 있으며(Kille, 1960), angelfish의 경우 수정란이 어떤 물체에 부착하는 기능을 가지고 있는 것으로 생각되는 망상구조물

들이 난막 전체를 덮고 있고 반면에 zebrafish는 부착구조물은 없지만 섬유상 구조물에 의해서 지지되고 있는 송이버섯모양의 구조물들이 분포하고 있다(Kim 등, 1993).

대부분의 어류에서 난막은 2층 또는 3층으로 구성되어 있는데 본 실험에 사용된 시클리드과 3종 모두, 2층으로 전자밀도가 높은 외층은 부착성 및 망상구조층, 내층은 전자밀도가 낮은 층으로 구분된 전자밀도가 높은 층으로 구성되어 있었는데 이 내층의 층상구조는 golden severum의 경우 15~17층, convic cichlid는 14~16층, 또한 discus는 18~19층으로 서로 다르게 나타났다. 이 형태학적 차이는 종특이성으로 생각되며 *Crenilabrus melops*, *C. cinereus* 및 *C. mediterraneus*의 수정란 난막구조 역시 형태는 매우 유사하나 내층이 *C. melops*는 6층, *C. cinereus*는 7층, *C. mediterraneus*는 9층으로 서로 다른 것으로 알려졌다(Lönning, 1972).

난막의 구조는 어종마다 다양하게 나타나는데 angelfish와 zebrafish의 경우 3층으로, angelfish는 망상구조층인 외층, 전자밀도가 높은 중층 및 전자밀도가 높은 10층에 의해서 전자밀도가 낮은 9층으로 나뉘어진 층상의 구조를 가진 내층으로 구성되어 있으며, zebrafish의 경우 전자밀도가 높은 외층과 내층이 전자밀도가 낮은 섬유성층에 의해서 나누어져 있다(Kim 등, 1993).

Oryzias latipes (Medaka)의 경우 난막은 3층으로 전자밀도가 낮은 외층, 중층 및 10~12층의 층상구조를 가지고 있는 내층으로 구성되어 있으며(Hart 등, 1984), *Plecoglossus altivelis*의 난막은 2층의 치밀층이 투명층에 의해 분리되어 3층으로 구성되어 있는 것으로 알려졌다(Toshimori와 Yasuzumi, 1976). 해마의 경우는 3층으로 구성되어 있는데 외층은 비교적 짧은 미세융모와 균질성 물질로 구성되어 있고 중층은 불투명한 과립성 물질로, 내층은 망상구조물로 조직화된 균질성 물질로 구성되어 있다(Anderson, 1974). 카라신과 어류인 head and tail light fish와 buenos aires tetra의 경우 3층으로, black tetra의 경우 2층으로 구성되어 있으며 이중 내층은 head and tail light fish는 3층, black tetra는 4층 및 buenos aires tetra는 5층으로 구성되어 있다(Kim 등, 1996).

어류난막의 구조는 광량, 수압 및 파도 등 외부환경에 따라 다양하게 나타나는데 연안에 서식하는 가자미의 일종인 starry flounder와 연어의 일종인 pink salmon의 난막두께를 비교한 결과 starry flounder가 더 두꺼운 것으로 알려졌는데 이것은 파도의 영향에 대한 적응으로 알려졌으며 (Stehr와 Hawkes, 1979), 난태생 어류의 수정란 난막은 형태학적으로 난생어류의 난막구조와 유사하지만 태생의 수정란 난막 보다 훨씬 얇은 것으로 알려졌다 (Flegler, 1977). 또한 같은 과라고 할지라도 난막의 구조는 다양하게 나타나는데 Goodeidae의 경우 *Ataeniobius toweri*와 *Girardinichthys viviparus*는 2층으로 *Hubbsina turneri*는 1층으로 구성되어 있고 (Riehl과 Greven, 1993), 연어과의 pink salmon, chinook salmon 및 chum salmon의 경우 모두 내층과 외층으로 구성되어 있으며 pink salmon만이 한 층의 부착성층으로 되어있고 나머지 종들은 2층의 부착성층으로 덮혀있는데 난막표면, 난막 각층의 형태 및 pore canal plug가 각 종마다 다른 것으로 알려졌으며 (Schmehl과 Graham, 1987), pore canal은 수정후 발생정도에 따라서 형태적인 변화가 일어나는 것으로 보고된 바 있다 (Lönning과 Davenport, 1980). 또한 다양한 형태의 난막 구조는 어류의 체색과 체색의 분화정도가 서식처의 외부환경, 다른 종과의 사회적 관계 및 화학적 자극에 따라 영향을 받는 것과 마찬가지로 다양한 환경조건하에서 종족보존과 생존에 매우 중요한 것으로 생각된다 (Schmehl과 Graham, 1987).

이상과 같이 시클리드과 어류 3종의 수정란의 형태는 광학현미경상에서는 서로 매우 유사하였으나 미세 구조는 부착성 망상구조, 난문의 형태 및 난막의 단면 중 내층에서 서로 다른 구조적 특징을 가지고 있었다. 광학현미경으로 관찰된 수정란의 형태는 시클리드과 어류의 공통적인 특징으로 생각되지만 단지 3종만이 실험되었기 때문에 다른 시클리드과 어류의 수정란을 더욱 연구하여 구체적인 체계를 수립해야 할 것으로 생각된다. 어류의 수정란에 대한 연구는 양어가 쉽고 번식이 용이한 몇몇 어종에 한정되어 집중적으로 되어 있으며 형태적인 연구는 진행되고 있지만 그 구조물들의 생리적인 면과 기능적인 면이 잘 밝혀지지 않았기 때문에 더욱 깊이 있게 연구되어야 하며, 또한 난문의

유무는 정자의 침체유무와도 관련성이 있으므로 앞으로 성숙된 정자의 형태학적 연구도 함께 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

시클리드과 golden severum (*Cichlasoma severum* var.), convic cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) 및 discus (*Symphysodon aequifasciatus*)의 수정란 난막구조를 광학현미경, 투과전자현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 관찰·비교하였다.

3종의 수정란은 모두 타원형인 황색의 불투명한 부착성 및 침관성으로 동물극쪽에 정자의 통로로 생각되는 난문을 보유하고 있었고 난막의 외층은 망상구조층에 의해 덮여 있었으며 난막표면에는 부속사가 관찰되지 않았다. 특히 convic cichlid의 경우 망상구조층이 golden severum보다 더욱 조밀한 형태로 나타났고 discus의 경우 굵은 섬유가 주축을 이루고 있었으며 이 주축으로부터 가는 섬유가 분지되어 있는 것이 관찰되었다.

난막의 구조는 3종 모두, 2층으로 전자밀도가 높은 외층은 부착성 및 망상구조층으로, 내층은 전자밀도가 낮은 층으로 구분된 전자밀도가 높은 층으로 구성되어 있었는데 이 내층의 층상구조는 golden severum의 경우 15~17층, convic cichlid는 14~16층, 또한 discus는 18~19층으로 서로 다르게 나타났다.

참 고 문 헌

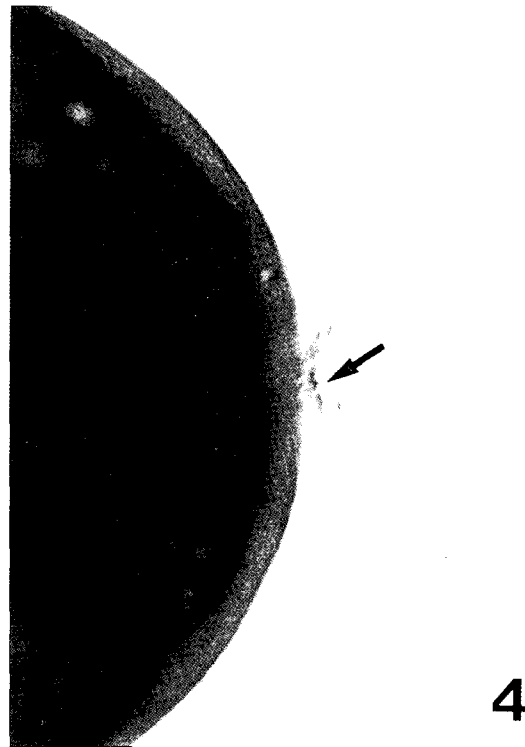
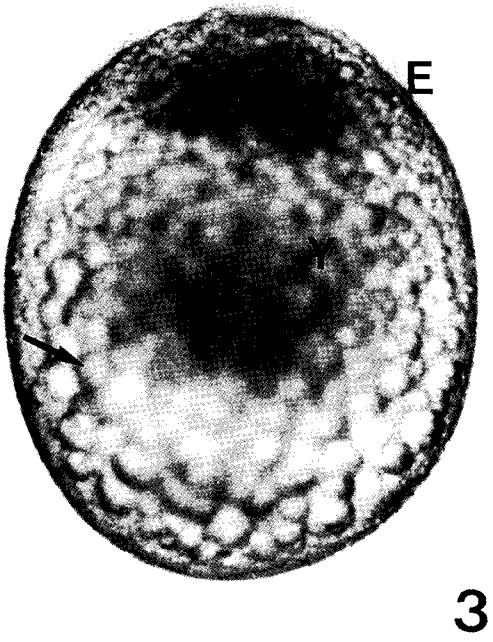
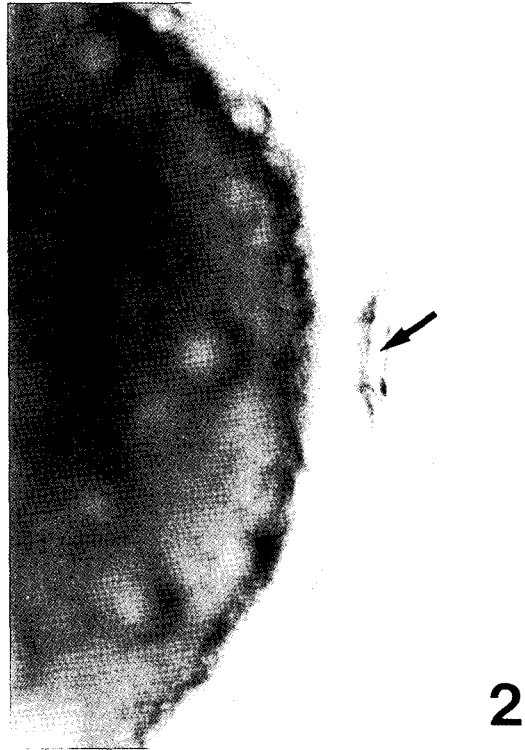
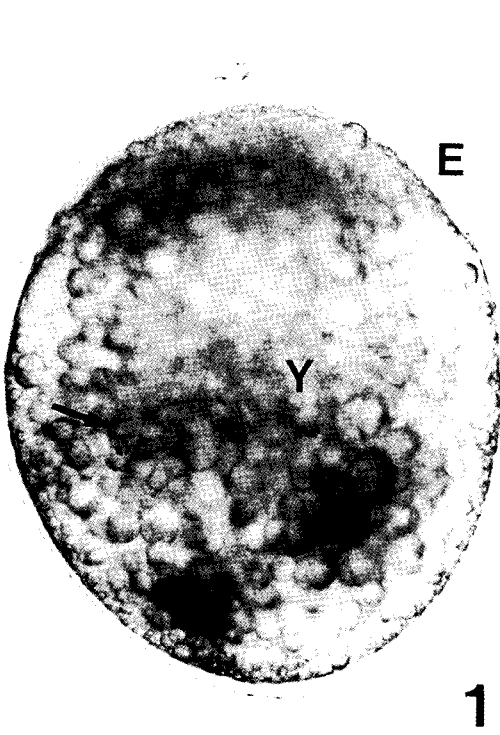
- Anderson E, 1974. Comparative aspects of the ultrastructure of the female gamete, Int. Rev. Cytol. Suppl. 4, 1-70
- Begovac PC, Wallace RA, 1989. Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer, J. Exp. Zool. 251, 56-73
- Bell GR, Hoskins GE and Bagshaw JW, 1969. On the structure and enzymatic degradation of the external membrane of the salmon egg, Can. J. Zool. 47, 145-148
- Berrada-Rkhami O, Gabrion C, 1990. The fine

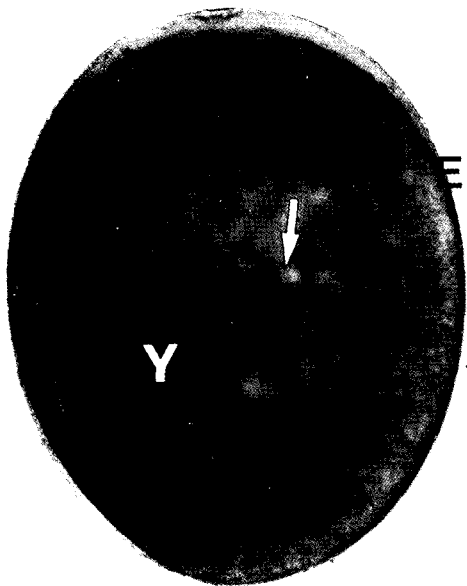
- structure of the embryonic envelopes before and after hatching in bothriocephalids: Physiological and ecological significance, *Parasitol. Res.* 76, 251-262
- Brivio MF, Bassi R, Cotelli F, 1991. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion, *Mol. Reprod. Dev.* 28, 85-93
- Browder LS, Erickson CA, Jeffery WR, 1991. *Developmental biology*, 3rd ed., Saunders College Publishing. P. 115
- Brummett AR, Dumont JN, 1979. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*, *J. Exp. Zool.* 210, 417-434
- Cameron IL, Hunter KE, 1984. Regulation of the permeability of the medaka fish embryo chorion by exogenous sodium and calcium ions, *J. Exp. Zool.* 231(3), 447-454
- Cherr GN, JR Clark WH, 1984. An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, *J. Exp. Zool.* 232, 129-139
- Cotelli F, Andronico F, Bassi R, Brivio M, Cecagno C, Denis-Donini S, La Rosa ML, Lamia-Donin CL, 1986. Studies on the composition, structure and differentiation of fish egg chorion, *Cell Biol. Int. Reports* 10(6), 471
- Donovan MJ, Hart NH, 1982. Uptake of ferritin by the mosaic egg surface of *Brachydanio*, *J. Exp. Zool.* 223, 299-304
- Donovan MJ, NH Hart, 1986. Cortical granule exocytosis is coupled with membrane retrieval in the egg of *Brachydanio*, *J. Exp. Zool.* 237, 391-405
- Dumont JN, Brummett AR, 1980. The vitelline envelope, chorion, and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs, *Gamete Res.* 3, 25-44
- Flegler C, 1977. Electron microscopic studies on the development of the chorion of the viviparous teleost *Dermogenys pusillus* (Hemirhamphidae), *Cell Tiss. Res.* 179, 255-270
- Gilkey JC, 1983. Roles of calcium and pH in activation of eggs of the medaka fish, *Oryzias latipes*, *J. Cell Biol.* 97, 669-678
- Grierson JP, Neville AC, 1981. Helicoidal architecture of fish eggshell, *Tissue Cell* 13(4), 819-830
- Hamazaki TS, Nagahama Y, Iuchi I, Yamagami K, 1989. A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (Zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*, *Dev. Biol.* 133, 101-110
- Han KH, Kim YU, 1989. Spawning behavior, embryonic development and morphology of larvae and juveniles of three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus* (Linnaeus) reared in the laboratory, *Bull. Nat. Fish. Univ. Pusan* 29, 11-36
- Hart NH, Donovan M, 1983. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*, *J. Exp. Zool.* 227, 277-296
- Hart NH, Pietri R, Donovan M, 1984. The surface of the chorion and associated surface filaments in *oryzias*-evidence for the presence of extracellular tubules, *J. Exp. Zool.* 230, 273-296
- Harvey B, Kelley RN, Ashwood-Smith MJ, 1983. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide, *Cryobiol.* 20, 432-439
- Hisaoka KK, Battle HI, 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), *J. Morphol.* 102, 311-328
- Ivankov VN, Kurdyayeva VP, 1973. Systematic differences and the ecological importance of the membranes in fish eggs, *J. Ichthyol.* 13, 864-873
- Jang SJ, Kim DH, Reu DS, Deung YK, 1995. A study on the oogenesis of palechub (*Zacco platypus*), *Korean J. Electron Microscopy* 25(3), 63-74
- Kille RA, 1960. Fertilization of the lamprey egg, *Exp. Cell. Res.* 20, 12-27
- Kim DH, Reu DS, Kim WJ, Deung YK, 1993. 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
- Kim DH, Reu DS, Deung YK, 1996. A comparative study on the ultrastructures of the egg envelope in fertilized eggs of fishes, characidae, three species, Korean J. Electron Microscopy 26(3), 277-291
- Kim YU, Myoung JG, Choi SO, 1984. Eggs development and larvae of the horn fish, *Hemiramphus sajori*, Bull. Korean Fish. Soc. 17(2), 125-131
- Kim YU, Park YS, 1987. Development of eggs larvae and juveniles of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque, Bull. Korean Fish. Soc. 20(1), 24-32
- Kim YU, Park YS, Kim DS, 1987. Development of eggs, larvae and juveniles of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunther, Bull. Korean Fish. Soc. 20(1), 16-23
- Kim YU, Park YS, Myoung JG, 1986. Egg development and larvae of the snailfish, *Liparis tanakai*, Bull. Korean Fish. Soc. 19(4), 380-386
- Kobayashi W, Yamamoto TS, 1981. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy, J. Exp. Zool. 217, 265-275
- Lönning S, 1972. Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs, Sarsia 49, 41-48
- Lönning S, Davenport J, 1980. The swelling egg of the long rough dab, *Hippoglossoides platessoides limandoides* (Bloch), J. Fish Biol. 17, 359-378
- Moyle PB, Cech JJ Jr, 1996. Fishes, An introduction to ichthyology, 3rd ed., Prentice Hall. P. 322
- Ohta T, Nashirozawa C, 1996. Sperm penetration and transformation of sperm entry site in eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*, J. Morphol. 229, 191-200
- Riehl R, Greven H, 1993. Fine structure of egg envelopes in some viviparous goodeid fishes, with comments on the relation of envelope thinness to viviparity, Can. J. Zool. 71, 91-97
- Schmehl MK, Graham EF, 1987. Comparative ultrastructure of the zona radiata from eggs of six species of salmonids, Cell Tiss. Res. 250, 513-519
- Stehr CM, Hawkes JW, 1979. The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus* (Pallas), and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum), Cell Tiss. Res. 202, 347-356
- Thiaw OT, Mattei X, 1991. Morphogenesis of the secondary envelope of the oocyte in a teleostean fish of the family Cyprinodontidae: *Aphyosemion splendopleure*, J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 23(3), 419-426
- Toshimori K, Yasuzumi F, 1976. The morphology and the function of the oocyte chorion in the teleost, *Plecoglossus altivelis*, J. Electron Microscopy 25, 210
- Wolenski JS, Hart NH, 1987. Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish egg, J. Exp. Zool. 243, 259-273
- Wourms JP, 1976. Annual fish oogenesis: Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelope, Devl. Biol. 50, 338-354
- Wourms JP, Sheldon H, 1976. Annual fish oogenesis; Formation of the secondary egg envelope, Dev. Biol. 50, 355-366
- Yamagami K, Hamazaki TS, Yasumasu S, Masuda K, Iuchi I, 1992. Molecular and cellular basis of formation, hardening and breakdown of the egg envelope in fish, Int. Review Cytol. 136, 51-92
- Yamamoto T, 1961. Physiology of fertilization in fish eggs, Int. Rev. Cytol. 12, 361-405
- Yoon JM, Chung KY, Reu DS, Lew ID, Roh SC, Kim GW, 1996. Electron microscopic observations on micropyle after sperm penetration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Korean J. Zool. 39, 173-181

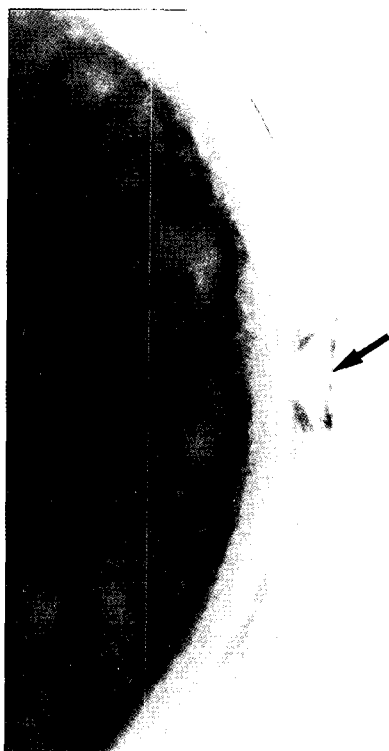
FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph of a fertilized egg in golden severum. Arrow indicates an oil droplet ($\times 40$). Y; yolk, E; egg envelope. This fertilized egg was of the non-transparent, ellipsoidal, adhesive and non-floated type.
- Fig. 2.** A light micrograph of the micropyle in the egg envelope of golden severum ($\times 100$). Note the micropyle (arrow).
- Fig. 3.** A light micrograph of a fertilized egg in convic cichlid. Arrow indicates an oil droplet ($\times 40$). Y; yolk, E; egg envelope.
- Fig. 4.** A light micrograph of the micropyle in the egg envelope of convic cichlid ($\times 100$). Note the micropyle (arrow).
- Fig. 5.** A light micrograph of a fertilized egg in discus. Arrow indicates an oil droplet ($\times 40$). Y; yolk, E; egg envelope.
- Fig. 6.** A light micrograph of the micropyle in the egg envelope of discus ($\times 100$). Note the micropyle (arrow).
- Fig. 7.** A scanning electron micrograph of the micropyle (arrow) in the fertilized egg envelope of golden severum (Bar= $5\ \mu\text{m}$).
- Fig. 8.** A scanning electron micrograph of the micropyle (arrow) in the fertilized egg envelope of convic cichlid (Bar= $10\ \mu\text{m}$).
- Fig. 9.** A scanning electron micrograph of the micropyle (arrow) in the fertilized egg envelope of discus (Bar= $5\ \mu\text{m}$).
- Fig. 10.** A scanning electron micrograph of the outer surface in the fertilized egg envelope of golden severum with reticular structure (Bar= $5\ \mu\text{m}$).
- Fig. 11.** A scanning electron micrograph of the outer surface in the fertilized egg envelope of convic cichlid with amorphous reticular structure (Bar= $10\ \mu\text{m}$).
- Fig. 12.** A scanning electron micrograph of the outer surface in the egg envelope of discus with branched reticular structure (Bar= $10\ \mu\text{m}$).
- Fig. 13.** A transmission electron micrograph of the egg envelope in golden severum. The egg envelope is two layered, consisting of an outer, adhesive layer (arrow) and an inner layer (IL) of 15~17 horizontal lower electron density lamellae alternating with interlamellae of higher electron density (Bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 14.** A transmission electron micrograph of the egg envelope in convic cichlid. The egg envelope is two layered, consisting of an outer adhesive layer (arrow) and an inner layer (IL) of 14~16 horizontal lower electron density lamellae alternating with interlamellae of higher electron density (Bar= $1\ \mu\text{m}$).
- Fig. 15.** A transmission electron micrograph of the egg envelope in discus. The egg envelope is two layered, consisting of an outer adhesive layer (arrow) and an inner layer (IL) of 18~19 horizontal lower electron density lamellae alternating with interlamellae of higher electron density (Bar= $1\ \mu\text{m}$).





5



6



7

