

해산 경골어류 자리돔과, Tomato Clown Anemonefish (*Amphiprion frenatus*)의 수정란 난막 미세구조

김 동 회 · 류 동 석 · 등 영 건*

청주대학교 생물학과

*연세대학교 원주의과대학 기초과학교실

연세대학교 기초의학연구소

Ultrastructure of Fertilized Egg Envelope in the Tomato Clown Anemonefish, *Amphiprion frenatus* (Pomacentridae: Marine Teleostei)

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

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

(Received April 28, 1998; revised August 25, 1998)

ABSTRACT

Ultrastructure of fertilized egg envelope in the tomato clown anemonefish (*Amphiprion frenatus*) was examined by mean of light, scanning and transmission electron microscopies.

The fertilized egg of tomato clown anemonefish was of non-transparent, ellipsoidal, adhesive and non-floted type, and there were numerous oil droplets in the yolk sac and adhesive filaments in the area of the animal pole. The outer surface of egg envelope was smooth. The fertilized egg envelope consisted of two distinct layers; a non-adhesive outer electron-dense layer and an inner layer, consisting of five horizontal low electron-dense lamellae alternating with the middle electron dense interlamellae.

Key words : Marine fish, Pomacentridae, Egg envelope, Fertilized egg, Egg, Ultrastructure

서 론

자리돔과(Pomacentridae)에 속하는 tomato clown anemonefish (*Amphiprion frenatus*)는 말미잘과 공생하는 해산 열대어로 fire clown, bridled clown-fish 및 black-backed anemonefish라고도 불리운다(Dakin과 Sprung, 1992; Dakin, 1996). 태평양

연안에 서식하고 크기는 약 7.5 cm정도이며 성전환하는 어류로써 무리중에 가장 큰 것이 암컷, 그 다음 큰 것이 수컷이고 나머지는 중성상태로 머무르게 되는데 만일 암컷이 죽거나 무리를 떠나면 수컷은 암컷으로 성전환하며 나머지 중성중 가장 큰 것이 수컷으로 된다(Dakin, 1996; Sprung과 Delbeek, 1997). 체색은 적색으로 *Amphiprion ephippium*과 모양 및 색깔은 똑같으나 눈 뒷쪽에 흰색 세로줄이 한 개 분포

하고 있어 서로 구별된다(Dakin과 Sprung, 1992).

어류의 수정란 난막은 발생중인 배자가 외부환경으로부터 받는 물리적인 충격 및 화학물질에 대한 방어, 확산에 의한 기체교환(Grierson과 Neville, 1981; Harvey 등, 1983; Cameron과 Hunter, 1984) 및 수정시 다수정(polyspermy)을 제한하는 기능을 수행하는데(Brummett와 Dumont, 1979; Kobayashi와 Yamamoto, 1981; Hart와 Donovan, 1983; Wolenski와 Hart, 1987; Yoon 등, 1996; Ohta와 Nashirozawa, 1996) 주로 당단백질로 이루어져 있으며(Cotelli 등, 1986; Brivio 등, 1991), 미세구조, 염색정도 및 화학적 조성에 따라 두 층(Flegler, 1977; Kobayashi와 Yamamoto, 1981) 또는 세층(Anderson, 1974; Cotelli 등, 1986; Kim 등, 1993)으로 구성되는데, 이중 내층은 두껍고 외층은 1~2층으로 구성되어 있으며 얇다.

어류의 난막과 난문에 대한 관찰들은 *Plecoglossus altivelis* (Toshimori와 Yasuzumi, 1976), *Hippoglossoides platessoides limandoides* (Lönning과 Davenport, 1980), chum salmon (Kobayashi와 Yamamoto, 1981), zebrafish (Hart와 Donovan, 1983), chinook salmon (Schmehl과 Graham, 1987), *Oryzias latipes* (Hamazaki 등, 1989), pipefish (Begovac과 Wallace, 1989), angelfish (Kim 등, 1993), 무지개 송어(Yoon 등, 1996) 붉은납줄개, *Rhodeus ocellatus ocellatus* (Ohta와 Nashirozawa, 1996), head and tail light fish, black tetra 및 buenos aires tetra (Kim 등, 1996)와 golden severum, convic cichlid 및 discus (Deung 등, 1997) 등에서 보고된 바 있다. 수정란의 크기와 난막의 구조는 어류가 서식하고 있는 수환경의 물리·화학적 특성의 차이에 따라서 다양하게 나타나는데(Stehr와 Hawkes, 1979; Laale, 1980; Berrada-Rkhami와 Gabrion, 1990) 난막의 두께는 침성란보다는 부성란이(Lönning, 1972; Stehr와 Hawkes, 1979) 난생어류의 수정란 난막보다는 난태생어류의 수정란 난막이 더 얇은 것으로 알려져 있다(Flegler, 1977). 또한 서로 다른 과에서는 물론, 같은 과, 같은 속내에서도 종에 따라 난막의 구조, 두께 또는 단백질의 조성이 서로 다르고(Hagström과 Lönning,

1968; Lönning, 1972; Cotelli 등, 1986; Schmehl과 Graham, 1987; Riehl과 Greven, 1993; Kim 등, 1996; Deung 등, 1997) 어류의 계통분류학적 위치 및 생태학적 군에 따라 차이를 보이기도 한다(Ivankov와 Kurdyayeva, 1973).

대부분의 난막구조에 대한 연구는 주로 미수정란을 난소로부터 적출하여 사용된 것이 많고, 수정란에 대한 연구는 실제 실험실내에서 양어하거나 산란시키기가 매우 어렵기 때문에 극히 적은 어종에서 집중적으로 연구가 되어있는 실정이다. 특히 해산어류의 경우 자연적인 산란을 관찰하기는 매우 어려운데 그것은 사육기술이 매우 까다롭고 암수구별 및 산란시기가 거의 알려져 있지 않기 때문이다.

따라서 본 실험은 해산 경골어류중 연중 산란가능한 자리돔과에 속하는 열대어의 한 종인 tomato clown anemonefish를 실험재료로 선정하여, 수정란의 내부구조, 난문의 유무 및 부속사의 구조가 어떤 형태학적 특성을 가지고 있는지를 규명하기 위하여 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

치어를 구입하여 염도 1.021 ± 0.001 , pH 8.4 ± 0.2 및 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수조(120 × 45 × 50 cm)에서 4년 이상 기초양어하여 친어로 사용하였다. 양어해수는 해수염 혼합액(Fritz Co., USA)을 증류수에 녹여(4.25 kg/94.6 l) 인공해수를 만들어 사용하였으며 여과방법은 저면식 생물학적 여과기(subgravel biological filter), 활성탄 여과기(activated carbon filter), 탈질화 여과기(denitrification filter) 및 건식 여과기(Trickle filter)를 병용하여 사용하였고(Fosså와 Nilsen, 1996) 조류의 발생을 막기위해서 인제거제(phosphate remover)와 단백질 여과기(protein skimmer)를 사용하여 해수내 인의 농도는 0.02 ppm, 암모니아와 아질산 농도는 0~0.01 ppm 이하로 유지시키고 질병방지를 위해서 UV살균기를 24시간 가동하였다. 공생용 말미잘은 pink malu 말미잘(*Anthopsis koseirensis*) 3마리를 사용하였으며

말미잘의 생육을 위해서 조명은 30 W 형광등 actinic blue 7,100 K (420 nm) 두 개(Coralife Co., USA)와 400 W 메탈할라이드 전구(Metal halide lamp) HQI-TS 400/D (Osram Co., Germany) 한 개를 사용하여 하루 12시간 낮환경을 유지시켰다. 또한 환수는 1주일에 20%씩 하였으며 먹이는 냉동 장구벌레와 테트라 비트(Tetra Bits™, Tetra Co., Germany)를 하루 두 번씩 오전 8시 30분과 오후 5시에 공급하였으며 자연적으로 짝지어진 산란력이 좋은 쌍을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 수정란의 채란

기초사육 기간동안 암수 한 쌍으로 생각되는 성어 두 마리를 선별하여 실험재료에서 언급했던 것과 동일한 사육시설이 설치된 같은 크기의 수조에 옮긴 후 live rock을 산란상으로 이용하여 자연산란에 의해 수정란을 얻었다.

2) 조직처리

(1) 광학현미경 시료

수정란과 산란상 사이에 연결되어 있는 부착사의 기부를 면도날로 긁어 떼어낸 후 스포이드를 이용하여 수조로부터 꺼내어 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 주사전자현미경 시료

수정란을 인공해수로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 48시간 전고정 및 2% osmium tetroxide (OsO₄)로 90분간 후고정하여 통상적인 전자현미경 처리방법에 따라 탈수, 치환, 건조 및 금도금하여 JSM-6300형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

(3) 투과전자현미경 시료

수정란으로부터 난막을 Iwamatsu (1983)의 방법에 의해 분리한 후 주사전자현미경과 동일한 방법으로 고정 및 탈수하여 propylene oxide로 치환하고 epon혼합액에 포매한 후 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM-1200 EX II형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

자리돔과 해산 경골어류인 tomato clown anemonefish의 수정란 난막구조를 광학현미경, 주사전자

현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

Tomato clown anemonefish의 수정란은 황색의 부착성 및 침성란으로 불투명하였고 장축 2.70 ± 0.07 mm, 단축 1.07 ± 0.02 mm인 장타원형이었으며 동물극쪽에 부착사가 부착되어 있었다. 난황낭은 난막과 같은 장타원형이었으며 난황낭내에는 많은 유적들이 골고루 분포하고 있었고 위란강은 난황낭막과 난막이 거의 붙어있는 동물극과 식물극 중간부분을 제외하고 잘 발달되어 있었는데 특히 식물극쪽의 위란강이 더 발달되어 있었다(Fig. 1).

난막 표면은 어떤 구조물도 없는 매끄러운 면으로 관찰되었으며(Fig. 2) 수정란 150개를 관찰한 결과 난문은 관찰되지 않았다. 부착사는 주사전자현미경으로 관찰하였을 때 밀집된 사람의 머리카락과 비슷한 섬유상 다발형태였고(Fig. 3) 부착사를 횡단한 결과 부착사내에는 아무런 구조물도 없는 직경 약 0.5~0.6 μm 정도인 원형의 전자밀도가 높은 균질한 면으로 관찰되었다(Fig. 4). 난막의 두께는 7.0~7.2 μm 정도이며 두 층으로 외층은 직경이 0.18~0.23 μm 정도로 전자밀도가 매우 높았고 내층은 전자밀도가 중간인 층으로서 전자밀도가 서로다른 낮은 5층으로 구성되어 있었다(Fig. 5).

고 찰

본 실험에 사용된 tomato clown anemonefish의 수정란은 단축에 비해 장축이 매우 긴 장타원형으로 짙은 황색의 불투명한 침성란성으로(Fig. 1) 부화될 때까지 수정란을 산란상에 부착시키는 기능을 하는 것으로 생각되는 부착사가 동물극쪽에 밀집하여 사람 머리카락과 비슷한 섬유상 다발형태로 부착되어 있었다(Figs. 2~3). 부착사는 다른 수정란의 부착사와 붙을 경우 떼기 힘들 정도로 매우 강한 부착성이었으나 난막 자체는 비부착성이었다. 이 강한 부착성은 산란이 연안에서 이루어지기 때문에 파도에 의해 떠내려가지 않게 하는데 매우 중요하며 가는 섬유이지만 수많은 섬유들이 다발을 형성하여 주축을 이루고 있는 것은 하나의 섬유로 되어있는 것 보다 물리

적 충격에 의해 발생된 힘이 여러 섬유로 분산되기 때문에 더 큰 물리적인 힘에 견딜 수 있을 것으로 추측되며, 부착사의 횡단면이 전자밀도가 높은 것으로 보아 주성분은 단백질로 구성되어 있을 것으로 생각된다(Fig. 4). 학공치의 경우 tomato clown anemonefish처럼 난막은 비부착성이지만 부착사는 동물극 쪽에 4~6개, 식물극쪽에 11개가 있어서 서로 엉겨 붙어 해조류나 바위에 고착하는 성질을 가지고 있으며(Kim 등, 1984) 시클리드과(Cichlidae) 어류인 angelfish, convic cichlid, discus 및 golden severum의 경우 부착사는 없지만 산란상에 부착하기 위한 부착성 망상구조물이 외막 표면에 분포하고 있고 이 망상구조는 종마다 서로 다른 것으로 알려졌다(Kim 등, 1993; Deung 등, 1997). *Oryzias latipes*처럼 난막표면에 부착성 섬유와 비부착성 섬유 모두 보유하고 있는 경우도 있는데 부착성 섬유는 14개의 구형소단위체(globular subunit)로 구성되어있는 분자량이 55,000 Da인 소관벽(tubule wall)으로 싸여 있고, 하나의 섬유로 된 것과 여러개의 섬유가 모여 다발을 형성하고 있다(Hart 등, 1984). 또한, 어떤 어종의 부속사들은 썰물에 의해서 수위가 낮아졌을 때 수분의 손실을 방지하는 기능을 나타내기도 한다(Dumont와 Brummet, 1980). 반면에 zebrafish는 접착구조물은 없지만 실모양의 구조물들에 의해서 지지되고 있는 송이버섯모양의 구조물들이 분포하고 있으며(Kim 등, 1993) *Pleuronichthys coenosus*의 경우 육각형의 벌집모양과 같은 구조물들이 난막전체를 둘러싸고 있는 것으로 알려져 있다(Stehr와 Hawkes, 1983). 또한 *Fundulus heteroclitus*의 경우 같은 종이라고 하더라도 지리적 분포에 따라 부속사의 형태는 서로 다르다(Brummett와 Dumont, 1981).

유적은 angelfish, golden severum, convic cichlid, discus, 연어 및 썸치에서처럼(Kim 등, 1993; Deung 등, 1997; Bell 등, 1969; Kim 등, 1986) 유적이 난황낭 내에 균질하게 분포하고 있었다(Fig. 1). 유적은 크기와 분포는 어종마다 다양한 것으로 알려졌는데 큰가시고기의 처럼 난 중앙에 집중되어 분포하고 있는 경우도 있으며(Han과 Kim, 1989), 블루길(bluegill)처럼 큰 유적 하나가 난황낭 중앙에

위치하고 있는 것도 있다(Kim과 Park, 1987). 또 한 미꾸라지와 zebrafish의 경우 유적은 없는 것으로 알려졌다(Kim 등, 1987; Kim 등, 1993).

위란강은 난황막과 난막이 거의 붙어있는 동물극과 식물극 중간부분을 제외하고 잘 발달되어 있었는데 특히 식물극쪽의 위란강이 더 발달되어 있었다(Fig. 1). 이것은 부착사가 붙어있는 동물극쪽은 파도에 의해 좌우로 흔들릴 때 산란상에 고정되어 있어서 외부의 물리적인 충격이 동물극보다는 식물극 쪽이 더 많이 받기 때문에 식물극쪽의 위란강이 동물극쪽보다 더 잘 발달되어 있는 것으로 생각된다. 난막표면은 어떤 구조물도 없는 매끄러운 면으로 관찰되었는데(Fig. 2) 연안에 산란하는 어류의 수정란은 구조물들이 없는 것이 파도에 의한 이물질의 부착가능성이 감소함으로써 박테리아 감염으로부터 보호되기 때문에 부화률이 증대되고 그 만큼 생존 가능성이 높아질 것으로 생각되며 난의 직경, 부피, 표면적 및 위란강의 크기는 어류의 수정란이 부화하기까지 발생시간의 경과에 따라서 변화하는 것으로 알려졌다(Lönning과 Davenport, 1980).

일반적으로 부착성 수정란은 산란상에 부착되는 부분은 식물극쪽이고 반대편은 동물극쪽인데 난문은 동물극쪽에 위치하고 있으나 본 실험의 경우 tomato clown anemonefish는 반대로 부착사쪽이 동물극이고 반대편이 식물극쪽이 위치하고 있었으며 100개 이상의 수정란을 관찰했으나 난문은 관찰하지 못했다. 이것은 정자가 침체를 보유하고 있거나 또는 부착사 부분에 난문이 위치하고 있어서 부착사에 가려져 난문이 관찰되지 않은 것으로 생각된다. 어떤 종에서는 이 난문 주위에 섬유상의 구조물들이 분포하고 있어 정자가 난막내로 쉽게 들어올 수 있도록 도움을 주는 역할을 하는 것도 있으며(Dumont와 Brummet, 1980) *Squalus suckleyi*의 경우 침체를 보유하고 있고(Stanley, 1971), 철갑상어의 경우 정자는 침체가 있으면서 난막에 난문이 없는데 이 경우 동물극쪽에 분포하는 섬유성 다발의 기부를 통해서 난자내로 들어간다(Kille, 1960). 그러나 흰철갑상어(white sturgeon)처럼 다수의 난문을 보유하고 있으면서 정자의 두부에 침체를 가지고 있는 종도 있다(Cherr와 Clark, 1984; 1985). 일반적으로 대

부분의 경골어류는 침체가 없으며 진화하는 과정에서 사라진 것으로 생각되지만 *Gambusia affinis*, *Lepadogaster lepadogaster*, *Oncorhynchus mikiss*의 경우 침체의 흔적이 남아있으며 (Mattei와 Thiw, 1993) 무지개 송어 정자의 경우 침체와 침체외막(OAM; outer acrosomal membrane)이 돼지의 침체외막 항체와 서로 반응하는 것으로 알려져 있다 (Flörke-Gerloff 등, 1986).

대부분의 어류에서 난막은 두 층 또는 세 층으로 구성되어 있는데 본 어종의 수정란 난막은 두 층으로 난막의 두께는 7.0~7.2 μm 정도였고 외층은 직경이 0.18~0.23 μm 정도로 전자밀도가 매우 높았으며 내층은 전자밀도가 중간인 층으로 나누어진 전자밀도가 낮은 5층으로 구성되어 있었다 (Fig. 5). 수정란 난막은 핀셋으로 잡아 당겨보면 담수어류의 수정란 난막보다 상당히 질기고 초박절편을 만들 때 너무 단단해서 얇은 절편을 얻기 힘들었는데 tomato clown anemonefish의 수정란 난막은 환경이 해수이므로 삼투압을 견디기 위해서는 이런 단단한 구조를 가지고 있어야 할 것으로 생각된다. 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 난막은 세 층으로 전자밀도가 낮은 외층, 중층, 및 10~12층의 층상구조를 가지고 있는 내층으로 구성되어 있으며 (Hart 등, 1984), *Plecoglossus altivelis*의 난막은 두 층의 치밀층이 투명층에 의해 분리되어 세 층으로 구성되어 있는 것으로 알려졌다 (Toshimori와 Yasuzumi, 1976). 해마의 경우는 세 층으로 구성되어 있는데 외층은 비교적 짧은 미세융모와 균질성 물질로 구성되어 있고 중층은 불투명한 과립성 물질로, 내층은 망상구조물로 조직화된 균질성 물질로 구성되어 있다 (Anderson, 1974). 어류 난막의 구조는 광량, 수압 및 파도의 강약 등 외부환경에 따라 다양하게 나타나는데 *Centrolabrus exoletus*와 *Ple-*

*uronectes platessa*의 경우는 예외이지만 (Lönning, 1972) 일반적으로 연안에 서식하는 종이 대양에서 서식하는 종보다 수정란 난막의 두께는 더 두꺼운 것으로 알려졌는데 (Lönning, 1972; Stehr와 Hawkes, 1979) 이것은 파도의 영향에 대한 적응으로 생각되며 난태생의 수정란 난막은 형태학적으로 난생어류의 난막구조와 유사하지만 태생의 수정란 난막 보다 훨씬 얇은 것으로 보고된 바 있다 (Flegler, 1977). 또한 같은 과라고 할지라도 난막의 구조는 다양하게 나타나는데 Goodeidae의 경우 *Ataeniobius toweri*와 *Girardinichthys viviparus*는 두 층으로 *Hubbsina turneri*는 한 층으로 되어있고 (Riehl과 Greven, 1993), 연어과의 pink salmon, chinook salmon 및 chum salmon의 경우 모두 내층과 외층으로 구성되어 있으며 pink salmon만이 한 층의 접착성층으로 되어있고 나머지 종들은 두 층의 접착성층으로 덮혀 있는데 난막표면, 난막 각층의 형태 및 pore canal plug가 각 종마다 다른 것으로 알려졌으며 (Schmehl과 Graham, 1987), pore canal은 수정후 발생 정도에 따라서 형태적인 변화가 일어나는 것으로 보고된 바 있다 (Lönning과 Davenport, 1980). 카라신과 (Characidae)의 경우 head and tail light fish와 buenos aires tetra의 경우 3층, black tetra의 경우는 2층으로 구성되어 있는데 이 중 내층은 head and tail light fish는 3층, buenos aires tetra는 5층 및 black tetra는 4층으로 구성되어 있으며 (Kim 등, 1996) 시클리드과 (Cichlid)의 경우 golden severum, convic cichlid 및 discus는 모두 2층으로 구성되어 있는데 내층의 층상구조는 golden severum의 경우 15~17층, convic cichlid는 14~16층 및 discus는 18~19층으로 서로 다른 것으로 알려졌다 (Deung 등, 1997). 또한 다양한 형태의 난막구조는 어류의 체색과 체색의 분화 정도가 서식처의 외부환경, 다른 종과의 사회적 관계 및 화학적 자극에 따라 영향을 받는 것과 마찬가지로 다양한 환경조건하에서 종족보존과 생존에 매우 중요한 것으로 믿어진다 (Schmehl과 Graham, 1987).

지금까지 어류의 수정란에 대한 연구는 양어가 쉽고 번식이 용이한 몇몇 군에 한정적으로 집중되어 있으며 특히 해수어의 수정란에 대한 형태학적 연구

는 번식의 최적 수질조건, 번식주기, 암수구별 및 실험실내 사육이 매우 어려워 주로 미수정란에 대한 연구가 대부분이다. 현재 형태학적인 연구는 진행되고 있지만 그 구조물들의 생리적인 면과 기능적인 면이 잘 밝혀지지 않았기 때문에 더욱 깊이있게 연구되어야 할 것으로 사료되며 또한 난문의 존재와 정자두부의 침체유무는 서로 밀접한 상관관계가 있으므로 성숙한 정자의 내부구조 및 정자형성과정의 연구도 함께 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

자리돔과 tomato clown anemonefish (*Amphiprion frenatus*)의 수정란 난막구조를 광학현미경, 투과전자현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

수정란은 황색의 부착성 및 침관성란으로 불투명하였고 장타원형이었으며 동물극쪽에 부착사가 부착되어 있었다. 난황낭내에는 많은 유적들이 분포하고 있었고 난막표면은 매끄러운 면으로 관찰되었으며 난문은 관찰되지 않았다. 난막은 두 층으로 구성되어 있었는데 외층은 전자밀도가 높고 비부착성이었으며, 내층은 전자밀도가 중간인 층으로서 전자밀도가 다른 5층으로 구성되어 있었다.

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 and 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, 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
- Brummett AR, Dumont JN, 1979. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*, J. Exp. Zool. 210, 417-434
- Brummett AR, Dumont JN, 1981. A comparison of chorions from eggs of northern and southern populations of *Fundulus heteroclitus*, Copeia 3, 607-614
- Cameron IL, Hunter KE, 1984. Regulation of the permeability of the medaka fish embryo chorion by exogeneous sodium and calcium ions, J. Exp. Zool. 231(3), 447-454
- Cherr GN, Clark WH JR, 1984. An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, J. Exp. Zool. 232, 129-139
- Cherr GN, Clark WH JR, 1985. An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm, J. Exp. Zool. 234, 75-85
- Cotelli F, Andronico F, Bassi R, Brivio M, Ceccagno C, Denis-Donini S, La Rosa ML, Donin CLL, 1986. Studies on the composition, structure and differentiation of fish egg chorion, Cell Biol. Int. Reports 10(6), 471
- Dakin N, 1996. The marine aquarium problem solver, Tetra Press, 120-123
- Dakin N, Sprung J, 1992. The Macmillan book of the marine aquarium, A definitive reference to more than 300 marine fish and invertebrate species and how to establish and maintain a reef aquarium, Macmillan Publishing Company, 262-267
- Deung YK, Reu DS, Kim DH, 1997. Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convic cichlid and discus, cichlidae, teleost, Korean J. Electron Microscopy 27(4), 417-432
- 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
- Flörke-Gerloff, S, E. Töpfer-Petersen, W.B. Schill and W. Engel, 1986, Evolution and development of the outer acrosomal membrane (OAM) and evidence that acrosin-inhibitors are proteins of the OAM, *Andrologia* 19(2), 121-133.
- Fosså SA, Nilsen AJ, 1996. The modern coral reef aquarium, Vol. 1. Birgit Schmettkamp Verlag, 251-268
- Grierson JP, Neville AC, 1981. Helicoidal architecture of fish eggshell, *Tissue Cell* 13(4), 819-830
- Hagström BE, Lönning S, 1968. Electron microscopic studies of unfertilized and fertilized eggs from marine teleosts, *Sarsia* 33, 73-80
- 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
- Ivankov VN, Kurdyayeva VP, 1973. Systematic differences and the ecological importance of the membranes in fish eggs, *J. Ichthyol.* 13, 864-873
- Iwamatsu T, 1983. A new technique for dechoriation and observations on the development of the naked egg in *Oryzias latipes*, *J. Exp. Zool.* 288, 83-89
- Kille RA, 1960. Fertilization of the lamprey egg, *Exp. Cell. Res.* 20, 12-27
- 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* Gunthér, *Bull. Korean Fish. Soc.* 20(1), 16-23
- Kim YU, Park YS, Myoung JG, 1986. Egg development and larvae of the snailfish, *Liparis tanakai* (Gilvert and Burke), *Bull. Korean Fish. Soc.* 19(4), 380-386
- 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. Egg development and larvae of the hornfish, *Hemiramphus sajori*, *Bull. Korean Fish. Soc.* 17(2), 125-131
- 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
- Laale HW, 1980. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review, *Copeia* 2, 210-226
- Lönning S, 1972. Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion, *Sarsia* 49, 41-48

- Lønning S, Davenport J, 1980. The swelling egg of the long rough dab, *Hippoglossoides platessoides limandoides* (Bloch), J. Fish Biol. 17, 359-378
- Mattei, X. and O.T. Thiaw, 1993. Acrosome-like structures in the spermatozoa of teleost fishes, Can. J. Zool., 71, 883-888.
- 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 thickness 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
- Sprung J, Delbeek JC, 1997. The reef aquarium, A comprehensive guide to the identification and care of tropical marine invertebrates, Vol. 2, Ricordea Publishing Inc. 126-131
- Stanley HP, 1971. Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckley*, J. Ultrastruc. Res. 36, 86-102
- 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
- Stehr CM, Hawkes JW, 1983. The development of the hexagonally structured egg envelope of the C-O sole (*Pleuronichthys coenosus*), J. Morphol. 178, 267-284
- 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
- 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 of tomato clown anemonefish. Arrow indicates oil droplets ($\times 40$). Y; yolk, E; egg envelope; P; perivitelline space; A: bundle of adhesive filaments.
- Fig. 2.** A scanning electron micrograph of a fertilized egg (FE) of tomato clown anemonefish. Arrow indicates a bundle of adhesive filaments (Bar=500 μm).
- Fig. 3.** A scanning electron micrograph of the bundle of adhesive filaments in the area of animal pole (Bar=10 μm).
- Fig. 4.** A transmission electron micrograph of a bundle of adhesive filaments by cross section (Bar=500 nm).
- Fig. 5.** A transmission electron micrograph of the fertilized egg envelope of tomato clown anemonefish. The egg envelope is two layered, consisting of an outer, non-adhesive layer (arrow) and the other inner layer (IL) of 5 horizontal lamellae alternating with interlamellae of lower and higher electron densities (Bar=1 μm).



