

# 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 정자형성과정과 정자미세구조

김진희\* · 장묘인<sup>1</sup> · 유명숙<sup>1</sup>

부경대학교 수산과학연구소, <sup>1</sup>부경대학교 자원생물학과

## Spermatogenesis and Spermatozoan Ultrastructure of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)

Jin Hee KIM\*, Myo In CHANG<sup>1</sup> and Myong-Suk YOO<sup>1</sup>

*Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 612-021, Korea.*

*<sup>1</sup>Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Spermatogenesis, ultrastructure, and sperm morphology of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) were investigated with TEM and SEM. *C. gigas* sperm were primitive consisting of a head, midpiece, and tail. Sperm size (head and midpiece) was about 1.78 μm. Sperm morphology was similar to a sharp of a small water jar with a rough surface. Sperm had both anterior nuclear fossa (anf) and posterior nuclear fossa (pnf). Acrosome forms had a hat-like shape. The axial rod was projected in front of the acrosome. *C. gigas* sperm had four large mitochondria in the midpiece.

Key words: *Crassostrea gigas*, Sperm morphology, Spermatogenesis

### 서론

조개류 정자는 일반적으로 표준형정자 (primitive type) (Franzen, 1956; Kim, 2001)이며 물 속에서 수정되는 체외수정 종 (Franzen, 1977)으로 정자형태는 종 특이성을 가진다.

조개류의 표준형정자는 일반적으로 두부, 중편, 그리고 미부로 나눌 수 있으며, 두부는 다양한 모양을 가지고, 중편에는 4-5개의 미토콘드리아, 그리고 꼬리길이는 50 μm 정도이다. 조개류 정자는 침체와 핵의 모양 그리고 중편에 위치한 미토콘드리아의 수 등에서 종 특이성을 가진다. 침체는 일반적으로 고깔모양이나, 종에 따라 형태 변이가 심하고, 더욱이 핵은 그 형태가 다양해 구형, 타원형, cylinder형, 그리고 아주 신장된 cylinder형 등으로 아주 다양하다. 그리고 중편의 미토콘드리아의 수는 일반적으로 과 수준에서 동일하다 (Franzen, 1983; Kim, 2001; Kim and Yoo, 2002).

조개류 정자의 미세구조나 정자의 형태에 관한 연구는 외국에서 다양하게 연구가 수행되어 *Mytilus edulis* (Longo and Dornfield, 1967), *Spisula solidissima* (Longo and Anderson, 1969), *Corbicula sandai* (Hachiri and Higashi, 1970), *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964; Galtsoff and Philpott, 1960; Daniels et al., 1971), 그리고 *Bathymodiolus childressi* (Eckelbarger and Young, 1999) 에 관한 보고가 있다.

그러나 국내의 경우, 정자형태에 관한 연구는 Lee et al. (1999)의 민들조개 (*Gomphina melanaegis*)와 Kim and Yoo (2000)의 참재첩 (*Corbicula leana*)의 연구, 그리고 Kim and Yoo (2002)의 개량조개과 4종의 정자형태 비교가 있다

본 연구는 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 정자형성과정과 정자

의 미세구조 및 외부형태를 조사하였다.

### 재료 및 방법

참굴 (*C. gigas*)의 정자형성과정과 정자미세구조를 조사하기 위해 투과전자현미경 (TEM)과 주사전자현미경 (SEM)을 사용하였다. 먼저 TEM 관찰을 위하여 약 1 mm<sup>3</sup>로 세절한 후, 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) 용액에 2-4시간 (4°C) 동안 전고정 (pre-fixation)을 실시하고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)로 매회 10분씩 3회 수세하였다. 수세 후 시료는 1% OsO<sub>4</sub> (0.1M phosphate buffer, pH 7.3)에 2시간 동안 (4°C) 후고정 (post-fixation)을 하였으며, 단계적으로 ethyl alcohol (50% → 70% → 80% → 90% → 95% → 100%)로 탈수 과정 거친 후, propylene oxide로 30분간 2회에 걸쳐 치환 후 propylene oxide와 epon 혼합물과 그리고 epon A+B 혼합물에 1-3시간 침투시킨 후, epon 812에 포매하였다. 이후 열중합 (polymerization, em oven 37°C, 12시간; 45°C, 12시간; 60°C, 48시간)을 실시하였다.

LKB-V ultramicrotome을 이용하여 0.5-1 μm 두께의 박절편을 만들고, 정확한 조직관찰을 하기 위하여 박절편을 toluidine blue로 염색하여 광학현미경에서 부위를 확인한 후, 전자현미경 관찰을 위해 초박절편 (60-90 nm)을 만들어 200 mesh copper grid에 부착하였다. grid에 부착한 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 JEOL JEM 1200 EX-II 투과전자현미경 (80 KV)으로 관찰하였다.

SEM 관찰을 위해 방정 또는 절개로 얻은 완숙정자를 PC membrane에 도말한 후 전술한 일련의 과정을 거쳐 탈수, Isoamyl acetate에 수용하고 금박 처리 후 SEM으로 관찰하였다.

\*Corresponding author: jiny90000@hotmail.com

## 결 과

### 정자형성과정

**정원세포** 참굴의 정원세포는 정소소관내벽 가장자리를 따라 여러 층으로 분포하고 타원형이나 원형의 핵을 가지며, 염색질의 전자밀도는 낮다. 핵경은 장경  $3.5\ \mu\text{m}$ , 단경  $2.5\ \mu\text{m}$  전후이다. 세포질에는 작은 미토콘드리아 및 다양한 세포소기관이 분포하며, 글리코젠 물질도 관찰된다. 세포질의 전자밀도는 낮고, 세포질다리로 연결되어 있다 (Fig. 1.A).

**정모세포** 이형염색질은 응축되어 염색사 형태로 되어 synaptonemal complex (Fig. 1.A, ▶)가 관찰되며, 핵은 원형에 가깝고, 핵경은  $3\ \mu\text{m}$  전후이다. 세포질에는 정원세포와 유사한 세포소기관이 있고 미토콘드리아는 핵의 후방으로 이동하여 융합된다 (Fig. 1.A). 또한 생식소관 가장자리에는 많은 공포와 다른 세포소기관을 가지는 지질과립성 세포 (adg)와 초기웅성생식세포 주위로 glycogen 물질과 오스늄산에 농축된 과립을 가지는 보조세포 (auxiliary cell)가 관찰된다.

**정세포** 핵은 대체로 구형이고, 염색질은 더욱 응축되어 이형염색질의 분포가 점차로 우세하게 되고, 미토콘드리아는 핵의 뒤쪽으로 이동, 융합되어 커지고 세포질은 점차 소실된다 (Fig. 1.B). 이후 염색질은 뚜렷한 염색사로 되며, 원형의 침체형성포 (pav, proacrosomal vesicle)가 관찰된다. 또한 침체형성포와 맞닿은 자리에는 핵이 후방으로 함입되면서 앞함입홈 (anf, anterior nuclear fossa)이 형성된다. 그리고 정세포 뒤쪽의 미토콘드리아 융합은 더욱 활발하고 세포질은 거의 소실되었다 (Fig. 1.C). 침체는 정자변태과정이 진행되면서 형성된다. 먼저 골지체에 의해 핵의 앞쪽에서 원형의 침체형성포가 형성되며 (Fig. 1.D), 막의 가장자리를 따라 뒤쪽이 함입되면서 사발을 엮어놓은 형태 (Fig. 1.E), 이후 침체물질 부분에서 발달한 침체간에 의해 앞쪽으로 함입이 진행되고 침체간이 침체포를 관통하여 전방으로 돌출되어 침체가 완성된다 (Fig. 1.F,G,I).

**정자** 참굴의 정자 크기 (두부+중편)는  $1.78\ \mu\text{m}$  전후이며, 핵의 길이는  $0.90\ \mu\text{m}$ , 핵의 넓이는  $1.36\ \mu\text{m}$ , 핵의 둘레는  $4.00\ \mu\text{m}$  전후였다. 정자의 형태는 핵의 표면이 아주 거친 뚜껑이 있는 단지모양으로 침체간이 침체의 앞쪽으로 돌출되어 있다. 침체포는 고밀도부가 균일하게 분포하며, 깊게 함입된 앞함입홈에는 과립형의 침체물질이 있고, 핵의 뒤쪽에는 뒤함입홈 (pnf, posterior nuclear fossa), 그리고 돌기도 관찰된다 (Fig. 1.H,I,J).

중편에는 근위중심립과 원위중심립이 수직으로 위치하고, 근위중심립에서 돌기가 뒤함입홈으로 돌출되어 있고 (Fig. 1.H, ▶), 4개의 미토콘드리아는 중심립을 둘러싸고 있다 (Fig. 1.L,K,I. insert).

미부에는 원위중심립에서 발달한 꼬리가 있으며, 9+2구조인 중심이중소관 (cd, central doublet)과 주변이중소관 (pd, peripheral microtubls)이 관찰되고 (Fig. 1.L,M), 주변이중소관 자리에 하나의 소관이 있고 중심이중소관을 가지는 8+2 구조

(Fig. 1.M ▶)도 관찰된다.

## 고 찰

조개류의 정자형성과정은 다른 종과 유사하여 (Longo and Dornfield, 1967; Sakker, 1984; Bernard and Hodgson, 1985; Kim and Yoo, 2000a, 2002), 핵내의 염색질은 감수분열 과정을 거쳐 점차적으로 응축되어 굵어지며, 세포질은 소실된다. 따라서 초기 웅성생식세포로는 종 또는 속 특이성을 판단하기 어렵다. 그러나 이후 염색질의 응축에 의해 형성되는 염색사의 발달 양상은 핵의 모양을 결정하는 것으로 보고되어 있다 (Kim and Yoo, 2002). 본 종의 경우에도 염색사가 상하로 길어지는 형태라기 보다는 좌우로 두터워지는 현상을 보여 정자 핵은 둥근 단지모양으로 발달하여 앞선 보고와 잘 부합된다.

정자변태과정을 통해 정자가 형성되는 과정에서 가장 먼저 일어나는 변화는 침체의 형성이다. 침체는 종에 따라 다르게 형성되어 정모세포나 정원세포의 세포질에 원형의 침체형성과립 (pag, proacrosomal granule)이 출현하고, 서로 융합되어 침체를 형성하고 (Eckelbarger and Young, 1999), 골지체에 의해 침체형성포가 형성되어 침체로 된다 (Healy, 1989). 참굴은 골지체에 의해 침체형성포가 만들어지는 현상이 뚜렷히 관찰되었다. 그리고 침체는 종 또는 속, 과 수준에서 특이성을 보인다는 보고 (Kim, 2001; Kim and Yoo, 2002)가 있으며, 이는 침체가 주요한 분류형질로의 사용가능함을 반증한다.

침체물질 (sm, subacrosomal materials)은 침체포와 핵 사이에 섬유성 물질, 또는 포상의 과립물질로 구성되어 있다. 이 물질의 축적 과정은 pulmonate snail (*Euhadra hickonis*) (Takaichi and Dan, 1977)에서 보고되었다. 본 종의 경우 침체물질이 생기는 과정은 명확하지 않으나 핵의 앞쪽에 만입에 의해 공간이 확보되면서 세포질 성분과는 다른 물질인 포상의 과립으로 채워지고, 또한 앞함입홈에서 침체의 전단부로 섬유상 물질이 생겨 침체간을 형성하는 것으로 보이나 서로 형태적으로 다른 물질의 변환과정, 생성 기작은 명확하지 않아 이후 계속적 연구가 필요하다.

동물의 정자는 일반적으로 표준형정자 (primitive type), 부정형정자 (modified type), 이미형정자 (biflagellate type) 그리고 무미형정자 (aflagellate type)으로 나눌수 있고 (Verdonk et al., 1983), Popham (1979)은 조개류 정자 핵의 모양을 구형, 타원형, cylinder 형으로 크게 나누었다. 참굴의 정자모양은 단지모양의 타원형이고 두부와 중편, 그리고 미부로 구성되어 있는 표준형정자이다. 핵의 표면이 거친 것은 염색질의 응축으로 굵은 염색사로 되면서 나타나는 현상으로 판단된다. 그리고 두부의 침체 전방으로 돌출된 침체간은 SEM으로만 관찰이 가능하여 정자형태를 연구하는데 다양한 방법이 동원되어야 할 것으로 판단된다. 그리고 핵의 뒤, 근위중심립에서 돌출된 돌기는 생성기작과 기능은 알 수 없지만 본 종의 특이 구조로 파악된다.

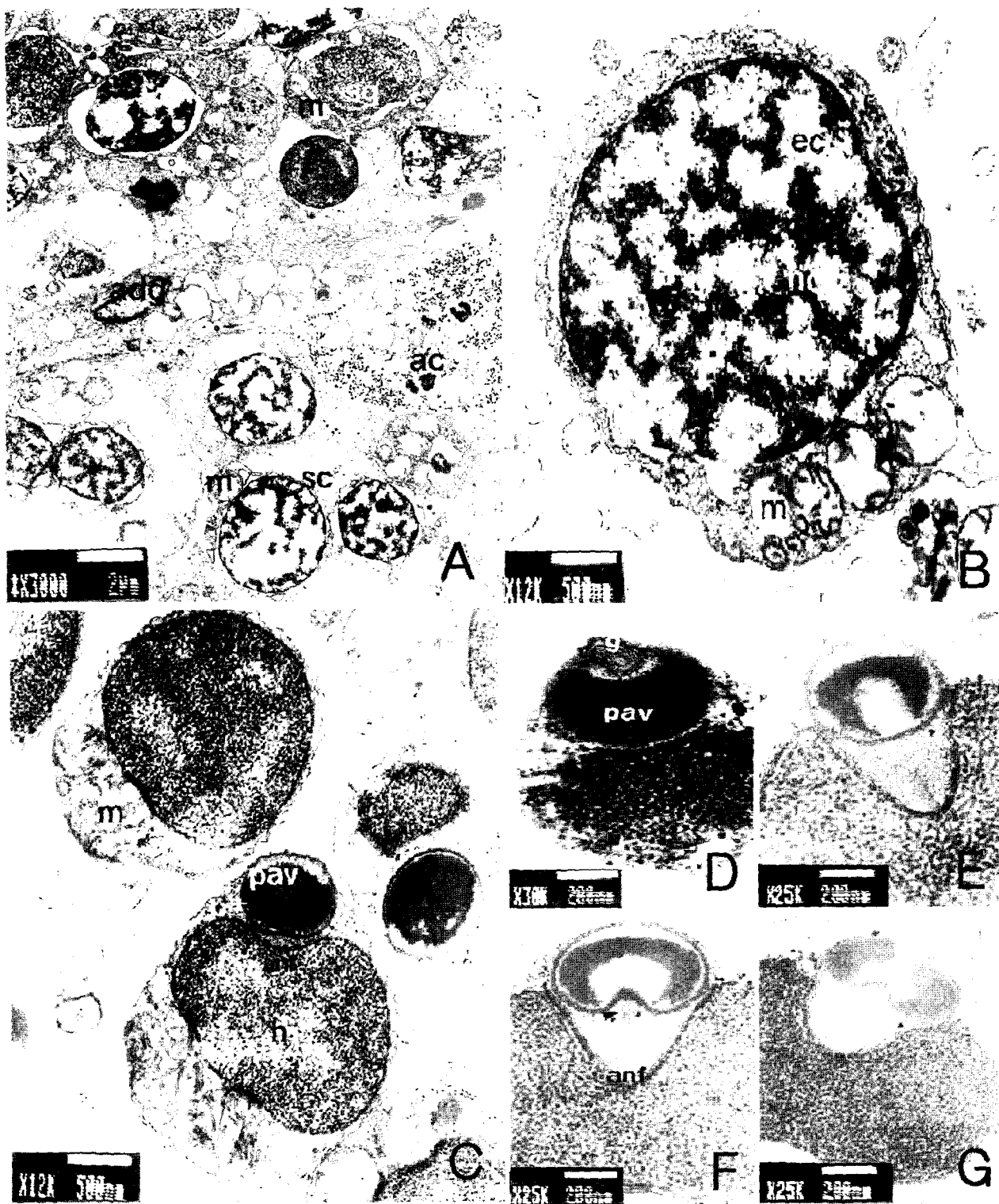


Fig. 1. Spermatogenesis and sperm morphology of Pacific oyster (*C. gigas*).

A. Section of spermatogonia and spermatocytes. (▶, synaptonemal complex); B, C. spermatid in spermiogenesis; D-G. Formation of acrosome (F. ▶, appearance of acrosomal rod); ac, auxiliary cell; adg, adipogranular cell; anf, anterior nuclear fossa; ec, euchromatin; g, golgi body; hc, heterochromatin; m, mitochondria; n, nuclear; pav, proacrosomal vesicle; sc, spermatocyte; sg, spermatogonia.

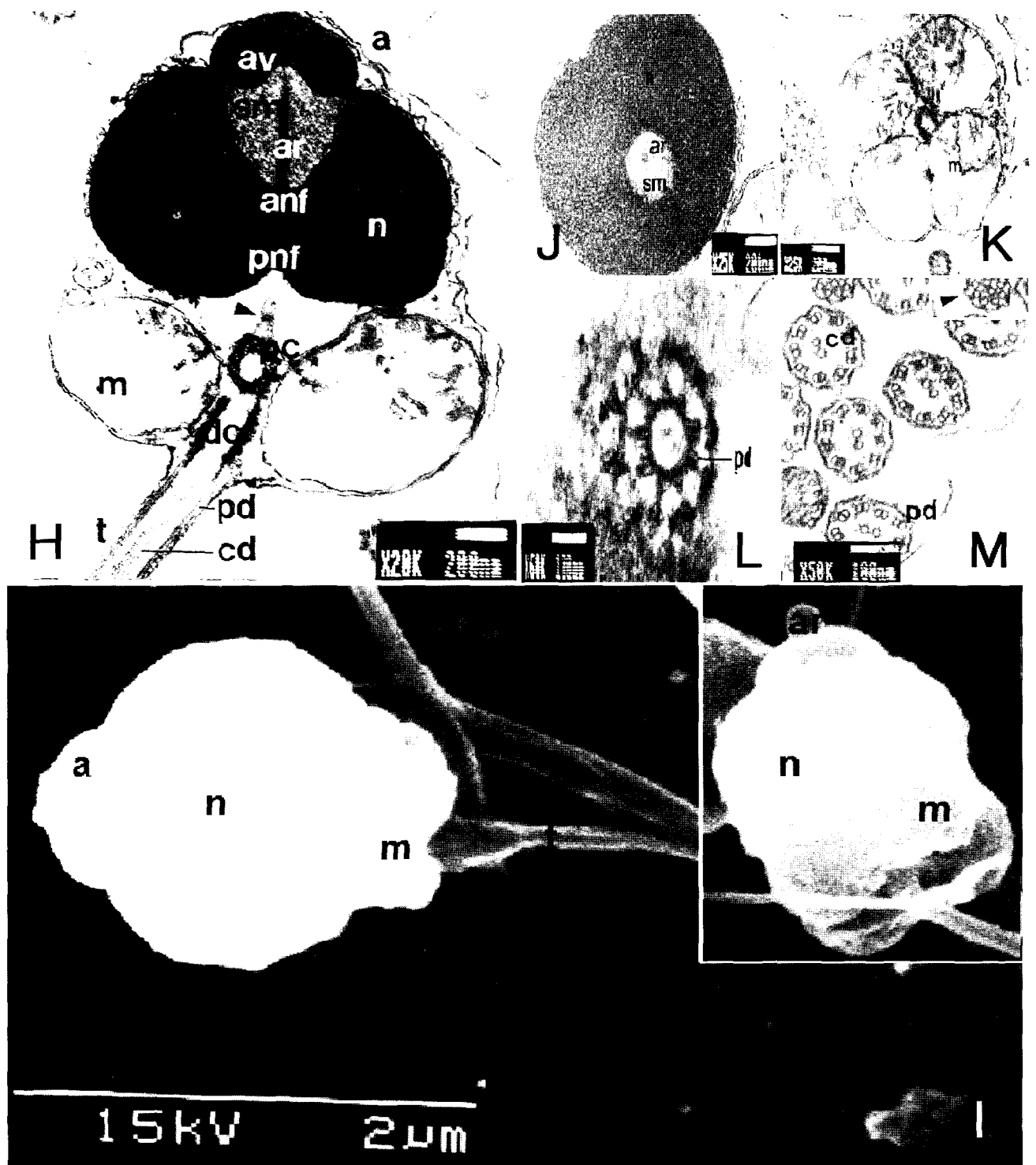


Fig. 1. continued.

H. Mature spermatozon observed by TEM (▶, centriole process); I. Mature spermatozoa observed by SEM; J. Cross section of nuclear of anterior part; K. mitochondria of midpiece showing large four mitochondria; L. distal centriole; M. 9+2 structure of tails. a, acrosome; anf, anterior nuclear fossa; ar, acrosomal rod; av, acrosomal vesicle; cd, central doublets; dc, distal centriole; m, mitochondria; n, nuclear; pc, proximal centriole; pd, peripheral microtubules; pnf, posterior nuclear fossa; sm, subacrosomal material.

중편에는 4개의 미토콘드리아가 있고, 꼬리 구조는 일반적인 9+2 구조이고 주변이중소관의 위치에 하나의 소관을 가진 8+2 구조는 참굴 정자 꼬리의 말단부로 판단된다.

참 고 문 헌

Bernard, R.T.F. and A.N. Hodgson. 1985. Fine structure of the sperm and spermatid differentiation in the brown mussel *Perna perna*. S. Afr. J. Zool., 20, 5-9.

Daniels, E.W., A.C. Longwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang. 1971. Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. Trans. Am. Microsc. Soc., 90, 275-282.

Eckelbarger K.J. and C. M. Young. 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiulus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). Mar. Biol., 135, 635-646.

Franzen, A. 1956. On spermoogenesis. Morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. Zool. Bidr. Upps., 31, 355-482.

Franzen, A. 1977. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. Verh. Dt. Zool. Ges., 123-128.

Franzen, A. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa, Gamete Res., 7, 199-214.

Galtsoff, P.S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. US Fish. Wildl. Serv. Fish Bull., 64, 1-480.

Galtsoff, P.S. and D.E. Philpott. 1960. Ultrastructure of the spermatozoon of the oyster, *Crassostrea virginica*. J. Ultrastruct. Res., 3, 241-253.

Hachiri, S. and Higashi, S. 1970. Spermiogenesis in the freshwater mussel *Corbicula sandai*. J. Educ. Dept., Shiga Univ., Nat. Sci., 20, 35-39.

Healy, J. M. 1989. Spermiogenesis and spermatozoa in the relict bivalve genus *Neotrigonia*: Relevance to

trigonioid relationships, particularly Unionoidea. Mar. Biol., 103, 73-85.

Kim J.H. 2001. Spermatogenesis and comparative ultrastructure of spermatozoa in several species of Korea economic bivalves (13 Family, 34 species). Ph.D. Thesis. Pukyong National University.

Kim, J.H and M.S. Yoo. 2000. Spermatogenesis and sperm morphology in marsh clams, *Corbicular leana* (Prime). J. Kor. Fish. Soc., 33(3), 171-175.

Kim J.H. and M.S. Yoo. 2002. Spermatozoan ultrastructure of 4 species in Mactridae. J. Kor. Fish. Soc., 35(5), 504-511.

Lee, J.Y., Y.H. Park and Y.J. Chang. 1999. Gonadal development and reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (Bivalvia: Veneridae). J. Kor. Fish. Soc., 32(2), 198-203.

Longo, F.J. and E. Anderson. 1969. spermiogenesis in the surf clam *Spisula solidissima* with special reference to the formation of the acrosomal vesicle. J. Ultrastr. Res., 27, 435-443.

Longo, F.J. and E.J. Dornfield. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*, J. Ultrastruct. Res., 20, 462-480.

Popham, J.D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. Malacol. Rev., 12, 1-20.

Sakker, E.R. 1984. Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chtonis (Mollusca, Polyplacophora). Zoomorphology, 104, 111-121.

Takaichi, S. and J.C. Dan. 1977. Spermiogenesis in the pulmonate snail *Euhadra hickonis*. I. Acrosome formation. Dev. Growth Differ., 20, 301-315.

Verdonk, N.H., J.A.M. Biggelaar and A.S. Tompa. 1983. The Mollusca, Vol. III, Development. New York, Academic Press, pp. 7.

2003년 11월 12일 접수  
2003년 12월 20일 수리