

기수재첩 (*Corbicula japonica*)의 정자형성과정과 정자 미세구조

이정용* · 김완기 · 이채성 · 장영진¹
 국립수산과학원 동해수산연구소, ¹부경대학교 양식학과

Spermatogenesis and Sperm Ultrastructure of the Marsh Clam (*Corbicula japonica*) (Bivalvia: Veneridae)

Jeong Yong LEE*, Wan Ki KIM, Chae Sung LEE and Young Jin CHANG¹
 East Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Gangnung 210-807, Korea
¹Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the marsh clam (*Corbicula japonica*) were investigated by electron microscopic observations. Testis of the marsh clam consists of numerous spermatogenic follicle containing germ cells in the different developmental stages. Spermatogonia are located nearest the outer wall of the follicle, while spermatocytes and spermatids are positioned nearer to the lumen. Spermatogonia are oval-shaped and about 5 μm in diameter. Spermatogonia develop into spermatocyte, spermatid and spermatozoon. In the spermatid to about 2 μm in diameter, cytoplasm decreases and mitochondria move to the base of the nucleus and fuse into several spheres, the centrioles become orthogonally oriented, a flagellum appears, and an acrosomal vesicle forms. The mature sperm has primitive type, consisting of a head, a midpiece and a tail. The sperm was arrow-shaped, and its head is about 8 μm long and comprised of a long nucleus and an acrosome. The four mitochondria encircled the centrosome in midpiece. The flagellum had the classical 9+2 axoneme structure, and axonemal lateral fins in the tail were observed.

Key words: Marsh clam, *Corbicula japonica*, Ultrastructure, Spermatogenesis

서론

연체동물중 조개류는 약 10,000종이 존재하며 (Eversole, 1989), 대부분 산란기에 알과 정자를 수중으로 방란·방정하여 수정하는 체외수정한다 (Franzen, 1977). 조개류 생식소의 해부학적 구조 및 생식세포의 미세구조는 생식생태 및 계통에 따라 종특이성을 가지며, 특히 종에 따라 정자 모양이 다양하기 때문에 많은 연구자들은 미세구조의 차이가 분류적 목적으로 이용 가능함을 보고하였다 (Franzen, 1956, 1977, 1983; Popham, 1979). 일반적으로 조개류의 정자는 핵과 침체의 모양, 침체기둥의 유무, 미토콘드리아의 수, 편모의 수 및 형태 등에서 다양한 특징을 보인다 (Morse and Zardus, 1997).

우리나라에는 재첩 (*Corbicular fluminea*), 참재첩 (*C. leana*), 기수재첩 (*C. japonica*) 등이 있으며, 호수 및 하천의 담수 또는 기수에 분포하고, 형태적 변이가 아주 심하다 (Jung, 1977; Jo et al., 1998; Kim et al., 2002). 재첩류의 정자 미세구조에 관한 연구는 Kim and Yoo (2000a)의 섬진강 하구 참재첩을 대상으로 한 연구 등이 있으나 다른 재첩류에 관한 미세구조 연구는 거의 없다.

이 연구는 강원도 양양 남대천에 서식하는 기수재첩의 정자형성과정 중 형태적 특징과 미세구조를 조사하였으며, 아울러 분류학적 측면으로 적용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험에 사용된 기수재첩은 2000년 4월과 8월에 강원도 양양군 남대천 하구에서 채취한 각장 2.2-3.2 cm, 전중 8.4-15.2 g 범위의 암수 각각 4마리의 성숙개체였다. 채취된 재료는 활패상태로 실험실로 옮겨 절개법으로 생식소 부위를 적출하여 파라핀 절편법에 의해 5 μm 두께로 연속절편한 후, Mayer's hematoxylin과 0.5% eosin (H-E)의 비교염색을 실시하였다. 또한 정자형성과정과 정자의 미세구조를 파악하기 위하여 생식소의 일부를 채취하여 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2)으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액에 4℃에서 2시간 동안 전고정 (pre-fixation)하였다. 이후 PBS로 10분간 세척한 다음, 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 4℃에서 2시간 동안 후고정 (post-fixation)하였다. 고정이 끝난 재료는 다시 PBS로 세척하고 50-100%의 단계별 ethanol 농도에서 15분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 propylene oxide와 epon의 혼합물에 넣어 37, 45 및 60℃에서 각각 12, 24 및 48시간씩 중합시킨 다음, epon 812에 포매하였다. 포매된 생식세포의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)에 의해 두께 0.5 μm로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포매 시료는 다시 70 nm 두께로 초박절 (ultrathin section)하였다. 초박절한 절편은 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM 1200 E-XII, 60-80 Kv, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

*Corresponding author: jylee@nfrdi.re.kr

결 과

발달중인 정소소낭 (spermatogenic follicle)의 생식상피 위에는 여러층의 정원세포 (spermatogonia, sg)가 배열되어 있었으며, 내강의 안쪽에는 일부 정모세포 (spermatocyte, sc) 단계의 생식세포가 관찰되었다 (Fig 1A). 이후 성숙 정소소낭에서는 대부분 변태 완료된 정자 (spermatozoa, sz)로 채워져 있었으며, 일부 생식상피 위에 정세포 (spermatid, st)와 정모세포 및 정원세포가 나타나 여러 단계의 생식세포들이 관찰되었다 (Fig. 1B).

정원세포의 미세구조는 불규칙적인 세포질 내에 장경 4 μm , 단경 2 μm 전후의 타원형 핵을 가지고 있었고, 핵내에는 여러 모양의 염색질이 산재하였으며, 핵 주위 세포질에는 미토콘드리아와 같은 세포소기관이 다수 나타났다 (Fig. 2A). 정원세포는 직경 4 μm 전후의 원형에 가까운 둥근 핵을 가진 정모세포로 변화하였고, 핵 주위 세포질에는 많은 골기체 (Golgi complex)를 관찰할 수 있었으며 (Fig. 2B), 이후 세포질은 축소되고 핵경은 작아져 3 μm 전후로서, 핵내에는 염색질의 응축이 활발히 이루어지고 있었다 (Fig. 2C). 핵경 2 μm 전후의 원형으로 변화한 정세포의 핵내에는 응축정도가 서로 다른 다양한 이형염색질들이 관찰되었으며, 세포질은 거의 나타나지 않았다 (Fig. 2D). 또한 정세포의 발달단계에 따라 핵의 후단부에는 2개의 미토콘드리아와 침체포 (acrosomal vesicle)가 관찰되었으며 (Fig. 2E), 이후 침체포는 핵의 전단부로 이동하였고 (Fig. 2F), 후단부에는 미토콘드리아와 중심립이 편모와 연결되어 있었다 (Fig. 2G). 정세포 분화 말기에는 과립상의 염색질은 섬유상으로 밀집되어 나타나며, 핵은 화살모양으로 신장되는데 이 시기에 핵의 전단부에서는 미세섬유상의 침체기둥 (acrosomal rod)을 가진 침체가 관찰되었다 (Fig. 2H).

변태를 완료한 정자는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었으며, 머리를 한 곳으로 향하여 다발을 형성하고 있었다 (Fig. 3A). 머리는 핵과 침체로 구성되어 있었으며, 치밀한 핵질로 충만한 화살모양의 핵의 길이는 약 5.5 μm 였으며, 선단에 침체가 존재하였다 (Fig. 3B). 완숙 정자의 꼬리는 1개의 편모구조로서, 편모는 편모축사 좌우로 날개모양의 axonemal lateral fin이 확인되었으며, 횡단면은 한쌍의 중심 미소세관과 아홉쌍의 주변 미소세관을 가지는 9+2 구조를 나타냈다 (Fig. 3C). 침체는 길이 약 2.5 μm 의 화살모양으로서 중간에 침체기둥과 과립상의 물질이 관찰되었으며 (Fig. 3D), 횡단면을 관찰한 결과에서도 전자밀도의 차이가 나는 2개 부분으로 구분 가능하였다 (Fig 3E). 중편부에는 길이 약 0.6 μm , 타원형 미토콘드리아가 머리부분과 수직으로 연결되어 있었으며, 중앙에 원단중심소체 (distal centriole) 및 기부중심소체 (proximal centriole)가 편모와 연결되어 있었다 (Fig. 3F). 중편부를 횡단면을 관찰한 결과, 미토콘드리아는 4개로 관찰되었다 (Fig. 3G).

고 찰

조개류의 번식생물학적 연구중 생식세포의 미세구조에 관하여는 가리비류 (Lubet et al., 1987; Dorange and Le Penec, 1989), 담치류 (Longo and Dornfield, 1967; Pipe, 1987) 및 굴류 (Daniels et al., 1973; Eckelbarger and Davis, 1996a,b), 북방대합 (*Spisula sachalinensis*) (Lee et al., 2003) 등에서 많은 연구가 이루어져 있다.

조개류의 정자는 정원세포, 정모세포, 정세포 그리고 정자로의 변태과정을 거쳐 체외로 방출되며 (Hodgson and Bernard, 1986; Eckelbarger and Davis, 1996b; Kim and Yoo, 2000b), 조직학적으로 하나의 생식소관 내에 다양한 형태의 정자발달

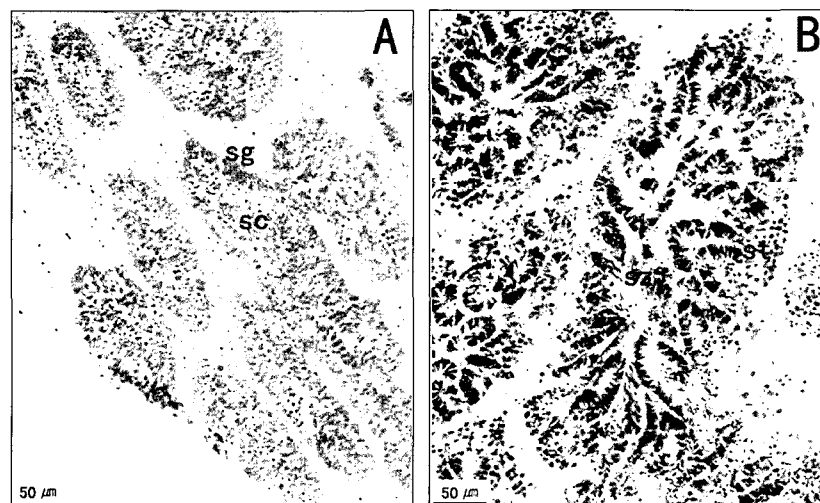


Fig. 1. Testicular structure of marsh clam (*Corbicula japonica*). A, Photomicrograph of spermatogenic follicle in early spermatogenesis. B, Spermatogenic follicle in testicular ripe stage. sc, spermatocyte; sg, spermatogonia; st, spermatid; sz, spermatozoa.

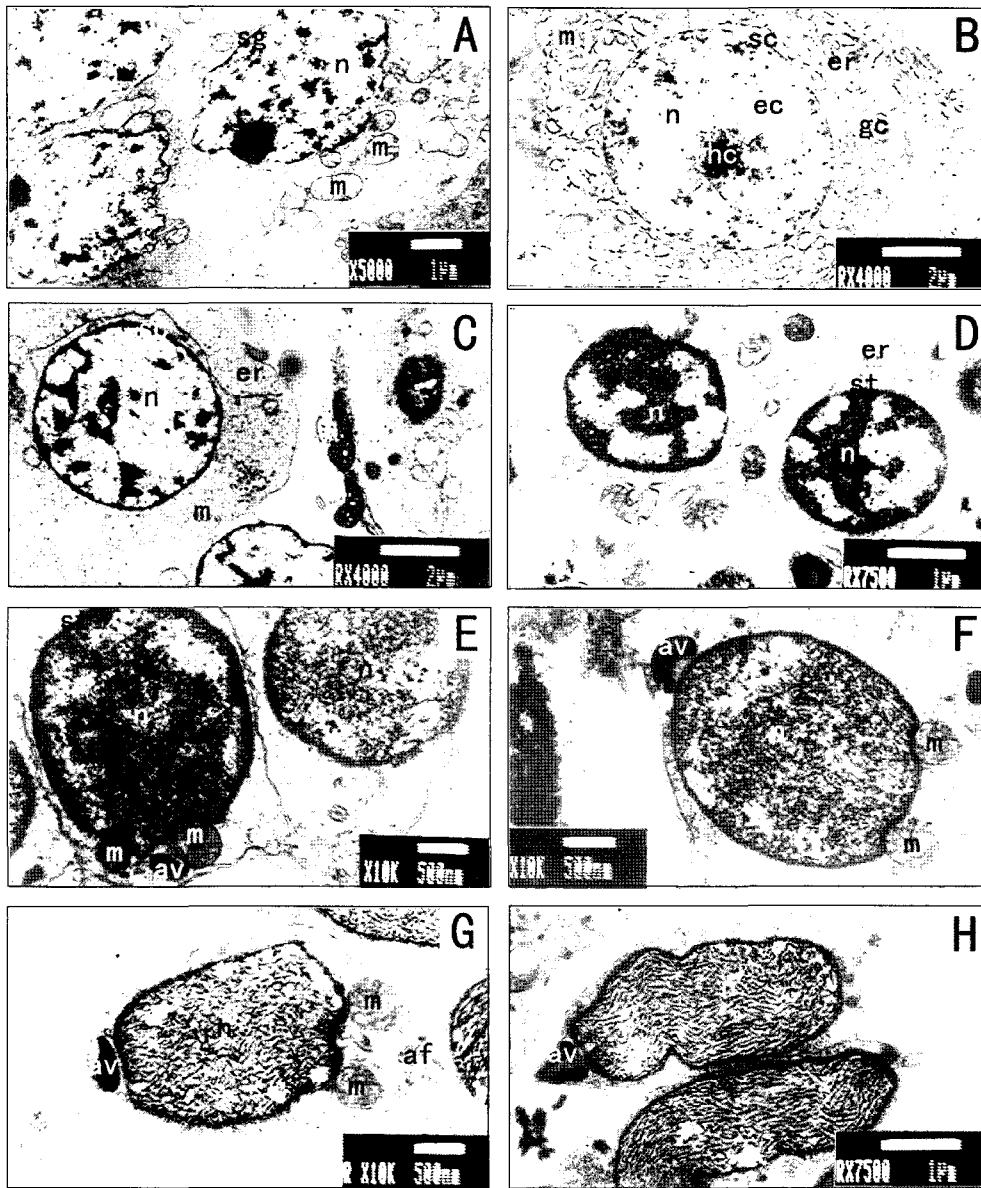


Fig. 2. Transmission electron micrographs of maturing spermatozoa of marsh clam (*Corbicula japonica*). A, section of spermatogonium; B, section of early spermatocyte. C, section of post spermatocyte. D, section of early spermatid; E, F, G and H, section of spermatid. af, axial filament; av, acrosomal vesicle; ec, euchromatin; er, endoplasmic reticulum; gc, Golgi complex; m, mitochondrion; n, nucleus; sc, spermatocyte; sg, spermatogonium; st, spermatid.

단계가 관찰된다 (Kim et al., 2003). 이 연구에서 기수재첩도 동일한 과정으로 발달하며, 같은 생식소관 내에 다양한 형태의 정자발달 단계가 관찰되었다. 정자형성 미세구조에 있어서도 참재첩은 타원형의 세포질내에 4 μ m 전후의 등근핵을 가진 정원세포가 지름 2.5 μ m의 핵으로 응축된 정모세포를 거쳐 정세포로 발달하며, 이후 미토콘드리아와 침체 및 꼬리가 형성되는 정자로의 변태과정을 거친다 (Kim and Yoo, 2000a). 이 연구에서 기수재첩의 정자형성과정도 참재첩과 유사한 형태를 보임으로써 정자형성과정에는 차이가 없는 것으로 판단된다.

조개류의 정자 구조는 종의 진화와 관계가 있어 분류학적 기준이 되며, 특히 꼬리나 중편의 미세구조보다는 핵의 모양, 특히 침체의 모양에서 큰 차이를 보인다 (Popham, 1979). 많은 연구자들이 조개류 정자에 있어서 미세구조의 차이를 분류적 목적으로 이용하였는데, Franzen (1956)은 정자를 체외수정형 종들이 가지는 “primitive type”과 체내수정형 종들이 가지는 “modified type”로 구분하였으며, primitive type 정자들의 형태학적 특징은 종에 따라 다양한 모양의 핵과 침체로 구성되는 두부, 4-5개의 미토콘드리아로 이루어진 중편부 및 약 50 μ m 길이의 편모로 이루어져 있다고 보고하였다. 이러한 기준으로

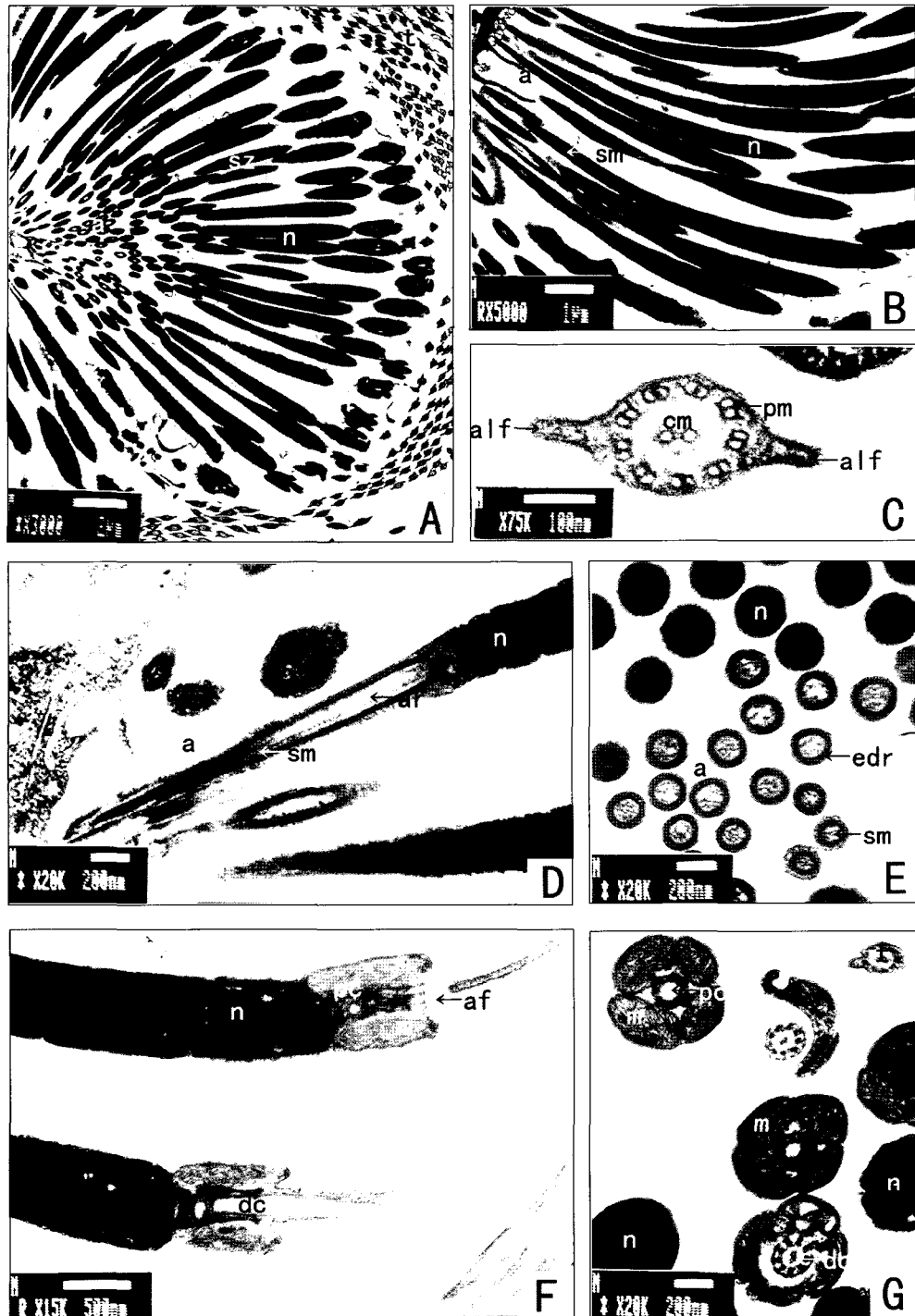


Fig. 3. Transmission electron micrographs of matured testicular sperm of marsh clam (*Corbicula japonica*). A, section of sperm bundles within the spermatogenic follicle; B, longitudinal section of sperm. C, cross section of flagellum. D, longitudinal section of a acrosome. E, cross section of nucleus and acrosomal part. F, longitudinal section of the midpiece. G, cross section of the midpiece. a, acrosome; af, axial filament; alf, axonemal lateral fin; ar, acrosomal rod; cm, central microtubules; dc, distal centriole; edr, electron-dense regions; m, mitochondrion; n, nucleus; pc, proximal centriole; pm, peripheral microtubules; sm, subacrosomal material; sz, spermatozoa.

볼 때, 이 연구 결과 기수채첩의 정자는 체외수정 종으로 두부는 핵과 침체로 구성되고, 중편에는 4개의 미토콘드리아를

가지며, 편모는 하나로 전형적인 조개류의 “primitive type” 정자를 가지고 있었다.

기수재첩의 정자는 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a)과 유사한 화살모양이었으며, 원뿔형의 참가리비 (*Patinopecten yessoensis*) (Park, 1998)나 민들조개 (*Gomphina melanaegis*) (Lee et al., 1999)의 정자보다는 가늘고 긴 형태로, 송곳모양의 침체기둥이 침체포에 싸여 있고 원형의 핵을 가진 북방대합 및 난원형의 핵을 가진 진주담치 (*Mytilus edulis*) (Nijima and Dan, 1965)와는 차이를 보였다. 또한 기수재첩 정자의 핵 길이는 약 5.5 μm 로서 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a)의 9 μm 전후보다는 짧은 것으로 나타났다.

정자의 침체는 주로 침체포 (acrosomal vesicle)와 침체기둥 (perforatorium, acrosomal rod 또는 axial rod)이라고 불리는 subacrosomal substance로 구성되는데, 침체포를 형성하는 proacrosomal granule은 골기체로부터 유래되며 (Dohnen, 1983), 이들 골기체의 활성화 및 침체포의 형성시기는 보통 제2정모세포 또는 초기 정세포 단계이다 (Hodgson and Bernard, 1986). 기수재첩의 침체도 침체포와 섬유상의 침체기둥으로 구성되어 있었다. 침체포는 정세포 초기에 나타났으며, 침체기둥은 정세포 후기에 형성되는 것으로 관찰되었다.

조개류 정자의 침체와 머리 형태는 난막에서의 차이로 나타나며, 정자의 침체 구조는 난모세포의 난막과 관련이 있다 (Hylander and Summers, 1977). 본 연구에서 난모세포의 난막 미세구조는 조사하지 않았으나 침체의 모양은 화살모양으로 다른 백합목의 조개류와 유사하였으나, 길이는 약 2.5 μm 로 약 3 μm 의 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a)보다 짧았으며, 1.0 μm 의 북방대합 (Lee et al., 2003)보다 길었다. 또한 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a)과 같이 북방대합에서 보고되었던 긴 원뿔모양의 침체간과 핵질과 인접한 지역에 꽃받침 모양의 전자밀도가 높은 basal ring 같은 구조는 나타나지 않았다.

중편부에는 4개의 미토콘드리아를 가지고 있어 5개의 미토콘드리아를 가진 진주담치 (Nijima and Dan, 1965), 가무락 (*Cyclina sinensis*) (Chung et al., 1991) 및 버지니아굴 (*Crassostrea virginica*) (Eckelbarger and Davis, 1996b)과는 차이가 있었으나 같은 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a), 참가리비 (Park, 1998), 민들조개 (Lee et al., 1999) 및 대복 (*G. veneriformis*) (Park et al., 2002) 등과는 동일하였다.

꼬리부는 다른 조개류와 같이 9+2의 전형적인 편모구조로 이루어져 있었으나 편모에는 참재첩 (Kim and Yoo, 2000a)에서 보고되지 않았던 편모축사 좌우로 날개모양의 axonemal lateral fin을 가지고 있었다.

이상과 같이 기수재첩의 정자는 수정을 위한 종특이적인 형태를 가지고 있으며, 특히 정자의 형태는 분류학적으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

Chung, E.Y., T.Y. Lee and C.M. An. 1991. Sexual maturation of the venus clam, *Cyclina sinensis*, on the west coast of Korea. J. Med. Appl. Malacol.,

3, 125-136.
 Daniels, E.W., A.C. Longwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang. 1973. Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. Trans. Am. Microsc. Soc., 90, 275-282.
 Dohnen, M.R. 1983. 1. Gametogenesis. In: The Mollusca, Verdonk N.K., Van Den biggelaar JAM, A.S. Tompa, eds, Academic Press, New York, pp. 1-48.
 Dorange, G. and M.L. Penneec. 1989. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia). Invert. Reprod. Dev., 5, 109-117.
 Eckelbarger, K.J. and C.V. Davis. 1996a. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. Mar. Biol., 127, 79-87.
 Eckelbarger, K.J. and C.V. Davis. 1996b. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. Mar. Biol., 127, 89-96.
 Eversole, A.G. 1989. Gametogenesis and spawning in North American clam populations: implications for culture. In: Clam Mariculture in North America, Manzi, J.J., W. Castagna, eds, Elsevier, New York, pp. 75-108.
 Franzen, A. 1956. On spermiogenesis. 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. Dtsch. 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.
 Hodgson, A.N. and R.T.F. Bernard. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of *Mytilidae* (Mollusca, Bivalvia). Gamete Res., 15, 123-135.
 Hylander, B.L. and R.G. Summers. 1977. An ultrastructural analysis of gametes and early fertilization in two bivalve molluscs, *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima*, with special reference to gametebinding. Cell Tiss. Res., 182, 469-489.
 Jung, J.Y. 1977. Ecological studies of a brackish water clam, *Corbicula japonica* from Nag Dong river. Nat. Fresh Water Fish Hat. of Fish. Cheong-pyong, Korea. 2, 130-140 (in Korean).
 Jo, M.K., K.S. Byun and M.H. Jang. 1998. Distribution

- and ecology of genus *Corbicula* in the North Kyung-sang province. I. Distribution and classification of genus *Corbicula* in the North Kyung-sang province. *J. Aquacult.*, 11, 581-592. (in Korean)
- Kim, J.H. and M.S. Yoo. 2000a. Spermatogenesis and sperm morphology in marsh clams, *Corbicular leana* (Prime). *J. Kor. Fish. Soc.*, 33, 171-175. (in Korean)
- Kim, J.H. and M.S. Yoo. 2000b. Reproductive cycle of marsh clams, *Corbicular leana* (Prime) in Hyongsan Estuary. *J. Kor. Fish. Soc.*, 33, 184-191. (in Korean)
- Kim, W.K., C.S. Lee, J.Y. Lee, K.K. Baik and S.B. Hur. 2002. Environmental factors and population density of brackish water clam, *Corbicula japonica* on Namdae stream in Yangyang, Gangwon. *J. Aquacult.*, 15, 1-6. (in Korean)
- Kim, W.K., J.Y. Lee, C.S. Lee, C.M. An, H.S. Kim, C.Y. Choi, J.W. Kim, E.Y. Chung and B.S. Kim. 2003. Reproductive cycle and the sex ratio of *Corbicula japonica* from Namdae stream in Gangwon-do, Korea. *Kor. J. Malacol.*, 19, 117-124. (in Korean)
- Lee, J.S. and J.B. Kim. 1997. Systematic study on the genus *Corbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in Korea. *Kor. J. Syst. Zool.*, 13, 233-246. (in Korean)
- Lee, J.Y., Y.J. Chang and Y.J. Chang. 2003. Ultrastructure of germ cell during the gametogenesis in surf clam, *Spisula sachalinensis*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 36, 157-162. (in Korean)
- Lee, J.Y., Y.J. Park and Y.J. Chang. 1999. Gonadal development reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (bivalve; veneridae). *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 198-203. (in Korean)
- Longo, J.C and B.J. Dornfield. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Ultrastruc. Res.*, 20, 462-480.
- Lubet, P., J.Y. Besnard, R. Faveris and R. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille Saint Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis*, 13, 265-290.
- Morse M.P and J.D. Zardus. 1997. Bivalvia. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison F.W. and A.J. Kohn, eds, Wiley-Liss Inc, New York, pp. 7-118.
- Niijima, L. and J.C. Dan. 1965. The acrosome reaction in *Mytilus edulis*. 1. Fine structure of the intact acrosome. *J. Cell Biol.*, 25, 243-248.
- Park, C.K., J.J. Park, J.Y. Lee and J.S. Lee. 2002. Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the equilateral venus *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Kor. J. Electron Microscopy*, 32, 303-310. (in Korean)
- Park, Y.J. 1998. Biological studies on aquaculture of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). Ph. D. Thesis, Cheju Natl. Univ., Cheju, Korea, pp. 187. (in Korean)
- Pipe, R.K. 1987. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis edulis*. *Mar. Biol.*, 96, 519-528.
- Popham, J.D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacol. Rev.*, 12, 1-20.

2004년 5월 28일 접수

2004년 8월 23일 수리