

경골어류 카라신과 *Hyphessobrycon serpae*의 수정란 난막 미세구조

김 동 회¹, 등 영 건¹, 이 규 재*
¹연세대학교 원주의과대학 기초과학교실,
기생충학교실 · 연세대학교 기초의학연구소

Ultrastructure of the Fertilized Egg Envelope from *Hyphessobrycon serpae*, Characidae, Teleost

Dong Heui Kim¹, Young Kun Deung¹ and Kyu Jae Lee*
¹Dept. of Basic Science, Parasitology and Institute of Basic Medical Science,
Wonju College of Medicine,
Yonsei University, Wonju 220-701, Korea.
(Received June 10, 2005; Accepted June 24, 2005)

ABSTRACT

The ultrastructures of the fertilized egg envelope from *Hyphessobrycon serpae* belonging to Characidae was studied using scanning and transmission electron microscopes to get systematic fundamental data for classification of species and to confirm whether micropyle is a common trait of Characidae or not.

The fertilized egg was of colorless, transparent, spherical, adhesive and demersal type. There were not oil droplets in vitelline membrane and attached structures in the outside of fertilize egg envelope. The egg envelope had a single micropyle resembling the pathway of sperm in the area of the animal pole. The micropyle was surrounded by 13 to 15 protruded lines of the egg envelope in a radiated form. The outer surface of fertilized egg envelope was covered by reticular adhesive fibrous structures and irregularly arranged by pore canals. The fertilized egg envelope consisted of three distinct layers an outer adhesive fibrous layer with high electron density, a middle layer with pore canals, and an inner layer consisting of 6 to 7 lamellae alternating layers with interlamellae of lower electron density.

These ultrastructural characters of fertilized egg envelope form *Hyphessobrycon serpae* can be utilized in taxonomy of teleost, and as fundamental data for study on early development of fertilized egg. It seems that the morphology of micropyle is a common trait of Characidae

Key words : Fertilized egg envelope, Fish, *Hyphessobrycon serpae*, Ultrastructure

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Parasitology and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, FAX: (033) 731-6953, E-mail: kjlee@wonju.yonsei.ac.kr

서 론

어류에서 수정란의 크기와 난막의 구조는 서식하는 수환경의 물리·화학적 특성에 따라 다양하며 (Lönning, 1972), 광량, 수압, 파도의 강약과 같은 환경 요인과 (Stehr & Hawkes, 1979) 바위, 돌, 모래 및 진흙 등 산란장소에 따라서도 다양한 구조를 보인다 (Ivankov & Kurdyayeva, 1973). 또한 서로 다른 과(Family)에서는 물론 같은 과, 같은 속에서도 종에 따라 난막의 구조와 단백질 조성은 서로 다른 경우도 있으며 (Cotelli et al., 1986; Deung et al., 1999, Kim et al., 2001, Kim et al., 2002), 매우 유사한 경우도 보고된 바 있다 (Kim et al., 1999). 카라신과(Characidae)에 속하는 head and tail light fish (*Hemigrammus ocellifer*), black tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*) 및 buenos aires tetra (*Hemigrammus caudovittatus*)의 경우 수정란의 동물극 쪽에 정자의 통로인 난분(micropyle)을 보유하고 있으며, 3종 모두 난분 주위에 난막의 융기선이 방사형으로 난분 주위에 위치하여 공통적인 특징을 보이지만 난막의 단면구조는 종에 따라서 서로 다른 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 1996). 그러나 난분의 구조가 카라신과 어류의 공통적인 과의 특성인지는 아직 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 카라신과 어류에서 난분의 구조가 과의 공통적인 특징인지 아니면 종만이 가지는 종특성인지를 확인하고 계통분류학적 기초 자료를 얻기 위하여 자연수정에 의해 얻은 카라신과에 속하는 *Hyphessobrycon serpae*의 수정란과 수정란 난막의 외부 및 내부구조를 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

충북 진천군 진천읍 우미양어장으로부터 카라신과에 속하는 *Hyphessobrycon serpae* 성어를 분양받아 pH 6.0 ± 0.5 , $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 의 수질 (Bailey & Sandford, 1998)

에서 사육하였다. 낮환경은 하루 10시간씩 유지시켰고, 먹이는 냉동장구벌레와 일반사료를 오전 9시와 오후 4시에 하루 2번씩 공급하였으며 자연수정에 적합한 성어를 선별하여 종어로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 수정란의 채란

완전히 포란된 암컷 한 마리와 성숙한 수컷 두 마리를 선별하여 저녁에 그물이 쳐진 유리수조(60×45×45 cm)에 넣은 후 아침에 산란되어 그물 밑으로 떨어진 수정란을 실험에 사용하였다.

2) 시료처리

위의 방법으로 얻은 수정란 중 위란강(perivitelline space) 형성 후부터 2세포기로 발생이 진행되기 전시기의 수정란을 선별한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C 에서 4시간 동안 전고정 및 2% osmium tetroxide로 90분간 후고정하여, 통상적인 전자현미경 시료 처리법에 따라 처리한 후 난분의 외형과 난막의 표면구조는 JSM-6300형 주사전자현미경으로, 난막의 단면구조는 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM-1200EX II형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 수정란의 형태

수정란은 직경 3.66 ± 0.08 mm (n=50) 정도인 구형의 무색투명한 부착성 침성란이었다. 난막의 표면에 부속사는 없었고 난황낭 중앙에서 유적은 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 또한 동물극 쪽에 정자의 통로로 생각되는 한 개의 난분이 위치하고 있었으며 난분을 중심으로 난막의 주름이 방사형으로 배열되어 있었다 (Fig. 2). 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 어류, 자리돔과(Pomacentridae)의 tomato clown anemonefish 및 구굴무치과(Eleotrididae)의 얼룩동사리의 수정란의 경우 장타원형이며 그 외의 대부분 어류의 수정란은 구형인 것으로 알려져 있다 (Deung et al., 1997; Kim et al.,

1998; Kim et al., 2002). 특히 얼룩동사리의 수정란은 수정직후 구형이나 시간이 경과함에 따라서 장타원형으로 형태가 변형되는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2002). 본 실험에서 난황낭 내에 유적은 관찰되지 않았으나 동목어과(Beleontiidae)에 속하는 어류는 난황낭을 거의 차지할 정도로 한 개의 큰 유적을 보유하고 있으며 이 유적은 알이 수면에 뜨는 특성을 갖게 하여 낮은 용존산소량 환경에서 생존율을 높이는 중요한 역할을 한다(Kim et al., 1999). 또한 큰가시고기의 수정란처럼 다양한 크기의 유적들이 중앙에 집중적으로는 분포하고 있는 어종도 있다(Deung et al., 1999).

2. 난문의 외부형태

난문을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 난문을 중심으로 방사형으로 배열된 난막의 융기선은 13~15개로 수정란마다 약간의 차이를 보였고(Fig. 3), 난문의 수직방향에서 관찰한 결과 경사가 완만한 깔대기 형태로 외경은 약 4.1~4.3 μm , 내경은 약 1.4~1.6 μm 정도였다(Fig. 4). 난문은 대부분의 경골어류에서 침체가 없는 정자가 난막을 뚫지 못하기 때문에 정자의 통로 및 다수정을 방지하는 기능을 하며(Wolenski & Hart, 1987; Kim et al., 2003), 배반(blastodisc) 상부에 위치하고 있는 여포세포가 함몰된 후 난막의 내막 또는 외막이 변형되어 난문이 형성되는 것으로 알려져 있다(Laale, 1980; Guraya, 1986). 난문의 미세구조는 어종에 따라 매우 다양하며 과(Family)에 따라서 유사성을 보이기도 하지만(Deung et al., 1997; Kim et al., 1999), 잉어과에 속하는 어류의 수정란과 같이 종마다 형태학적으로 서로 다른 경우도 있다(Kim et al., 1998). 피라미의 경우 다른 종들에서 볼 수 없는 봉우리 모양의 특이한 구조물 5개가 난문 주위를 둘러싸고 있는데 이 경우 종을 구분하는 분류형질로 사용될 수 있다(Deung et al., 2000). 그러나 흰등가리돔과 얼룩동사리의 경우 난문은 관찰되지 않으며 그 이유는 부착기능을 하는 부속구조물이 동물극에 위치하고 있어 난문이 가려 보이지 않는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1998, 2002). 같은 과의 head and tail light fish (*Hemigrammus ocellifer*), black tetra (*Gymnocorymbus*

ternetzi) 및 buenos aires tetra (*Hemigrammus caudovittatus*)의 경우 난문주위에 본 실험종과 같은 난막의 융기선이 방사형으로 배열하고 있는 것으로 알려져 있으며(Kim et al., 1996) 이 특징은 다른 과에서는 볼 수 없는 카라신과를 대표하는 공통적인 형태학적 형질로 생각된다. 침체와 난문의 유무는 종에 따라 다양하여 판새어류인 *Squalus suckleyi*와 칠성장어의 경우 난막에 난문은 없으면서 침체를 보유하고 있으나(Stanley, 1971), 흰철갑상어(*Acipenser transmontanus*)처럼 다수의 난문과 침체를 모두 가지고 있는 종도 있다(Cherr & Clark, 1985). Ocean pout (*Macrozoarces americanus*)의 경우는 2개의 난문을 보유하고 있으며 이 경우 정자의 꼬리가 2개이고, 정자수가 적어 수정율을 높이기 위한 것으로 생각되고 있다(Yao et al., 1995).

3. 난막의 표면형태

광학현미경으로 관찰한 결과 난막 표면에서 부속구조물은 관찰되지 않았으나 수정란의 접착기능을 나타내는 망상형의 섬유들이 관찰되었고 섬유사이에 pore canal들이 불규칙적으로 산재하고 있었다(Fig 5). 이 pore canal은 난막형성과정 중에 미세융모가 사라진 후 남은 흔적이며 같은 과의 black tetra의 수정란의 경우도 같은 형태를 하고 있고, 종에 따라서 약 0.2 μm 정도의 불룩한 단추모양의 원형구조물들이 pore canal을 덮고 있는 경우도 있다(Kim et al., 1998). 시클리드과 어류인 angelfish, convic cichlid, discus 및 golden severum의 경우 부착사는 없지만 산란상에 부착하기 위한 부착성 망상구조물들이 난막 표면에 분포하고 있으며 이 망상구조물의 미세구조는 종에 따라 서로 다른 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1997). Zebrafish(Kim et al., 1993), leopard danio(Kim et al., 1998) 및 큰가시고기(Deung et al., 1999)의 경우는 비부착성란이며 공통적으로 난막 표면에 버섯모양의 부속구조물을 가지고 있으며 큰가시고기의 경우 산란상에는 비부착성이지만 알끼리는 부착성이다. 또한 참마자의 경우처럼 부착성인데도 불구하고 버섯모양의 구조물을 가지고 있는 경우도 있다(Kim et al., 2001). 이런 구조적 특징은 산란시 산란상에 알이 떨어질 때

발생되는 충격으로부터 배자(embryo)를 보호하는 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 일반적으로 난막의 표면구조는 난분과 마찬가지로 과에 따라 형태학적 유사성을 보이지만(Kim et al., 1999) 같은 과라고 하더라도 종에 따라서 또한 같은 종이라고 해도 분포지역에 따라 형태학적차이를 보이는 경우도 있다(Brummett & Dumont, 1981).

4. 난막의 단면구조

수정란 난막의 두께는 0.9~1.0 μm 정도였으며 모두 3층으로 구성되어 있었다. 외층은 접착성이 있는 전자밀도가 가장 높은 섬유상층, 중층은 한 층, 내층은 전자밀도가 서로 다른 6~7층의 다층구조를 하고 있었다. 특히 중층에서는 표면에서 관찰되었던 pore canal 들이 중층이 끊어진 형태로 완전히 관통되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 같은 과의 head and tail light fish와 buenos aires tetra의 수정란 난막은 3층으로 head and tail light fish는 전자밀도가 낮은 외층, 전자밀도가 매우 높은 중층 및 전자밀도가 서로 다른 층상구조를 하고 있는 내층으로 구성되어 있으며, buenos aires tetra는 전자밀도가 높은 외층, 전자밀도가 낮은 중층 및 전자밀도가 서로 다른 층상구조를 하고 있는 내층으로 구성되어 있다. Black tetra의 경우 같은 과인데도 불구하고 2층으로 구성되어 있으며 내층은 head and tail light fish의 경우 3층, black tetra의 경우 4층, 그리고 buenos aires tetra의 경우 5층으로 같은 과라고 하더라도 종에 따라 서로 다른 구조를 가지고 있다. 난막의 단면 구조는 종에 따라 다양하며 같은 과일수록 서로 유사한 것으로 알려져 있으나 동목어과 어류에서처럼 종마다 모두 같은 형태인 부착성 외층과 톱니형태의 내층으로 2층으로 구성된 경우도 있다(Kim et al., 1999). 잉어과에 속하는 피라미의 경우는 3층으로 부착성인 전자밀도가 낮은 외층, 전자밀도가 높은 중층 및 9층의 층상구조를 이룬 내층으로 구성되어 있으며, 내층의 층상구조가 바깥쪽은 좁고 안쪽은 넓은 층상구조를 가지고 있다(Deung et al., 2000). 수정란에서 난막의 두께는 일반적으로 침성란보다는 부성란이, 난태생어류보다는 난생어류가, 친어가 알을 보호하지 않는 경우 또한, 물의 흐름이 더 빠른 곳에서 서식하는 종에서 더 두꺼운 것으로 알려져

있는데, 종에 따라서 산란환경 및 습성이 같은데도 불구하고 난막 구조는 서로 다른 경우도 있다(Guraya, 1986).

이상과 같이 경골어류 카라신과 *Hypheosobrycon serpae*의 수정란 및 난막을 예전에 연구했던 카라신과 3종의 어류와 본 실험종을 비교한 결과 난분주위의 형태는 카라신과를 대표하는 중요한 공통적인 형태학적 특징이며 난막의 표면 및 단면구조는 다른 카라신과에 속하는 어종과 각각 서로 다른 구조를 가지고 있기 때문에 *Hypheosobrycon serpae*만이 가지는 종을 대표하는 종특이성이며, 종을 분류하는데 중요한 분류형질로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 과의 특성을 확인하기 위하여 카라신과에 속하는 다른 어류의 수정란 난막에 대한 형태학적 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bailey M, Sandford G: The new guide to aquarium fish, a comprehensive and authoritative guide to tropical freshwater, brackish, and marine fishes, Hermes House, 62-63, 1998.
- Brummett AR, Dumont JN: A comparison of chorions from eggs of northern and southern populations of *Fundulus heteroclitus*, Copeia 3 : 607-614, 1981.
- Cherr GN, Clark WH Jr: An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm, J Exp Zool 234 : 75-85, 1985.
- Cotelli F, Andronico F, Bassi R, Brivio M, Ceccagno C, Denis-Donini S, La Rosa ML, Lamia-Donin CL: Studies on the composition, structure and differentiation of fish egg chorion, Cell Biol Int Rep 10(6) : 471, 1986.
- Deung YK, Reu DS, Kim DH: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convict cichlid and discus, Cichlidae, Teleost, Korean J Electron Microscopy 27(4) : 417-432, 1997 (Korean).
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of gametes in the Three-spine stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus*, Korean J. Electron Microscopy 29(2) : 177-187, 1999 (Korean).
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelope in pale chub Cyprinidae, Teleost, Korean J

- Electron Microscopy 30(4) : 321-326, 2000 (Korean).
- Guraya SS: Monographs in developmental biology, The cell and molecular biology of fish oogenesis, Karger 18 : 111-147, 1986.
- Ivankov VN, Kurdyayeva VP: Systematic differences and the ecological importance of the membranes in fish eggs, J Ichthyol 13 : 864-873, 1973.
- Kim DH, Reu DS, Kim WJ, Deung YK: 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, 1993 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: A comparative study on the ultrastructure of the egg envelope in fertilized eggs of fishes, Characidae, three species, Korean J Electron Microscopy 26(3) : 277-291, 1996 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Comparative ultrastructure of the fertilized egg envelope in three species, Cyprinidae, teleost, Korean J Electron Microscopy 28(2) : 237-253, 1998 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of fertilized egg envelop in the tomato clown anemonefish, *Amphiprion freatus* (Pomacentridae: Marine teleostei), Korean J Electron Microscopy 28(3) : 273-282, 1998 (Korean).
- 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, Korean J Electron Microscopy 29(3) : 343-351, 1999 (Korean).
- Kim DH, Deung YK, Kim HY, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from long nose barbel, Cyprinidae, teleost, Korean J Electron Microscopy 31(1) : 85-90, 2001 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from dark sleeper, Eleotrididae, teleost, Korean J Electron Microscopy 32(1) : 39-44, 2002 (Korean).
- Lanning S: Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion, Sarsia 49 : 41-48, 1972.
- Stanley HP: Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi*, J Ultrastruc Res 36 : 86-102, 1971.

Stehr CM, Hawkes JW: 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, 1979.

<국문초록>

카라신과(Characidae)에 속하는 *Hemigrammus ocellifer*, *Gymnocorymbus ternetzi* 및 *Hemigrammus caudovittatus*의 경우 동물극 쪽에 정자의 통로인 난문(micropyle)이 있으며, 3층 모두 난문 주위에 난막의 융기선이 방사형으로 위치하여 공통적인 특징을 보이지만 난막의 단면구조는 종에 따라서 서로 다른 것으로 알려져 있다. 그러나 난문의 구조가 카라신과 어류의 공통적인 과의 특성인지는 아직 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 카라신과 어류에서 난문의 구조가 과의 공통적인 특징인지 아니면 종만이 가지는 종특성인지를 확인하고 계통분류학적 기초 자료를 얻기 위하여 *Hypessobrycon serpae*의 수정란과 난막의 외부 및 내부형태를 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰하고자 하였다.

*Hypessobrycon serpae*의 수정란은 구형의 무색투명한 부착성 및 침성란으로 유적(oil droplet)과 부속사는 관찰되지 않았다. 동물극 쪽에 수정을 위한 정자의 통로인 한 개의 난문(micropyle)이 관찰되었고, 난문 주위에는 난막의 융기선이 방사형으로 배열하고 있었으며 난막의 융기선은 13~15개로 수정란마다 약간의 차이를 보였다. 난막의 표면은 산란상에 부착하는 기능을 수행하는 것으로 생각되는 망상형의 섬유상 구조물들이 분포하고 있었으며 이 망상구조물 내부에 pore canal이 산재하고 있었다. 수정란 난막의 두께는 0.9~1.0 μm 였으며 3층으로 구성되어 있었다. 외층은 부착기능을 하는 전자밀도가 가장 높은 섬유상층이었고, 중층은 표면에서 관찰되었던 pore canal들이 중층이 끊어진 형태로 완전히 관통되어 있었으며 내층은 전자밀도가 서로 다른 6~7층의 다층구조를 하고 있었다.

이상과 같이 *Hypessobrycon serpae*의 수정란 난막의 미세구조적 특징은 이 종만이 가지는 독특한 형태학적 형질로서 종을 분류하는데 사용될 수 있으며 난문 주위에 난막의 융기선이 방사형으로 배열하고 있는 것은 카라신과 어류의 공통적인 과(Family)의 특성으로 생각된다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** The fertilized egg of *Hyphessobrycon serpae* ($\times 40$). E; Egg envelope, Y; Yolk.
- Fig. 2.** A light micrograph of the micropyle in the egg envelope ($\times 100$). Note the micropyle (arrow).
- Fig. 3.** A scanning electron micrograph of the micropyle (arrow) in the fertilized egg envelope (scale bar = 10 μm). Note the micropyle surrounded by protruded lines of the egg envelope in a radiated form.
- Fig. 4.** A magnified scanning electron micrograph of micropyle (scale bar = 1 μm).
- Fig. 5.** The outer surface of fertilized egg envelope (scale bar = 1 μm). The outer surface of fertilized egg envelope was covered by reticular adhesive fibrous structures and irregularly arranged by pore canals.
- Fig. 6.** The cross section of the fertilized egg envelope (scale bar = 500 nm). The egg envelope consisted of three layers, an outer adhesive layer (arrow), a middle layer with pore canals and an inner lamellae layer (IL) consisting of 6 to 7 layers.



