

한국산 잉어과 어류인 돌마자(*Microphysogobio yaluensis*)의 정세포변형과 성숙한 정자의 미세해부학적 구조

김정기 · 김구환^{1,*} · 황기주²

대구보건대학 작업치료과, ¹대구보건대학 방사선과, ²한국기초과학지원연구원 대구센터

Anatomical Ultrastructure of Spermiogenesis and Spermatozoa of *Microphysogobio yaluensis* (Pisces: Cyprinidae) from Korea by Jeong-Ki Kim, Kgu-Hwan Kim^{1,*} and Ki-Ju Hwang² (Department of Occupational Therapy, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea; ¹Department of Radiologic Technology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea; ²Daegu Center, Korea Basic Science Institute, Daegu 702-701, Korea)

ABSTRACT Study on spermatid and spermatozoon of a Korean endemic freshwater fish, *Microphysogobio yaluensis*, has been carried out by transmission electron microscope. Spermiogenesis involves conspicuous modifications intercellular movement such as centrioles and mitochondria migration, nuclear depression and structural changes for instance chroatin condensation, excess of cytoplasm. The mature spermatozoa are similar to those of other cyprinids as follows: a spherical nucleus with a shallow nuclear fossa, a short midpiece containing several mitochondria and encircling the basal body of the flagellum. However there are some differences in the orientation of the centrioles, the number of the mitochondria and distribution of vesicles from other cyprinids. It could be concluded that the *M. yaluensis* spermiogenesis belongs to type 2, and its mature spermatozoon is characterized by a unique feature which may provide a useful systematic character.

Key words : Spermatozoa, ultrastructure, cyprinidae, *Microphysogobio yaluensis*

서 론

돌마자, *Microphysogobio yaluensis*는 Mori (1927)에 의하여 처음 기재된 종으로 한반도 전역에서 비교적 흔히 서식하고 있는 종이다. 본 종은 모래무지아과에 속해 있으며, 모래무지아과는 Banarescu and Nalbant (1973)의 분류법에 따라 분류된 소형종들이지만 잉어과 중에서 가장 큰 분류군에 속한다. 돌마자는 기재당시에 *Pseudogobio yaluensis* (1927)였으나 Uchida (1939)에 의하여 *Microphysogobio* 속에 포함되었으며, 다시 김 (1997)에 의하여 Gobioninae로 분류되었다. 한편 김 (1984)은 한국산 모래무지아과 어류의 계통분류를 형태적 특징을 중심으로 정리한 바 있다. 동물을 분류함에 있어 정자구조의 특이성은 종을 구분하고 계통관계를 규명하는데 유용한 자료로 활용할 수 있으며 (Kenzo, 1993) 어류에서도 분류와 계통분석에 정자의 미세구조형질을 활

용하고 있다 (Jemieson, 1991).

잉어과 어류 정자의 미세구조에 관한 연구는 *Acanthopthalmus semicinctus* (Jemieson, 1991), *Cobitis striata* (김과 박, 1996), *Leciscus cephalus*, *Leciscus souffia*, *Rutilus rubilio*, *Alburnus alburnus alborella*, *Chondrostom toxostoma*, *Barbus barbus plebejus*, *Carassius auratus* (Baccetti *et al.*, 1984), *Zacco koreanus* (Kim, 2006) 등에서 많은 연구가 있으나 어류 종의 방대함에 비하면 미흡한 실정이다.

본 연구는 한국산 돌마자 *M. yaluensis* 정자의 미세해부학적 구조를 밝히고 잉어류의 인접분류군과의 유연관계를 고찰하여 어류분류군 정자의 미세구조적 계통관계를 규명하는데 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구를 위해 돌마자, *Microphysogobio yaluensis*를

*교신저자: 김구환 Tel: 82-53-320-1320, Fax: 82-53-320-1449,
E-mail: kimgh@mail.dhc.ac.kr

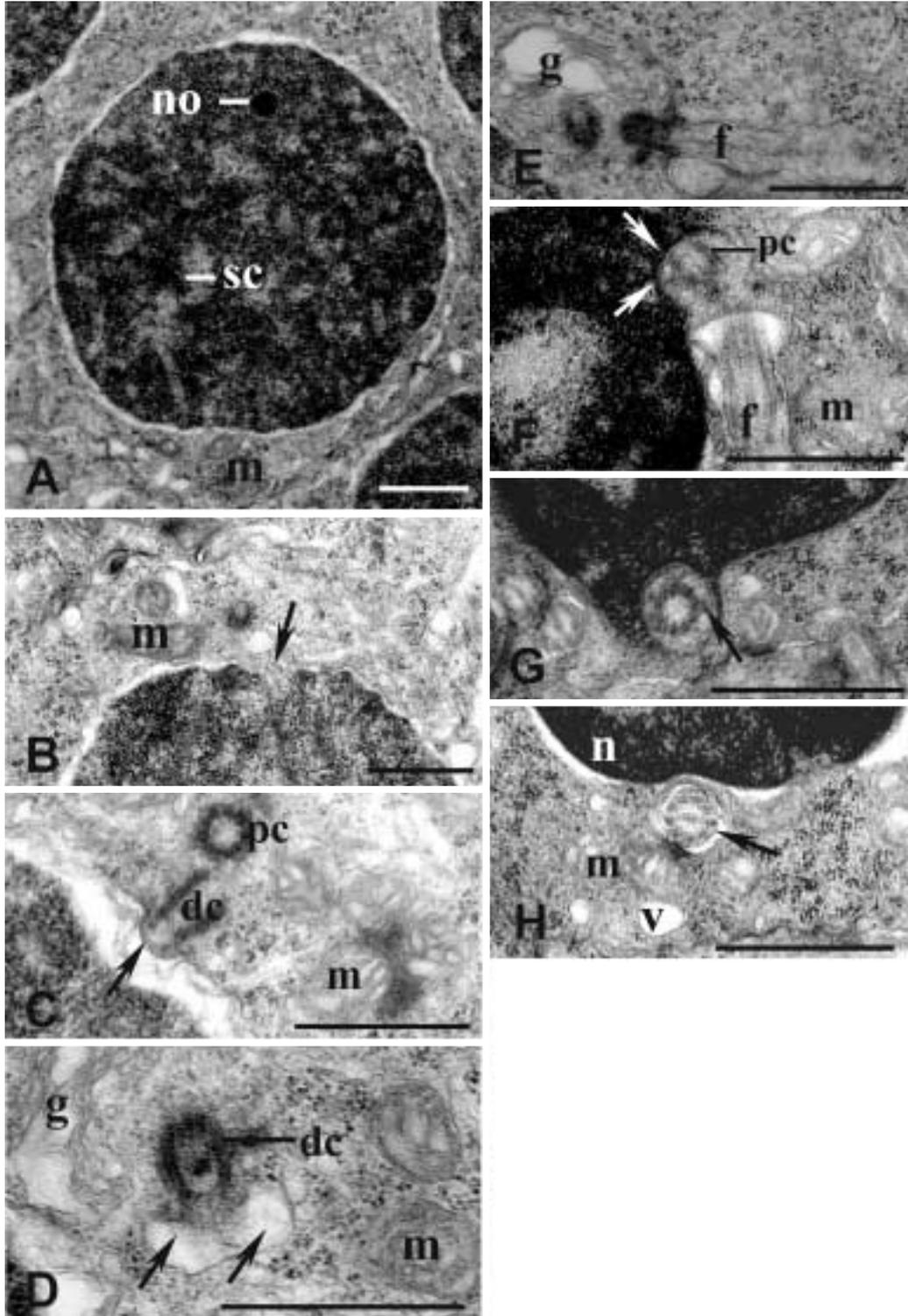


Fig. 1. Transformation of *Microphysogobio yaluensis* spermatid to mature spermatozoon during spermiogenesis. Bars=1 μ m. A: An spermatocyte displays a synaptonemal complex (sc) within the nucleus. The nucleoli (no) have been fade and the nucleus appears clumped with chromatin. B: The spermatid begins to discard excess nuclear material (arrow). C: The distal centriole (dc) of early spermatid at the beginning to flagellum formation (arrow). D: The cytoplasmic canal (arrows) is formed. There is mitochondria (m) group together around the flagellar base. E: The flagellum (f) project from the distal centriole. The Golgi apparatus (g) lies closely to the proximal centriole. F: The nuclear fossa (arrows) is relatively shallow and eccentrically positioned. The proximal centriole is located within nuclear fossa. The nucleus has electron-dense fine heterochromatin. G: The proximal centriole (pc) penetrates into the nuclear fossa and connected by osmiophilic filament (arrow) to the nuclear envelope. H: The axoneme separated from the midpiece by cytoplasmic canal (arrow).

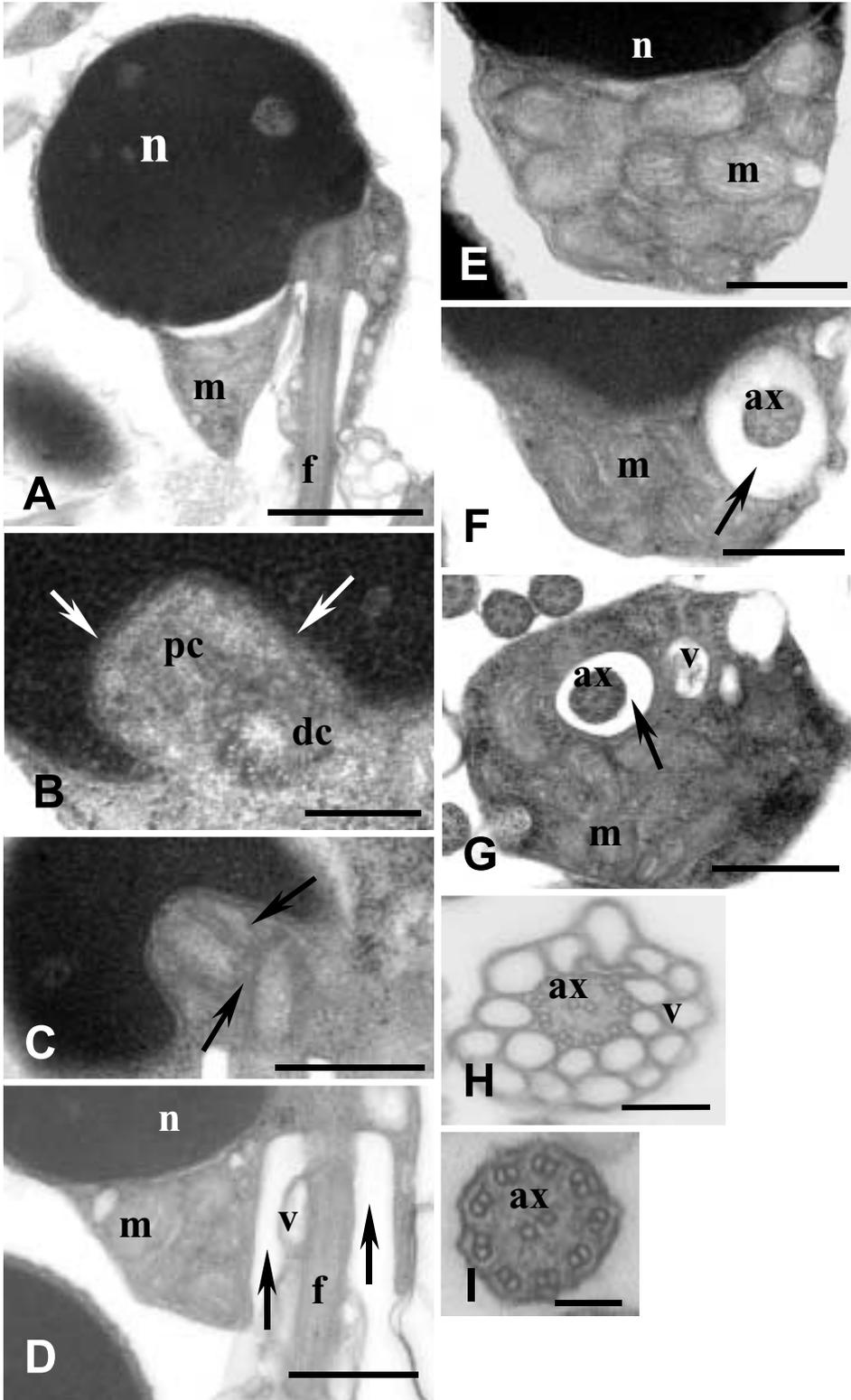


Fig. 2. Mature spermatozoon of *Micropophysogobio yaluensis*. A: Longitudinal section of head, which consists of a nucleus (n), midpiece including mitochondria (m) and a tail (f). Bar=1 μ m. B: Nuclear fossa (arrows) including the proximal centriole (pc) and anterior part of distal centriole (dc). Bar=0.2 μ m. C: Longitudinal section of the nuclear fossa showing an acute angle of two centrioles. Note the connection (arrows) of two centrioles and nuclear enveloper. Bar=0.5 μ m. D: Longitudinal section of the midpiece containing mitochondria (m). Bar=0.5 μ m. E: Sagittal section of midpiece including numerous mitochondria (m). Bar=0.5 μ m. F, G: Transverse section of midpiece showing nucleus (n), mitochondria (m), cytoplasmic canal (arrow) and axoneme (ax). F: Superior region of midpiece. Bar=1 μ m. G: Inferior region of Midpiece. Bar=1 μ m. H, I: Transverse section of flagellum showing axoneme (ax) and vesicles (v). Bar=0.2 μ m, Bar=0.1 μ m.

2006년 4월~8월 경상북도 안동시 반변천 일대에서 산란 시기인 성숙한 수컷을 이용하였으며 포획된 실험동물은 살아있는 상태로 실험실로 운반하였고 해부 후 정소를 추출

하였다.

적출된 정소조직은 즉시 4°C, 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 용액에서

2~3시간 전고정한 후 고정된 정소조직을 동일한 완충용액(4°C, phosphate buffer, pH 7.2)으로 10분간 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide (OsO₄)에서 후고정 하였다. 고정된 재료는 다시 동일한 완충용액으로 3회 세척한 후, ethanol 농도 상승순(50% → 100%)으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 Epon812 혼합액에 포매한 다음 35°C, 45°C 및 60°C 순으로 vacuum dry oven에서 중합반응 하였다. 포매된 재료는 ultramicrotome (MTXL)으로 초박절편을 만들어 copper grid에 부착한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경 (Hitachi, H-7100)으로 관찰하였다.

결 과

1. 정세포변형과정 (spermiogenesis)

돌마자 *Micropysogobio yaluensis*의 초기 정세포(early spermatid)는 주변 세포질에 비해서는 전자밀도가 높게 나타났으나 밀도는 전반적으로 낮았다(Fig. 1A). 핵 안에는 핵소체의 일부가 남아 있으며 염색질은 농축되어 복합체(synaptonemal complex)가 형성되고 있었다(Fig. 1A). 핵의 염색질이 농축되면서 핵안의 물질이 세포질로 유출되고 있으며(Fig. 1B) 핵막주변에는 공포들이 배열되어 세포질과 핵사이를 구분할 수 있었다(Fig. 1A, 1B). 세포질의 한 측면에 두 중심립이 위치해 있으며 말단부중심립에서 편모기지의 흔적인 세포막 일부의 돌출이 나타나고 있었다(Fig. 1C). 말단부중심립에서 편모가 돌출되어 나가면서 주변 세포질이 함입되어 세포질관(cytoplasmic canal)이 형성되며, 세포질관 주변으로 미토콘드리아가 분포해 있었다(Fig. 1D). 두 중심립은 핵 주변에 있으며 말단부중심립에서 편모가 신장되면서 세포질의 확장이 수반되며, 골지체는 기부중심립 근처에 위치해 있었다(Fig. 1E). 정세포의 변형이 진행되면서 염색질은 이형질화(heterochromatin)되고 핵의 주변부가 함입되어 핵외를 형성하고 있으며 두 중심립은 핵외 주변으로 이동하여 기부중심립은 핵외와 근접해 있었다(Fig. 1F). 핵외가 형성되면서 기부중심립은 핵외안으로 완전히 들어가고 기부중심립과 핵외를 형성하는 핵막 사이에는 섬유성 물질로 상호 연결되어 있었다(Fig. 1G). 말단부중심립에서 신장된 편모는 세포질관(cytoplasmic canal)에 의하여 상호 분리되어 있으며 미토콘드리아가 편모의 주변에 위치해 있었다(Fig. 1H).

2. 성숙한 정자 (mature spermatozoa)

돌마자 정자의 두부는 편모를 중심으로 세포의 장축에 측면으로 기울어져 위치해 있었다(Fig. 2A). 두부는 구형이며 그 속에 핵이 위치해 있으며 핵물질은 농축되어 전자밀

도가 높은 동질형(homogeneous)이 나타나며 핵의 기저부는 함몰되어 핵외를 형성하고 있었다(Fig. 2A). 함입된 핵외는 기부중심립이 들어가 있으나 말단부중심립은 일부가 포함되어 있었다(Fig. 2B). 기부중심립과 말단부중심립은 약 130°를 유지하고 있고 섬유성 물질에 의하여 상호 연결되어 있으며 핵막과 두 중심립사이도 연결되어 있었다. 두 중심립사이의 각도만큼 두부와 편모사이의 각도가 반영되어 나타나며 말단부중심립에서 편모가 유래되었다(Fig. 2C). 중편세포질은 두부의 기저부인 핵과 편모사이에 위치해 있으며 두부가 기울어진 방향으로 세포질이 많이 분포해 있는 비대칭적 구조이었다. 미토콘드리아가 2~3층으로 중편세포질에 배열하고 있으며, 편모가 신장되어 나가면서 세포질이 함입되어 형성된 세포질관(cytoplasmic canal)이 있었다(Fig. 2D). 미토콘드리아의 수는 시상단면상(sagittal plane)에서 최대 11개를 관찰할 수 있으나 횡단면상(transverse plane)에서는 최대 4개를 확인할 수 있으며 세포질의 분포에서와 같이 비대칭적 구조를 취하고 있었다(Fig. 2D, 2E). 편모는 세포질관(cytoplasmic canal)에 의하여 세포질과는 분리되어 있었다(Fig. 2F). 중편세포질에는 공포(vesicles)가 일부 있으며 편모에서는 다수의 공포가 나타나고 있었다(Fig. 2D, 2G, 2H). 공포는 편모의 기부에서 1~2층으로 축사를 완전히 둘러싸고 있으나(Fig. 2H) 말단부에서는 나타나지 않았다(Fig. 2I).

고 찰

돌마자 *M. yaluensis* 정자의 변형과정과 성숙한 정자의 구조는 잉어과 어류 정자변형과정과 유사하게 나타나고 있다. 경골어류의 정자변형과정은 2가지 type으로 구분할 수 있다(Mattei, 1970). Type 1은 핵의 회전이 일어나며 두 중심립은 핵외 안으로 들어가며 편모는 대칭적으로 위치하는 한편, Type 2는 핵의 회전이 일어나지 않으며 중심소체는 핵외의 바깥쪽에 있으며 편모는 비대칭적으로 위치하게 된다. 돌마자 정자형성과정에서 발생하는 편모는 핵의 한쪽 측면에서 발생하여 계속 신장되는 결과로 보아 돌마자는 Type 2에 해당하며, 이러한 특징은 잉어과 어류의 공통된 특징으로 사료된다(박과 김, 1996; Kim, 2006; Kim *et al.*, 2006).

성숙한 돌마자 정자에서 편모의 위치는 두부의 측면에서 신장되어 있으며 이와 같은 형태는 잉어과 어류의 정자에서 공통적으로 나타나는 구조로서(Baccetti *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 2006) 성숙한 정자의 두부 측면에 위치한 편모구조는 정자변형과정에서 핵의 회전이 일어나지 않았다는 것을 입증하고 있다.

성숙한 정자에서 기부중심립이 핵외 안에 위치하는 것은

잉어과 어류에서 공통적으로 나타나는 구조이다(Jemieson, 1991). 돌마자 역시 정자의 변형과정에서 중심립은 핵의 측면에 위치해 있었다.

정자변형과정 중에 중심립 주변에서 관찰되는 골지체는 편모의 확장과 중심립이 핵과 안으로 이동하는 데 필요한 물질을 제공하는 것으로 추정되며 정자변형과정 후기에는 관찰되지 않았다. 체내수정형의 정자에서는 골지체가 침체 물질을 만드는 것으로 보고되어 있으나(Morisawa, 1995) 잉어과 어류에서는 골지체와 침체가 관련된 보고는 없었다. Jamieson (1991)은 일부 경골어류에서 관찰되는 침체의 흔적을 과생형질로 규정하였다.

중편세포질에 분포하는 미토콘드리아는 잉어과 어류 내에서 그 수가 하나인 *Rhodeus sericeus sinensis* (Guan and Afzelius, 1991), *Puntungia herzi* (Lee and Kim, 1998b)를 제외하고 *Leciscus cephalus* 2~3개, *Leciscus souffia* 4개, *Rutilus rubilio* 5~6개, *Alburnus alburnus alborella* 2개, *Chondrostom toxostoma* 3~4개, *Barbus barbus plebejus* 2개, *Carrasius auratus* 10개 (Baccetti et al., 1984), *S. gracilis majimae* 10개 (Lee and Kim, 1998a), *S. chankaensis tsuchigae* 7개 (Kim et al., 1998), *Z. temmincki* 6개 (Kim et al., 2006) 등 종에 따라 다양한 수가 보고되었다. 한편 미토콘드리아의 분포는 대칭적으로 분포한 *Z. koreanus* (Kim, 2006), *Z. temmincki* (Kim et al., 2006), *P. esocinus* (Kim et al., 2007) 등을 제외하고는 비대칭적 분포를 하고 있었다. 경골어류에서 미토콘드리아의 수와 위치는 중요한 분류형질로 알려져 있다 (Baccetti et al., 1984).

말단부중심립의 기저부에서 섬유성물질이 세포막과 연결되어 있는 구조는 cytoplasmic canal 형성과 밀접한 연관성을 갖는다고 알려져 있는데 그 이유는 편모의 기부가 되는 말단부중심립이 원형질막과 함께 핵과 방향으로 이동하면서 형성되기 때문이다 (Mattei, 1970). 돌마자의 성숙한 정자에서 cytoplasmic canal은 Fig. 2D에서 나타난 바와 같이 말단부중심립의 기저부 위치만큼 함입되어 있었다.

돌마자 정자의 세포질에서 나타나는 vesicles 구조는 중편보다 편모에서 많이 나타나는데 *Puntungia herzi* (Lee and Kim, 1998b), *Squalidus chankaensis tsuchigae* (Kim et al., 1998), *S. gracilis majimae* (Lee and Kim, 1998a), *Pseudogobio esocinus* (Kim et al., 2007), *Z. koreanus* (Kim, 2006) 등의 잉어과 어류에서 공통적으로 나타나는 형질이다. 잉어류 정자 편모의 vesicles은 기부에 주로 분포해 있으며 말단부에서는 나타나지 않는다. 돌마자 정자의 편모에서는 현재까지 밝혀진 잉어과 어류보다 많은 편모 vesicles을 가지고 있다.

한편 이러한 돌마자 세포질의 vesicles 구조는 인접분류군과 비교적 잘 구분되고 있다. Characiformes의 Curimatidae (Quagio-Gassiotto et al., 2003)에서는 중편부와 편모에서 많은 vesicle이 나타나는 반면에 Siuriformes의 Siluridae

(Lee and Kim, 2001)에서는 중편부에서만 나타나고 있어 이러한 정자의 vesicle의 특성은 일부 분류군에 있어서 중요한 형질인 것으로 사료된다.

요 약

돌마자 *M. yaluensis* 정자의 변형과정과 성숙한 정자의 미세해부학적 구조를 전자현미경으로 관찰하였다. 돌마자 정자형성과정에서 발생하는 편모는 핵의 한쪽 측면에서 발생하여 계속 신장되고 있어 잉어과 정자변형과정과 공통된 type 2로 분류할 수 있으며 성숙한 돌마자 정자의 두부 측면에 위치한 편모구조는 정자변형과정에서 핵의 회전이 일어나지 않았다는 것을 입증하고 있다.

두 중심립의 각도만큼 편모와 두부의 각도가 만들어지며 잉어과 어류 정자에서 두부와 편모는 두 중심립의 각도만큼 기울어져 있었다. 정자변형과정 중에 중심립 주변에서 관찰되는 골지체는 편모의 확장과 핵과 안으로 이동하는 데 필요한 물질을 제공하는 것으로 추정되며 정자변형과정 후기에는 관찰되지 않았다.

돌마자 정자의 세포질에서 나타나는 vesicles 구조는 중편보다 편모에서 많이 분포하며, 정자 편모의 vesicles은 기부에 주로 분포해 있으며 말단부에서는 나타나지 않는다. 중편세포질에 분포하는 미토콘드리아는 비대칭적으로 분포해 있으며, 미토콘드리아의 비대칭적 분포는 잉어류에서는 일부 종을 제외한 공통적인 특징인 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- 김익수. 1984. 한국산 모래무지아과 어류의 계통분류학적 연구. 한국수산학회지, 17: 436-448.
- 김익수. 1997. 한국동식물도감 제37권 동물편(담수어류). 교육부, 629pp.
- 김익수 · 박종영. 1996. 한국산 줄종개 *Cobitis striata* (미꾸리과)의 정소 및 정자의 구조. 한국어류학회지, 8: 1-8.
- 박종영 · 김익수. 1996. 한국산 미꾸리과 Cobitidae (잉어목) 어류의 정자 미세구조. 한국어류학회지, 8: 74-83.
- Baccetti, B., A.G. Burrini, G. Callaini, G. Gibertini, M. Mazzini and S. Zerunian. 1984. Fish germinal cells I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. Gamete Res., 10: 373-396.
- Banarescu, P. and T. Nalbant. 1973. Pisces, Teleostei, Cyprinidae (Gobioninae). Das Tierreich, Lieferung 93. Walter de Gruyter. Berlin, 304pp.
- Guan, T.L. and B.A. Afzelius. 1991. The spermatozoon of the Chinese bitterling, *Rhodeus sericeus sinensis* (Cyprinidae, Teleostei). J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 23: 351-356.

- Jamieson, B.G.M. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. New York: Cambridge University Press, pp. 135-148.
- Kenzo, U. 1993. Motility and morphology of sperm of the ayu, *Plecogloss altivelis* at different salinities. Japan, J. Ichthyol., 40: 273-278.
- Kim, K.H. 2006. Ultrastructure of *Zacco koreanus* (Teleostei, Cypriniformes, Cyprinidae) spermiogenesis and spermatozoa. Korean J. Ichthyol., 18: 347-354.
- Kim, K.H., A.S. Kwon and Y.H. Lee. 1998. Spermatozoal ultrastructure and phylogenetic relationships of the subfamily Gobioninae (Cyprinidae, Teleostei) ultrastructure of the spermatozoa of the Korean gudgeon *Squalidus chankaensis tsuchigae*. Korean J. Limnol., 31: 159-164.
- Kim, K.H., D.M. Kwon, J.I. Lee and S.B. Jung. 2007. Ultrastructure of *Pseudogobio esocinus* (Teleostei, Cyprinidae) spermiogenesis and spermatozoa. J. Kor. Fish. Soc., 40: 147-152.
- Kim, Y.J., C. Choi and I.S. Park. 2006. Ultrastructure of dark chub *Zacco temmincki* (Cyprinidae) spermatozoa. J. Fish. Sci. Technol., 9: 1-6.
- Lee, Y.H. and K.H. Kim. 1998a. Spermatozoal ultrastructure and phylogenetic relationships of the subfamily Gobioninae (Cyprinidae, Teleostei) I. Ultrastructure of the spermatozoa of the Korean Gudgeon *Squalidus gracilis majimae*. Korean J. Electron Microsc., 28: 63-71.
- Lee, Y.H. and K.H. Kim. 1998b. Ultrastructure of spermatozoa in *Pungtungia herzi*. Dev. Reprod., 2: 141-148.
- Lee, Y.H. and K.H. Kim. 2001. The ultrastructure of spermatozoa of the slender catfish *Silurus microdorsalis* (Teleostei, Siluriformes, Siluridae) with phylogenetic considerations. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 33: 329-336.
- Mattei, C. 1970. Spermiogeneses comparee des Poissons, In: Bacetti, B. (ed.) Comparative spermatology. Academic Press, New York, pp. 57-69.
- Mori, T. 1927. Notes on the genus *Sarcochelilichthys*, with the descriptions of four new species. Ann. Zool. Jap., 11: 97-106.
- Morisawa, S. 1995. Fine structure of spermatozoa of the Hagfish *Eptatretus burgeri* (Agnatha). Biol. Bull., 189: 6-12.
- Quagio-GAssiotto, I., M.C. Gameiro, T. Schneider, L.R. Malabarba and C. Oliveira. 2003. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. Neotropical Ichthy., 1: 35-45.
- Uchida, K. 1939. The fishes of Tyseon. Part 1. Nematognathi, Evertognathi. Bull. Fish. Exp. Sat. Gov. Gener. Tyosen. 6, 458pp., (in Japanese).