

경골어류 시클리드과 *Cichlasoma managuensis*의 정자형성과정

이규재^{1,2}, 장병수³, 등영건^{1,4}, 김 석⁵, 송미숙⁵, 주경복⁶, 김동희^{1,4,*}

¹연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실, ⁴기초의학연구소, ²평생건강사업단, ⁵중앙연구소,
³한서대학교 보건학부 피부미용학과, ⁶초당대학교 안경광학과

The Spermatogenesis of *Cichlasoma managuensis*, Cichlidae, Teleost

Kyu-Jae Lee^{1,2}, Byung-Soo Chang³, Yung-Chien Teng^{1,4}, Seok Kim⁵,
Mi Sook Song⁵, Kyung-Bok Joo⁶ and Dong-Heui Kim^{1,4,*}

¹Department of Environmental Medical Biology, ⁴Institute of Basic Medical Science,
²Institute of Lifelong Health and ⁵Central Research Laboratory, Wonju College of Medicine,
Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-701, Korea

³Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

⁶Department of Ophthalmic Optics, Chodang University, Muan, Jeonnam 534-701, Korea

(Received June 25, 2009; Accepted September 23, 2009)

ABSTRACT

The ultrastructure of spermatogenesis and sperm in *Cichlasoma managuensis* belonging to Cichlidae was investigated by light and electron microscopes.

The testis of *C. managuensis* contained numerous testicular cysts, and spermatogenesis was synchronized in these testicular cysts. In the case of spermatogonia, the nucleus was comparatively large ellipsoidal, and mitochondria showed a marked development. The size of primary spermatocyte was smaller than that of spermatogonia, and that of secondary spermatocyte was smaller than that of primary spermatocyte. The chromatin of spermatocyte was highly condensed according to their development. The nucleus with electron-dense was round shape. In spermiogenesis, flagella started to be formed and chromatin was more condensed. The mitochondria were rearranged in a middle piece. The sperm was formed by loss of cytoplasm. The head of mature sperm was a spherical shape and had not acrosome. The microtubules of flagella were arranged 9+2 structure. Also, the tail of sperm have lateral fins.

Keywords : *Cichlasoma managuensis*, Fish, Spermatogenesis, Ultrastructure

서 론

경골어강(Osteichthyes)의 농어목(Perciformes)에 속하는

*Cichlasoma managuense*는 미국 Honduras 동부, 플로리다 북부와 중부지역, Managua 호수, Nicaragua 호수 및 Costa Rica에 서식하며 Jaguar cichlid, Jaguar guapote, Guapote tiger 및 Guapote 등으로 불리운다(Shafland, 1996).

* Correspondence should be addressed to Dr. Dong Heui Kim, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, 162 Ilsan-dong, Wonju, Gangwon-do 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0353, Fax: (033) 732-4446, E-mail: fish7963@yonsei.ac.kr

어류의 정소는 척추동물과 유사하지만 정소낭(testicular cyst)을 보유하는 것이 특징이며 이곳에서 정자형성이 이루어진다. 어류의 정자형성이 이루어지는 동안 세르톨리 세포(Sertoli cell)는 생식세포를 둘러싸으로써 정소낭을 형성하기도 하며(van den Hurk et al., 1978; Gwo & Gwo, 1993), 인접한 생식세포 간에 세포간교(intercellular bridge)를 형성하기도 한다(Billard, 1984). 또한 정자변태과정(spermiogenesis) 동안에 정세포의 세포질 잔사체(residual body)는 표면 쪽으로 배열된 후 정소낭의 내강쪽으로 배출되고 결국 인접한 세르톨리 세포에 의해서 phagocytic vacuole을 형성한 후 내포작용으로 제거된다(Billard, 1983; Sprando & Russell, 1988). 어중에 따라서 생식세포가 정소낭 내에서 동시에 분화되는 경우(Grier, 1976; Brusle, 1981; Hourigan et al., 1991; Gwo & Gwo, 1993)와 동시에 분화되지 않는 종이 있는 것으로 알려져 있다(Rossouw & Vanessen, 1993).

정자형성은 서식지의 기후 조건과 종에 따라 차이를 보일 뿐만 아니라 동종의 개체 간에도 생식 습성 혹은 서식환경에 따라 서로 다르게 이루어지는 것으로 알려져 있다(Yoneyama & Iwasawa, 1985; Wolenski & Hart, 1987). 특히 정자형성과정은 광주기에 영향을 많이 받는데 낮 기간을 연속적으로 유지시킬 경우 호르몬 변화 특히 testosterone의 분비가 억제되고 생식과정에 문제를 발생시켜 수컷의 성숙을 억제한다(Bayarri et al., 2009).

경골어류의 경우, 큰가시고기의 경우를 제외하고(Deung, 1999) 대부분 부정소가 없으며 다른 척추동물과는 달리 정자의 두부에 첨체가 존재하지 않기 때문에 난자의 동물극 쪽 난막에 있는 난문(micropyle)을 통해서 수정이 이루어지게 된다(Ohta & Nashirozawa, 1996; Yoon et al., 1996; Kim et al., 2002, 2005, 2007).

지금까지 일반적인 정자형성과정에 대한 연구는 일부 어종에서 이루어져 왔으나 실험실 내에서 어류의 양어, 암수구별 및 산란이 매우 어렵기 때문에 양어 및 산란이 쉬운 몇몇 어종 또는 산업적 유용성에 따라서 식용어류에서 집중적으로 연구되어 왔으며 성숙한 정자의 미세구조를 분류 체계에 따른 체계화가 전혀 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 아직 밝혀져 있지 않은 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 *C. managuense*를 실험재료로 선정하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 정자형성과정을 밝히고 이 종만이 가지고 있는 정자의 미세구조적 특징을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

한강수족관(강원도, 원주)에서 *Cichlasoma managuense* 성어를 기증 받아 pH 6.5 ± 0.5 및 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수조(60×45

×45 cm)에서 3개월 이상 기초 양어하여 실험재료로 사용하였다. 양어수는 Fritz-guard(Fritz Co. Ltd., USA)로 염소를 제거시킨 후 사용하였고 저면여과법을 이용하여 정수하였다. 환수는 일주일에 2번 1/4씩, 낮 환경은 하루 10시간씩 유지시켰고, 먹이는 냉동장구벌레(Blood Worms™, Hikari Sales USA, Inc., USA)를 오전 9시와 오후 4시에 하루 2번씩 급여하였다.

2. 수컷의 선별

자연번식을 통하여 수정 능력이 확인된 *Cichlasoma managuense* 수컷을 선별하여 실험에 사용하였다.

3. 시료처리

정소를 적출하여 육안으로 정소의 크기와 색깔을 확인한 후 광학현미경용 시료는 10% 포르말린으로 고정하여 처리한 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였고, 투과전자현미경 시료는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C 에서 4시간 전고정 및 2% osmium tetroxide로 90분간 후고정 하였다. 모든 시료처리는 통상적인 전자현미경 시료 처리법에 따라 처리한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였으며, epon 혼합액에 포매한 후 50~60 nm로 초박절편하여 JEM-1200EX II형(JEOL, Japan) 투과전자현미경으로 관찰하였다. 또한 주사전자현미경용 시료는 정소를 분쇄한 후 2,800 rpm에서 2분간 원심 분리하여 얻은 정자를 투과전자현미경의 시료처리법에 따라 고정 및 탈수하여 hexamethyldisilazane (HMDS)으로 치환시키고 4등분한 cover glass에 도말하여 대기 중에서 건조한 후 탁상용주사전자현미경(TM-1000, HITACHI, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

경골어류 시클리드과에 속하는 *Cichlasoma managuense*의 정자형성과정을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

*C. managuense*의 정소는 부레와 창자 사이에 위치하고 있었고 장축 2.3 cm, 단축 4 mm 정도의 크기로 살색을 띠고 있었다. 정자형성과정은 다른 경골어류와 마찬가지로 세정관 내에서 이루어지지 않고 정소낭(testicular cyst)에서 이루어졌으며, 각 정소낭 내에 분화시기가 동일한 생식세포들이 분포하고 있었다. 발달 정도가 높아질수록 핵이 hematoxyline으로 짙게 염색되어 푸른색을 띠었다(Fig. 1). 정소의 색깔은 분화정도에 따라 변화하는 것으로 알려져 있는데 카라신과(Characidae)에 속하는 *Oligosarcus hepsetus*의 경우

휴지기에는 반투명, 초기성숙기에는 흰색, 또한 성숙기에는 황갈색으로 변화한다(Santos et al., 2006).

정원세포는 정소낭 내에 적은 수가 분포하고 있었고, 타원형으로 매우 큰 핵을 보유하고 있었다(Fig. 2). 분화가 진전됨에 따라 제1정모세포는 핵 내에 뚜렷한 인이 관찰되는 경우도 있었으며 세포질에는 미토콘드리아의 발달이 현저하였다(Fig. 3). 제2정모세포는 제1정모세포보다 더 작아졌으며 정모세포들은 정소낭 내에서 세포간교(intercellular bridge)에 의해 연결되어 있었으며 제2감수분열 전기의 태사기에 나타나는 태사기 복합체(synaptonemal complex)들이 확인되는 경우도 있었다(Figs. 4, 5). 세포간교에 의한 생식세포들의 연결은 생식세포들이 동시에 분화함으로써 다수의 정자를 방출하여 수정율을 높이기 위한 것으로 알려져 있다(Billard, 1983; Gwo & Gwo, 1993). 체내수정하는 *Xiphophorus maculatus*의 경우도 일반 체외수정하는 어류와 유사한 구조를 가지고 있다(Kim et al., 2003).

정세포의 초기발달시기에는 세포의 크기가 정모세포보다 작았고 염색질의 응축에 의하여 전자밀도가 높아졌으며 편모가 형성되기 시작하였고 미토콘드리아는 편모가 형성되는 주변에 넓게 분포하고 있었다(Fig. 6). 정자완성과정 중기에는 핵의 염색질 응축이 뚜렷하였으며 핵은 세포질 한쪽에 치우쳐 있었고 미토콘드리아가 편모 주변에 집중되어 분포하고 있었으며 핵은 구형이었다. 또한 정소낭의 강소를 형성하기 위해 세포간극이 확장되어 있었다(Fig. 7).

정자변태과정 중의 초기 정자에서 두부의 핵은 전자밀도가 정세포에 비해 더 높아졌으며 매우 긴 편모가 관찰되었고 미토콘드리아가 중편부의 단면상으로 볼 때 약 3~8개가 편모 쪽에 몰려있었다. 미토콘드리아의 형태는 거의 구형에 가까웠다(Fig. 8). 성숙한 정자는 염색질 응축이 매우 뚜렷하였고, 침체는 발견되지 않았다. 또한 미토콘드리아는 중편부에 종단면 상으로 1층, 횡단면 상으로 3~8개가 관찰되었다(Fig. 9). 편모를 횡단한 결과 미세소관 배열은 전형적인 9+2 구조를 이루고 있었고 축사의 이중미세소관 내의 A소관에서 디네인완이 관찰되었다. 또한 편모 양쪽으로 평행한 lateral fin이 관찰되었다(Fig. 10). 종에 따라서 미세소관 배열이 9+0 구조를 가지고 있는 경우도 알려져 있으며(Todd, 1976), 큰가시고기의 경우도 lateral fin이 있는데 이 lateral fin은 정자의 이동에 보조역할을 하여 수정하는 데 더 유리한 도구로 사용될 수 있다(Deung et al., 1999). 정자를 분리하여 주사전자현미경으로 정자의 외형을 관찰한 결과 투과전자현미경의 결과와 마찬가지로 두부의 형태는 직경 0.7~0.8 μ m 정도인 구형이었고 매우 작은 중편과 13~15 μ m 정도의 꼬리가 관찰되었다(Fig. 11).

어류의 정자의 두부형태는 종에 따라 리본형(Zirkin, 1975), 초승달형(Todd, 1976), 구형(Grier, 1976), 탄환형(Afzelelius, 1978) 및 신장형(Brusle, 1981) 등으로 매우 다양하며 대부

분의 체외수정 하는 종은 중편에 미토콘드리아가 구형의 주머니 속에 모여 있는 형태이나 체내수정하는 난태생 어류의 경우는 포유류의 정자와 마찬가지로 중편부가 길고 일렬로 배열되어 있다(Kim et al., 2003). 대부분의 경골어류는 정자의 두부에 침체가 존재하지 않아서 난자의 난문을 통하여 수정이 이루어지는 것으로 알려져 있으며(Kim, 2001, 2002, 2005). 따라서 본 종도 침체가 관찰되지 않았기 때문에 난자의 난막에 정자의 통로인 난문이 있을 것으로 추측되며 성숙한 난자에서 난문의 존재 여부에 대한 연구도 필요하다.

*C. managuense*의 정자형성과정은 다른 경골어류의 경우와 유사하지만 정자에서 두부의 형태가 구형인 것과 매우 짧은 중편, 미토콘드리아의 개수는 종특이성으로 생각되며 다른 시클리드과 어류의 정자형성과정과 정자의 형태가 공통적인 특징인지 아니면 종의 특이성인지를 확인하기 위한 같은 과에 속하는 다른 종에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Afzelelius BA: Fine structure of the garfish spermatozoon. J Ultrastr Res 64 : 309-314, 1978.
- Bayarri MJ, Zanuy S, Yilmaz O, Carrillo M: Effects of continuous light on the reproductive system of European sea bass gauged by alterations of circadian variations during their first reproductive cycle. Chronobiol Int 26 : 84-99, 2009.
- Billard R: Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): An ultrastructural study. Cell Tissue Res 233 : 265-284, 1983.
- Billard R: Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. Cell Tissue Res 237 : 347-355, 1984.
- Brusle S: Ultrastructure of spermatogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). Cell Tissue Res 217 : 415-424, 1981.
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of gametes in the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus*. Korean J Electron Microscopy 29 : 177-178, 1999. (Korean)
- Grier HJ: Sperm development in the teleost. Cell Tissue Res 168 : 419-431, 1976.
- Gwo JC, Gwo HH: Spermatogenesis in the black porgy *Acanthopagrus schlegeli* (Teleostei: Perciformes: Sparidae). Mol Rep Dev 36 : 75-83, 1993.
- Hourigan TF, Nakamura M, Nagahama Y, Yamauchi K, Grau EG: Histology, ultrastructure, and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the protogynous fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). General Comparative Endocrinol 83 : 193-217, 1991.
- 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 : 85-90, 2001. (Korean)

- Kim DH, Deung YK, Lee KJ: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from *Hyphessobrycon serpae*, Characidae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 35 : 89-96, 2005. (Korean)
- Kim DH, Lee KJ, Kim S, Deung YK: A study on the oogenesis of False dace (*Pseudorasbora parva*). Korean J Electron Microscopy 37 : 65-72, 2007. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from dark sleeper, Eleotrididae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 32 : 39-44, 2002. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: An ultrastructural study on the spermatogenesis of *Xiphophorus maculatus*. Korean J Electron Microscopy 33 : 267-274, 2003. (Korean)
- Ohta T, Nashirozawa C: Sperm penetration and transformation of sperm entry site in eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. J Morphol 229 : 191-200, 1996.
- Rossouw GJ, Vanessen LD: Spermatogenesis in the male whitespotted houndshark, *Mustelus palubes* Smith. South African J Sci 89 : 244-246, 1993.
- Santos RN, Andrade CC, Santos LN, Santos AFGN, Araujo FG: Testicular maturation of *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier) (Actinopterygii, Characidae) in a Brazilian tropical reservoir. Braz J Biol 66 : 143-150, 2006.
- Shafland PL: Exotic fishes of Florida-1994. Reviews in Fisheries Science 4 : 101-122, 1996.
- Sprando RL, Russell LD: Spermiogenesis in the bluegill (*Lepomis macrochirus*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. J Morphol 198 : 165-177, 1988.
- Todd PR: Ultrastructure of the sperm and spermiogenesis in the New Zealand freshwater eels (Anguillidae). Cell Tissue Res 171 : 221-232, 1976.
- van den Hurk, Peute RJ, Vermeij JAL: Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Cell Tissue Res 186 : 309-325.
- Wolenski JS, Hart NH: Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish egg. J Exp Zool 243 : 259-273, 1987.
- Yoneyama H, Iwasawa H: Annual changes in the testis and accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. Zool Sci 2 : 229-237, 1985.
- Yoon JM, Chung KY, Reu DS, Lew ID, Roh SC, Kim GW: Electron microscopic observations on micropyle after sperm penetration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Kor J Zool 39 : 173-181, 1996. (Korean)

< 국문초록 >

경골어류 시클리드과에 속하는 *Cichlasoma managuense*의 정자형성과정 및 정자를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. *Cichlasoma managuense*의 정소는 부레와 창자 사이에 위치하고 있었고 장축 2.3 cm, 단축 4 mm 정도의 크기로 살색을 띠고 있었다. 정자형성과정은 정소낭(testicular cyst)에서 이루어졌으며, 각 정소낭 내에 동일한 분화시기의 생식세포가 분포하고 있었다. 정원세포는 타원형이었고 미토콘드리아의 발달이 현저하였다. 제1정모세포는 원형으로 정원세포보다 크기가 작았고 제2정모세포는 제1정모세포보다 더 작아졌고 핵의 전자밀도는 더 높았다. 정세포의 초기발달시기에는 세포의 크기가 정모세포보다 작아졌고 두부의 전자밀도가 높아졌으며 편모가 형성되기 시작하였고 미토콘드리아는 핵 주변에 분포하였다. 정자완성과정 말기에는 핵의 염색질 응축이 뚜렷하였으며 핵은 세포질 한쪽에 치우쳐 있었고, 미토콘드리아는 편모 주변에 집중되었다. 완전히 성숙한 정자의 경우 두부형태는 구형이었고 두부에서 첨체는 관찰되지 않았으며 편모의 미세소관 배열은 9+2 구조를 이루고 있었다. 또한 편모 양쪽으로 lateral fin이 관찰되었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Light micrograph testis section of *Cichlasoma managuense* belonging to Cichlidae. Each cyst contains a clone of synchronically differentiating germ cells. Various staged cysts consisted mainly of spermatocytes (A), spermatid (B) and spermatozoa (C) are compared ($\times 40$).
- Fig. 2.** A transmission electron micrograph of spermatogonia of *Cichlasoma managuense* (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 3.** A transmission electron micrograph of primary spermatocytes. N, Nucleus; M, Mitochondria (Scale bar= $1\ \mu\text{m}$).
- Fig. 4.** An electron micrograph of secondary spermatocytes with synaptonemal complex in meiotic prophase II (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 5.** An electron micrograph of secondary spermatocytes (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 6.** An electron micrograph of early spermatids. N, Nucleus; M, Mitochondria (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 7.** An electron micrograph in late spermatids. F, Flagella; M, Mitochondria (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 8.** An electron micrograph of early sperm in testicular cyst. M, mitochondria (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 9.** A Transmission electron micrograph of a spermatozoon. N, Nucleus; M, mitochondria; F, Flagella; Is, Intercellular space (Scale bar= $1\ \mu\text{m}$).
- Fig. 10.** Cross section of the tail of a spermatozoon. Note the 9+2 structure and lateral fins (arrow) (Scale bar= $0.2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 11.** A scanning electron micrograph of sperm (Scale bar= $2\ \mu\text{m}$).





