

경골어류 시클리드과 *Cichlasoma managuensis*의 수정란 난막 미세구조

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

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

Ultrastructure of the Fertilized Egg Envelope in *Cichlasoma managuensis*, Cichlidae, Teleost

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

¹Department of Environmental Medical Biology, ²Institute of Basic Medical Science,
⁴Institute 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 January 7, 2009; Accepted February 6, 2009)

ABSTRACT

The ultrastructure of the fertilized egg envelope in *Cichlasoma managuensis* belonging to Cichlidae were investigated by routine light and electron microscopes.

The fertilized eggs of *Cichlasoma managuensis* was of the light yellow, non-transparent, ellipsoidal, adhesive and non-floated type. The size of fertilized egg was the major axis 1.92 ± 0.08 mm, the minor axis 1.43 ± 0.04 mm. The egg envelopes have a single micropyle, which is thought to the pathway of sperm in the area of the animal pole.

An outer surface of fertilized egg envelope was covered by a adhesive reticular structures and the fertilized egg envelopes consisted of two distinct layers; an outer adhesive layer and an inner layer of 13~15 horizontal lower electron density lamellae alternating with interlamellae of higher electron density. The external shape of fertilized egg is common trait of fishes belonging to Cichlidae and these ultrastructural characters of fertilized egg envelope can be utilized in taxonomy of teleost.

Keywords : Ultrastructure, Fish, Cichlidae, Egg envelope, Fertilized egg

서 론

경골어강(Osteichthyes)의 농어목(Perciformes)에 속하는 시클리드과(Cichlidae)의 어류는 약 1,300종이 아프리카, 남

아메리카, 중앙아메리카, 북아메리카 및 아시아의 담수와 기수지역에 분포하고 있으며 이중 900여 종이 아프리카의 말라이호(Malawi), 빅토리아호 및 탕가호(Tanganyika)에서 서식한다(Moyle & Cech, 1996). *Cichlasoma managuense*는 미국 Honduras 동부에서, Managua 호수, Nicaragua 호수 및

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, Fax: (033) 731-6953, E-mail: medbio@yonsei.ac.kr

Costa Rica까지 서식하며 Jaguar cichlid, Jaguar guapote, Guapote tiger 및 Guapote 등으로 불리운다. 사육 시 적정수온은 22~27°C이지만 12°C 정도의 저온인 플로리다 북부와 중부지역에서도 발견된다는 보고가 있다 (Shafland, 1996). 이 어종의 수컷은 암컷보다 크며 밝은 체색을 띠고 등지느러미와 볼기지느러미가 더 뾰족하다 (Riehl & Baensch, 1991). 산란기는 미국 Miami, Dade의 경우 3월에서 11월이며 7월에 절정을 이룬다. 일반적으로 전장 15.1~30.4 cm 정도인 암컷은 4053개의 알을 산란하지만 (Gestring & Shafland, 1997) Sakurai et al. (1993)에 따르면 50~63 cm까지 성장이 가능한 것으로 알려져 있다.

어류의 수정란은 비세포성인 난막에 의해 둘러싸여 있으며 발생중인 배자가 외부환경으로 부터 받는 물리적인 충격 및 화학물질에 대해서 방어하고 확산에 의한 기체교환의 기능을 수행하며 (Harvey et al., 1983; Cameron & Hunter, 1984). 또한 동물극쪽에 난문(micropyle)을 가지고 있어서 첨체가 없는 정자의 통과 역할을 하는데, 난문의 직경은 난막의 내측으로 들어갈수록 작아지기 때문에 다수정(poly-spermy)을 제한하는 물리적인 장벽으로 작용한다 (Ohta & Nashirozawa, 1996; Yoon et al., 1996).

어류의 난막과 난문에 대한 연구들은 카라신과 (Characidae) 어류인 head and tail light fish, black tetra 및 buenos aires tetra (Kim et al., 1996), 피라미 (Deung et al., 2000), 참마자 (Kim et al., 2001), 얼룩동사리 (Kim et al., 2002), *Hyphessobrycon serpae* (Kim et al., 2005) 및 참붕어 (Kim et al., 2007) 등에서 보고된 바 있으며 Cichlidae에 속하는 어류에 대한 연구는 golden severum, convic cichlid 및 discus의 경우 알려져 있다 (Deung et al., 1997). 이들 수정란은 광학현미경으로 관찰한 경우 외형은 같으나 난막의 미세구조는 종에 따라 서로 다르다. 그러나 난막의 미세구조가 과에 따라서 공통적인 특징이 있는지 아니면 실제로 종마다 서로 다른 것인지에 대한 연구결과는 몇 종만을 비교하여 설명하기에는 불충분하기 때문에 시클리드과 어류인 *Cichlasoma managuense*를 실험재료로 선정하여 이 과 (Family)에 속하는 어종의 수정란 난막의 일반적인 특징인 침란성 및 부착성인 수정란이 과 수준에서 어떤 형태학적 특징들을 가지고 있는지 알아보고 종의 분류학적 기준이 되는 특징들을 확인하기 위하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 수정란의 일반적인 형태, 난막의 표면, 단면구조 및 난문의 형태를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

한강수족관 (강원도, 원주)에서 *Cichlasoma managuense* 한

쌍을 기증 받아 pH 6.5±0.5 및 26±0.5°C의 수조 (60×45×45 cm)에서 3개월 이상 기초 양어하여 친어로 사용하였다. 양어수는 Fritz-guard (Fritz Co. Ltd., USA)로 염소를 제거시킨 후 사용하였고 일반 저면여과법을 이용하였다. 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. 실험방법

1) 수정란의 채란

기초양어수를 사용하였으며 산란상은 초벌구이된 디스크스용 산란상을 이용하였으며 산란상 밖에 자연적으로 산란된 수정란을 실험에 사용하였다.

2) 조직처리

(1) 광학현미경 시료

수정란 중 난할과정을 수행하지 않은 수정란을 선택하여 광학현미경으로 난의 형태와 난문을 관찰하였다. 수정란을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 4% formaldehyde로 4°C에서 24시간 고정한 후 흐르는 물로 12시간 수세하였다. Ethanol 농도 상승순으로 탈수하고 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중염색 후 수정란의 난막단면을 관찰하였다.

(2) 주사전자현미경 시료

광학현미경의 시료와 동일한 방법으로 선별한 수정란을 0.1 M 인산완충액 (pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 48시간 전고정한 후 동일 완충액으로 세척하여 1% 오스뮴산으로 90분간 후고정하였다. 동일 완충액으로 30분씩 2회 세척하였으며 ethanol농도 상승순으로 탈수시켜 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후 JFC 1100형 ion coater에서 20 nm의 두께로 금도금하여 탁상용주사전자현미경 (TM-1000, HITACHI, Japan)으로 관찰하였다.

(3) 투과전자현미경 시료

수정란을 주사전자현미경과 동일한 방법으로 고정 및 탈수하여 propylene oxide로 치환하고 epon혼합액에 포매한 후 50~60 nm로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM-1200EX II형 투과전자현미경 (JEOL, Japan)으로 80 kV에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

경골어류 시클리드과에 속하는 *Cichlasoma managuense*

의 수정란 난막구조를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

수정란은 약황색의 불투명한 부착성 및 침란성란으로 장타원형이었으며 크기는 장축 1.43 ± 0.04 mm, 단축 1.85 ± 0.03 mm였다. 수정란 내부에는 지방적이 관찰되지 않았고 난황낭이 모여 형성된 난황괴(yolk mass)가 발견되었으며, 위란강은 잘 발달되어 있지 않았다(Fig. 1). 지금까지 알려진 시클리드과에 속하는 어류 중 angelfish (Kim et al., 1993), golden severum, convic cichlid 및 discus의 경우(Deung et al., 1997) 수정란의 외형은 *Cichlasoma managuense*와 거의 같은 형태이다. 다른 과의 어종과 비교해 볼 때 위란강은 매우 작는데 그 이유는 산란 습성과 관련이 있는 것으로 생각된다. 시클리드과의 어류는 산란시 암컷이 산란관을 산란상인 돌에 비비면서 산란을 하고 후에 수정이 이루어지기 때문에 난자가 산란시 발생하는 충격은 거의 없다. 이런 광학현미경상으로 관찰되는 수정란의 외형은 시클리드과 어류의 공통적인 형태학적 형질이 될 수 있을 것으로 사료된다. 바닥에 알을 뿌리듯이 산란하는 잉어과에 속하는 zebrafish와 카라신과인 head and tail light fish, black tetra, buenos aires tetra 및 *Hyphessobrycon serpae*의 경우 뿌리듯 산란을 하기 때문에 충격으로부터 수정란을 보호하기 위하여 위란강은 매우 잘 발달되어 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1993, 1996, 2005).

광학현미경상에서는 난막주위에 부착사가 일부 관찰되었고 동물극 쪽에서 한 개의 난문이 발견되었으며 난문을 확대하여 관찰한 결과 갈매기 형태였다(Fig. 2). 수정란 난막의 정단면을 광학현미경으로 관찰한 결과 부착성 바깥층과 띠 모양의 내층으로 모두 2층으로 구성되어 있었다(Fig. 3).

주사전자현미경으로 저배율에서 난막을 관찰하였을 때 상당히 부드러운 표층구조로 관찰되었고 동물극 쪽에 옅게 들어간 난문이 관찰되었다(Fig. 4). 난문은 대부분 경골어류에서 침체가 없는 정자가 난막을 뚫지 못하기 때문에 정자의 통로 및 다정자수정을 방지하는 구조물로 알려졌다(Hart & Donovan, 1983; Wolenski & Hart, 1987) 확대하여 관찰한 결과 외경 $12 \sim 15 \mu\text{m}$ 정도로 원형이었고 안으로 들어갈수록 좁아지는 갈매기 형태를 하고 있었다(Fig. 5). 어종에 따라 정자의 두부에 침체를 보유하고 있는 종도 있으며 정자에 침체를 보유하고 있으면서 난문도 같이 보유하고 있는 것도 있다. 특히 칠성장어의 경우, 정자는 침체를 보유하고 있으며 난막에 난문은 없으며 이 경우 정자는 동물극쪽에 분포하는 섬유상 다발의 기부를 통해서 난자내로 들어가는 것으로 알려졌다(Kille, 1960). 또한 흰철갑상어(white sturgeon)의 경우처럼 다수의 난문을 보유하고 있으면서 정자의 두부에 침체를 보유하고 있는 종도 있다(Cherr & Clark, 1984).

부착기능을 하는 부착사를 관찰한 결과 섬유들이 그물모

양을 하고 있었으며 굵은 섬유가 주축을 이루고 이 주축으로부터 가는 섬유가 분지되어 있는 것이 관찰 되었다(Fig. 6). 시클리드과 어류의 수정란은 모두 부착성이며 부착사가 난막 외측에 분포한다. 부착사는 수정란이 부착될 때까지 산란상에 부착하는데 매우 중요한 역할을 하며 같은 과라고 하더라도 종에 따라 부착사의 미세구조는 서로 다른 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1997). Zebrafish와 leopard danio의 경우에서처럼 부착성이 아닌 수정란의 경우 부착사는 없는 대신에 충격을 흡수할 수 있는 버섯모양의 구조물을 보유하고 있는 경우도 있다(Kim et al., 1993, 1998).

수정란 난막을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 두께는 약 $17 \sim 20 \mu\text{m}$ 이었고 전자밀도가 높은 부착성 바깥층과 전자밀도가 낮고 높은 층이 교대로 되어있는 층상구조를 이루고 있는 내층, 모두 2층으로 구성되어 있었고 내층을 계수한 결과 전자밀도가 서로 다른 13~15층이었다(Fig. 7). 서식처가 서로 다른 같은 과의 golden severum, convic cichlid 및 discus의 경우 매우 유사한 형태를 가지고 있으며 내층의 수는 golden severum의 경우 15~17층, convic cichlid는 14~16층, 또한 discus의 경우는 18~19층으로 서로 다르다(Deung et al., 1997). 따라서 2층으로 구성되어 있다는 점에서는 시클리드과의 공통적인 특성으로 생각되지만 내층의 수가 종에 따라 서로 다른 것은 종특이성이 될 수 있다고 사료된다. 카라신과 어류인 head and tail light fish와 buenos aires tetra의 수정란 난막은 3층으로, black tetra의 경우 2층으로 구성되어 있으며 이중 내층은 head and tail light fish는 3층, black tetra는 4층 및 buenos aires tetra는 5층으로 구성되어 있다(Kim et al., 1996).

어류에서 난막의 구조는 광량, 수압 및 파도 등 외부환경에 따라 다양하게 나타나는데 연안에 서식하는 종과 좀 더 깊은 곳에 서식하는 종의 난막의 두께를 비교한 결과 연안에 서식하는 종이 더 두꺼운 것으로 알려졌는데 이것은 파도의 영향에 대한 적응으로 알려졌으며(Stehr & Hawkes, 1979), 난태생 어류의 수정란 난막은 형태학적으로 난생어류의 난막구조와 유사하지만 태생의 수정란 난막보다 훨씬 얇은 것으로 알려졌다(Flegler, 1977). 또한 같은 과라고 할 지라도 종에 따라서 난막의 구조는 다양하다(Riehl & Greven, 1993; Kim et al., 1996, 1998, 1999).

이상과 같이 다른 어종과 비교해 볼 때 *Cichlasoma managuense*의 수정란의 외형, 난문 및 난막의 형태는 시클리드과 어류의 공통적인 특징이며 부착사의 모양, 난막의 내층 수의 차이는 이 종만이 가지는 종특이성이 될 수 있다. 그러나 앞으로 정확한 결과를 정리하기 위하여 보다 많은 시클리드과에 속하는 다른 어종에 대한 연구가 추가적으로 필요하고, 난문을 가지고 있다고 하더라도 정자의 침체의 유무를 확인하기 위한 추가적이 실험이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 난막의 단면구조만으로는 정확한 구조

를 확인하기 어려우므로 3D-tomography 같은 기법을 이용한 형태학적 연구도 필요하다.

참 고 문 헌

- Cameron IL, Hunter KE: Regulation of the permeability of the medaka fish embryo chorion by exogenous sodium and calcium ions. *J Exp Zool* 231(3) : 447-454, 1984.
- Cherr GN, JR Clark WH: An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J Exp Zool* 232 : 129-139, 1984.
- 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)
- Flegler C: Electron microscopic studies on the development of the chorion of the viviparous teleost *Dermogenys pusillus* (Hemirhamphidae). *Cell Tiss Res* 179 : 255-270, 1977.
- Gestring K, Shafland P: Selected life history attributes of the exotic jaguar guapote (*Cichlasoma managuense*) in Florida. *Florida Scientist* 60(3) : 137-142, 1997.
- Hart NH, Donovan M: Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J Exp Zool* 227 : 277-296, 1983.
- Harvey B, Kelley RN, Ashwood-Smith MJ: Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiol* 20 : 432-439, 1983.
- Kille RA: Fertilization of the lamprey egg. *Exp Cell Res* 20 : 12-27, 1960.
- 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, Deung YK, Kim WJ, Reu DS, Kang SJ: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelope from three-spot gourami, pearl gourami and marble gourami, Belontiidae, teleost. *Korean J Electron Microscopy* 29(3) : 343-351, 1999. (Korean)
- Kim DH, Lee KJ, Kim Seok, Deung YK: A study on the oogenesis of false dace (*Pseudorasbora parva*). *Korean J Electron Microscopy* 37(2) : 65-72, 2007. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: A comparative study on the ultrastructures 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 the fertilized egg envelope from dark sleeper, Eleotrididae, Teleost. *Korean J Electron Microscopy* 32(1) : 39-44, 2002. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from *Hypheobrycon serpae*, Characidae, teleost. *Korean J Electron Microscopy* 35(2) : 89-96, 2005. (Korean)
- 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.
- Moyle PB, Cech JJ Jr: *Fishes, An introduction to ichthyology*, 3rd ed., Prentice Hall, p. 322, 1996.
- 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.
- Riehl R, Baensch HA: *Aquarium Atlas*, Mergus, Melle, p. 992, 1991.
- Riehl R, Greven H: Fine structure of egg envelopes in some viviparous goodeid fishes, with comments on the relation of envelope thickness to viviparity. *Can J Zool* 71 : 91-97, 1993.
- Sakurai A, Sakamoto Y, Mori F: *Aquarium Fish of The World: The Comprehensive Guide To 650 Species*. Chronicle Books, San Francisco, p. 288, 1993.
- Shafland PL: Exotic Fishes of Florida-1994. *Reviews in Fisheries Science* 4(2) : 101-122, 1996.
- 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.
- Wolenski JS, Hart NH: Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish egg. *J Exp Zool* 243 : 259-273, 1987.
- 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 수정란 난막구조를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

수정란은 약황색의 불투명한 부착성 및 침란성란으로 장타원형이었으며 크기는 장축 1.43 ± 0.04 mm, 단축 1.85 ± 0.03 mm였다. 수정란의 동물극쪽에서 수정을 위한 정자의 통로로 생각되는 난문이 위치하고 있었고 위란강은 잘 발달되어 있지 않았다. 수정란 난막의 표면에는 부착성 망상구조물들이 덮고 있었고 난문의 형태는 깔때기 형태였다. 수정란 난막의 단면을 관찰한 결과 2층으로 구성되어 있었으며 외층은 부착성 층, 내층은 전자밀도가 서로 다른 13~15층의 층상구조를 하고 있었다.

수정란의 외형은 전형적인 시클리드과에 속하는 다른 어류와 동일한 형태를 하고 있어 과의 특성을 보이며 이들 수정란 난막에서 표면과 단면의 미세구조는 *Cichlasoma managuense*만이 가지고 있는 종특이성이 될 수 있기 때문에 경골어류의 종을 분류하는데 형태학적 형질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph of a fertilized egg in *Cichlasoma managuense* belonging to Cichlidae. Arrow indicates a micropyle ($\times 40$). Ym : Yolk mass, E : egg envelope, Bd : Blastodisc. This fertilized egg was of the non-transparent, ellipsoidal, adhesive and non-floated type.
- Fig. 2.** A light micrograph of the micropyle in the fertilized egg envelope of *Cichlasoma managuense* ($\times 100$). Note the micropyle.
- Fig. 3.** A light micrograph of cross section of fertilized egg envelope. Arrow indicates a fertilized egg envelope ($\times 400$). OL : Outer adhesive layer.
- Fig. 4.** A scanning electron micrograph of the micropyle (arrow) in the fertilized egg envelope (Bar= $10\ \mu\text{m}$).
- Fig. 5.** A scanning electron micrograph of the micropyle in the fertilized egg envelope (Bar= $3\ \mu\text{m}$).
- Fig. 6.** A scanning electron micrograph of the outer surface in the fertilized egg envelope (Bar= $1\ \mu\text{m}$).
- Fig. 7.** A transmission electron micrograph of the fertilized egg envelope. The egg envelope is two layered, consisting of an outer, adhesive layer (OL) and an inner layer (IL) of 13 ~ 15 horizontal lower electron density lamellae alternating with interlamellae of higher electron density (Bar= $1\ \mu\text{m}$). Yv : Yolk mass.



