

## 경골어류 시클리드과 크리벤시스 (*Pelvicachromis pulcher*)의 난자형성과정

김동희, 장병수<sup>1</sup>, 등영건, 권중균<sup>2</sup>, 이명선<sup>3</sup>, 이귀영<sup>4</sup>, 이규재\*

연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실, 기초의학연구소,

<sup>1</sup>한서대학교 보건학부 피부미용학과, <sup>2</sup>한양대학교 의과대학 전자현미경실,

<sup>3</sup>청주대학교 이공대학 유전공학과, <sup>4</sup>극동정보대학 뷰티코디네이션학과

## The Oogenesis of Kribensis, *Pelvicachromis pulcher*, Cichlidae, Teleostei

Dong-Heui Kim, Byung-Soo Chang<sup>1</sup>, Yung-Chien Teng, Jung-Kyun Kwon<sup>2</sup>,  
Myeong-Seon Lee<sup>3</sup>, Gui-Young Lee<sup>4</sup> and Kyu-Jae Lee\*

Department of Environmental Medical Biology, Institute of Basic Medical Science,  
Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

<sup>2</sup>Department of Electron Microscopy Laboratory, College of Medicine,  
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

<sup>4</sup>Department of Beauty Coordination, Keukdong College, Icheon, Gyeonggi 467-900, Korea

(Received April 20, 2010; Revised June 10, 2010; Accepted June 14, 2010)

### ABSTRACT

Kribensis, *Pelvicachromis pulcher* is a teleost belonging to Cichlidae. The oogenesis was investigated by light microscope.

The ovary was located between intestine and air bladder, a yellowish and ellipsoidal shape with the major axis 20 mm and the minor axis 5 mm. Cytoplasm of oogonia in early stage was basophilic and many nucleoli were located at inside of nuclear membrane. In primary oocytes, yolk vesicles were distributed only in the marginal area and egg envelope was not formed on the outside of an egg. In secondary oocytes, the egg envelope was formed and yolk vesicles in the cytoplasm were increased than the earlier stage. The basophilic substance of cytoplasm was changed to acidic. Some yolk vesicles started forming small yolk mass except the surrounding nucleus. In case of matured egg, size of egg were increased. The yolk vesicles were changed to yolk mass in accordance with development. The yolk mass contained crystal-like structures.

In conclusion, the oogenesis of *Pelvicachromis pulcher* was summarized by the increase in cell size, the formation and the accumulation of yolk, and the decrease of basophilic substance in the cytoplasm. The oogenesis of *Coreoleuciscus splendidus* is similar with other teleost. But there were differences in distribution of yolk vesicle and yolk mass containing cristal-like structures.

**Keywords** : Kribensis, *Pelvicachromis pulcher*, Oogenesis

\* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, 162, Ilsan-dong, Wonju, Gangwon-do 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, Fax: (033) 731-6953, E-mail: medbio@yonsei.ac.kr

## 서 론

시클리드과(Cichlidae)에 속하는 어류는 부착성란을 수초와 돌과 같은 산란상에 붙이는 종류와 산란 후 수정란을 입속에 넣어 부화될 때까지 물고 다니는(mouthbrooding) 종류 2가지로 나누어 진다(Bailey & Sandford, 1998). 크리벤시스(*kribensis*)는 산란상에 알을 붙이는 종으로 종명에서 라틴어 *pulcher*는 아름답다는(*beautiful*) 의미로 외형이 매우 화려해서 관상용으로 인기가 있는 종이다. 서식처는 나이지리아 남부부터 카메룬 연안지역의 하천이며 최적 수질은 수온 24~26°C, pH 5.6~6.2이다(Nwadiaro, 1985). 번식기에 암수 모두 혼인색을 띠지만 암컷은 수컷보다 작고 수컷 등지느러미는 황색이 거의 없으며, 꼬리지느러미가 끝이 뾰족한 스페이드형(spade-shaped caudal fin)이지만 암수구별은 어려운 편이다. 성장시기의 수환경의 pH의 증가는 성비에 영향을 주며 pH 증가는 수컷이 암컷보다 증가하는 경향이 있다(Rubin, 1985).

난자형성과정은 인(nucleolus)의 형성, 핵 내의 inclusion body의 발달, 난황을 포함한 다양한 형태의 소기관의 축적 및 난막의 형성 등을 포함한 다양한 과정을 통하여 이루어진다(Guraya, 1986). 어류의 난자형성과정은 온대지역과 열대지역에 서식하는 경우 서로 다른 생식주기를 보인다. 온대지역에 서식하는 경우 산란 직후 여름에 퇴행기로 들어가며 난자형성과정은 늦가을부터 시작하여 산란기인 봄에 절정을 이룬다(Singh et al., 2005). 이 경우 난자형성과정은 휴지기, 준비시기, 산란전시기, 산란시기 및 산란 후 퇴행시기로 5단계로 나누어진다. 열대지역에 서식하는 경우 년 중 산란이 이루어지기 때문에 퇴행시기 없이 산란전시기, 초기 산란시기 및 산란후시기 3단계로 나누기도 하지만(Hatakeyama & Akiyama, 2007), 인위적으로 단계를 나누는 것은 상당히 어렵다.

지금까지 보고된 어류의 난자형성과정은 잉어과에 속하는 참붕어, 피라미, 버들치 및 카라신과(Characidae)에 속하는 glow-light tetra 등에서 알려져 있으며(Jang et al., 1995; Kim et al., 2007; Lee et al., 2008; Kim et al., 2009), 같은 속(Genus)에 속하는 9종의 난자형성과정에 대한 연구에 따르면 수환경 조건은 동일하지만 종간 난자형성과정은 서로 다른 것으로 보고된 바 있다(Motta et al., 2005).

본 연구는 산란주기가 짧고 연중 산란이 가능한 시클리드과에 속하는 크리벤시스(*Pelvicachromis pulcher*)를 실험재료로 하여 광학현미경으로 난자형성과정을 확인함으로써 열대지역에 서식하는 어류의 경우 난자형성과정이 기존에 연구해왔던 국내에 서식하는 온대지역의 어류와 차이점이 있는지 아니면 열대나 온대지역에 상관없이 담수산 경골어류의 난자형성과정은 같은지 그리고 지금까지 연구해온 다른 종과의 차이점이 있는지 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

2009년 4월 강원도 원주시 산호수조관에서 크리벤시스(*Pelvicachromis pulcher*)를 구입하여 실험실내에서 기초사육을 하였으며 사육중 성숙한 암컷을 선별하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 사육방법

피트모스를 통과시켜 pH 5.85±0.5 및 25.0±0.5°C로 조정된 물이 담긴 수조(60×45×45 cm)에서 사육하였으며 기초양어수는 Fritz-guard(Fritz Co., Ltd., USA)로 상수의 염소를 제거시킨 후 사용하였고 저면식 여과기를 이용한 생물학적 여과(biological filtration)법으로 물을 정화하였다. 수조 바닥에 쌓인 배설물과 먹고 남은 사료는 7일 간격으로 1/3씩 환수시켜 제거하였다. 하루 10시간씩 낮 환경을 유지시켰고 먹이는 자외선으로 살균시킨 냉동장구벌레를 오전 8시 30분과 오후 5시에 하루 2번씩 공급하였다.

#### 2) 암수분리

실험동물을 사육하는 혼인색이 흐리고 포란되어 복부가 팽창된 개체를 암컷으로 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 조직처리

성숙한 쉬리의 암컷을 해부하여 난소를 적출하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 10% formaldehyde로 4°C에서 24시간 고정한 후 흐르는 물로 12시간 세척하고 ethanol 농도 상승순으로 탈수한 다음 xylene으로 치환시킨 후, paraffin으로 포매하여 3~4 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 발색분화시기에 따른 난자형성과정을 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

경골어류, 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 크리벤시스(*Pelvicachromis pulcher*)의 난자형성과정을 광학현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

난소는 한 쌍으로 부레와 창자사이에 위치하고 있었으며 일반적으로 다른 종의 경우에서처럼 황색을 띠었다. 난소의 형태는 장타원형(장축 20 mm, 단축 5 mm)이었다. 난소 내에는 난원세포, 제1난모세포, 제2난모세포 및 난세포 등 다양한 분화단계의 생식세포들이 분포하고 있었고, 초기난원세포는 진한 파란색으로 염색되었으며(Fig. 1) 발달함에 따라 난원세포는 매우 작은 다각형이었고 이중 삼각형이

가장 많이 관찰되었다. 세포질은 hematoxylin으로 초기의 난원세포에 비하여 염색성이 낮은 파란색으로 염색되었으며 핵 안에 여러 개의 인들이 초기시기의 난원세포와 같이 핵막 안쪽에만 배열하는 특징을 보였다(Fig. 2). 발달함에 따라서 제1난모세포(primary oocyte)는 커졌으며 난원세포와 같이 인이 핵막 안쪽에만 배열하는 특징을 보였다. 초기 난원세포에 비하여 색상은 좀 흐려져 보라색에 가깝게 관찰되었고 난막은 관찰되지 않았다. 난황포(yolk vesicle)들은 핵 주변부에는 관찰되지 않았고 세포질의 가장자리에만 국한적으로 형성되기 시작하였다. 이시기에 난막은 형성되기 시작하였으나 매우 얇게 관찰되었다(Fig. 3). 제1난모세포가 발달함에 따라서 난황포는 바깥 가장자리에서 안쪽으로 증식되어 핵 쪽으로 이동되었으며 핵과 난막은 eosin에 의해 염색되어 분홍색을 띠었고 난막 바깥쪽은 짙은 푸른색의 여포상피(follicular epithelium)로 싸여 있었다. 그러나 핵막 주변부에는 난황포가 형성되지 않았고 약간 떨어진 곳에 난황포가 모여 띠 형태를 이루었다(Figs. 4, 5). 제2난모세포는 세포질이 전체적으로 호산성이었으며 난황포가 세포질 전체에 분포하였다. 일부 난황포는 작은 난황포를 형성하기 시작하였으나 핵 주변부에서는 난황포 형성이 많이 이루어지지 않았다(Fig. 6). 성숙한 난자는 제1난모세포보다도 크기가 상당히 크며, 난막이 뚜렷하고 난황포는 더욱 발달하여 적색으로 염색된 구형의 난황포(yolk mass)를 형성하고 있었고, 핵 주변부와 난막 주변에 분포하고 있는 난황포는 세포질 중앙쪽보다 크기가 작았다(Fig. 7). 성숙난의 난황포를 확대한 결과 난황포 속에 염색밀도가 낮은 다각형과 타원형의 결정형태의 구조물들이 채워져 있었다(Fig. 8).

경골어류의 난소는 한 쌍으로 부레와 창자사이에 위치하며(Kim et al., 2009), 난자형성과정은 수온, 광주기, 광도 및 수질 등 환경요인에 의해 결정된다. 이중 온도상승과 광량의 증가가 난자형성과정에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Hatakeyama & Akiyama, 2007).

포유류와는 달리 경골어류의 생식은 수환경이라는 점에서 많은 다양성을 가지고 있다. 난자의 형태나 난황형성과정과 같은 특수성, 환경요인, 산란방식 및 생식행동 등 매우 다양하다. 난황형성과정은 성호르몬의 자극에 의한 간에서 특수한 glycolipo-phosphoprotein인 vitellogenin의 합성 과정을 의미한다. 또한 여포세포에서 이루어지는 estradiol 합성과 vitellogenic follicles에 의한 vtg uptake는 모두 FSH에 의해서 조절되는 것으로 생각된다. 난세포의 성숙은 LH 조절 하에서 여포세포에서 합성되는 MIS(maturation inducing steroid) 또는 progestin에 의해서 직접적으로 시작되고 성결정은 염색체에 의해서 결정되는 것은 당연하지만 환경호르몬의 영향을 피하기 어렵다(Jalabert, 2005). 지금까지 조직학적으로 난자형성과정에서 관찰되는 구조물들의 성분에 대하여 많이 알려져 있지 않으나 심해경골어류인 *Hoplost-*

*thus mediterraneus*의 난자형성과정을 면역염색법을 이용한 연구에 따르면 난황낭 속에는 주로 당단백질들을 포함하고 있으며 초기에는 alpha-D-glucose와 alpha-D-mannose, 후기에는 galactose와 beta-N-acetyl glucosamine이 분포하고 세포질 주변부에 분포하는 nNOS가 산란과 배우체형성과정(gametogenesis) 조절에 관여하는 것으로 생각되고 있다(Calabro et al., 2008).

크리벤시스의 난자형성과정은 쉬리의 경우 난황포가 난막쪽에서 핵막쪽으로 이동된다는 점에서 유사하지만(Kim et al., 2010) 난황포형성이 동시에 이루어지지 않고 세포질 중앙부위에서 먼저 이루어진다는 점에서 차이점이 있었다. 또한 난황포의 형태가 버들치(Kim et al., 2009)와 쉬리(Kim et al., 2010)의 경우 구형이면서 내부에 어떤 구조물도 관찰되지 않았지만 크리벤시스의 경우 다각형 또는 타원형의 결정 같은 구조물이 존재한다는 점에서 차이를 보였다. 따라서 온대지역에 서식하는 버들치와 쉬리의 경우와 비교해 볼 때 난황포의 이동방식과 난황포의 형태가 차이를 보였다. 따라서 본 실험에서 관찰된 난황포의 형태는 크리벤시스의 종특이성으로 생각된다. 카라신과(Characidae)에 속하는 열대지역에 서식하는 glow-light tetra의 경우 난황포는 결정구조물이 없다(Lee et al., 2008). 그러나 정확한 종특이성을 확인하기 위해서는 수정란 및 수정란 난막에 대한 미세구조에 대한 연구가 필요하다. 난막의 표면 및 단면의 미세구조는 종에 따라 서로 다른 종특이성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1997; Kim et al., 1993; 1998, 2005).

이상과 같이 크리벤시스의 난자형성과정은 난세포의 크기증가, 난황낭의 축적, 세포질 내 염기성 물질이 산성으로 전환 및 난막의 발달로 요약될 수 있으며 일반적인 다른과의 담수경골어류와 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다. 그러나 난황포의 배열방식과 난황포의 형태는 다른 종과 구별되는 종특이성이다. 본 실험에 사용된 크리벤시스는 열대지역에 서식하는 종이기 때문에 산란주기가 한 달 정도로 매우 짧아 실험동물로써 활용이 가능하며 같은 과에 속하는 다른 종의 난자형성과정을 확인하여 과(Family)간의 유연관계를 확인할 필요성이 있다.

## 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, London, pp. 12-13, 1998.
- Calabro C, Albanese MP, Bertuccio C, Licata A, Gentile N: Histological, histochemical and immunohistochemical study on the growing oocytes of the abyssal teleost *Hoplostethus mediterraneus* (V). *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 46(1) : 97-102,

- 2008.
- Deung YK, Reu DS, Kim DH: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convic cichlid and discus, Cichlidae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 27(4) : 417-432, 1997. (Korean)
- Guraya SS: Monographs in developmental biology, The cell and molecular biology of fish oogenesis. Karger 18 : 111-147, 1986.
- Hatakeyama R, Akiyama N: Annual reproductive cycle of a bitterling, *Tanakia tanago*, reared in an outdoor tank. Zoolog Sci 24(6) : 614-622, 2007.
- Jalabert B: Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod Nutr Dev 45 : 261-279, 2005.
- Jang SJ, Kim DH, Reu DS, Deung YK: A study on the oogenesis of *Pale chub (Zacco platypus)*. Korean J Electron Microscopy 25(3) : 63-74, 1995. (Korean)
- Kim DH, Chang BS, Jung HS, Teng YC, Kim S, Lee KJ: The oogenesis of Chinese minnow, Leuciscinae, Teleostei. Korean J Electron Microscopy 39(3) : 237-243, 2009. (Korean)
- Kim DH, Lee KJ, Kim S, 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: 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 *Hyphessobrycon 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. (Korean)
- Lee KJ, Chang BS, Teng YC, Kim DH: The oogenesis of Glowlight Tetra, Characidae, Teleost. Korean J Microscopy 38(4) : 315-319, 2008. (Korean)
- Lee TY, Kang YJ, Lee BD: Reproduction and population dynamics of marbled sole *Linmanda yokohamae*, 1. Reproduction. Bull Korean Fish Soc 18(3) : 253-261, 1985. (Korean)
- Motta CM, Capriglione T, Frezza V, Simoniello P, Tammaro S, Filosa S: Oogenesis at subzero temperatures: a comparative study of the oocyte morphology in nine species of Notothenioids. Tissue Cell 37(3) : 233-240, 2005.
- Nwadiaro CS: The distribution and food habits of the dwarf African cichlid, *Pelvicachromis pulcher* in the River Sombreiro, Nigeria. Hydrobiologia 121 : 157-164, 1985.
- Rubin, DA: Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia 1 : 233-235, 1985.
- Singh AK, Kumar A, Singh IJ, Ram RN: Seasonal ovarian cycle in freshwater teleost, *Labeo rohita* (Ham.) in Tarai region of Uttaranchal. J Environ Biol 26(3) : 557-565, 2005.

### < 국문초록 >

경골어류, 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 크리벤시스(*Pelvicachromis pulcher*)의 난자형성과정을 광학현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

크리벤시스의 난소는 한 쌍으로 부레와 창자사이에 위치하고 있었으며 황색을 띠었다. 난소의 형태는 장타원형(장축 20 mm, 단축 5 mm)이었다. 초기난원세포는 진한 파란색으로 염색되었으며 발달함에 따라서 난원세포의 세포질은 hematoxylin으로 초기의 난원세포에 비하여 파란색으로 낮게 염색되었으며 핵 안에 여러 개의 인들이 초기시기의 난원세포와 같이 핵막 안쪽에만 배열하는 특징을 보였다 발달함에 따라서 제1난모세포(primary oocyte)는 커졌으며 초기 난원세포에 비하여 색상은 좀 흐려져 보라색에 가깝게 관찰되었고 난막은 관찰되지 않았다. 난황포(yolk vesicle)들은 핵 주변부에는 관찰되지 않았고 세포질의 가장자리에만 국한적으로 형성되기 시작하였다. 제1난모세포가 발달함에 따라서 난황포는 바깥 가장자리에서 안쪽으로 증식되어 핵 쪽으로 이동되었으며 제2난모세포는 세포질이 전체적으로 호산성이었으며 난황포가 세포질 전체에 분포하였다. 일부 난황포는 작은 난황포를 형성하기 시작하였으나 핵 주변부에서는 난황포 형성은 많이 이루어지지 않았다. 성숙한 난자는 난자의 크기가 상당히 커졌으며 난황포는 더욱 발달하여 난황포(yolk mass)를 이루고 있었고 성숙난의 난황포를 확대한 결과 난황포 속에 염색밀도가 낮은 다각형 또는 타원형의 결정구조물들이 채워져 있었다.

이상과 같이 크리벤시스의 난자형성과정은 난세포의 크기증가, 난황낭의 축적, 세포질 내 염기성 물질이 산성으로 전환 및 난막의 발달로 요약될 수 있으며 일반적인 다른과의 담수경골어류와 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다. 그러나 난황포의 배열방식과 난황포의 형태는 다른 종과 구별되는 종특이성이다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph of an early oogonium in ovary ( $\times 400$ ). C: Cytoplasm. The cytoplasm was basophilic.
- Fig. 2.** A light micrograph of an oogonium in ovary ( $\times 400$ ). The color of cytoplasm is changing from blue to light blue. N: Nucleus, C: Cytoplasm.
- Fig. 3.** Primary oocyte in early stage ( $\times 200$ ). Yv: Yolk vesicle. Yolk vesicle was distributed in marginal area only.
- Fig. 4.** Primary oocyte ( $\times 200$ ). N: Nucleus, Yv: Yolk vesicle.
- Fig. 5.** Primary oocyte ( $\times 40$ ). The yolk vesicle was increased than that of early stage. Arrow: Follicular epithelium.
- Fig. 6.** Secondary oocyte ( $\times 40$ ). N: Nucleus.
- Fig. 7.** A matured egg ( $\times 40$ ). E: Egg envelope, Ym: Yolk mass.
- Fig. 8.** Magnified yolk mass containing crystal-like structure ( $\times 400$ ). Ym: Yolk mass, arrow: crystal-like structure.



