

경골어류 바다빙어과 빙어의 성숙란 난막 미세구조

김 동 희, 김 재 구¹, 류 동 석^{2,*}

연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실,

¹전북대학교 자연과학대학 생물과학부, ²청주대학교 생명과학과

Ultrastructure of the Matured Egg Envelope in Pond Smelt, Osmeridae, Teleostei

Dong-Heui Kim, Jae-Goo Kim¹, Dong-Suck Reu^{2,*}

Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea

¹Faculty of Biological science, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received February 7, 2011; Revised March 21, 2011; Accepted March 21, 2011)

ABSTRACT

The ultrastructure of the matured egg envelope in Pond smelt, *Hypomesus nipponensis* belonging to Osmeridae, Osmeriformes were investigated by routine light and electron microscopes.

The matured egg have two egg envelopes and have a single micropyle, which is thought to the pathway of sperm in the area of the animal pole. An outer egg envelope was surrounded by a follicular layer and outer surface of inner egg envelope have structure with high electron density. Also, the inner egg envelope consisted of 6 horizontal lamellae with higher electron density alternating with 5 interlamellae of lower electron density. Many grooves distributed on the outer surface of outer egg envelope, and the outer surface of inner egg envelope was covered by amorphous structures.

In conclusion, the egg of teleost is surrounded by one egg envelope according to the studies on morphology of egg envelope up to the present. The fact that have two egg envelopes is a species specificity of Pond smelt and these ultrastructural characters of egg envelope can be utilized in taxonomy of teleost.

Keywords : Ultrastructure, Fish, Egg envelope, Pond smelt, *Hypomesus nipponensis*

서 론

경골어강(Osteichthyes)의 바다빙어목(Osmeriformes), 바다빙어과(Osmeridae)에 속하는 빙어(*Hypomesus nipponensis*)는 국내 동북부 바다에 유입하는 하천 하류, 일본, 러시아 및 알래스카 등에 분포하고 있으나, 수산진흥원에서 1925년 이래 함경남도 용흥강에서 채란한 빙어를 제천 의림지 등

전국 주요 저수지에 이식한 후 현재 전국에 분포하고 있다. 빙어는 하절기에는 저수지의 수심이 깊은 곳에 서식하다 산란기인 3월이 되면 얇은 개울로 이동한다. 먹이는 동물성플랑크톤과 깔따구 유충이다. 만 1년생이 되면 호수나 하천의 얇은 곳으로 나와 수초나 모랫바닥에 산란하는 것으로 알려져 있다(Kim & Park, 2002).

어류의 수정란은 비세포성인 난막에 의해 둘러싸여 있으며, 발생중인 배자가 외부환경으로부터 받는 물리적인 충격

* Correspondence should be addressed to Dr. Dong Suck Reu, Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea. Ph.: (043) 229-8528, Fax: (043) 229-8525, E-mail: re8448@cju.ac.kr

및 화학물질에 대해서 방어하고 확산에 의한 기체교환의 기능을 수행하며 (Harvey et al., 1983; Cameron & Hunter, 1984) 동물극쪽에 난문(micropyle)을 가지고 있어서 침체가 없는 정자의 통과 역할을 한다. 난문의 직경은 난막의 내측으로 들어갈수록 작아지기 때문에 다수정(polyspermy)을 제한하는 물리적인 장벽으로 작용한다(Ohta & Nashirozawa, 1996; Yoon et al., 1996).

열대지역에 서식하는 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 Golden severum, Convic cichlid 및 디스커스의 경우 수정란의 형태는 모두 장타원형으로 같은 형태를 가지고 있으나 난막 표면에 부착성 구조물과 단면구조는 종에 따라서 서로 다른 구조를 가지고 있어 종특이성을 나타내고(Deung et al., 1997), 등목어과(Belontiidae)에 속하는 Three-spot gourami, Pearl gourami 및 Marble gourami의 수정란 난막은 모두 같은 미세구조를 가지고 있어 과(Family)의 공통적인 특성을 나타낸다(Kim et al., 1999). 또한 카라신과(Characidae)에 속하는 어류의 경우 난막의 단면구조는 종에 따라 서로 다른 구조를 가지고 있으나 난문의 외부형태는 난막의 주름이 방사형으로 둘러싸여 수레바퀴모양을 하고 있어 과의 특이성, 난막 단면의 미세구조는 종특이성을 나타낸다(Kim et al., 1996, 2005).

지금까지의 난막의 미세구조에 대한 연구는 대부분 산란 주기가 짧고 연 중 산란이 가능한 열대지역에 서식하는 어종에서 주로 이루어져 왔으며, 온대지역에 서식하는 국내 어종에 대한 연구는 채집, 암수구별, 양어 및 실험실내 번식의 어려움 때문에 많이 이루어지지 못하고 있다. 국내에 서식하는 어류의 난막과 난문에 대한 연구들은 큰가시고기(Deung et al., 1999), 피라미(Deung et al., 2000), 참마자(Kim et al., 2001), 얼룩동사리(Kim et al., 2002), 참붕어(Kim et al., 2007), 버들치(Kim et al., 2009) 및 쉬리(Kim et al., 2010) 등에서 보고된 바 있으며 같은 과라고 하더라도 종에 따라서 난막의 구조는 서로 다른 것으로 알려져 있다. 빙어에 대한 연구는 정자구조에 대한 연구가 보고된 바 있으나(Kim et al., 2010) 난자에 대한 연구는 이루어진 적이 없으며, 특히 바다빙어과에서 난자의 난막에 대한 미세구조적 연구는 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구는 바다빙어과에 속하는 빙어의 난막구조가 종 수준에서 어떤 형태학적 특징들을 가지고 있는지 확인하기 위하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 난막의 표면구조, 단면구조 및 난문의 형태를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

2010년 1월부터 4월까지 충청북도 청원군 내수읍 비상저

수지에 서식하는 빙어(*Hypomesus nipponensis*)를 채집한 후 포란되어 복부가 팽창된 성숙한 암컷을 선별하여 실험재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 성숙란 채취

성숙한 암컷의 복부에 손가락으로 압력을 가하여 수란관을 통하여 빠져나온 성숙란을 실험에 사용하였다.

2) 조직처리

(1) 광학현미경 시료

성숙란을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 4% formaldehyde로 4°C에서 24시간 고정한 후 흐르는 물로 12시간 수세하였다. Ethanol 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중염색한 후 난막의 단면을 관찰하였다.

(2) 주사전자현미경 시료

광학현미경의 시료와 동일한 방법으로 얻은 성숙란을 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 건조시킨 후 JFC 1100형 ion coater에서 20 nm의 두께로 금도금하여 탁상용주사전자현미경(TM-1000, HITACHI, Japan)으로 관찰하였다.

(3) 투과전자현미경 시료

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

결과 및 고찰

바다빙어목, 바다빙어과에 속하는 빙어(*Hypomesus nipponensis*)의 성숙란 난막구조를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

빙어의 성숙란은 두 개의 난막으로 둘러싸여 있었으며 바깥쪽 난막의 외층은 여포세포가 분포하고 있었고 안쪽의 난막 바깥쪽은 호염기성을 나타내는 구조물들이 배열하고 있었다(Fig. 1). 지금까지 보고된 연구결과에 따르면 어류의 난자는 한 개의 난막으로만 둘러싸여 있는 것으로 알려져 있으나 빙어는 아주 특이한 경우로서 두 개의 난막으로 둘

러싸여져 있으므로 종특이성을 가짐으로서 형태학적 기준으로 중요성이 매우 높다.

난막의 단면을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 난막의 바깥쪽에 여포세포층이 한 층으로 배열되어져 있으며, 두 개의 난막 중 바깥쪽 막은 전자밀도가 균일한 한 층으로 되어 있었고 안쪽 막은 전자밀도가 높은 6층이 전자밀도가 낮은 5층에 의해서 분리되어 층상구조를 하고 있었다. 안쪽 막의 표면은 전자밀도가 높은 무정형의 돌기들이 관찰되었다(Fig. 2). 외측막을 정확히 수직단으로 관찰한 결과 외측이 안으로 함몰된 형태를 하고 있었으며(Fig. 3) 내측의 난막은 역시 층상구조를 하고 있었다(Fig. 4).

국내에 서식하는 큰가시고기과에 속하는 큰가시고기의 수정란 난막은 3층으로, 전자밀도가 높은 외층, 내층보다 폭이 넓은 층상구조로 두 층으로 구성된 중층 및 전자밀도가 낮은 층으로 나뉘어진 16~20층의 층상구조인 내층으로 구성되어 있고 난막의 주요 단백질은 19.4 kDa, 36.7 kDa, 39.4 kDa, 42.9 kDa, 46.1 kDa 및 53.0 kDa이다(Deung et al., 1999). 동사리과에 속하는 얼룩동사리의 경우 수정란 난막은 두 층으로, 외층은 직경 0.06~0.08 μm 정도의 얇고 전자밀도가 높은 한 층, 내층은 전자밀도가 서로 다른 7층으로 구성되어 있다(Kim et al., 2002). 황어아과에 속하는 버들치의 수정란은 모두 2층으로 미세용모 형태를 하고 있는 부착성 외층과 섬유상 띠가 위아래 각각 한 줄로 배열되어 있다(Kim et al., 2009). 잉어과에 속하는 피라미의 경우 수정란 난막은 3층으로 부착성인 전자밀도가 낮은 외층, 전자밀도가 높은 중층 및 9층의 층상구조를 이룬 내층으로 구성되어 있다(Deung et al., 2000). 참마자의 수정란 난막은 모두 2층으로 구성되어 있으며 외층은 2층으로, 내층은 4층으로 구성되어 있다(Kim et al., 2001). 또한 같은과의 참붕어의 난막은 3층으로, 부착구조물이 분포하고 있는 외층, 6층의 전자밀도가 서로 다른 층상구조를 가진 중층, 전자밀도가 높은 내층으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2007).

이와 같이 국내에 서식하는 어종의 경우 과의 공통적인 특징은 없으며 종마다 서로 다르다. 어류의 난막구조는 수환경의 물리·화학적 특성에 따라 다양하며 광량, 수압, 파도의 강약(Stehr & Hawkes, 1979), 바닷물의 염도, 온도 및 밀도와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Lönning, 1972). 또한 바위, 돌, 모래 및 진흙 등 산란 장소에 따라서도 다양한 구조를 보이며(Ivankov & Kurdyayeva, 1973), 계통분류학적으로 유연관계가 가까운 종에서 유사성이 높은 것으로 알려져 있다(Lönning, 1972). 서식처가 서로 다른 시클리드과(Cichlidae)에 속하는 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 따

라서 2층으로 구성되어 있다는 점에서는 시클리드과의 공통적인 특성으로 생각되지만 내층의 수가 종에 따라 서로 다른 것은 종특이성이 될 수 있다(Deung et al., 1997). 카라신과(Characidae) 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).

성숙란을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 맨 바깥쪽에 여포세포층이 관찰되었고, 일부 난막이 떨어져 나간 곳에서 바깥쪽의 막표면과 안쪽 난막의 표면이 동시에 관찰되었다(Fig. 5). 바깥쪽 막을 확대하여 관찰한 결과 홈들이 관찰되었고, 난막의 바깥쪽의 단면에서 안으로 함몰된 구조와 일치하는 형태를 보였다(Fig. 6). 안쪽막 표면은 돌기형태의 구조물들이 산재하고 있었다(Fig. 7).

국내에 서식하는 큰가시고기의 수정란 난막표면은 둥근 버섯 모양의 구조물들이 분포하고 있으며(Deung et al., 1999), 얼룩동사리의 경우 표면은 특정 구조물이 없는 부드러운 면을 보인다(Kim et al., 2002). 버들치처럼 수정란 표면에 미세용모와 같은 접착성 구조물이 분포하거나(Kim et al., 2009) 피라미처럼 난막 표면이 부착성이지만 부착사나 부착구조물들이 없는 경우도 있다(Deung et al., 2000). 참마자는 버섯모양의 돌기들이 뭉쳐 하나의 덩어리를 형성하여 표면에 분포하며(Kim et al., 2001) 참붕어의 난막은 돌기 같은 접착성 구조물들이 난막 표면 전체를 덮고 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2007).

시클리드과 어류의 수정란은 모두 부착성이며 부착사가 난막 외측에 분포한다. 부착사는 수정란이 부화될 때까지 산란상에 부착하는데 매우 중요한 역할을 하며 같은 과라고 하더라도 종에 따라 부착사의 미세구조는 서로 다른 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1997).

여포세포층을 제거한 난막의 동물극에는 다른 경골어류와 마찬가지로 한 개의 난문이 관찰되었다. 본 실험에서 난문의 존재유무는 확인할 수 있었으나 난자의 부착성 성질 때문에 이물질이 많이 붙어 있어 난문의 정확한 구조에 대한 정보는 얻을 수 없었다. 따라서 차후 추가적인 연구가 필요하다.

이상과 같이 빙어의 성숙란은 지금까지 보고된 경골어류의 경우 한 개의 난막으로 둘러싸여 있는데 비해서 두 개의 난막으로 둘러싸여 있다는 것은 매우 중요한 빙어의 종특이성을 나타낸다. 본 연구는 성숙란에 대한 연구이므로 미세구조적으로 변화가 일어나지 않는 수정란 난막에 대한 미세구조적 연구와 두 개의 난막으로 싸여있는 종의 난자형성과정에 대한 연구도 차후에 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 국내에 서식하는 바다빙어목에 속하는 어종은 빙어 이외에 은어(*Plecoglossus altivelis*)가 있으며 같은 목

(Order)에 속하는 어종의 경우 이런 난막의 형태학적 특성이 목에 따라 같은 공통적인 특성인지 아니면 빙어만 이런 구조를 가지고 있는 종특이성인지에 대한 조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

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.
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of gametes in the Three-spine stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus*. *Kor 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. *Kor J Electron Microscopy* 30(4) : 321-326, 2000. (Korean)
- Deung YK, Reu DS, Kim DH: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convic cichlid and discus, Cichlidae, Teleost. *Kor J Electron Microscopy* 27(4) : 417-432, 1997. (Korean)
- 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.
- Ivankov VN, Kurdyayeva VP: Systematic differences and the ecological importance of the membranes in fish eggs. *J Ichthyol* 13 : 864-873, 1973.
- Kim DH, Chang BS, Jung HS, Teng YC, Kim S, Lee KJ: The oogenesis of Chinese minnow, Leuciscinae, Teleostei. *Kor J Microscopy* 39(3) : 237-243, 2009. (Korean)
- Kim DH, Deung YK, Kim HY, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from long nose barbel, Cyprinidae, teleost. *Kor 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. *Kor 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*). *Kor 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. *Kor J Electron Microscopy* 26(3) : 277-291, 1996. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from Dark sleeper, Eleotrididae, Teleost. *Kor J Electron Microscopy* 32(1) : 39-44, 2002. (Korean)
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from *Hyphessobrycon serpae*, Characidae, teleost. *Kor J Electron Microscopy* 35(2) : 89-96, 2005. (Korean)
- Kim IS, Park JY: Freshwater fishes of Korea, Kyo-Hak Publishing, Co., Ltd., Seoul, 261-262, 2002. (Korean)
- Kim JG, Park NK, Reu DS: Ultrastructure of the sperm in testes of the Pond smelt (*Hypomesus nipponensis*). *Kor J Microscopy* 40(4) : 253-259, 2010. (Korean)
- Lönning S: Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion. *Sarsia* 49 : 41-48, 1972.
- 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.
- 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.
- 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 >

바다빙어목(Osmeriformes), 바다빙어과(Osmeridae)에 속하는 빙어(*Hypomesus nipponensis*)의 성숙란 난막구조를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

빙어의 성숙란은 두 개의 난막으로 둘러싸여 있었으며 바깥쪽 난막의 외층은 한 층의 여포세포가 분포하고 있었고 안쪽의 난막 바깥쪽은 호흡기성을 나타내는 구조물들이 배열하고 있었다. 난막의 단면을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 두 개의 난막 중 바깥쪽 막은 전자밀도가 균일한 한 층으로 되어 있었고 안쪽 막은 전자밀도가 높은 6층이 전자밀도가 낮은 5층에 의해서 분리되어 층상구조를 하고 있었다. 주사전자현미경으로 관찰한 결과 바깥쪽 막은 홈들이 관찰되었고 안쪽막 표면은 부정형의 구조물들이 산재하고 있었다. 또한 동물극 쪽에 한 개의 난문이 관찰되었다.

이상과 같이 빙어의 성숙란은 지금까지 보고된 경골어류의 경우 한 개의 난막으로 둘러싸여 있는데 비해서 두 개의 난막으로 둘러싸여 있다는 것은 매우 중요한 빙어의 종특이성을 나타내며 난막의 미세구조적 특징들은 종을 분류하는 데 이용될 수 있다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph of a matured egg envelope in Pond smelt, *Hypomesus nipponensis* belonging to Osmeridae, Osmeriformes. Arrow indicates a follicular layer ($\times 400$).
- Fig. 2.** A transmission electron micrograph of egg envelope (Bar= $2\ \mu\text{m}$). FL; Follicular layer, OL; Outer egg envelope, IL; Inner egg envelope.
- Fig. 3.** A transmission electron micrograph of outer egg envelope. Arrow indicates a groove (Bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 4.** A transmission electron micrograph of inner egg envelope Arrow indicates a electron dense structure (Bar= $2\ \mu\text{m}$).
- Fig. 5.** A scanning electron micrograph of the outer surface in the matured egg (Bar= $40\ \mu\text{m}$). F; Follicular layer, OS; Outer egg envelope, IS; Inner egg envelope.
- Fig. 6.** A scanning electron micrograph of the outer surface in outer egg envelope. Many grooves distributed on outer surface (Bar= $4\ \mu\text{m}$).
- Fig. 7.** A scanning electron micrograph of the outer surface in inner egg envelope. Many amorphous structures on outer surface (Bar= $3\ \mu\text{m}$).
- Fig. 8.** Micropyle, sperm entry site (arrow) in the area of the animal pole (Bar= $40\ \mu\text{m}$).





