

한국산 검은큰집박쥐 (*Pipistrellus savii velox*)의 정자미세구조

이 유리, 이 정 훈^{1,*}

경남대학교 대학원, ¹경남대학교 사범대학 과학교육과

Sperm Ultrastructure of *Pipistrellus savii velox*

Yu-Ri Lee, Jung-Hun Lee^{1,*}

Department of Biology, Graduate School, Kyungnam University, Changwon, Gyeongnam 631-701, Korea

¹Department of Science Education, Kyungnam University, Changwon, Gyeongnam 631-701, Korea

(Received May 24, 2011; Revised June 19, 2011; Accepted June 23, 2011)

ABSTRACT

Sperm morphology of *Pipistrellus savii velox* was examined by transmission electron microscope. The sperm head of *P. savii velox* was bullet in shape. The sperm head was 3.1 μm in length, whose posterior 3.0 μm was occupied by a nucleus with 1.8 μm in width. The segmented columns were about 14~15 in number. The total number of mitochondrial gyres was 57. Number of 1, 5, and 6 of the outer dense fibers were larger than the others. A fibrous sheath and longitudinal column of the principal piece were evidence, but the fibrous sheath was not seen at the end piece. In the present study, the length of the sperm head of *P. savii velox* were very shorter than those of other bats.

Keywords : *Pipistrellus savii velox*, Sperm morphology, Mitochondrial gyres

서 론

박쥐류 정자의 형태에 관한 연구는 광학현미경적 연구로는 Vespertilionidae에 속하는 17종(Hirth, 1960; Forman, 1968)과 Phyllostomidae에 속하는 8종(Forman, 1968)이, 전자현미경적 연구로는 대익수아목의 1종(*Pteropus dasymallus*: Mōri, 1995)과 소익수아목 9종(*Miniopterus schreibersii*, *Murina leucogaster*, *Myotis macrodactylus*, *M. natereri*, *Pipistrellus abramus*, *Rhinolophus cornutus*: Mōri, 1995; *Miniopterus schreibersi fuliginosus*: Kim et al., 1999; *Rhinolophus ferrumequinum korai*: Kim et al., 1999; *Myotis daubentonii ussuriensis*: Kim & Lee, 2011)이 보고된 바 있으나 *Pipistrel-*

*lus savii*의 아종인 한국산 검은 큰집박쥐(*Pipistrellus savii velox*)의 정자미세구조에 관한 연구는 아직 제시된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 한국산 검은 큰집박쥐의 정자미세구조가 다른 박쥐 종과 다른점을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구의 재료는 경남 일대의 폐광동굴에 서식하는 검은 큰집박쥐(*Pipistrellus savii velox*) 수컷 2개체를 채집하여 사용하였다. 이들 박쥐들은 채집 즉시 실험실로 운반한 다음 에테르로 마취하여 부정소의 미부를 적출하였다. 적출된 부

이 연구결과물은 2010년도 경남대학교 학술연구장려금 지원에 의한 것임.

* Correspondence should be addressed to Jung-Hun Lee, Department of Science Education, Kyungnam University, 449 Woryeong-dong Masanhappo-gu, Changwon-si, Gyeongsangnam-do 631-701, Korea. Ph.: (055) 249-2243, Fax: (055) 249-2014, E-mail: jhlee@kyungnam.ac.kr

정소 조직은 3%-glutaraldehyde (4°C, Millonig's buffer, pH 7.4)로 2시간 동안 전고정 시킨 다음 세척하여, 1~1.5 mm³ 정도로 조각편을 만든 후 다시 3%-glutaraldehyde 용액에 2시간 다시 고정하였다. 고정이 끝난 조직편들은 Millonig's buffer (pH 7.4)로 2~3회 세척한 다음 1.33%-OsO₄으로 2시간 후고정 하였다. 고정이 끝난 조직편들을 동일한 완충액들로 세척한 다음 아세톤 농도 상승 순으로 (65, 75, 85, 90, 95, 100%) 탈수한 다음 Epon 812 혼합액으로 포매하여 굳혔다. 포매가 끝난 조직편들을 Ultramicrotome (MT 6000; Sorvall, Dupont)을 사용하여 60~90 nm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 이중 염색한 다음 투과전자현미경 (TEM, H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

결 과

1. 정자두부 (Sperm head)

정자 두부의 모양은 탄환형이었으며, 첩체는 얇고 균질하게 핵을 덮고 있었다 (Fig. 1). 정자두부의 총 길이는 3.1 μm 이었고, 폭은 1.8 μm이었다. 핵의 길이는 3.0 μm으로서 정자 두부의 대부분을 차지하고 있었다 (Figs. 1, 2, Table 1).

2. 정자경부 (Sperm neck)

정자의 경부는 기저막 (basal plate)을 비롯하여, 소두 (capitulum)와 그 주변부를 둘러싸고 있는 9개의 분절와 (segmented column)로 이루어져 있었다 (Figs. 1, 4). 경부의 길이는 1 μm이었으며, 각각의 분절와는 14~15개 정도로 구성되어져 있었다 (Fig. 4). 이들 각각의 분절주는 중편부의 첫 번째 외측섬유 (outer dense fiber)의 선단부분과 접촉하고 있었다 (Figs. 1, 4).

3. 미부 (Sperm tail)

미부는 크게 미토콘드리아를 갖는 중편부 (Figs. 3, 6), 주편부 (principle piece) (Figs. 3, 5, 7)와 미부 (Fig. 8)로 구성되어져 있다. 중편부의 축사의 구조는 전형적인 9+2구조를 취하고 있었으며, 외측섬유가 축사를 둘러싸고 있었다. 또한 외측섬유의 1, 5, 6번이 다른 것들보다 크다 (Fig. 6). 한 쌍의 큰 미토콘드리아들이 외측섬유를 나선상으로 둘러싸고 있었으며 (Figs. 4, 5, 6), 미토콘드리아 회전수는 57개이었다 (Fig. 3). 주편부의 축사 (axial filament)와 섬유초 (fibrous sheath)로 구성되어 있었고, 환절 (annulus)은 1쌍으로 이루어진 미토콘드리아 끝부분에 위치하고 있었다 (Figs. 3, 5). 주편부의 섬유초 (fibrous sheath)가 외측섬유들을 둘러싸고 있었고, 종지주 (longitudinal column)가 관찰되었다 (Fig. 7). 미부의 기시부에서는 외측섬유가 존재하지 않았으며 축사

들만 관찰되었고 미부의 끝부분에서는 미세소관들로만 이루어져 있었다 (Fig. 8).

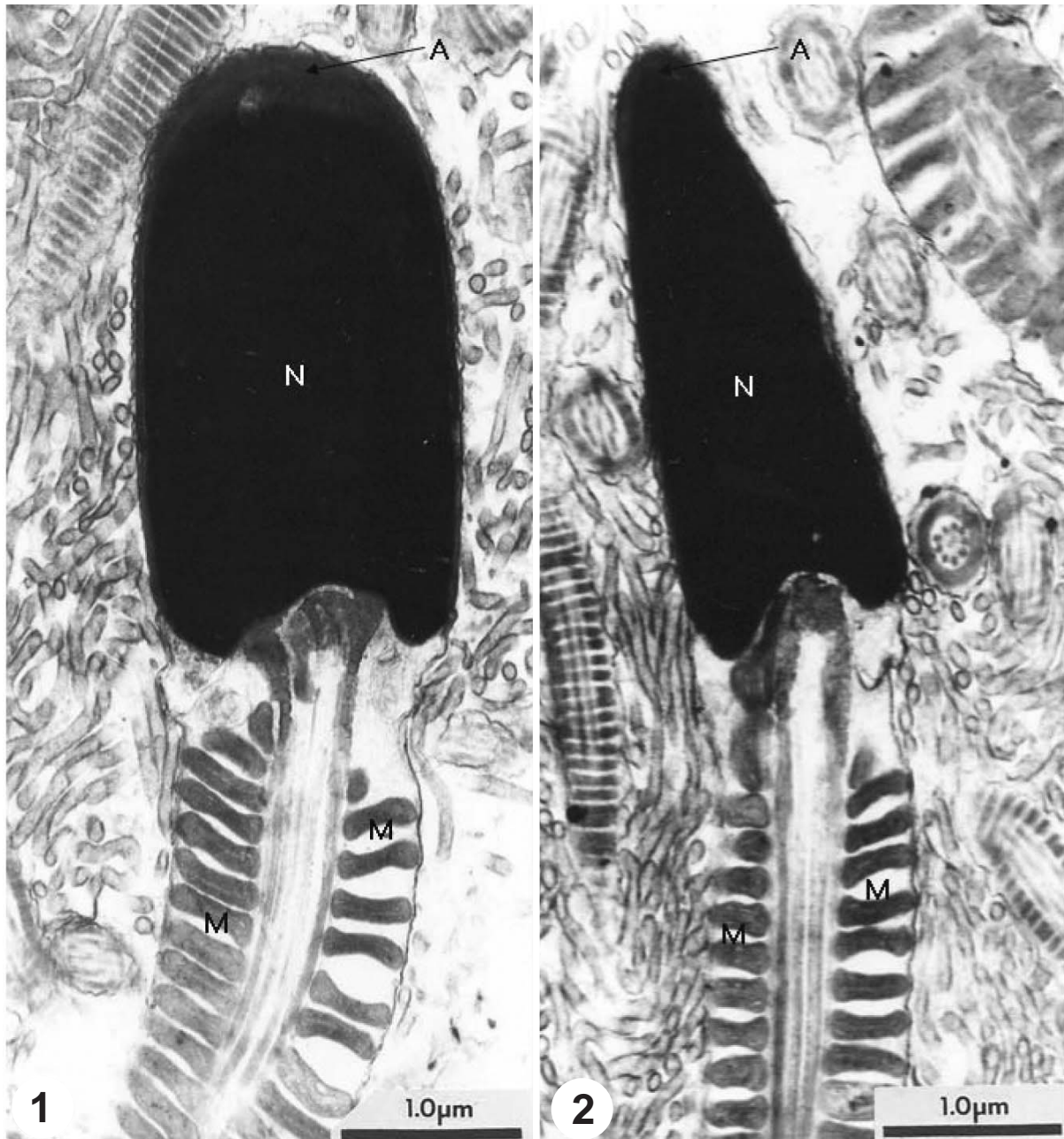
고 찰

일반적으로 포유류의 정자는 매우 다양하며, 정자두부와 꼬리의 형태는 각 종마다 많은 차이를 보인다 (Kim & Lee, 2011). 이러한 차이는 각각의 생물종이 갖는 생식양식과 매우 밀접한 관계가 있으며, 정자의 형태적 특징들은 정자의 진화패턴과 종을 분류하는데 유용한 정보를 제공한다 (Lee, 2009).

포유류의 정자 두부의 형태는 탄환형, 주걱형, 타원형 그리고 낫꼴형의 다양한 형태를 보이며 (Kim & Lee, 2011), 그 중에서도 설치류에 속하는 정자들은 대개 갈고리형 혹은 낫꼴 모양의 정자두부를 갖는 것이 일반적인 특징으로 잘 알려져 있다 (Friend, 1936; Fawcett, 1970; Breed, 1983, 1984; Flaherty & Breed, 1983; Lee & Mōri, 2006; Lee, 2009). 설치류 중에서도 *Sorex shinto*, *Crocidura dsinezumi* 그리고 *Suncus murinus* 정자의 경우는 모두 방패형의 형태를 취하고 있다는 점에서 다른 설치류의 종과 구별된다 (Mōri, 1994).

한편, 박쥐류 정자의 두부 모양은 Vespertilionidae에 속하는 *Miniopterus schreibersii* (Mōri, 1995), *M. schreibersii fuliginosus* (Kim et al., 1999) 그리고 *Murina leucogaster* (Mōri, 1995)는 주걱형의 정자두부를 (Table 1), *Pteropus dasymallus* (Mōri, 1995)는 순가락형을 가진다. 관박쥐과의 경우, *Rhinolophus cornutus* (Mōri, 1995)는 주걱형인데 반해서 *R. ferrumequinum korai* (Kim et al., 1999)는 탄환형의 정자두부를 가지고 있다는 점에서 종간의 차이를 보인다. 집박쥐속의 *Pipistrellus abramus* (Mōri, 1995)와 본 연구에 사용한 종인 *Pipistrellus savii velox*의 경우 모두 탄환형의 정자두부를 가지고 있었다. 이처럼 관박쥐과에서는 종과 아종간의 차이가 두드러지게 나타나지만 집박쥐과의 경우에는 차이가 없었으므로, 진화학적 유연관계를 고찰하기 위해서는 유전자적 방법이 요구된다. 반면에 정자두부와 꼬리의 길이에 대한 비교분석에서는 매우 뚜렷한 차이가 있다. 즉 Vespertilionidae의 *Miniopterus schreibersii* 정자두부의 전체길이는 8.0 μm (Mōri, 1995), *Eptesicus fuscus*는 6.59 μm (Forman, 1968)로서 다른 종들의 평균적인 두부의 전체길이인 4~5 μm 비해 길이가 긴 것으로 나타났으며 (Table 1), 본 연구에 사용한 종인 *Pipistrellus savii velox*의 두부 전체길이는 3.1 μm로서 특이하게도 정자머리의 길이와 첩체의 폭도 애기박쥐과의 다른 박쥐류의 비해서 짧았다. 그러나 정자두부의 모양이나 크기는 물윗수염박쥐 (Kim & Lee, 2011)와 거의 흡사하므로 이들 종이 다른 박쥐류 종보다 유연관계가 깊은 종이라고 여겨진다.

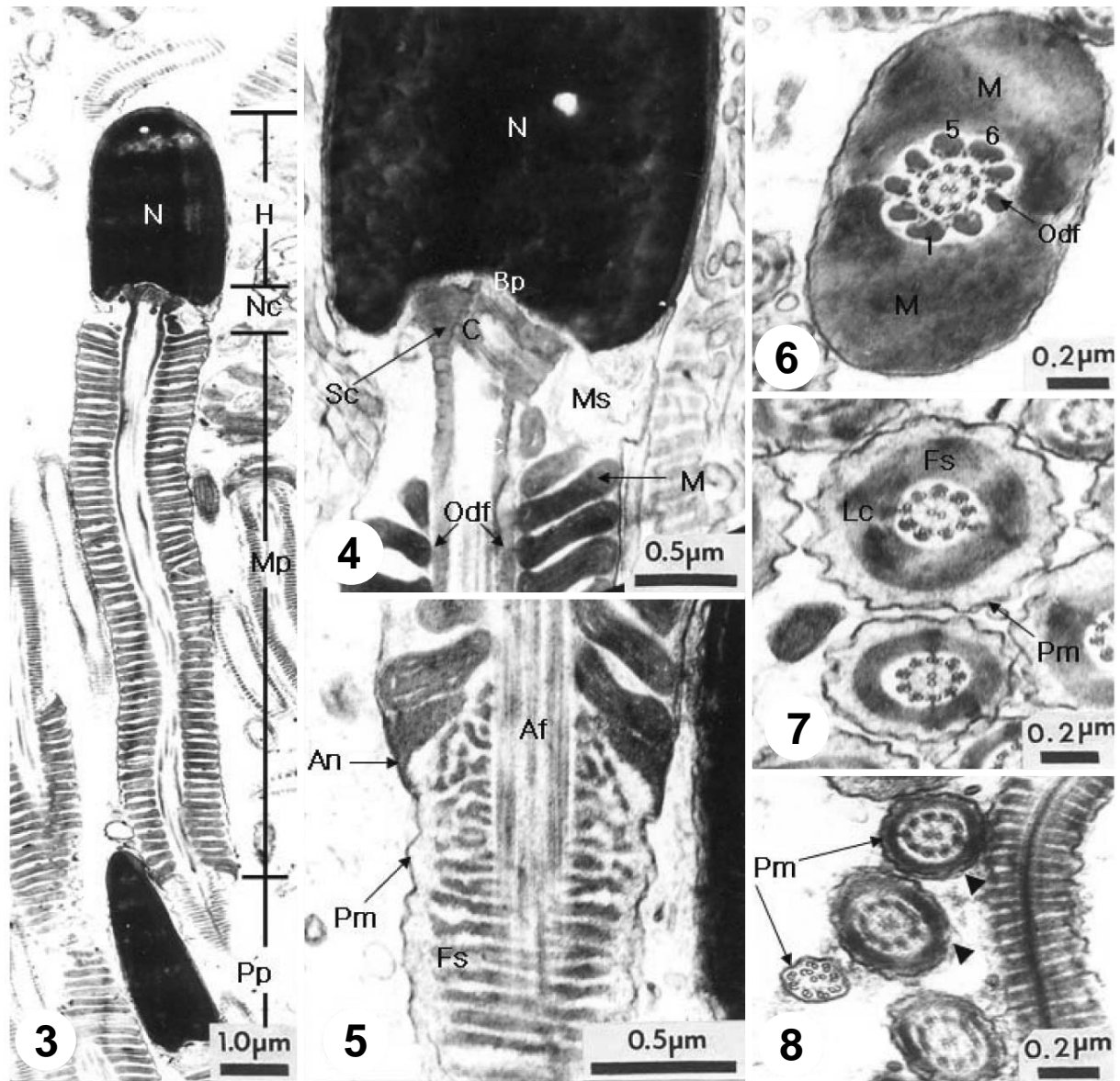
정자의 중편부를 구성하는 미토콘드리아는 산화과정의 축



Figs. 1, 2. Electron micrographs showing the longitudinal and sagittal sections of the cauda epididymal spermatozoa of *Pipistrellus savii velox*. The sperm head was bullet in shape (Fig. 1). The shape of the sperm head was showed a slender more than toward the posterior part to anterior part of the nucleus (Fig. 2). A, acrosome; M, mitochondria; N, nucleus.

진과 ATP 생산에 관여하는 것으로서 (Keyhani & Lemanski, 1981) 정자의 운동성에 에너지를 제공하는데 (Olson & Winfrey, 1992), 각 종에 따라서 저마다 미토콘드리아의 모양과 수의 차이를 보인다. 박쥐류의 중편부의 미토콘드리아 구성은 1회전 동안 2개의 미토콘드리아가 위치하고 있으므로 따라서 1회전수에는 미토콘드리아가 2개가 위치한다. *Myotis nattereri*와 *M. macrodactylus*의 미토콘드리아 회전수는 각

각 135개와 115개 (Mōri, 1995), 일본산 긴날개 박쥐 (*Miniopterus schreibersi*)는 76개 (Mōri, 1995), 한국산 긴날개박쥐 (*Miniopterus schreibersi fuliginosus*)는 78개 (Kim et al., 1999), 그리고 일본산 관박쥐 (*Rhinolophus ferrumequinum nippon*)와 한국산 관박쥐 (*Rhinolophus ferrumequinum korai*)는 각각 80개로 나타났으며, 이들 *Myotis*종과 *Miniopterus*종 그리고 *Rhinolophus*종에서는 별 다른 차이를 보이지 않았다. 반면



Figs. 3-8. Electron micrographs showing longitudinal (Figs. 3-5) and cross sections (Figs. 6-8) of the cauda epididymal spermatozoa. The mitochondrial gyres were 57 in number (Fig. 3). The segmented columns (Sc) were about 14~15 in number (Fig. 4), and surrounded by redundant membranous scroll (Ms) (Fig. 4). The end of the middle piece (Mp) was marked by the annulus (An) (Fig. 5). The Number of 1, 5 and 6 of the outer dense fibers (Odf) were larger than the others (Fig. 6). The mitochondria did not exist at the principal piece (Pp) (Fig. 7). The fibrous sheaths (Fs) and longitudinal columns (Lc) disappeared at the mid and end portions of end piece (Fig. 8). Af, axial filament; Bp, basal plate; C, capitulum; H, head; M, mitochondria; N, nucleus; Nc, neck; Pm, plasma membrane.

에 일본산 집박쥐 (*Pipistrellus abramus*)의 경우 미토콘드리아 수는 138개 (Mōri, 1995), 본 연구에 사용한 종인 한국산 검은큰집박쥐 (*Pipistrellus savii velox*)의 미토콘드리아 수는 57개로서 (Table 1), 이들 집박쥐의 경우에서는 종과 아종 간에 많은 차이를 보이는 것으로 보아 미토콘드리아의 모양과 수는 종 분류와 정자진화의 유연관계를 설명하는데 도움을 제공해 주리라 여겨진다. 한편, Kim et al. (1999)은 중편부를 구성하는 미토콘드리아 회전수와 외부 생식기 길이와 연관

성이 있는 것으로 즉 일본산 관박쥐의 외부 생식기 길이는 물윗수염박쥐의 외부 생식기 길이보다 훨씬 짧으며 이는 상대적으로 사출된 정자가 난자로 접근하기까지 더 많은 에너지를 필요로 하기 때문에 미토콘드리아 수가 많다고 보고되었다.

외측섬유의 모양이나 크기와 satellite fiber 존재 여부 등도 종의 분류 뿐 아니라 종의 유연관계를 밝히는데 유용한 정보를 제공한다. 설치류의 몇몇 종에 있어서, *Suncus murinus*

Table 1. Comparison of size and shape of the sperm head, and sperm tail length of 4 family 36 species in bats

Family	Species	Head (μm)				Tail (μm)				Authors
		Thl	W	Nl	Sh	Mpl	Mpw	Stl	NoMg	
Phyllostomidae	<i>Aniura cultrata</i>	5.01	4.35	—	—	7.78	0.76	—	—	Forman (1968)
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	3.80	3.41	—	—	8.28	0.62	—	—	Forman (1968)
	<i>A. lituratus</i>	4.50	3.45	—	—	9.38	0.96	—	—	Forman (1968)
	<i>Carollia castanea</i>	4.79	3.95	—	—	9.9	0.88	—	—	Forman (1968)
	<i>Glossophaga soricina</i>	4.0	3.52	—	—	7.9	0.96	—	—	Forman (1968)
	<i>Phyllostomus discolor</i>	5.36	4.18	—	—	9.06	0.61	—	—	Forman (1968)
	<i>Sturnira lilium</i>	4.24	3.81	—	—	9.21	0.82	—	—	Forman (1968)
	<i>S. ludovici</i>	4.56	3.75	—	—	10.46	0.99	—	—	Forman (1968)
Pteropodidae	<i>Pteropus dasymallus</i>	6.0	3.4	3.2	Sp	22.0	—	—	—	Mōri (1995)
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus cornutus</i>	6.8	2.1	4.1	S	15.0	—	—	—	Mōri (1995)
	<i>R. ferrumequinum korai</i>	5.8	1.8	4.6±0.2	B	18.0	—	113.0	154	Kim et al. (1999)
Vespertilionidae	<i>Antrozous pallius</i>	3.59	2.54	—	—	11.95	2.15	—	—	Forman (1968)
	<i>Eptesicus fuscus</i>	5.0	2.0	—	—	9.0	0.8	—	—	Hirth (1960)
		6.59	2.71	—	—	9.89	0.92	—	—	Forman (1968)
	<i>Lasionycteris noctivagans</i>	5.5	2.0	—	—	8.9	0.8	—	—	Forman (1968)
	<i>Lasiurus borealis</i>	5.3	2.0	—	—	11.2	0.8	—	—	Hirth (1960)
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	8.0	2.8	5.0	S	—	—	—	—	Mōri (1995)
	<i>M. schreibersii fuliginosus</i>	4.0	2.6	2.6±0.3	S	9.0	—	54.0	78	Kim et al. (1999)
		—	—	—	—	—	—	—	76	Oh et al. (1985)
	<i>Murina leucogaster</i>	4.7	2.0	4.0	S	—	—	—	—	Mōri (1995)
	<i>Myotis austroriparius</i>	4.6	1.9	—	—	12.8	1.2	—	—	Hirth (1960)
	<i>M. daubentini ussuriensis</i>	4.5	2.0	4.3	B	—	—	—	57	Kim & Lee (2011)
	<i>M. evotis</i>	4.85	2.08	—	—	15.05	1.33	—	—	Forman (1968)
	<i>M. grisescens</i>	5.81	2.53	—	—	18.6	1.83	—	—	Forman (1968)
	<i>M. keeni</i>	4.4	1.9	—	—	15.4	1.1	—	—	Hirth (1960)
		4.9	2.16	—	—	18.55	1.41	—	—	Forman (1968)
	<i>M. lucifugus</i>	4.3	1.8	—	—	12.7	1.1	—	—	Hirth (1960)
	<i>M. macroductylus</i>	5.1	—	4.9	—	—	—	—	—	Mōri (1995)
		—	—	—	—	—	—	—	115	Mōri (1995)
	<i>M. nattereri</i>	—	—	—	—	—	—	—	135	Mōri (1995)
	<i>M. nigricans</i>	4.67	2.22	—	—	17.62	1.34	—	—	Forman (1968)
	<i>M. sodalis</i>	4.9	1.8	—	—	13.7	1.0	—	—	Hirth (1960)
		5.60	2.15	—	—	—	—	—	—	Forman (1968)
	<i>M. velifer</i>	3.95	1.84	—	—	16.55	1.70	—	—	Forman (1968)
	<i>M. volans</i>	5.30	2.02	—	—	15.89	1.12	—	—	Forman (1968)
	<i>Nycticeius humeralis</i>	5.2	2.1	—	—	10.8	2.1	—	—	Hirth (1960)
	<i>Pipistrellus abramus</i>	4.0	—	3.7	—	—	—	—	—	Mōri (1995)
		—	—	—	—	—	—	—	138	Mōri (1995)
	<i>P. savii velox</i>	3.1	1.8	3.0	B	—	—	—	57	Present study
	<i>P. subflavus</i>	5.4	2.0	—	—	—	0.8	—	—	Hirth (1960)
		5.81	2.50	—	—	10.35	0.82	—	—	Forman (1968)
	<i>Plecotus rafinesquii</i>	4.74	2.25	—	—	9.59	1.41	—	—	Hirth (1960)
		3.8	1.9	—	—	8.9	1.1	—	—	Forman (1968)
	<i>P. townsendii</i>	5.56	2.79	—	—	12.60	1.52	—	—	Forman (1968)

B, bullet; Mpl, Middle piece length; Mpw, Middle piece width; NoMg, total number of mitochondrial gyre; Nl, Nuclear length; S, spatulate; Sh, Shape; Sp, spoon; Stl, sperm tail length; Thl, Total sperm head length; W, Width.

와 *Sorex araneus* (Green & Dryden, 1976; Plöen et al., 1979)의 정자 미부의 외측섬유(outer dense fiber)는 1, 5, 6번이 다른 것보다 크며, 박쥐류의 경우에는 외측섬유가 1, 4, 5, 9번이 2, 3, 6, 7, 8번보다 크다고 보고하였고(Yang et al., 1991), 본 연구에서는 외측섬유가 1, 5, 6번이 다른 것 보다 크게 나타났다. 그리고 딱지과(Soricidae), 두더지과(Talpidae)를 비롯하여 관박쥐(Kim et al., 1999)와 물윗수염박쥐(Kim & Lee,

2011)에서는 외측섬유 사이에 satellite fiber가 관찰되었으나 긴가락박쥐(Kim et al., 1999)와 본 연구에서는 관찰되지 않았다. 이상에서 살펴본 바와 같이, 정자두부의 모양과 길이, 그리고 꼬리의 길이 및 이들 구성 요소들의 형태와 크기 그리고 특히 미토콘드리아의 수와 외측섬유의 모양과 크기 그리고 satellite fiber 존재 여부 등을 고려하여볼 때 본 연구에 사용한 종인 검은큰집박쥐는 큰발윗수염박쥐, 관박쥐, 긴가

락박쥐 보다 오히려 물윗수염박쥐와 더 유연관계가 깊은 종이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Breed WG: Variation in sperm morphology in the Austrian rodent genus, *Pseudomys* (Muridae). *Cell Tissue Res* 229 : 611-625, 1983.
- Breed WG: Sperm head structure in the Hydromyinae (Rodentia: Muridae); a further evolutionary development of the subacrosomal space in mammals. *Gamete Res* 10 : 31-44, 1984.
- Fawcett DW: A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod (Suppl 1)* 90-127, 1970.
- Flaherty SP, Breed, WG: The sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis*: Ultrastructure and effects of chemical treatment. *Gamete Res* 8 : 231-244, 1983.
- Forman GL: Comparative gross morphology of spermatozoa of two families of North American bats. *Univ Kansas Sci Bull* 47 : 901-908, 1968.
- Friend GF: The sperms of the British Muridae. *Q J Microsc Sci* 78 : 419-443, 1936.
- Green AJ, Dryden GL: Ultrastructure of epididymal spermatozoa of the Asiatic musk shrew, *Suncus murinus*. *Biol Reprod* 14 : 327-331, 1976.
- Hirth HF: The spermatozoa of some North American bats and rodents. *J Morph* 106 : 77-83, 1960.
- Keyhani E, Lemanski LF: Mitochondrial morphology in the spermatozoa of the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Cell Sci* 50 : 449-461, 1981.
- Kim HH, Lee JH: Fine structure of the sperm in the *Myotis daubentonii ussuriensis*. *Kotern J Microsc* 41 : 31-35, 2011. (Korean)
- Kim SS, Lee JH, Son SW, Choi BJ: Morphological comparison of spermatozoa in the Korean greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum kora*) and long-fingered bat (*Miniopterus schreibersi fuliginosus*). *Korean J Electr Microsc* 29 : 1-10, 1999. (Korean)
- Lee JH: Ultrastructural observations on the sperm of the grey red-black vole, *Clethrionomys rufocanus*. *Korean J Microsc* 39 : 89-99, 2009. (Korean)
- Lee JH, Mōri T: Ultrastructure observations on the sperm of two *Apodemus* species, *Apodemus agrarius coreae* and *Apodemus speciosus peninsulae* in Korea. *J Fac Agr Kyushu Univ* 51 : 125-133, 2006.
- Mōri T: Phylogenetic implications of sperm ultrastructure in Japanese Insectivores. *Honyurui Kagaku (Mamalian Science)* 34 : 51-57, 1994.
- Mōri T: Comparative sperm structure in bats (Chiroptera): Some taxonomic and adaptive implications. *Mém Mus natn Hist nat* 166 : 421-429, 1995.
- Olson GE, Winfrey VP: Structural organization of surface domains of sperm mitochondria. *Mol Reprod Dev* 33 : 89-98, 1992.
- Plöen L, Ekwall H, Afzelius BA: Spermatogenesis and the spermatozoa of the European common shrew (*Sorex araneus* L.). *J Ultrastr Res* 68 : 149-159, 1979.
- Yang BG, Jeong HD, Koh HS: Sperm morphology of two species of the Genus *Apodemus* (Rodentia, Mammalia) in Korea. *Korean J Zool* 34 : 59-63, 1991.

< 국문초록 >

한국산 검은큰집박쥐 (*Pipistrellus savii velox*)의 정자의 형태를 알아보기 위해서 투과전자현미경으로 관찰하였다. 검은 큰집박쥐 정자두부의 모양은 탄환형의 형태를 취하고 있었다. 정자두부의 전체길이는 3.1 μm이었으며, 핵의 길이는 3.0 μm, 폭은 1.8 μm으로서 정자두부의 대부분을 차지하고 있었다. 정자경부의 분절와(segmented column)는 약 14~15개로 구성되어 있었으며, 중편부의 미토콘드리아 회전수는 57개 정도이었다. 또한 중편부의 외측섬유는 1, 5, 6번이 다른 것 보다 크다. 주편부에서는 섬유초(fibrous sheath)와 종 지주(longitudinal column)가 뚜렷하게 관찰되었지만 미부에서는 섬유초가 관찰되지 않았다. 이 연구에서 검은큰집박쥐는 정자두부의 길이가 다른 박쥐류 종보다도 매우 짧은 특징을 갖고 있었다.