한국현미경학회지 제41권 제2호 2011
Korean J. Microscopy 41(2), 123~128(2011)

홍바리, *Epinephelus fasciatus*의 인공수정 전 · 후 난문의 미세구조적 변화

김성훈, 이치훈, 주해성, 김형배[1], 이영돈*
제주대학교 해양과환경연구소, [1]강원도립대학 해양생명과학과

Ultrastructural Variations on the Micropyle of Blacktip Grouper, *Epinephelus Fasciatus* before and after Artificial Fertilization

Seong Hoon Kim, Chi Hoon Lee, Hea Sung Ju, Hyung Bae Kim[1], Young-Don Lee*
Marine and Environmental Research Institute of Jeju National University, Jeju 695-965, Korea
[1]Department of Marine Bio-resources, Gangwon Provincial University, Gangneung 210-804, Korea
(Received May 3, 2011; Revised June 22, 2011; Accepted June 23, 2011)

ABSTRACT

The micropyles on the prefertilized and artificial fertilized eggs of *Epinephelus fasciatus* were investigated using scanning electron microscope (SEM). The micropyles (6.6±0.41 μm) of *E. fasciatus* eggs were found in the animal pole and theirs shape were observed as a flat crateriform of cylindrical shape. The micropylar vestibule arranged by 6~7 thickened spiral annuli on the ridge and contributed to differentiate and form fertilization cone for blocking to polyspermy by presenting swollen vestibule structure. As *E. fasciatus* eggs was pelagic, so chorionic surface was an uneven structures such as circular and fillar form nodules. Especially, various pores (0.15~0.55 μm, 230~270 pores) distributed at the only around micropyles, those pores radiately exhibited regular projection structures showing gill filament-shape. These ultrastructural characters of *E. fasciatus* eggs can be utilized in a taxonomical cue of grouper species.

Keywords : Blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, Micropyle, SEM

서 론

경골어류 난의 난문과 난막표면의 미세구조적인 특징은 어류의 분류학적 동정에 중요한 지표들 중에 하나이다(Riehl, 1980; Riehl & Kokoscha, 1993; Chen et al., 1999; Vorobyeva & Markov, 1999; Breining & Britz, 2000; Giulianini & Ferrero, 2000; Li et al., 2000; Chiou et al., 2004; Esmaeil & Johal, 2005). 특히 난문의 모양, 수, 크기 그리고 난문의 구조물인 vestibule와 canal의 미세구조와 배열형태가 분류학적인 형질로 이용될 수 있으며(Riehl & Kokoscha, 1993; Chen et al., 1999; Li et al., 2000; Bless & Riehl, 2002), 또한 어류 난의 난문 구조물은 배우자 인식과 다수정을 방지하기 때문에 종 특이성을 갖는 미세구조적인 특징이 있다(Kobayashi & Yamamoto, 1981; Hirai & Yamamoto, 1986).

해산어 난문의 미세구조적 연구는 감성돔류(Chen et al.,

이 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 109197-3, 홍바리 *Epinephelus fasciatus* 양식산업 최적화 기술개발)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.
*Correspondence should be addressed to Young-Don Lee, Marine and Environmental Research Institute of Jeju National University, Jeju 695-965, Korea. Ph.: (064) 782-8922, Fax: (064) 782-8281, E-mail: leemri@jejunu.ac.kr

1999), 학치류(Breining & Britz, 2000), 숭어와 바리과 어류(Li et al., 2000), 망둑어류(Giulianini & Ferrero, 2000) 그리고 민어류(Berois et al., 2007) 등의 어종에서 보고되어 있다. 담수어인 피라미(Deung et al., 2000), 참마자(Kim et al., 2001), 얼룩동사리(Kim et al., 2002) 등 수정란 난막에 관한 미세구조적 특징이 보고되고 있으나 국내 해산어의 미수정란과 수정란 난문에 관한 연구는 미약한 실정이다. 이 연구는 홍바리, *Epinephelus fasciatus*의 인공수정 전·후 난문의 미세구조적인 특징을 주사형 전자현미경으로 관찰하여 제주연안에 서식하는 자바리, 능성어 그리고 붉바리(Kim et al., unpublished data) 등 난문의 형태학적인 차이점을 조사하였다.

재료 및 방법

정자와 난자는 수온 25±1˚C에 사육중인 홍바리 어미(전장: 26～37 cm, 체중: 298～778 g)로부터 복부압박 방법으로 암컷에서는 배란된 성숙란을 적출하였고, 수컷에서는 정액을 채취하였다. 수정란을 얻기 위한 수정은 200 mL 비이커에 배란된 성숙란을 넣고 수컷의 정액과 혼합하여 습식법으로 인공수정 하였고, 이후 수정란은 수온 25±1˚C의 여과해수에 수용하여 배반형성이 시작되는 수정란을 선별하였다. 선별된 수정란은 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간 전고정한 후 0.1 M sorense's phosphate buffer 용액(pH 7.4)에 3회 수세 및 2% osmium tetroxide 용액에 2시간 후고정하여 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 시료는 ethanol 농도 상승순으로 탈수하고 isoamyl acetate로 치환한 후 critical point dryer로 건조시켜 platinum으로 도금하여 장방출 주사형 전자현미경(JSM-6700F, JEOL)으로 인공수정 전·후 난문의 미세구조를 관찰하였다.

결과 및 고찰

홍바리 미수정란의 난문은 동물극에 1개가 존재하였다(Fig. 1). 난문(직경 6.6±0.41 μm)은 원통형의 분화구형태(Fig. 2)로 vestibule과 canal로 구성되었고, vestibular ridge의 구조는 시계방향으로 6～7개의 나선형 고리구조로 관찰되었다(Fig. 3). 어류의 난문 형성과정은 배반 상층부에 존재하는 여포세포가 함몰된 후 난막의 외막 또는 내막이 변형되어 형성되며 난문과 정자의 첨체 존재 유무는 종 특이성을 갖는다(Laale, 1980; Guraya, 1986). 바리과 어류인 자바리와 능성어 그리고 붉바리 등 대부분의 어류는 1개의 난문이 존재하나(Kim et al., unpublished data), 철갑상어류인 *Acipenser stellatus*의 난문은 1～13개가 있으며, *Polyodon spathula*는 4～12개, *Huso huso*는 33개, *A. gueldenstaedtii*는 52개의 난문이 존재한다(Dettlaff et al., 1993; Linhart & Kudo, 1997). 그러나 칠성장어와 곱상어의 난에는 난문이 존재하지 않고 정자의 두부에는 첨체를 갖고 있으며(Stanley, 1971), 흰철갑상어는 다수의 난문이 있으며 정자 또한 두부에 첨체를 갖는다(Cherr & Clark, 1985). 이와 같이 어류의 난문과 첨체의 존재 유무는 종 특이성으로 배우자 인식에 중요한 기능을 하는 난문의 형태도 종 특이성을 보인다(Kobayashi & Yamamoto, 1981). 난문은 vestibule와 canal로 구분되며, 이들의 미세구조적 형태에 따라 난문은 Type I, Type II, Type III 그리고 Type IV 등 4가지 유형(Riehl & Kock, 1989)과 원통형과 원추형 그리고 깔때기형 등의 3가지 유형으로 구분된다(Mikodina, 1987). 바리과 어류인 자바리와 능성어 그리고 붉바리의 난문형태는 Type I이나(Kim et al., unpublished data), *E. malabaricus*와 *E. coioides*는 Type III로 알려져 있다(Li et al., 2000). 이 연구에서 홍바리 난문의 형태는 주사형 전자현미경 관찰 결과 vestibule과 canal의 형태학적인 특징에 따라 Type I의 원통형으로 구분되었다.

분류학적인 난 동정의 다른 요소는 난문의 구성 구조물인 vestibular ridge의 배열형태에 따라 종 특이성을 나타낸다. 예를 들어, 감성돔류인 청돔(*Sparus sarba*)과 새눈치(*Acanthopagrus latus*), 감성돔(*A. schlegeli*)은 나선형의 ridge 구조이며, 참돔(*Pagrus major*)은 10개의 두꺼운 고리형 구조를 갖는다(Chen et al., 1999). 바리과 어류의 난문 vestibular ridge의 배열은 대부분 시계방향인 나선형 고리로, *E. malabricus*는 5～6개, *E. coioides*은 7～8개의 나선형 배열 구조를 보이며(Li et al., 2000), 또한 자바리 8～10개, 능성어 9개, 붉바리 8～9개의 시계방향의 나선형 고리구조를 보인다(Kim et al., unpublished data). 이 연구에서 홍바리 난문의 vestibule 구조는 시계방향으로 6～7개의 나선형 고리구조가 관찰되어 바리과 어종간에 상이하였다(Table 1).

난문의 크기와 정자의 두부 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있으며, 협소한 난문 입구는 다수정 방지(Hart, 1990; Linhart & Kudo, 1997)와 종간잡종교배 방지(Chen et al., 1999) 등의 역할을 하고, 이러한 물리적인 제한 요소는 종 특이성을 갖는다고 알려져 있다(Kobayashi & Yamamoto, 1981). 어류 난문의 크기와 정자 두부의 크기를 관련지어 볼 때, 서로 비례관계가 있으므로 이 연구에서 홍바리 또한 난문의 크기와 정자 두부의 크기는 수정시 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다(Table 1).

홍바리 미수정난의 난문 주변부에는 크기가 다른 0.15～0.55 μm의 pore들이 동심원상으로 혼재되어 개구된 형태로 관찰되었고, pore들은 230～270개가 존재하였다(Fig. 2). Pore 내부에는 어류 아가미의 filament와 유사한 돌기가 방사상으로 분포하였고(Fig. 4), 전 난막 표면에 존재하는 pore의 가장자리와 주변부에는 고리형과 불규칙한 돌기형 nodule

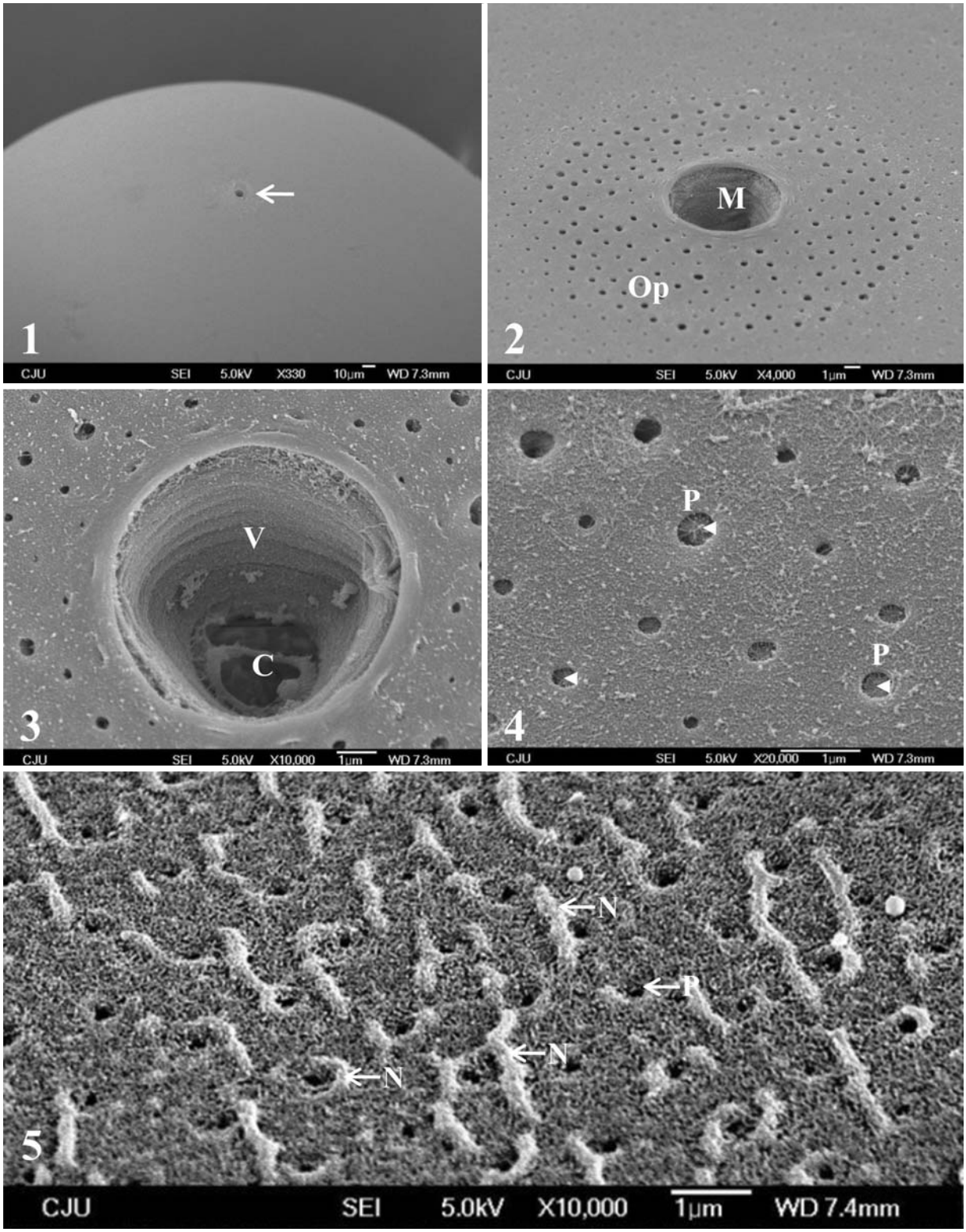

Fig. 1. A scanning electron micrograph of the unfertilized egg mircopyle (arrow) in the animal pole.
Fig. 2. A scanning electron micrograph of the opening pores (Op) distributing only around the unfertilized egg micropyle (M).
Fig. 3. A scanning electron micrograph of the unfertilized egg mircopyle. The micropyles consisted of vestibule (V) and canal (C). The vestibule presented a clockwise 6 ~ 7 spiral arrangement.
Fig. 4. A scanning electron micrograph of the various pores (P) in the unfertilized egg. Note gill filament-shape projection structure (arrowheads).
Fig. 5. A scanning electron micrograph of the chorionic surface showing pores (P) and nodules (N) in the unfertilized egg.

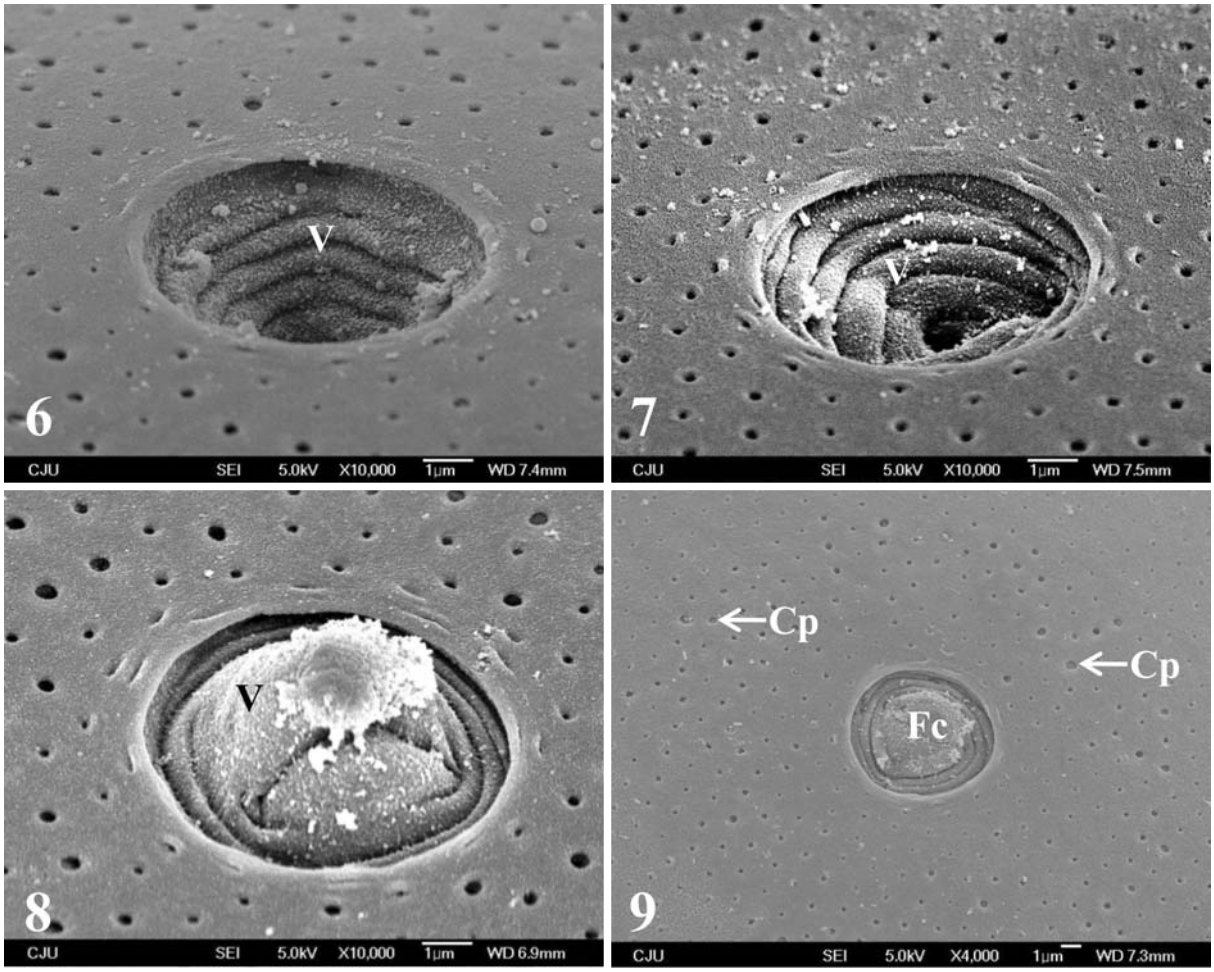

Fig. 6. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule (V). The micropylar vestibule appeared as a thickened structure by activation.
Fig. 7. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule (V). The micropylar vestibule exhibited swollen structure.
Fig. 8. A scanning electron micrograph of the fertilized egg micropylar vestibule (V) showing dome-shaped structure.
Fig. 9. A scanning electron micrograph of the closed pores (Cp) distributed around the fertilization cone (Fc) of the fertilized egg.

Table 1. Comparisons of SEM ultrastructural characteristics on the chorion surface and micropyle of unfertilized eggs in grouper species

Characters	Species					
	E. fasciatus	*E. bruneus*	*E. septemfasciatus*	*E. akaara*	*E. malabaricus*	*E. coioides*
Size of micropyle (μm)	6.6±0.41	7.2±1.63	6.2±0.69	5.9±0.57	6.3±0.28	7.1±0.38
Size of sperm head (μm)	2.4±0.15	2.6±0.36	2.3±0.28	2.4±0.39	Unknown	
Shape of micropyle	Cylindrical crateriform				Funnel shape	
Arrangement form of vestibular ridge	Clockwise (Spiral)				Clockwise (Spiral)	
Micropylar type	Type I				Type III	
Number of vestibular ridges	6~7	8~10	9	8~9	5~6	7~8
Distribution form of nodules	Circular and pillar form	Irregular form	Connecting form	Circular form	Circular lips form	
Number of pores	230~270	200~250	280~320	170~220	100~200	100~200
Size of pores (μm)	0.15~0.55	0.19~1.68	0.21~2.17	0.11~0.66	Unknown	
Arrangement type of pores	Concentric circles around the micropyle					
Inner structure of pores	Circular form with radial projections				Unknown	
Remarks	Present data	Kim et al., unpublished data			Li et al., 2000	

이 관찰되었다(Fig. 5). 수정 후 난문의 vestibular ridge가 활성화 되어 뚜렷한 형태를 보였고(Fig. 6), 부풀어 융기가 되면서(Fig. 7), 돔(dome)형의 수정구(fertilization cone)로 분화 형성되었다(Fig. 8). 난문 주변부와 난막 표면에 존재하는 pore들이 닫히는 현상을 관찰할 수 있었으나 nodule들은 관찰할 수 없었다(Fig. 9).

미수정란의 난막표면의 미세구조적 특징과 세포화학적 분석은 어류 난의 분류 동정에 중요한 형질 요소로 이용된다(Chiou et al., 2004; Mekkawy & Osman, 2006). 일반적으로 어류의 침성란은 점착성 물질을 갖으며, 난막표면에 부착사와 같은 돌기형의 부속구조물이 발달되어 있으나, 부상난은 비접착성이며 난막표면에 부속구조물을 관찰할 수가 없다(Rizzo et al., 2002). 또한 어류 난의 난막표면 구조는 서식환경과 밀접한 연관성이 있다(Berois et al., 2007). 부상란을 산란하는 자바리와 능성어 그리고 붉바리는 난막표면에 부착사 또는 돌기형의 부속 구조물이 존재하지 않으나 크기가 작은 pore (0.11～0.21 μm)들이 전 난막 표면에서 관찰된다. 특히 난문 주변부에는 크기가 다른 pore (0.66～2.17 μm)들이 동심원상으로 혼재하며, pore의 주변부와 가장자리에는 고리형과 고리연결형 그리고 불규칙한 형태 등 nodule이 다양하게 분포한다(Kim et al., unpublished data). 그러나 부상란을 산란하는 숭어는 난막 표면에 pore가 존재하지 않다는 보고가 있다(Li et al., 2000).

홍바리 미수정란의 난막표면 nodule의 형태는 종특이성을 가지며, 난문 주변부 동심원상으로 혼재하는 크기(0.15～0.55 μm)가 다양한 pore의 개수는 자바리 200～250개, 능성어 280～320개, 붉바리 180～220개이나 홍바리 경우 230～270개로 종간에 차이가 있었다(Table 1). Pore의 기능은 수정과 난발생 과정에 해수와 난이 접촉면을 넓혀 영양염류 유입과 기체교환 그리고 삼투조절의 기능을 수행하는 것으로 추정되나 이에 대한 생리학적 및 미세구조적인 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

Berois N, Arezo MJ, Chalar C, Brauer MM, Barros C: Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the white mouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Sciaenidae, Perciformes). J Appl Ichthyol 23 : 34-39, 2007.

Bless R, Riehl R: Biology and egg morphology of the Damatian barbelgudgeon, *Aulopyge huegeli*, an endangered endemic species in Croatia. Environ Biol Fish 63 : 451-456, 2002.

Breining T, Britz R: Egg surface structure of clingfish species, using scanning electron microscopy. J Fish Biol 56 : 1129-1137, 2000.

Chen KC, Shao KT, Yang JS: Using micropylar ultrastructure for species identification and phylogenetic inference among four species of Sparidae. J Fish Biol 55 : 288-300, 1999.

Cherr GN, Clar WHJr: An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm. J Exp Zool 234 : 75-85, 1985.

Chiou LM, Chung MC, Tung PG, Hsu T, Yang JS: The use of egg chorion glycoprotein of *Epinephelus malabaricus* for egg identification. J Fish Biol 65 : 1614-1621, 2004.

Dettlaff TA, Ginsburg AS, Schmalhausen O: Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquacutlrue. Springer-Verlag, Berlin, p. 300, 1993.Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelop in Pale chub Cyprinidae, teleost. Kor J Electron Microscopy 30 : 321-326, 2000. (Korean)

Esmaeili HR, Johal MS: Ultrastructural features of the egg envelope of silver carp, *Hypophthalmichtys molitrix* (Osteinchthys, Cyprinidae). Environ Biol Fish 72 : 373-377. 2005.

Giulianini PG, Ferrero EA: Ultrastructural aspects of the ovarian follicle and egg envelope of the sea-grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Osteichthyes, Gobiidae). Ital J Zool, 68 : 29-37, 2000.

Guraya SS: The cell and molecular biology of fish oogenesis. Karger, New York, pp. 141-147, 1986.

Hart NH: Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. Int Rev Cytol 121 : 1-66, 1990.

Hirai A, Yamamoto ST: Micropyle in the developing of the anchovy, *Engraulis japonica*. Japan J Ichthyol 33 : 62-66, 1986.

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 : 85-90, 2001. (Korean)

Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from Dark sleeper, Eleotrididae, Teleost. Kor J Electron Microscopy 32 : 39-44, 2002. (Korean)

Kobayashi W, Yamamoto TS: Fine structure of micropylar apparatus of the chum salmon egg with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. J Exp Zool 217 : 265-275, 1981.

Laale HW: The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. Copeia 2 : 210-226, 1980.

Li YH, Wu CC, Yang JS: Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Peciformes. J Fish Biol 56 : 615-621, 2000.

Linhart O, Kudo S: Surface structure of paddlefish eggs before and after fertilization. J Fish Biol 51 : 573-582, 1997.

Mekkawy IAA, Osman AGH: Ultrastructural studies of the morphological variations of the egg surface and envelopes of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1982) before and after fertilisation, with a discussion of the fertilization mechanism. Sci Mar 702 : 23-40, 2006.

Mikodina EV: Surface structure of the egg of teleostean fishes. Voprosy Ikhtiologii 1 : 106-113, 1987.

Riehl R: Micropyle of some salmonids and coregonids. Environ Biol Fish 5 : 59-66, 1980.

Riehl R, Kock KH: The surface structure of Antarctic fish eggs and its use in identifying fish eggs from the southern ocean. Polar

Biol 43 : 617-620, 1989.
Riehl R, Kokoscha M: A unique surface pattern and micropylar apparatus in the eggs of *Luciocephalus* sp. (Perciformes, Luciocephalidae). J Fish Biol 43 : 617-620, 1993.
Rizzo E, Sato Y, Barreto BP, Godinho HP: Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. J Fish Biol 61 : 615-632, 2002.
Stanley HP: Fine structure of spermatogenesis in the elasmobranch fish *Squalussuckleyi*. J Ultrastruct Res 36 : 86-102, 1971.
Vorobyeva EI, Markov KP: Specific ultrastructural features of eggs of Acipenseridae in relation to reproductive biology and phylogency. J Ichthyol 39 : 157-169, 1999.

＜국문초록＞

홍바리, *Epinephelus fasciatus* 난의 인공수정 전 · 후 난문의 미세구조적 특징을 주사형 전자현미경으로 관찰하였다. 홍바리 난문(6.6±0.41 μm)은 원통형의 분화구형으로 동물극에 1개가 존재하였다. 난문의 vestibular ridge는 시계방향성을 갖는 6～7개의 나선형의 내벽구조로 구성되었다. 난문의 내벽구조물인 나선형의 vestibular ridge는 인공수정 후 부풀어 올라와 돔(dome)형의 수정구로 분화 형성되었다. 홍바리 난은 부상란으로 난막표면에는 pore 가장자리에 고리형의 nodule과 pore 사이에 돌기형의 nodule이 관찰되었으나, 부착사와 유사한 보조 구조물은 관찰할 수 없었다. 난문 주변부에는 동심원상으로 크기가 다른 pore (0.15～0.55 μm)들이 개구된 형태로 혼재하였고, 수정 후 돔(dome)형의 수정구가 분화 형성되면서 pore들이 닫히는 현상을 보였다. 홍바리 난문의 미세구조적 특징은 바리과 어종간에 형태학적으로 상이하여, 바리과 어류의 계통분류학의 형질로 이용될 수 있다고 판단된다.