한국전자현미경학회지 제 33 권 제 4 호 2003
Korean J. Electron Microscopy 33(4), 267~274(2003)

*Xiphophorus maculatus*의 정자형성과정에 관한 미세구조

김 동 희*, 류 동 석[1], 등 영 건
연세대학교 원주의과대학 기초과학교실 · 연세대학교 기초의학연구소
[1]청주대학교 생물학과

An Ultrastructural Study on the Spermatogenesis of *Xiphophorus maculatus*

Dong Heui Kim*, Dong Suck Reu[1] and Young Kun Deung
Dept. of Basic Science and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea
[1]Dept. of Biology, Chongju University, Chongju 360-764, Korea
(Received November 19, 2003; Accepted December 11, 2003)

ABSTRACT

The ultrastructures of spermatogenesis and sperm in *Xiphophorus maculatus*, ovoviviparous fish were investigated by electronmicroscopy

The testis of *Xiphophorus maculatus* contained numerous testicular sacs, and spermatogenesis was synchronized in these testicular sac. In the case of spermatogonium, the nucleus was comparatively large ellipsoidal, and the nucleolus and mitochondria showed a marked development. The size of primary spermatocyte was smaller than that of spermatogonia, and that of secondary spermatocyte was smaller than that of primary spermatocyte. The chromatin of spermatocyte was highly condensed according to their development. The nucleus with electron dense was round shape. In spermiogenesis, flagella started to be formed and chromatin was more condensed. The mitochondria were rearranged along the tail. The sperm was formed by loss of cytoplasm. The head of mature sperm was long cone shape and had not acrosome. The microtubules of flagella were arranged 9+2 structure. Also, the sperm has a loop like structure at the end of a tail.

Key words : Fish, Spermatogenesis, Ultrastructure, *Xiphophorus maculatus*

서 론

어류의 정자형성과정은 종간에서 차이를 보일 뿐만 아니라 동종의 개체 간에서도 생식습성 또는 서식환경에 따라 서로 다르게 나타난다(Wolenski & Hart, 1987). 일반적으로 경골어류의 경우 정자형성과정은

* Correspondence should be addressed to Dr. Dong Heui Kim, Dept. of Basic Science and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0353, FAX: (033) 732-4446, E-mail: kdhfish@hanmir.com
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

정소낭 내에서 이루어지며(Marcaillou & Annette, 1980; Brusle, 1981; Billard, 1983; Gwo & Gwo, 1993; Medina et al., 2003), 정소낭 내의 생식세포는 *Oryzias latipes, Liza aurata, Acanthopagrus schlegeli, Thalassoma duperrey* 및 *Anguilla japonica*처럼 동시에 분화하는 종과(Grier, 1976; Brusle, 1981; Hourigan et al., 1991; Miura et al., 1991; Gwo & Gwo, 1993), Salmo gairdneri와 Mustelus palumbes처럼 동시에 분화하지 않는 종들이 있다(Billard, 1983; Rossouw & Vanessen, 1993).

지금까지 정자형성과정은 주로 난생어류에서 연구되어 왔으며(Brusle, 1981; Billard, 1983; Deung et al., 1993; Gwo & Gwo, 1993; Rossouw & Vanessen, 1993; Medina et al., 2003), 체내수정을 하는 난태생 어류의 정자형성에 대한 연구(Grier, 1973)는 미흡한 실정이다. 따라서 체내수정을 하며 난태생을 통하여 발생과정을 수행하는 *Xiphophorus maculatus*의 정자형성과정과 성숙한 정자의 미세구조를 전자현미경을 이용하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 기초사육

*Xiphophorus maculatus*는 pH 7.5±0.5 및 26.0±0.5°C의 수조(60×45×45 cm)에서 양어하였고, 사육수는 Fritz-guard (Fritz Co., USA)로 상수의 염소를 제거시킨 후 사용하였다. 물의 정화는 스폰지 여과기(Brilliant sponge filter™, Tetra Co., Germany)를 이용한 생물학적 여과(biological filtration)법을 이용하였으며, 수조 바닥에 쌓인 배설물은 3일 간격으로 1/4씩 환수시켜 제거하였다. 낮 환경은 하루 10시간씩 유지시켰고, 먹이는 냉동장구벌레(Blood Worms™, Hikari Sales USA, Inc., USA)와 테트라민(Tetra Min™, Tetra Co., Germany)을 각각 오전 9시와 오후 5시에 하루 2번씩 급이 하였다.

2. 수컷의 선별

*Xiphophorus maculatus*중 뒷지느러미가 변형된 교접기(gonopodium)를 가지고 있는 수컷을 선별하여 실험에 사용하였다.

3. 시료처리

정소를 적출하여 광학현미경용 시료는 10% 포르말린으로 고정하여 처리한 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였다. 투과전자현미경용 시료는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 4시간 전고정 및 2% osmium tetroxide로 90분간 후고정하여, 통상적인 전자현미경 시료처리법에 따라 처리한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM-1200EX II형 투과전자현미경으로 관찰하였다. 또한 주사전자현미경용 시료는 정소를 분쇄한 후 2,800 rpm에서 2분간 원심분리하여 얻은 정자를 투과전자현미경의 시료처리법에 따라 고정 및 탈수하여 Hexamethyldisilazane으로 치환시킨 후 4등분한 cover glass에 도말하여 대기 중에서 건조한 후 JEM-6300형 SEM으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

난태생 어류인 성숙한 *Xiphophorus maculatus*의 정소를 적출하여 정자형성과정과 정자의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

정자형성과정은 세정관내에서 이루어지지 않고 정소낭(testicular cyst)에서 이루어졌으며, 각 정소낭 내에 동일한 분화시기의 생식세포가 분포하고 있었고 정세포가 발달함에 따라 염색성이 높게 나타났다(Fig. 1).

정원세포는 타원형으로 매우 큰 핵을 보유하고 있었고 핵 내에 뚜렷한 인이 관찰되었으며 세포질에는 미토콘드리아의 발달이 현저하였다(Fig. 2). 제1정모세포는 구형으로 정원세포보다 크기는 작았고 인은 발달되어 있지 않았으며, 제2정모세포는 제1정모세포보다 더 작아졌고 핵의 전자밀도는 더 높았다(Fig. 3).

정모세포들은 정소낭 내에서 세포간교(intercellular bridges)에 의해 연결되어 있었으며 제2감수분열 전기의 태사기에 나타나는 태사기 복합체(synaptonemal complex)들이 확인되었고, 세포질에는 미토콘드리아의

발달이 뚜렷하였다(Fig. 4). 난생을 통하여 발생과정을 수행하는 *Acanthopagrus schlegeli, Salmo gairdneri* 및 *Orzias latipes*의 정자형성과정에서도 정모세포들이 세포간교에 연결되어있는 것은 생식세포들이 동시에 분화함으로써 다수의 정자를 방출하여 수정율을 높이기 위한 것으로 알려져 있다(Grier, 1976; Billard, 1983; Gwo & Gwo, 1993). *Xiphophorus maculatus*의 경우 체내수정을 하는데도 불구하고 다수의 정자를 동시에 방출할 수 있다는 것은 수정율을 높이기 위한 중요한 구조적 특징으로 생각된다.

정세포의 초기발달시기에는 세포의 크기가 정모세포보다 작았고 염색질의 응축은 핵막 쪽에서 뚜렷하여 전자밀도가 높았으며 편모가 형성되기 시작하였고 미토콘드리아는 핵 주변에 분포하고 있었다(Fig. 5). 정자완성과정 중기에는 핵의 염색질 응축이 뚜렷하였으며 핵은 세포질 한쪽에 치우쳐 있었고 미토콘드리아가 편모 주변에 집중되어 분포하고 있었으며 핵은 구형이었다. 또한 정소낭의 강소를 형성하기 위해 세포간극이 확장되어 있었다(Fig. 6).

성숙된 정자의 두부형태는 정세포와 달리 장원추형이었으며 염색질 응축이 매우 뚜렷하였고, 두부에서 첨체는 관찰되지 않았다. 중편부는 정중단 했을 때 미토콘드리아가 6~7층으로 편모를 중심으로 배열하고 있었다(Fig. 7). 어류에서 정자의 두부형태는 신장형(Brusle, 1981), 탄환형(Afzelelius, 1978; Jones & Butler, 1988), 리본형(Zirkin, 1975; Billard, 1983), 초승달형(Todd, 1976) 및 구형(Grier, 1976; Gwo & Gwo, 1993) 등으로 다양하며 Zebrafish, 송어, black porgy, garfish, *Liza aurata, Pantodon buchholzi* 및 *Platichthys flesus* 등은 정자의 두부에 첨체가 존재하지 않아(Deurs & Lastein, 1973; Todd, 1976; Afzelius, 1978; Brusle, 1981; Kessel et al., 1983; Billard, 1983; Jones & Butler, 1988; Gwo & Gwo, 1993) 난막을 뚫고 들어갈 수 없기 때문에 정자는 난막의 동물극 쪽에 위치한 난문(micropyle)을 통하여 난자내로 진입하여 수정하는 것으로 알려졌다(Brusle, 1981; Kim et al., 1999). 따라서 본 어종의 성숙한 난자에서 난문의 존재 여부에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 사료된다.

중편부를 횡단하여 관찰한 결과 미토콘드리아는 2~3개가 배열하고 있었고 편모의 미세소관 배열은 전형적인 9+2구조를 이루고 있었다(Fig. 8). 다른 대부분의 어류에서도 미세소관은 동일한 배열을 하고 있는 것으로 알려졌으나(Deurs & Lastein, 1973; Grier, 1973; Brusle, 1981; Jones & Butler, 1988), 뱀장어(*Anguilla australis*)의 정자는 편모의 미세소관 배열이 9+0 구조를 가지고 있다(Todd, 1976). 정자를 분리하여 주사전자현미경으로 관찰한 결과 정자는 일반적인 형태를 보였으나 꼬리 끝부분에 고리형태의 구조물을 보유하고 있었고(Figs. 9-10), 이 형태학적 특징은 다른 어종에서는 관찰되지 않는 특이한 구조물로 이 어종만이 가지는 종특이성이기 때문에 분류형질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Afzelius BA: Fine structure of the garfish spermatozoon. J Ultrastr Res 64 : 309 314, 1978.

Billard R: Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) An ultrastructural study. Cell Tissue Res 223 : 265 284, 1983.

Brusle S: Ultrastructure of Spermiogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). Cell Tissue Res 217 : 415 424, 1981.

Deung YK, Kim WJ, Kim DH, Song SB, Reu DS: An ultrastructual study on the spermatogenesis of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). J Wonju College of Medicine 6(1) : 186 194, 1993. (Korean)

Kim DH, Deung YK, Kim WJ, Reu DS, Kang SJ: Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes from three spot gourami, pearl gourami and marble gourami, Belontiidae, Teleost. Korean J Electron Microscopy 29(3) : 343 351, 1999. (Korean)

Deurs BV, Lastein U: Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. J Ultrastr Res 42 : 517 533, 1973.

Grier HJ: Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna*. J Ultrastr Res 45 : 82 92, 1973.

Gwo JC, Gwo HH: Spermatogenesis in the black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* (Teleostei : Perciformaes : Sparidae). Molecu Reprod Dev 36 : 75 83, 1993.

Hourigan TF, Nakamura M, Nagahama Y, Yamauchi K, Grau EG: Histology, ultrastructure, and in vitro viteroidogenesis

of the testes of two male phenotypes of the protogynous Fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). General and Comparative Endocrinology 83 : 193 217, 1991.

Jones PR, Butler RD: Spermatozoon ultrastructure of *Platichthys flesus*. J Ultrastr Molecu Struc Res 98 : 71 82, 1988.

Kessel RG, Beams HW, Tung HN, Roberts R: Unusual particle arrays in the plasma membrane of zebrafish spermatozoa. J Ultrastr Res 84 : 268 274, 1983.

Marcaillou C, Annette S: The "Blood Testis" barrier in a nematode and a fish: A generalizable concept. J Ultrastr Res 70 : 128 136, 1980.

Medina A, Megina C, Abascal FJ, Calzada A: The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei, Gadiformes): phylogenetic considerations. Acta Zoologica 84(2) : 131 137, 2003.

Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H: Introduction of permatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. Zool Sci 8 : 63 73, 1991.

Rossouw GJ, Vanessen LD: Spermatogenesis in the male white spotted houndshark, *Mustelus palubes* Smith, 1957. South African J Sci 89 : 244 246, 1993.

Todd PR: Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (Anguillidae). Cell Tissue Res 171 : 224 232, 1976.

Wolenski JS, Hart NH: Scanning electron microscopic studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg. J Exp Zool 243 : 259 273, 1987.

Zirkin BR: The ultrastructure of nuclear differentiation during spermiogenesis in the salmon. J Ultrastr Res 50 : 174 184, 1975.

<국문초록>

난태생 어류인 성숙한 *Xiphophorus maculatus*의 정소를 적출하여 정자형성과정과 정자의 미세구조를 전자현미경으로 관찰하였다.

정자형성과정은 정소낭(testicular cyst)에서 이루어지며, 각 정소낭 내에 동일한 분화시기의 생식세포가 분포하고 있었다. 정원세포는 타원형으로 핵 내에 뚜렷한 인을 보유하고 있었고 세포질에는 미토콘드리아의 발달이 현저하였다. 제1정모세포는 원형으로 정원세포보다 크기가 작았고 인은 발달되어 있지 않았으며, 제2정모세포는 제1정모세포보다 더 작아졌고 핵의 전자밀도는 더 높았다. 정세포의 초기발달시기에는 세포의 크기가 정모세포보다 작았고 염색질의 응축은 핵막 쪽에서 뚜렷하여 전자밀도가 높았으며 편모가 형성되기 시작하였고 미토콘드리아는 핵 주변에 분포하였다. 정자완성과정 중기에는 핵의 염색질 응축이 뚜렷하였으며 핵은 세포질 한쪽에 치우쳐 있었고, 미토콘드리아는 편모 주변에 집중되었으며 핵은 구형을 이루고 있었다. 완전히 성숙한 정자의 두부형태는 장원추형이었고 두부에서 첨체는 관찰되지 않았으며 편모의 미세소관 배열은 9+2구조를 이루고 있었다. 또한 정자의 꼬리 끝에는 고리형태의 구조물 보유하고 있었다.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Light micrograph of *Xiphophorus maculatus* testis section (× 40). Each cyst contains a clone of synchronically differentiating germ cells. Various staged cysts consisted mainly of spermatocytes (A), early spermatid (B) and spermatozoa (C) are compared.

Fig. 2. A transmission electron micrograph of spermatogonia of *Xiphophorus maculatus* (scale bar = 1 μm).

Fig. 3. An electron micrograph of primary spermatocyte (PS) and secondary spermatocyte (SS) of *Xiphophorus maculatus* (scale bar = 2 μm).

Fig. 4. An electron micrograph of primary spermatocytes in meiotic prophase I (scale bar = 1 μm). N; Nucleus, Arrow; Synaptonemal complex.

Fig. 5. An electron micrograph of early spermatids (scale bar = 1 μm).

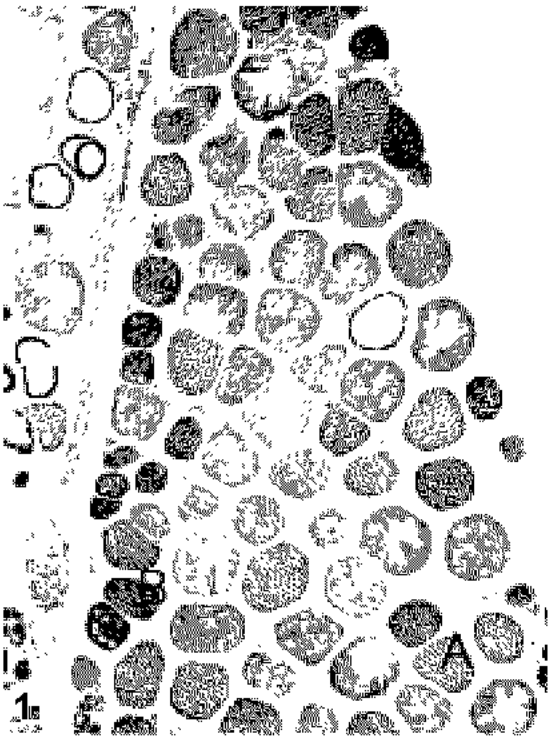
Fig. 6. An electron micrograph of spermatids in testicular sac (scale bar = 1 μm). N; Nucleus, M; mitochondria; Is; Intercellular space.

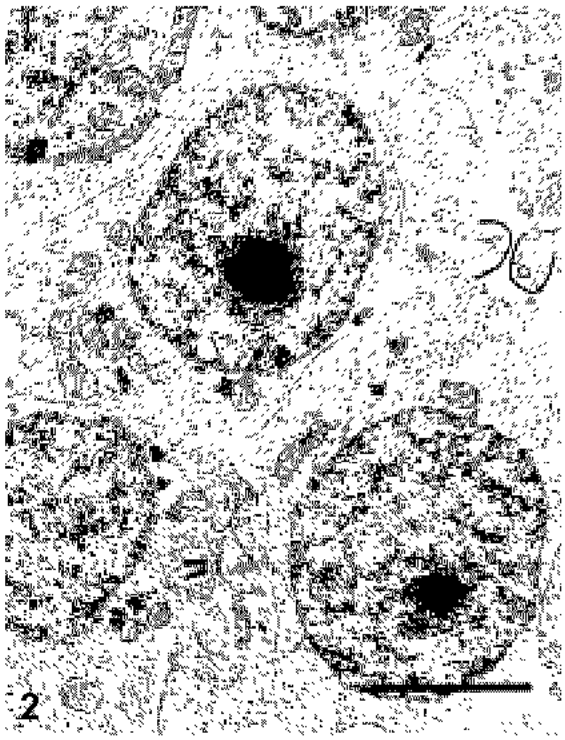
Fig. 7. Transmission electron micrograph of sperms (scale bar = 500 nm). M; mitochondria, N; nucleus.

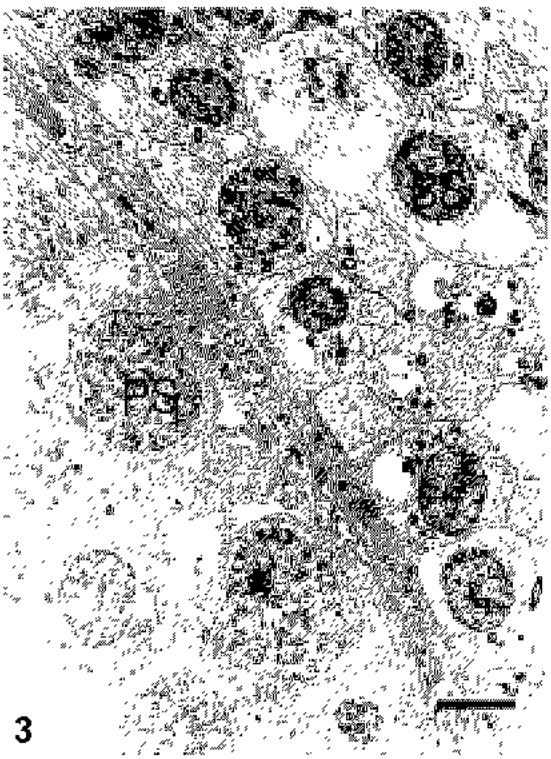
Fig. 8. A transmission electron micrograph of middle piece contain mitochondria (M) (scale bar = 200 μm).

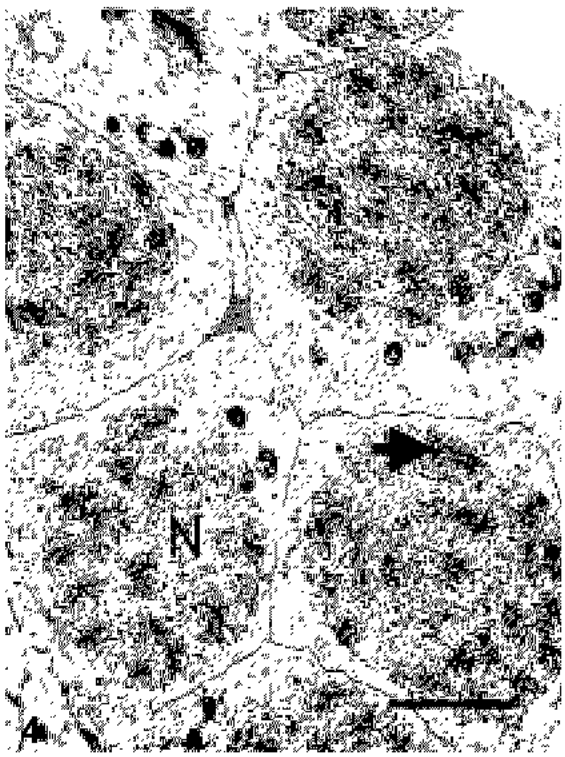
Fig. 9. A scanning electron micrograph of a spermatozoon (scale bar = 5 μm).

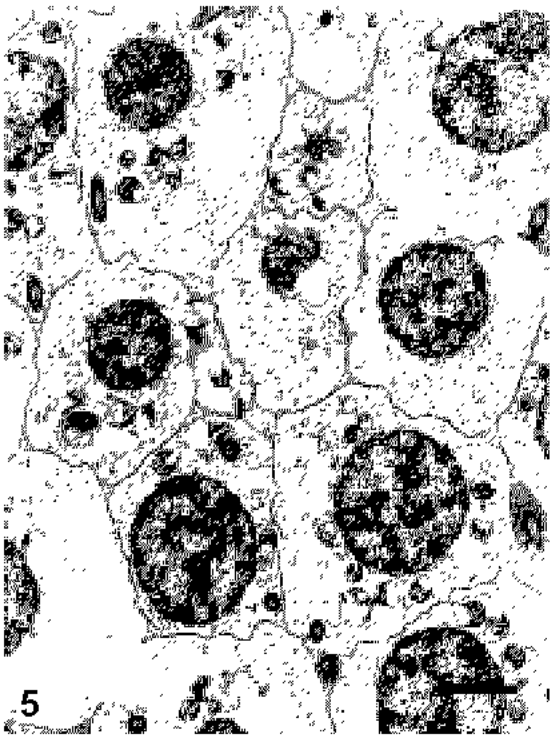
Fig. 10. Note the loop-like structure at the end of a tail (scale bar = 1 μm).


A
1.

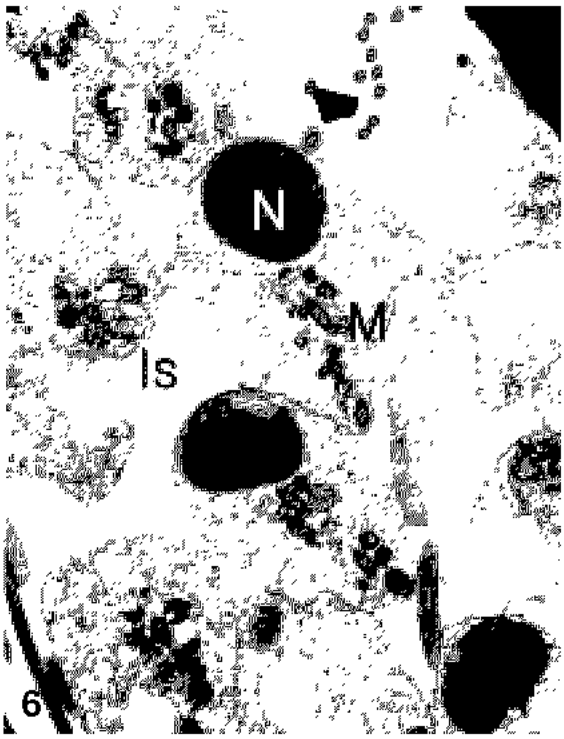

2


3

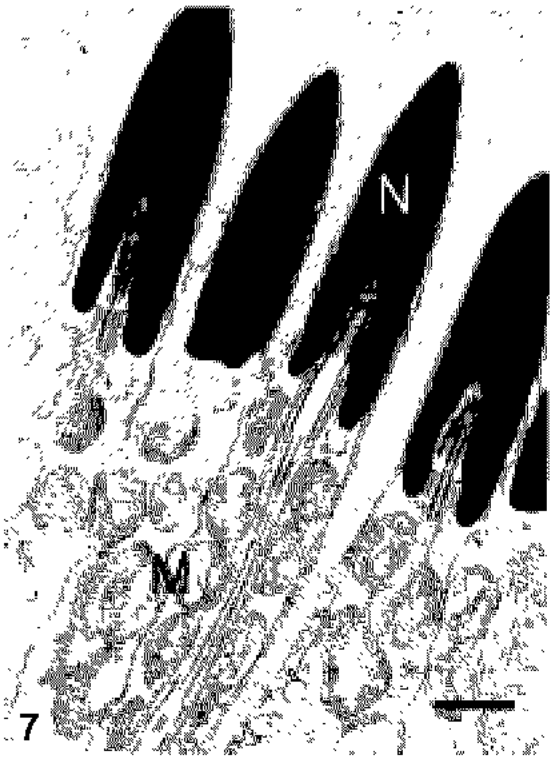

N
4



5

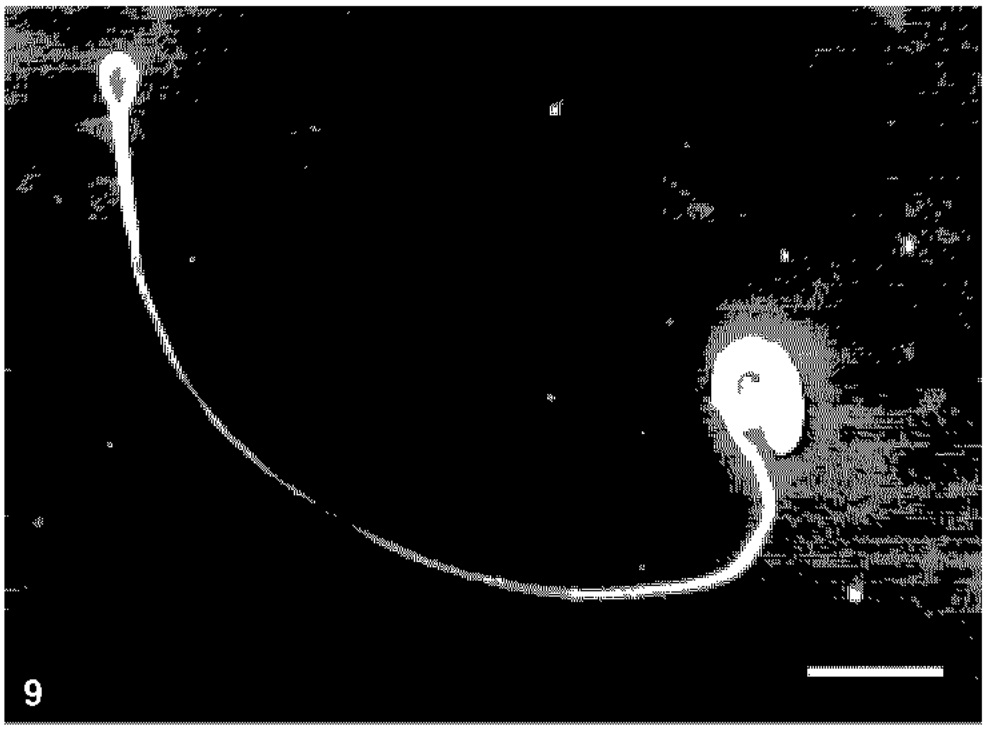


6



7

8


9

10