

피빨고둥 *Rapana venosa* (Valencienes) 정소소엽 내에서의 생식세포 발달과 정자형성과정 중 출현하는 비정형 세포들의 미세구조적 연구 및 저정낭의 발달단계에 따른 상피세포들의 주기적 변화

이일호, 정재승¹

군산대학교 대학원, ¹인제대학교 의과대학

Ultrastructural Studies of Germ Cell Developments and Atypical Cells Occurred During Spermatogenesis in the Acini, and the Cyclic Changes in the Epithelial Cells With the Developmental Phases of the Seminal Vesicle in *Rapana venosa* (Valencienes)

Il Ho Lee and Jae Seung Chung¹

Department of Fisheries Sciences, Graduate School, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

¹Department of Urology, College of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea

ABSTRACT

Germ cell development and cyclic changes in the epithelial cells of the seminal vesicle of the male rapa whelk, *Rapana venosa*, were investigated by cytological and histological observations. The process of germ cell development can be classified into five stages: (1) spermatogonial, (2) primary spermatocyte, (3) secondary spermatocyte, (4) spermatid, and (5) spermatozoon. In particular, four atypical cells (Type IA, IB, IIA and IIB cells) occur among normal germ cells in the acini during spermatogenesis. Presumably, the atypical cells, which have lysosome-like vacuoles or lysosome-like bodies in the cells, are involved in breakdown and absorption themselves in the acini. However, atypical cells were not found in the epithelial cells of the inner layer of the seminal vesicle. A considerable amount of spermatozoa are transported from the testis towards the the seminal vesicles until late July. The main copulation period is between June and July. The process of the cyclical changes of the seminal vesicles can be classified into three phases: (1) resting, (2) accumulating, and (3) spent. Yellow granular bodies are involved in resorption or digestion of residual spermatozoa.

Key words: *Rapana venosa*, germ cell development, atypical cells, seminal vesicle

서 론

피빨고둥, *Rapana venosa*은 한국, 중국, 일본 등 동아시아

Received: March 20, 2015; Revised: March 23, 2015;
Accepted: March 30, 2015

Corresponding author : Il Ho Lee

Tel: +82 (10) 8634-3154 e-mail: lee21544@nate.com
1225-3480/24561

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

가 원산지로 알려져 있다 (Rawling, 1990, 1994, 1995; Chung *et al.*, 1993 Harding *et al.*, 2007). 그러나 지금은 동아시아 국가는 물론 유럽의 여러 나라와, 아프리카, 북아메리카 그리고 남아메리카의 여러 나라에서도 본 종이 확산되어 출현하고 있는 것으로 보고되어 있다 (Rawling, 1995; Zolotarev, 1996; Mann and Harding, 2000). 우리나라에서는 본 종이 남해안과 서해안의 조간대와 조하대에서 어망에 의해 어획되는 식용 대형복족류로 산업상 매우 중요한 수산자원의 하나로 알려져 있다. 그러나 최근 대단위 간척사업과 무분별한 남획으로 인해, 본 종의 자원량이 점차 감소되어, 앞으로 자연자원관리가 요구되는 대상 생물의 하나로 지목되어 있

는 중요한 생물자원이자이다.

지금까지 피빨고둥에 대한연구는 생식주기 (Chung *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 2002) 와 생식생태 (Chung *et al.*, 1993), 생식양상 (Middelfart, 1994, 1996), 산란과 난낭 (Knudsen, 1950; Habe, 1960, 1969; Amio, 1963; Spight, 1976; D'Asaro, 1966, 1970, 1988, 1991, 1993a, b; Le Boeuf, 1971; Rawling, 1990, 1994, 1995; Harding and Mann, 1999; Harding *et al.*, 2007), 유생발생 (Thorson, 1940; Staiger, 1950, 1951) 과 성장과 발달 (Choi and Ryu, 2009) 과 같은 생식측면에 관해 많은 보고되어 있으며, 그 밖에 분류 (Habe, 1960, 1969; Kwon *et al.*, 1993; Min *et al.*, 2004), 형태 (Lee and Kim, 1988), 생태에 관하여 연령과 성장 (Choi and Ryu, 2009) 이 보고되어 있고, 그 밖에 생화학적 연구·보고가 단편적으로 되어 있다 (Yoon, 1986; Yoo *et al.*, 1991).

피빨고둥은 고염분 지역에서 서식하고 있는 것으로 알려져 왔으나 최근 저염분 지역 (24-26 psu 지역) 에서도 피빨고둥의 서식이 확인되었다.

일반적으로 패류의 경우, 이매패류와 두족류 등에서는 비정형세포들이 관찰되지 않아 보고되어 있지 않았으나, 예외적으로 일부 대형 복족류 (빨소라과와 물레고둥과의 일부 종들) 경우에는 정자형성과정 중에서도 정소소엽 내에서 정상적인 생식세포들과 섞이어 발견되고 있는 것으로 알려져 있다 (Fretter and Graham, 1964). 이와 같이 비정형세포들 (atypical type cells) 은 정소소엽 내에서만 정상적인 생식세포들과 섞이어 출현하고 저정낭 내에서는 발견되지 않는 것으로 알려져 있어, 이들 비정형세포들이 정소소엽 내에서 작용하는 고유의 기능적 특성을 밝히는 것은 매우 중요한 일이라 생각된다.

따라서 본 연구의 목적은 피빨고둥의 교미 후 저정낭 내에서 출현하는 황색과립소체와 정자들의 유입과 퇴화 소실되는 현상 등을 세포·조직학적 방법에 의해 관찰하여 이들 간의 관계를 명확히 밝히는 데 있다.

재료 및 방법

1. 채집방법

피빨고둥은 2009년 1월부터 12월까지 1년간에 걸쳐 경상남도 섬진강 기수지역에서 형망에 의해서 매일 1회씩 수컷 피빨고둥 표본을 무작위로 15-20 개체씩 채집하여 정소와 저정낭 내부의 구조적 변화를 조사하였다.

2. 생식세포 분화의 미세구조적 관찰

피빨고둥의 정소 내 생식세포 분화과정을 조사하기 위해 투과

전자현미경 (TEM) 을 사용하여 미세구조를 관찰하였다. 투과전자현미경관찰을 위한 조직표본은 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.5) 에 2시간정도 전고정 한 후, 10% sucrose (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.5) 로 약 10분간 충분히 세척하고 2% osmium tetroxide와 0.2 M cacodylate 1:1 용액에서 90분간 후 고정시켰다. 고정이 끝난 조직소편을 ethanol에 의해 탈수 시킨 뒤 propylene oxide로 치환하였고 Epon-812 혼합액에 포매하여 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색하여 정자형성과정 (spermatogenesis) 의 미세구조적 분화 특징을 투과전자현미경 (JEM 100 CX- II 100kV, JEOL, Japan) 으로 관찰하였다.

3. 정소소엽 내에 출현하는 비정형세포들 (atypical Type cells) 의 형태와 기능 관찰

대형 복족류 (gastropods) 중 몇 개과의 경우는 일반 정소소엽 내에서 정자형성과정 중 비정형세포들이 정상적인 수컷 생식세포들 사이에서 나타나고 있는데, 본 조사에서 피빨고둥의 정소소엽 내에서 이들 비정형세포 (atypical Type cell) 들이 투과전자현미경하에서 관찰 중 발견하여 Fretter and Graham (1964) 의 분류방법에 따라 비정형세포들을 형태·구조적으로 편의상 비정형 Type I cells과 비정형 Type II cells 의 크게 두 가지 유형으로 구분하였고, 다시 비정형 Type I cells는 Type IA와 IB cells로 나누었고, Type II cells는 Type IIA와 IIB cells로 구분하여 총 4가지로 구분하여 비교 조사하였다.

4. 저정낭 상피세포의 형태와 구조적 특징의 주기적 변화 관찰

1) 저정낭 상피세포의 형태와 구조, 관찰을 위한 조직학적 표본제작

저정낭의 조직학적 조사를 위해 총 160 개체의 정소와 인접한 저정낭 부위의 조직 절편을 절취하여 Bouin 용액에 24시간 고정한 후 24시간 동안 수세하여 정소와 저정낭 부위를 Paraffin 절편법으로 5-7 μ m로 연속절편을 만들어 Hansen's haematoxylin과 0.5% Eosin에 비교 염색하였고, 결체조직과 근육조직을 식별하기 위해 Mallory triple 염색을 병행하여 저정낭의 조직표본을 제작하였다.

2) 광학현미경 관찰에 의한 저정낭 내부 상피세포의 형태와 구조적 특징 관찰

일반적으로 정소 내의 수많은 acini 속에서 정소의 발달단계가 성숙 단계에 도달된 정자들은 좀 더 완숙된 기능상의 정자들로 되기 위해 정관의 구불구불한 부분인 저정낭

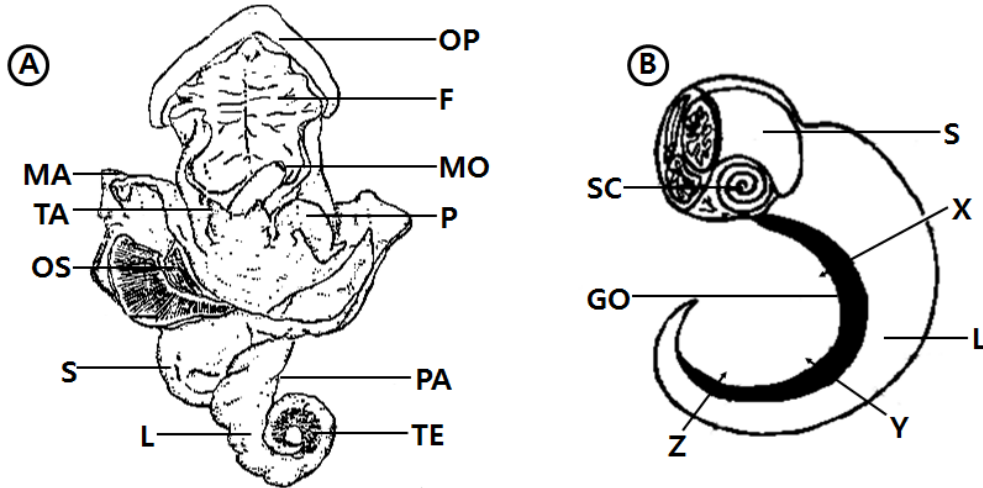


Fig. 1. Anatomy of a male *Rapana venosa* removed from its shell. **A**, reproductive organ of male individual; **B**, posterior appendage showing the gonad and liver. X, Y and Z denote the section parts for research. Abbreviations: A, anus; F, foot; G, gill; GO, gonad; L, liver; MA, mantle; MO, mouth; OP, operculum; OS, osphradium; P, penis; PA, posterior appendage; S, stomach; SC, stomachal caecum, TA, tentacle; TE, testis.

(seminal vesicle) 으로 이동한다. 저장낭 내층에 존재하는 상피세포들의 형태 구조적 특징과 저장낭 내 축적된 정자의 상대적량을 근거로, Takahashi *et al.* (1972) 의 방법에 따라 편의상 저장낭의 형태 구조적 변화는 (1) S-I 단계 (휴지기), (2) S-II 단계 (축적기), 그리고 (3) S-III 단계 (방출기) 의 3단계로 구분하여 관찰하였다.

결 과

1. 웅성생식기관의 형태 및 위치 (Morphology and position of the male reproductive organ)

피빨고둥 (*Rapana venosa*) 은 자웅이체이다. 개체의 자웅성을 외부형태에 의해 구분하려면 수컷 개체들은 촉수 가까이에서 출현하는 웅성생식기인 음경 (penis) 이 존재하고 있는지 여부에 따라 쉽게 구분되었다 (Fig. 1A). 정소는 후부 나선형의 내장낭에 위치하고 있는 간 (또는 소화선) 표면의 상부에 위치하고 있다 (Fig. 1B). 점차 성숙이 진행되면서 정소의 외부 형태적 특징은 황갈색을 나타내고 있는 점이다. 만약 정소를 면도 날로 살짝 긁으면 유백색의 정자들이 용이하게 흘러나와 수컷 개체임을 해부학적으로 확인할 수 있다.

1) 웅성 생식세포 발달 (male germ cell development) 및 분화

정소조직을 전자현미경하에서 관찰하여 보면, 정소조직 외부에는 이를 둘러싸는 여러 가지 점모상피조직들과 섬유성 결

체조직들이 정소의 외부 상피를 이루고 있다.

정소 내 생식세포 발달단계는 편의상, (1) 정원세포기, (2) 제1 정모세포기, (3) 제2 정모세포기, (4) 정세포기, (5) 정자기의 5 단계로 나눌 수 있었으며, 정모세포기는 다시 1차 정모세포기와 2차 정모세포기로 다시 나누었다.

(1) 정원세포기 (spermatogonial stage)

정원세포기의 정원세포들은 주로 정소소엽들 (testicular acini) 내에서 소엽의 생식상피 상에 위치하였고, 한 개 또는 여러 개가 출현하는 특징을 보였다. 정원세포는 크기와 형태적 특징에 따라 1차 정원세포와 2차 정원세포로 구분할 수 있었다. 1차 정원세포들의 직경은 대략 8-9 μm 정도이며, 모양은 다소 타원형이었다. 1차 정원세포는 큰 핵을 가지며 비교적 작은 세포질을 가졌다. 핵 내에는 전자밀도가 비교적 높은 크로마틴 물질들이 분산되어 나타났다. 제1차 정원세포 세포질 내에는 여러 개의 미토콘드리아와 작은 소포들이 관찰되었다. 2차 정원세포들의 직경은 대략 7-8 μm 정도이었고, 모양은 다소 타원형이었으며 핵과 세포질 내에서 출현하는 세포 소기관자들은 1차 정원세포의 세포 소기관자들과 형태적으로 유사하였는데, 전반적으로 정원세포기 시기에 출현하는 정원세포들의 발달은 아주 미약하였다 (Fig. 2A).

(2) 정모세포기 (spermatocyte stage)

정모세포의 세포질 내 출현하는 세포소기관자들과 정모세포들의 분화 특징에 따라 편의상 정모세포는 편의상 1차 정모세

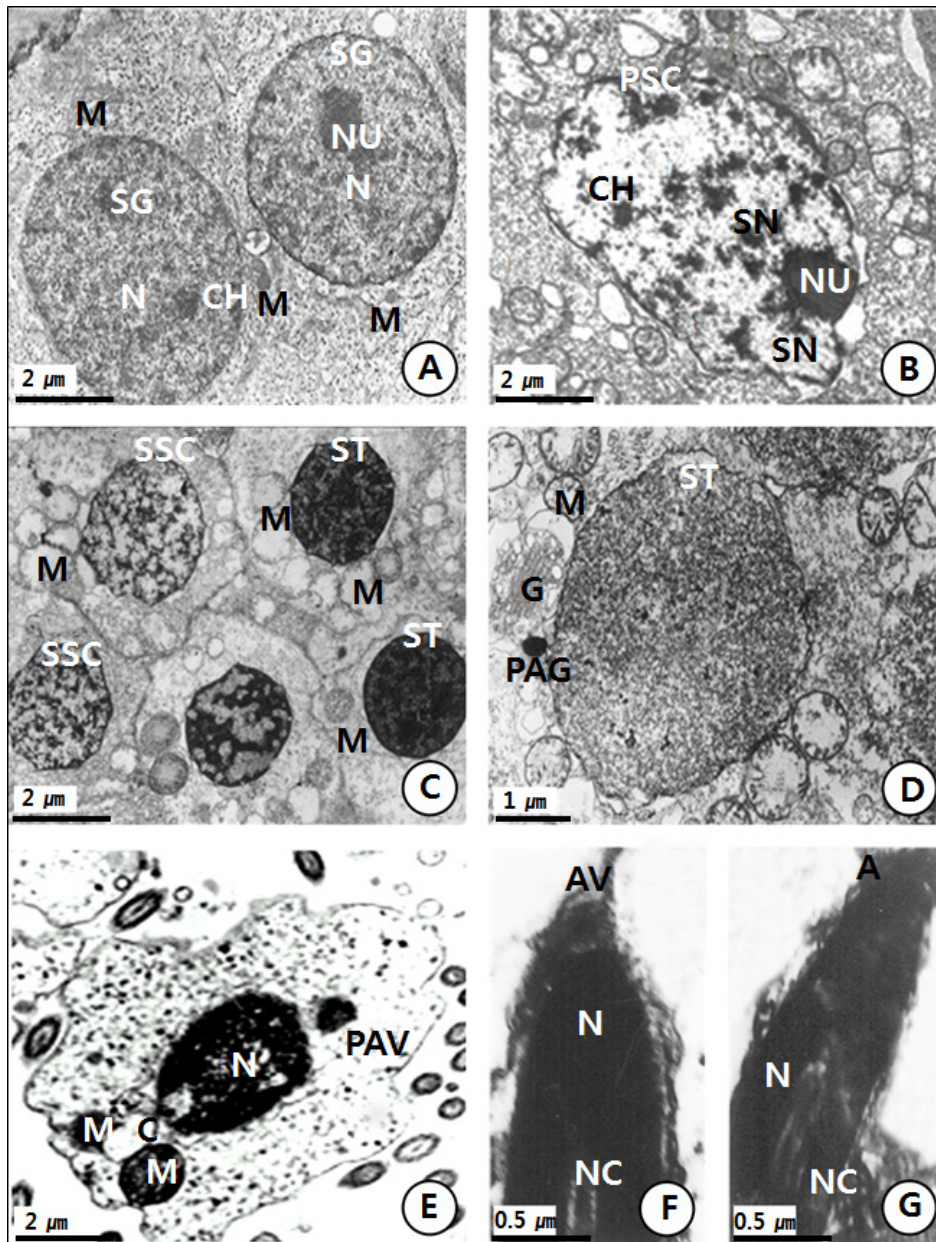


Fig. 2. Electron micrographs showing spermatogenesis of *Rapana venosa*. A-G, **A**, Spermatogonia. Note a nucleolus in the large nucleus containing chromatin materials, and several mitochondria in the cytoplasm; **B**, A primary spermatocyte. Note synaptonemal complexes in the nucleus during the prophase of meiosis and several mitochondria in the cytoplasm; **C**, secondary spermatocytes and spermatids. Note the nucleus containing more dense heterochromatin materials and several mitochondria in the cytoplasm; **D**, A spermatid. Note proacrosomal granules in front of the nucleus of the spermatid and several mitochondria in the cytoplasm; **E**, A spermatid with proacrosomal vesicle near the Golgi complex in front of the nucleus and two large mitochondria in the cytoplasm; **F**, A spermatid during spermiogenesis. Note an acrosomal vesicle on the nucleus containing the nuclear canal; **G**, A spermatozoon containing an acrosome. Note elongated nucleus containing the nuclear canal and an acrosome on the nucleus. Abbreviations: A, acrosome; AV, acrosomal vesicle; CH, chromatin; G, Golgi complex; M, mitochondrion; N, nucleus; NC, nuclear canal; NU, nucleolus; PAG, proacrosomal granule; PAV, proacrosomal vesicle; PSC, primary spermatocyte; SG, spermatogonium; SN, synaptonemal complex; SSC, secondary spermatocyte; ST, spermatid.; SZ, spermatozoon

포기 (primary spermatocyte stage) 와 2차 정모세포기 (secondary spermatocyte stage) 로 나누었다. 정원세포가 유사분열을 거쳐 1차 정모세포가 된다. 1차 정모세포들의 직경의 크기는 약 7 μm 정도로 정원세포들 (약 7 μm 정도) 의 직경 크기 보다 더 작아졌다. 1차 정모세포의 핵은 3.5 μm 정도이며, 핵 내에는 전자밀도가 좀 더 높은 이형염색질 물질을 함유하였다. 특히, 감수분열 전기 중에 1차 정모세포 핵 내에서, 연접사복합체 (synaptonemal complex) 가 출현하였다. 1차 정모세포기에는 여러 개의 미토콘드리아와 공포 및 소포들이 세포질 내에서 출현하였다 (Fig. 2B).

2차 정모세포 (secondary spermatocyte) 는 1차 정모세포가 성숙분열 (제 1감수분열) 을 하여 2차 정모세포가 된다. 2차 정모세포기의 세포 크기는 직경이 약 6 μm 정도이며, 핵 내에는 좀 더 전자밀도가 높은 이형염색질 물질을 함유하였다. 이 시기에는 여러 개의 미토콘드리아와 작은 공포들이 세포질 내에서 출현하였다 (Fig. 2C).

(3) 정세포기 (spermatid stage)

2차 정모세포들은 제2 성숙분열을 거쳐 정세포로 발달하였는데, 이때 정세포는 응결된 이형염색질 물질을 휴지기의 핵 내에 함유하였다. 세포질 내에는 타원형의 미토콘드리아들이 다수 출현하였다 (Fig. 2C). 정자변태 중 정세포 분화초기에, 농축된 핵은 길이가 좀 더 길어졌다. 골지체와 그 주변에서 출현하는 원첨체과립 (proacrosomal granule) 이 핵 상부에 인접하여 출현하였으며, 핵 밑에는 여러 개의 구형 미토콘드리아들이 아래로 이동하였다 (Fig. 2D). 정자변태 중 정세포 분화 후기에 첨체전구소포 (proacrosomal vesicle) 가 핵 쪽에 위치하였고, 핵 밑으로 2개의 중심립들 (근위중심립과 원위중심립) 이 핵 바로 밑에 출현하였으며, 또한 핵 밑에는 구형의 큰 미토콘드리아 2개가 출현하였다 (Fig. 2E). 그 후 첨체소포의 모양은 좀 더 신장되고, 길어져, 최종적으로 모자모양 (cap shape) 을 나타내었다 (Fig. 2F). spermiogenesis 후기 단계로 진행되는 동안 첨체에 있는 첨체 과립들은 첨체의 핵심을 형성하였다. 정자 두부의 정핵이 좀 더 길게 신장되었다. 상부, 중간부 및 정자의 중간부분의 축사 허부는 미토콘드리아초 및 외부의 조밀한 섬유들로 싸여있다.

(4) 정자기 (spermatozoon stage)

정자의 변태과정을 마친 후, 완숙한 정자의 핵은 좀 더 길어져 정자 두부는 아주 길어지며, 첨체사 (axial filament) 는 정자의 긴 핵 속으로 들어간다 (Fig. 2G). 완숙한 정자의 길이는 약 50 μm 정도이다. 피복고동의 정소소엽을 투과형전자현미경으로 관찰하여보면 종절단된 형태 (정자들의 두부, 첨체, 편모들) 가 이 큰 한 개의 씨틀리 세포 (Sertoli cell) 주위에서

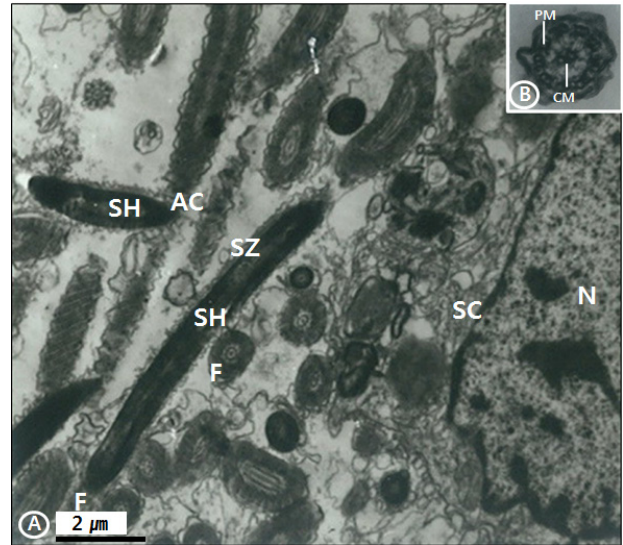


Fig. 3. An electron micrographs showing spermatozoa and a Sertoli cell of *Rapana venosa*. (A-B. A, Many ripe spermatozoa toward the Sertoli cell. Note llongitudinal sectioned spermatozoa containing an acrosome and the sperm head near the Sertoli cell. B, Cross sectioned sperm tail flagellum. Note the axoneme of the tail flagellum composed of a pair of central microtubules and nine pairs of peripheral microtubules Abbreviations: AC, acrosome; CM, central microtubule; F, flagellum; N, nucleus; PM, peripheral microtubule; SC, Sertoli cell; SH, sperm head; SZ, spermatozoon).

쉽게 관찰되었다. Sertoli cell (씨틀리세포) 주위에는 다수의 지방적들과 글리코젠 입자들이 다량으로 분산되어 출현하였다 (Fig. 3A). 이들 물질에 다수의 정자들이 정자 두부를 영양물질로 추정되는 이들 물질에 두부를 부착하려하고 있어 정자들이 씨틀리세포로부터 영양물질을 공급 받고 있는 것으로 추정되었다. 정자 편모 약소님을 횡절단하면 9+2 구조 (중앙에 1쌍의 중심 미세소관과 주변에 9쌍의 미세소관이 출현) 를 나타내었다 (Fig. 3B).

2) 정소소엽 내에 출현하는 비정형세포들 (atypical Type cells) 의 형태와 기능

대형 복족류 (gastropods) 중 몇 개과의 경우는 일반 이매패류들 (bivalves) 과 달리, 정소소엽 내에서 정자형성과정 중 비정형세포들이 정상적인 수컷 생식세포들 사이에서 나타나고 있는 점이 특이하게 다르다. 이들 비정형세포 (atypical Type cell) 들을 Fretter and Graham (1964) 의 분류방법에 따라 전자현미경으로 상세히 관찰하여 보면, 편의상 비정형 Type I cell과 비정형 Type II cell 로 크게 두 가지 유형으로 구분할 수 있었다 (Figs. 4A, B).

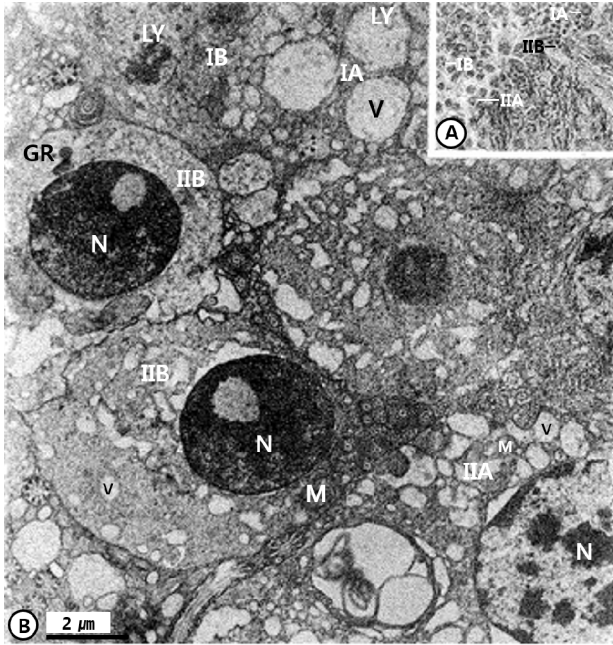


Fig. 4. A photomicrograph and an electron micrograph of atypical cells among normal germ cells in the testicular lobules of *Rapana venosa* A-B. A, A photomicrograph of the atypical cells among normal germ cells. Note external features of four cells (Type IA and IB cells and Type IIA and IIB cells) in the acini.: B, an electron micrograph of the atypical cells. Note the fine structural characteristics of four atypical cells: 1) Type IA containing several lysosome-like vacuoles in the cytoplasm; 2) Type IB having several lysosome-like bodies; 3) Type IIA containing a clear nucleus and several mitochondria and a lot of vacuoles; 4) Type IIB containing a nucleus with a remarkable nucleolus and a few mitochondria, a granule and vacuoles. Abbreviations, GR, granule; LY, lysosome; M, mitochondrion; N, nucleus.

(1) Atypical Type I 세포

전자현미경으로 비정형 Type I 세포들을 관찰하여 보면, 핵의 형태는 모양이 불규칙하거나 뚜렷하지 않다. 그들은 구조와 기능에 따라 편의상 비정형 Type IA 세포들과 비정형 Type IB 세포들로 두 가지 유형으로 다시 세분할 수 있었다 (Figs. 4A, 4B). 통상 비정형 Type IA 세포들은 크기가 14-15 μm 정도이며, 일반적으로 불규칙하거나 다소 불명확하였다. 그러나 이들 세포들의 세포질은 헤마톡실린에 약하게 염색되었다. 비정형 Type IB 세포들은 그 크기가 12-13 μm 정도이다. 그들의 핵도 불규칙하거나 다소 불명확하였다. 그러나 세포들은 헤마톡실린에 약하게 염색되었다 (Figs. 4A, 4B). 그러나 투과전자현미경으로 관찰하여 보면, 비정형 Type IA 세포들은 그들 세포질 내에 여러 개의 리소좀-모양 공포들이 출현하

였다. 그러나 비정형 Type IB 세포들 내에서는 단지 소수의 리소좀-모양 소체들이 출현하였다 (Figs. 4A, 4B).

(2) Atypical Type II 세포

광학현미경 사진에서 관찰된바와 같이, 비정형 Type II 세포들의 핵들은 약간 더 뚜렷하였다. 그러나 정소소엽 내의 정상적인 생식세포들에서 관찰되어지는 것 보다 이들 비정형 세포들의 크기가 약간 더 컸다. 이들 세포들은 외부특징에 따라 비정형 Type IIA 세포와 비정형 Type IIB 세포들 즉, 2가지 유형으로 구분하여 조사하였다. 비정형 Type IIA 세포들은 크기가 약 10 μm 정도이며, 헤마톡실린에 짙게 염색되었다. 비정형 Type IIB 세포들은 크기가 약 8 μm 정도이며, 헤마톡실린에 좀 더 짙게 염색되었다 (Figs. 4A, 4B). 이들 세포의 핵들은 비정형 Type IIA 세포들의 핵 보다 크기가 약간 작았다. 그러나 투과전자현미경하에서 관찰된 바와 같이, 비정형 Type IIA 세포들에서는 이형크로마틴물질들을 갖는 한 개의 큰 핵을 갖는 특징을 보였다. 그리고 이들 세포는 세포질 내에 여러 개의 잘 발달된 미토콘드리아와 많은 공포들을 가진다. 통상, 정소소엽들 내의 비정형 Type IIA 세포와 비정형 Type IIB 세포들은 비교적 큰 한 개의 핵 속에 뚜렷한 인을 가지며 특히, 잘 발달된 미토콘드리아와 여러 개의 공포들 그리고 세포질 과립들을 세포질 내에 함유하였다. 이들 세포는 정자형성 과정시 함께 출현하고 있으나, 저장낭 속에서는 비정형세포들이 전연 출현하지 않았다 (Figs. 4A, 4B).

3) 저장낭 상피세포의 형태·구조 특징의 주기적 변화

광학현미경으로 관찰하여보면, 정소 내의 수많은 acini 속에서 정소의 발달단계에 따라 여러 종류의 용성생식세포들이 출현하고 있는 것과, 그 후 정소 내에 생식세포들이 성숙단계에 도달된 정자가 좀 더 완숙된 정자들로 되기 위해 다시 저장낭 (seminal vesicle) 으로 이동되기 전 단계의 정소 구조들로 구분된다. 그 후 저장낭 내로 들어온 다수의 성숙정자들은 저장낭 내에서 정자로서 기능을 할 수 있는 기능적으로 완숙한 완숙정자들이다. 저장낭 내의 내부구조는 완숙정자가 채워지기 전과 완숙정자가 채워졌을 때의 내부구조는 다르며 특히, 완숙정자가 교미로 정자가 사출된 후에는 저장낭 내부의 구조적 변화는 뚜렷하게 다른 특징을 보였다. 저장낭 (정관의 구불구불한 부분) 내층에 존재하는 상피세포들의 형태·구조적 특징과 저장낭 내 축적된 정자의 상대적 양을 근거로, 편의상 저장낭의 형태적 변화는 (1) S-I 단계 (휴지기), (2) S-II 단계 (축적기), 그리고 (3) S-III 단계 (배정기) 의 3단계로 나눌 수 있었다.

(1) S-I 단계 (휴지단계, resting phase)

광학현미경 하에서 저장낭 수정관 (vas deferens) 을 구성

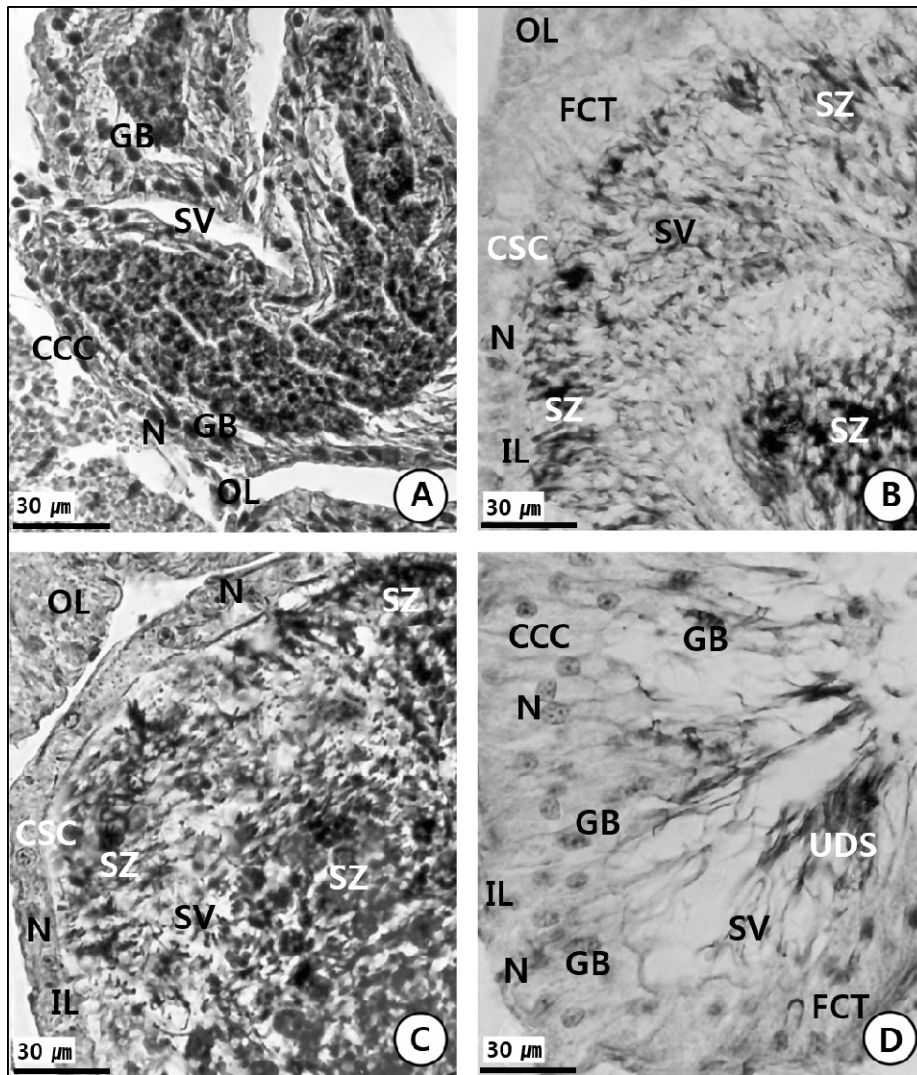


Fig. 5. Photomicrographs showing morphological characteristics of the epithelial cells of the seminal vesicle in the male rapa whelk, *Rapana venosa* (A-D). **A**, Section of the epithelial cells of the inner layer of the seminal vesicle in the resting phase. Note the ciliated cuboid cells with an oval or conical nucleus and the granular bodies in the inner layer, and relatively thick fibrous connective tissue in the outer layer. **B**, Section of the epithelial tissue of the seminal vesicle in the early accumulating phase. Note the small volume of spermatozoa in the ciliated cuboid cells. **C**, Section of the epithelial cells of the seminal vesicle in the accumulating phase. Note a number of spermatozoa in the lumen covered by ciliated squamous cells; **D**, Section of the epithelial cells of the seminal vesicle in the spent phase. Note a number of undischarged spermatozoa in the lumen covered by ciliated columnar cells of the inner layer, and the remarkably thick fibrous connective tissue in the outer layer. Abbreviations. CCC, ciliated cuboid cell; CLC, ciliated columnar cell; CSC, ciliated squamous cell; FCT, fibrous connective tissue; GB, granular body; IL, inner layer; N, nucleus; OL, out layer; SZ, spermatozoon; UDS, undischarged spermatozoon.

하고 있는 섬유성 결합조직들은 두터운 여러 층을 나타내나 약간 수축된 상태를 보였다. 저장낭 내층의 상피세포들은 섬모입방세포로 구성되어 있는데, 세포의 핵들은 헤마톡실린에 짙게 염색되는 타원형 또는 원추상 핵을 가진다. 휴지기 단계에서는

저장낭 내로 정자가 유입되지 않은 상태라서 특히, 소수의 황색과립소체 (granular body) 가 저장낭 내층 상피세포의 세포질 내에서 출현하였다 (Fig. 5A). 저장낭의 휴지단계는 정소 발달단계가 회복기 또는 활성기의 시기 중에 나타났다.

(2) S-II 단계 (축적단계, accumulating phase)

저정낭의 초기축적단계 (early accumulating phase) 에 상피세포들은 입방세포들로 변하였다. 이때 세포들은 둥근 핵과 세포질 내에 뚜렷한 공포를 나타내나 황색과립소체는 사라졌고, 정자괴들이 유입됨으로서, 저정낭은 유백색으로 변하였다 (Fig. 5B). 그 후, 저정낭의 후기축적기단계에서는 수많은 정자괴들이 저정낭 내강 속에 존재하였다. 저정낭의 후기 축적기에는 입방세포들이 편평상피세포들로 변하였다. 편평상피세포들은 높이가 약 10 μm 이며, 여러 개의 인을 갖는 타원형 또는 둥근 핵을 가진다. 저정낭 외층의 결체조직들은 얇아졌다 (Fig. 5C). 저정낭의 축적단계인 정소 발달단계가 성숙기인 시기 중에 나타났다.

(3) S-III 단계 (배정단계, spent phase)

이 단계 중에는 수많은 미 방출된 정자괴는 아직 저정낭의 내강 속에 존재하나, 저정낭 내층의 섬모상피세포들은 원주세포로 변한다. 이들 세포들은 높이가 높아진다. 저정낭 외층의 섬유성결체조직들은 두께가 현저하게 두터워진다 (Fig. 5C). 특히, 이 시기에는 정자가 방출되었기 때문에 소수의 황색과립소체가 저정낭 내층의 상피세포의 세포질 내에서 출현하였다 (Fig. 5D). 저정낭이 배정단계인 시기는 정소 발달단계가 교미기인 시기 중에 나타났다.

고 찰

복족류의 정자형태는 다양하며 종 특이성을 가지고 있어, 일반적으로 많은 연구자들이 정자의 미세구조적 연구를 이용하여 종 분류나 계통관계를 조사하여 왔다 (Franzen, 1970, 1983; Hodson and Bernard, 1986). 그리고 생식생태에 따라 체외수정종과 체내수정종의 정자형태가 약간의 차이를 보이고 있으나 전반적으로 별다른 차이를 보이지 않았다 (Franzen, 1970; Popham, 1979).

동물의 정자형태는 원시형 (primitive type), 변형형 (modified type), 쌍모형 (biflagellate type), 무모형 (aflagellate type) 의 4가지로 구분하는데 (Baccetti and Afzelius, 1976), 두 개의 편모를 가지는 쌍편모형에 속하는 종에는 재첩 (*Corbicula fluminea*) 과 참재첩 (*C. leana*) 이 있고, 무편모형에 속하는 종은 갑각류에서 볼 수 있다고 보고하였다 (Kim, 2001).

Franzen (1970) 은 정자를 체외수정형 종들이 가지는 원시형과 체내수정형들이 가지는 변형형으로 구분하였는데 본 연구 결과에 따르면 피빨고둥은 체내수정종으로 변형형에 속한다. 복족강 전세류의 동종이형 정자 (dimorphic spermatozoa) 의 유형에 관하여, Nishiwaki (1964) 는 계통

발생학적으로, 가느다란 실 모양의 유형 (type) 이 가장 원시적인 유형에 속하고, 타원형 유형이 좀 더 진전된 유형이라고 보고하였다.

전체적으로 볼 때, 대형 복족류인 피빨고둥의 생식세포 발달 및 분화 과정을 투과전자현미경으로 관찰하여 보면, 다른 복족류나 이매패류와 별 차이를 보이지 않고 유사하였다. 그러나 고염분에 서식하는 피빨고둥 개체들일 수록 저염분에 서식하는 개체를 보다 성장이 좀 더 빠르게 나타났을 뿐 (Lee *et al.*, 2014), 정소소엽 내에서 전자현미경 하에서 관찰되는 생식세포 발달과 분화과정 중 미세구조적 차이는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

대형 복족류 (피빨고둥 등) 의 정자형성과정은 정소소엽 내에서 일어나는데, 소엽 내에서는 정상적인 양성생식세포들 (정원세포들, 제1, 제2 정모세포들, 정세포들, 정자들) 이 출현하여 성장발달하고 있으며, 여기에 4종류의 비정형세포들 (형태적으로 atypical IA, IB, atypical Type IIa, IIb) 들이 정소소엽 내에서 함께 섞여 출현하고 있다. 이 현상은 다른 동물들에서는 보기 드문 사례로 특히, 연체동물 중 대형 복족류에서 소수 종들에서만 출현하는 예외적인 생식 현상이다.

본 연구에서, 비정형세포들 중 atypical Type IIa 세포와 Type IIb 세포들은 타원형이나, 정상적인 정자는 실모양이다. 동종 이형정자에 대해서는 (1) 수정에 관여하고 (Takahashi *et al.*, 1972), (2) 붕괴 및 흡수에 관여할 것이라고 보고하였으며 (Fretter and Graham, 1964), (3) 두 가지 가능성을 모두 보고하였다 (Fujinaga, 1985). 본 조사에서 조직학적 관찰에 의하면, atypical 세포들은 정소소엽 내의 정상 생식세포들 사이에서 함께 출현하나, 저정낭 내에서는 발견되지 않는다. 본 연구에서, 전자현미경하에서 정자형성과정을 관찰하던 중, 여러 개의 리소솜 모양의 공포와 여러 개의 리소솜 모양의 소체들이 atypical Type IA 세포들 또는 atypical Type IB 세포들의 세포질 내에서 관찰되었다. 상기 언급된 두 가지 atypical cell들 중, 정자는 atypical Type IA 세포들과 Type IB 세포들이 정소소엽이나 양성생식 도관 (genital ducts) 내에서 붕괴되거나 흡수되는 것으로 추정된다. 그것은 저정낭 내에서는 이들 세포를 발견할 수 없고, 수많은 정자괴들만 관찰할 수 있기 때문이다. 이와 같은 결과는 Fretter and Graham (1964) 가 다른 신복족류의 정자형성과정에서 보고한 결과와 유사한 결과라 생각된다. Takahashi *et al.* (1972) 와 Fujinaga (1985) 는 생식기관의 구조적 변화 및 기능에 대해 설명한 바 있다. 이들은 갈색띠매물고둥 (*N. arthritica*) 의 경우, 저정낭 내층 상피세포는 여러 단계의 생식소 발달 단계에 따라 내층 내 상피세포들은 형태학적 변화를 하고 있다고 보고한 바 있다. 특히 정자를 저정낭 내에 축적하기 전인 휴지기 (resting stage) 에 황색과립소체 (yellow granular body)

가 저정낭 내층의 상피세포층에 나타난 후, 이들 소체는 정자가 저장되기 시작하는 초기축적기 (early accumulating stage) 부터 축적기 (accumulating stage) 사이에 사라졌으나 이들 황색과립소체는 고미 이후, 방출기 (spent stage) 에 다시 출현하였다고 보고하였다. 또한 Fretter (1941) 도 *Barcsinum undatum* 및 *N. lapillus*의 저정낭 내층 상피세포의 세포질 내에서 황색 과립소체 (yellow granular body) 들을 발견하였는데, 이것은 흡수 및 미방출된 정자의 소화 (digestion) 에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 그리고 Takahashi *et al.*, (1972) 도 연구 보고에서 *N. arthritica* 의 저정낭 내 상피세포의 세포질 내에서 출현하는 황색과립소체는 리소솜 (lysosome) 과 유사한 구조를 하고 있다고 보고하였다.

본 조사에서 피빨고둥 저정낭 내층 상피세포의 세포질 내에 황색과립소체가 생식소 발달단계 중 휴지기 (resting stage) 와 방출기 (spent stage) 에 나타나고 있음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 이들 황색과립소체의 구조와 기능이 Fretter (1941) 와 Takahashi *et al.* (1972) 이 언급한 바와 같이, 미방출된 다수의 정자를 흡수하고 미방출된 정자들을 소화 (digestion) 시키기 위해서는 “lysosome”과 황색과립소체와 같은 구조물들이 반드시 필요하기에 출현하는 것으로 판단되었다. 그러나 이들 소체의 운명에 관해서는 전자현미경 관찰에 의한 좀 더 섬세한 연구가 추후 필요하다고 생각된다. 따라서 피빨고둥의 경우는 정소소엽 내에서 정자가 배정되어 저정낭으로 이동하면 정자가 기능을 발휘 할 수 있게 좀 더 완숙한 정자괴가 되는 것으로 판단된다. 정소소엽에서 정자들이 배정되지 못한 정자들은 상기 여러 연구자들이 보고한 바와 같이 퇴화되고 끝내는 흡수되게 되는데 이때 황색과립소체들이 퇴화, 흡수하여 소화되고 마는 것으로 생각된다. 미 방출된 잔존 정자는 정소소엽 내의 Sertoli cell들에 의해서도 역시 퇴화, 흡수되는 것으로 추정된다.

결국 고미에 사용된 정자들을 제외하면 다수의 정자들이 생식에 참여하지 않은 채 퇴화, 흡수되어야 함으로 이들을 다시 영양성분으로 재흡수하기 위해서는 신복족류의 경우는 저정낭 내층의 상피세포에서 출현하는 황색과립소체가 퇴화 흡수 및 소화흡수에 중요한 역할을 하는 기관으로 판단되었다. 대부분의 이매패류에서, 배우자형성 또는 성숙이 시작되어 진행되는 그 기간은 뚜렷한 시공간적 변이를 나타내고 있어, 자연에서 생식소 발달단계의 연구는 매우 중요한 일이라고 생각된다. 지금까지 대부분의 패류 중 이매패류와 복족류의 생식소를 조직학적으로 조사한 결과, 생식소가 발달하고 성숙해지는 시기는 수온이 높아지기 시작하는 봄철에서 여름철에 걸쳐 일어나거나 또는 여름철 중에 일어나고 있는데, 이 시기에는 먹이생물인 식물성플랑크톤이 풍부하고, 소화맹장 속에 영양물질이 축

적·저장되는 시기이었다.

반면, 수온이 낮고 먹이가 불충분한 시기에는 생식소의 발달이 매우 미숙한 상태를 보였다 (Chung *et al.*, 1993, 2002). 이와 같이 대형 복족류인 피빨고둥도 일반 이매패류와 같이 생식소 발달과 퇴화는 수컷이라도 암컷과 마찬가지로 수온과 먹이에 영향을 크게 받을 것으로 보고하였다 (Kinnee, 1963).

요 약

피빨고둥, *Rapana venosa*의 정소소엽 내에서 정자형성과정 중에 생성되는 정상적인 생식세포의 발달과 함께 섞이어 일정 시기에만 출현하는 비정상세포들을 미세구조적으로 관찰하였고, 또한 정소 발달단계에 따른 저정낭 내층 상피세포들의 주기적 변화를 조직학적 관찰에 의해 조사하였다.

생식세포의 발달단계는 정원세포기, 정모세포기, 정세포기, 정자기로 나누어지며, 정모세포기는 다시 제1 정모세포기와 제2 정모세포기로 세분할 수 있어, 총 5 단계로 구분할 수 있었다. 정상적인 웅성생식세포들의 분화와 발달과정은 다른 복족류 종들과 유사하였다. 정자는 길이가 대략 50 μm 정도이었다. 정자의 미부 편모의 악소넴 (axoneme) 은 주변에 9쌍의 미세소관들과 중앙에 1쌍의 미세소관들로 구성되어 있다. 즉, 9+2 구조를 이루고 있다. 특히, 대형 복족류 중 빨소라과 피빨고둥의 경우는 예외적으로 다른 이매패류나 두족류 등과 달리 정소소엽 내에서 정자형성과정 중에 정상적인 생식세포들 사이에서 총 4종 (Type IA, IB, Type IIA, IIB) 의 비정상세포들 (atypical cells) 이 함께 출현하는 특징을 보이고 있는데, 이러한 현상은 대형 복족류의 단지 소수의 종들에 한하여 출현하는 예외적인 특이한 현상이라 할 수 있다. 그러나 비정상세포들은 저정낭의 여러 단계 중 내층 상피세포들 내에서는 발견되지 않았다. 추측컨대 몇 가지 비정상세포들은 리소솜-모양의 공포들이나 리소솜-모양의 소체들을 가지는 데, 이들은 정소소엽 내에서 붕괴나 그 자신들의 흡수에 관여하는 것으로 추정된다.

상당량의 정자들이 정소소엽 내에서 형성되어, 그들의 일부는 7월 말까지 정소에서 저정낭으로 이동된다. 고미 성기는 6-7 월 사이이었다. 피빨고둥 저정낭 발달단계의 주기적 변화는 (1) S-I 단계 (휴지단계), (2) S-II 단계 (축적단계), 그리고 S-III 단계 (배정단계) 의 3 단계로 구분되었다.

사 사

저자들은 본 논문을 교람 하여 주시고 수정하여 주신 군산대학교 이기영 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 본 연구는 한국해양환경생태연구소의 일부 연구비 지원 (2008년도) 에

의해 연구되었기에 감사드립니다.

REFERENCES

- Amio, M. (1963) A comparative embryology of marine gastropods, with ecological emphasis. *Journal of Shimonoseki College Fisheries*, **12**: 229-253.
- Baccetti, B. and Afzelius, B.A., 1976. Biology of sperm cell. S. Krager, New York p. 1-254. (Monogr Devel Biol No. 10)
- Choi, J.D and Ryu, D.K. (2009) Age and Growth of purple whelk, *Rapana venosa* Baccetti *Malacology*, **25**: 189-196.
- Chung, E.Y, Kim, S.Y, Kim, Y.G. (1993) *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae), with species reference to the reproductive cycle, depositions of egg capsules and hatching of larvae. *The Korean Journal of Malacology*, **9**: 1-15.
- Chung, E.Y., Kim, S.Y., Park, K.H. Park, G.M. (2002) Sexual maturation, spawning and deposition of the egg capsules of the female purple shell, *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae). *Malacologia*, **44**: 241-257.
- D'Asaro, C.N. (1966) The egg capsules, embryogenesis and early organogenesis of a common oyster predator, *Thais haemostoma floridana* (Gastropoda: Prosobranchia). *Bulletin of Marine Science*, **16**: 884-914.
- D'Asaro, C.N. (1970) Egg capsules of prosobranch mollusks from south Florida and the Bahamas and notes on spawning in the laboratory. *Bulletin of Marine Science*, **20**: 414-440.
- D'Asaro, C.N. (1988) Micromorphology of neogastropod egg capsules. *Nautilus*, **102**: 134-148.
- D'Asaro, C.N. (1991) Gunnar thorsons world-wide collection of prosobranch egg capsules: Muricidae. *Ophelia*, **35**: 1-101.
- D'Asaro, C.N. (1993a) Gunnar thorsons world-wide collection of prosobranch egg capsules: Melongenidae. *Ophelia*, **46**: 83-125.
- D'Asaro, C.N. (1993b) Gunnar thorsons world-wide collection of prosobranch egg capsules: Nassariidae. *Ophelia*, **48**: 149-215.
- Franzen, A. (1970) Phylogenetic aspects of the morphology spermatozoa and spermiogenesis. In: Baccetti, B. (ed). "Comparative spermatology." *Accademia Nazionale Dei Lincei, Rome*, pp. 573.
- Franzen, A. (1983) Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Research*, **7**: 199-214.
- Fretter, V. (1941) The genital ducts of some british stenoglossen prosobranchs. *Journal of Marine Biology Association of the U.K.*, **25**: 173-211.: 1
- Fretter, V. and Graham, A. (1964) Reproduction. Pp. 127-156. In Wilbur, K.M. and Yonge, C.M. (eds.) *Physiology of Mollusca*. Academic Press, New York, 473 pp.
- Fujinaga, K. 1985. The productive ecology of the neptune whelk (*Neptunea arthritica* Bernadi) population, with special reference to the reproductive cycles, depositions of egg masses hatchings of juveniles. *Bull. Fac. Fish, Hokkaido University*, **36**(3): 87-98.
- Habe, T. (1960) Egg masses and egg capsules of some japanese marine prosobranchiate gastropod. *Bulletin of National Biological Station Asamusi*, **10**: 121-126.
- Habe, T. (1969) A nomenclatorial note on *Rapana venosa*. *Venus*, **28**: 109-111.
- Harding, J.M, Mann, R. (1999) Observations on the biology of the veined rapa whelk, *Rapana venosa* in the Chesapeake Bay. *Journal of Shellfish Research*, **18**: 9-17.
- Harding, J.M., Mann, R. and Kilduff, C.W. (2007) The effects of female size on fecundity in a large marine gastropod *Rapana venosa* (Muricidae). *Journal of Shellfish Research*, **26**: 33-42.
- Hodgson, A.N. and Bernard, R.T.F. (1986) Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of *Mytilidae* (Mollusca, bivalvia). *Gamete Research*, **15**: 123-135.
- Kim, J.H. (2001) Spermatogenesis and comparative ultrastructure of spermatozoa in several species of Korean economic bivalves (13 families, 34 species), Pukyong National University, 161pp.
- Kinnee, (1963) The effects of temperature and salinity on marine brackish water animals. 1. Temperature. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, **1**: 301-340.
- Knudsen, J. (1950) Egg capsules and development of some marine prosobranchs from tropical west africa. *Atlantide Report*, **1**: 85-130.
- Kwon, O.K, Park, G.M, and Lee, J.S. (1993) Coloured Shells of Korea. Academy Publication Co. Seoul, 285 pp.
- Le Boeuf, R. (1971) *Thais emarginata*: Description of the veliger and egg capsule. *Veliger*, **14**: 205-211.
- Lee, I.H., Chung, E.Y., Son, P.W. and Lee, K.Y. (2014) Depositions of egg capsules by female shell heights and comparisons of sizes at 50% of group sexual maturities of the female Rapa whelk *Rapana venosa* in three different salinity concentration regions. *The Korean Journal of Malacology*, **30**: 139-153.
- Lee, J.J, and Kim, S.H. (1988) Morphological study on the osphradium of *Rapana venosa*. *The Korean Journal of Malacology*, **4**: 1-16.
- Middelfart, P. (1994) Reproductive patterns in Muricidae. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, **13**: 83-88.
- Middelfart, P. (1996) Egg capsules and early development of ten muftid gastropods from Thailand Water. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, **16**: 103-130.
- Mann, R. and Harding, J.M. (2000) Invasion of a Mid

- Atlantic estuary by the oriental gastropod *Rapana venosa* Valenciennes, 1846. *Biological Invasion*, **2**: 7-22.
- Min, D.K. Lee, J.S. Ko, D.B. and Je, J.G. (2004) Mollusks in Korea. Hangeul Graphics. 566pp.
- Nishiwaki, S. (1964) Phylogenetical study on type of the dimorphic spermatozoa in Prosobranchia. *Science of Reproduction, Tokyo Kyoiku Daigaku*, **11**: 237-275.
- Popham, J.D. (1979) Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacological Review*, **12**: 1-20.
- Rawling, T.A. (1990) Associations between egg capsule morphology and predation among populations of the marine gastropod, *nucella emarginata*. *Biological Bulletin*, **179**: 312-325.
- Rawling, T.A. (1994) Encapsulation of eggs by marine gastropods: Effect of variation in capsules from on the vulnerability of embryos to predation. *Evolution*, **84**: 1301-1313.
- Rawling, T.A. (1995) Adaptations to physical stresses in the intertidal zone: The egg capsules of neogastropod mollusca. *American Zoology*, **39**: 230-243.
- Spight, T.M. (1976) Ecology of hatching size for marine snails. *Oecologia*, **24**: 283-294.
- Staiger, H. (1950) Zur determination der Nherier bei prosobranchiern. *Revision Suis Zoology*, **57**: 96-530.
- Staiger, H. (1951) Cytologische und morphologische untersuchungen zur determination der Neherier bei prosobranchiern. *Zeitschrift für Zellforsch Mikosk anat*, **35**: 469-549.
- Takahashi, N. Takano, K. and Murai, S. (1972) Histological studies on the reproductive cycle of the male netune whelk, *Neptunea arthritica*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, **36**: 87-98 (in Japanese).
- Thorson, G. (1940) Studies on the egg masses and larval development of gastropods from the Iranian gulf. *Danish Scientific Inverstigations in Iran*, **2**: 159-238.
- Wu, Y. (1988) Distribution and shell height-weight relation of Rawling *Rapana venosa* Valenciennes in the Laizhou Bay. *Marine Science/Haiyanh kexue*, **6**: 39-40.
- Yoo, I.S, Soh, C.T, Lee, I.S, Kim, J.J. (1991) Heavy metals in water, sediments and mollusca along coast line close to the estuaries of Gum-gang (river) and Mangyeong-gang. *The Korean Journal of Malacology*, **7**: 87-93.
- Yoon, H.D. (1986) Lipid composition of purple shell and abalone. *Bulletin of Korean Fisheries Society*, **19**: 446-452.
- Zolotarev, V. (1996) The Black Sea ecosystem change related to the introduction of new molluska species. *Marine Ecology*, **17**: 227-236