

## 참붕어 (*Pseudorasbora parva*)의 난자형성 과정에 관한 연구

김동희<sup>1,4</sup>, 이규재<sup>2,4</sup>, 김 석<sup>3</sup>, 등영진<sup>1,4,\*</sup>  
<sup>1</sup>연세대학교 원주의과대학 기초과학교실, <sup>2</sup>기생충학교실,  
<sup>3</sup>전자현미경실, <sup>4</sup>기초의학연구소

### A Study on the Oogenesis of False Dace (*Pseudorasbora parva*)

Dong-Heui Kim<sup>1,4</sup>, Kyu-Jae Lee<sup>2,4</sup>, Seok Kim<sup>3</sup> and Young-Kun Deung<sup>1,4,\*</sup>  
<sup>1</sup>Department of Basic Science, <sup>2</sup>Department of Parasitology,  
<sup>3</sup>Electron Microscope Facility and <sup>4</sup>Institute of Basic Medical Science,  
Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-701, Korea  
(Received March 30, 2007; Accepted June 14, 2007)

#### ABSTRACT

The oogenesis and ultrastructure of fertilized egg envelope of false dace were investigated by light and electron microscope.

The cytoplasm of false dace oogonia was basophilic and many nucleoli were located at inner side of nuclear membrane. In primary oocytes, yolk vesicles were distributed in marginal area only and egg envelope was not formed on egg outside. In secondary oocyte, the egg envelope was formed and yolk vesicles were increased than that of early stage in cytoplasm. The amount of basophilic substance was decreased. In case of matured egg, thickness of egg envelope and size of egg were increased, basophilic substance was distributed in egg envelope around only. The yolk vesicles were changed to yolk mass in accordance with development. The fertilized egg was of ellipsoidal, adhesive type and yellowish, have a single micropyle in the area of the animal pole. The fertilized egg envelope consisted of three layers, an outer adhesive layer, a middle layer consisting of 6 lamellae alternating layers and an inner electron dense layer. An outer surface of the fertilized egg envelope was arranged by adhesive fibrous structures.

In conclusion, it is summarized that the oogenesis of false dace were the increase of cell size, the formation and accumulation of yolk, and decrease of basophilic intensity in cytoplasm. These ultrastructural characteristics of fertilized egg envelope from false dace can be utilized in taxonomy of teleost.

**Keywords :** Oogenesis, False dace, Fertilized egg envelope, Fish

본 연구는 2006년도 연세대학교 원주의대 연구비(YUWCM-2006-06)에 의하여 이루어 졌음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Kun Deung, Department of Basic Science and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Ganwon 220-701, Korea. Ph: (033) 741-0351, FAX: (033) 732-4446, E-mail: youngkun@yonsei.ac.kr

## 서 론

참붕어 (*Pseudorasbora parva*)는 잉어목(Cypriniformes), 잉어과(Cyprinidae), 모래무지아과(Gobioninae)에 속하는 담수어로 국내 전 담수역, 헤이룽강 수계, 중국, 대만 및 일본에 분포한다. 식성은 잡식성으로 부착조류 및 수서곤충을 주식으로 하며, 산란기는 5~6월로 산란 후 친어가 수정란을 보호하는 것으로 알려져 있다(Kim & Park, 2002).

어류에서 배우체에 관한 연구는 정자형성, 난자형성 및 수정과정으로 나뉘어 일부 어종에서 연구되어 왔고 이 과정들은 중간에서 차이를 보일 뿐만 아니라 동종 간에서도 그들의 수정방식이나 생식습성 혹은 서식환경에 따라 다양한 것으로 알려져 있다(Wolenski & Hart, 1987). 어류의 난소는 한 쌍으로 체강상부의 좌우에 위치하며 난소내의 난원세포(oogonia)는 체세포 분열을 통하여 제1난모세포가 된다. 제1난모세포는 난황이 없고 난황포(yolk vesicle)가 세포질 가장자리에 형성되어 다당류를 축적하는 것으로 알려져 있으며(Lee et al., 1985), 제2감수분열과정 중에 난막 외측의 여포세포에서 합성된 물질이 미세용모를 통하여 세포질 안으로 들어오는 난황형성과정(vitellogenesis)이 이루어지고 후에 성숙란이 형성된 후 세포분열은 멈추고 산란 단계에 이르게 된다. 난막의 외부에는 종에 따라 여포세포로부터 형성되는 것으로 알려진 부속구조물들이 분포하는 경우가 있는데 과(Family) 및 종에 따라서 다양한 형태를 보유하고 있고, 수정란의 크기와 난막구조 및 단백질 조성은 환경의 물리, 화학적 특성에 따라 서로 다르고(Stehr & Hawkes, 1979), 다른 과에서는 물론 같은 과, 같은 속에서도 서로 다른 구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1997; Kim et al., 2002, 2005).

어류의 정자는 다른 척추동물과는 달리 정자의 두부에 첨체가 존재하지 않기 때문에(Gwo & Gwo, 1993) 난막의 동물극 쪽에 위치하고 있는 난문(micropyle)을 통해서 수정이 이루어지며 난문의 내부직경이 난막 안쪽으로 들어갈수록 작아지기 때문에 다수정(poly-spermy)을 제한하는 기능도 수행한다. 수정란 난문의 형태는 과에 따라 유사성이 있거나 종마다 서로 다른

것으로 알려져 있다.

국내에 서식하는 어종의 난자형성과정 및 수정란에 대한 연구는 실제 실험실내에서 어류의 양어, 암수구별 및 산란이 매우 어렵기 때문에 양어 및 산란이 쉬운 몇몇 어종 또는 산업적 유용성에 따라서 식용어류에서 집중적으로 연구되어 있는 실정이다. 또한 참붕어는 기생충 분야에서 간디스토마 피낭유충(metacercaria)의 제2중간숙주로서 중요성이 대두되는 어종으로 중요성이 있으며 최근 환경오염으로 점점 수가 급격히 줄고 있고 참붕어에 대한 번식자료는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 참붕어의 난자형성과정을 확인하고, 인공번식법 개발을 통해 종 보존을 위한 기초자료를 확립하며, 분류체계에 따른 체계화 작업의 일환으로 어류의 수정란 미세구조 즉 난막의 외부 및 내부 형태, 난문의 유무 및 미세구조를 확인하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

2006년 4부터 2007년 3월 사이에 강원도 원주시 흥업면 매지리 연세대학교 원주 캠퍼스 호수에서 참붕어(*Pseudorasbora parva*)를 채집하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 암수분리

산란기에 채집된 참붕어를 몸이 검어진 수컷과 밝은 노란색을 띠게 되는 혼인색을 기준으로 하여 암수를 분리하였다.

#### 2) 난소의 적출 및 조직처리

성숙한 참붕어 암컷을 해부하여 난소의 외부형태를 관찰하고 난소를 적출하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 4% glutaraldehyde-4% formaldehyde로 4°C에서 24시간 고정된 후 흐르는 물로 12시간 세척하고 ethanol 농도 상승순으로 탈수한 다음에 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μm 두

개로 자른 후 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 발생분화시기에 따른 난자형성과정을 관찰하였다.

### 3) 수정란 채취

#### (1) 포란된 상태의 암컷의 경우

산란 직전의 포란된 암컷의 복부를 손가락으로 압력을 가하여 난소로부터 빠져나온 성숙란을 petri dish에 100개씩 넣고 수컷의 부정소를 적출하여 막자사발에 넣어 분쇄한 후 난자와 혼합하여 수정시킨 후 생리식염수를 채워 수정란을 얻었다.

#### (2) 포란되지 않은 상태의 암컷의 경우

시판중인 배란 유도용 HCG 1,000 IU 한 병에 1 mL의 링겔액(NaCl 15 g, KCl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.8 g/2 L)으로 용해한 후 복강 내 주사하여(0.1 mL/10 g) 포란시킨 후 일정시간이 경과하여 포란되면 (1)의 방법에 따라 수정란을 얻어 실험에 사용하였다.

### 4) 수정여부의 확인

인공수정을 한 후 해부현미경을 이용하여 위란강 형성된 알을 수정란으로 판별하여 실험에 사용하였다.

### 5) 전자현미경 시료처리

#### (1) 수정란 난막

수정란에서 난막의 난면구조를 확인하기 위하여 수정란에서 난막을 분리하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 4시간 전고정한 후 동일 완충액으로 세척하여 1% osmium tetroxide로 2시간동안 후고정하였다. 동일 완충액으로 30분씩 3회 세척하고, ethanol 농도 상승순으로 탈수시켜 propylene oxide로 치환하였다. 포매는 Epon혼합액을 사용하였고 포매된 조직은 초박절편기를 사용하여 50~60 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 JEOL-1200EXII형 투과전자현미경(JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

#### (2) 수정란 난막의 표면과 부속구조물

수정란을 투과전자현미경 시료처리법과 동일한 방법으로 고정된 후, 통상적인 주사전자현미경 처리법에 따라 시료를 처리한 후 수정란 난막의 표면구조와 부속구조물의 미세구조를 JSM-6300형 주사전자현미경(JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 광학현미경 관찰결과

참봉어의 난소는 방추형으로 부레와 소장사이에 위치하고 있었고 난소 내에는 난원세포, 제1난모세포, 제2난모세포 및 난세포 등 분화단계가 다양한 생식세포들이 분포하고 있었다. 일반적으로 어류는 한 쌍의 주름이 없는 긴방추형의 난소를 가지고 있으나 쟁둥어의 경우 난소는 주름진 낭상을 이룬 모양으로 되어있는 경우도 있다(Chung et al., 1991). 난원세포의 세포질은 hematoxylin으로 매우 강하게 염색되었고 핵 내에는 여러 개의 구형인 인들이 분포하고 있었다(Fig. 1). 초기시기의 제1난모세포는 난세포 세포질의 가장 자리에 국한적으로 난황포(yolk vesicle)들이 형성되어 분포하고 있었으며 난막은 형성되지 않았다(Fig. 2). 제1난모세포가 발달함에 따라서 난황포는 안쪽으로 증식되어 증가하였고 핵주위는 호염기성이었으며 매우 얇은 난막이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 제2난모세포의 세포질은 난황포가 점점 증가하여 제1난모세포에 비하여 완전히 다 채워지고 난막이 뚜렷하게 관찰되었으며 염기성 물질들은 점점 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 발생이 진행됨에 따라서 성숙란이 되었을 때 난막의 두께와 난자의 크기는 증가되었고 염기성 물질들은 난막쪽에 국한되어 분포하고 있었다(Fig. 5). 발생이 진행됨에 따라서 난황포는 난황괴(yolk mass)를 이루었다(Fig. 6). 피라미의 경우 난자형성과정은 참봉어와 매우 유사한 것으로 알려져 있지만 발생이 진행됨에 따라서 난막의 두께는 얇아지는 것으로 보고된 바 있다(Jang et al., 1995). 어류의 난자형성과정은 수온, 광주기, 광도, 수질 등 환경요인에 의해 결정되며, 난자는 비세포성 난막에 의해 둘러싸여 있어서 배자가 외부환경으로부터 받는 물리적인 충격 및 화학물질에 방어하고 확산에 의한 기체교환의 기능을 수행한다(Harvey et al., 1983; Cameron & Hunter, 1984). 난막은 주로 당단백질로 구성되어 있으며(Brivot et al., 1991) 미세용모가 형성될 때 1차난막이 만들어 지며 미세용모가 여포세포를 완전히 관통한 후 여포세포로부터 만들어진 전자밀도가 높은 물

질들이 형성되어 1차난막에 침적됨으로서 2차난막이 형성된다(Wourms & Seldon, 1976). 수정 후 수정란은 난막과 난황막이 분리되어 위란강이 형성되었으며 난황막은 구형이었고 수정란의 크기는 최장 2.0~2.5 mm인 타원형으로 부착성이었으며 동물극 쪽에서 난문이 관찰되었다(Fig. 7). 일반적으로 잉어과의 어류는 부착성이지만 zebrafish와 leopard danio의 경우처럼 비부착성인 경우도 있다(Kim et al., 1993, 1998). 참붕어는 서식처가 수류가 매우 느린 곳에 서식하는데 부착성이면서 친어가 수정란을 보호하는 특징은 생존율을 높이는데 큰 기여를 할 수 있고 바닥이 주로 진흙이기 때문에 용존 산소량 문제도 해결될 수 있을 것으로 생각된다. 경골어류의 경우 정자는 침체가 없어 수정을 위해 난자의 난막에 정자의 통로인 난문(micropyle)을 가지고 있으며 이 난문의 형태는 종마다 매우 다양하지만 카라신과(Characidae)의 어류처럼 공통적인 특징을 나타내어 과의 특성을 보이는 경우로 알려져 있다(Kim et al., 1996; 2005)

## 2. 전자현미경적 관찰결과

수정란의 난막을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 모두 3층으로, 부착구조물이 분포하고 있는 외층, 6층의 전자밀도가 서로 다른 층상구조를 가진 중층, 전자밀도가 높은 내층으로 구성되어 있었다(Fig. 8). 수정란 난막의 구조는 어종마다 매우 다양한 것으로 알려져 있으나 등목어과(Belontiidae)에 속하는 어류의 수정란 난막은 2층으로, 부착성 외층과 톱니모양의 내층으로 형태가 같은 경우도 있으며(Kim et al., 1999) 시클리드과(Cichlidae) 또는 카라신과(Characidae) 어류의 경우 수정란의 외형은 육안으로 구별 할 수 없지만 난막의 미세구조는 과(Family)에 따라서 서로 다른 구조를 가지고 있어 종을 구분하는데 매우 중요하다(Kim et al., 1996; Deung et al., 1997). 특히 다른 종보다는 잉어과 어류의 난막은 매우 서로 다른 구조를 가지고 있다. Leopard danio의 난막은 3층으로, 전자밀도가 높은 외층은 pore canal plug를 가지고 있으며 중층은 섬유층으로 되어 있고 내층은 전자밀도가 서로 다른 10층으로 구성되어 있다. Cherry barb의 경우 같은 3층이지만 내층이 8층으로 되어 있고, white cloud

mountain fish는 2층으로 되어 있다(Kim et al., 1998). 국내에 서식하는 같은 과의 참마자의 경우 2층으로 구성되어 있으며 외층은 2층, 내층은 4층으로 구성되어 있다(Kim et al., 2001). 유속이 비교적 높은 지역에 서식하는 피라미의 경우 난막은 더욱 견고한 구조로 3층으로 구성되어 있는 난막 중 내층이 9층의 층상구조를 가지고 있다(Deung et al., 2000). 수정란의 난막은 침성란 보다는 부성란이, 난태생어류보다는 난생어류가, 친어가 알을 보호하지 않는 경우, 유속이 더 빠른 곳에 서식하는 어류에서 더 두꺼운 것으로 알려져 있다(Guraya, 1986).

난막 바깥층에는 직경 0.5~0.8  $\mu\text{m}$  정도인 단백질성 섬유상 구조물들이 분포하고 있었고(Fig. 9) 이 섬유상 구조물을 횡단하여 관찰한 결과 각 섬유상 구조물 사이에 얇은 막이 싸여 있고 전체적으로 벌집형의 구조를 하고 있었다(Fig. 10). 수정란 표면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 돌기 같은 접착성 구조물들이 난막 표면 전체를 덮고 있었으며(Fig. 11), 확대하여 관찰할 결과 돌기의 기부부분은 서로 붙어 있었다(Fig. 12). 부착구조물 사이 연결부위는 분리되어 있는 경우 보다는 더 큰 기계적 강도를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

난막 표면에 부착구조물들은 leopard danio처럼 부착성이 아닌 경우에도 분포하는 경우가 있으며, 잉어과에 속하는 cherry barb는 단추모양의 원형구조물, white cloud mountain fish의 경우는 간상의 구조물들이 분포하고 있다(Kim et al., 1998). 참마자의 경우 버섯모양의 돌기들이 뭉쳐 하나의 덩어리를 형성하여 매우 견고한 구조를 하고 있다. 그러나 피라미의 경우는 유속이 높은 곳에 서식하지만 난막표면에 부착구조물은 없는 것으로 알려져 있다(Deung et al., 2000). 광학현미경상에서 관찰되던 난문은 주사전자현미경상에서는 관찰할 수 없었으며 관찰되지 않은 이유는 부착성 구조물들이 난문까지 모두 덮고 있기 때문인 것으로 생각된다.

이상과 같이 참붕어의 미성숙 난원세포가 성숙한 난세포를 형성하고 수정란이 형성될 때까지 발달하는 과정을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 참붕어의 난자형성과정은 세포의 크기증가, 난황의 축적, 염기성 물질의 감소 및 난막의 형성으로 요

약될 수 있으며 잉어과의 어류의 경우 수정란 난막의 표면 및 단면구조는 서로 다른 구조를 가지고 있기 때문에 참붕어의 수정란 난막의 미세구조는 종을 대표하는 종특이성이며, 종을 분류하는데 분류형질로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 초기발생과정을 연구하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Brivio MF, Bassi R, Cotelli F: Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion, *Mol Reprod Dev* 28 : 85-93, 1991.
- 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.
- Chung EY, An CM, Lee TY: Sexual maturation of the blue-spotted mud hopper, *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus), *Bull Korean Fish Soc* 24(3) : 167-176, 1991 (Korean).
- Deung YK, Kim DH, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelope in pale chub Cyprinidae, Teleost, *Korean 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, convict cichlid and discus, cichlidae, teleost, *Korean J. Electron Microscopy* 27(4) : 417-432, 1997 (Korean).
- Guraya SS: Monographs in developmental biology, The cell and molecular biology of fish oogenesis, *Karger* 18 : 111-147, 1986.
- Gwo JC, Gwo HH: Spermatogenesis in the Black Porgy, *Acanthopagrus chlegeli* (Teleostei, Perciformes, Sparidae), *Mol Rep Dev* 36 : 75-83, 1993.
- 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.
- Jang SJ, Kim DH, Reu DS, Deung YK: A study on the oogenesis of Pale chub (*Zacco platypus*), *Korean J Electron Microscopy* 25(3) : 63-74, 1995 (Korean).
- Kim DH, Deung YK, Kim HY, Reu DS: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from long nose barbel, Cyprinidae, teleost, *Korean 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 envelopes from three-spot gourami, pearl gourami and marble gourami, Belontiidae, Teleost, *Korean J Electron Microscopy* 29(3) : 343-351, 1999 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: A comparative study on the ultrastructure of the egg envelope in fertilized eggs of fishes, Characidae, three species, *Korean J Electron Microscopy* 26(3) : 277-291, 1996 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Kim WJ, Deung YK: A comparative study on the ultrastructures of the egg envelope in fertilized eggs of angelfish (*Pterophyllum eimekei*) and zebrafish (*Brachydanio rerio*), *Korean J Electron Microscopy* 23(3) : 115-128, 1993 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Comparative ultrastructure of the fertilized egg envelope in three species, Cyprinidae, teleost, *Korean J Electron Microscopy* 28(2) : 237-253, 1998 (Korean).
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: Ultrastructure of the fertilized egg envelope from dark sleeper, Eleotrididae, Teleost, *Korean 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, *Korean J Electron Microscopy* 35(2) : 89-96, 2005 (Korean).
- Kim IS, Park JY: Freshwater fishes of Korea, Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., 94-96, 2002 (Korean).
- Lee TY, Kang YJ, Lee BD: Reproduction and population dynamics of marbled sole *Linmanda yokohamae*, I. Reproduction, *Bull Korean Fish Soc* 18(3) : 253-261, 1985 (Korean).
- 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.
- Wolenski JS, Hart NH: Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg, *J Exp Zool* 243 : 259-273, 1987.
- Wourms JP, Sheldon H: Annual fish oogenesis; Formation of the secondary egg envelope in fish, *Int Review Cytol* 136 : 51-92, 1976.

### < 국문초록 >

참붕어의 난자형성과정과 수정란 난막의 미세구조를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

참붕어에서 난원세포의 세포질은 호염기성이었고 핵막 내에 많은 인들이 분포하고 있었다. 제1난모세포의 경우 난황포가 단지 난세포 가장자리에만 배열되어 있었고 난막의 형성은 관찰되지 않았다. 제2난모세포에서는 난막이 형성되었고 제1난모세포에 비해서 난황포가 점점 핵쪽으로 증식된 경향을 보였다. 발생이 진행됨에 따라서 호염기성 물질들은 점점 감소하는 경향을 보였고 후에 난막 주위에만 국한적으로 분포하였으며, 난막의 두께와 난자

의 크기는 점점 증가되었다. 또한 성숙란으로 발생이 진행되면서 난황포들은 난황괴로 변화되었다. 참붕어의 수정란은 타원형으로 부착성이었으며 동물극쪽에서 난분이 관찰되었다. 수정란의 난막은 모두 3층으로, 부착성인 외층, 전자밀도가 서로 다른 6층상구조를 가진 중층 및 전자밀도가 높은 내층으로 구성되어 있었으며 난막표면은 부착성 섬유상 구조물로 덮여 있었다.

이상과 같이 참붕어의 난자형성과정은 생식세포의 크기 증가, 난황의 형성과 축적 및 세포질의 호염기성물질 감소로 요약될 수 있으며 수정란 난막의 미세구조적 특징들은 경골어류의 계통분류학에서 분류형질도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph of an oogonium in ovary ( $\times 200$ ). N: Nucleus, C: Cytoplasm. The cytoplasm was basophilic.
- Fig. 2.** Primary oocyte ( $\times 100$ ). Yv: Yolk vesicle. Egg envelope was not formed on egg outside. Yolk vesicle was distributed in marginal area only.
- Fig. 3.** Secondary oocyte ( $\times 100$ ). E: Egg envelope, N: Nucleus, Yv: Yolk vesicle. The egg envelope was formed.
- Fig. 4.** A light micrograph of a secondary oocyte ( $\times 100$ ). N: Nucleus, Yv: Yolk vesicle. The yolk vesicle was increased than that of early stage.
- Fig. 5.** A light micrograph of matured egg ( $\times 40$ ). E: Egg envelope, Yv: Yolk vesicle.
- Fig. 6.** The yolk mass in matured egg before spawning ( $\times 40$ ).
- Fig. 7.** The fertilized egg of *Pseudorasbora parva* ( $\times 40$ ). F: Fertilized egg envelope, Y: Yolk, P: Perivitelline space, arrow: micropyle.
- Fig. 8.** The egg envelope consisted of three layers, an outer layer (OL), a middle layer consisting of 6 lamellae alternating layers (ML) and an inner layer (arrow) (scale bar= $2\mu\text{m}$ ).
- Fig. 9.** The tangential section of the adhesive structure (AS) on outer surface of fertilized egg envelope (scale bar= $2\mu\text{m}$ ).
- Fig. 10.** The cross section of the adhesive structure on outer surface of fertilized egg envelope (scale bar= $2\mu\text{m}$ ).
- Fig. 11.** The scanning electron micrograph of outer surface of fertilized egg envelope (scale bar= $10\mu\text{m}$ ). The outer surface was arranged by adhesive fibrous structures.
- Fig. 12.** The scanning electron micrograph of magnified adhesive structures (scale bar= $5\mu\text{m}$ ).



