

韓國產 미꾸리에 관한 育種 · 繁殖學의 研究

IV. 卵母細胞의 卵黃 形成 및 成熟에 관한 電子顯微鏡的 觀察

尹鍾萬 · 李宗映 · 李慶鎬* · 朴弘陽

建國大學校 畜產學科 動物 遺傳 育種學 研究室

Breeding and Reproductive Studies on Korean Native Loach

(*Misgurnus anguillicaudatus*)

IV. Electron Microscopic Observation on Vitellogenesis and Maturation in Oocytes

Yoon J.M., J.Y Lee, K.H. Lee and H.Y. Park

Animal Science, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the histomorphological changes of ovaries obtained from 100 of 1-year-old female Korean loach(*Misgurnus anguillicaudatus*). The light microscopic and ultrastructural changes of ooplasm and follicular membranes of oocytes, were observed by light and transmission electron microscope during the reproductive cycle. All data were collected from November in 1991 to May in 1992.

The results obtained in this study were as follows:

The size of the nucleoli and number of the yolk granules increased as the oocyte grown. Yolk granules were loosely deposited in the oocyte as crystalline granules. Due to the presence of large early and late maturing oocytes, their ovaries were enlarged, transparent, granular and yellowish in color. The lattice was broken down at hydration, leaving the egg transparent. As the percentages of fish in LMO and RO stage increased from March to April, mean gonadosomatic index(GSI) values(18.49%) increased.

Zona radiata change a squamous into cuboid shape in EMO stage. Processes from the granulosa cells and from the oocyte, microvilli grow and make contact with each other in the pore canals of the zona radiata during vitellogenesis, but are withdrawn as the zona radiata becomes more compact and devoid of pore canals during oocyte maturation.

Seasonal changes in the microscopic appearance of the ovaries were well correlated with those in both GSI and macroscopic appearance.

(Key Words : Korean loach, Ultrastructures, Vitellogenesis, Zona radiata, Microvilli, Pore canals, Yolk granule, Gonadosomatic index)

* 建國大學校 基礎科學研究所 化學科

이 논문은 大山農村文化財團(1992~1993)의 지원과제로서 수행되었습니다.

I. 緒 論

한국산 미꾸리는 季節性 繁殖을 하는 溫水性 淡水魚 種으로서 一般 動物園 및 大型 動物園에서 飼育하고 있는 鳥類 및 海産動物의 먹이로서 多量 要求되고 있고, 옛날부터 우리 조상들은 몸을 보호하는 식품으로 이용해 왔다. 현재 그 수요는 꾸준히 상승하고 있고, 특히 성수기인 겨울철에는 공급량이 부족한 실정에 있다. 그러자 요즘에는 韓中間 왕래가 빈번한 관동 브리지號(여객선)를 통한 값싼 중국산 미꾸리의 수입으로 말미암아 국내 생산업자들은 큰 피해를 보고 있다. 그러나 國內에서는 現在 農夫들이 논과 뚝 등에서 서식하고 있는 自然産 미꾸리 등을 採集 및 蒐集하고 있기 때문에 大量生産이 遼遠한 實情이며, 채집업자들이 미꾸리 稚魚의 가격을 높게 산정하기 때문에 현재 成魚의 출하가격이 상당히 높게 책정되어 있다.

따라서 淡水魚類中에서 미꾸리의 人工受精에 의한 優身種苗의 大量 生産 및 普及을 위하여 새로운 品種改良과 繁殖效率 改良은 무엇보다도 시급한 研究課題라고 할 수 있다.

그러나 下等脊椎動物인 魚類에서는 현재 여러가지 制約條件으로 말미암아 아직 걸음마 段階에 있는 實情이다. 따라서 畜産에서 應用하고 있는 여러 關聯學問을 高級魚類 蛋白質의 生産에 關與하는 魚類의 遺傳, 育種, 繁殖에 接木시켜서 必要한 基礎 이론을 研究, 樹立하고자 한다.

지금까지 外國의 경우 담수산 및 해산어에 대한 난모세포의 細胞學의 特徵에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다. Guraya(1986)는 각종 어류의 卵形成에 관해서 세포 및 분자생물학적 측면에서 연구해 왔고, Drance等(1976)은 未成熟 무지개 松魚에 연어 腦下垂體 homogenate를 反復 注入시킴으로서 精巢가 發達하는 時期를 短縮시키는 結果를 얻었다고 報告하였다. Hirose等(1976)이 은연어(*Plecoglossu altivelis*)의 性腺을 調査하였고, Nagahama等(1983)이 여러 硬骨魚類의 性腺 刺戟 호르몬이 生成되는 腦下垂體 部位를 組織學의 側面으로 觀察 究明하였다.

Tesoriero(1977)는 일본산 송사리(*Oryzias latipes*)의 초기 卵形成時絨毛膜(zona pellucida)의 형성

시기와 그의 형태학적 연구를 실시하였으며, 그는 발달중인 난모세포의 난세포질 외층부에 존재하는 표면이 여러 층으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles이 송사리과에서 발달이 진행되는 경우 융모막으로 변하는 微細構造라고 주장하였다.

Lambert 등(1978)은 무지개 송어가 난황 형성 기간동안에 다량의 난황 단백질이 난모세포내에 축적되어 난소 중량의 증가를 야기시킨다고 밝혔고, 卵黃顆粒이 난모세포질내에 출현될 때의 段階에 卵母細胞層(follicle cell layer)이 두꺼워지며, 放射帶(zona radiata) 역시 두껍게 형성되면서 급속하게 증가된다고 보고하였다.

Mackenzie等(1989)은 溫水性 魚種인 미국산 메기(*Ictalurus punctatus*)의 卵直徑과 GSI의 卵母細胞의 成長은 가을에 開始되어서 產卵時期인 5月까지 繼續적으로 增加 趨勢에 있게 된다고 報告하는 등 많은 研究가 進行되어 왔다.

국내에서는 붕고기의 계절적 변화에 따른 性腺 발달에 관한 연구 보고중 貝類(Chung等, 1986), 이스라엘 잉어(Lee等, 1989), 미꾸리(Yoon等, 1987, 1991), 무지개 송어(Kim, 1991; Yoon等, 1991)의 卵母細胞에 대한 광학현미경적 발달 정도만 보고되었을 뿐이다.

따라서 한국산 미꾸리의 生活週期中 11월부터 5월까지 繁殖週期에 따른 卵黃形成(vitellogenesis)과 卵成熟期間 동안에 일어나는 卵母細胞의 微細構造의 形態 變化를 光學(LM) 및 透過 電子顯微鏡(TEM)을 이용하여 究明함으로써 장차 미꾸리의 대량생산체계를 갖추는데 필요한 發生遺傳學의 基礎資料를 얻기 위해서 本 研究를 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼養管理

본 연구는 1991년 11월부터 1992년 5월까지 건국대학교 畜産大學 動物遺傳育種學 實驗室 및 부설 養魚場에서 실시하였다. 계절에 따른 수온의 변화속에서 溶存酸素量이 6.2 ± 0.5 ppm이며, pH 7.2 ± 0.1 인 1.5 m³크기의 탱크에서 N.R.C. 사양표준에 준한 배합사료 및 실지령이를 급여하여 사육중인 체중 15~25g의

암컷 1년생 韓國産 미꾸리 100마리를 供試魚로 사용하였다.

2. 光學(LH) 및 透過電子 顯微鏡의 方法(TEM)

各 組織片을 pH 7.3인 0.1M phosphate buffer가 包含된 3% glutaraldehyde 溶液에 固定시키고, 2時間동안 1% osmium 溶液으로 後固定시키며, 1時間동안 여러가지 濃度の ethanol 溶液으로 계속해서 脫水시킨다. Epon 812로 包埋(embedding) 시키고, 超薄切器로 50nm의 크기로 薄切시킨 후 일부는 toluidine blue로 염색시켜서 광학현미경에서 400×로 관찰하였고, 나머지 일부는, uranyl acetate와 lead citrate로 彩色시킨 다음, 電子顯微鏡으로 70kV의 電壓하에서 檢鏡한다. 특히, 卵母細胞內의 染色質의 濃度, yolk vesicles 및 卵黃顆粒, 脂肪滴, 核, 核仁의 크기 및 두께를 측정하였고, 顆粒膜, 莢膜의 直徑을 측정하였다. 그리고 난소조직의 卵形成의 各 단계는 앞에서 언급된 난모세포의 세포학적 특징을 기초로 하여 early-perinucleolus, late-perinucleolus, early-maturing, late-maturing, ripe의 5단계로 구분시켰다. 본 연구에서는 Howell(1983)이 사용했던 용어가 이용되었다.

各 단계의 卵母細胞의 莢膜, 顆粒膜, 基底膜, zona radiata의 平均直徑을 측정한 후 QUATTRO PRO 컴퓨터 프로그램을 利用하여 각각의 그래프를 圖式하였다.

III. 結果 및 考察

1. 初期 卵形成

Fig. 1, 3, 9, 15, 19는 光학현미경(50nm의 超薄片)을 통해 미꾸리 암컷의 各 卵母細胞이고, Fig. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24는 전자현미경(50nm의 超薄片)을 통해서 살펴본 각각의 卵母細胞의 微細構造로서 莢膜, 顆粒膜, 核, 核心體, 卵細胞質을 나타내고 있다. 發達 段階에 따른 各 細胞들의 發達狀態 및 細胞遺傳學의 特徵은 다음과 같다.

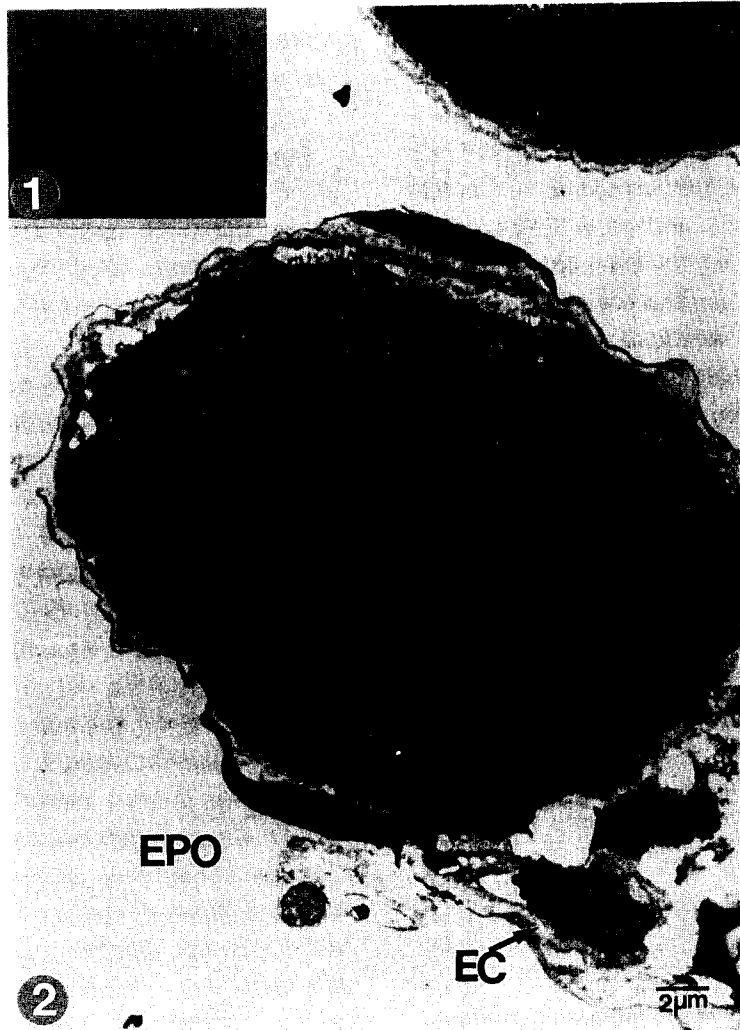
2. Previtellogenic phase

이 단계에 있는 卵母細胞(약 >75 μm)는 10월부터

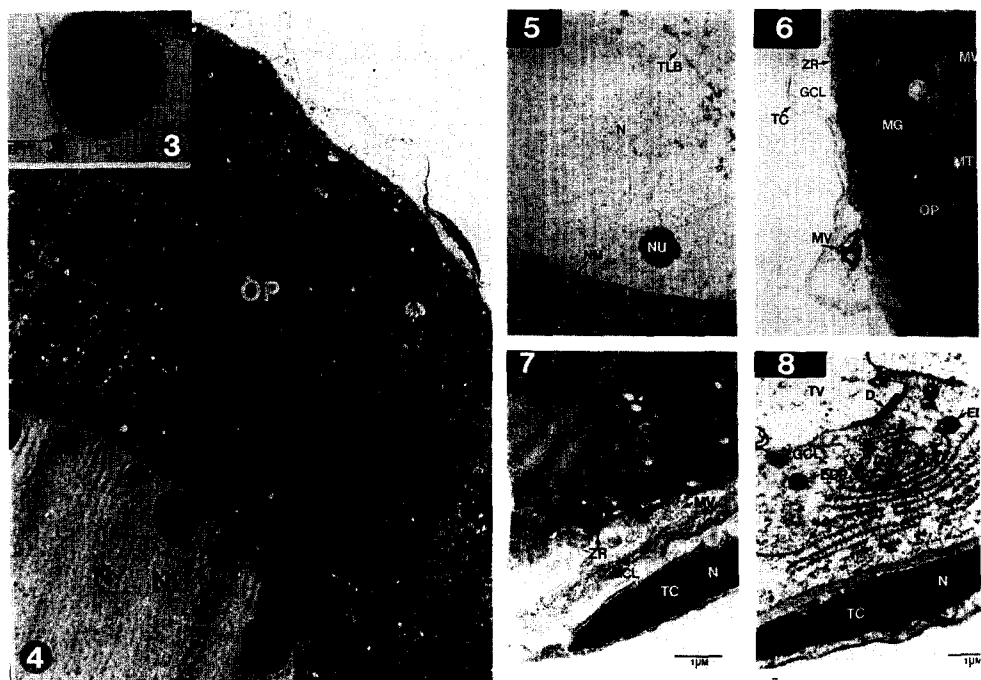
2월까지 비산란시기에 있는 卵巢의 대부분을 차지하며, Fig. 1, 2, 3, 4에서와 같이 核이 난모세포의 일부분을 차지하나 시간이 흐를수록 卵母細胞의 대부분을 차지한다. 이 단계에서는 放射帶(zona radiata)의 형성이 안된 상태를 나타내나 放射帶가 單層으로 나타나는 末期 전단계까지를 지칭한다.

Stage I (Early perinucleolus oocyte) (Fig. 1, 2): 약 30~70 μm의 核心體가 核 주변부에 위치해 있는 初期 段階로서 卵母細胞의 形態가 약간 둥근 원형을 이루고, 染色質이 실처럼 가늘게 나타나며, Fig. 2에서와 같이 9~12 μm의 크기를 갖는 核과 그 내부에 강한 好鹽基성을 띠고 있는 3~5 μm의 크기를 갖는 둥근 형태의 커다란 核心體가 존재한다. 이 크기는 孫(1992)이 연구한 한국산 메기(*Silurus asotus*)의 핵소체 크기와 유사하게 나타났다. 細胞質은 Fig. 1에서와 같이 toluidine blue 染色時, 核과 細胞質이 진하게 染色되었다. 이 시기의 卵母細胞를 光학현미경으로 관찰시, Fig. 1에서와 같이 세포질내에 세포소기관의 확인이 어려웠다. Fig. 2에서와 같이 상당한 數의 전자물질로 채워지지 않은 둥근 액포(화살표)와 가득 채워진 둥근 형태의 액포(화살표 머리)가 세포질의 전체를 이루고 있다. 이 단계의 卵母細胞는 Fig. 2에서와 같이 여러 層의 外層膜(EC)卵胞膜으로 둘러 싸여져 있다. 이 단계에서는 아직까지 放射帶가 발달되지 않았고, 顆粒膜의 구조도 명확하게 관찰되지 않았다.

Stage II (Late perinucleolus oocyte) (Fig. 3, 4, 5, 6, 7, 8): 약 85~160 μm, 核小體 核 주변부에 위치해 있는 末期 段階로서 약 30 μm의 크기를 갖는 核의 形態는 early perinucleolus oocytes 보다 둥글고, Fig. 1에서와 같이 toluidine blue 染色時, 核은 연한 밝은 색을 띠었다. 이러한 변화는 한 색깔을 나타내었으나, EPO 보다는 밝은 색을 띠었다. 이러한 변화는 Yoon 등(1991)이 연구한 무지개 송어나 孫(1992)이 연구한 한국산 메기의 LPO 단계와 유사한 특징을 나타내었다. Fig. 4, 5에서와 같이 核膜과 細胞質 사이의 區分이 명확하며, 核膜은 2중막을 나타내었다. Fig. 5에서와 같이 실같은 염색질(Chromatin)과 Fig. 4에서와 같이 크고 작은 형태의 커다란 核小體(Nucleoli)를 가진 둥근 형태의 核이 존재한다는 것이 가장 두드러진 특징중의 하나이다. Fig. 7에 나타난



- Fig. 1. Histomorphology of the oocyte development of Korean loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, by light-microscopic observation, 2. 5% glutaraldehyde soln-fixed, Epoxy resin-embedded, and toluidine blue-stained preparations. EPO:Early perinucleolus oocyte. Cytoplasm is basophilic.
- Fig. 2. Electron microscopic observation of early perinucleolus oocyte. This oocyte(about 30~70 μ m in diameter) is observed in ovary during the immature times. The major diameter of nucleus with a large nucleolus is about 9~12 μ m. EC:Epithelial cell, EPO:early perinucleolus oocyte.



- Fig. 3. Light microscopic observation of late perinucleolus oocyte. The nuclear size of this oocytes is relatively larger than that of EPO. Cytoplasm is slightly basophilic. LPO:Late perinucleolus oocyte.
- Fig. 4. Electron microscopic observation of late perinucleolus oocyte. The major diameter of LPO is about $85\sim 160\mu\text{m}$. The major diameter of the nucleus is about $30\mu\text{m}$: Numerous small and large nucleoli are located at the periphery of nuclear membrane. Early perinucleolus oocyte surrounded by the thin epithelial cell layer. N:Nucleus, NU:Nucleolus, OP:Ooplasm.
- Fig. 5. Electron microscopic observation of late perinucleolus oocyte. The nuclear membrane(NM) is composed of two layer. The nuclear membrane is sharply divided into nucleus and ooplasm. The nuclear pores are observed in nuclear membrane. N:Nucleus, NM:Nuclear membrane, NU:Nucleolus
- Fig. 6. Electron microscopic observation of the cortical ooplasm of late perinucleolus oocyte. Note outermost ooplasmic inclusions such as multivesicular bodies(MVB), mitochondria(MT) and melanin granules(MG) located at the peripheral region of oocyte. The thecal layer and granulosa layer are underdeveloped. GCL:Granulosa cell layer, MG:Melanin granules, N:Nucleus of the thecal cell OP:Ooplasm, TC:Thecal cell layer, ZR:Zona radiata.
- Fig. 7. Electron microscopic observation of the follicular membrane of late perinucleolus oocyte. Note outermost ooplasmic inclusions such as lipid bodies(LB), multivesicular bodies(MV), and melanin granules(MG) located at the peripheral region of oocyte. Microvilli(MV) from the oocyte and granulosa cells protrude into the zona radiata. This oocyte is composed of thick thecal cell layer(TC) composed of many nuclei.

GCL:Granulosa cell layer, LB:Lipid body, MG:Melanin granules, MV:Microvilli, N:Nucleus of the thecal cell, OP:Ooplasm, TC:Thecal cell layer, ZR:Zona radiata.

Fig. 8. Electron microscopic observation of late perinucleolus oocyte.

바와 같이 卵細胞質網(RER)과 골지체(GA)를 가지고 있는 顆粒膜細胞(GCL)와 진하게 염색되는 핵을 가지고 있는 莢膜細胞(TC)로 둘러 싸여져 있으며, 이 2가지 卵胞膜細胞는 基底莫(BM)에 의해서 명확하게 구분된다.

Vitellogenic phase

이 단계에 있는 卵母細胞(약 $>520\mu\text{m}$)는 3월부터 5월까지 비산란시기 부터 산란시기까지의 卵巢이며, Fig. 9, 15에서 같이 핵이 난모세포의 중앙부로 부터 卵胞膜쪽으로 이동한 상태이고, 斷層放射帶(Fig. 11, 12, 13, 14)가 여러 층의 막(Fig. 10, 17, 18, 23, 24)으로 나타나며, 顆粒膜과 莢膜이 잘 발달된 상태를 나타내고 있다. 卵胞膜이 잘 발달됨에 따라 호르몬이 왕성하게 분비되어 卵黃顆粒의 수가 급증하게 되며, 궁극적으로 난세포질의 전체적인 크기가 급증하게 된다.

Stage III (Early maturing oocyte)(Fig. 9, 10, 11, 12, 13, 14): 약 $520\sim 750\mu\text{m}$, 성숙초기 단계의 卵母細胞로서 Stage I, II에 비해서 細胞質에서 핵이 차지하는 면적이 相對적으로 작으나, EPO보다 상당히 增加하여 약 $150\mu\text{m}$ 의 크기를 가지며, 아직까지 핵膜이 명료하게 觀察되었다. Toluidine blue 染色時, EPO 및 LPO보다는 핵과 細胞質이 전반적으로 연한 색깔을 나타내었다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 이 段階부터 yolk vesicle의 수는 서서히 減少하고, 반면에 細胞質內的 과립물질을 가지고 있는 卵黃顆粒의 수가 증가되었으며, 이 段階 初期에 작은 卵黃이 커다란 yolk vesicle사이에 존재하였다.

管狀의 내형질세망이 vesicular 형태의 내형질세망으로 변화될 때 단백질 합성이 개시되는 것으로 사료된다. 이러한 변화는 송사리(medaka)에서 관찰한 Iwamatsu 등(1988)의 결과에서도 언급되었는데, 이러한 과정은 이 단계(EMO)의 난모세포가 2월, 3월에 나타나기 시작하다가 4월, 5월에 급증한 것과 상당히 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 여기서 생성된 yolk vesicle이 Fig. 13에서와 같이 성숙된 난자의 放

射帶(zona radiata) 주변부에 위치하여 수정시 多精子侵入을 방지하는 중요한 역할을 수행하는 表層膜(CA)에 해당된다고 Iwamatsu 등(1988)이 보고한 바 있다. Fig. 14에 나타난 바와 같이 細胞質內에 존재하는 細胞小器管은 주로 세포질 외곽에 위치하며, 특히 미토콘드리아의 수가 일부 관찰되었다. 이는 卵母細胞의 활성이 왕성한 것을 나타내고 있다고 사료된다. 미토콘드리아의 내부에 존재하는 cristae는 아직 명확하지 않은 상태로 확인이 되었으며, Stage I과 마찬가지로 內形質細網이 아직 발달되지 않은 상태이다.

그리고 Fig. 14에 나타난 바와 같이 卵母細胞가 발달할수록 미토콘드리아의 수가 확인되었고, 세포질의 내부를 차지하고 있는 2~4층의 脂肪滴(MB)이 세포질 주변부에 일부 존재하였다. EPO 및 LPO와는 달리 Fig. 10, 11, 12, 13, 14에 나타난 바와 같이 放射帶의 構造가 이 단계에서 확실하게 관찰되었으며, 單層(약 $0.15\mu\text{m}$)에서 여러 층(약 $4\mu\text{m}$)의 膜으로 상당히 발달되었다. 이러한 膜구조를 Tesoriero(1977)는 발달중인 卵母細胞의 난세포질 외측부에 존재하는 여러 층으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles이 난발달이 진행되는 동안에 放射帶로 변하는 微細構造라고 주장하였다. 바로 이 구조가 일본산 송사리(*Oryzias latipes*)의 초기 卵形成時 발달중인 난모세포에서 난세포질 외측부에 존재하는 표면이 여러 층으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles이 궁극적으로 放射帶로 변하는 微細構造라고 주장한 Tesoriero(1977)의 결과와 비교해 볼 때 이 多層의 구조를 이룬 둥근 형태의 vesicles과 유사한 구조라 사료된다.

일반적으로 放射帶에는 顆粒膜으로 돌출된 微細突起(MV)가 상당히 많이 관찰되었고, 顆粒膜細胞에는 상당히 많이 관찰되었고, 顆粒膜細胞에는 상당히 크게 팽창된 內形質細網, 골지체(GA), 脂肪滴(OD), 잘 발달된 핵(N)이 관찰되었다. 그러나 莢膜細胞는 덜 발달된 상태를 나타내고 있다. 그리고 Fig. 14에 나타난 바와 같이 이 단계부터는 외층세포(EC)가 존재하



- Fig. 9. Light microscopic observation of early maturing oocyte. The major diameter of EMO is about $520\sim 750\mu\text{m}$ in size. The major diameter of nucleus is about $150\mu\text{m}$, and existed at the center. Cytoplasm is acidophilic. Ooplasm is composed of numerous yolk vesicles(YV) and yolk granules(YG). Cortical alveoli(CA) are located at the periphery of the outer ooplasm. CA:Cortical alveolus, EMO:Early maturing oocyte, OP:Ooplasm.
- Fig. 10. Electron microscopical observation of early maturing oocyte. Note ooplasmic inclusions such as masses of large cortical alveoli, yolk vesicles(YV), and small yolk granules(YG), distinct banding of zona radiata(ZR). Yolk granules are formed from inner ooplasm to outer. OP:Ooplasm, YG:Yolk granules, YV:Yolk vesicles.
- Fig. 11. Electron microscopical observation of the follicular membrane of early maturing oocyte. A layer of zona radiata is surrounded by a follicular epithelium consisting of flattened granulosa(GCL) tending to become columnar and relatively thick thecal cell layers(TC) which are separated by a basement membrane(BM). BM:Basement membrane, D:Desmosome, ZR:Zona radiata.
- Fig. 12. Magnification of the granulosa cell layer in Fig. 5-A. Microvilli(MV) from the zona radiata(ZR) protrude into granulosa cell layer. The granulosa cells are underdeveloped. D:Desmosome, OP:Ooplasm, ZR:Zona radiata.
- Fig. 13. Electron microscopical observation of early maturing oocyte. Note ooplasmic inclusions such as massive cortical alveoli, yolk vesicles, and yolk granules(YG), distinct banding of zona radiata. The granulosa cells are well developed. CA:Cortical alveolus, YG:Yolk granules.
- Fig. 14. Electron microscopical observation of the cortical ooplasm and follicular membrane of early maturing oocyte. Cortical cytoplasm of the oocyte is electron dense. Note

ooplasmic inclusions such as mitochondria(MT), multivesicular bodies(MB). Two layers of zona radiata(ZR) surrounded by a follicular epithelium containing of the well-developed granulosa cell layer and relatively thin thecal cell layers which are separated by a basement membrane(BM). Note the inclusions of granulosa cell such as masses of short and long mitochondria(MT), oil lipid(OD) and Golgi apparatus (GA). BM:Basement membrane, CA:Cortical alveolus, D:Desmosome, GA:Golgi apparatus, GP:Projection from granulosa cell layer, MT:Mitochondria, MV:Multivesicular bodies, N:Nucleus of granulosa cell, OD:Oil droplet, YG:Yolk granules.

지 않는 것으로 확인되었다.

Stage IV (Late maturing oocyte) (Fig. 15, 16, 17, 18) : 약 850~950 μm 로서 Fig. 15에 나타난 바와 같이 核(germinal vesicle)의 位置가 中心部에서 細胞質 外側 부근으로 이동하는 段階로서 直徑이 약 140 μm 인 核이 放射帶(ZR)의 두께가 식물극보다 두꺼운 상태를 나타내는 동물극쪽으로 이동하였다. Fig. 15에 나타난 바와 같이 yolk vesicle의 數가 현저히 減少한 반면에 난황물질들이 yolk vesicles내에 축적되므로 卵黃顆粒이 상당히 增加하여 세포질 전체를 차지하며, Yoon 等(1991)이 보고한 바와 같이 무지개 송어와는 달리 卵黃顆粒이 癒着된 상태를 나타내지 않았으며, Fig. 15에서와 같이 균일하게 분포되어 있다. H-E 염색시 Fig. 15에서와 같이 細胞質의 染色 狀態가 붉은 색깔을 나타내었다. 이와 같이 卵黃形成이 균일하게 분포되어 있기 때문에 무지개 송어의 난자와 달리 내부를 쉽게 관찰할 수 있도록 투명한 난자를 형성하는 것으로 사료되며, 수정후 나타나는 여러 수정 현상을 쉽게 관찰할 수 있는 것으로 사료된다.

난황 형성이 완성되는 시기에는 지방질의 이동과 축적이 왕성하게 이루어지게 되어 卵胞膜 細胞와 血清속에서 발견된다고 Kim(1991) 및 Yoon 等(1991)이 보고한 바 있다. 그리고 이러한 변화는 대구의 난형성에 관하여 연구한 Kjesbu와 Kryvi(1989)가 난황 형성기 동안에 지방성분의 이동이 증가하여 난포막 세포와 혈장내에서 발견되었다는 결과와도 일치하였다.

Lambert 等(1978)은 무지개 松魚가 卵黃形成期 동안에 많은 卵黃 蛋白質量이 卵母細胞內에 축적되어 卵巢重量의 增加를 야기시킨다고 밝혔다. Fig. 16, 17, 18에 나타난 바와 같이 顆粒膜에는 수많은 核, 대형질 세망(RER), 橋小體(D)를 가지고 있다. Fig. 16에서와 같이 顆粒膜 細胞쪽을 향해서 直徑이 약 1.45 μm 인

微細突起(MV)가 존재하였는데, 이것은 EMO의 미세돌기보다 약 5배 정도 증가한 결과를 나타내고 있다. 그리고 Fig. 25에서 보는 바와 같이 여러 단계중 LMO단계에서 顆粒膜(GCL) 및 放射帶(ZR)가 가장 두껍게 나타났다.

이러한 결과는 Lambert 等(1978)이 무지개 松魚가 卵黃形成과 더불어 卵黃 蛋白質이 卵母細胞內에 增加됨에 따라서 放射帶(zona radiata)는 두꺼워지고 급속하게 增加된다는 報告와 대체적으로 一致하였다. 또한 이러한 변화는 참돔(*Pagrus major*)의 난포세포 중 MN(migratory nucleus stage) 단계까지 卵胞膜 중 顆粒膜의 두께가 증가하다가 이 단계 이후부터 감소하는 추세를 나타낸다고 보고한 Matsuyama 等(1991)의 결과와 거의 유사한 경향을 나타내었고, 莢膜細胞와 基底膜의 두께는 이 단계에 해당되는 secondary yolk stage의 단계에서 감소한다고 보고한 결과와도 유사한 결과를 나타내었다.

그러나 尹 等(1991)이 보고한 무지개 송어의 난포막의 변화와는 다른 추세를 보여 주었다. 이러한 결과는 온수성 어종과 냉수성 어종간의 차이가 있는 것으로 사료된다. 그리고 放射帶의 변화는 EMO 단계에서부터 증가하기 시작하여 RO 단계에서는 약 4.4 μm 정도를 나타내었다. 이러한 변화는 냉수성 어종인 무지개 송어의 두께가 19.8 μm 정도까지 생각해 볼 때 상대적으로 얇게 나타났다. 바로 이러한 생리적인 특징 때문에 난내부(난세포질)를 볼 수 있는 것으로 사료된다. 橋小體(D)를 가지고 있는 과립막 세포는 골지체(GA)가 상당히 발달되는 특징을 나타내었으며, 顆粒膜과 莢膜을 분리시키는 균일한 크기를 갖는 基底膜(BM)이 관찰되었다. 그리고 莢膜세포에는 강하게 염색되는 잘 발달된 核(N)과 內形質細網(RER)이 관찰되었다.

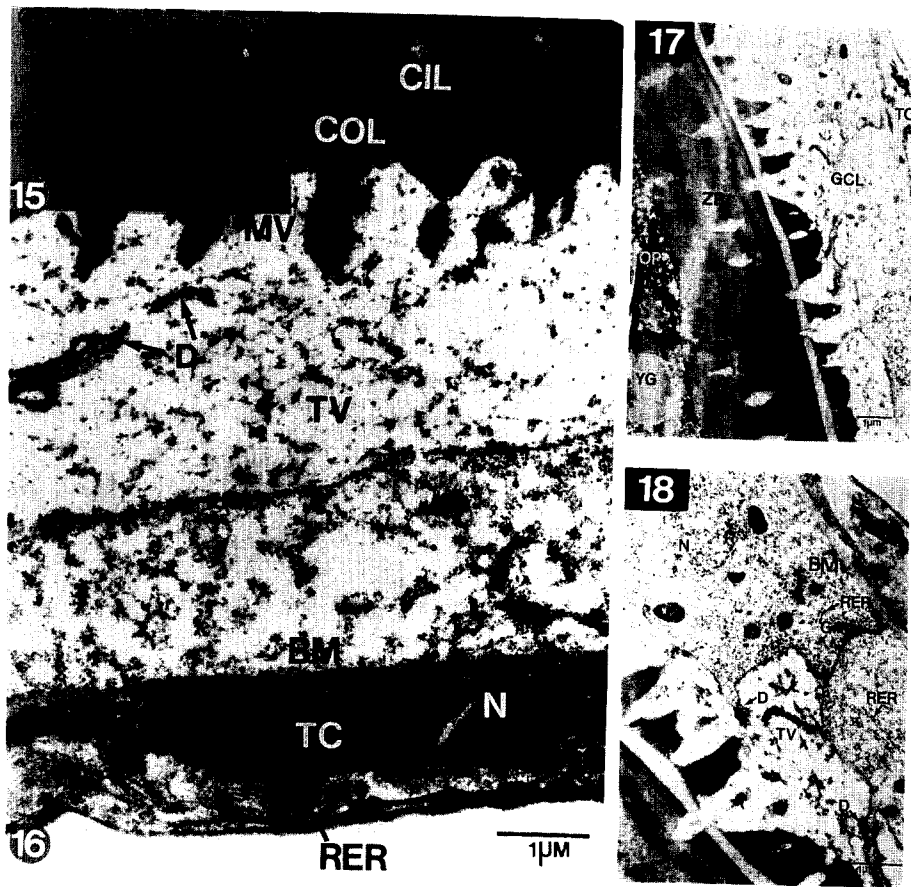


Fig. 15. Light microscopic observation of the late maturing oocyte (Migrating nucleus of oocyte or peri~heral GV stage). The major diameter of LMO is about 850~950 μ m in size. The major diameter of migratory nucleus is about 140 μ m in size. EPO: Early perinucleolus oocyte, LPO: Late perinucleolus oocyte, EMO: Early maturing oocyte, LMO: Late maturing oocyte.

Fig. 16. Electron microscopic observation of the follicular membrane of late maturing oocyte. BM: Basement membrane, CIL: Zona radiata interna, COL: Zona radiata externa, D: Desmosome, LMO: Late maturing oocyte, N: Nucleus of thecal cell, TC: Thecal cell.

Fig. 17. Electron microscopic observation of the follicular membrane of late maturing oocyte. Microvilli (arrow) from the zona radiata (ZR) protrude into granulosa cell layer (GCL). BM: Basement membrane, D: Desmosome, GCL: Granulosa cell layer, OP: ooplasm, TC: Thecal cell layer, ZR: Zona radiata.

Fig. 18. Magnification of the zona radiata of late maturing oocytes in Fig. 6-C. Microvilli (arrow) from the zona radiata protrude into granulosa cells. CIL: Zona radiata interna, COL: Zona radiata externa D: Desmosome, OP: Ooplasm, YG: Yolk granule.

Stage V (Ripe ovum)(Fig. 19, 20, 21, 22, 23, 24) : 약 900~1,200 μm . Fig. 19, 22에서와 같이 직경이 6~16 μm 인 수많은 卵黃顆粒이 卵細胞質內에서 분산된 상태로 존재하며, Fig. 22에서와 같이 작은 脂肪滴(LD)이 細胞質內의 卵黃顆粒과 卵黃顆粒 사이에 一部 存在한다. 이러한 상태는 Yoon 等(1991)이 보고한 난황과립이 치밀하거나 癒着된 상태로 존재하는 냉수성 어종인 무지개 송어와는 달리 내부를 들여다 볼 수 있는 상태를 나타내고 있다. 이러한 변화는 미꾸리와 같이 온수성 어종으로 분류되는 한국산 메기(Son, 1992)에서도 유사한 결과를 나타내었다.

Fig. 19에서와 같이 커다란 핵이 세포질 중앙부로부터 動物極 주변부로 이동하였기 때문에 핵이 보이지 않게 되었고, germinal vesicle breakdown(GVBD)이 發生하여 바로 正常的인 性成熟이 되어 排卵 및 產卵後 受精이 이루어질 수 있는 직전 단계인 감수분열의 metaphase II 段階로 알려져 있다. 이 때 제 1차 極體가 發生되어 동물극 부위에 나타나는 것으로 생각된다.

Fig. 21에서와 같이 난세포질의 외측부에는 난황과립 보다 커다란 크기(7 μm)를 가진 表層胞(CA)가 일련의 層을 이루면서 放射帶(ZR) 가까이에서 관찰되었다. Fig. 20, 23, 24에서와 같이 직경이 약 1 μm 인 細胞突起(↓)가 顆粒膜 세포쪽을 향해서 돌출되어 있는데, 이것은 LMO 단계보다 0.6배 약간 감소된 상태를 나타내고 있다. 이러한 결과는 Lambert 等(1978)과 Yoon 等(1991)이 무지개 松魚가 卵黃形成과 더불어 卵黃蛋白質이 卵母細胞內에 增加되는 시기와 더불어 放射帶도 급속하게 增加되어 두꺼워진다는 것과 다른 추세를 나타내고 있다.

이것은 냉수성 어종과 온수성 어종 사이의 다른 생리적인 차이점으로 사료된다. 顆粒膜에는 핵(N), 내형질세망(RER), 골지체(GA), 橋小體(D)가 잘 발달된 細胞가 존재하며, Fig. 25에 나타난 바와 같이 그 두께는 LMO단계보다 약간 감소된 약 4 μm 를 나타내고 있다.

성숙시기인 5월에 GSI가 18.49%로 급격하게 증가하였는데 이는 溫水性 魚種인 美國產 메기(*Ictalurus punctatus*)의 卵直徑과 GSI의 증가가 가을에 開始되어 產卵時期인 5월까지 繼續적으로 增加 趨勢에 있게

된다고 報告한 Mackenzie 等(1989)의 결과와 일치되는 특징을 나타내었다. 그리고 배란 직후의 卵子는 미성숙단계에서 옅은 노란색을 띠다가 성숙에 가까울수록 초록색을 나타내는 메기와는 달리 무지개 송어와 마찬가지로 투명한 빛의 연노란색을 나타내었다.

IV. 摘 要

1991年 9월부터 1992年 4월까지 채취된 한국산 재래 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*) 卵母細胞의 卵黃形成(vitellogenesis)과 成熟(maturation) 등의 發達 段階와 影響을 미치는 腦下垂體의 微細構造를 理解하기 위하여 光學 및 透過電子顯微鏡(TEM)을 이용하여 本 研究를 實施하였다. 建國大學校 畜產大學 養魚場에서 계절에 따른 수온의 변화속에서 溶存酸素量이 6.2 ± 0.5 ppm이며, pH 7.2 ± 0.1 인 1.5 m³ 크기의 탱크에서 N.R.C. 사양표준에 준한 크립를 飼料를 급여하여 사육중인 체중 15~25g의 암컷 1년생 韓國產 미꾸리 100마리를 供試魚로 사용하였다.

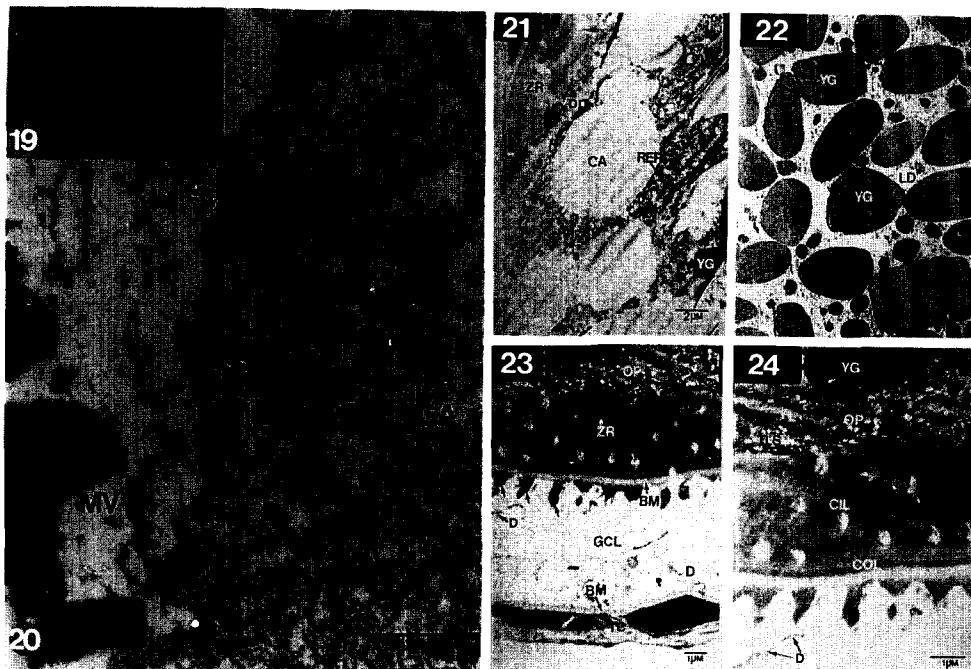
본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

卵母細胞가 발달함에 따라 핵의 크기와 난황과립이 증가하였고, 난황과립이 결정체의 형태로 yolk vesicles 속에 축적되며, 癒着되지 않아서 성숙이 되어도 난 내부를 들여다 볼 수 있을 만큼 투명하였다. 5월에 접근할수록 LMO 및 RO의 수가 증가하였으며, 卵巢는 점차적으로 증대되어 평균 GSI가 최고 18.49%까지 증가되었다.

EMO단계에서 顆粒膜과 莢膜과 같은 卵胞膜이 單層構造로부터 여러 層의 層방형 구조로 변화되었다.

성숙시기에 접어들수록 자연적인 조건하에서 난포막은 卵巢의 卵形成에 影響을 미치는 성호르몬의 발달 및 분비에 크나큰 影響을 미칠 만큼 顆粒膜細胞의 핵, 내형질세망, 골지체 및 橋小體가 잘 발달되었다. 莢膜, 顆粒膜, 放射帶의 3가지 膜이 점점 더 두꺼워지는 특징을 나타내었으며, 卵細胞質은 卵黃顆粒, 골지체, 내형질세망, 리보솜 등의 細胞小器官들의 발달이 왕성하였다. 放射帶에 가까이 커다란 表層胞가 단층을 형성하였다.

난소의 계절에 따른 현미경적 특징은 성성숙 지수와



- Fig. 19. Light microscopic observation of ripe ovum. The major diameter of this oocyte is 900~1,200 μ m. This oocyte has acidophilic cytoplasm. Cytoplasm in this stage is much compacter than that of any other oocytes. This ovum in this stage is fertilized with spermatozoa. RO:Ripe ovum, YG:Yolk granules, YM:Yolk mass.
- Fig. 20. Electron microscophic observation of the granulosa cell of ripe oocyte. Microvilli (MV) from zona radiata protrude into granulosa cell layer. The granulosa cell is composed with nuclei(N), electron dense particles(EDP), Golgi apparatus(GA), and rough endoplasmic reticulum(RER). N:Nucleus, EDP:Electron dense particles, GA:Golgi apparatus, RER:Rough endoplasmic reticulum.
- Fig. 21. Electron microscophic observation of the cortical alveoli(CA). CA:Cortical alveolus, RER:Rough endoplasmic reticulum, YG:Yolk granules.
- Fig. 22. Electron microscophic observation of yolk granules(YG) in RO stage. LD:Lipid droplets, YG:Yolk granules.
- Fig. 23. Electron microscophic observation of the granulosa cells of ripe ovum. Microvilli(arrow) from the zona radiata protrude into granulosa cells. GCL:Granulosa cell layer, OP:Ooplasm, TC:Thecal cell layer, YG:Yolk granule, ZR:Zona radiata.
- Fig. 24. Magnification of granulosa cell layer in Fig. 23. The granulosa cell is electron dense. A basement membrane(BM) clearly separates the granulosa and thecal layers. BM:Base-ment membrane, D:Desmosome, N:Nucleus of granulosa cell, RER:Rough endoplas-mic reticulum.

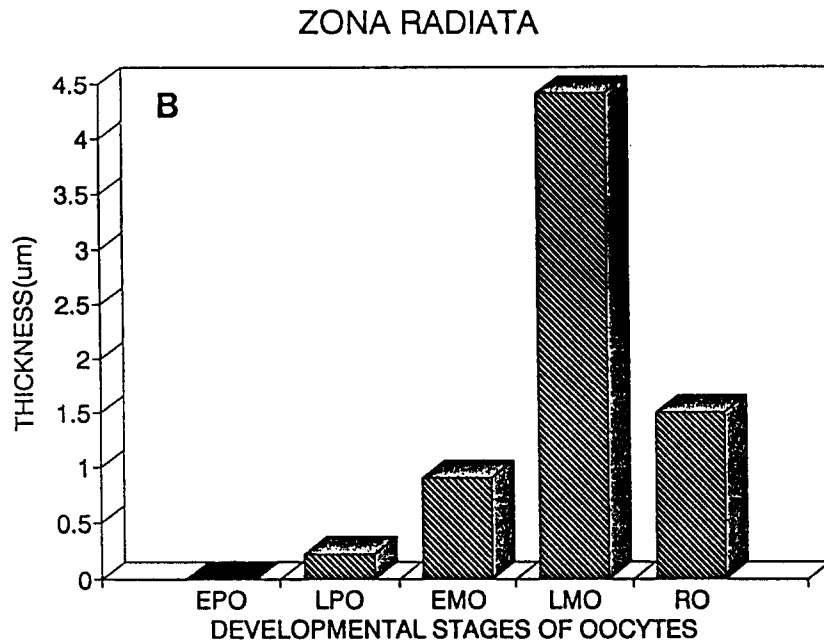
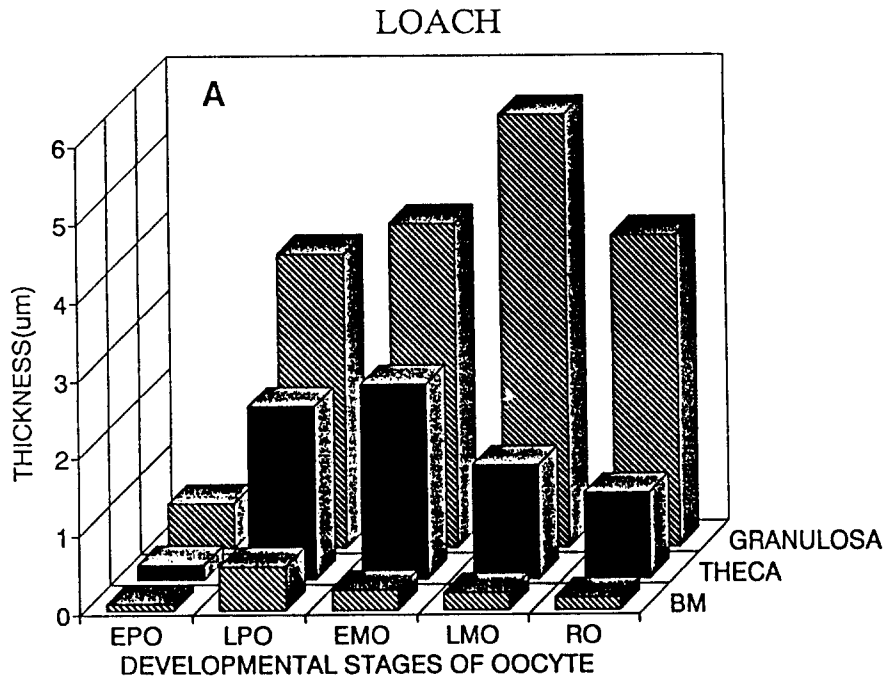


Fig. 25. The changes in thickness of the ovarian follicles and zona radiata with oocyte developmental stage in Korean loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). A: Changes of granulosa cell layer, thecal cell layer and basement membrane. B: Changes of zona radiata. EPO, Early perinucleolus stage; LPO, Late perinucleolus stage; EMO, Early maturing stage; LMO, Late maturing stage; RO, Ripe stage.

외형상의 특징과 아주 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Chung, E. Y., H. B. Kim and T. Y. Lee. 1986. Annual reproductive cycle of the jack-knife clams, *Solen strictus* and *Solen gordonis*. Bulletin of the Korean Fisheries Society, 19(6):563-574.
2. Drance, M. B., M. J. Hollenberg, M. Smith and V. Wylie. 1976. Histological changes in trout testis produced by injections of salmon pituitary gonadotropin. Can. J. Zool. 54, 1285-1293.
3. Guraya, S.S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Follicular wall. Karger, Basel, pp. 110-154.
4. Howell, W. H. 1983. Seasonal changes in ovaries of adult yellow-tail flounder (*Limanda ferruginea*). Fisheries, 81(2):341-355.
5. Iwamatsu, T., T. Ohta, E. Oshima and N. Sakai. 1988. Oogenesis in medaka *Oryzias latipes*-Stages of oocyte development. Zool. Sci. 5. 353-373.
6. Kim, G. Y. 1991. Studies on serum hormone, serum components levels, genotype frequency and histological changes in reproductive cycles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis of doctor degree.
7. Kjesbu, O.S., and H. Kryvi. 1989. Oogenesis in cod, *Gadus morhua* L., studied by light and electron microscopy. J. Fish. Biol. 24, 735-746.
8. Lambert, J. G. D., G.I.C.G.M. Bosman, R. Van Den Hurk, P.G.W.J. Van Oordt. 1978. Annual cycle of plasma oestradiol-17 β in the female trout, *Salmo gairdneri*. Ann. biol. anim. Bioch. Biophys. 18(4), 923-927.
9. Lee, Jae-Hyun, Jong-Man Yon, and Hong-Yang Park. 1989. Histological changes of oocytes development and hormone levels in the Israeli carp (*Cyprinus carpio*) from February to May., Journal of Aquaculture, 2 (1):21-31.
10. MacKenzie, D.S., P. Thomas, and S.M. Farras. 1989. Seasonal changes in thyroid and reproductive steroid hormones in female channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in pond culture. Aquaculture, 78:63-80.
11. Matsuyama, M., Y. Nagahama, and S. Matsuura. 1991. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. Aquaculture, 92:67-82.
12. Nagahama, Y., K. Hirose, G. Young, S. Adachi, K. Suzuki and B. Tamaoki. 1983. Relative *in vitro* effectiveness of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*), and goldfish (*Carassius auratus*). General and Comparative Endocrinology, 51:15-23.
13. Son, Chae-Dong. 1992. Ultrastructural Changes of Oocyte Developmental Stage in Korean Catfish, *Silurus asotus*. Master's thesis, p.50. Kon-Kuk University.
14. Tesoriero, J.V. 1977. Formation of the chorion (*Zona Pellucida*) in the teleost, *Oryzias latipes*. < I. Morphology and Early Oogenesis > Journal of Ultrastructure Research, 59:282-291.
15. Yoon, J.M., S.M. Lee, and H.Y. Park. 1987. Induced ovulation and histological changes of the oocytes according to hCG and trout pituitary extract in the Korean loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Korean Journal of Animal Reproduction, 11(3):170-180.

16. Yoon, J.M., B.C. Kim and H.Y. Park. 1991. Breeding and Reproductive Studies on Korean Loach. II. Histological changes in immature and mature stages in korean native loach. Korean J. Anim. Sci., 33(8), 552-561.
17. Yoon, Jong-Man, Young-Kon Kim, and Hong-Yang Park. 1991. Studies on genetics and breeding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. VIII. Ultrastructural changes of oocytes in reproductive cycles. Korean. J. Anim. Reprod. 15(3). 207-220.