

發達 段階에 따른 韓國産 메기(*Silurus asotus*)

卵母細胞의 微細構造的 變化

윤종만 · 김계웅* · 신호철** · 장계남*** · 류동석**** · 박홍양

건국대학교 동물자원연구센터

Ultrastructural Changes of Oocyte in Korean Catfish, *Silurus asotus*

Yoon, Jong-Man, Gye-Woong Kim*, Ho-Chul Shin**, Kye-Nam Chang***

Dong-Suck Reu**** and Hong-Yang Park

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the histomorphological changes and the electrophoretic patterns of egg components, obtained from 100 of 1-year-old female catfish(*Silurus asotus*). Especially, the light microscopic and ultrastructural changes of ooplasm and follicular membranes of oocytes, were observed by light and transmission electron microscope. All data were collected from October in 1992 to May in 1993. The size of the nucleoli and number of the yolk granules increased as the oocyte grew. Yolk granules were deposited in the oocyte as fluid. Due to the presence of large early and late maturing oocytes, their ovaries were large, transparent, granular, and greenish in color. As the percentages of fish in LMO and RO stage increased from March to April, mean of GSI values(19.95%) increased. Follicle cells such as granulosa cell and thecal cell change a squamous into cuboid shape in LPO and EMO stage. Processes, microvilli, from the granulosa cells and from the oocyte grow and make contact with each other in the pore canals of the zona radiata during vitellogenesis, but are withdrawn as the zona radiata becomes more compact and devoid of pore canals during oocyte maturation. The electrophoretic pattern of major band in mature stage was much thicker(21k, 24k, 32k, 45k, 67~110k, 170k dalton) than that in previtellogenic phase.

Key words: catfish, oocytes, follicular membranes, zona radiata, transmission electron microscope, electrophoretic pattern

I. 서 론

전 세계적으로 메기의 종류는 대단히 많다. 양식분야 면에서 본다면 미국의 차넬 메기(*Ictalurus punctatus*) 양식이 가장 큰 규모를 차지하고 있고, 그밖에 태국을 비롯한 동남 아시아에서의 클라리어스 메기(*Clarias* spp.)와 팡가시어스 메기(*Pangasius* spp.),

그리고 동유럽에서의 글라니스 메기(*Silurus glanis*) 등의 양식도 시도되어 왔다. 한국에서도 최근 들어 급증하기 시작한 식용 메기의 수요를 충족하기 위하여, 온수성 담수 어종인 한국산 메기(*Silurus asotus*)와 수입종 메기의 양식이 활발히 시도되고 있다. 그러나 국내에서는 한국인의 고유한 식소비 형태 및 특이한 기호성으로 인하여, 식용 메기의 대량 생산 및 공급을 목적으로 하는 번식과 양식이 용이한 이들 외국산 메

* : 공주대학교 축산학과

*** : 국립수산진흥원 서해수산연구소

** : 한국화학연구소 안전성연구센터

**** : 청주대학교 생물학과

기들의 도입과 보급이 한국산 메기의 수요를 대체하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 한국산 메기의 공급 부족 문제를 해결하기 위해서는 낙후되어 있는 한국산 재래종 메기의 繁殖 및 대량생산 방법에 관한 연구와 노력이 필요하다고 하겠다.

담수어의 생체내 여러가지 생리적 변화는 가장 큰 비중을 가지는 수온, 광주기와 같은 계절적 요인, 사료, 수질, 염분농도, 移住, 수송 등과 같은 환경적 요인에 의해서 영향을 받으며, 생체내 변화 중에서 卵黃形成, 卵母細胞의 成熟, 排卵 및 成長率 등의 경계형질은 매우 중대한 영향을 받는다 (Peter 등, 1979; Lee 등, 1989; Kim 1991). 담수어 및 해산어에 대한 난모세포의 細胞學的 特徵에 관한 연구가 외국의 경우 Tesoriero(1977), Lambert 등(1978), Mackenzie 등(1989)에 의해서 이루어져 왔다.

국내에서는 물고기의 계절적 변화에 따른 性腺 발달에 관한 연구 보고 중 이스라엘 잉어(Lee 등, 1989), 무지개 송어(Yoon 등, 1991; Yoon 등, 1993), 미꾸리(Yoon 등, 1991; Yoon 등, 1993), 貝類(Chung 등, 1986)의 卵母細胞에 대한 광학현미경 및 전자현미경적 보고가 있다.

따라서 본 연구는 이를 토대로 해서 한국산 메기의 생활주기중 卵母細胞의 형성 및 발달 단계별 조직학적 변화를 光學 및 電子顯微鏡的 관찰에 의해서 고찰하였으며, 궁극적으로 한국산 메기 암컷의 繁殖效率 개선 및 遺傳 育種學的 연구에 필요한 기초자료를 얻기 위해서 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼養管理

본 연구는 1992년 10월부터 1993년 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 1.5m³크기인 탱크에서 N.R.C. 사양표준에 준한 pellet 배합사료를 급여하여 사육중인 체중 250~300g의 한국산 메기(*Silurus asotus*) 암컷 2년생 50마리를 供試魚로 사용하였다.

2. 光學(LM) 및 透過電子顯微鏡的 方法(TEM)

各 組織片을 pH 7.3인 0.1M phosphate buffer가 包含된 3% glutaraldehyde 용액에 固定시키고, 2시간 동안 1% osmium 용액으로 後固定시키며, 1시간 동안 여러가지 濃度의 ethanol 용액으로 계속해서 탈수시킨다. Epon 812로 包埋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 染色시킨 다음, 電子顯微鏡으로 70 kV의 전압하에서 檢鏡한다. 특히, 卵母細胞內的 染色質의 濃度, yolk vesicles 및 卵黃顆粒, 脂肪滴, 核, 核小體의 크기 및 두께를 측정하였고, 顆粒膜, 莢膜의 직경을 측정하였다. 그리고 난소조직의 卵形成의 각 단계는 앞에서 언급된 난모세포의 세포학적 특징을 기초로 하여 early-perinucleolus, late-perinucleolus, early-maturing, late-maturing, ripe oocyte의 5단계로 구분시켰다.

3. 圖表處理

각 단계의 卵母細胞의 莢膜, 顆粒膜, 基底膜, zona radiata의 直徑을 측정후 Quattro Pro 컴퓨터 프로그램을 利用하여 각각의 그래프를 그림으로 표시하였다.

4. 卵母細胞의 電氣泳動像

季節마다 채취한 각 단계의 卵母細胞를 -196°C 의 液體窒素 탱크에 보관한 후 Scobbie와 Mackie (1990)의 방법을 변형시킨 Fig. 1, 2와 같은 방법에 의해서 메기 卵母細胞의 내용물을 분리 抽出시켰다.

III. 結果 및 考察

Fig. 3-A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L은 광학현미경(50nm의 超薄片)을 통해 본 메기 암컷의 각 卵母細胞이고, Fig. 4-A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N은 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, 核小體, 卵細胞質이며, Fig. 6-A, B는 미성숙 개체의 腦下垂體의 미세구조이다. 發達 段階에 따른 각 細胞들의 發達狀態 및 細胞遺傳學的 特徵은 다음과 같다.

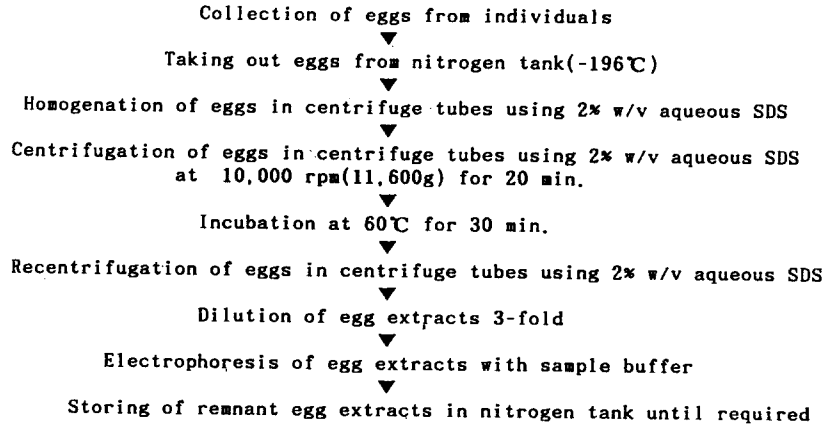


Fig. 1. Extraction process from various sizes of the eggs in Korean catfish.

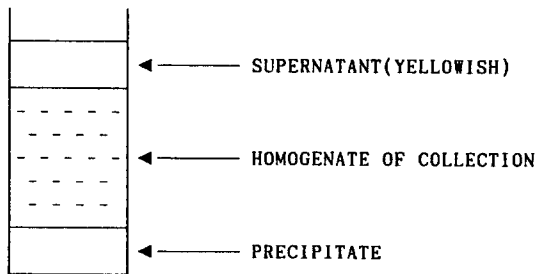


Fig. 2. Diagram of extraction from various sizes of the eggs in Korean catfish.

1. Previtellogenic phase

이 단계에 있는 卵母細胞(약 $>90\mu\text{m}$)는 10월부터 2월까지 Fig. 3-A에서와 같이 비산란시기에 있는 卵巢의 대부분을 차지하며, Fig. 3-B에서와 같이 핵이 난모세포의 일부분을 차지하나 시간이 흐를수록 Fig. 3-C, D와 Fig. 4-B, C에서와 같이 卵母細胞의 대부분을 차지하고 있다. 일반적으로 처음 단계에서는 絨毛膜의 형성이 안된 상태를 나타내나, 이 단계 末期에 絨毛膜이 單層으로 나타나는 단계로서 Iwamatsu 등(1988)은 이 단계를 chromatin-thread perinucleolus이라고 불렀다.

Stage I(Early perinucleolus oocyte)(Fig. 3-A,

B; Fig. 4-A, B, C, D): 약 $90\sim 120\mu\text{m}$, 핵小體가 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. 4-A에서와 같이 $20\sim 22\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 핵과 그 내부에 강한 好鹽基性을 띠고 있는 $3\sim 4\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 둥근 형태의 핵小體가 존재한다. 細胞質은 Fig. 4-C에서와 같이 toluidine blue 染色時, 2개의 層으로 구분되는데, 핵膜에 가까운 부분은 진한 색(DO)을 띠고, 바깥부분은 연한 색깔(LO)을 나타내었다. 이 시기에 존재하는 卵母細胞는 Fig. 4-D에서와 같이 세포질내에 미토콘드리아(MT)가 확인되었으나, 內形質細網(RER)의 확인은 어려웠다. 실 같은 染色質(chromatin)과 커다란 핵小體(nucleoli) 그리고 짧은 길이의 lampbrush 染色體를 가지고 있는 핵이 둥근 원형의 형태로 존재한다. 2~4層의 커다란 yolk vesicles과 脂肪滴(LB)이 세포질 주변부에 일부 존재하고, 여러 層으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles(Fig. 4-D의 화살머리)이 관찰되었다. Tesoriero(1977)는 이 구조가 일본산 송사리(*Oryzias latipes*)의 초기 卵形成時 발달중에 궁극적으로 絨毛膜으로 변하는 微細構造라고 주장하였다. 또한 이 단계의 卵母細胞는 Fig. 4-A, B에서와 같이 여러 層의 外層膜(EC)과 莢膜(TC) 및 顆粒膜(GCL)으로 둘러싸여져 있으며, 이 2가지 난포막 세포는 기저막(BM)으로 분리되어져 있다. 그러나 絨毛膜(zona radiata)은 존재하지 않았다. Fig. 4-A, B에 나타난 바와 같이 細胞

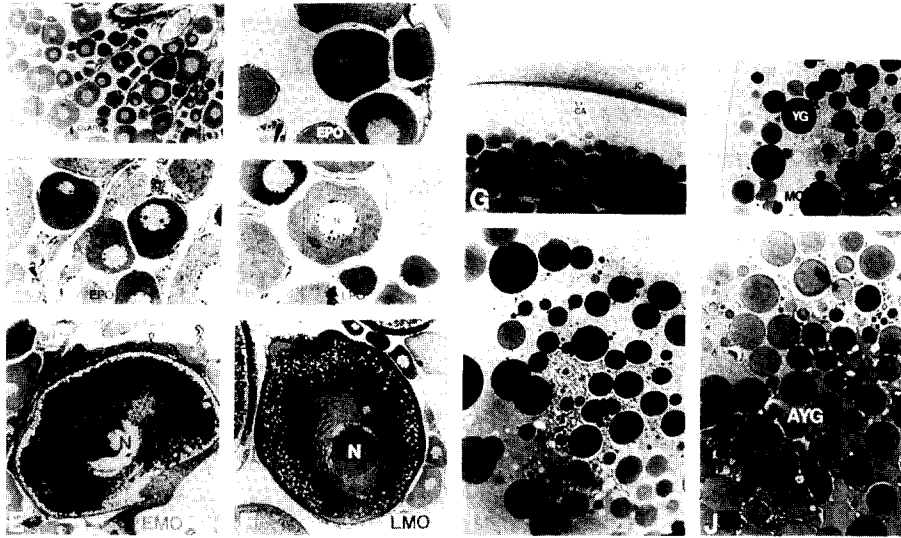


Fig. 3. Histomorphology of the ovary and oocyte development of Korean native catfish, *Silurus asotus*, by light-microscoph, 2.5% glutaraldehyde soln-fixed, Epoxy resin-embedded, and toluidine blue-stained preparations.

- A. 100 \times . Ovary filled with a large number of oocytes in early and late perinucleolus stage in December. There were formed with many ovigerous folds.
- B.C. 400 \times . Early perinucleolus stage. This oocyte(about 50~60 μ m in diameter) is observed in ovary during the immature times. The major diameter of nucleus is about 20~22 μ m. The nuclear size of this oocytes is relatively larger than that of other oocytes in mature times. Cytoplasm is basophilic. The zone which two arrows indicate, shows that cytoplasm divided into two concentric zones; the inner slightly basophilic and less dense (light ooplasm) and the outer deeply basophilic and dense(dark ooplasm).
- D. 400 \times . Late perinucleolus stage. The major diameter of LPO is about 60~80 μ m in size. The major diameter of the nucleus is about 25 μ m. Cytoplasm was slightly basophilic. LPO: Late perinucleolus oocyte, N:Nucleus.
- E. 100 \times . Early maturing stage. The major diameter of EMO is about 80~150 μ m in size. Cytoplasm containing yolk granules was basophilic. The nucleus(about 210 μ m in major diameter) was existed at the center. Yolk granules is formed from inner cytoplasm to outer. EMO: Early maturing oocyte, N: Nucleus.
- F. 100 \times . Late maturing stage(Migrating nucleus of late maturing oocyte or peripheral GV stage). The major diameter of LMO is about 1,750 μ m in size. The major diameter of migratory nucleus is about 220 μ m in size. LMO: Late maturing oocyte. N: Nucleus.
- G.H. 400 \times . Maturing stage(ovulated oocyte). Yolk granules have coalesced to form yolk masses. The jelly coating is thicker. A large number of cortical alveoli are located at the periphery of vitelline membrane. The yolk granules have its affinity for toluidine blue. The major diameter of RO is about 1,200 μ m in size. YM: Yolk masses.
- I.J. 400 \times . Cytoplasm of maturing oocyte. Many yolk granules in outer cytoplasm have scattered(I). A large number of yolk located in inner cytoplasm have coalesced to form yolk masses. The major diameter of yolk granules is about 36 μ m in size. AYM: Aggregated yolk granules.

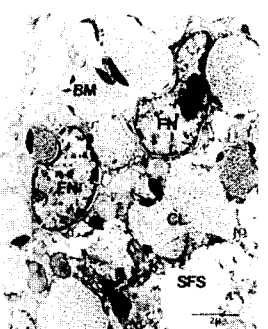
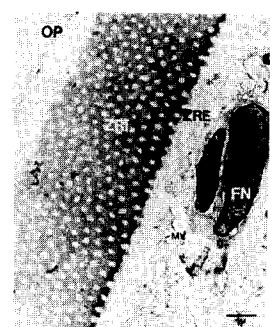
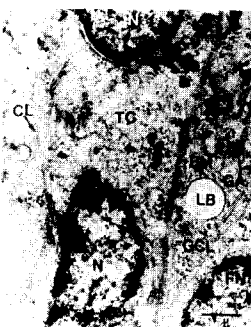
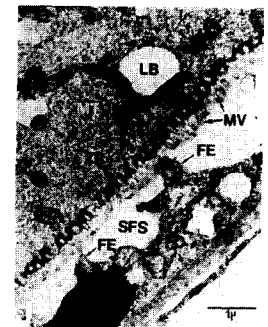
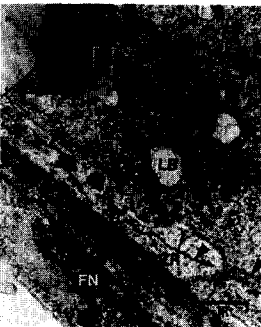
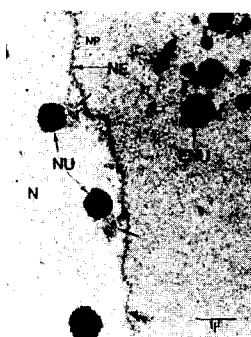
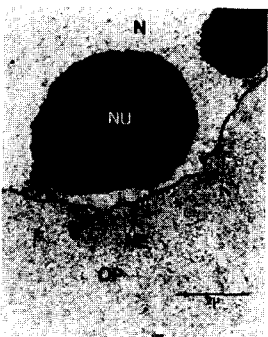
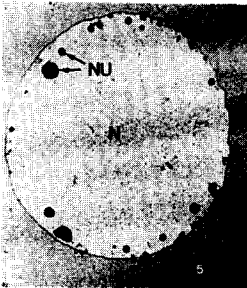
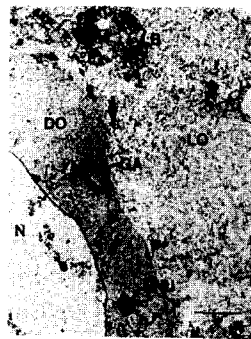
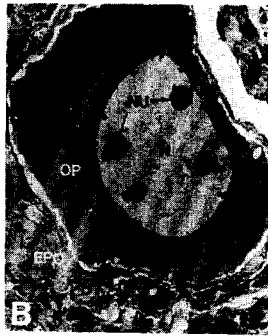
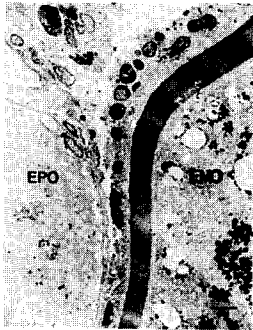


Fig. 4. Histomorphology of the ooplasm, follicular membrane of oocytes in Korean native catfish, *Silurus asotus*, by transmission electron microscophs(TEM), 2.5% glutaraldehyde soln-fixed, Epoxy resin-embedded, and toluidine blue-stained preparations.

- A. 2,300×. Ovary showing early perinucleolus oocyte and early maturing oocyte. This ovary is observed in ovary during the immature times(in February). Early perinucleolus oocyte (about 50~60 μm in diameter) surrounded by the thin epithelial cell layer. Early maturing oocyte is surrounded by the thick follicular layers. EPO: Early perinucleolus oocyte, EMO: Early maturing oocyte.
- B. 2,800×. Early perinucleolus stage. Oocyte(about 50~60μm in diameter) showing a few large dense nucleoli. Note outermost ooplasmic inclusions such as multivesicular bodies (MVB) located at the peripheral region of oocyte. This oocyte is observed in ovary during the immature times (in December). EPO: Early perinucleolus oocyte, MVB: Multivesicular bodies.
- C. 6,900×. Late perinucleolus stage. Section of inner and outermost ooplasm containing Stage II oocytes. Cortical cytoplasm of the oocyte is electron dense. The zone which two arrows indicate, shows that cytoplasm divided into two concentric zones; the inner slightly basophilic and less dense(light ooplasm) and the outer deeply basophilic and dense(dark ooplasm). A few of extruded nucleolus are showed in the peripheral region of nucleus. Note ooplasmic inclusions such as Golgi apparatus, lipid bodies. DO: Dark ooplasm, ENU: Extruded nucleolus, GA: Golgi apparatus, LB: Lipid bodies, LO: Light ooplasm.
- D. 5,800×. Section of ooplasm containing Stage II oocyte composed of a few layers of thick epithelial cell layer(EC) composed of many nuclei. Note ooplasmic inclusions such as masses of short and long mitochondria and lipid. A basement membrane(BM) clearly separates the granulosa and thecal layers. Note the dense cored vesicle(▲) in the cytoplasm of the oocyte. The numerous electron-lucent vesicle(△) in the peripheral cytoplasm adjacent to follicle cell. EC: Epithelial cell, EPO: Early perinucleolus oocyte, FN: Follicular cell nucleus, OP: Ooplasm.
- E. 3,500×. Section of nucleus containing Stage II oocyte composed a few of small and large nucleoli. The nucleus envelope is sharply divided into nucleus and ooplasm. NU: Nucleolus, N:Nuclei.
- F. 13,800×. Application of nucleolus(E) in Stage II.
- G. 18,000×. Section of nucleus and ooplasm containing Stage II. There are a few of extruded nucleoli in the inner ooplasm. The nucleus membrane is divided into two layers. The nuclear pores is observed in nucleus envelope. ENU: Extruded nucleoli, N: Nucleus, NE: Nucleus envelope, NU: Nucleus.
- H. 23,000×. Cortical ooplasm of LPO. Note ooplasmic inclusions such as masses of short and long mitochondria and lipid bodies. Subfollicular space is located between the follicle cell and oocyte. Microvilli(MV) from the oocyte and granulosa cells protrude into the zona radiata. LAB: Lipid bodies, HX: Hexa bodies, MT: Mitochondria, SFS: Subfollicular space.
- I. 23,000×. Cortical ooplasm of LPO. Note ooplasmic inclusions such as masses of short and long mitochondria and lipid bodies. A basement membrane(BM) clearly separates the granulosa and thecal layers. LB: Lipid bodies, MT: Mitochondria, ZR: Zona radiata, FN: Follicular nucleus.
- J. 23,000×. Cortical ooplasm of EMO. Note ooplasmic inclusions such as masses of short and long mitochondria and lipid bodies, distinct banding of zona radiata(ZR). The oocyte consisted in a few layers of follicular cells and thin layer of epithelial cells. A large number

of long multivilli are observed in zona radiata. Microvilli(MV) from the oocyte and granulosa cells protrude into the zona radiata. FC: Follicular cell, FE: Follicular, LB: Lipid bodies, MT: Mitochondria, MV: Multivilli, SFS: Subfollicular space, ZR: Zona radiata.

- K. 34,500×. Section of ovarian follicles containing Stage IV oocyte. There existed a large quantity of granulosa cells(GCL) and thecal cells(TC). Note ovarian follicles such as Golgi apparatus(GA) and massive collagen fibres(CL). Zona radiata surrounded by a follicular epithelium consisting of flattened granulosa(GCL) tending to become columnar and relative thick thecal cell layers (TC) which are separated by a basement membrane(BM). The cortical cytoplasm of the oocyte is electron dense. BM: Basement membrane, CL: Collagen fibers, FN: Follicular nucleus, GCL: Granulosa cell layer, GA: Golgi apparatus, LB: Lipid bodies, N: Nucleus, TC: Thecal cell layer.
- L. 13,800×. A part of the zona radiata at Stage IV which micro-projections insert into ooplasm. Zona radiata surrounded by a follicular epithelium consisting of granulosa(GCL) composed by nuclei. The cortical cytoplasm of the oocyte is electron dense. FN: Follicular nucleus, MV: Microvilli, OP: Ooplasm, ZRE: External zona radiata, ZRI: Internal zona radiata.
- M, N, 5,800×, 11,000×. Section of outermost ooplasm containing Stage III oocyte. Note ooplasmic inclusions such as massive cortical alveoli(CA) and yolk vesicles, distinct banding of zona radiata (ZR). Zona radiata surrounded by follicular epithelium consisting of round granulosa(GCL) composed by nuclei. There existed a large quantity of granulosa cells in this stage. BM: Basement membrane, CA: Cortical alveoli, FN: Follicular nucleus, MV: Microvilli, OP: Ooplasm, SFS: Subfollicular space, ZRE: External zona radiata, ZRI: Internal zona radiata.

質 주변부에는 상당한 數의 multivesicular bodies (MVB)를 가지고 있다. 이 단계에서는 아직까지 zona radiata 가 발달되지 않았고, 顆粒膜의 구조는 명확하게 관찰되지 않았다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 EPO 단계에서 卵黃蛋白質의 電氣泳動像이 성숙 단계의 난자와 비교해 볼 때 전반적으로 그 두께가 희미하게 나타났다. 특히 21k, 24k, 32k, 45k, 67~110k, 170k dalton 에서 상대적으로 희미하게 나타났는데, 이러한 변화는 卵黃蛋白質이 나타나지 않았다는 것을 보여준다.

Stage II (Late perinucleolus oocyte) (Fig. 3-D: Fig. 4-E, F, G, H, I): 약 140~180 μm, 核小體가 核 주변부에 위치해 있는 末期 段階로서 약 60 μm의 크기를 갖는 核의 形態는 early perinucleolus oocytes 보다 둥글고, Fig. 3-D에서와 같이 toluidine blue 染色時, 核은 연한 밝은 색을 띄며, 染色質은 진한 색깔을 나타내었으나, EPO 보다는 밝은 색을 띄었다. Fig. 3-C와 Fig. 4-E, F에서와 같이 核膜과 細胞質 사이의 區分이 명확하게 나타나 있다. Fig. 4-E, F에서와 같이 실 같은 염색질(chromatin)과 크고 작은

형태의 커다란 核小體(nucleoli)를 가진 둥근 형태의 核이 존재한다는 것이 가장 두드러진 특징 중의 하나이다. Fig. 4-F, G, H, I에서와 같이 卵黃顆粒의 發達이 아직 미흡한 대신에 Stage I에서와 마찬가지로 여러層的 yolk vesicle이 상당히 增加된 狀態로서 이러한 상태를 Iwamatsu 等(1988)은 卵黃 形成期(yolk formation stage)라 불렀고, Fig. 3-D에서와 같이 細胞質 주변부에 위치하며, 卵黃 前驅物質의 활발한 融合이 이루어지는 단계이다. 여기서 생성된 yolk vesicle이 Fig. 3-G, H, I에서와 같이 성숙된 난자의 絨毛膜(zona radiata) 주변부에 위치하여 수정시 多精子侵入을 방지하는 중요한 역할을 수행하는 表層胞(CA)에 해당된다고 Iwamatsu 等(1988)이 보고한 바 있다. Fig. 4-H에 나타난 바와 같이 細胞質內에 존재하는 細胞小器官은 주로 세포질 외곽에 위치하며, 특히 미토콘드리아의 수가 상당히 많이 관찰되었다. 이는 卵母細胞의 활성이 旺盛한 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 상태

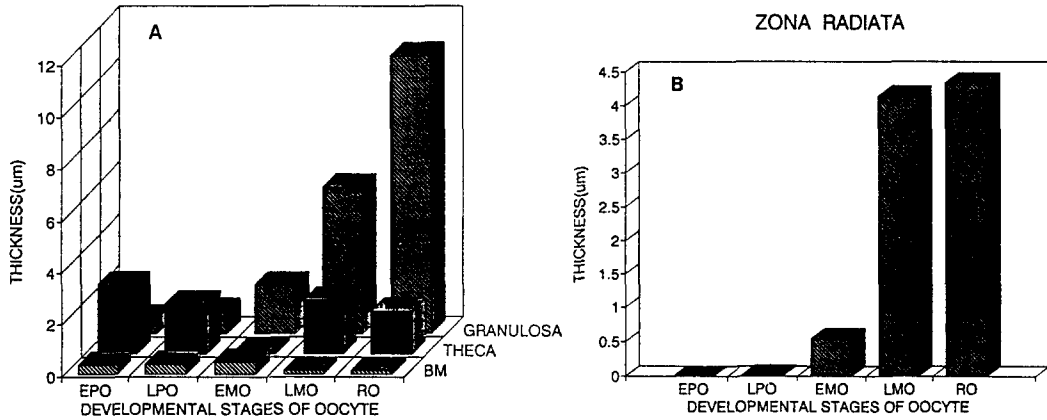


Fig. 5. Changes in thickness of the ovarian follicles and zona radiata with oocyte developmental stage in Korean native catfish. A : Changes in granulosa cell layer, thecal cell layer and basement membrane. B : Changes in zona radiata. EPO, Early perinucleolus stage ; LPO, Late perinucleolus stage ; EMO, Early maturing stage ; LMO, Late maturing stage; RO, Ripe stage.

이다. 그리고 Fig. 4-I에 나타난 바와 같이 卵母細胞가 발달할수록 內形質細網, 골지체, 미토콘드리아의 數가 점점 증가하고, 세포질의 내부를 차지하고 있는 2~4層的 커다란 yolk vesicles과 脂肪滴(LB)이 세포질 주변부에 일부 존재하였다. 그러나 Stage I과는 달리 絨毛膜의 構造가 橋小體 (Fig. 4-H, I의 화살머리)의 형태로 이 단계에서 확실하게 관찰되었다. 바로 이 구조가 일본산 송사리(*Oryzias latipes*)의 초기 卵形成時 발달중인 난모세포에서 난세포질 외층부에 존재하는 표면이 여러 층으로 구성된 등근 형태의 치밀한 vesicles 이 궁극적으로 융모막으로 변하는 微細構造라고 주장한 Tesoriero(1977)의 결과와 비교해 볼 때 이 多層의 구조를 이룬 등근 형태의 vesicles 과 유사한 구조라 사료된다. 卵細胞質 및 顆粒膜에서 돌출된 잘 발달된 微細突起(MV)가 서로 접촉한 상태로 관찰되었다. 이 단계의 卵母細胞는 Fig. 4-H, I에서와 같이 顆粒膜 細胞(GCL)와 莢膜 細胞(TC)로 둘러 싸여져 있고, Fig. 4-H, I에서와 같이 이 2가지 卵胞膜 細胞는 基底膜(BM)에 의해서 명확하게 구분된다. 卵胞膜 細胞는 적은 수의 미토콘드리아, 미발달된 內形質細網과 核小體를 지닌 核을 가지고 있다. 그러나 이 시기에는 아직도 외층세포(EC)가 존재하며, 점차적으로 그 두께가 얇게 나타났다.

2. Vitellogenic phase

Stage III (Early maturing oocyte)(Fig. 3-E; Fig. 4-J): 약 790~840 μm , 성숙초기 단계의 卵母細胞로서 Stage I, II에 비해서 細胞質에서 核이 차지하는 면적이 相對적으로 작으나, EPO 보다 상당히 증가하여 약 210 μm 의 크기를 가지며, 아직까지 核膜이 명료하게 觀察되었다. Toluidine blue 染色時, EPO 및 LPO보다는 核과 細胞質이 전반적으로 진한 색깔을 나타내었다. Fig. 3-E에 나타난 바와 같이 이 段階부터 yolk vesicle의 數는 서서히 減少하고, 반면에 細胞質內의 과립물질을 가지고 있는 卵黃顆粒의 數가 증가되었다. 이 段階 初期에 작은 卵黃이 커다란 yolk vesicle 사이에 존재하다가 末期에 癒着狀態로 되었다. 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 Fig. 4-A에서와 같이 이 단계(EMO)의 난모세포가 2월, 3월에 나타나기 시작하다가 4월, 5월에 급증한 것과 상당히 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 난황과립의 발생 시기는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 卵黃蛋白質의 電氣泳動像이 21k, 24k, 32k,

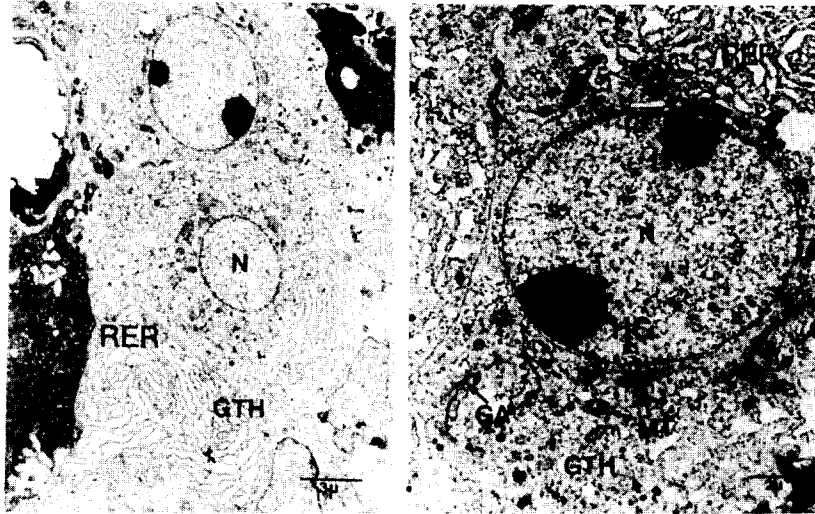


Fig. 6. Histomorphology of the pituitary gland in Korean native catfish, *Silurus asotus*, by transmission electron microscophs(TEM), 2.5% glutaraldehyde soln-fixed, Epoxy resin-embedded, and toluidine blue-stained preparations.

- A. 5,800 \times . Details of gonadotropic cells(GTH) of catfish caught in December, showing a large quantity of secretory vesicles(SV) and round endopalsmic reticulum(RER), and nucleus(N). GTH :Gonadotroph, N:Nucleus. RER:Round endoplasmic reticulum.**
- B. 13,800 \times . Magnification of gonadotroph(GTH) in gonadotroph (A). Note Golgi apparatus(GA) and round endoplasmic reticulum (RER) showing a few of secretory vesicles (SV) and massive mitochondria (MT). GA:Golgi apparatus, HC:Heterochromatic nucleolus, MT:6Mitochondria.**

45k, 67~110k dalton 으로 부터 170 k dalton 사이에 나타났는데, 이러한 변화를 통해서 볼 때 난황단백질의 출현 시기가 이 단계로 생각된다. 이러한 결과는 메기의 난자를 연구한 Iwamatsu 등(1988)이 98~116 k dalton에 해당되는 난황단백질이 이 단계에 나타났다고 보고한 결과와 거의 일치하였고, 그 크기에 있어서도 거의 유사하게 나타났다. 그러나 그 두께는 성숙시기의 난황단백질보다는 상대적으로 작게 나타났다. Fig. 4J와 Fig. 5-B에 나타난 바와 같이放射帶가 0.55 μ m로서 상당히 얇게 나타나기 시작하였는데, 이러한 膜구조를 Tesoriero(1977)는 발달중인 卵母細胞의 난세포질 외측부에 존재하는 여러 층으로 구성된 근 형태의 치밀한 vesicles이 난발달이 진행되는 동안에 絨毛膜으로 변하는 微細構造라고 주장하였다. 卵細胞質에서 돌출된 微細突起(MV)가 상당히 많이

관찰되었고, 顆粒膜 細胞에는 상당히 크게 팽창된 內形質細網이 일부 관찰되었다. 그리고 Fig. 4-J에 나타난 바와 같이 이 단계부터는 외층세포(EC)가 존재하지 않는 것으로 확인되었다. Fig. 5-A에 나타난 바와 같이 이러한 卵胞膜에서 莢膜의 두께가 상대적으로 얇아지는 대신 顆粒膜 細胞層의 두께가 상당히 증가하였고, 基底膜의 두께는 서서히 얇아지는 경향을 나타내었다. 이러한 변화는 참돔(*Pagrus major*)의 난모세포 중 MN(migratory nucleus stage) 단계까지 卵胞膜 중 顆粒膜의 두께가 증가하다가 이 단계 이후부터 감소하는 추세를 나타낸다고 보고한 Matsuyama 등(1991)의 결과와 비교해 보았을 때 다른 경향을 나타내었다. 그러나 莢膜細胞와 基底膜의 두께는 이 단계에 해당되는 primary yolk stage의 단계에서 감소한다고 보고한 결과와는 유사한 결과를 나타내었다. 그

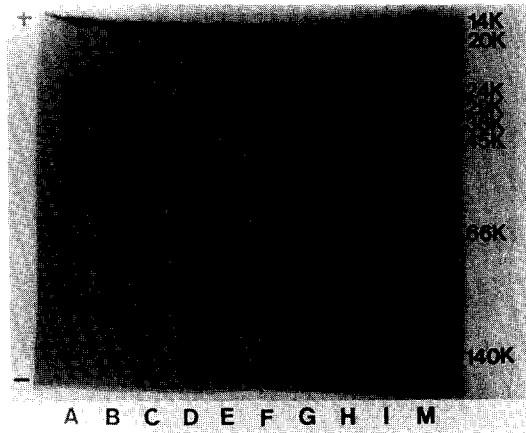


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of extracts from various oocytes stages in female Korean catfish. A, B, C: EPO, D, E, F: EMO, G, H, I: RIPE stage.

그러나 尹等(1991)이 보고한 무지개 송어의 난포막의 변화와는 다른 추세를 보여주었다. 이러한 결과는 온수성 어종과 냉수성 어종간의 차이가 있는 것으로 사료된다. 그리고 Fig. 5-B 에 나타난 바와 같이 放射帶의 변화는 EMO 단계에서 부터 증가하기 시작하여 RO 단계에서는 약 4.3 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.

Stage IV (Late maturing oocyte) (Fig. 3-F; Fig. 4-K, L): 약 820~850 μm , 核(germinal vesicle)의 위치가 中心部에서 細胞質 外側 부근으로 이동하는 段階로서 직경이 약 180 μm 인 核이 絨毛膜(ZR)의 두께가 식물극보다 두꺼운 상태를 나타내는 동물극쪽으로 이동하였다. Fig. 3-G, H, I, J에 나타난 바와 같이 yolk vesicle의 수가 현저히 減少한 반면에 난황물질들이 yolk vesicles내에 축적됨으로써 卵黃顆粒이 상당히 增加하여 세포질 전체를 차지하며, 細胞質의 染色 狀態가 진한 상태를 나타내었다. 이와

같이 난황형성이 이루어지는 시기에는 지방적의 이동과 축적이 왕성하게 이루어지게 되어 卵胞膜 細胞와 혈정속에서 발견된다고 金(1991) 및 尹等(1991)이 보고한 바 있다. 그리고 이러한 변화는 대구의 난황형성에 관하여 연구한 Kjesbu와 Kryvi(1989)이 난황형성기 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 밝혔으며, 卵黃顆粒이 卵母細胞質內에 出現될 때의 段階(stage)가 卵母細胞層(follicle cell layer)이 두꺼워지며, 放射帶(zona radiata)가 두껍게 形成되면서 급속하게 增加된다고 報告하였다. Fig. 4-K에 나타난 바와 같이 卵胞膜에 수많은 미토콘드리아(MT), 내형질세망(RER), 표층포(CA), 脂肪滴(OD)을 가지고 있다. Fig. 4-L에서와 같이 卵細胞質 혹은 顆粒膜 세포쪽을 향해서 직경이 약 4 μm 인 微細突起가 존재하였다. 이것은 EMO의 미세돌기보다 약 7배 정도 증가한 결과로서 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. 교소체를 가지고 있는 과립막 세포는 점점 더 두꺼워지고, 글자체(GA)가 상당히 발달되는 특징을 나타내었으며, 균일한 크기를 갖는 基底膜이 관찰되었다. 그리고 莢膜세포에는 황단면으로 잘라진 콜라겐 섬유와 잘 발달된 核이 관찰되었다.

Stage V (Ripe ovum) (Fig. 3-G, H, I, J; Fig. 4-M, N): < 약 900~1,500 μm , Fig. 3- K, L에서와 같이 작은 脂肪滴이 細胞質內에 一部 存在하고, Fig. 3-I, J에서와 같이 직경이 12~42 μm 인 수많은 卵黃顆粒이 細胞質內에서는 퍼진 상태로 있으나, 세포질 외측부에 있는 卵黃은 상당히 緻密한 狀態로 維持되어 일부는 癒着된 狀態로 관찰이 되었다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 電氣泳動像을 살펴보면 20k dalton의 단백질은 사라진 반면에 90~110k dalton의 분자량을 가진 단백질이 더욱더 두꺼워지는 특징이 확인되었다. 커다란 核은 세포질 중앙부로 부터 動物極 주변부로 이동하였기 때문에 核이 보이지 않게 되었고, germinal vesicle breakdown(GVBD)이 發生하여 감수분열의 Metaphase II인 이 段階가 바로 正常的인 性成

熟이 되어 排卵 및 產卵이 이루어지게 되어 受精이 이루어질 수 있는 직전 단계이다. 이 때 제 1차 極體가 발생되어 동물극 부위에 나타나는 것으로 생각된다. Fig. 4-M, N에서와 같이 卵細胞質 혹은 顆粒膜 세포 쪽을 향해서 직경이 약 5 μm 인 微細突起가 external 및 internal zona radiata 로 2가지 막으로 뚜렷하게 구분되었다. 이것은 EMO 보다 9배 그리고 LMO 보다 약간 증가된 1.25배 정도 두께를 나타내었다. 이러한 결과는 Lambert 等(1978)과 尹 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(zona radiata) 도 급속하게 增加되어 두꺼워진다는 것과 대체적으로 一致하였다. 顆粒膜 細胞와 莢膜 細胞는 횡단면으로 잘라진 콜라겐 섬유와 잘 발달된 核이 혼재하면서 두 겹께 잘 발달된 특징을 나타내었으며, 일정치 않은 基底膜이 관찰되었다.

성숙시기인 4월과 5월에 GSI 가 19.95% 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 배란직후의 卵子는 반투명한 빛이 나는 노란색을 나타내는 무지개 송어 및 미꾸리와는 달리 미성숙단계에서 옅은 노란색을 띄다가 성숙에 가까울수록 초록색을 나타내었고, Fig. 4-M에서와 같이 수많은 表層胞(CA)와 脂肪滴이 관찰되었다.

IV. 摘 要

1992年 10월부터 1993年 5월까지 채취된 한국산 재래메기(*Silurus asotus*) 卵母細胞의 卵黃形成(vitellogenesis)과 成熟(maturation) 등의 發達 段階와 이에 영향을 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 m^3 크기인 탱크에서 N, R, C, 사양표준에 준한 浮上飼料(EP)를 급여하여 사육중인 체중 250~300g의 한국산 재래메기(*Silurus asotus*) 암컷 2년생 50마리를 供試魚로 사용하였다.

腦下垂體의 성선자극 호르몬(GTH)을 분비하는 gonadotrophs의 세포학적 특징은 非成熟期에 GTH는 分泌粒의 數가 적은 상태이나 성숙시기에 있는 개체의 경우 세포의 발달이 왕성한 상태를 나타내었다. 특히 크고 작은 分泌粒(SG, GL)이 존재하였고, 과립형 내형질세망이 상당히 발달되었다.

산란시기에 접어들수록 卵母細胞의 顆粒膜 細胞(GCL)의 核과 내형질세망 및 소포체의 발달이 왕성한 상태이다. 성장시기에 접어들수록 莢膜, 顆粒膜, 放射帶 등 이 3가지 膜은 점점 더 두꺼워지는 특징을 나타내었으며, 細胞質은 表層胞, 卵黃顆粒, 골지체, 내형질세망, 리보솜 등의 細胞小器官들의 발달이 왕성하였다. 난모세포가 발달하면 세포질내의 여러 소기관(미토콘드리아, 난황립, 표층포)이 발달하고, 막에 있어서 放射帶의 두께가 점차적으로 얇아지나, 과립막의 두께는 증가하는 경향을 나타내었다.

난모세포가 발달함에 따라 핵소체의 크기와 난황과립이 증가하였고, 난황과립이 결정체의 형태로 난모세포내에 축적이 이루어졌다. EMO와 LMO의 수가 증가함에 따라 난소는 점차적으로 증대되었고, 투명한 액체상의 난황이 관찰되었다. 그리고 이러한 LMO, RO 단계의 난모세포를 가진 개체의 경우 평균 GSI가 최고 19.95% 까지 증가되었다.

LPO, EMO 단계에서 과립막 세포와 협막세포와 같은 난포막 세포는 단층구조로 부터 입방형 구조로 변화되었다. 자연적인 조건하에서 난포막은 조직적인 발달과 이에 영향을 끼치는 난형성과 성호르몬의 발달에 충분한 호르몬을 계절에 따라 분비시키는 데에 크나큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 난소의 계절에 따른 현미경적 특징은 성성숙 지수와 외형상의 특징과 아주 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

성성숙 시기에 나타나는 major band의 전기영동상은 previtellogenic phase에 확인된 band 보다 훨씬 두껍게 나타났으며, 그 분자량은 각각 21k, 24k, 32k, 45k, 67~110k, 170k dalton의 크기를 가졌다.

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. Guraya, S. S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Follicular wall. Karger, Basel, pp. 110-154.
 3. Howell, W. H. 1983. Seasonal changes in ovaries of adult yellow-tail flounder (*Limanda ferruginea*). Fisheries Bulletin, 81(2):341-355.
 4. Idler, D. R., and T. B. Ng. 1979. Studies on two types of gonadotropins from both salmon and carp pituitaries. General and Comparative Endocrinology, 38:421-440.
 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*). p.100. 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. 34, 735-746.
 8. Lambert, J. G. D., G. I. C. G. M. Bosman, R. Van Den Hurk, and P. G. W. J. Van Oort. 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 Yoon, 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. Lee, J. Y., J. M. Yoon, J. H. Lee, J. K. Shin and H. Y. Park. 1992. Breeding and reproductive studies on Korean native loach III. Early embryonic development. Korean J. Anim. Reprod. 16 (1). 63-77.
 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. Peter, R. E. and L. W. Crim. 1979. Reproductive endocrinology of fishes: Gonadal cycles and gonadotropin in teleosts. A. Rev. Physiol. 41, 323-335.
 13. Scobbie, A. E. and I. M. Mackie. 1990. The use of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis in species identification of fish eggs. Comp. Biochem. Physiol. 96B(4). 743-746.
 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. Toshimori, K., and F. Yasuzumi. 1979. Tight junction between ovarian follicle cells in the teleost, *Plecoglossus altivelis*. Journal of Ultrastructure Research, 67:73-78.
 16. Yaron, Z. 1971. Observations on the granulosa cells of *Acanthobrama terrae-sanctae* and *Tilapia nilotica* (Teleostei). General and Comparative Endocrinology, 17:247-252.
 17. 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.
 18. 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. K. J. Anim. Reprod. 15(3). 207-220.

19. Yoon, J. M, B. C. Kim and H. Y. Park. 1991. Breeding and reproductive studies on Korean native loach II. Histological changes in immature and mature stages in Korean native loach. Korean J. Anim. Sci. 33(8). 552-561.
20. Yoon, Jong-Man, Gye-Yoong Kim, Hyung-Tack Huh, Jong-Man Kim, and Hong-Yang Park, Studies on genetics and breeding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* IX. Ultrastructural changes of ovarian follicle during oocyte growth. Korean. J. Zoology. 36(2). 304-318.