

쌍구흡충(*Paramphistomum cervi*)에서의 정자형성과정

이 현 · 정계현 · 박종안*

순천향대학교 자연과학대학 생물학과 및 환경보건학과*

소의 위에 기생하는 쌍구흡충(*Paramphistomum cervi*)에서의 정자형성과정을 광학현미경과 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 발생중인 모든 세포들은 중앙에 있는 세포질로부터 각 세포들로 이어지는 세포간교에 의하여 서로 연결되어 있어 분열과 분화의 동시성을 위한 영양계를 이루고 있었다. 정원세포들은 4세포기까지이며 모두 기정막에 붙어 있었다. 일차정모세포는 8세포, 이차정모세포는 16세포가 영양계를 이루었고, 정세포는 32세포가 영양계를 이루었으며 이 상태에서 변태를 진행하였다. 성숙한 정자의 머리는 나사모양이고 첨체는 형성되지 않았으며 2개의 축사를 가지고 있었다. 축사의 단면에서 미소관의 배열상태는 9+1 유형이었다.

KEY WORDS: *Paramphistomum cervi*, Trematode, Spermatogenesis

편형동물 중 흡충류(Trematodes)에서의 정자형성과정과 정자의 모습 등은 고등동물에서와 많은 부분이 다르며 이에 대한 형태학적 연구 결과가 간간히 보고되어 왔다. 주로 연구대상이 되었던 종들은 *Paragonimus westermani*(Sato 등, 1967), *Haematoloechus medioplexus*(Burton, 1972), *Fasciola hepatica*(Threadgold, 1975), *Eurytrema pancreaticum*과 *Paragonimus ohirai*(Fujino 등, 1977), *Clonorchis sinensis*(Jeong 등, 1976; 鄭·林, 1984), *Schistosoma mansoni*(Kitajima 등, 1976; Otubanjo, 1980)와 *Fibricola seoulensis*(손·이, 1993) 등이며, 편형동물에서의 정자 꼬리의 미세구조에 대한 집중적인 연구는 Justine과 Mattei(1983, 1988)에 의하여 수행된 바 있다. 본 연구는 소의 위에 기생하는 쌍구흡충(*Paramphistomum cervi*)에서의 정자형성과정을 알아 보고자 수행되었다.

재료 및 방법

재료: 재료는 쌍구흡충(*Paramphistomum cervi*)으로서 이는 편형동물문(Platyhelminth), 흡충강(Trematoda), 이생목(Digenea), 쌍구흡충과(Paramphistomatidae)에 속하는 종이다.

방법: 광학현미경적인 관찰을 위하여 도축장에서 갓 도축된 소의 위벽에서 채집한 총체를 0.85% 생리식염수에 보관하여 연구실로 옮긴 후 성충의 생체를 해부하여 정소를 적출, 절개하고 slide glass 위에 얇게 도말하여 neutral buffered formalin 으로 10분간 고정하고 증류수로 세척한 다음 toluidine blue 혹은 Giemsa solution 으로 염색하였다. 염색이 된 시료들은 위상차현미경으로 관찰되었다.

전자현미경적인 관찰을 위하여 채집된 총체를 즉시 0.85% 생리식염수로 세척한 다음 4% glutaraldehyde로 고정을 시작한 후 30분 후 총체를 절개하여 정소를 분리하여 전고정을 1시간 30분간 계속하였다. 후고정은 1% osmium

tetroxide 로 1시간 30분간 실시하였고, 전후고정 후의 세척은 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)로 하였다. 탈수과정은 ethanol series를 거쳤으며, 포매는 araldite 502 mixture로, 초박절편된 시료는 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM CX I 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결과

광학현미경적 관찰조건

정소의 semithin section을 관찰해 보면 정소는 정자형성과정 중의 각 과정을 거치고 있는 세포들과 형성이 완료된 것으로 보이는 것들로 가득하였다. 정원세포(spermatogonium)들은 정소벽에 몇 개의 층을 이루어 붙어 있었고, 일차정모세포(primary spermatocyte), 이차정모세포(secondary spermatocyte)들과 정세포(spermatid)들은 기저막으로부터 유리되어 존재하였다. 정소를 도말해 염색하여 위상차현미경으로 관찰해 본 결과 역시 각 발생단계별 생식세포들이 관찰 가능하였으나 정원세포들만은 관찰되지 않았다. 그리고, 이차정모세포의 수는 다른 단계의 세포들보다 그 수가 상당히 적게 관찰되었다. 발생 중인 세포들은 모두 세포간교(intercellular bridge)에 의하여 중심에서 서로 연결되어 있었는데 일차정모세포는 8개의 세포가, 이차정모세포는 16세포가 영양계를 이루었고, 정세포는 32세포가 하나의 영양계를 이루어 정자로 변태하고 있었다(Figs. 1-5). 정세포들은 변태과정을 시작하면서 핵이 길어지고 염색체는 농축되어 갔으며, 정자의 머리부위는 약간의 나선상이었다(Figs. 3-6).

투과전자현미경적 관찰조건

1. 생식세포의 초기 발생단계별 구조

정원세포(spermatogonia): 이들은 주로 정세포관의 기저막에 붙어 있어 3, 4층의 세포층을 이루고 있었다. 이들의 핵은 일반적으로 구형 또

는 난형으로서 세포질에 비하여 큰 비율을 차지하고 있었다(Fig. 2). 세포질에는 다량의 리보솜(ribosome)과 미토콘드리아(mitochondria)가 존재하였다(Fig. 7).

정모세포(spermatocytes): 정모세포들은 각 세포들이 내는 세포간교에 의하여 중앙에 위치한 세포질 즉 cytophore에 연결되어 있는데 이들의 핵은 비교적 크고 구형 또는 난형으로서 cytophore로부터 멀리 떨어진 세포질에 위치하였고, 핵질에는 과립상 염색질이 거의 균질하게 분포하고 있었다. Cytophore와 근접한 세포질에는 많은 수의 미토콘드리아와 약간의 골지체(Golgi apparatus)가 관찰되었다. 각 세포의 세포질에는 상당량의 유리 리보솜이 분산되어 존재하였다. 그러나, cytophore 내의 세포질에는 일반 세포내 소기관의 존재가 확인되지 않았다(Fig. 3).

정세포(spermatids): 정세포는 32-세포군을 이루는 그 각각의 세포의 크기는 정모세포보다 작지만 전체적인 크기는 정모세포보다 큰 것이 많았다. 이들은 곧 정자변태과정(spermiogenesis)을 거치므로 발생단계별로 변화가 심하게 나타났다. 정세포들의 세포질에는 역시 상당량의 유리 리보솜이 존재하며 정모세포에서와는 달리 골지체가 뚜렷하게 각 세포의 핵 주변에 나타났다. 발생이 진전됨에 따라 미토콘드리아는 정모세포들 내에서 관찰되었던 부위에서 각 세포의 말단부로 이동하고 핵은 그 전자밀도가 높아졌고 염색사는 농축되어 나선형으로 꼬이며 신장된 모습이었다(Fig. 9).

핵이 정세포의 종축을 따라 신장될 때 핵에 인접한 양 옆에는 1개씩의 축사뿌리(rootlet of flagellum or axoneme)와 이 둘 사이에 중심체 또는 microtubule-organizing center (MTOC)가 나타났다(Fig. 10, 11).

이러한 세포는 전체적으로 신장되며 그 안에 앞쪽으로는 길게 신장된 핵과 미토콘드리아가 위치하고 뒤로는 2개의 축사가 거의 평행하게 뒤로 뻗어 나가며 전단의 세포질도 최소화하여 전체적으로 가늘고 긴 정자가 형성되었다(Figs. 12-17).

2. 정자의 구조

정소 조직을 초박 절편하여 투과전자현미경으로 관찰해 보면 수많은 정자들이 다양한 각도로 절단되어 있음을 볼 수 있다. 본 연구를 통하여 관찰된 정자의 여러 단면들을 자료로 쌍구흡충 정자의 미세구조를 재구성해 보면 다음과 같다.

정자의 두부와 미부의 뚜렷한 경계가 외견적으로는 구분하기 어려우나 일반적으로 정자의 두부는 약간 나선상으로 꼬인 듯 하였다(Fig. 6). 정자의 두부 전단부로부터 본다면 쌍구흡충의 정자에서는 첨체(acrosome)가 관찰되지 않았다. 전단에서는 핵만이 관찰되고 그 다음에 핵의 양 옆에 근원을 둔 축사 뿌리와 이들에 이어지는 축사들은 핵을 가운데 두고 뒤로 달리며(Fig. 10), 미토콘드리아는 핵의 아래 세포질의 거의 중앙에 자리잡고 얼마만큼 핵을 따라 뒤로 가며 핵이 먼저 끝나고 미토콘드리아만이 축사들 가운데서 당분간 뒤로 더 가다가 끝이 났다(Figs. 13-15).

핵이 끝난 후로는 핵이 있던 위치와 그 반대편의 세포질에 다량의 glycogen granules 이 존재하였다(Figs. 12-14). 정자의 꼬리가 축사를 2개 가지고 있을 때까지의 정자 세포막의 바로 안 쪽 세포질에는 피질미세소관(cortical microtubule)이 많이 존재하였는데 이들의 수는 전단부에서 10개, 중간부위에서 26개까지 되다가 뒤로 가면서 감소하여 축사가 하나인 곳에서는 관찰되지 않았다(Figs. 13-17).

정자는 전반적으로 나선상의 세포질 굴곡을 가지며 기다란 미부는 납작한 모습이고(Fig. 16), 정자 미부의 말단부에서는 축사가 하나로 끝났으며, 정자가 치닌 축사의 내부 미세소관의 배열 유형은 9+1형이었다(Figs. 13-17).

고찰

쌍구흡충(*Paramphistomum cervi*)의 정자형성과정을 광학현미경적으로 관찰해 본 결과 쌍구흡충에서의 정자형성과정은 정원세포가 유사분

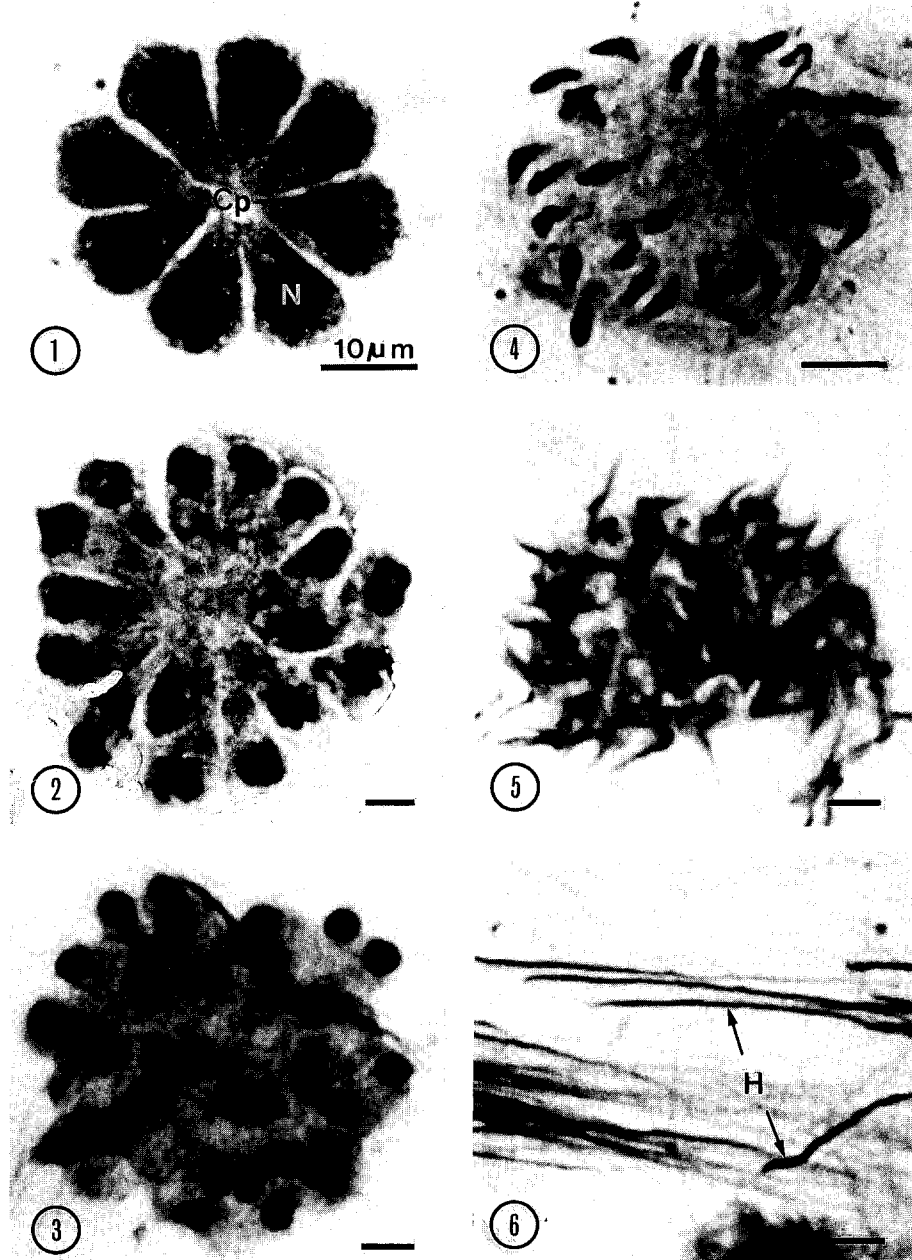
열에 의하여 4세포기가 될 때까지는 기저막 위에 붙어 있다는 것을 알았다. 정소의 추출액으로도 말, 염색한 표본에서는 정원세포는 관찰되지 않았고 제1차 정모세포 이후의 발생단계만이 관찰할 수 있었던 사실이 이를 뒷받침해주고 있다.

발생 중인 각 단계의 생식세포들은 세포간교(intercellular bridge)에 의하여 중앙에 위치한 cytophore를 중심으로 연결되어 있었는데 제1차 정모세포는 8개의 세포가, 제2차 정모세포는 16개, 그리고 정세포는 32개의 세포가 덩어리져 함께 발생을 진행하였다. 이러한 과정은 *Haematoloechus medioplexus*(Burton, 1972)에서와 *Clonorchis sinensis*(Jeong 등, 1976) 및 *Pharyngostomoides procyonis*(Grant 등, 1976)에서의 정자형성과정에서도 관찰된 바와 같다.

Rosario(1964)는 촌충류(cetodes)의 정자형성과정을 관찰하고 발생단계별로 군을 이루고 있는 세포들이 공유하고 있는 중앙의 세포질을 cytophore라고 불렀다. 이 cytophore의 존재는 발생 중인 정자들의 분열과 분화의 동시성을 위하여 세포들을 서로 연결시켜 주는 곳이며, 세포간교에 의해 세포들이 서로 연결되어 발생단계별로 영양계를 이루고 있음을 암시하는 현상이라 하겠다. 정세포가 정자로 변태할 때 핵의 뒤 두 축사의 rootlets 사이에 나타나는 구조물(Fig. 11)에 대하여 저자에 따라MTOC(microtubule organizing center), 중심소체 혹은 centriole-like body라고 칭하였으나, 이 논문에서는 MTOC라고 하였다. 이 구조물의 확실한 기능에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다.

흡충류 정자들의 전체적인 겉모양이 일반 고등동물의 것들과 너무 상이하여 정자의 부분들을 기존의 개념으로 이해하기는 어려운 점이 있다. Burton(1972)은 *H. medioplexus*의 정자를 광학적으로 관찰하고 두부(head portion), 미부(tail portion)로 나눈 뒤 미부를 다시 중편(middle piece)과 말단부(terminal piece)로 나누었다. 그리고 말단부가 납작하고 빠른 과상운동을 보여준다고 했다.

여기에서 언급한 말단부는 본 연구에서와 *C.*



Figs. 1-6. Phase contrast light micrographs of the germ cells (bar = 10 μ m)

Fig. 1. Eight primary spermatocytes centrally interconnected by cytophore. Cp, cytophore; N, nucleus \times 1,450

Fig. 2. Secondary spermatocytes in a group of sixteen. \times 790

Fig. 3. Spermatids in a group of thirty two. \times 870

Fig. 4. Spermatids in elongation of the nuclei. \times 1,400

Fig. 5. Spermatids with the long nuclei. \times 980

Fig. 6. Anterior parts of the spermatozoa. H, head \times 1,000

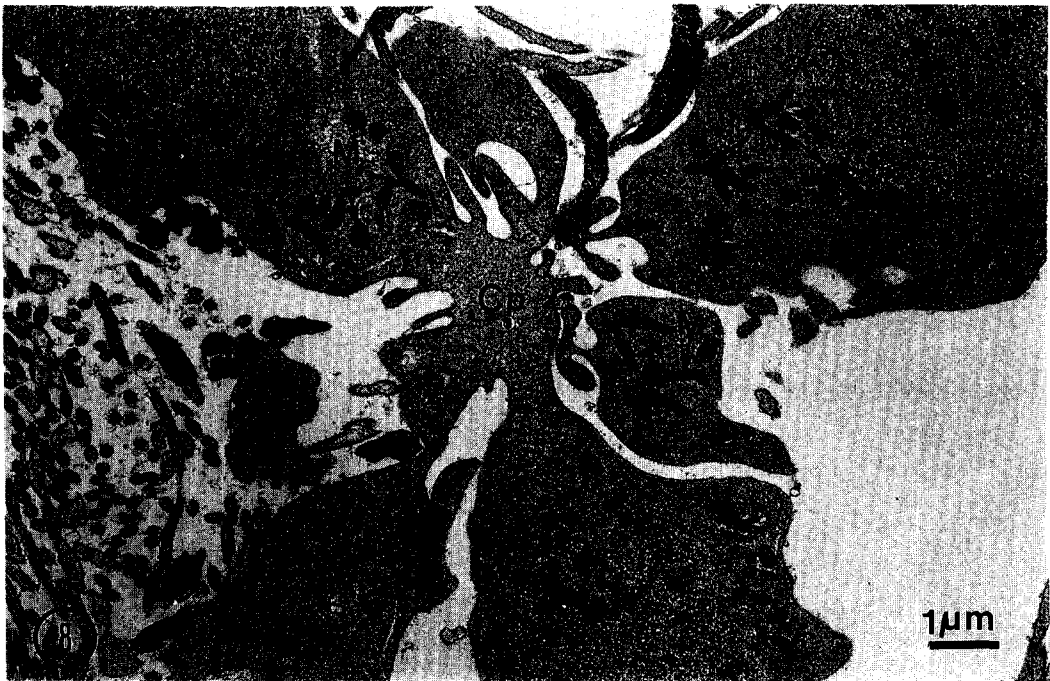
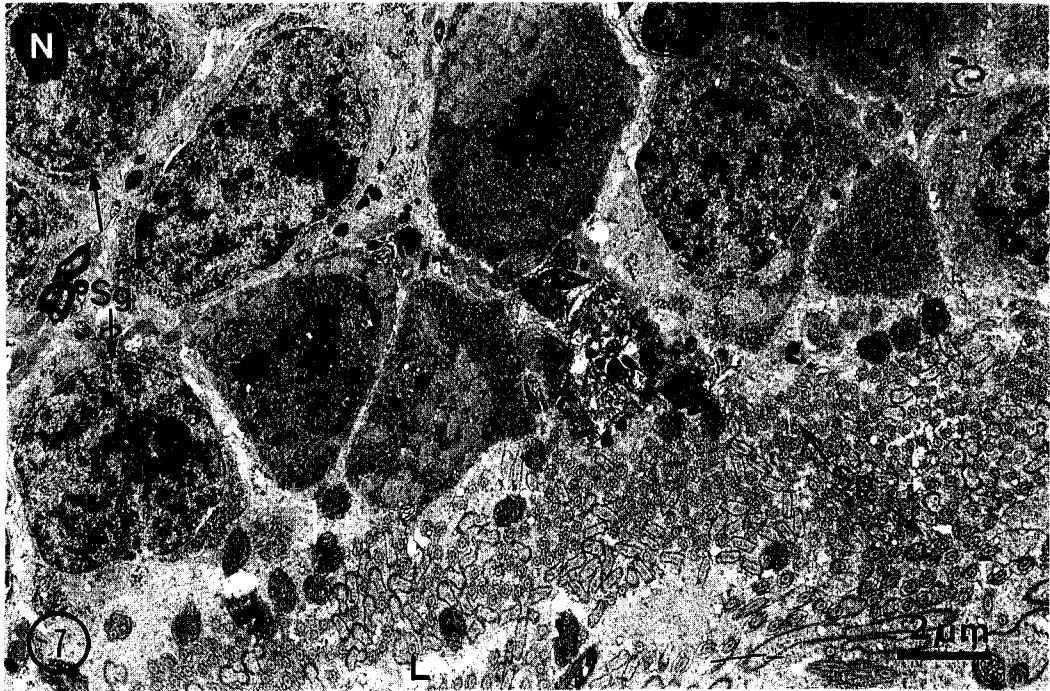


Fig. 7. Epithelium of the testis with the spermatogonia (Sg) on the basement membrane. Sp, sperm; L, lumen; N, nucleus $\times 5,600$

Fig. 8. Secondary spermatocytes connected by intercellular bridges or cytophore (Cp). Many mitochondria (M) are located near cytophore. N, nucleus $\times 8,000$



Fig. 9. Spermatids undergoing spermiogenesis showing helical chromosomes and the Golgi apparatus (G) and rich ribosomes. R, rootlet $\times 12,000$

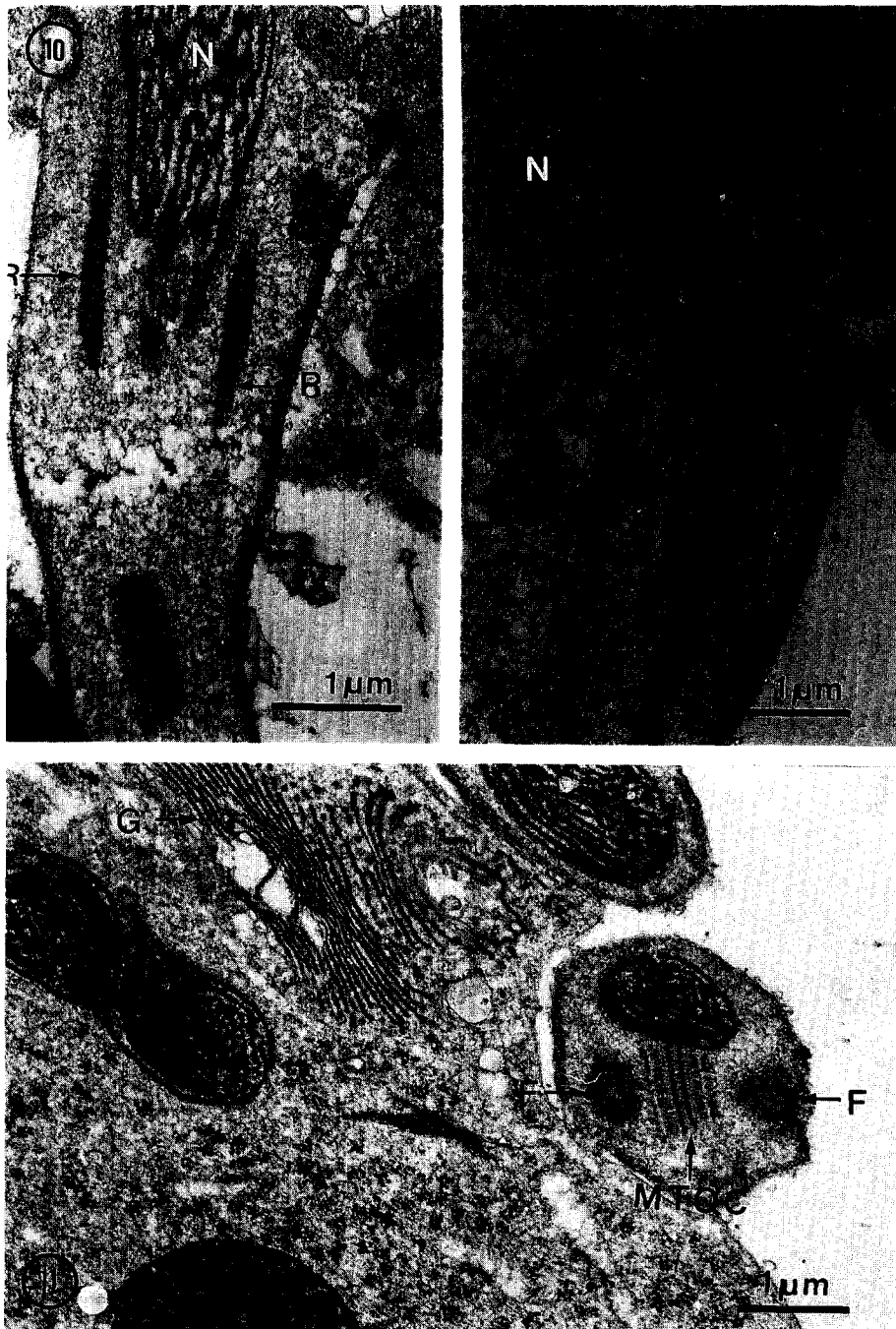


Fig. 10 a, b. Each spermatid undergoing tail elongation show the long nucleus (N), the two rootlets (R), and a basal body of flagellum. $\times 24,000$

Fig. 11. Spermatids undergoing spermiogenesis show the helically coiled chromosomes, the Golgi apparatus (G), and the MTOC (Microtubule Organizing Center) or the centriole. F, flagellum $\times 31,000$

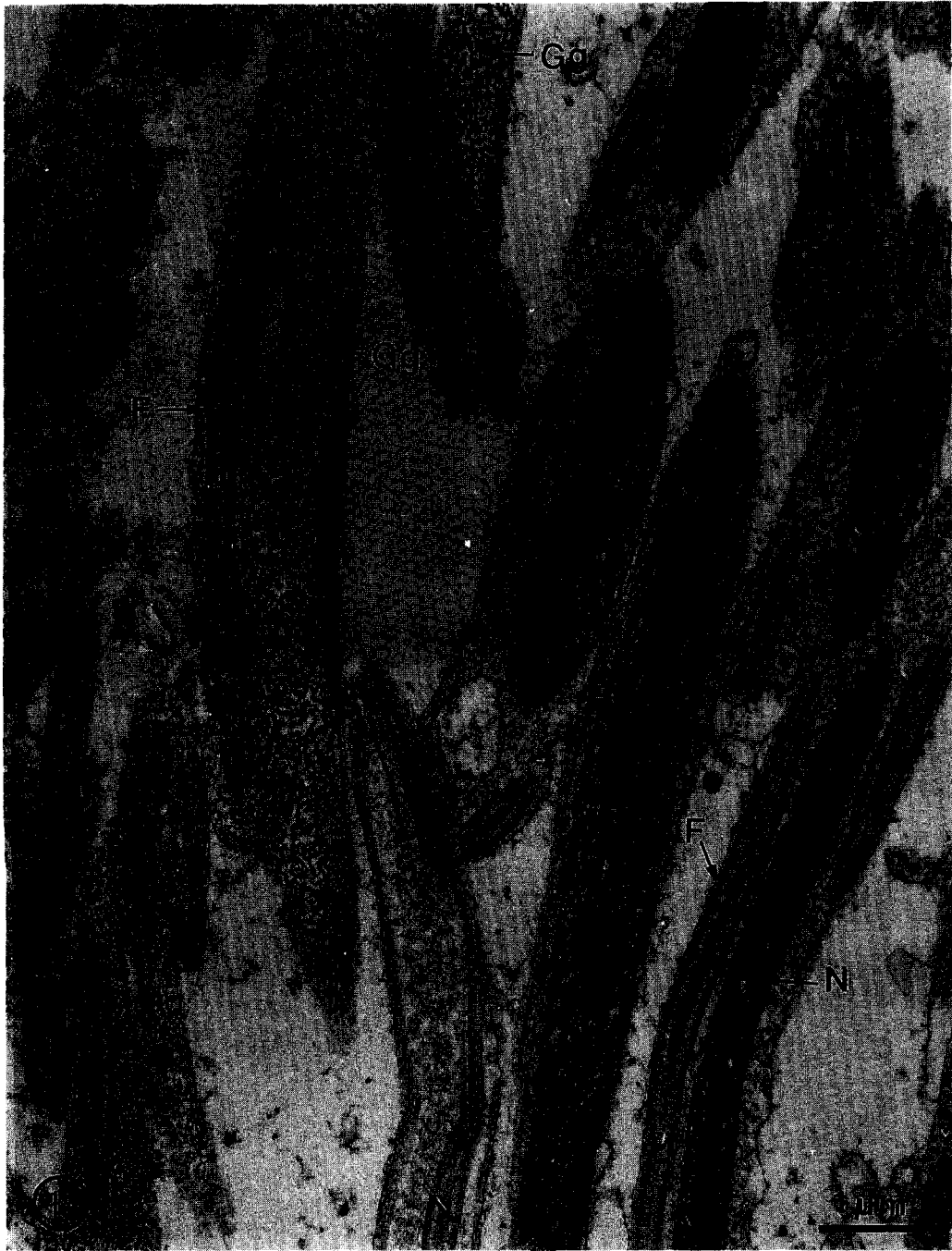
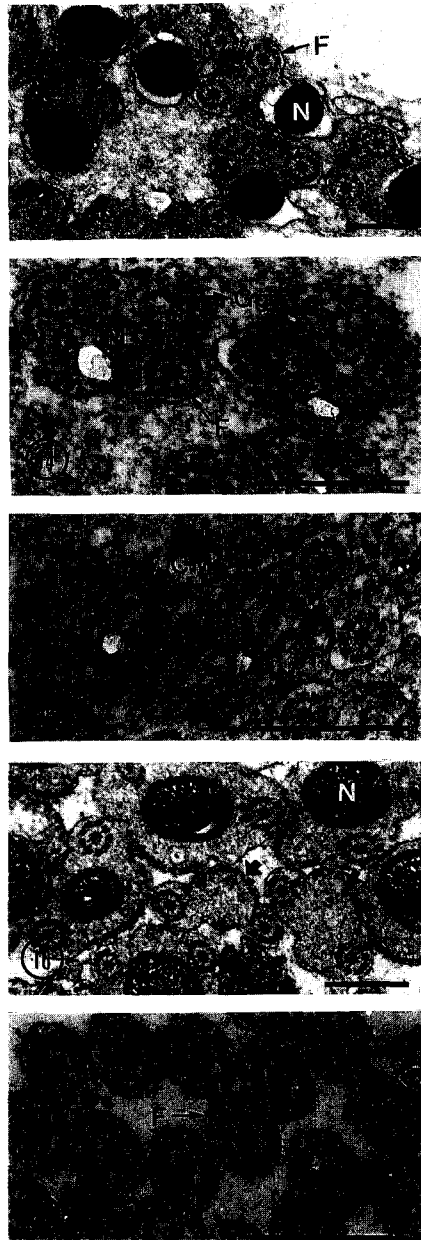


Fig. 12. Spermatozoa showing the longitudinally sectioned anterior parts with the nuclei (N) extended along the two flagella (F) and the middle parts containing rich glycogen granules (Gg) in the cytoplasm. $\times 27,000$



Figs. 13-17. Transverse sections of spermatozoa

Fig. 13. Spermatozoa showing the nuclei (N) and two sets of 9+1 arrangement of the micotubules. F, flagellum $\times 32,000$

Fig. 14. Anterior middle parts showing glycogen granules (Gg), mitochondria (M), and cortical microtubules. F, flagellum $\times 47,000$

Fig. 15. Middle parts showing the flagella in sperm tail become closer than those of the anterior parts. The cortical microtubules (CM) are obvious. $\times 47,000$

Fig. 16. Posterior parts (arrowed) without the nuclei and mitochondria, the cortical microtubules are arranged along the cytoplasmic membranes between the flagella. $\times 30,000$

Fig. 17. Terminal parts. The each of the flagella (F) singly exists with the 9+1 arrangement of microtubules. $\times 68,000$

sinensis(Jeong 등, 1976)에서 보는 말단부(end piece) 즉, 축사가 하나로 끝나는 말단부 이전의 모습을 언급한 것으로 생각된다.

Fujino 등(1977)과 Orido(1988)는 *Paragonimus ohirai*의 정자의 부분 명칭을 각각 다르게 부르고 있다. 앞으로 이부분은 더욱 연구해 보아야 할 사항으로 사료된다. 본 연구에서 쌍구흡충의 정세포가 정자로 변태하는 과정중에서나, 성숙정자에서도 침체의 존재라고 인지되는 부분은 관찰된 바 없는데 이러한 현상은 *C. sinensis*(鄭·林, 1984)에서의 관찰결과와 같고, 또한 최근 *Fibricola seoulensis*(손·이, 1993)을 대상으로 연구결과와 일치한다. 침체가 없는 경우는 McLaren(1973)에 의하여 선충류(Nematodes)에서도 보고된 바 있는데 어떤 구조물이 침체의 기능을 대신하는지에 대해서는 아직 분명히 밝혀진 바 없고 본 연구에서도 이것을 밝힐 수는 없었다.

정자 미부의 상부 세포질에서는 다량의 glycogen granules이 관찰되었는데 이는 Anderson과 Personne(1970)이 언급한 바와 같이 정자의 energy source로서 존재하는 것으로 생각된다.

정자의 미부 세포질 내에서 서로 거의 평행하게 뒤로 뻗어간 두개의 축사 횡단면이 보여 주는 미세소관들의 배열 양상은 자못 흥미롭다. 미세소관의 배열양상은 편모나 섬모가 통상적으로 지니는 9+2 유형이 아니라 9+1인 것으로 사료된다.

이러한 미세소관의 배열상태에 관하여 Tulloc와 Hershenov(1967)는 편형동물 정자의 미세구조에 관한 고찰에서, Morseth²(1969)은 *Echinococcus granulosus*와 *Dicrocoelium dentriticum*의 정자에서, Rees(1979)는 *Cryptyle lingua*의 정자 형성과정에서, Robinson과 Halton(1982)은 *Corrigia vitta*의 정자 형성과정에서, 특히 Justine과 Mattei(1982, 1983, 1984a, b, 1988)의 경우는 여러 편형동물의 정자꼬리 축사의 미세소관 배열에 관한 집중적인 연구에서 미세소관의 배열이 주로 9+1 유형이라고 보고하였다. 이러한 일련의 보

고들과 본 연구에서의 결과를 고려해보면 편형동물 특히 흡충류의 정자가 가지는 축사내 미세소관 배열의 일반적인 양상은 특이한 9+1 유형인 것 같다.

본 연구에 의하면 정자미부내 축사가 뒤에서는 하나로 끝나는 것으로 관찰되었는데 두개의 축사가 끝부분에서 하나로 합쳤다는 증거는 관찰할 수 없었다. 그러나 이 현상은 Fujino 등(1977)이 *Paragonimus ohirai*의 정자를 주사현미경(SEM)으로 관찰한 보고에 의하면 말단부가 둘로 갈라진 것을 볼 수 있었는데 쌍구흡충에서도 이러한 이유에서가 아닌가 생각된다.

인용문헌

- 鄭啓憲, 林漢鍾, 1984. 肝吸蟲의 微細構造에 關한 研究. V. 精子的 微細構造. 기생충학잡지 **22**: 30-36.
- 손운목, 이순형, 1993. *Fibricola seoulensis*의 웅성생식 세포 및 정자에 대한 투과전자형미경적 미세구조. 기생충학잡지 **31(3)**: 183-191.
- Anderson, W.A. and P. Personne, 1970. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *J. Cell Biol.* **44**: 29-51.
- Awad, A.H.H. and A.J. Probert, 1989. Transmission and scanning electron microscopy of the male reproductive system of *Schistosoma margrebowiei* Le Roux, 1933. *J. Helminthol.* **63**: 197-205.
- Burton, P.R., 1972. Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. *J. Parasit.* **58(1)**: 68-83.
- Fujino, T., Ishii, Y. and T. Mori, 1977. Ultrastructural studies on the spermatozoa and spermatogenesis in *Paragonimus* and *Eurytrema* (Trematoda: Digenea). *Jap. J. Parasit.* **26**: 240-255.
- Grant, W.C., Harkema, R., and K.E. Muse, 1976. Ultrastructure of *Pharyngostomoides procyonis* Harkema 1942 Diplostomatidae. I Observations on the male reproductive system. *J. Parasit.* **62**: 39-49.
- Jeong, K.H., Rim, H.J., Yang, H.Y., Kim, W.K. and C. W. Kim, 1976. A morphological study on spermatogenesis in the liver fluke, *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.* **14**: 123-132.
- Justine, J.L. and X. Mattei, 1982. Etude ultrastructurale de la spermiogenese et du spermatozoide d'un Plathelmine: *Gonapodasmius* (Trematoda: Didymozoidae). *J. Ultrastr. Res.* **79**: 350-365.

- Justine, J.L. and X. Mattei, 1983. A spermatozoon with 9+1 axonemes in a parasitic flatworm, *Didymozoon* (Digenea: Didymozoidae). *J. Submicrosc. Cytol.* **15** (4): 1101-1105.
- Justine, J.L. and X. Mattei, 1984a. Apical Spermogenesis in a Parasitic Flatworm, *Didymozoon* (Trematoda: Digenea: Didymozoidae). *J. Ultrastr. Res.* **87**: 106-111.
- Justine, J.L. and X. Mattei, 1984b. Comparative Ultrastructural Study of Spermogenesis in Monogeneans (Flatworm). *J. Ultrastr. Res.* **88**: 77-91.
- Justine, J.L. and X. Mattei, 1988. Bending of 9 + "1" axonemes of flatworm spermatozoa in hypotonic media: An experimental study. *J. Ultra. Mole. Struc. Res.* **100**: 31-38.
- Kitajima, E.W., Paraense W.L., L.R. Correa, 1976. The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda: Digenea). *J. Parasit.* **62**: 215-221.
- Mclaren, D.J., 1973. The structure and development of the spermatozoon of *Dipetaionema viteae* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitol.* **66**: 447-463.
- Morseth², D.J., 1969. Sperm tail fine structure of *Echinococcus granulosus* and *Dicrocoelium dentriticum*. *Exp. Parasit.* **24**: 47-53.
- Orido, Y. 1988. Ultrastructure of spermatozoa of the lung fluke, *Paragonimus ohirai* (Trematoda: Troglotrematidae), in the seminal receptacle. *J. Morphol.* **196**: 333-343.
- Otubanjo, O.A. 1980. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of the ducts of the male reproductive system. *Parasitol.* **81**: 565-571.
- Rees, F.G., 1979. The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). *Int. J. Parasit.* **9**: 405-419.
- Robinson, R.D. and D.W. Halton, 1982. Fine structural observations on spermatogenesis in *Corrigia vitta* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Z. Parasitenkd.* **68**: 53-72.
- Rosario, B., 1964. An electron microscopic study of spermatogenesis in cestodes. *J. Ultrastruct. Res.* **11**: 412-427.
- Sato, M., Oh, M. and K. Sakoda, 1967. Electron microscopic study of spermatogenesis in the lung fluke *Paragonimus miyazakii*. *Z. Zellforsch.* **77**: 232-243.
- Silveira, M and R. Porter, 1964. The spermatozoides of flatworm and their microtubular systems. *Protoplasm* **59**: 240-265.
- Threadgold, L.T., 1975. *Fasciola hepatica*: the ultrastructure of the epithelium of the seminal vesicle, the ejaculatory duct and cirrus. *Parasitol.* **71**: 437-443.
- Tulloch, G.S. and B.R. Hershenvov, 1967. Fine structure of platyhelminth sperm tails. *Nature* **213**: 299-300.

(Accepted November 5, 1994)

Spermatogenesis in *Paramphistomum cervi*

Hyun Lee, Kye-Heon Jeong and Jong-An Park* (Department of Biology and Department of Environmental Health Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Onyang, Chungnam, 330-600 Korea)

Spermatogenesis in *Paramphistomum cervi* was investigated under the light and transmission electron microscopes. All of the cells undergoing spermatogenesis are interconnected by intercellular bridges for synchrony of division and differentiation. The spermatogonia seem to be in contact with the basal lamina. The primary spermatocytes occur in groups of eight and the secondary spermatocytes are present in groups of sixteen. The spermatids, occurred in groups of thirty- two, take procedures for spermiogenesis. The spermatozoon has two axonemes incorporated into the cytoplasm and show 9 + 1 type of arrangement of microtubules. Acrosome formation is not observed.