

징거미새우, *Macrobrachium nipponense* 생식주기에 따른 Androgenic Gland의 조직학적 변화

김대현 · 강정하* · 이재용** · 정지현** · 김병기** · *한창희**
국립수산과학원 자원조성연구소, *국립수산진흥원 생물공학과
**동의대학교 생물학과

Histological Changes of Androgenic Gland According Reproductive Cycle in *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849)

Dae-Hyun KIM, Jung-Ha KANG*, Jae-Young LEE**, Jee-Hyun JEONG**
Byung-Ki KIM** and *Chang-Hee HAN**

Resources Enhancement Institute, National Fisheries Research and Development Institute,
Jeju 690-192, Korea

*Biotechnology Division, National Fisheries Research and Development Institute,
Busan 619-900, Korea

**Department of Biology, Dongeui University, Busan 614-054, Korea

The androgenic gland secretes a hormone, androgenic gland hormone, which is believed to act on the differentiation of the primary, secondary, and behavioral sex characteristics in most malacostracan crustaceans. Based on the changes in gonado-somatic index and histological observation of testis and androgenic gland cell, testicular maturation and spermatogenesis of *M. nipponense* occurred early in summer (May to July), and generally spermatogenesis was absent in August. It could be concluded that May to July is the period when adult males of this species are sexually active, and androgenic gland showed signs of increased secretory activity.

Key words: Androgenic gland, Gonadosomatic index, Male sexual characteristics, Reproductive cycle

서 론

대부분의 연갑류는 자웅이체이나, 암수는 부화 후 어느 시기까지는 구분되지 않는다. 이러한 성의 미분화시기는 연속적인 탈피와 함께 암수의 성적 특성이 발현됨에 따라 종료되지만, 암수 모두 시원생식소 그리고 생식수관과 primordial androgenic gland를 가진다. 그리고 미분화시기의 종료는 androgenic gland (AG)의 발달 유무에 의해 성적 특징이 구분되어진다고 알려져 있다 (Charniaux-Cotton and Payen, 1984). 이러한 갑각류의 AG의 기능에 관해서는 Charniaux-Cotton (1954)에 의해 처음 보고된 이후, 거의 대부분 단각류나 등각류를 대상으로 그 구조적 특징에 관해 연구되어 왔다 (Radu and Cracium, 1976; Martin et al., 1990; Suzuki and Yamasaki, 1997). 이 연구들에 의하면 AG에서 androgenic gland hormone이 생성·합성되어 분비될 가능성이 많으며, 이 호르몬에 의해 수컷의 1차 성징과 2차 성징의 분화가 조절될 것으로 추측하고 있다 (Katakura, 1984; Charniaux-Cotton and Payen, 1984). 하지만, 십각류에 관해서는 징거미새우류인 *M. rosenbergii*의 어린 시기의 암컷에 AG를 이식하면 옹성화되고, AG를 제거하면 수컷의 제1, 2차 성징이 퇴화된다는 보고 (Nagamine et al., 1980a, b)와 성숙 단계에 따라 AG 세포의 활성이 달라짐으로 보아 생식소의 성숙에도 관여할 것이라 추측하고 있다 (Okumura et al., 1997).

저자들은 징거미새우 수컷 생식조절 기구를 구명하기 위한 연구의 일환으로 생식주기에 따른 AG의 조직학적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 징거미새우는 1997년 8월부터 1999년 7월까지 부산광역시 해동수원지 지류에서 매월 새우통발로 포획하여 동의대학교 동물 사육실에 설치되어 있는 FRP 수조 (120^W×250^L×70^H cm)에 옮겨 자연조건하에서 사육하였으며, 먹이로는 보리새우용 배합사료를 공급하였다. 그러나 수온이 약 12^oC 이하로 하강하여 채집 할 수 없는 시기인 11월부터 다음해 3월까지 조사 개체는 10월에 채집된 새우를 자연조건하에서 사육하면서 각 실험 재료로 사용하였다.

채집된 실험동물의 정소와 AG는 저배율 현미경하에서 각 부위를 절취하여 Bouin's 용액에 24시간 고정하였다. 고정된 각 조직들은 상법인 paraffin 절편법으로 5~6 μm 두께로 연속 절편하여 조직표본을 만들었다. 절편된 조직은 Hansen's hematoxylin-eosin으로 비교 염색하였다. 그리고 수정관을 포함한 생식소의 전체적인 성숙 상태는 생식소지수 (gonadosomatic index: GSI=생식소중량/체중×100)로 나타내었다. AG 세포들의 미세구조관찰을 위해서는 2.5% glutaraldehyde (0.2 M phosphate buffer, pH 7.2)에 4시간 동안 1차 고정 후, 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 후고정하여 ethyl alcohol series로 탈수하였다. 포매는 Epon 812를 사용하였다. 절편은 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)을 사

*Corresponding author: chhan@hyomin.dongeui.ac.kr

용하여 60~80 nm 두께로 만든 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였다. 염색된 조직은 200 mesh copper grid에 부착한 후, 투과형 전자현미경 (JEM 1200EX-II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

Androgenic gland (AG)의 위치는 마지막 가슴다리의 저절에 위치한 사정관의 후반부와 수정관의 말단부 사이에 위치하고 있다 (Kim et al., 1999). 사정관에 위치한 AG는 사정관의 환상근과 종주근으로 구성된 근육층에 결합조직에 의해 연결되어 있고, 수정관의 말단부에 위치한 AG는 근섬유 및 상피세포의 외피와 결합조직으로 연결되어 있다. AG의 세포는 몇 개의 세포들이 세포가닥 (strand)을 이루어 하나의 세포덩어리를 형성하고 이러한 세포덩어리들이 결합조직으로 연결되어 AG를 이룬다 (Fig. 1).

6~7월에 관찰된 정소의 각 세정관의 germinal ridge에서는 분열성숙중인 생식세포들이 관찰되고, 성숙 정자들은 각 세정관의

내강에 가득 채워져 있다 (Fig. 2-A). 8월부터는 정원세포, 정세포 그리고 정자는 관찰되지만, 대부분의 개체에서는 분열성숙중인 생식세포는 관찰되지 않는다 (Fig. 2-B). 그리고 각 세정관의 germinal ridge은 점차 퇴화되어 내강의 면적은 전반적으로 산란기에 비해 그 직경이 다소 증가되어 있다. 11월부터 다음해 2월까지의 정소는 보다 퇴화, 수축되어 있고 기저관 주변으로는 휴지기 상태의 정원세포가 그리고 내강에는 일부 잔여 정자만 관찰된다 (Fig. 2-C, D). 4월에는 정소의 germinal ridge에서 정원세포의 분열이 활발히 일어나고 (Fig. 2-E), 5월부터는 대부분의 개체에서 분열성숙중인 정모세포로 가득 채워져 있다 (Fig. 2-F). 그리고 6월부터는 다시 정자형성이 활발히 이루어지고 있다.

채집지의 연간 수온과 일장 및 생식소지수 (GSI)의 변화를 Fig. 3과 4에 나타내었다. 본 종의 GSI는 6월과 7월에 각각 1.19, 1.09로 연중 가장 높고, 1월과 2월에 각각 0.44, 0.49로 가장 낮다. GSI의 변화와 일장 및 수온의 환경 변화를 연관시켜 보면, GSI의 증가는 수온 12°C, 일장 12.5L/11.5D의 3월에 0.71로 증가하고, 수온 및 일장이 23.5°C, 14L/10D 전후로 되는 시기인 6월과 7월에 가장 높았다. GSI의 감소는 9월인 수온 20~22°C, 일장 13L/11D 전후에서 나타났으며, 수온 및 일장이 10.5°C, 10/14D 전후의 1월과 2월에 가장 낮게 나타났다. 이상 정소의 조직학적 조사와 GSI의 변화 결과 본 종의 생식주기는 계절적으로 뚜렷한 차이를 나타내어, 산란기 (6월에서 7월), 퇴화기 (8월에서 11월), 휴지기 (12월에서 2월) 그리고 성숙기 (3월에서 5월) 등의 연속적인 주기로 구분할 수 있었다.

산란기에 관찰된 AG 세포는 hematoxylin에 약하게 염색되는 염색결과 농염하게 염색되는 2~4개의 인을 갖는 타원형의 핵을 가진다. AG세포의 핵질과 세포질은 염기성 핵막을 경계로 쉽게 구분되나, 세포간의 경계는 그 구별이 어렵다. 각 세포가닥들은 잘 발달된 결합조직에 의해 둘러싸여 있다. 이 시기에서는 퇴화 중인 세포는 관찰되지 않는다 (Fig. 5-A). 산란기가 종료되어 퇴화기로 접어드는 8월의 AG는 산란기에 각 세포가닥을 둘러싸고 있었던 결합조직이 다소 퇴화되어 있다. 핵질과 세포질은 전반적으로 다소 비대해져 있으나, 산란기에 관찰되었던 인은 거의 관찰되지 않는다. 연중 생식소가 가장 퇴화된 시기인 휴지기의 AG는 그 면적이 가장 작고 핵질과 세포질 모두 퇴화, 응축되어 있다 (Fig. 5-B). 각 세포가닥과 세포의 경계도 매우 불명확하고 세포가닥을 둘러싸고 있었던 결합조직은 거의 관찰되지 않는다 (Fig. 5-C). 정소의 소엽 내강에는 분열성숙중인 정모세포들로 충만해져 있는 성숙기의 AG는 현저히 그 면적이 증가되어 있다. 핵질에는 몇 개의 인들이 산재하고 핵질의 형태는 대부분 난구형으로 산란기의 핵질과 거의 유사하지만, 세포질은 산란기에 비해 투명하게 나타났다. 한편, AG의 가장자리의 일부 세포들에서는 아직도 핵질과 세포질이 응축된 세포가 관찰된다 (Fig. 5-D).

투과형 전자현미경으로 관찰한 산란기 AG 세포의 특징은 Kim et al. (1999)의 보고와 같이 세포질에는 잘 발달된 조면소포체가 광범위하게 분포하고 시스터네는 대부분 층상구조로 나타나지만 종종 나선상으로 배열되어 지문형태로 관찰된다. 횡방향의 크리스테로 이루어진 미토콘드리아가 잘 발달되어 있다. 그리고 이 시기

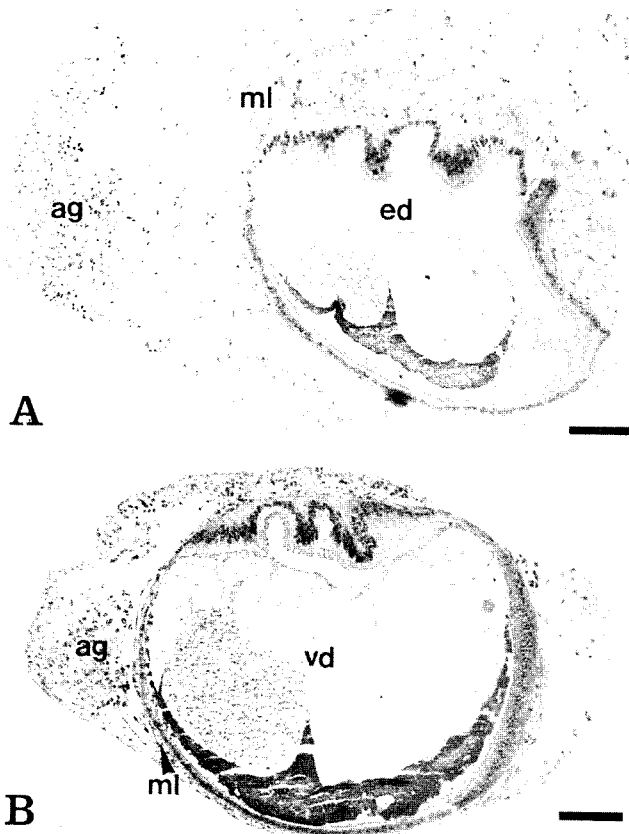


Fig. 1. *Macrobrachium nipponense*. Transverse sections of androgenic gland associated with vas deferens stained with hematoxyline and eosin. A: Androgenic gland of the ejaculatory duct. B: Androgenic gland of the distal portion of the vas deferens. androgenic gland (ag); ejaculatory duct (ed); muscle layer (ml); vas deferens (vd). Scale bar represents 50 μ m.



Fig. 2. *Macrobrachium nipponense*. Seasonal variations in the gonad history. A: June to July. Spermatogenesis in activation and sperm stored in the seminiferous cord. B: August. Division of spermatocytes is not observed. C: November. Spermatogonia near the germinal epithelium and resting sperm. D: January. The testis in atrophy. E: April. Spermatogonia in initiation of active cell division. F: May. variously staged germ cells. g, spermatogonium; s, sperm; sc, spermatocyte. Scale bar represents 50 μ m.

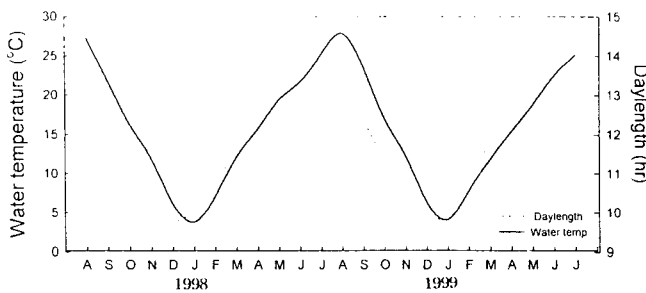


Fig. 3. Annual variations of water temperature and day-length at Lake Hoi-Dong.

의 AG 세포는 거의 동일한 크기, 구조 및 전자밀도를 보인다 (Fig. 6-A). 퇴화기 AG는 산란기에 광범위하게 분포하고 있던 충상구

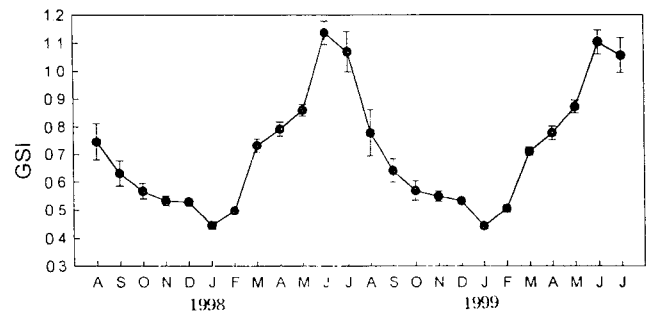


Fig. 4. *Macrobrachium nipponense*. Annual changes of gonado-somatic index (GSI) under natural condition. Vertical bars represent standard error.

조의 조면소포체는 소관이나 소낭의 형태로 변형되어 있고, 리보

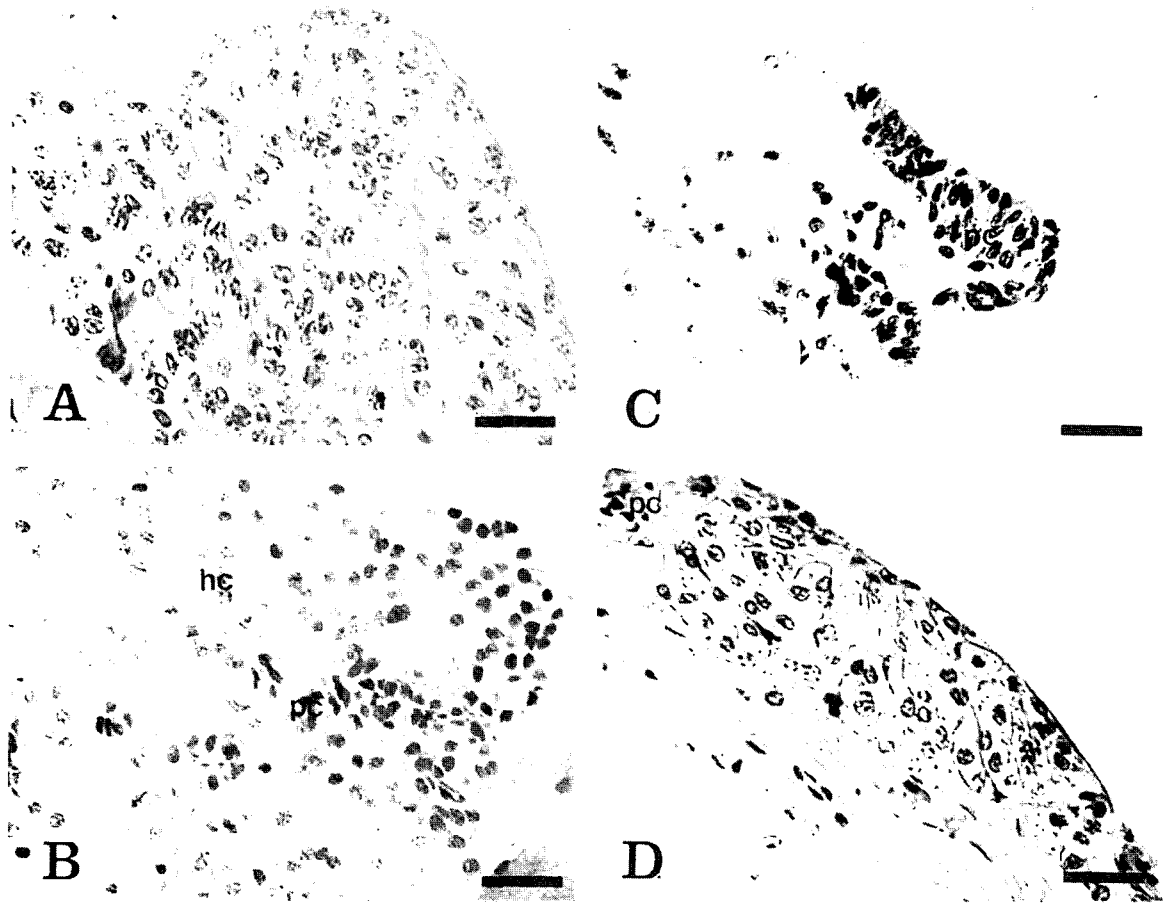


Fig. 5. *Macrobrachium nipponense*. Seasonal changes of the androgenic gland stained with hematoxylin and eosin. A: Androgenic gland in the spawning period. No areas of cell degenerated are present. B: Androgenic gland in the resting period. Occasional areas of cell degeneration are present in most glands and are characterized by the presence of hypertrophied cells with vesicular cytoplasm and often with disrupted cytoplasmic membranes; the nuclei are enlarged and often are either pyknotic or absent. C: Androgenic gland in the recovery period. Androgenic gland, as a whole, atrophied significantly in size and shows a pyknotic nucleus and vacuolated cytoplasm. D: Androgenic gland in maturation filled with regenerated cells. hc, hypertrophied cell; pc, pyknotic cell. Scale bar represents 30 μ m.

숨의 수가 현저하게 감소되어 있다. 미토콘드리아는 크리스테의 형태가 불규칙하고 그 수가 감소되어 있다. 그리고 일부 세포질에는 세포소기관이 퇴화 소멸되어 공포로 되어진 경우도 관찰된다 (Fig. 6-B). 휴지기에서는 AG 세포의 대부분이 핵질과 세포질 모두 소멸되는 양상을 보인다 (Fig. 6-C). 성숙기의 AG 세포는 핵질의 크기가 증가되어 있고 다수의 인이 관찰된다. 그리고 세포질에는 조면소포체 등 세포소기관이 발달 중에 있다 (Fig. 6-D).

고 찰

온대지역이나 아한대지역에 서식하는 대부분의 십각류들은 계절적 변화에 따라 뚜렷한 생식년주기를 가지며 이러한 생식주기는 수온과 일장의 변화에 영향을 받기 때문인 것으로 알려져 있다 (Kon and Honma, 1970; Pillay and Nair, 1971; Berrill, 1982; Somerton and MacIntosh, 1985). 본 종의 경우도 생식년주기는 수온과 일장의 변화와 깊은 관련이 있는 것으로 나타났다.

한편, 본 종의 AG 세포는 생식주기에 따라 핵질의 응축과 세포질의 공포화 정도에 따라 staining property의 변화, 핵질의 크기, 인의 수 등의 변화가 관찰되고 특히, 생식소지수가 가장 높고 정자형성과 교미 및 산란행동이 활발히 일어나는 6월에서 7월에 여러 개의 인 갖는 핵질, 가장 농염되는 세포질을 가지며 퇴화 중인 세포들이 관찰되지 않는 점등으로 보아 이 시기에 AG세포의 분비활성이 가장 높은 것으로 판단되었다. 하지만 분비물질의 양적 변동과 특성에 관해서는 향후 자세한 연구가 필요하다.

그리고 AG의 분비양식은 퇴화기에 동일 개체의 동일한 AG 내에서도 세포질 공포를 갖지 않는 작고 농염하게 염색되는 세포와 세포질에 공포를 가지며 상대적으로 투명하고 비대해진 세포 등 퇴화정도가 다른 세포 군들이 관찰됨으로서 본 종의 AG는 전분비선인 것으로 판단된다. 그리고 Carpenter and DeRoos (1970)는 가재의 일종인 *Orconectes nais*에서 Radu and Cracium (1976)은 육상 등각류의 일종인 *Porcellio scaber*에서 이들의 AG도 전분비선이라 보고하고 있다.

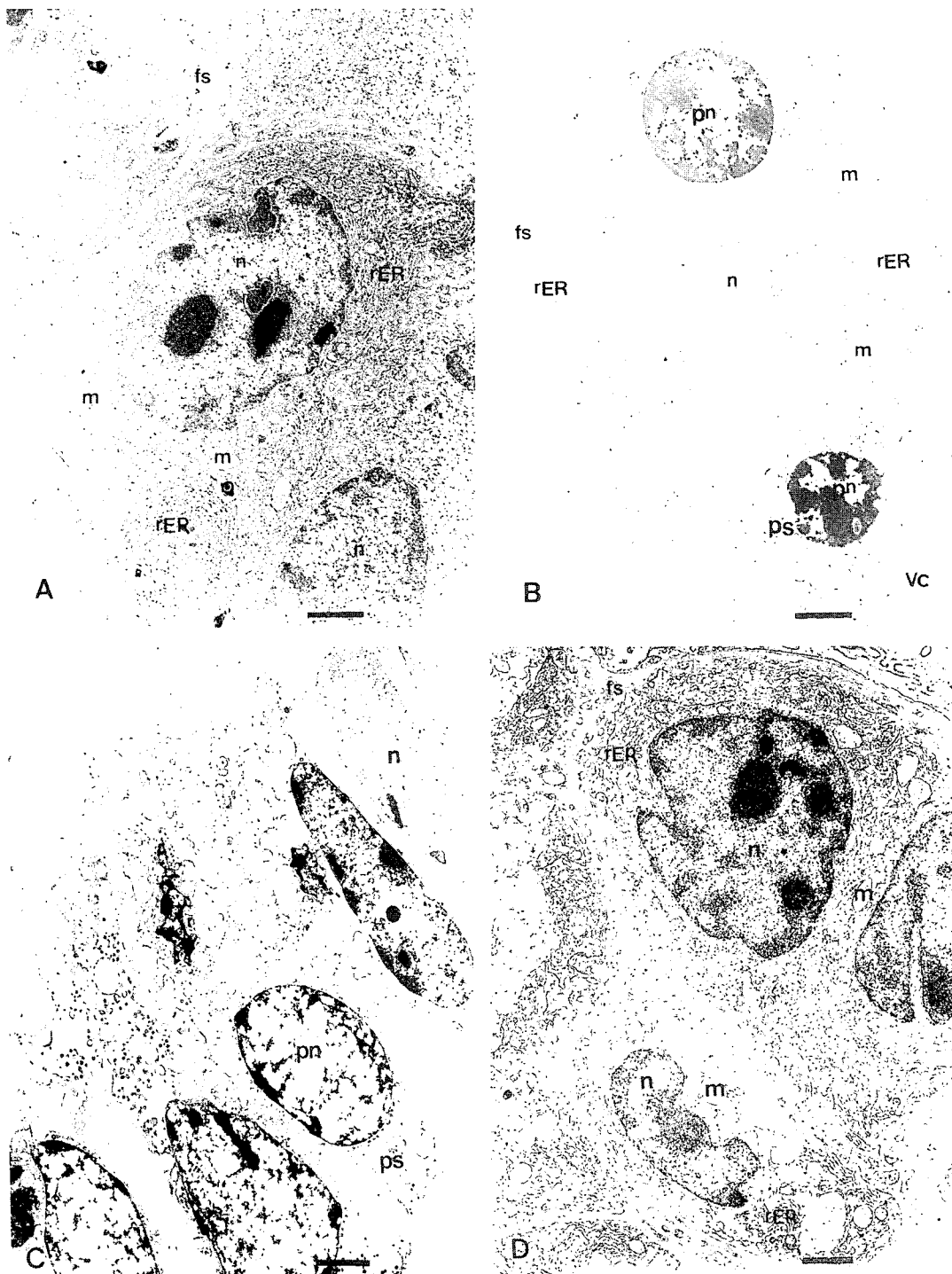


Fig. 6. *Macrobrachium nipponense*. Transmission electron micrograph of the androgenic gland cells. A: Androgenic gland in the spawning period. The gland is encased in a fibrous sheath about $0.2\ \mu\text{m}$ in thickness. Well-developed rough endoplasmic reticulum and other organelles are observed. B: Androgenic gland in the resting period. The earliest stage of degeneration in which the nucleolus disappears and the organelles are degenerated. The further degenerated cells showing fragmented cell membrane and pycnotic nucleus. Rough endoplasmic reticulum is smaller and sac-shaped and mitochondrial cristae are irregularly arranged. C: Androgenic gland cells in the recovery period. Note that the inner and outer membranes of the pycnotic nucleus are separated each other and wide spaces are noted between them. D: Androgenic gland cells in maturation. Nuclei are hypertrophied with nucleoli. Cell organelles are developing in most of the cytoplasm. fibrous sheath (fs); mitochondria (m); nucleus (n); rough endoplasmic reticulum (rER); pycnotic nucleus (pn); perinuclear space (ps); vacuole (vc). Scale bar represents $2\ \mu\text{m}$.

AG의 성장에 관해 Carpenter and DeRoos (1970)는 AG 세포가 상대적으로 크기가 작고 농염하게 염색되는 시기에 AG의 면적이 가장 크게 관찰되는 점으로 보아 AG의 성장은 세포비대 현상으로 이루어지는 것이 아니라, 유사분열에 의해 성장되는 것으로 보고하였고, 본 종에서도 유사분열에 의한 성장이 이루어지는 것으로 추측한 바 있다 (Kim et al., 1999).

Taketomi (1986)와 Taketimi et al. (1996)은 가재류의 일종인 *Procambarus clarkii*의 AG 세포는 세포질에 조면소포체, 미토콘드리아, Golgi 복합체 등과 같은 세포소기관이 충만하게 산재하여 전자밀도가 높은 세포와 세포소기관이 상대적으로 적고 핵의 내·외막이 분리되어 perinuclear space (Miyawaki and Taketomi, 1978)를 갖는 2 종류의 세포들이 연중 관찰되며 perinuclear space를 갖는 세포들은 성적으로 비활성기에 현저히 많은 비율을 차지하는 점으로 보아 이들 세포활성은 perinuclear space를 갖지 않은 세포에 비해 낮은 것으로 보고하였다. 한편, 본 종의 경우는 퇴화기에 perinuclear space를 갖는 세포들이 일부 관찰되기 시작하여 휴지기에 가장 많은 비율을 보였으며 성숙기와 산란기의 세포들에서는 거의 관찰할 수 없었다.

앞으로 AG의 기능을 보다 명확하게 밝히기 위해서는 AG의 절제에 따른 1, 2차 성징의 변화와 AG hormone을 분리하여 그 특성을 밝히는 연구가 필요하다.

요 약

Androgenic gland는 대부분의 수컷 연갑류의 제1, 2차 성징의 분화와 성적행동을 유발시키는 호르몬을 분비하는 것으로 알려져 있다. 생식소지수와 정소 및 AG의 조직학적 조사결과, 본 종에서 정자형성이 활발히 일어나는 시기는 5~7월이며 8월부터는 대부분의 개체에서 정자형성은 관찰되지 않았다. 따라서 본 종의 수컷은 5월에서 7월이 성적으로 가장 활발하며 이 시기에 AG는 increased secretory activity를 나타내는 여러 징후를 보인다.

참 고 문 헌

- Adiyodi, K.G. and R.G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. *Biol. Rev.*, 45, 121~165.
- Berrill, M. 1982. The life cycle of the green crab *Carcinus maenas* at the northern end of its range. *J. Crust. Biol.*, 2, 31~39.
- Charniaux-Cotton, H. 1954. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires males. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 239, 780~782.
- Charniaux-Cotton, H. and G. Payen. 1984. Sexual differentiation in malacostracans. -In: D.E. Bliss and L. Mantel, eds., *The biology of Crustacea*, 9, 257~265. Academic Press, New York.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanism of crustacean. *J. Crust. Biol.*, 7, 1~24.
- Katakura, Y. 1984. Sex differentiation and androgenic gland hormone in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Symp. zool. Soc. London.*, 53, 127~142.
- Kim, D.H., J.H. Kang, D.J. Kim and C.H. Han. 1999. Ultrastructure of the androgenic gland of the freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Dev. reprod.*, 3, 53~58 (in Korean).
- King, D.S. 1964. Fine structure of the androgenic gland of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 4, 533~544.
- Kon, T. and Y. Honma. 1970. Studies on the maturity of the gonad in some marine invertebrates. IV. Seasonal changes in the ovary of the tanner crab. *Bull. Japan. Soc. Fish.*, 36, 1021~1027.
- Martin, G., P. Juchault, O. Sorokine and A. Dorssetlaer. 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80, 349~354.
- Miyawaki, Y. and Y. Taketomi. 1978. The occurrence of an extended perinuclear space in androgenic gland cells of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cytologia*, 43, 351~355.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman. 1980a. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41, 423~441.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman. 1980b. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41, 442~457.
- Okumura, T., M. Hara, M. Hara and M. Okiyama. 1997. Possible roles of the androgenic gland in male reproduction in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. XIII International Congress of Comparative Endocrinology, 73~77.
- Pillay, K. and N.B. Nair. 1971. The annual reproductive cycles of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) from the South-west coast of India. *Mar. Biol.*, 11, 152~166.
- Radu, V.Gh. and C. Cracium. 1976. The ultrastructure of the androgenic gland in *Porcellio scaber* Latr. (Terrestrial Isopods). *Cell Tissue and Res.*, 175, 245~263.
- Somerton, D.A. and R.A. MacIntosh. 1985. Reproductive biology of the female blue king crab *Paralithodes platypus* near the *Pribilof islands*, Alaska. *J. Crust. Biol.*, 5, 365~376.
- Suzuki, S. and K. Yamasaki. 1997. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107, 136~146.
- Taketomi, Y. 1986. Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cell Biol. Internl. Rep.*, 10, 131~136.
- Taketomi, Y., M. Murata and K. Imakado. 1996. On the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Natural Sci. Kumamoto Univ.*, 31, 65~72.

2001년 9월 29일 접수

2002년 5월 2일 수리