

韓國產 미꾸리에 관한 育種·繁殖學的 研究 III. 初期 卵發生

이종영 · 윤종만 · 이재현 · 신재구 · 박홍양
(건국대학교 축산학과 동물 유전 육종학 연구실)

Breeding and Reproductive Studies on Korean Native Loach III. Early Embryonic Development

Lee J.Y., Yoon J.N., Lee J.H., Shin J.K., Park H.Y.

Animal Science, Kon-Kuk University

Abstract

This study was carried out to investigate the appearance time of the second polar body for producing Gynogenesis or Triploid which could be obtained by arresting the second polar body by cold shock, and then blastoderm was used to measure fertility that revealed the nature of oogenesis, the effects of water temperature on fertility, hatchability, abnormality, viability and growth rate, and the water temperature and the breeding methods to prevent early death of larvae in Korean loach (*Misgurnus anguillicaudatus*); the results obtained in this study were summarized as follows.

The second polar body was observed on the surface of plasma disc close to micropyle within 10~40 min after fertilization at 29°C. Artificial insemination had to be done immediately after the egg spawning because the spermatozoa of loach lose their mobility within 2 minutes when they were exposed to water. The amount of time needed to reach at blastoderm stage was 12 hours if fertilized eggs were incubated at 16°C, 8 hours at 19°C, 6 hours at 21°C, 5 hours at 23°C, 4 hours at 26°C and 3 hours 30 min at 29°C showing the shorter time for development of eggs at higher temperature.

Fertilization rates in water temperatures of 19°C, 21°C, 23°C, and 26°C were higher than those of water temperatures, 16°C and 29°C. Water temperatures at 19°C, 21°C, and 23°C showed higher hatching rates than those of 16°C, 26°C, and 29°C, while abnormal rates in 16°C, 19°C, 21°C and 23°C were lower than that of 26°C and 29°C. Water temperatures at 16°C, 19°C, 21°C, 23°C and 26°C respectively, were more efficient than 29°C in survival rates.

The embryos were hatched at 72 hours after fertilization in 16°C water temperature, 48 hours in 19°C, 40 hours in 21°C, 32 hours in 23°C, 25 hours in 26°C, and 16 hours in 29°C. Within three days after hatched out, the larvae grew 3mm in total length, the yolk granules were entirely consumed and the head and the trunk became thicker. Within 45 days after hatched out. the larva grew 25mm at 29°C, 21mm at 26°C, 16mm at 23°C, 15mm at 21°C, 12mm at 16°C in a 30litre glass aquarium.

I. 서론

미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)는 우리나라 뿐만 아니라 일본, 중국, 대만, 소련, 인도네시아, 인도 등 아시아 지역에 특이적으로 분포되어 있는 어종으로서, 그 특성을 보면, 수심이 얇은 논이나 河川, 湖水 등을 서식처로 삼고 있으며 추위와 가뭄에 강하고, 낮은 용존산소량의 수질에도 잘 견디는 雜食性 淡水魚類로서, 담수어의 경우 사료계수가 1.5로서 육상가축에 비하여 飼料 效率이 높아 경제성과 경쟁력을 두루 갖춘 어종으로 알려져 있다.

미꾸리는 육질면에서 脂肪含量(2%)이 낮고 蛋白質含量이 높아 고급단백질 공급원으로서 우리나라와 일본 등지에서 그 수요가 증가하고 있는 추세이다.

미꾸리에 관한 연구는 Suzuki와 Yamaguchi(1975, 1977)가 hCG(human chorionic gonadotropin)를 암컷 미꾸리에 주입한 후 수온이 산란과 성숙에 미치는 영향에 관한 연구를 하였으며, Suzuki(1983)는 미꾸리의 年中産卵에 관한 연구와 저온충격에 의한 3배체 미꾸리의 생산 등의 미꾸리 사양과 생산을 증대를 위한 연구를 실시하였다.

그리고 현재까지 보고된 일반어류의 생리, 번식 등에 관한 연구로서는 문치가자미(Hirose 등, 1978), 미국산 메기(Espinach, 1984), 호주산 대구(Rowland, 1988) 등에서, 계절별 수온의 변화에 따른 成長率에 관한 연구가 금붕어(Ouchi, 1969)에서, 그리고 치어의 受精率, 孵化率, 成長率, 生存率, 畸形率에 관한 연구는 닥치(Kitajima, 1988), *Diplodus vulgaris*(Jug-Dujakovic와 Glamuzina, 1988), 미국산 메기(Espinach, 1984), *Tkifugu chrysops*(Fujita, 1986), Sorpaenid Fish(Kimura, 1989), *Pseudoblenius cottoides*(Kimura, 1988) 등에 까지 시행되었다.

그러나, 인공수정에 의해 생산된 많은 치어들은 일정기간 사육되면서 斃死量이 증가하는 단점이 나타나는 데, 이것의 원인으로는 첫째, 水質 및 水溫의 不適合, 둘째, 集中飼育시 사료에 의한 水質汚染과 飼料攝取후 消化不良에 의한 大量斃死, 셋째, 환경의 변화에 대한 適應性的 약화 등을 들 수 있다.

어류는 부화시 수온에 따라서 發生段階 및 수정율, 부화율, 기형율, 생존율 등에 커다란 차이를 보이고 있어서, 성공적인 人工孵化를 위해서는 제 성적이 높은 부화 온도역을 찾아내는 것이 그 관건이며, 또한 초기 치어의 飼育水溫과 먹이에 관한 문제를 해결함으로써 초기 단계에서의 大量斃死를 방지하고 生産性을 높일 수 있다고 사료된다.

따라서 자성생식성 2배체, 응성생식 및 3배체의 개체를 생산하기 위하여 수정후 제2극체의 출현시기를 밝혀내고, 그 이외에 수온이 受精率, 孵化率, 畸形率 및 生存率에 미치는 영향을 연구하기 위해서 본 연구가 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 材 料

1) 供試動物 및 飼養管理

1990년 2월부터 1991년 5월까지 建國大學校 畜産大學校 附設 養魚場에서 水溫이 각각 16°C, 19°C, 21°C, 23°C, 26°C 및 29°C이고, 溶存酸素量이 6.2±0.5ppm, pH 7.2인 正常的인 光週期를 받는 타원형 plastic통 6개(용량 150L)의 水族館에서 N.R.C. 飼養標準에 準한 펠렛트 配合飼料를 給與하여 1개월간 馴致, 適應시킨 후 飼育中인 體重 15~30g인 미꾸리 암컷 50마리와 수컷 150마리를 供試驗魚로 利用하였다. 본 실험에서 이용된 産卵 및 採精 직전의 성숙된 미꾸리의 腦下垂體, 卵子 및 精子는 Plate I -1, 2, 3, 4에 나타난 바와 같다.

2. 方 法

1) 精子의 活力度

Ringer's solution으로 만든 희석정액을 slide glass에 소량 점적한 후 담수를 첨가하여 담수에 노출된 후 정자의 활력지속시간을 현미경하(×400)에서 관찰하였다.

2) 人工受精 및 孵化

인공 산란 유기는 Suzuki와 Yamaguchi(1976)의 방법을 변형하여 hCG(Serno Co., Swiss) 10 IU/g을 미꾸리 복강에 주사한지 10시간후 인위적으로 산란을 유기시켰고, 이 때의 수온은 25°C로 유지시켰다.

산란된 알의 수정방법은, 수컷을 절개하여 정소조직을 핀셋으로 적출하는 방법으로써 3마리의 정소조직당 Ringer's solution 20ml의 비율로 混濁液을 만들고, 이 混濁液을 암컷의 복강에서 卵이 사출될 때 스포이드로 떨어뜨려 卵이 부화망에 흘러내리는 과정에서 수정되도록 유도하였다.

부화관으로는 산소의 공급을 원활히 하고 卵이 서로 겹치는 것을 방지하기 위하여 사각형의 plastic판에 卵의 크기보다 약간 작은 공극이 있는 망(0.5~0.7 mm)을 이용하여, 수온이 16°C, 19°C, 21°C, 23°C, 26°C 및 29°C인 부화조에서 부화를 유지하였다.

3) 受精卵의 觀察方法 및 比較

실제 현미경(Micromanipulator Microscope Co. Model MSS-100, USA, Video Camera(Bausch & Lomb Co., USA)과 광학현미경(Hertel & Reuss Co., W-Germany)에 각각 설치한 후 현미경하에서 수정을 유지하여, 수정란과 미수정란의 차이점을 관찰하였고, 수정 및 수정란의 발달과정을 CCTV를 통하여 관찰하면서 촬영하였고, 같은 방법으로 양어장에 설치된 여러가지 수온의 부화조에 있는 受精卵을 수정 직후부터 6시간 까지는 2시간 간격으로, 그 이후는 6시간 간격으로 실험실에 가져와 각 수온의 발생단계를 비교 관찰하였다.

4) 受精率, 孵化率, 生存率 및 畸形率의 算出

受精率은 3.5~12시간이 경과한 후 육안으로 卵의 수정 여부를 관찰하였고, 孵化率과 畸形率은 각 溫度群에서 부화된 稚魚의 數를 확인하여 계산하였고, 生存率은 부화 3일후 생존한 稚魚의 수를 계산하여 구하였다.

5) 水溫別 成長率

인공수정에 의해 부화된 치어를 5개의 수조(30×70×40cm)에 20L의 물을 넣은 뒤 16°C, 20°C, 23°C, 26°C 및 29°C로 온도를 맞추고 45일간 사육한 뒤 각 온도에서의 생존율과 성장율을 비교하였다.

6) 電子 顯微鏡的 方法(TEM)

각 組織片을 pH 7.3인 0.1M phosphate buffer가 포함된 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이 ethanol溶液으로 계속해서 脫水시킨다. Epon 812로 包埋 封埋(embedding)시키고, 超薄切器(ultramicrotome)로 50nm의 크기로 超薄切시킨 후 일부는

toluidine blue로 염색시켰고, 나머지 일부는 uranyl acetate와 lead citrate로 染色시킨 다음, 電子顯微鏡으로 70kV의 電壓하에서 檢鏡한다.

7) 統計 處理

모든 結果의 處理는 컴퓨터 프로그램인 SAS package를 利用하여 mean±S.D.로 나타내었고, Pearson 相關係數法을 利用하여 相關係數를 分析하였고, Quattro Pro 프로그램을 利用하여 각각의 그래프를 圖式하였다.

III. 結果 및 高찰

Plate I-1, 2, 3은 본 실험에서 이용된 產卵 및 採精 직전의 성숙된 미꾸리의 腦下垂體, 卵子 및 精子의 電子顯微鏡的 사진이고, Plate I-4는 超薄切(ultramicrotome)시킨 精素의 광학현미경 사진이다.

1. 受精適期

인공수정시 정자가 담수에 노출되었을 때 精子의 活力 지속시간을 알아보기 위하여 稀釋된 精液에 여러 水溫 조건을 주어 精子의 活力度를 검사하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 水溫이 精子의 活力度에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났으며, 높은 水溫에서 精子의 生存時間이 낮은 온도에 비하여 길게 나타났다.

그러나 정자의 운동성은 담수에 노출된 후 2분내에 운동성을 상실하기 때문에 성숙된 未受精卵이 미꾸리의 체외로 방출되는 즉시 精子와의 수정이 이루어지도록 해야 할 것으로 사료된다.

2. 水溫과 受精卵의 發達段階

孵化水溫 29°C에서 미꾸리 受精卵의 發生段階를 관찰한 결과, 수정후 5분이 경과한 卵에서는 표면에 직경이 약 10~40μm 정도의 表層胞(cortical alveolus)가 밀집되어 있는 것이 관찰되었으며, 외측은 제1차 卵膜(egg membrane) 또는 chorion이라 칭하여 이것은 卵 그 자체에서 분비된 물질에 의해 구성된 것이고, 어류중에는 2차막이나 3차막을 갖고 있는 것이 있는데, 메기의 卵에

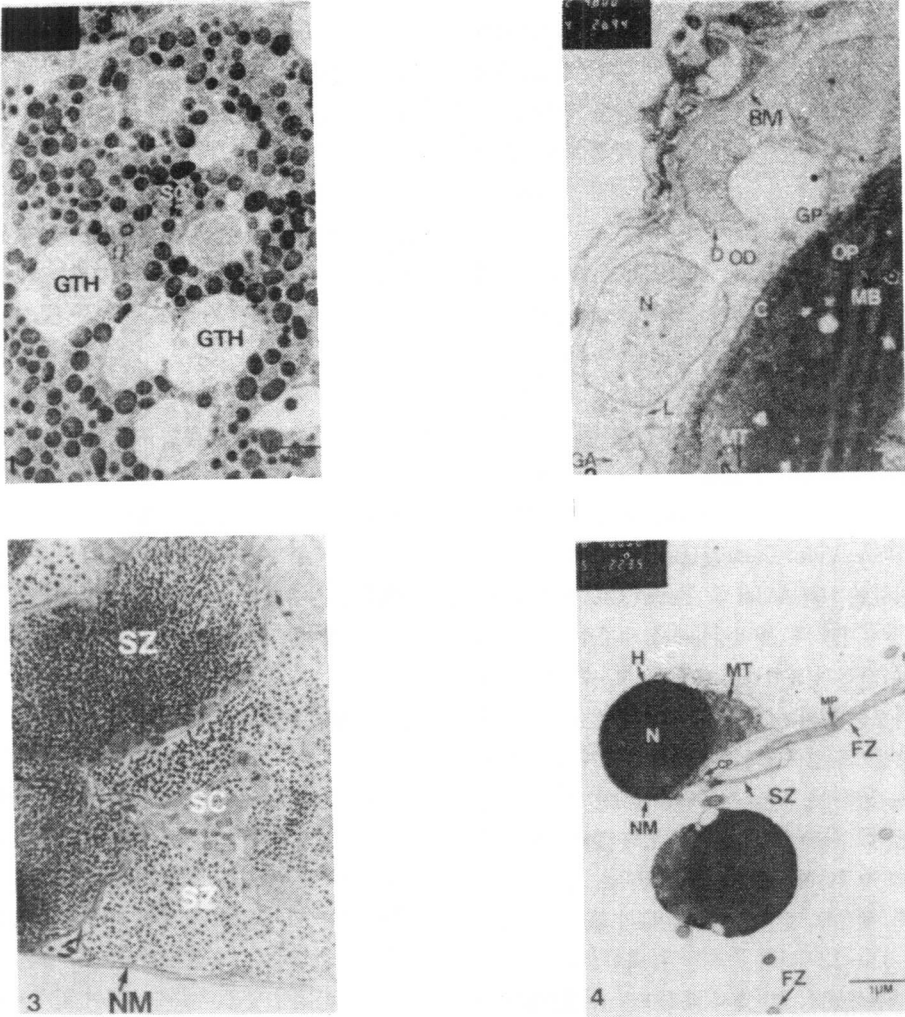


Plate I. Explanation of figures, light-microscoph and ultramicroscophs of pituitary, oocyte and test is of Korean loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).

1. Details of gonadotrophic cells(GTH) of rainbow trout caught in May, showing a few of secretory vesicles(SV), a large quantity of secretory granules(SG), and globules(GL), cisternae of the granular endopalsmic reticulum(GER) and nucleus. $\times 34,500$.
2. Prevulatory follicles(about $5.7\mu\text{m}$ in diameter). A Special granulosa cells as progesterone-producing cells contain charateristic mitochondria with tubular cristae and dense matrix. BM:Basement membrane, C:Chorion, D:Desmosome, GP:Projection from granulosa cell. L:Lysosome-like body, MB:Mutibody, MT:Mitochondria, N:Nucleus, OD:Oil droplets, GP:Projection from ooplasam. $\times 11,000$.
3. Testis showing spermatozoa in May. SC:Spermatocytes, SZ:Spermatozoa. $\times 400$.
4. Spermatozoa. Metamorphosis of spermatids to form spermatozoa occurs within the lobule lumen. Their round-shaped heads have a mean width of $2\mu\text{m}$. The sperm often retain their organization into parachute-shpaed clumps due to adhesion of the sperm tails and reduced spermatogenetic activity in the lobule walls. CP:Connecting piece. FZ:Flazellum. H:Head, MT:Mitochondria, MP:middle piece, N:Nucleus, NM:Nuclear membrane, PP:Principal piece. $\times 23,000$

서 볼 수 있는 제2차 卵膜은 卵이 난소중에 있을 때 난포세포에서 분비된 막이고, 3차막은 수란관을 통하는 과

정에서 부가된 물질이나 반드시 막상을 하고 있지는 않다 (Plate II-5)고 보고하고 있다(降島과 羽生, 1989).

Table 1. Sperm motility according to various water temperature

Time	1min	1.5min	2min	3min	4min	8min	10min
16°C	+++	++	+	±	-	-	-
20°C	+++	++	+	±	-	-	-
24°C	+++	++	+	±	-	-	-
29°C	+++	++	+	±	±	±	-

수정후 10분이 경과하면, 정자의 침입으로 표층포의 붕괴가 일어나며, 세포막과 난막 사이에 위란강(perivitelline space)이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다 (Plate II-6).

수정 20분 후에는 胚盤(blastodisc)이 형성되기 시작하여, 30분경이 되면 胚盤이 완전히 형성되며, 세포질은 동물극(animal pole)쪽으로 모이는 것이 관찰되었다 (Plate II-7).

수정 35분 후에는 배반의 중간 끝부분에 하나의 홈이 생겨 2개로 분할하면서 제1분열이 끝나게 되며(Plate II-8), 제2극체는 수정후 약 10분경부터 40분경까지 용이하게 관찰되었다.

수정 45분후에는 제1분열면에 직각으로 제2분열이 일어나 4세포로 되었다(Plate II-9). 이것은 다른 연구보고와 대체로 일치하는 경향을 보인다. 즉, Suzuki는 미꾸리에서 수정후 8분에서 35분경까지 제2극체를 관찰하였다고 보고하였으며(Suzuki 등, 1985), 독가시치(*Siganus fuscescens*)는 부화수온 23.5~26°C에서 1시간후 4세포로 분할했다고 한 것과 시간이 유사하게 나타났다(Fujita, 1986).

수정후 1시간 20분이 경과하면, 상실배기(morula stage)가 되고(Plate II-10), 수정후 3시간 30분 경과하게 되면 포배기가 되었다. 이 포배기는 세포에 고유의 성질이 부여되고 형태형성이나 세포분화의 기초로 되는 중요한 단계이기 때문에 이 시기까지를 수정율의 척도로 이용하였다(Plate II-11).

수정후 5시간이 지나면 낭배기(gastrula)로서 포배의

후기가 되며 난황을 씌운 것처럼 넓어지며 평평하게 되고 (Plate II-12), 배환(germring)을 형성하게 된다 (Plate II-13).

수정후 8시간 후에는 배환의 함입이 일어나고, 이 시기를 신경배 형성(neuralation), 즉 신경배라 하고 (Plate II-14), 9시간 후의 형태로 안포와 체절이 나타난 것을 확인할 수 있었으며(Plate II-15), 10시간 후에는 체절이 더욱 발달되었고, 이 시기부터 움직임이 나타났다(Plate II-16, 17).

수정 12시간후 난황과 미부가 분리되기 시작하여 부화전기(Plate II-18), 부화중기(Plate II-19), 부화후기(Plate II-20) 단계로 발달하였다.

난막을 뚫고 나온 부화 직후 치어의 복부에 난황이 다량 존재하는 것이 관찰하였고(Plate II-21, 22), 부화후 1~2일이 경과하면 치어의 난황이 흡수되고 체표면이 melanin 색소의 형성으로 인해 검은 색으로 변화되는 것이 관찰되었다(Plate II-23, 24).

따라서 치어의 난황은 체내로 흡수되어 영양물질로 이용되는 것으로 생각되기 때문에 부화 3일부터 치어에 먹이를 공급해야 할 것으로 사료된다.

난 발달 과정에서 중지란 및 기형란을 나타낸 것으로서 배반이 형성되었으나 그 이상의 단계로는 발달이 진행되지 않고 중지된 것으로(Plate II-25), 형성된 배반이 분할을 계속하지 않고 난황과 분리되는 기형란(Plate II-26)과, 상실기로 발달 도중 난황이 진행되지 않은 중지란(Plate II-27)이며, 포배기로 발달 도중에 난의 발달이 중지된 중지란(Plate II-28)이다. 그리고 세포질이

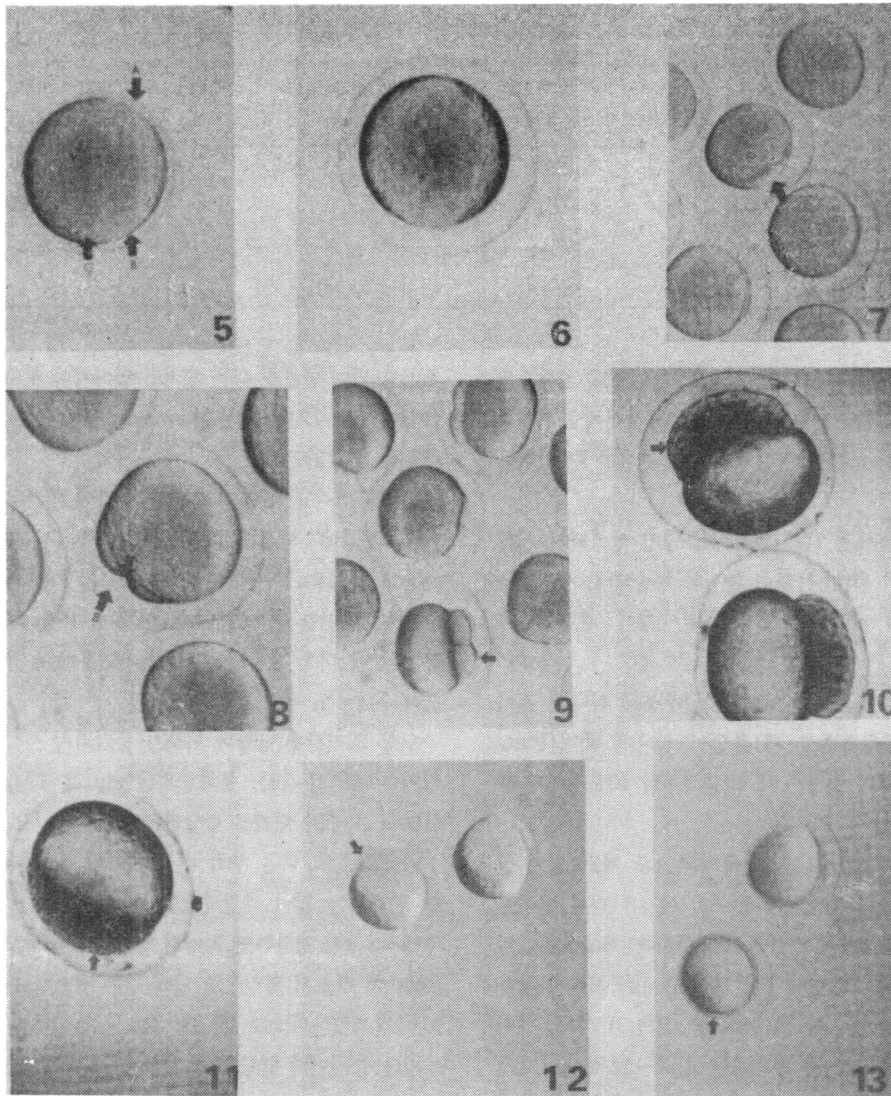
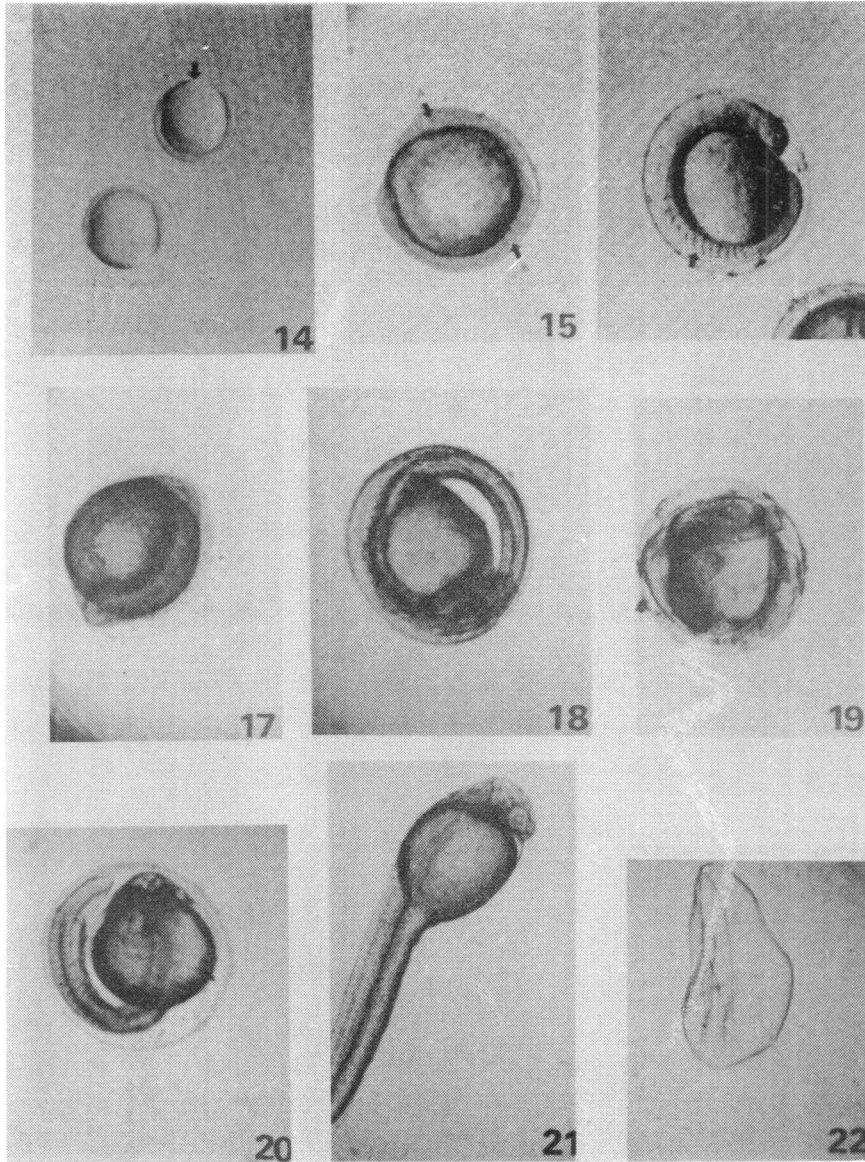
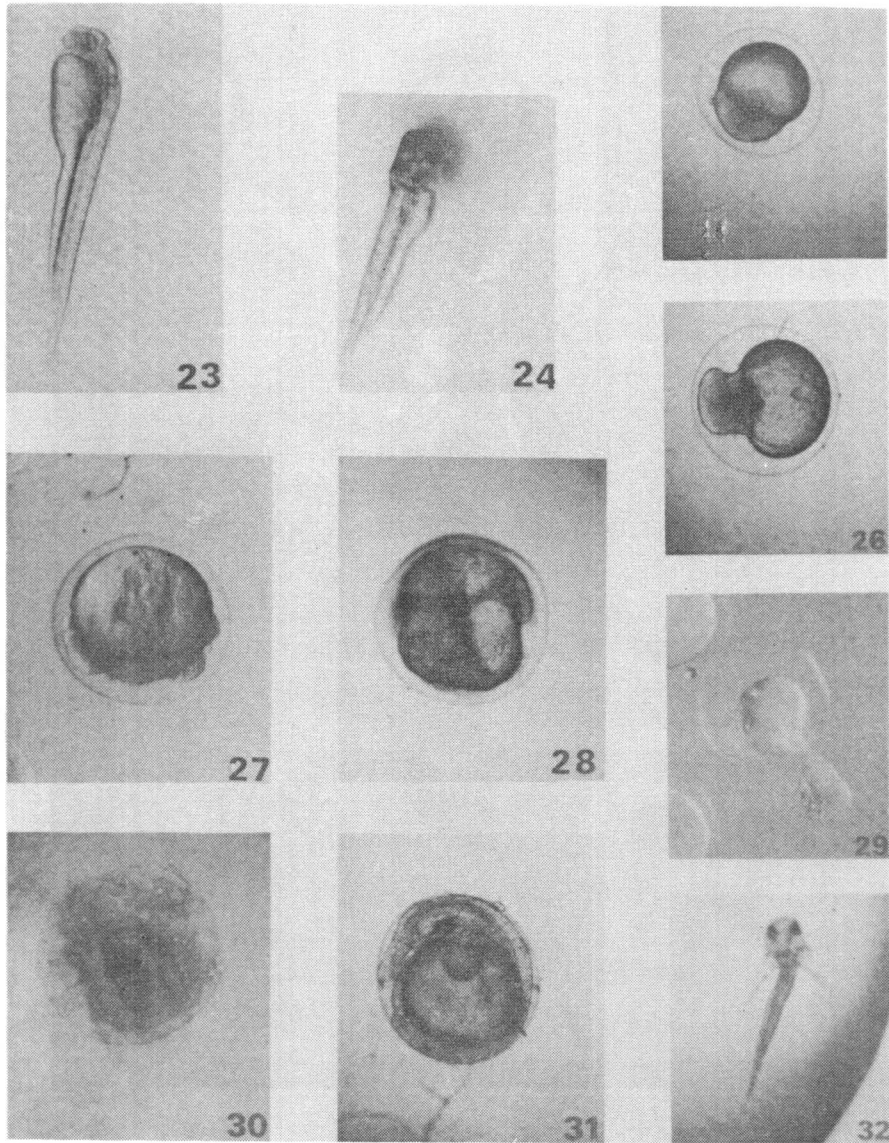


Plate II. Early embryonic developmemnt in Korean loach(*Misgurnus anguillicaudatus*).

- 5. About 5 min after insemination. A:egg membrane, B:plasma membrane, C:cortical alveolus
- 6. About 10 min.
- 7. About 20 min:showing blastodisc.
- 8. 35min:2 cell stage
- 9, 10:about 45min, 4 cell stage. about 1 hr 20 min, morular stage.
- 11, 12:3hrs 30min:blastular stage. 5hrs:gastrula stage.



13, 14:6hrs:germ ring formation. 7hrs:subsidence of germ ring.
15, 16:9hrs:somite formation. 10hrs:thicker somite.
17, 18:the other of figure 16. 12hrs:the former stage before hatching
19, 20:14hrs:the middle stage. 16 hrs:the last stage.
21, 22:19hrs:newly hatched larva. egg membrane after hatching:



23, 24: 1 day after hatching. 2 days after hatching.

25, 26: 1, 2 hrs: suspended egg at blastodisc formation stage

27, 28: 2 hrs: suspended egg at morula stage.

29, 30: plasma run from egg membrane. plasma spread egg membrane

31, 32: abnormal development. abnormal larva.

난막밖으로 빠져나온 중지란(Plate II-29) 및 세포질이 난막안에 퍼져있는 중지란 등을 관찰할 수 있었으며(Plate II-30), 비정상적인 발달을 하고 있는(Plate II-31) 수정란에서 부화된 기형치어를 관찰할 수 있었다(Plate II-32).

부화수온 16~29°C에서 수정란의 발달단계별 소요시간을 비교한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 포배기까지의 소요시간이 수정후 16°C에서 12시간, 19°C에서 8시간, 21°C에서 6시간, 23°C에서 5시간, 26°C에서 4시간, 29°C에서 3시간 30분이었고, Sharpnose puffer(Arai 와 Fujita, 1988)의 경우는 수온 22.8~25.0°C에서 6시간, Bitterling(Suzuki 等, 1989)는 22°C에서 10시간, 밀뿔(*Atherion elymus*)(Kimura and Tsukamoto, 1990)의 경우 수온 20.5~21.4°C에서 20시간 후이었다.

따라서 특정한 어종에 있어, 수정율의 판단시기는 부화

수온에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

3. 부화온도가 受精率, 孵化率, 畸形率 및 生存率에 미치는 영향

受精率, 孵化率은 19°C, 21°C, 23°C 및 26°C의 수온보다 16°C와 29°C의 저온과 고온의 수온이 낮았고, 기형율은 26°C, 29°C의 높은 수온이 16°C, 19°C, 21°C 및 23°C보다 높았으며, 생존율은 16°C, 19°C, 21°C, 23°C 및 26°C가 29°C보다 좋은 경향을 보였다.(Fig. 2)

따라서 온수어종인 미꾸리의 受精率, 孵化率은 저온과 고온에서 낮았고, 畸形稚魚는 낮은 온도보다는 높은 온도에서 출현율이 높았으며, 생존율은 높은 온도에서 다소 낮게 나타난 결과로 부화시 지하수 등을 可溫하여 수온을 26~29°C로 높게 유지할 필요성이 없다고 思料된다.

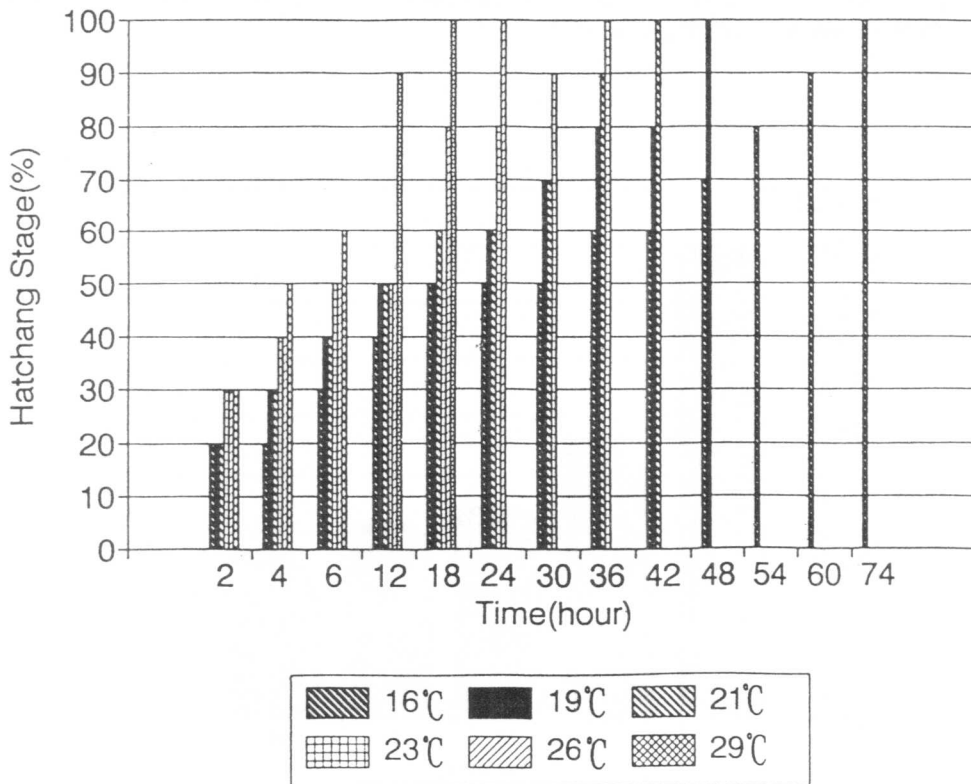


Fig. 1. Developmental stages of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) at different temperatures.

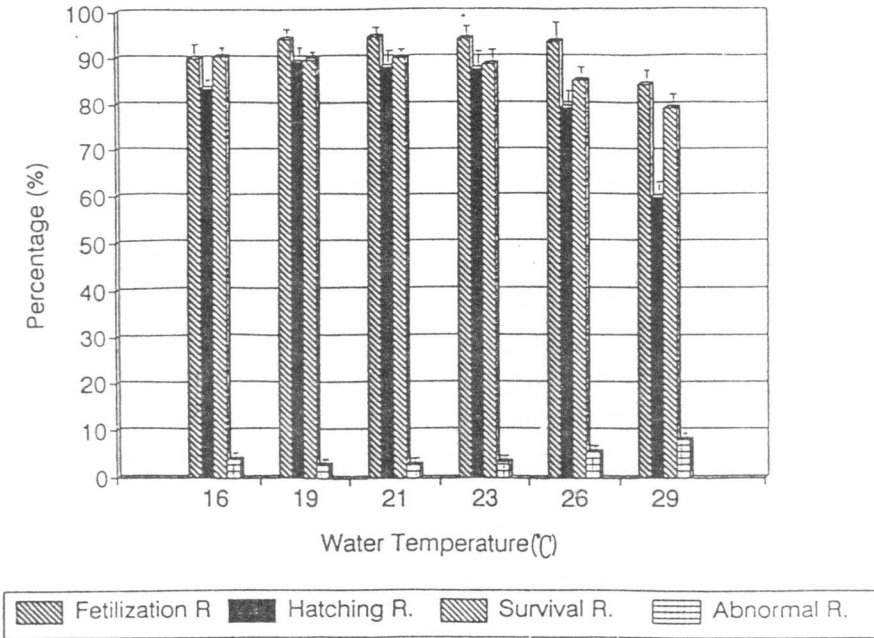


Fig. 2. Fertilization, hatching, abnormal and survival rates of the loach at different water temperatures. Vertical bars represent the mean \pm S.D.

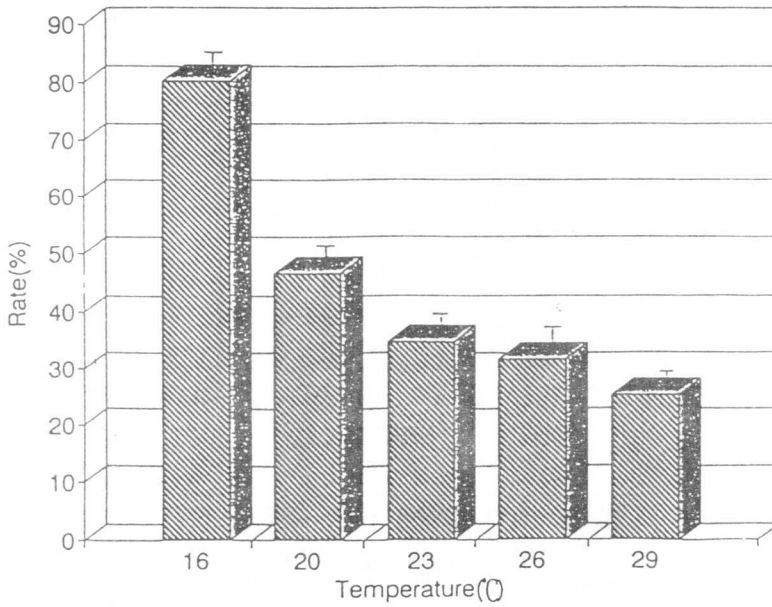


Fig. 3. Mortalities of the fry loach at different water temperatures. Vertical bars represent the mean \pm S.D.

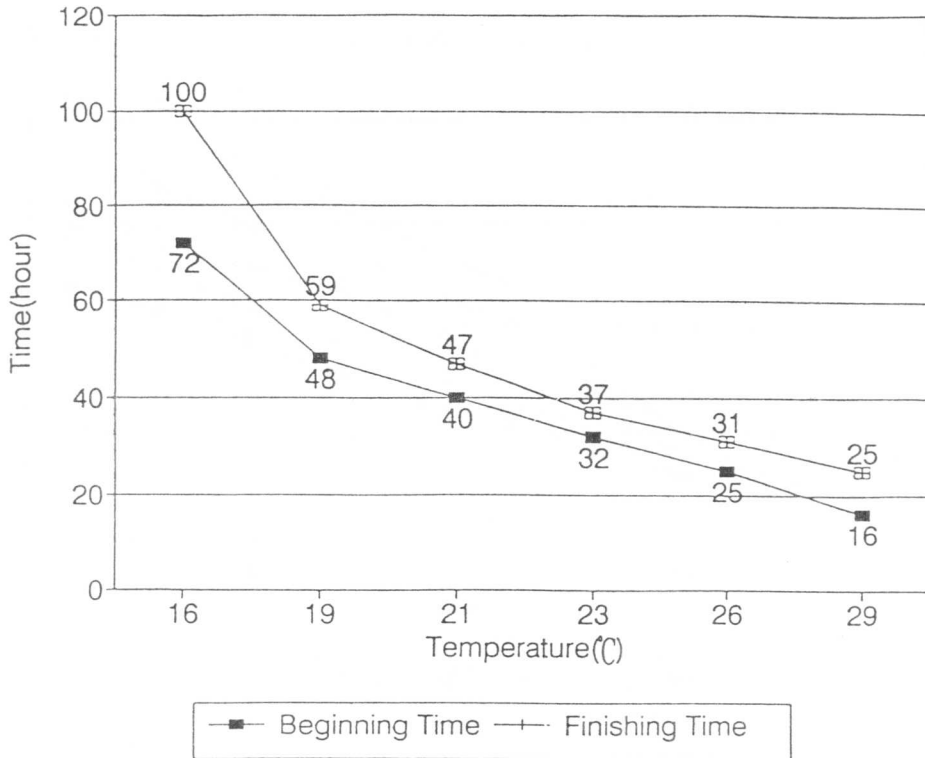


Fig. 4. Duration of hatching eggs of the loach at different water temperatures.

4. 수온과 孵化開始 시간과 孵化完了 시간

孵化開始 시간은 16°C에서 72시간, 23°C에서 32시간, 29°C에서 16시간 후이며, 孵化完了 시간은 16°C에서 100시간, 23°C에서 37시간, 29°C에서 25시간이 걸려서 수온이 높을수록 孵化開始 시간과 完了時間이 단축되는 경향을 보였다(Fig. 4).

*Seriola dumerili*는 수온 23.1~23.7°C에서 수정 38시간후 부화하였고(Masuma, 1990), 주굴감펍(*Scorpaena miostoma*)는 수온 22~24°C에서 수정 34시간 20분후 부화하였으며(Seishi Kimura, 1989), *Atherion elymus*의 경우 부화개시 시간이 수온 21~22°C에서 수정 297시간후 부화하였다고 보고하였다(Takita and Nakamura, 1986).

따라서 부화개시 시간은 어종 및 수온에 따라 커다란 차이가 있음이 관찰되었고 여러가지 수온에서 孵化開始 시간과 完了時間을 산정함으로써 부화시간이 길게 나타난 어종이나 수온에서는 부화시간이 짧은 것보다 환경적

인 주의가 요구된다고 사료된다.

5. 水溫과 成長率

부화직후의 먹이로는 윤충, 물벼룩, brine shrimp 등을 사용하고 있으나 인공수정에 의해 대량의 치어를 생산할 경우 이러한 먹이생물들을 공급하는데는 여러 제약조건이 따르게 된다.

따라서 본 실험에서는 이러한 문제를 극복하기 위해서 인공배합사료인 TP-1과 TP-3(부화초기 사료, Yeaster Co., JAPAN)를 이용하여 1일 2회 소량급여한 결과 16°C에서 12mm, 20°C에서 15mm, 23°C에서 16mm, 26°C에서 21mm, 29°C에서는 25mm까지 성장하여 75%의 生存率을 얻었고(Fig. 5), 水溫別 成長率이 좋게 나타났으나, 앞으로 밀도와 먹이의 섭취량 등을 고려하여 사료효율 및 성장율 등을 측정하는 사양실험을 통하여 불필요하게 쓰이는 가온비를 절약함으로써 효율적인 미꾸리 養殖이 가능할 것으로 思料된다.

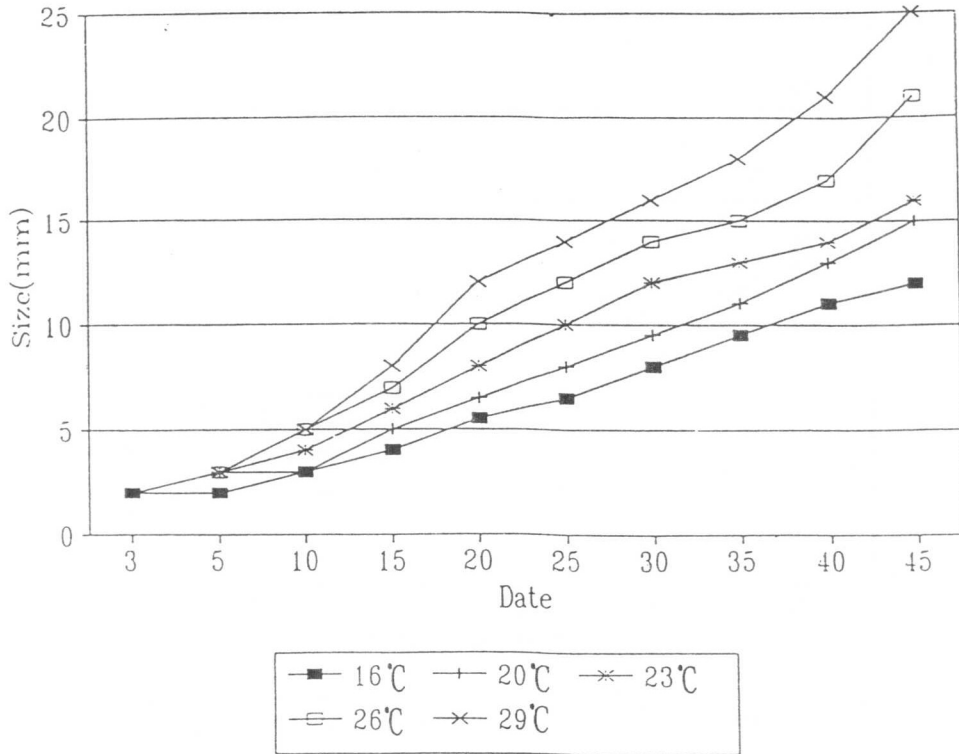


Fig. 5. Growth rates of the fry loach at different water temperatures.

적 요

본 연구에서는 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 있어 난의 저온처리를 통하여 제2극체 방출을 억제함으로써 Glycinogenesis 및 Triploid 개체를 생산하는 과정 중 제2극체의 방출시기를 밝혔고, 난의 발달단계를 통하여 세포에 고유의 성질이 부여되는 포배기를 수정율의 척도로 이용하였으며 또한 수온이 受精率, 孵化率, 畸形率 및 生存率에 미치는 영향을 조사하였고, 인공부화 및 자연부화시 초기의 많은 폐사를 방지하기 위하여 적합한 수온 및 초기 치어의 사육방법에 관한 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

제2극체의 출현 및 관찰은 수정 후 10~40분경 까지 용이하게 관찰하였다. 미꾸리 정자는 물에 노출된 후 2분 정도면 운동성을 상실하므로 인공수정시 난이 암컷의 복부에서 나오는 즉시 수정을 시켜야 한다. 여러가지 수온에서 포배기 도달시간이 16°C에서 12시간, 19°C에서

8시간, 21°C에서 6시간, 23°C에서 5시간, 26°C에서 4시간, 29°C에서는 3시간 30분이 소요되었다. 따라서 수정율의 판단시간은 부화 수온에 따라 차이가 있음이 사료된다.

여러가지 부화수온중 수정율은 19°C, 21°C, 23°C, 26°C가 16°C, 29°C보다 높게 나타났으며, 부화율은 19°C, 21°C, 23°C가 16°C, 26°C, 29°C보다 높게 나타났고, 기형율은 16°C, 19°C, 21°C, 23°C가 16°C, 26°C나 29°C 보다 낮게 나타났고, 생존율은 16°C, 19°C, 21°C, 23°C, 26°C가 높고, 29°C가 가장 낮게 나타났다. 미꾸리 수정란의 부화개시 시간은 16°C에서 72시간, 19°C에서 48시간, 21°C에서 40시간, 23°C에서 32시간, 26°C에서 25시간, 29°C에서 16시간이 소요되었다.

치어에게 45일간 TP-1과 TP-3만을 공급하였을 경우 성장치는 16°C에서 12mm, 21°C에서 15mm, 23°C에서 16mm, 26°C에서 21mm, 29°C에서 25mm의 크기로 성장하였다. 이 성장율은 연못 등에서 자연사육된 치어의 성장율보다는 다소 떨어지지만 생존율이 75%로 치

어의 대량사육시 폐사율을 낮출 수 있어서 대량사육을 가능케 하고, 사육온도가 높을수록 성장율이 높게 나타났다.

참고 문헌

1. Arai, H. and S. Fujita. 1988. Spawning behavior and early history of the Sharpnose Puffer, *Canthigaster rivulata*, in the aquarium. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 35:194-202.
2. Espinach Ros, A., A.G. Amutio, J.P. Mestre Arceredillo, G. Orti and A. Nani. 1984. Induced breeding of the South American catfish, *Rhamdia sapo*(C. & V.). Aquaculture, 37:141-146.
3. Fujita, S. and M. Shinohara. 1986. Development of eggs, larvae and juveniles of the Puffer, *Tkifugu chrysops*, reared in the laboratory. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 33:186-194.
4. Hirose, K., Y. Machida and E.M. Donaldson. 1978. Induced ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin and salmon gonadotropin, with special reference to changes in quality of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45(1):31-36.
5. Jug-Dujakovic, J. and B. Glamuzina. 1988. Preliminary studies of reproduction and early life history of *Diplodus vulgaris*(E. Geoffroy Saint-Hilaire 1817) in Captivity. Aquaculture, 69:367-377.
6. Kimura, S. and Y. Tsukamoto. 1990. Development of larvae and juveniles of the Atherinid Fish, *Atherion elymus*, reared in the laboratory. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 37:29-38.
7. Kimura, S., K. Tsumoto, and K. Mori. 1988. Development of the Cottid Fish, *Pseudoblennius cottoides*, reared in the laboratory, Japanese J. of Ichthyology., Vol. 35:346-350.
8. Kimura, S., Y. Tsukamoto, and K. Mori. 1989. Early development stages of the Scorpaenid Fish,

- Scorpaena miostoma*, reared in the laboratory. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 35:434-439.
9. Masuma, S., M. Kanematu, and K. Teruya. 1990. Embryonic and morphological development of larvae and juveniles of the Amberjack, *Seriola dumerili*. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 37:164-169.
10. Rowland, S.J. 1988. Hormonal-Induced Spawning of the Australian Freshwater Fish Murray Cod, *Maccullochella pæli*(Mitchell)(Percichthyidae). Aquaculture, 70:371-389.
11. Suzuki, N., K. Umezawa, T. Yabe and H. Murai. 1989. Development of the Bitterling, *Paracheilognathus himantegus*(Cyprinidae), with a Note on Minute Tubercles on the Skin Surface. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 36:318-326.
12. Suzuki, R. and M. Yamaguchi. 1975. Influence of water temperature on inducing spawning by hormone injection in the loach, cyprinid fish. Aquaculture, 22:135-139.
13. Suzuki, R. and M. Yamaguchi. 1977. Effect of temperature on maturation of a cyprinid loach. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 43(4):367-373.
14. Suzuki, R. 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus Anguillicaudatus*. Aquaculture, 31:233-243.
15. Suzuki, R. 1976b. Duration of developmental capacity of eggs in ovarian cavity after ovulation of a cyprinid loach. *Misgurnus anguillicandatus*. Agriculture, 23:93-99.
16. Takita, T. and K. Nakamura. 1986. Embryonic development and prolarva of the Atherinid Fish. *Atherion elymus*. Japanese J. of Ichthyology., Vol. 33:200-203.
17. 隆島史夫, 羽生. 1989. 水族繁殖學. 水族繁殖學講座 第4卷. pp.167-169.

韓國產 미꾸리애 關한 育種·繁殖學的 研究

IV. 卵母細胞의 卵黃 形成 및 成熟에 關한 電子顯微鏡的 觀察

윤종만·이종영·이경호*·박홍양
(건국대학교 축산학과 동물 유전 육종학 연구실)

Breeding and Reproductive Studies on Korean Native Loach
(*Misgurnus anguillicaudatus*)

IV. Electron Microscopic Observation on Vitellogenesis
and Maturation in Oocytes

Yoon J.M., Lee J.Y., Lee K.H., Park H.Y.
Animal Science, Kon-Kuk University

Abstract

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 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)

* 건국대학교 기초과학연구소 화학과

I. 서론

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 골든 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 品種改良과 繁殖效率 改良은 무엇보다도 시급한 研究課題라고 할 수 있다.

그러나 下等脊樞動物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 細胞學的 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 단축시키는 結果를 얻었다고 報告하였다. Hirose 等(1976)이 은 연어(*Plecoglossu altivelis*)이 여러 硬骨魚類의 性腺 刺戟 호르몬이 生成되는 腦下垂體 部位를 組織學的 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 형성시기와 그의 형태학적 연구를 실시하였으며, 그는 발달중인 난모세포의 난세포질 외층부에 존재하는 표면이 여러 층으로 구

성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles이 송사리관에서 발달이 진행되는 것은 융모막으로 변하는 微細構造라고 주장하였다.

Lambert 등(1978)은 무지개 송어가 난황 형성 기간 동안에 다량의 난황 단백질의 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 5월까지 繼續的으로 增加 趨勢에 있게 된다고 報告하는 등 많은 研究가 進行되어 왔다.

국내에서는 물고기의 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 發生遺傳學的 基礎資料를 얻기 위해서 本 研究를 실시하였다.

II. 재료 및 방법

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 1.5m^3 크기의 탱크에서 N.R.C. 사양표준에 준한 배합사료 및 실지렁이를 급여하여 사육중인 체중 15~25g의 암컷 1년생 韓國産 미꾸리 100마리를 供試魚로 사용하였다.

2. 光學(LH) 및 透過電子顯微鏡的方法(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의 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 高찰

1. 初期 卵形成

Fig. 1, 3, 9, 15, 19는 광학현미경(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 살펴 본 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 μ m)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 μ m의 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 μ m의 크기를 갖는 核과 그 내부에 강한 好鹽基性を 띠고 있는 3~5 μ m의 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 광학현미경으로 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 관찰하지 않았다.

Stage II (Late perinucleolus oocyte)(Fig. 3, 4, 5, 6, 7, 8) : 약 85~160 μ m, 核心體 核 주변부에 위치해 있는 末期 段階로서 약 30 μ m의 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 等(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 사이에 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 바와 같이 卵細胞質網(RER)과 골지체(GA)를

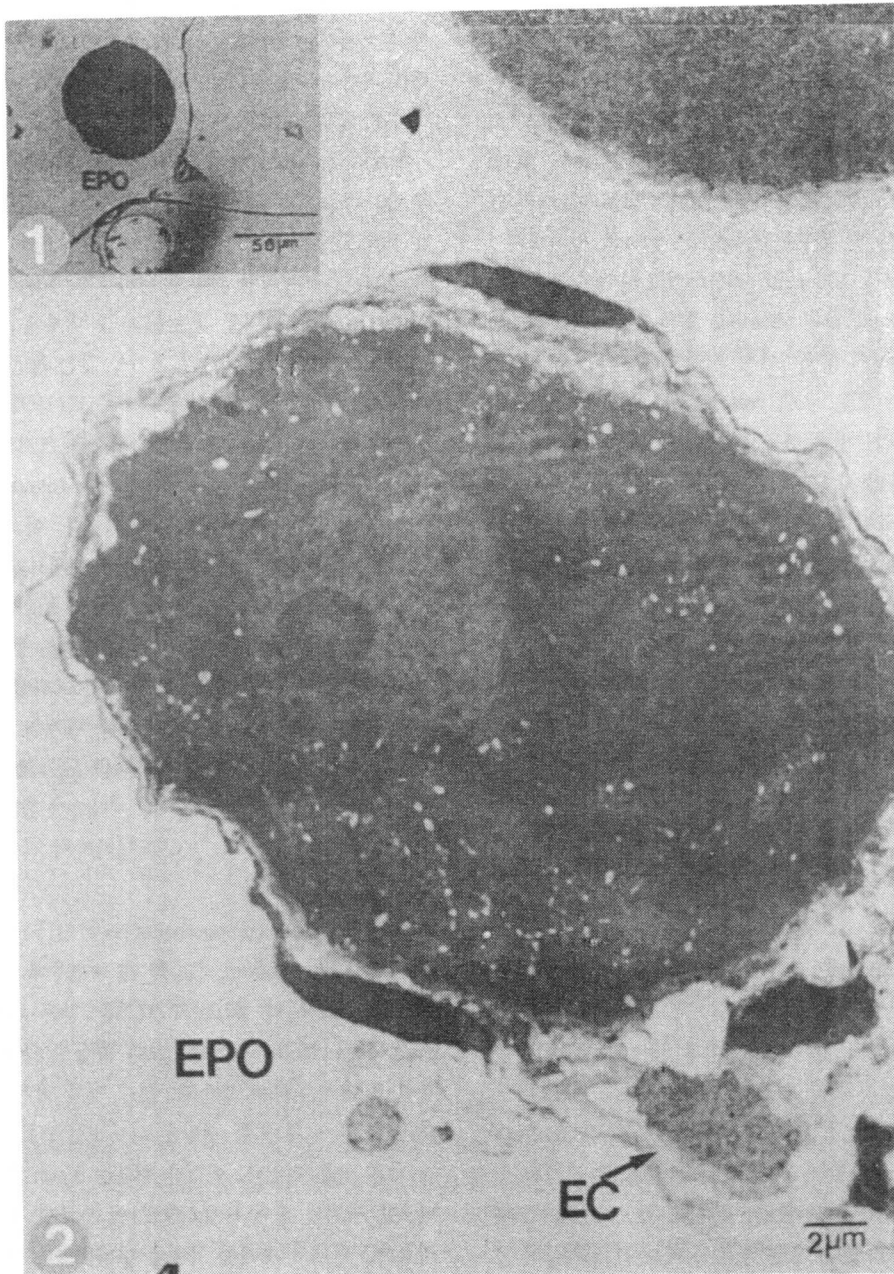
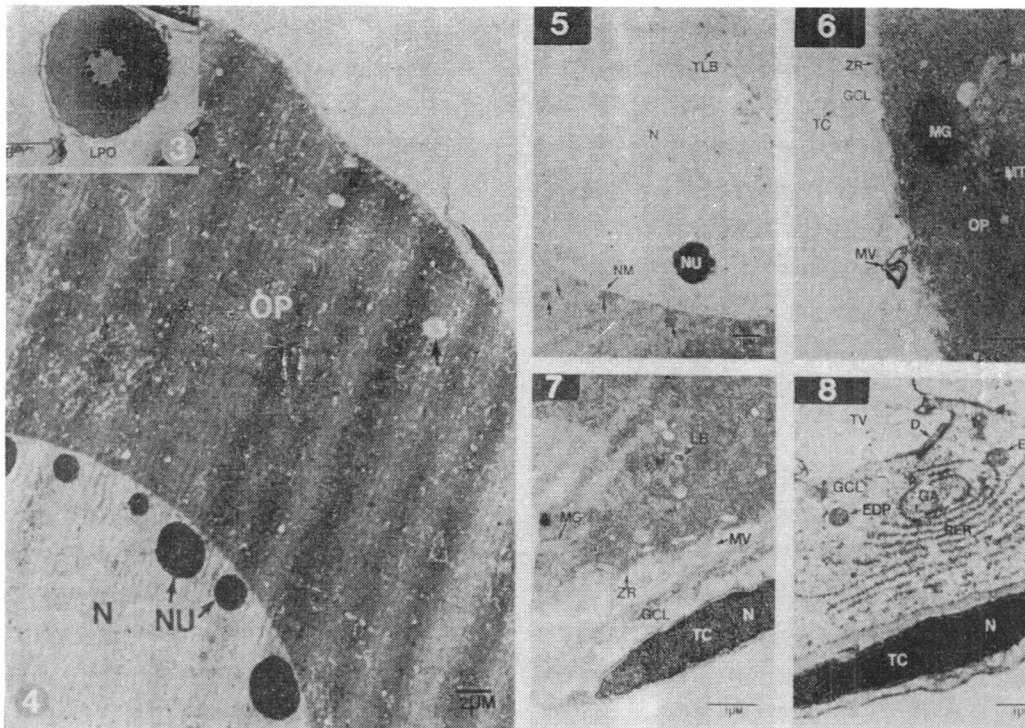


Fig. 1. Histomorphology of the oocyte development of Korean loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, by light-microscopic observation, 2. 5% glutaraldehyde soln-fixed, Epoxy resin-embedded, and toluidine blue-stained preparations. EPO : Early perinucleolus oocyte. Cytoplasm is basophilic.

Fig. 2. Electron microscopic observation of early perinucleolus oocyte. This oocyte (about 30~70µm in diameter) is observed ovary during the immature times. The major diameter of nucleus with a large nucleolus is about 9~12µm. 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 85~160 μ m. The major diameter of the nucleus is about 30 μ m. Numerous small and large nucleoli are located at the periphery of nuclear membrane. Early perinucleolus oocytes 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.

가지고 있는 顆粒膜 細胞(GCL)와 진하게 염색되는 核을 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 核이 난모세포의 중앙부로 부터 卵胞膜쪽으로 이동한 상태이고, 斷層 放射帶(Fig. 11, 12, 13, 14)가 여러 層의 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 호르몬의 왕성하게 분비되어 卵黃顆粒의 數가 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 核이 차지하는 면적이 相對적으로 작으나, EPO보다 상당히 增加하여 약 $150\mu\text{m}$ 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 연한 색깔을 나타내었다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 이 段階부터 yolk vesicle의 數는 서서히 減少하고, 반면에 細胞質內的 과립물질을 가지고 있는 卵黃顆粒의 數가 증가되었으며, 이 段階 初期에 작은 卵黃이 커다란 yolk vesicle 사이에 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 I 과 마찬가지로 內形質細網이 아직 발달되지 않은 상태이다.

그리고 Fig. 14에 나타난 바와 같이 卵母細胞가 발달할수록 미토콘드리아의 數가 확인되었고, 세포질의 내부를 차지하고 있는 2~4層의 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 層(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 層으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles의 난 발달이 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 層으로 구성된 둥근 형태의 치밀한 vesicles이 궁극적으로 放射帶으로 변하는 微細構造라고 주장한 Tesoriero(1977)의 결과와 비교해 볼 때 이 다層的 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 크게 팽창된 內形質細網, 골지체(GA), 脂肪滴(OD), 잘 발달된 核(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 존재하지 않는 것으로 확인되었다.

Stage IV(Late maturing oocyte)(Fig. 15, 16, 17, 18) : 약 $850\sim 950\mu\text{m}$ 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 직경이 약 $140\mu\text{m}$ 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 축적되므로서 卵黃顆粒이 상당히 增加하여 세포질 전체를 차지하며, Yoon 등(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

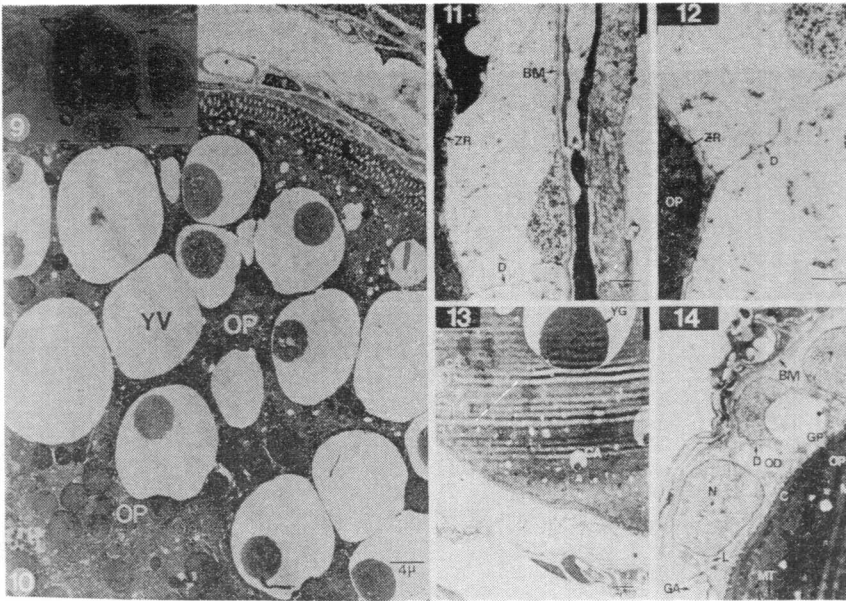


Fig. 9. Light microscopic observation of early maturing oocyte. The major diameter of EMO is about $520\sim 750\mu$ m in size. The major diameter of nucleus is about 150μ m, and existed at the center. Cytoplasm is acidophilic. Ooplasm is composed of numerous yolk vesicles(YV) and yolk granules(YG). Cortical alveoli(CA) are located at the periphery of the outer ooplasm. CA : Cortical alveolus, EMO : Early maturing oocyte, OP : Ooplasm.

Fig. 10. Electron microscopic 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 microscopic 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 in to granulosa cell layer. The granulosa cells are underdeveloped. D : Desmosome, OP : Ooplasm, ZR : Zona radiata.

Fig. 13. Electron microscopic 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 microscopic 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.

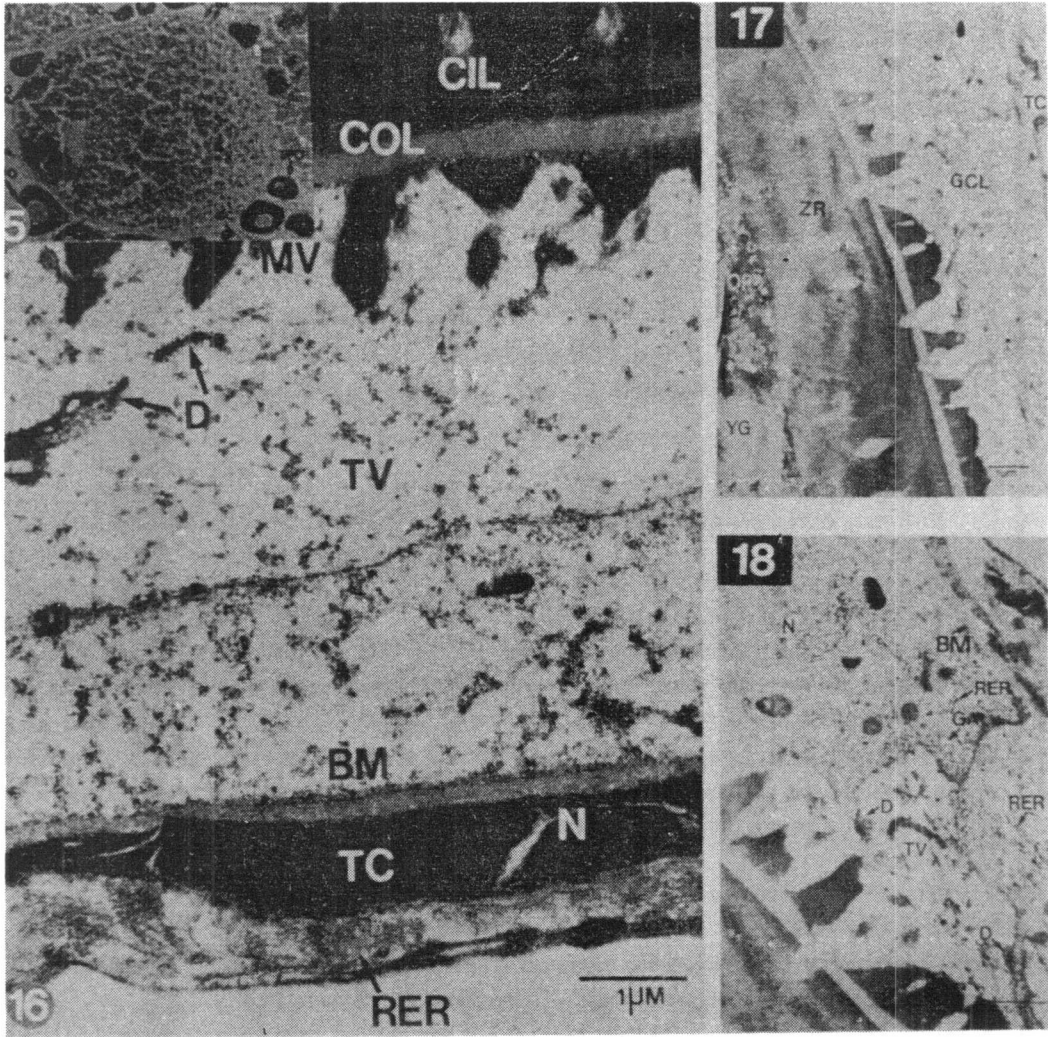


Fig. 15. Light microscopic observation of the late maturing oocyte (Migrating nucleus of oocyte or peri~heral GV stage). The major diameter of LMO is about 850~950 μ m in size. The major diameter of migratory nucleus is about 140 μ m in size. EPO : Early perinucleolus oocyte, LPO : Late perinucleolus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

胞質의 染色 狀態가 붉은 색깔로 나타내었다. 이와 같이 卵黃形成이 均일하게 분포되어 있기 때문에 무지개 송어의 난자와 달리 내부를 쉽게 관찰할 수 있도록 투명한 난자를 형성하는 것으로 사료되며, 수정후 나타나는 여러 수정현상을 쉽게 관찰할 수 있는 것으로 사료된다.

난황 형성이 완성되는 시기에는 지방적의 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 형성기동안에 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이 卵母細胞內에 축적되어 卵巢重量的 增加를 야기시킨다고 밝혔다. Fig. 16, 17, 18에 나타난 바와 같이 顆粒膜에는 수많은 核, 내형질세망(RER), 橋小體(D)를 가지고 있다. Fig. 16에서와 같이 顆粒膜 細胞쪽을 향해서 직경이 약 1.45 μ m인 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. 卍卍

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 난포세포중 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 단계에서 부터 증가하기 시작하여 RO 단계에서는 약 4.4 μ m정도를 나타내었다. 이러한 변화는 냉수성 어종인 무지개 송어의 두께가

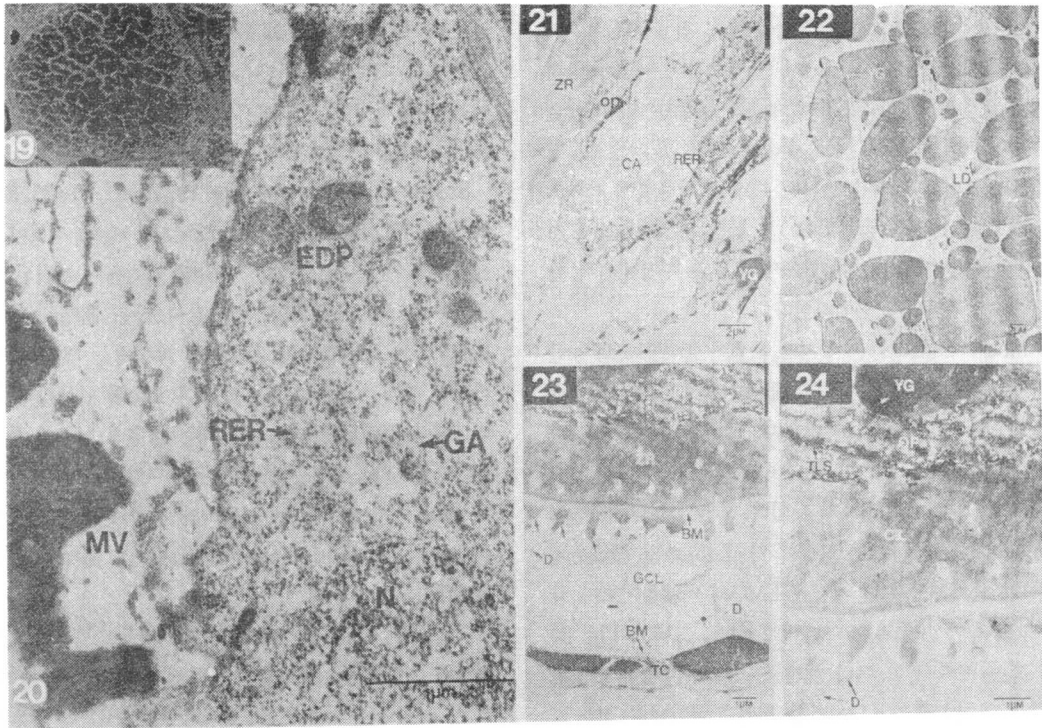
19.8 μ m 정도까지 생각해 볼 때 상대적으로 얇게 나타났다. 바로 이러한 생리적인 특징때문에 난내부(난세포질)를 볼 수 있는 것으로 사료된다. 橋小體(D)를 가지고 있는 과립막 세포는 골지체(GA)가 상당히 발달되는 특징을 나타내었으며, 顆粒膜과 莢膜을 분리시키는 균일한 크기를 갖는 基底膜(BM)이 관찰되었다. 그리고 莢膜세포에는 강하게 염색되는 잘 발달된 核(N)과 內形質細網(RER)이 관찰되었다.

Stage V (Ripe ovum)(Fig. 19, 20, 21, 22, 23, 24) : 약 900~1,200 μ m. Fig. 19, 22에서와 같이 직경이 6~16 μ m인 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 核이 세포질 중앙부로부터 動物極 주변부로 이동하였기 때문에 核이 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 발생되어 동물극 부위에 나타나는 것으로 생각된다.

Fig. 21에서와 같이 난세포질의 외측부에는 난황과립보다 커다란 크기(7 μ m)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 μ m인 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 核(N), 내형질세망



- Fig. 19. Light microscopic observation of ripe ovum. The major diameter of this oocyte is $900\sim 1,200\mu\text{m}$. 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 microscopic 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 microscopic observation of the cortical alveoli(CA). CA : Cortical alveolus, RER : Rough endoplasmic reticulum, YG : Yolk granules.
- Fig. 22. Electron microscopic observation of yolk granules(YG) in RO stage. LD : Lipid droplets, YG : Yolk granules.
- Fig. 23. Electron microscopic 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 : Basement membrane, D : Desmosome, N : Nucleus of granulosa cell, RER : Rough endoplasmic reticulum.

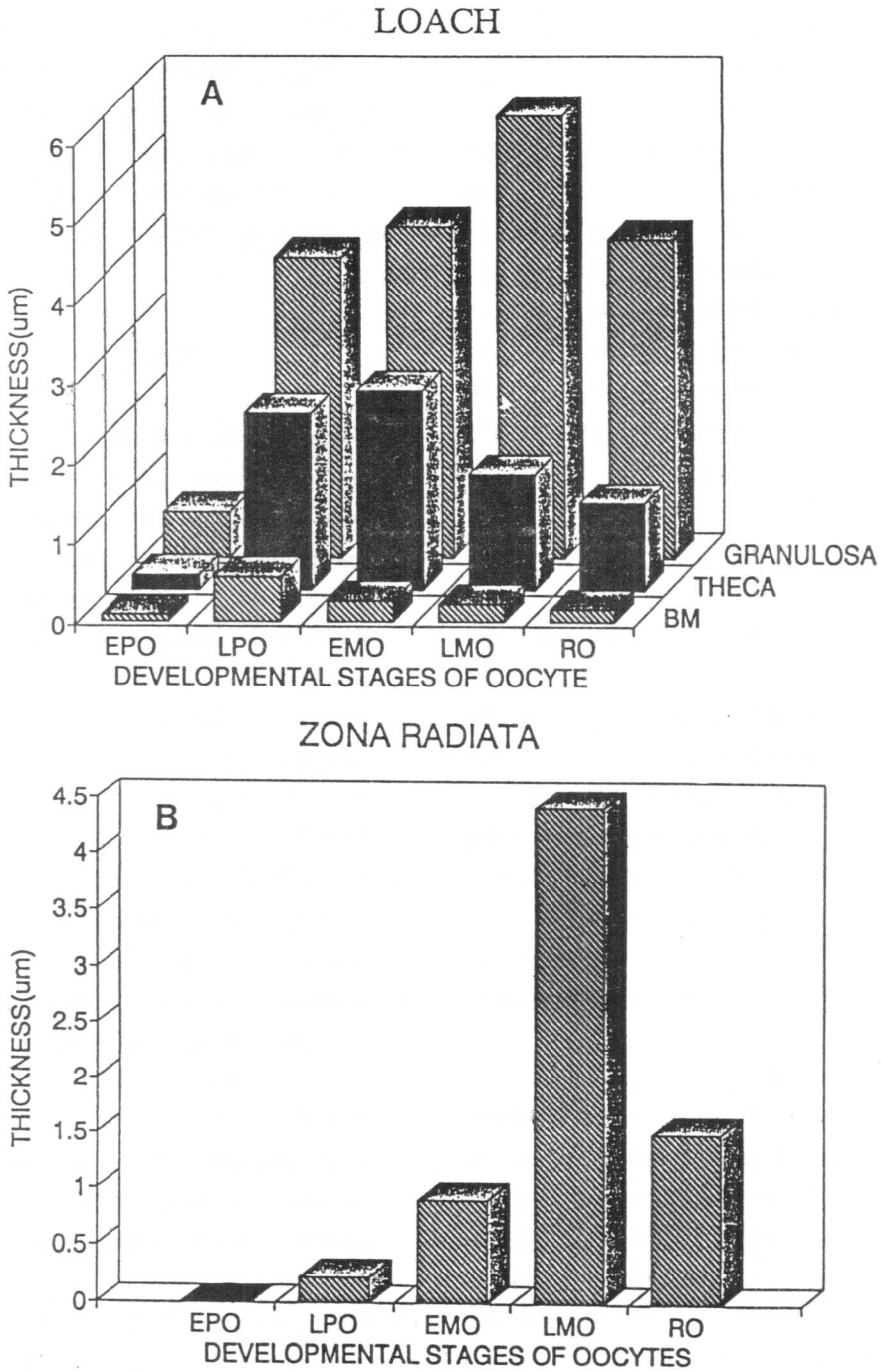


Fig. 25. The changes in thickness of the ovarian follicles and zona radiata with oocyte developmental stage in Korean loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). A : Changes of granulosa cell layer, thecal cell layer and basement membrane. B : Changes of zona radiata. EPO, Early perinucleolus stage ; LPO,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

(RER), 골지체(GA), 橋小體(D)가 발달된 세포가 존재하며, Fig. 25에 나타난 바와 같이 그 두께는 LMO단계보다 약간 감소된 약 $4\mu\text{m}$ 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 産卵時期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.

적 요

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 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 畜産大學 養魚場에서 계절에 따른 수온의 변화속에서 溶存酸素量이 $6.2 \pm 0.5\text{ppm}$ 이며, pH 7.2 ± 0.1 인 1.5m^3 크기의 탱크에서 N.R.C. 사양 표준에 준한 크럼를 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 핵인의 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 층의 層狀 구조로 변화되었다.

성숙시기에 접어들수록 자연적인 조건하에서 난포막은 卵巢의 卵形成에 영향을 미치는 성호르몬의 발달 및 분비에 크나큰 영향을 미칠 만큼 顆粒膜細胞의 核, 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 성숙수 지수와 외형상의 특징과 아주 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Chung, E. Y., H. B. Kim and T. Y. Lee. 1986. Annual reproductive cycle of the jackknife 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 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. 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 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.