

이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio*) 卵母細胞의 季節에 따른 組織學的 變化 및 호르몬 水準의 變化

李在賢·尹鍾萬·朴弘陽

建國大學校 畜産學科 魚類遺傳育種學 研究室

Histological Changes of Oocytes Development and Hormone Levels in the Israeli carp, *Cyprinus carpio*, according to Season

Jae-Hyun Lee, Jong-Man Yoon, Hong-Yang Park

Animal Science, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was undertaken to understand development stage of ovary and changes of hormones concentration from February to May in the Israeli carp, *Cyprinus carpio*.

The results obtained in these experiments are as follows :

1. Serum LH levels began to increase sharply in March, coinciding with the onset of rapid ovarian development.
2. LH levels were well correlated with changes in gonadosomatic index.
3. Dramatic increase in gonadosomatic index occurred during the months of March
4. Ripe stage(Stage V) rapidly increase in March.
5. Early perinucleolus oocyte rapidly develop into late perinucleolus oocytes in March.
6. The vitellogenic phase begins as these late perinucleolus oocytes become transformed into early maturing oocytes through the accumulation of yolk.
7. The cytoplasm completely fills with yolk as oocytes reach the late maturing stage.
8. Changes in the microscopic appearances of the ovaries were well correlated with changes in both gonadosomatic index and macroscopic appearance.
9. It is concluded from these observations that LH plays a major role in sexual maturation of the Israeli carp.

I. 緒 論

최근에 Hirose 等(1976)이 넙치(*Limanda yokohamae*), Howel(1983)이 넙치(*Limanda feerr-*

uginea), Hirose 와 Ishida(1974), Hirose 等(1977), Aida(1983)가 은어(*Plecoglossus altivelis*), Bieniarz 等(1977, 1979, 1980), Billard 等(1983)이 잉어(*Cyprinus carpio*), Davis(1977)가 메기(*Tandanus tandanus*), Gillet 等(1978)이 금붕어

(*Carassius auratus*), 그리고 尹 等(1978)이 미꾸라지에 D-Ala-LH-RH, HCG, LH-RH 그리고 腦下垂體 등을 이용한 호르몬의 注入, 水温의 상승과 하락, 光週期 調節에 의한 長日處理에 의하여 性成熟 및 排卵이 人爲적으로 조절되는지의 與否를 Howell (1983)은 成熟中인 oocyte의 각 發達段階를 外形의 인 면과 顯微鏡的 觀察에 따른 特徵을 變形시켜 나타내었다. 이는 卵母細胞의 成熟段階를 未成熟段階에서 過成熟段階까지 6段階로 나누어서 卵의 色과 形態, 크기, 組織學的 檢査 등으로 그 成熟 정도를 判斷했다. Manning(1984), Billard(1982), Kobayashi(1986) 등의 LH, GTH, testosterone, estradiol 호르몬 定量方法을 이용하여 調査했다.

現在 國內에서는 잉어류의 産卵誘起를 위하여 溫度 shock 方法이 實用化되어 있고 光週期處理를 하여 무지개 松魚의 産卵時期를 조절하는 方法에 대한 研究가 進行되고 있다. 季節性 繁殖을 하는 이스라엘 잉어를 高水温 狀態에 收容하여 性成熟을 進행시키는 過程에서 卵母細胞의 段階의인 組織學的 變化 및 魚類의 性成熟과 排卵에 關與하는 LH, estradiol 호르몬 濃度가 季節에 따라 어떻게 變化하는지를 알고자 實施한 本 研究은 잉어類의 人爲的인 早期産卵을 誘起하기 위한 基礎研究이다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 供試魚 및 管理

自然狀態인 저수지에서 棲息중인 個體들중 약 2個月間 16°C에 蓄養中이었던 3年生 이스라엘 잉어 1.10~2.56 kg(平均 1.6 kg)인 암컷 21마리를 1989년 1월부터 2월까지 水温이 16°C에서 溫度를 상승시켜 25°C가 되도록 하여 5월까지 이 溫度로 일정하게 維持시켰으며, 溶存酸素 5.0~6.7 ppm, pH 7.2~7.6으로 維持시켰다. 收容탱크의 크기는 직경 150 cm. 높이 100 cm(水深 85 cm), 水量 1,500 liter로 分當 2.5 liter의 새로운 물을 注入하여 탱크내의 물을 1일 2회 環水시켰다. 飼料供給은 魚體重當 1%/1일을 基準로해서 狀態에 따라 알맞게 給與하였고, 營養狀態를 考慮하여 魚類用 綜合비타민이 코팅된 송어용 펠렛飼料(고려특수사료사)를 給與했다.

2. 方 法

1) 血液採取 및 血清分離

個體를 죽이지 않고 血液을 採取하기 위해 麻醉劑(MS-222) 100 ppm에 15分間 麻醉시킨 후 caudal vein 및 artery로부터 17 gauge의 주사바늘을 사용하여 血液을 1 ml씩 採取했다. 血液을 採取한 個體는 患部에 70% 알콜로 消毒하여 25 ppm의 kanamycin이 용해된 물에 24시간 藥欲시킨 후 收容탱크에 放養했다. 血液採取는 2週日 間隔으로 午後 12時에서 午後 3時 사이에 實施하였으며 採取한 血液은 15分동안 3,000 rpm으로 遠心分離한 후 分離된 上層液 一部를 호르몬 測定에 利用하였다.

2) Enhanced Fluorescence Immunoassay

Amerlite Kit(U.K.)와 Amerlite analyzer를 使用하여 LH, 17β-estradiol 濃度를 測定하였고, 그 定量方法은 Amersham社에서 提示한 標準定量方法을 利用하였다.

3) 組織學의 方法

組織學的 檢査로는 한달에 한번씩 個體를 잡아 性腺을 摘出하였고, Bouin' fluid로 固定시켰으며 4 μm 크기로 자른 다음 H-E 染色後 31.25, 50, 125 그리고 400 X으로 檢鏡하여 chromatin condensation의 정도, 크기와 染色特徵(acidophilic, basophilic), nucleoli의 數와 germinal vesicle (GV=nucleus)의 位置(germinal vesicle breakdown, GVBD) 그리고 cytoplasm과 oocyte의 形態의 變化에 따라 oocyte의 發達段階를 分類 決定하였고, innerstructure가 崩壞되는 特徵을 나타내는 oocyte를 resorbing oocytes로 區分시켰으며, 季節과 G.S.I.(性成熟指數, gonadosomatic index, gonad weight(g) × 100/body weight(g)變化에 대해서도 相關關係를 調査하였다.

III. 結果 및 考察

Table 1은 2월부터 5월까지 각 oocyte의 發達狀態를 100%로 하여 각 段階別로 나타낸 것으로서 2월경에 79.6%를 차지한 Stage I인 未成熟 狀態의 oocyte가 4월, 5월경에는 각각 5.2%, 6.8% 정도로 감소하였고, 2월경에 3.9%인 Stage V인 性成熟狀態의 oocyte가 각각 30.2%, 43.2% 정도를 나타냈으며, 温水魚種인 넙치(*Limanda feerruginea*)

Table 1. Ratio to each development stage from February to May.

Month Day Stage	2/20	3/10	4/30	5/9
I	79.6	19.3	5.2	6.8
II	7.3	10.5	5.2	12.5
III	6.6	12.3	13.5	13.6
IV	0.9	3.5	16.7	17.0
V	3.9	38.6	30.2	43.2
VI	1.6	15.8	29.2	6.8

에 대하여 연구한 Howell(1983)의 결과와 유사하게 나타났고, 미꾸라지 (*Misgurnus anguillicaudatus*)의 發達段階를 組織學的方法으로 研究한 尹等(1987)의 結果와 큰 차이없이 類似하게 나타났는데, 이는 성성숙이 되는 데 필요한 25°C 정도의 適切

한 水温과 15-16 L, 8-9 D인 光週期가 요구되는 温水魚種에서는 共通되는 事項이 아닌가 思慮되며, 따라서 앞으로 더 많은 温水魚種에 대한 研究가 進行되어야 할 것이라고 생각된다.

Fig. 1은 LH의 測定原理를 그림으로 표시한 것이며, Fig. 2는 2월부터 5월까지 이스라엘 잉어 암컷의 血清中 LH濃度를 測定한 것으로써 水温을 16°C에서 25°C로 상승시킨 3月경의 가장 높은 peak를 나타내었고, 4月 및 5月경에 약간 떨어졌다. 이는 3月경에 調査된 組織學的 檢査에서 볼 때 Stage I의 比率이 급격히 떨어지고, Stage V (ovulated oocyte)의 比率이 상승되는 것과 연관이 있다는 것을 알 수 있었으며, 溫度가 상승함에 따라 oocyte의 發達이 빨라지는 것과 동시에 LH濃度도 상승된다는 Bieniarz(1977), Gillet(1978) 그리고 Manning(1984)의 結果와도 類似하게 나타난 것을 알 수 있

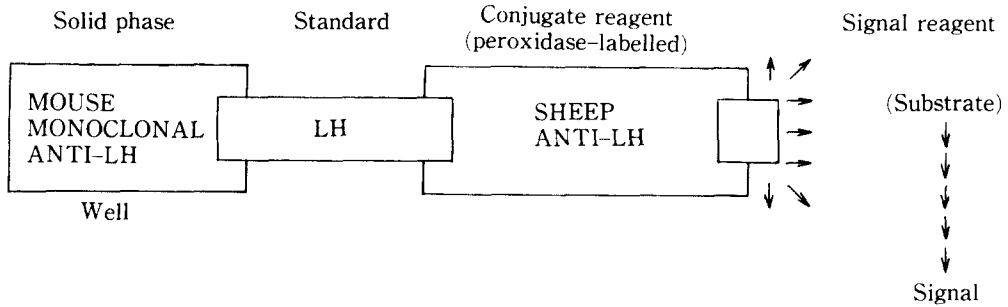


Fig. 1. Schematic representation of Amerlite LH-30 assay.

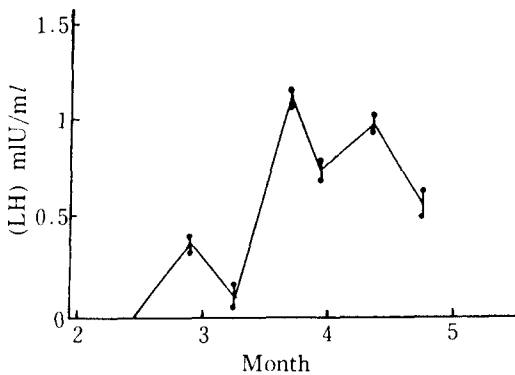


Fig. 2. Changes in serum LH levels in female Israeli carp. The vertical bars represent the mean \pm S.D.

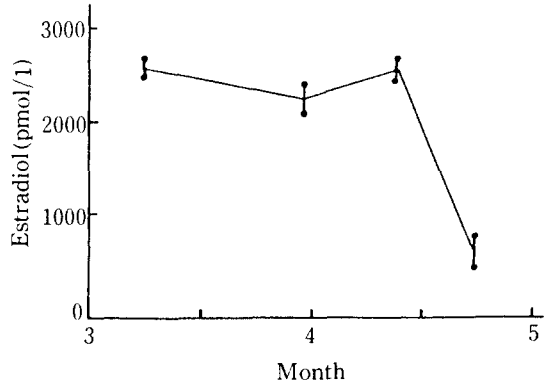


Fig. 3. Changes in serum 17 β -estradiol levels in female Israeli carp. The vertical bars represent the mean \pm S.D.

었다.

Fig. 3은 3월부터 5월까지 水温이 25°C로 維持된 狀態에서 17 β -estradiol을 測定한 것으로서 3월부터 4月 中旬까지 일정한 水準으로 維持되다가 4月末경 부터 급격히 떨어지기 시작하였는데, 이 시기에 oocyte의 發達狀態를 살펴보았을 때 Stage VI (over-ripe oocyte)의 경우 4月경에 29.2%를 나타내었는데 이는 3月경의 15.8%와 5月경의 6.8%보다는 상당한 차이를 나타낸 것으로 보아 17 β -estradiol의 血清中 濃도가 높을수록 過熟의 狀態가 더디고, 낮을수록 過熟의 狀態가 빠른 것이 아닌가 思慮되며, 水温이 25°C 이상이 될 때 estradiol의 濃도가 급격히 떨어진다는 Manning(1984)의 結果와도 일치하였다.

Fig. 4는 2월부터 5월까지 암컷의 卵巢의 무게를 測定하여 體重에 대한 比率인 G.S.I.를 나타낸 것으로서 水温이 25°C로 상승하는 초여름에 가까울수록 卵巢의 무게가 증가한다는 事實을 알 수 있었고, 2月과 5月경의 G.S.I.는 각각 5.3%와 20.15%를 나타내었는데, 이는 Bieniarz(1977), Clemens(1967), Gillet(1978) 및 尹等(1987)의 結果와 類似하게 나타났다.

Plate 1은 oocyte의 각 發達段階를 현미경적 觀察를 통해서 나타낸 것으로서 Hirose(1977) 등은 oogenesis를 4段階로, Davis(1977)는 9段階로 나누었고, Howell(1983)은 7段階로 나누었는데, 본 研究에서는 細胞의 細胞學的 特徵(cytological

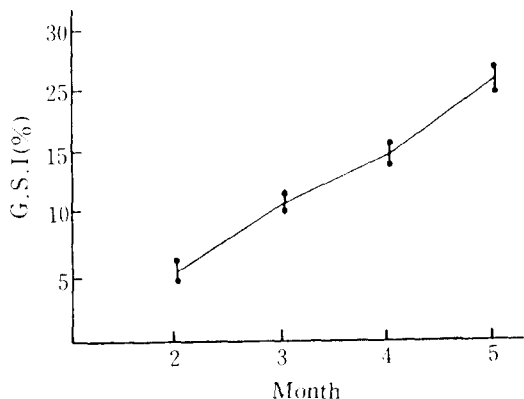


Fig. 4. Changes in the gonadosomatic index in Israeli carp. The vertical bars represent the mean \pm S.D.

characteristics)을 基礎로 하여 6段階로 나누었다. Teleost oocytes가 거치는 發達段階는 種에 있어서 아주 類似하나 그 명칭이 다소 다르게 表現되고 있으며, 여기에서 사용되는 用語는 Bieniarz(1979), Epler(1979) 그리고 Howell(1983)이 사용했던 用語를 利用하였으며, 季節에 따른 發達段階는 다음과 같다.

Stage I - Early perinucleolus (Pl. I-1) : 180-200 μ m, 核仁의 形態는 타원형이고 크며, 染色質이 선처럼 가늘게 나타났다. 染色時 核質 및 卵黃도 好臙期性を 띠고 있었다.

Stage II - Late perinucleolus (Pl. I-2) : 490-510 μ m, 核의 形態는 둥글고 크며 染色時 細胞質은 두 가지 띠(zones)를 띠고 있는데, 이 두 가지 띠의 境界는 一般의 明確하게 구분되어 있지는 않으나 어느 정도 구분이 가능하였다.

Stage III - Late maturing (Pl. I-3) : 이 段階는 크기가 약 1,000 μ m로써 전단계보다 크고, 核膜이 明瞭하게 觀察되지 않으며, 染色時 核質은 약한 好酸性을 띠었고, 核仁이 核中央部에 位置해 있었으며, 核의 크기는 230-250 μ m이며, yolk globules이 細胞質 内部를 가득히 채우고 있다. 이 段階는 3月, 4月, 5月경에 全體比率중 약 13-15%를 차지하고 있다.

Stage IV - migratory nucleus stage (Pl. I-4) : 크기는 약 870-1,000 μ m이고, 이 段階의 核은 細胞質의 外側(periphery)부근에 위치해 있으며, 이 段階의 初期에 卵黃은 懸着狀態로 있게 된다. 이 段階는 4月, 5月中에 차지하는 比率이 약 17% 정도를 나타내었다.

Stage V - Ripe (Pl. I-5) : 크기는 약 1-1.2 mm이며, 작은 oil globules가 細胞質에 一定하게 分布되어 있다. Germinal vesicle break down (GVBD)이 發生하였으며, 바로 이 段階가 正常的인 性成熟이 되어 排卵이 일어나는 狀態이다.

Stage IV - Over-ripe (Pl. I-6) : 이 段階에서는 oil globules가 크며, 細胞質의 退化(degeneration)와 收縮(shrinkage)이 發生하게 된다.

일부 oocytes의 平均 直徑은 個體에 따라 다르게 나타났다 stage V에 가까울수록 크게 나타났다. Early perinucleolus oocytes는 Table 1에서와 같이 모든 samples에서 存在하며 2月경에 가장 풍

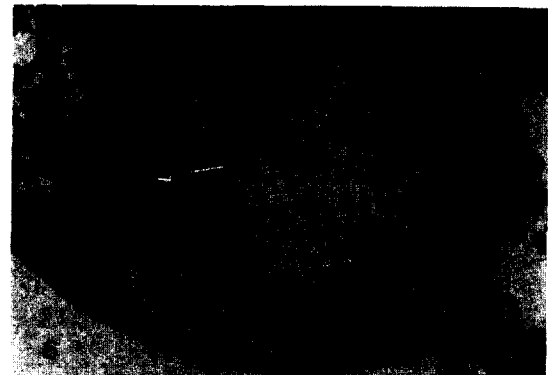
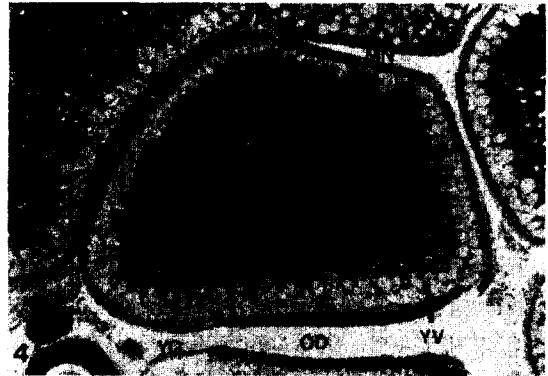


Plate 1. Explanations of Figures

Light-microscophs of ovaries of female Israeli carp, 10% neutral formalin-fixed, paraffin-embedded, and haematoxylin-eosin stained preparations.

1. Early perinucleolus stage. CY : cytoplasm, EPO : early perinucleolus oocyte, GCL : granulosa cell layer, N : nucleus, NU : nucleolus, TC : thecal cell, ZR : zona radiata.

2. Late perinucleolus stage. EPO : early perinucleolus oocyte, LPO : late perinucleolus oocyte, YG : yolk granules, YV : yolk vesicles.
3. Late maturing stage. YV : yolk vesicles
4. Migratory nucleus stage of oocyte(migrating nucleus of late maturing oocyte or peripheral GV stage), MN : migratory nucleus, OD : oil droplets.
5. Ripe stage(ovulated oocyte), CLC : cortical layer of cytoplasm, EPO : early perinucleolus oocyte, OO : ovulated oocyte(ripe oocyte).
6. Over-ripe stage(aggregation of oil globules).
DY : degenerating yolk, OD : oil droplets, ORO : over-ripe oocyte.

부하게 나타났으나, 水温이 상승하는 5월에 가까울수록 減少하였다. 대부분의 early perinucleolus oocytes는 直徑이 약 200 μm 이며, 2월경에는 그 크기가 140 μm 로 나타났으며, late perinucleolus oocytes는 follicle layer 바로 內側에 있는 cytoplasm에서 좁고 明瞭한 부분을 가지고 있다.

Table 1을 볼 때 late maturing oocytes는 2월경에는 그 수가 비교적 적게 存在하였으나, 3월, 4월, 5월경에 갈수록 점점 더 증가하였는데, 이는 Hirose 等(1976), Howell(1983)이 GSI가 late maturing oocytes 時期에서 增加하게 되고, 그 크기도 커지게 되며, ripe stage에서는 GSI가 가장 크게 나타난다고 主張한 結果와 一致하였다.

IV. 摘要

이스라엘 잉어 卵母細胞의 發育段階와 血清중 호르몬 濃度の 變化를 알기 위해서 2월부터 5월까지 本 研究를 수행하였다.

本 研究에서 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 卵巢가 發達되는 3월에 들어와서 血清중 LH 水準이 급격히 상승하기 시작했다.
2. LH 水準은 G.S.I.의 變化와 높은 相關關係에 있었다.
3. 3월경부터 G.S.I.가 急激하게 증가했다.
4. 3월중에는 成熟段階가 상당히 증가했다.
5. Early perinucleolus oocyte가 late perinucleolus oocyte 로의 빠른 發達을 나타냈다.
6. 卵黃이 蓄積됨으로써 late perinucleolus oocyte가 初期成熟段階인 oocyte로 되는 時期에 vitellogenesis가 시작되었다.
7. Oocyte가 後期 性成熟 段階에 到達했을 때 細

胞質內에 卵黃으로 가득 채워졌다.

8. 이스라엘 잉어 卵巢의 顯微鏡的 形態의 變化는 G.S.I.외관상의 變化와 聯關性이 깊었다.

9. LH는 이스라엘 잉어의 性成熟에 重要な 役割을 수행하는 것으로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Aida, K., 1983. Effect of LH-releasing hormones on gonadal development in a salmonid fish, the ayu. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(5), 711-718.
2. Bieniarz, K., Epler, P., Breton, B. and Thuy, L. N., 1977. The annual reproduction cycle in adult carp in Poland : Ovarian state and serum gonadotropin level. Symposium la reproduction des poissons paimpont. France, 19-21.
3. Bieniarz, K., Epler, P., Thuy, L. N. and Kogut, E., 1979. Changes in the ovaries of adult carp. Aquaculture, 17, 45-68.
4. Bieniarz, K., Epler, P., Thuy, L. N. and Breton, B., 1980. Change in blood gonadotropin level in mature female carp following hypophysial homogenate injections. Aquaculture, 20, 65-69.
5. Billard, R., Fostier, A., Weil, C. and Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 65-79.
6. Billard, R., Choisis, J. P. and Reinaud, P., 1983. Stimulation of spermiation in carp in response to LH-RH and D-Ala-LH-RH ethyl-

- amide. *Aquaculture*, 35, 173-176.
7. Clemens, H. P., 1967. Testicular characteristics of goldfish, *Carassius auratus*, in nature and under diet limitations. *J. Morph.*, 122, 131-138.
 8. Crim, L. W. and Evans, D. M., 1978. Seasonal levels of pituitary and plasma gonadotropin in male and female Atlantic salmon parr. *Can. J. Zool.*, 56, 1550-1555.
 9. Davis, T. L. O., 1977. Reproductive biology of the freshwater catfish, *Tandanus tandanus* Mitchell, in the Gwyder river, Australia I. Structure of the gonads. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 28, 139-158.
 10. Epler, P., Marosz, E. and Bieniarz, K., 1979. Effect of teleost pituitary gonadotropin on the in vitro maturation of carp oocytes. *Aquaculture*, 18, 379-382.
 11. Fourcher, R. P. and Beamish, R. J., 1980. Production of nonviable oocytes by pacific hake, *Merluccius productus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 41-48.
 12. Gillet, C., Breton, B. and Billard, R., 1978. Seasonal effects of exposure of temperature and photoperiod regimes on gonad growth and plasma gonadotropin in goldfish, *Carassius auratus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18(4), 1045-1049.
 13. Hirose, K. and Ishida, R., 1974. Induction of ovulation in the ayu, *Plecoglossus altivelis*, with LH-releasing hormone (LH-RH). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40(12), 1235-1240.
 14. Hirose, K., 1976. Endocrine control of ovulation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, northern pike, *Esox lucius*, and goldfish, *Carassius auratus*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 974-988.
 15. Hirose, K., Ishida, R. and Sakai, K., 1977. Induced ovulation of ayu using human chorionic gonadotropin (HCG), with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43(4), 408-416.
 16. Howell, W. H., 1983. Seasonal changes in ovaries of adult yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*. *Fishery Bulletin*, 81(2), 408-355.
 17. Hunt, S. M., Simpson, T. H. and Wright, R. S., 1982. Seasonal changes in the levels of 11-oxotestosterone and testosterone in the serum of male salmon, *Salmo salar* L., and their relationship to growth and maturation cycle. *J. Fish Biol.*, 20, 105-119.
 18. Kobayashi, M., 1986. Effects of HCG on milt amount and plasma levels of steroid hormones in male goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(4), 755.
 19. Manning, N. J. and Kime, D. E., 1984. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., in vivo and in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 376-388.
 20. Stuart-Kregor, P. A. C., Sumpter, J. P. and Dodd, J. M., 1981. The involvement of gonadotropin and sex steroids in the control of reproduction in the parr and adults of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Biol.*, 18, 59-72.
 21. 윤종만, 이상목, 박홍양, 1987. 韓國産 미꾸리에 있어서 HCG 나 송어의 腦下垂體에 의한 排卵誘期和 卵母細胞의 組織學的 變化. *家畜繁殖學會誌*, 11(3), 170-180.