

2~5월 사이의 이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio*) 卵母細胞의 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*) from February to May

Jae-Hyun Lee, Jong-Man Yoon, and Hong-Yang Park
Department of Animal Science, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea.

ABSTRACT

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

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 VII) 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 maturing of the Israeli carp.

序論

최근에 Hirose 등(1976)이 문치가자미(*Limanda yokohamae*), Howell(1983)이 *Limanda ferruginea*

Hirose와 Ishida(1974), Hirose 等(1977), Aida(1983)가 은어(*Plecoglossus altivelis*), Bieniarz 等(1977, 1979, 1980), Piotr 等(1979), Billard 等(1983), Fumio 等(1984), Nigel 等(1984)이 잉어(*Cyprinus carpio*), Davis(1977)가 *Tandanus tandanus*, Foucher와 Beamish(1980)가 Pacific hake(*Merluccius productus*), Crim 等(1981), Hunt 等(1982)이 대서양연어(*Salmo salar*) 그리고 Gillet 等(1978), Makito 等(1986)이 금붕어(*Carassius auratus*)에 D-Ala-LH-RH, HCG, LH-RH 그리고 腦下垂體 等を 이용한 호르몬의 注入, 水溫의 상승과 하락, 光週期조절에 의한 長日處理에 의하여 性成熟 및 排卵이 인위적으로 조절되는 지의 여부를 成熟中인 Oocyte의 각 發達段階를 현미경적으로 觀察하는 組織學의 方法과 Manning(1984), Billard(1982), Kobayashi(1986)등의 LH, GTH, Testosterone, Estradiol 호르몬 定量方法을 이용하여 調査하였고, 國內에서는 現在 잉어류의 産卵 誘期를 위하여 溫度 shock 方法이 實用化되어 있고 光週期處理를 하여 무지개송어의 産卵時期를 조절하는 方法의 研究가 進行되고 있다.

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 1.10~2.56kg(平均 1.6kg)인 암컷 21마리를 1989年 1月부터 2月까지는 水溫이 16°C에서 溫度를 상승시켜 25°C가 되도록 하여 5月까지 이 溫度로 일정하게 維持시켰으며, 溶存酸素 5.0~6.7ppm, pH 7.2~7.6으로 維持시켰다. 收容탱크의 크기는 직경 150cm, 높이 100cm(水深 85 cm), 水量 1500 liter로 分當 2.5liter의 새로운 물을 注入하여 탱크내의 물을 1일 2.4회 還水하였다. 飼料供給은 魚體重當 1%/1日을 基準으로해서 狀態에 따라 알맞게 給餘하였고, 營養狀態를 考慮하여 魚類用 綜合비타민이 코팅된 송어용 펠릿飼料(고려특수사료사)를 給餘했다.

2. 方法

1) 血液採取 및 血清分離

個體를 죽이지않고 血液을 採取하기위해 痲醉製(MS-222) 100ppm에 15分間 痲醉시킨 후 Caudal vein 및 artery로부터 17gauge의 주사바늘을 사용하여 血液을 1ml씩 採取했다. 血液을 採取한 個體는 患部에 70% 알콜로 消毒하여 25ppm의 kanamycin을 섞은 물에 24시간 藥浴한 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 3000rpm으로 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, 17 β -estradiol 濃度を 測定하였고, 그 定量方法은 Fig. 1에 수록하였다.

3) 組織學의 方法

組織學의 檢査로는 한달에 한번씩 個體를 잡아 性腺을 摘出하였고, Bouin's fluid로 固定시켰으며 4 μ m 크기로 자른다음 H-E 染色 後 31, 25, 50, 125 그리고 400X으로 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

이스라엘 잉어 卵母細胞의 組織學的變化 및 호르몬 水準의 變化

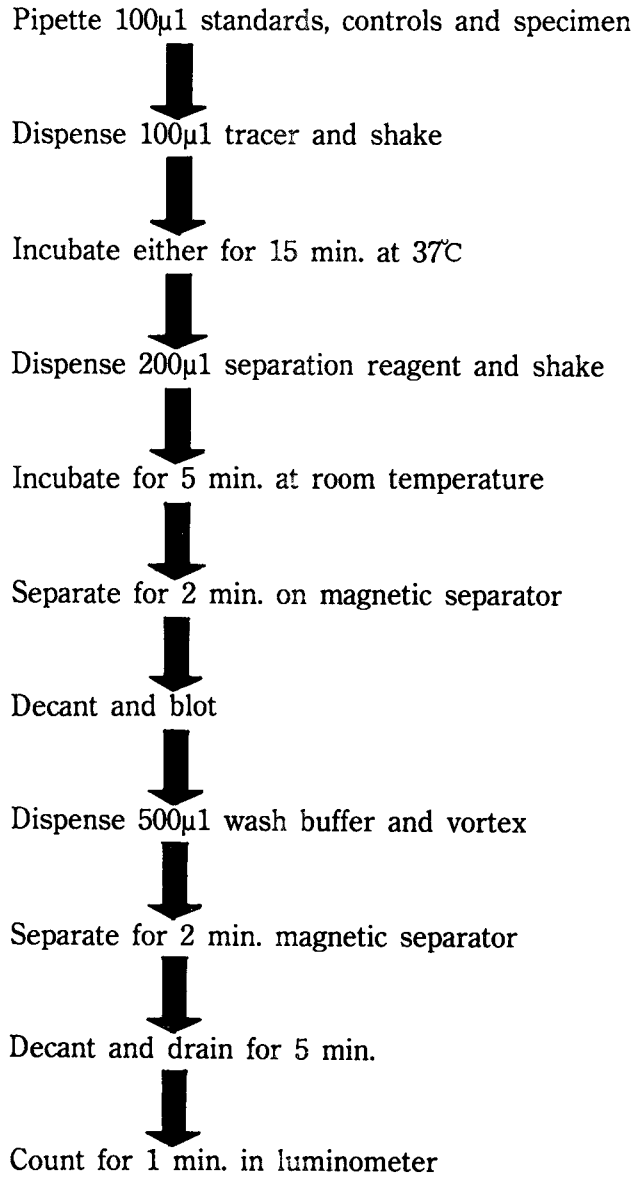


Fig. 1. Assay protocol by Amerlite analyser

oocyte를 resorbing oocytes로 區分시켰으며, 季節과 G.S.I(性成熟指數, genadosomatic index, gonad weight(g) × 100/body weight(g))變化에 대해서도 相關關係를 調査하였다.

結果 및 考察

Table 1은 Howell(1983)이 卵母細胞의 각 發達段階에 대하여 外形的인 면과 현미경적 觀察에

Table 1. Macroscopic and microscopic characteristics of the different maturity stages in Israeli carp. Stages modified from Howell(1983). Oocyte developmental stages are described in text.

Maturity stage	External appearance	Histological appearance
I. Immature virgin	Ovaries small(2-5cm), splendor, conical, ivory and generally translucent. Enveloped in a layer of silvery ephthelium. No oocytes visible to the naked eye.	Mainly stage I oocytes few >50 μ m. A few stage I oocytes also present. All oocytes lightly basophilic cytoplasm. Ovarian wall from 90 to 175 μ m thick.
II. Developing virgin recovering spent	Ovaries relatively small(6-12cm), rounded, ivory and translucent. Ovarian wall thick. Vascularization slight.	Stage II. Oocytes predominate. Stage II oocytes are abundant early in this maturity stage. but tend to decline as stage III oocytes increase later in the period. Most oocytes >500 μ m diameter. Ovarian wall from 80 to 150 μ m thick.
III. Developing, maturing	Ovaries larger in size(>12cm) and occupying most of ovarian cavity. Visible oocytes larger, yellowish in color, and opaque. Ovarian wall thin, translucent and granular in texture due to underlying developing oocytes.	Mainly stage IV, V, and VI oocytes. but small numbers of stages I, II, III and VII also present. stage VI oocytes increase in diameter to reach about 850 μ m just prior to ripe running stage. Ovarian wall from 100 to 200 μ m thick.
IV. Ripe	Ovaries very large and distending the body wall. Some oocytes yellowish and opaque. Others transparent(hyaline) producing a speckled appearance. Vasvularization heavy. Ovarian wall thin. Ova run from vent upon slight pressure.	Stage III, IV, V, and VI oocytes predominate, stage VII oocytes are irregular in shape, about 1000 μ m in diameter and often present in the lumen of the ovary. Ovarian wall from 50 to 100 μ m thick.
V. Spent	Ovaries flaccid. bloodshot. All visible remaining oocytes clear.	Many empty and collapsed follicles with relatively few oocytes. Stage VI and VII oocytes predominate. with many in transition between these two stages. Small numbers of stage I, II, and resorbing oocytes also present. Ovarian wall from 250 to 400 μ m thick.

Table 2. Ratio to each development stage from February to May

Stage	Month Day			
	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, IV	6.6	12.3	13.5	13.6
V	0.9	3.5	16.7	17.0
VI	3.9	38.6	30.2	43.2
VII	1.6	15.8	29.2	6.8

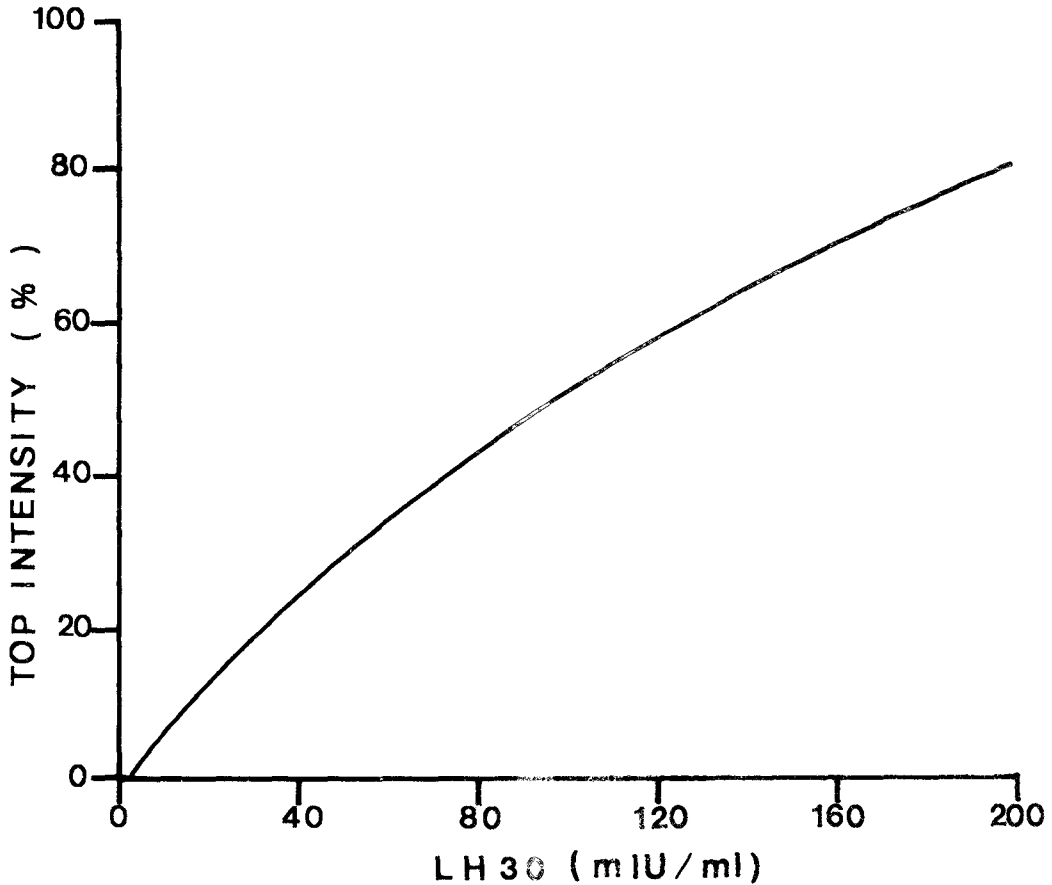


Fig. 2. Standard curve of Israeli carp LH on LH-30 assay.

다른 特徵을 變形시켜 나타낸 것이다. 이는 卵母細胞의 成熟단계를 未熟段階에서 過熟段階까지 5段階로 나누어서 卵의 色과 形態, 크기, 組織學的 調査등으로 그 成熟정도를 판단했다.

Table 2는 2월부터 5월까지 각 oocyte의 發達狀態를 100%로 하여 각 段階別로 나타낸 것으로서 2월경에 약 80%를 차지한 stage I인 oocyte가 4월, 5월경에는 약 5~7% 정도로 감소하였고, 그 대신에 stage VII인 oocyte가 약 35~45% 정도를 나타내었다.

Fig.1은 血清中 LH와 17β -estradiol의 濃度를 測定하는 過程을 나타내는 것으로서 Amerlite analyzer의 전형적인 方法을 나타낸 것이다.

Fig.2는 Fig.1의 過程에 따라 測定된 calibration curve를 나타내는 것이고, Fig.3은 LH의 測定原理를 圖式한 것이다.

Fig.4는 2월부터 5월까지 이스라엘 잉어 암컷의 血清中 LH 濃度를 測定한 것으로서 水溫을 16°C 에서 25°C 로 상승시킨 3월경에 가장 높은 peak를 나타내었고, 4월 및 5월경에 약간 떨어졌다. 이는 3월경에 調査된 組織學的 檢査에서 볼 때 stage I의 比率이 급격히 떨어지고, stage VII(ovulated oocyte)의 比率이 상승되는 것과 연관이 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 溫度가 상승함에 따라 oocyte의 發達이 빨라지는 것과 동시에 LH 濃度도 상승된다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 5는 3월부터 5월까지 水溫이 25°C 로 維持된 狀態에서 17β -estradiol을 測定한 것으로서

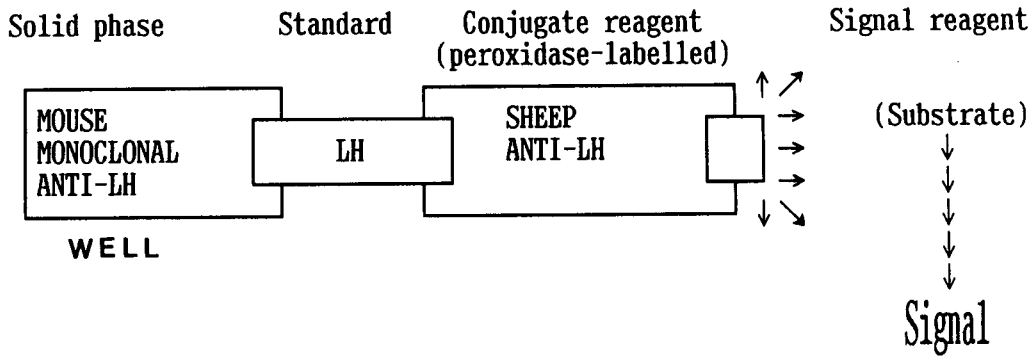


Fig. 3. Schematic representation of Amerlite LH-30 assay.

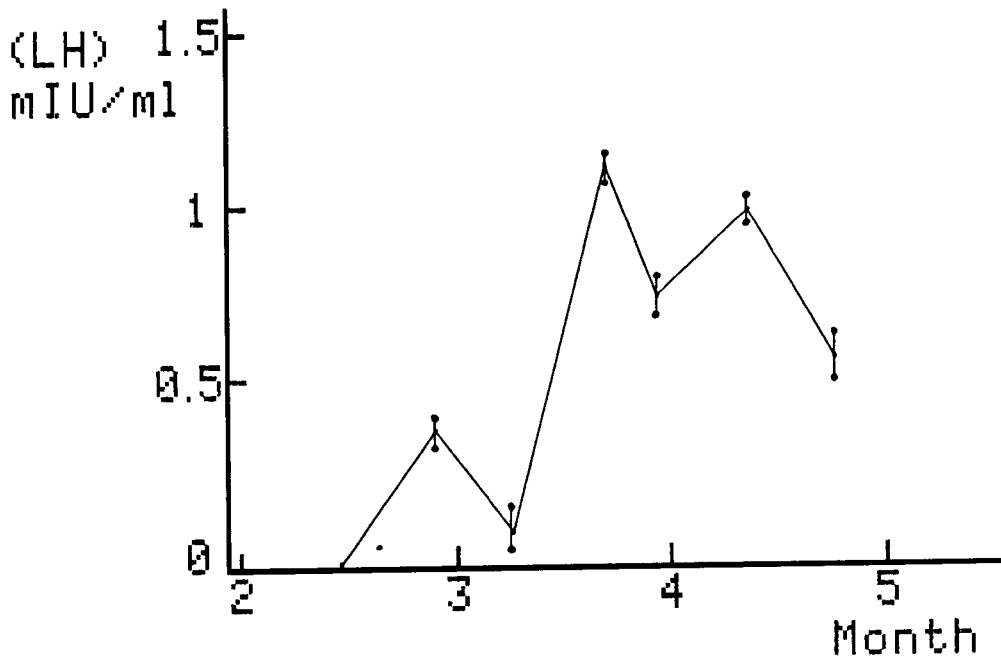


Fig. 4. Changes in serum LH levels in female Israeli carp.
The vertical bars represent the mean \pm S.D.

3月부터 4月中旬까지 일정한 水準으로 維持되다가 4月末경부터 급격히 떨어지기 시작하였는데, 이 시기에 oocyte의 發達狀態를 살펴보았을 때 stage VIII (over-ripe oocyte)의 경우 4월에 29.2%를 나타내었는데 이는 3월경의 15.8%와 5월경의 6.8%보다는 상당한 차이를 나타낸 것으로 보아 17 β -estradiol의 血清中 濃度가 높을수록 過熱의 狀態가 더디고 낮을 수록 過熱의 狀態가 빠른 것이 아닌가 思料된다. 그리고 Manning(1984)의 結果에 의하면 水溫이 25°C 이상이 될 때

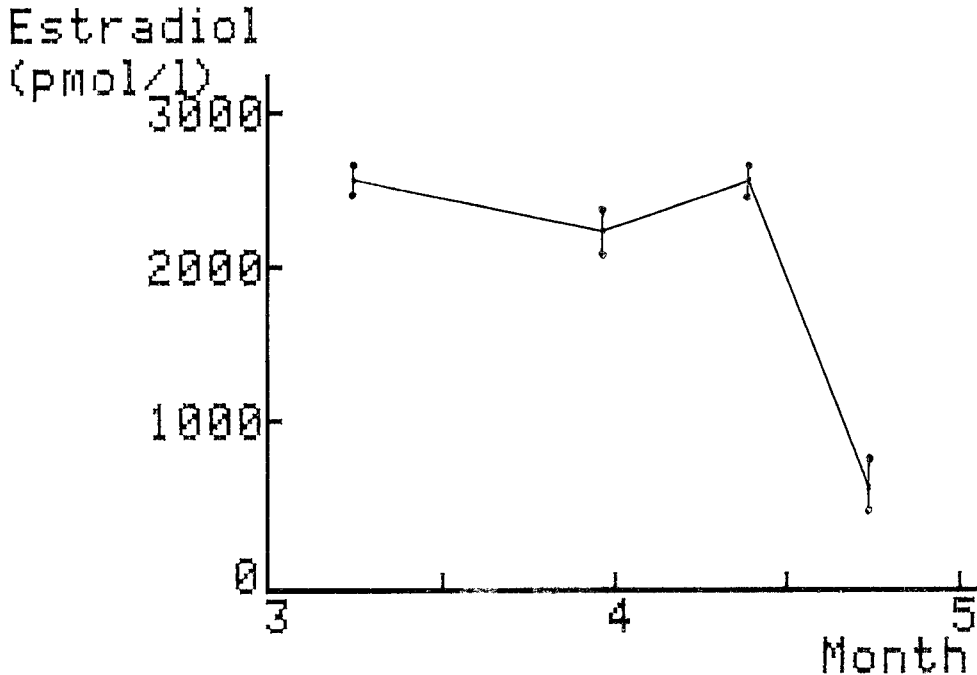


Fig. 5. Changes in serum 17β-estradiol levels in female Israeli carp.
The vertical bars represent the mean±S.D.

estradiol의 濃度가 급격히 떨어지는 結果를 招來한다는 것과는도 연관이 있을 것 같다.

Fig. 6은 2월부터 5월까지 암컷의 卵巢의 무게를 測定하여 體重에 대한 比率인 G.S.I.를 나타낸 것으로서 水溫이 상승하는 초여름에 가까울수록 卵巢의 무게는 증가한다는 事實을 알 수 있었는데 2월과 5월의 G.S.I.는 각각 5.3%와 20.15%를 나타내었다. 이는 Bieniarz(1977), Clemens(1967) 그리고 Giller(1978)의 結果와 類似하였다.

Plate I은 oocyte의 각 發達段階를 현미경적 觀察을 통해서 나타낸 것으로서 Hirose 등(1977)은 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 characteristics)을 基礎로하여 8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 μm, 核仁의 形態는 타원형이고 크며, 染色質이 실처럼 가늘게 나타났다. 染色시 核質 및 卵黃도 好鹽基性を 띠고 있었다.

Stage II-Late perinucleolus(Pl. I-2, 3) : 490-510μm, 核의 形態는 둥글고 크며 染色시 細胞質은 두가지 띠(zones)를 띠고 있는데, Pl.-9은 核을 擴大시킨 것으로서 內側은 진한 好鹽基性を 띠고 緻密하며, 外側은 약한 好鹽基性を 나타내고 그다지 치밀하지 못하다. 두가지 띠의 境界는 一般적으로 明確하게 구분되어 있지는 않으나 어느 정도 구분이 가능하였다.

Stage III-Early maturing(Pl. I-4) : 그 크기는 740-760μm으로써 중간형태를 나타내며 核의 形態는 타원형이고 그 크기는 130-150μm이다. 核膜 바로 인접해서 好鹽基性を 띠고 있는 核仁이 位置해 있다. 細胞質에는 yolk vesicle(Pl. I-1, 2, 3) 즉 yolk globules(Pl. I-3)가 있다.

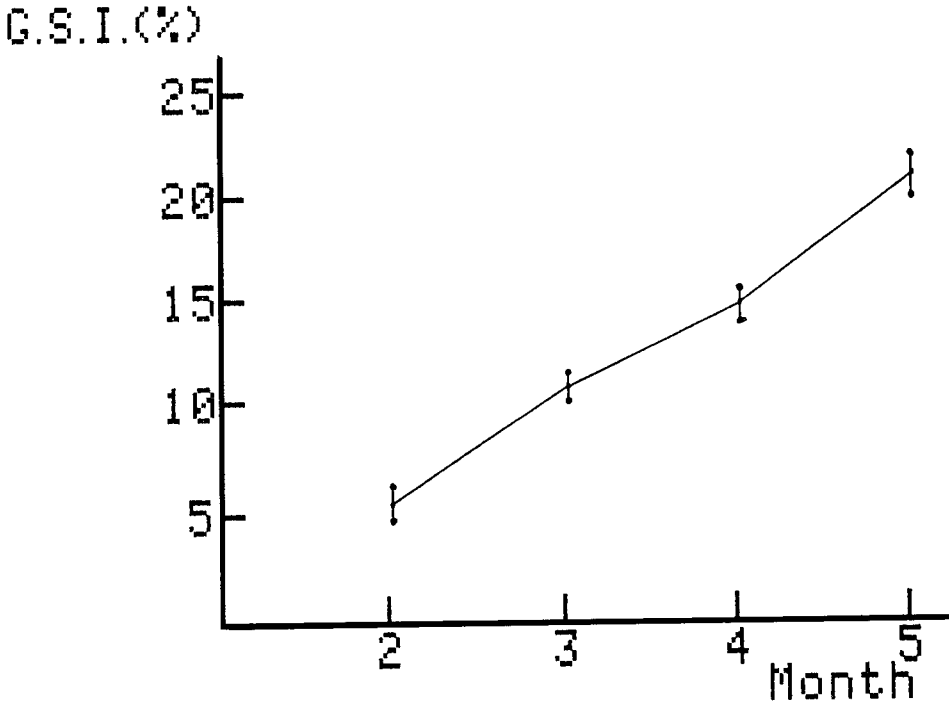


Fig. 6. Changes in the gonadosomatic index in Israeli carp.
The vertical bars represent the mean \pm S.D.

Stage IV-Late maturing(Pl. I-5) : 이 段階는 그 크기가 약 1000 μ m로써 전단계보다 크고, 核膜이 明瞭하게 觀察되지 않으며, 染色시 核質은 약한 好酸性을 띠었고, 核仁이 核中央에 位置해 있었으며, 核의 크기는 230~250 μ m이며, yolk globules가 細胞質 内部를 가득히 채우고있다. 이 段階는 3月, 4月, 5月경에 全體比率중 약 13~15%를 차지하고있다.

Stage V-Migratory nucleus stage(Pl. I-6) : 크기는 약 870-1000 μ m이고, 이 단계의 핵은 細胞質의 外側(periphery) 부근에 위치해 있으며, 이 段階의 초기에 卵黃은 癒着狀態로 있게된다. 이 段階는 4月, 5月中旬에 차지하는 비율이 약 17%정도를 나타내었다.

Stage VI-Ripe(Pl. I-7) : 크기는 약 1-1.2mm이며, 작은 oil globules가 細胞質에 一定하게 分布되어있다. 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 VII-Over-ripe(Pl. I-8) : 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직경은 個體에 따라 다르게 나타났으나 stage VII에 가까울수록 크게 나타났다. Plate I-10은 oogonia와 hyaline상태인 oocyte를 나타내나 그 數量은 적은 傾向을 나타내고 있다. Early perinucleolus oocytes는 Table 2에서와 같이 모든 samples에서 存在하며 2月경에 가장 풍부하게 나타났으나, 水溫이 상승하는 5월에 가까울수록 減少하였다. 대부분의 early perinucleolus oocytes는 직경이 약 200 μ m이며, 2月경에는 그 크기가 140 μ m로 나타났다.

Late perinucleolus oocytes는 follicle layer바로 内側에 있는 cytoplasm에서 좁고 明瞭한 부분을 가지고 있다.

Table 2를 볼 때 late maturing oocytes는 2月경에는 그 수가 비교적 적게 存在하였으나, 3月,

4月, 5月경에 갈수록 점점 더 증가하였다.

要 約

이스라엘 잉어 卵母細胞의 發達段階와 血清중 호르몬 濃度の 變化를 알기 위해서 2月부터 5月까지 본 研究를 수행했다.

본 研究에서 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 卵巢가 發達되는 3月에 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. 3月경부터 G.S.I.가 急激하게 증가했다.
4. 3月중에는 成熟段階가 상당히 증가했다.
5. Early perinucleolus oocyte가 late perinucleolus oocyte로의 빠른 發達을 나타냈다.
6. 卵黃이 蓄積됨으로써 late perinucleolus oocyte가 初期成熟段階인 oocyte로 되는 시기에 vitellogenesis가 시작되었다.
7. Oocyte가 後記成熟段階에 到達했을 때 細胞質內에 卵黃으로 가득 채워졌다.
8. 이스라엘 잉어 卵巢의 현미경적 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 重要的 역할을 수행하는 것으로 나타났다.

REFERENCE

- 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.
- Bieniarz, K., P. Epler, B. Breton, and L.N. Thuy. 1977. The annual reproduction cycle in adult carp in Poland : Ovarian state and serum gonadotropin level. Symposium la reproduction des poissons paimpont. France : 19-20.
- Bieniarz, K., P. Epler, L.N. Thuy, and E. Kogut. 1979. Changes in the ovaries of adult carp. Aquaculture, 17 : 45-68.
- Bieniarz, K., P. Epler, L.N. Thuy, and B. Breton. 1980. Change in blood gonadotropin level in mature female carp following hypophysial homogenate injections. Aquaculture. 20 : 65-69.
- Billard, R., A. Fostier, C. Weil, and B. Breton. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39 : 65-79.
- Bilard, R., J.P. Choisis, and P. Reinaud. 1983. Stimulation of spermiation in carp in response to LH-RH and D-Ala-LH-RH ethylamide. Aquaculture, 35 : 173-176.
- Clemens, H.P. 1967. Testicular characteristics of goldfish, *Carassius auratus*, in nature and under diet limitations. J. Morph., 122 : 131-138.
- Crim, L.W. and D.M. Evans. 1978. Seasonal levels of pituitary and plasma gonadotropin in male and female Atlantic salmon parr. Can. J. Zool., 56:1550-1555.
- 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.
- Epler, P., E. Marosz, and K. Bieniarz, 1979. Effect of teleost pituitary gonadotropin on the in vitro maturation of carp oocytes. Aquaculture, 18 : 379-382.
- Fourcher, R.P., and R.J. Beamish. 1980. Production of nonviable oocytes by pacific hake, *Merluccius*

- productus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37 : 41-48.
- Gillet, C., B. Breton, and R. Rillard. 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.
- Hirose, K. and R. Ishida. 1974. Induction of ovulation in the ayu, *Plecoglossus altivelis*, with LH-Releasing hormone(LH-RH). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40(12) : 1235-1240.
- 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.
- Hirose, K., R. Ishida, and K. Sakai. 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.
- Howell, W.H. 1983. Seasonal changes in ovaries of adult yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*. Fishery Bulletin, 81(2) : 341-355.
- Hunt, S.M., T.H. Simpson, and R.S. Wright. 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.
- 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.
- Manning, N.J., and D.E. Kime, 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.
- Stuart-Kregor, P.A.C., J.P. Sumpster, and J.M. Dodd. 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.
- 윤중만, 이상목, 박홍양. 1987. 韓國産 미꾸리에 있어서 HCG나 송어의 腦下垂體에 의한 排卵誘期와 卵母細胞의 組織學的 變化, 家畜繁殖學會誌, 11(3) : 170-180.

이스라엘 잉어 卵母細胞의 組織學的變化 및 호르몬 水準의 變化

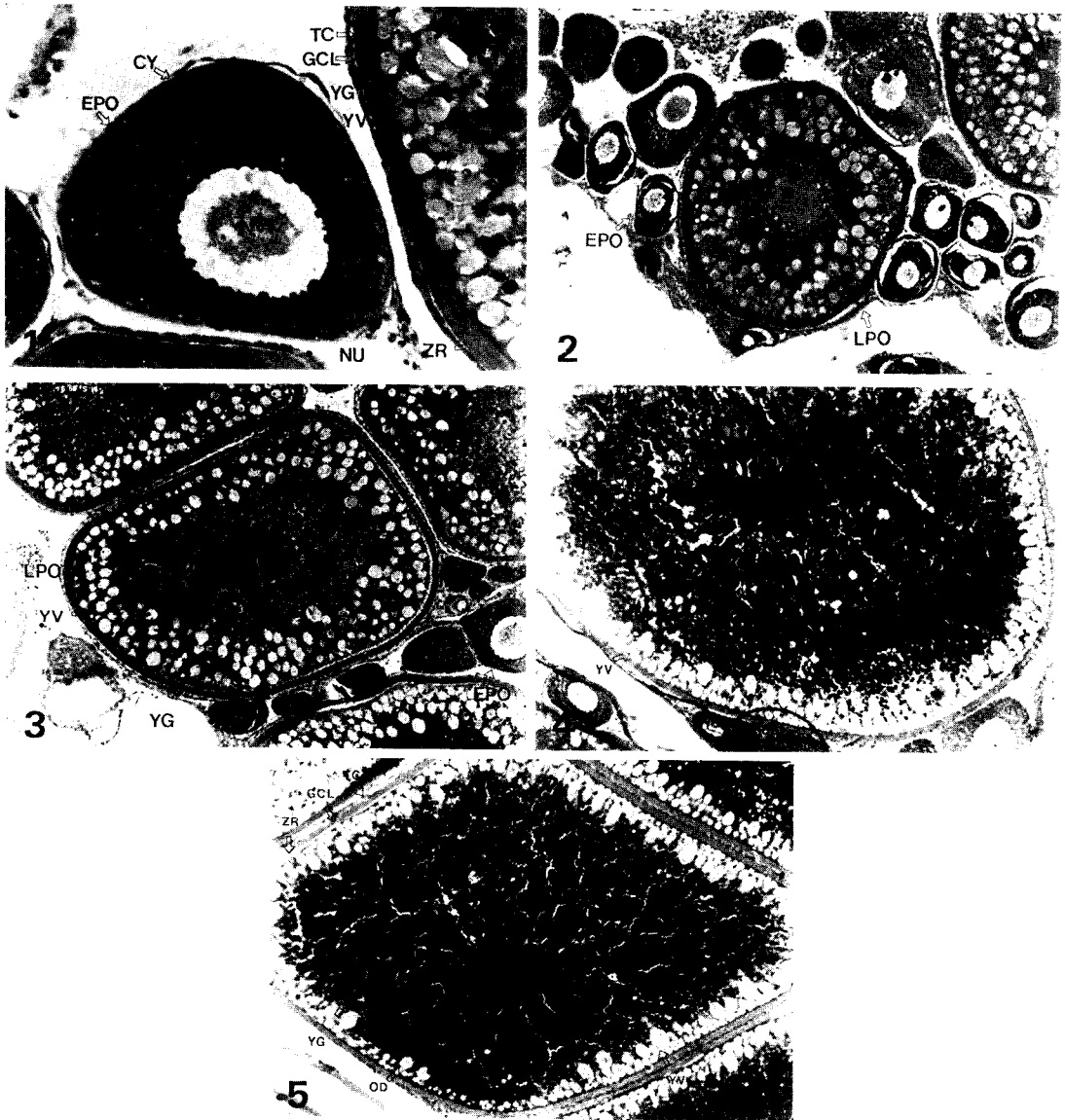
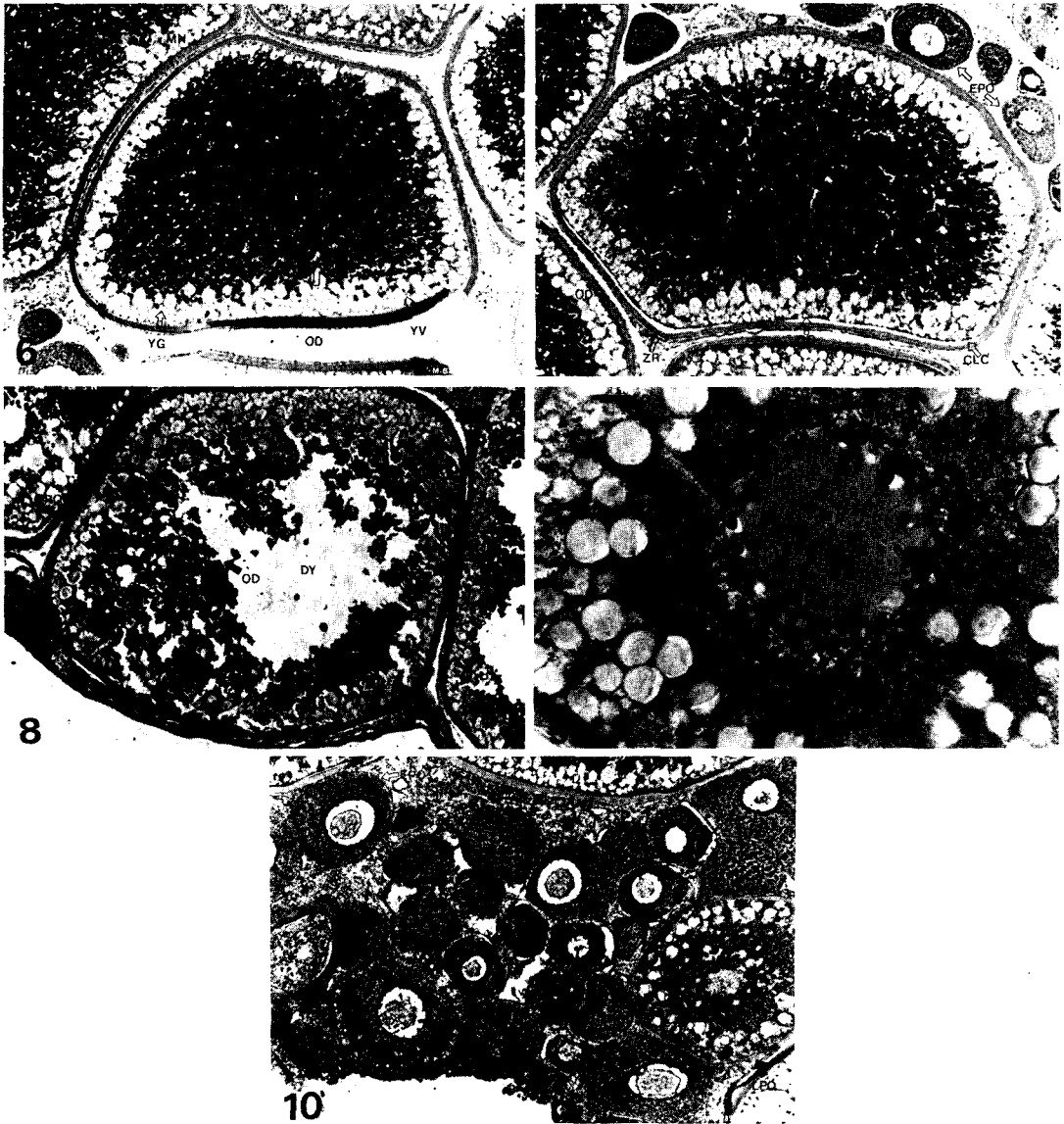


Plate I. Explanations of Figures

Light-microscophics 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
- 2.3. Late perinucleolus stage of the Israeli carp with yolk vesicles or globules. OD : oil droplets, YG : yolk granules or globules, vesicles
4. Early maturing stage of the Israeli carp with yolk vesicles or globules,
5. Late maturing stage. YV : yolk vesicles



6. Migratory nucleus stage of oocyte(migrating nucleus of late maturing oocyte or peripheral GV stage), MN : migratory nucleus, OD : oil droplets
7. Ripe stage(ovulated oocyte). CLC : cortical layer of cytoplasm, EPO : early perinucleolus oocyte, OO : ovulated oocyte(ripe oocyte)
8. Over-ripe stage(aggregation of oil globules).
DY : degenerating yolk, OD : oil droplets,
ORO : over-ripe oocyte
9. The amplification of germinal vesicle, N : nucleus(small), NU : nucleolus(large), OD : oil droplets, YG : yolk granules or globules, YV : yolk vesicles
10. Immature stage, The stage is filled with large amount of early or late perinucleolus oocytes. EPO : early perinucleolus oocyte, HY : hyaline oocyte, LPO : late perinucleolus oocyte.