

hCG가 한국산 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)의 性成熟에

미치는 影響

송기철 · 이재현 · 이종영 · 신재구 · 윤종만 · 박홍양

建國大學校 畜產大學

Effects of hCG on Sexual Maturation in Korean Loach

Song, K.C., J.H. Lee, J.Y. Lee, J.K. Shin, J.M. Yoon and H.Y. Park

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was carried out to obtain basic information available on ovulation, spawning, fertilization rate, hatching rate, and deformity rate after hCG injection in cyprinid loach, *Misgurnus mizolepis*.

The results obtained in these experiments were as follows :

1. Ovulation and spawning occurred simultaneously and spawning was completed within 1 hour after ovulation.
2. More than 80% of fertilization rates appeared within 12 hours at 21°C, 8 hours at 25°C, and 4 hours at 29°C, respectively, following the onset of spawning. Afterwards, the fertilization rates of released eggs sharply decreased in three different water temperatures.
3. More than 70% of hatching rates appeared within 8 hours at 21°C, 6 hours at 25°C, and 2 hours at 29°C, respectively, following the onset of spawning. Afterwards, hatching rates of spawned eggs abruptly decreased in three different water temperatures.
4. The deformity rates of hatched larvae were high at 25°C, 8 hours following the onset of spawning.
5. Based on the developmental ability of oocytes, the optimum time of fertilization was 4 hours (stage 5) following the onset of spawning.

(Key words : hCG, maturation, spawning, ovulation, Korean loach)

I. 緒 論

70년 대부터 시작된 비약적인 경제성장은 80년대에 접어들어 GNP의 향상으로 인한 국민 식생활 구조에 변화를 가져와 건강식품인 고급 어류의 수요가 증가하게 되었으나, 그 동안 어류시장을 주도해 온 자연산 어획고는 자원 및 생산 원가면에서 이미 한계점에 도달하였다.

한편 쌀 농사를 위주한 耕種農業의 결과로 정부미 재고가 1990년 10월말 현재 1,310만섬으로 급증하여

재고관리 비용만 연간 4,420억원이 소요되고 있는 실정이다(東亞日報, 1990). 이와 같은 문제점의 해결방안으로 內水面養殖을 이용하는 有機農法으로 전환한다면 농촌의 생활 안정을 위한 소득증대와 동시에 내수면 양식의 발달이 기대된다.

최근에 Bieniarz 등(1979, 1980), Manning과 Kime(1984), 이 등(1989)이 잉어(*Cyprinus carpio*), Hirose와 Ishida(1974), Hirose 등(1977), Aida(1983)가 은어(*Plecoglossus altivelis*), Hirose 등(1977), Howell(1980)이 문치 가자미(*Limanda*

yokohamae), Sneed와 Clemens(1960)이 메기 (*Clarias lazera*), Hunter 등(1981, 1982)이 연어 (*Oncorhynchus kisutch*), Suzuki 등(1985), Oshiro와 Hibiya(1982), 윤 등(1987), 이(1991)가 미꾸리과 어종의 性成熟 및 排卵을 호르몬처리에 의하여 인위적으로 조절할 수 있다고 보고하였다.

Howell(1983), Ueda 등(1983), 김(1991)도 成熟中인 oocyte의 각 발달단계를 관찰하여 성선자극 호르몬과 steroid성 호르몬이 性成熟과 排卵誘起에 효과가 있다고 보고하였다.

본 연구는 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)에 있어서 hCG 주입후 발생하는 卵母細胞의 발달에 따른 排卵, 產卵, 受精率, 孵化率 및 畸形率을 조사하여 생산성 향상과 우량품종을 생산하는데 필요한 자료를 얻기 위하여 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 供試動物

供試魚는 체중 16.3~33.5g(평균 24.8g)인 미꾸라지 105尾를 구입하여 건국대학교 축산대학 동물유전육종학실험실 부설 양어장의 靜水式 못에서 6개월동안 인공사료(잉어용 pellet 사료, 고령특수사)로 馴致, 適應시킨 후, 실험군별로 循環濾過式 수조에 나누어 실험에 이용하였다.

2) 飼育裝置

靜水式 못은 2.5m×2.0m×0.45m의 크기이고, 방수처리를 위해 비닐을 깔고 그 위에 흙을 15cm 높이로 덮었다. 적응기간 동안의 環水量은 1일 당 전체 水量의 1/5이었다.

循環濾過式 水槽는 plastic 물통(100 liter) 4개에 여과조(150 liter)를 PVC 배관과 PUMP(1/4HP, 한일 펌프사)로 연결, 설치하여 飼育水를 순환시키며 동시에 산소를 공급하였다. 여과조내의 여과재료로 자갈을 사용하여 사육기간 동안 공시어가 배출한 배설물을 제거하여 사육수의 오염을 방지했다. 수온의 조절을 위해 heater와 온도조절기를 설치하여 전 실험기간을 통해 각각 21°C, 25°C, 29°C±1°C로 유지시켰다.

孵化槽는 용량이 400 liter인 스텐레스 제품을 이용

했으며, 부화조시설에도 역시 여과조와 heater를 설치하여 항온(25°C±1°C)을 유지하였다. 부화조 내부에는 20개의 망을 띄운 basket을 설치하여 각 군에서 나온 처리군을 분리하여 부화시켰다.

2. 方 法

1) 排卵 및 產卵

미꾸라지 암컷 20尾의 腹部에 魚體重 g당 10IU의 hCG(Profaci 5000, Swiss Serono사)를 주입한 후 25°C의 수조에 수용하여 9시간후부터 30분 간격으로 복부를 눌러서 산란 여부를 확인하고, 각 시간별로 공시어의 복부를 開腹하여 卵巢內 난의 형태학적 특성을 조사하여 배란과 산란 사이의 관계를 조사했다.

2) 수온에 따른 排卵時間과 放卵率

암컷 20尾에 어체중 g당 10IU의 hCG를 주사해서 수온 21°C, 25°C, 29°C인 수조에 각각 6, 8, 6尾씩 수용해서 산란개시 시간과 산란 완료시기를 기준으로 난의 방란율을 조사했다.

3) 排卵 후 난자의 발생능력

수온 25°C±1°C가 유지되는 수조에 수용중인 암컷 20尾에 어체중 g당 10IU의 hCG를 주입하여 배란을 유도한 후 21°C, 25°C, 29°C인 수조에 각각 6, 18, 6尾씩 수용해서 4시간 간격으로 hand-stripping하여 인공수정을 실시한 후 수정율, 부화율, 기형율을 조사했다.

4) 卵母細胞의 組織學的 분석

25°C±1°C가 유지되는 수조에 hCG 처리군(25尾)을 수용, 성성숙이 된 개체로부터 산란개시 후 4시간 간격으로 1g 정도의 난을 채취하여 Bouin's fluid로 고정시키고, 4μm 두께로 절단한 다음 H-E 염색 후 난의 크기 및 염색 특징, germinal vesicle의 위치, 核仁의 수, chromatin condensation의 정도, cytoplasm과 oocyte의 형태에 따른 발달단계를 조사하였다. 卵母細胞의 발달단계를 Hirose 등(1977)이 4단계로, Davis(1977)가 9단계로 나누었으나 Howell(1983)의 분류방법을 기초로 하여 본 연구에서는 6단계로 분류했고, 사용된 용어는 Bieniarz 등(1979), Epler 등(1979) 그리고 Howell(1983)이 사용한 용어를 이용하였다.

III. 結果 및 考察

1. 排卵 및 産卵

hCG 주사후 9시간 30분까지 전 개체중 산란한 개체는 1尾도 없었고, 卵巢내의 난은 전부 卵胞에 싸여 서로 연결되어 있었다. 대부분 난의 直徑은 $800\sim 900\mu\text{m}$ 이었고 투명한 황색이었다. 즉 난포에 싸여 있는 난은 배란 후의 성숙란과 같은 단계였다. 주사 10시간 후 2尾는 산란하지 않았지만 다른 3尾는 복부를 누를 때마다 직경 $800\sim 900\mu\text{m}$ 인 성숙란을 소량 방출했다. 배란이 일어난 성숙란을 최대한 stripping 한 후 개복해 본 결과, 난소내에 남아 있는 난은 난포에 싸여 있었다. 卵巢卵 중에도 난경이 $800\mu\text{m}$ 이상의 투명한 황색을 띠는 성숙란이 75% 존재했다. 10시간 30분후 5尾 중 2尾는 소량의 성숙란을 방출했지만 다른 3尾에서는 63%의 성숙난을 방출했다.

Hand stripping 한 후 개복해 본 결과, 난소내에는 배란한 성숙란은 거의 보이지 않았다. 즉 대부분의 성숙란은 산란되었고 난포에 싸여 배란이 안된 $800\mu\text{m}$ 이상의 투명한 대형 난이 11% 남아 있었다. 주사 11시간 후에는 5尾 전부가 산란했다. 산란한 공시어의 난소내에는 성숙란이 거의 배란되었고 남아 있는 소량의 난은 백색 불투명하고 직경이 약 $400\mu\text{m}$ 이하인 미성숙란이었다. 이러한 결과로 볼 때 난소내에서 배란이 일어나기 시작한 후 1시간 내에 산란이 완료되는 것을 알 수 있었다.

排卵(ovulation)과 産卵(spawning)이 기능상 다르지만 배란이 일어났을 때 거의 동시에 산란이 이루어진다는 Suzuki와 Yamaguchi (1975)의 보고와 유사하였다.

2. 수온에 따른 배란시간과 放卵率

hCG 주사후 10~17시간 사이에 모든 개체가 산란개시 상태에 도달했다(Fig. 1). 각 개체를 30분 간격으로 hand-stripping 하여 산란완료시기를 측정한 결과, 대부분의 암컷이 배란개시부터 30분 이내에 85%의 난을 방출하였는데 수온에 의한 차이는 거의 없었다(Fig. 2). 이러한 결과는 channel catfish의 경우 $21\sim 29^\circ\text{C}$ 의 온도 범위내에서 산란율이 좋았다는 Cle-

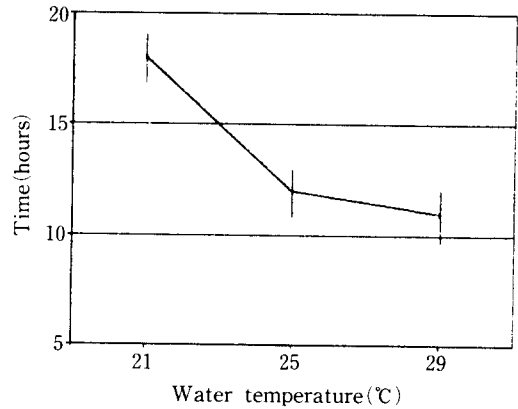


Fig. 1. Time of induced spawning at various water temperature. Vertical bars represent standard error of mean.

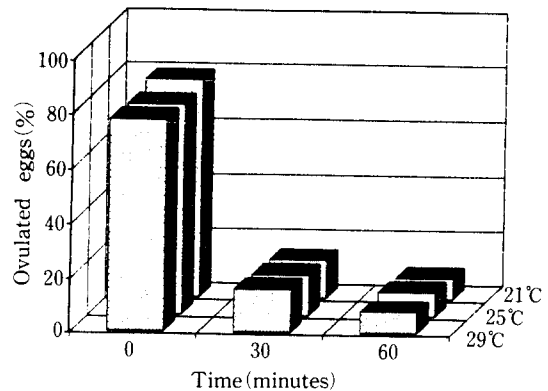


Fig. 2. Ratio of stripped eggs according to times following ovulation.

mens와 Sneed (1957)의 보고와 유사하였다.

산란을 완료한 5尾를 개복해서 난소를 조사한 결과, 난소내에 남아 있는 대부분의 난은 백색 불투명하고 직경이 $400\mu\text{m}$ 이하이며 난포에 싸여 있는 미성숙란이었다. 즉 성숙란은 모두 산란되었고 미성숙란만이 소량 존재하였다.

Suzuki (1976)의 보고에 의하면 일본산 미꾸리에서는 난소 部位에 따라 성숙속도가 다르기 때문에 배란이 일어나는 시간에도 상당한 차이가 있다고 보고한 것과

본 실험의 결과와는 다소 차이가 있었다.

3. 排卵後 난자의 발생능력

암컷 20尾에 hCG를 주사한 11~13시간후에 모든 개체가 산란개시에 도달하였고 그 후 20분 뒤 각 개체에서 100개의 난을 搾出해서 수정시키고 나머지 난은 그대로 모체내에 남겨두었다. 암컷을 다시 21°C, 25°C, 29°C로 유지되는 수조에 6, 8, 6尾씩 분리 수용해서 4시간 간격으로 난을 착출하였다. 각 군의 수정율은 21°C에서 배란 후 12시간 이내, 25°C에서 8시간 이내, 29°C에서 4시간 이내에 80% 이상을 나타냈다 (Fig. 3). 즉 수온이 높을수록 배란후 단시간내에 난의 수정능력이 저하되는 것을 나타냈다.

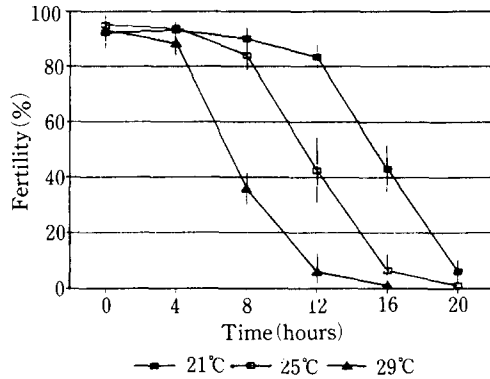


Fig. 3. Fertility in eggs of loach (*Misgurnus mizolepis*) at various times after ovulation.

Vertical bars represent standard error of mean.

孵化率은 배란 후 21°C에서 8시간, 25°C에서 6시간, 29°C에서 2시간 이내에 70% 이상을 나타냈고 그 이후는 급격히 감소했다 (Fig. 4). 이러한 결과는 미꾸라지와 같은 온수성 어류인 channel catfish의 난을 18~29°C에서 부화시켰을 때 가장 좋은 결과를 초래했다는 Martin (1967)의 보고와 같이 부화 적수온대에서의 온도별 차이는 심하지 않은 것으로 사료된다. 배란 후 난의 受精率과 孵化率을 비교해 보면 부화율이 수정율보다도 훨씬 단시간내에 저하되는 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 Suzuki와 Yamaguchi (1975)가 일

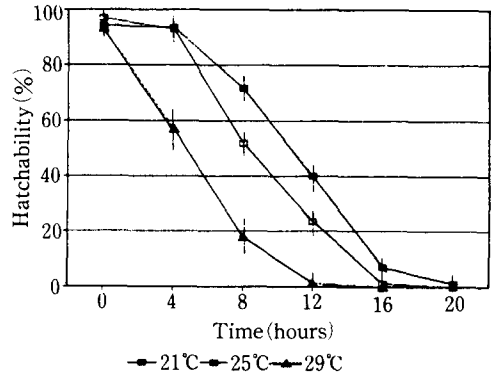


Fig. 4. Hatchability in eggs of loach (*Misgurnus mizolepis*) at various times after ovulation.

Vertical bars represent standard error of mean.

본산 미꾸라지에 대해 조사한 결과와 같이 배란 후, 난은 수정능력을 보유하고 있어도 일정 시간이 경과하면 過熱이 되어 原形質이 변화해서 胚芽가 정상적으로 발생되지 않기 때문에 孵化率의 저하를 초래한다는 것과 유사하였다.

수온 25°C에서 산란 개시시, 4시간 후, 8시간 후 및 12시간 후에 수정시켜 부화된 치어의 기형율은 각각 6.1%, 7.2%, 15.3% 및 50.2%로서 산란개시 12시간 후에 처리한 군이 유의하게 ($p < 0.05$) 가장 높았다 (Fig. 5). 이와 같이 畸形率이 높은 것은 시간의 경과에 따라 난이 過熱된 것에 기인하는 것으로 사료된다.

4. 卵母細胞의 組織學的 變化

hCG 주입후에 卵母細胞의 발달을 6단계로 분류한 결과는 다음과 같다.

Stage 1-Early perinucleolus stage (Pl. I-1): 核仁의 형태는 타원형이고 염색시 核質은 好鹽基性 (basophil)을 띠고 크기는 약 80~150 μm 정도이다.

Stage 2-Late perinucleolus stage (Pl. I-2, 3): 핵의 형태는 둥글고 크며 내측은 진한 호염기성을 띠고, 외측은 약한 호염기성을 보여주고 있고, 난황포 (yolk vesicles)가 서서히 형성되며, 크기는 약 180~250 μm 이다.

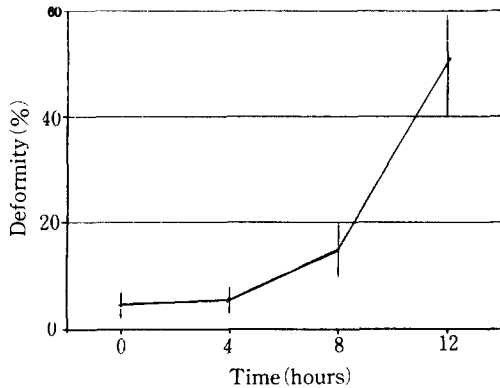


Fig. 5. Deformity of larvae in loach (*Misgurnus mizolepis*) at various times after ovulation at 25°C
Vertical bars represent standard error of mean.

Stage 3-Early maturing stage (Pl. I-4) : 핵의 형태는 타원형이고 조금 더 커진 난황 포가 다수 나타나고 난황입자(yolk granules)가 형성되어진다. 크기는 약 400~480 μm 이다.

Stage 4-Late maturing stage (Pl. I-5, 6) : Migratory nucleus 단계로서 핵이 중앙에서 細胞質

외측으로 이동하고 난황입자가 가득 채어진다. 크기는 약 550~650 μm 이다.

Stage 5-Ripe stage (Pl. I-7) : 핵은 확인되지 않고 난황입자가 단단하게 뭉쳐 난을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. 크기는 700~900 μm 이고, 이 단계가 수정하기에 적합한 성숙란으로서 수정 직후에서 4시간 사이에 가장 많이 존재한다.

Stage 6-Over ripe stage (Pl. I-8) : 細胞質의 퇴행 (degeneration)과 수축 (shrinkage)이 일어난다. 이 단계는 배란후 12~16시간 사이에 가장 많이 존재하는 것을 확인했다. 따라서 hCG 주입후 난모세포가 정상적으로 발달하여 수정됨을 확인할 수 있었다.

IV. 摘要

본 연구는 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)에 있어서 hCG 주입후 卵母細胞의 발달에 따른 排卵, 産卵, 受精率, 孵化率 및 畸形率을 조사하여 생산성 향상과 우량품종을 생산하기 위한 기초연구로서 실시하였다.

본 실험에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 排卵과 産卵은 거의 동시에 일어나고 배란 개시후 1시간 내에 산란이 완료되었다.
2. 受精率이 80% 이상을 보인 것은 수온 21°C에서 12

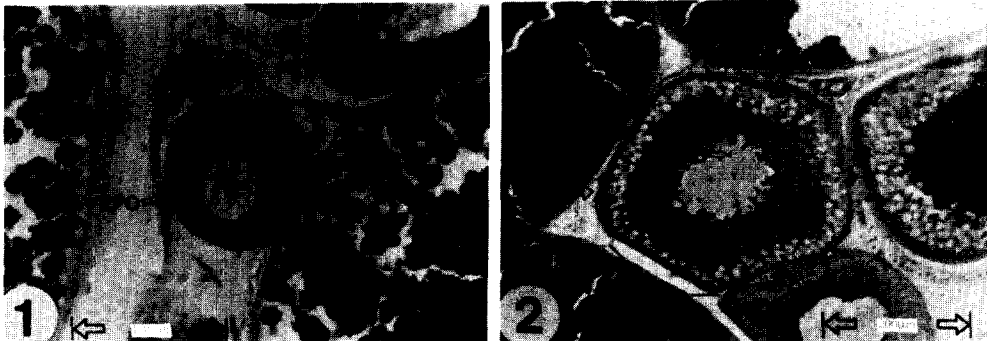
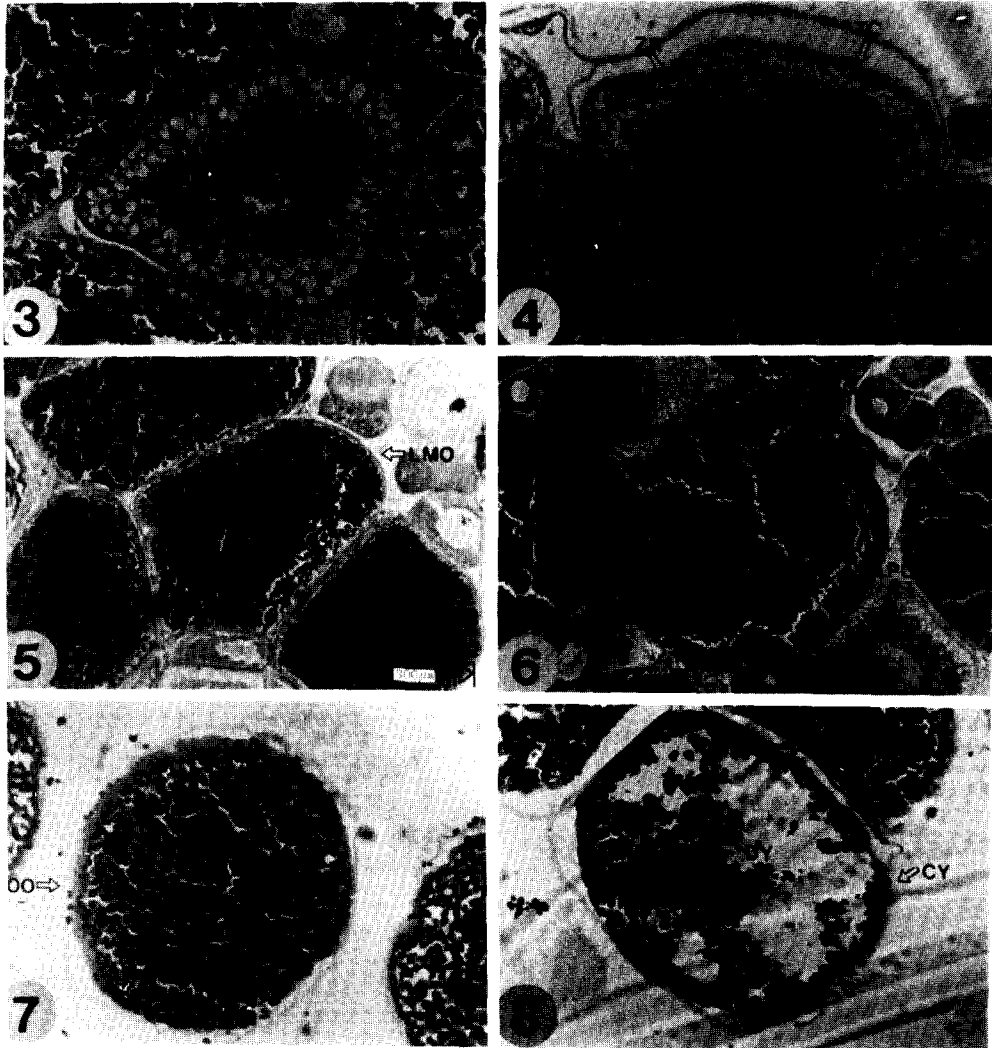


Plate. I. Explanations of Figures

Light-microscops of ovaries of female Cyprinid loach, Bouin's fluid-fixed, paraffin-embedded and haematoxylin-eosin stained preparations.

1. Early perinucleous stage.

CY : cytoplasm, EPO : early perinucleolus oocyte, N : nucleus, NU : nucleolous



2, 3. Late perinucleolus stage.

EPO : early perinucleolus oocyte, LPO : late perinucleolus oocyte, YV : yolk vesicles, GCL : granulosa cell layer

4. Early maturing stage.

ZR : zona radiata, TC : thecal cell, YG : yolk granules

5, 6. Late maturing stage.

N : nucleus, MN : migratory nucleus

7. Ripe stage (ovulated oocyte).

OO : ovulated oocyte, YG : yolk granules

8. Over ripe stage.

DY : degenerating yolk, CY : cytoplasm

시간 이내, 수온 25°C에서는 8시간 이내, 29°C에서는 4시간 이내이고, 그 후에 산란된 난의 受精率은 3수온군 공히 급격히 낮아졌다.

3. 孵化率이 70% 이상을 보인 것은 21°C에서 8시간 이내, 25°C에서는 6시간 이내, 그리고 29°C에서는 2시간 이내이고, 그 후에 산란된 난의 부화율은 3수온군 공히 급격히 낮아졌다.
4. 25°C에서 산란개시 8시간 후에 부화된 치어군에서는 기형율이 높았다.
5. hCG 주입후 조직학적인 변화로 볼 때 산란 직후부터 4시간 사이가 수정적이었다(Stage 5).

V. 引用文獻

1. Aida, K. 1983. Effect of LH-releasing hormones on gonadal development in a salmonoid fish, the ayu. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(5) : 711-718.
2. Bieniarz, K., P. Epler, L.N. Thuy and E. Kogut. 1979. Changes in the ovaries of adult carp. Aquaculture, 17 : 45-68.
3. Bieniarz, K., P. Epler, L.N. Thuy and E. Kogut. 1980. Changes in blood gonadotropin level in mature female carp following hypophysial homogenate injections. Aquaculture, 20 : 65-69.
4. Clemens, H.P. and K.E. Sneed. 1957. The spawning behavior of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. U.S. Department of the Interior, Special Scientific Report-Fisheries, No.219. 11p.
5. Davis, T.L.O., 1977. Reproductive biology of the fresh water catfish, *Tandanus tandanus* Mitchell, in the Gwyder river, Australia, I. structure of the gonads. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 28 : 139-158.
6. 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.
7. Hirose, K., 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.
8. Hirose, K., Y. Machida and M. Donaldson. 1977. 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. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45(1) : 31-36.
9. Howell, W.H. 1980. Temperature effects on growth yolk utilization in yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*, yolk-sac larvae. Fish. Bull., 78(3) : 731-739.
10. Howell, W.H. 1983. Seasonal changes in ovaries of adult yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*. Fish. Bull., 81(2) : 341-355.
11. Hunter, G.A., E.M. Donaldson and H.M. Dye. 1981/1982. Induced ovulation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, I. Further studies on the salmon pituitary preparation. Aquaculture, 2 : 117-127.
12. Manning, N.J. and D.E. Kime. 1984. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L. Gen. Comp. Endocrine, 56 : 376-388.
13. Martin, M. 1967. Techniques of catfish fingerling production. In proceedings of the commercial fish farming conference, Texas A & M University, February 1-2. Texas A & M University, College Station. pp. 13-22.
14. Oshiro, T. and T. Hibiya. 1982. Protease secretion of ovarian follicles in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*, suggesting the presence of ovulation-inducing enzyme. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48(5) : 623-628.

15. Sneed, K.E. and H.P. Clemens. 1960. Use of fish pituitaries to induce spawning in channel catfish, *Clarias lazera*. U.S. Fish and Wildlife Service. Special Scientific Report-Fisheries, No. 329.
16. Suzuki, R. 1976. Number of ovarian eggs and spawned eggs and thier size composition in the loach, cyprinid fish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 42(9) : 961-967.
17. Suzuki, R., T. Nakanishi and T. Oshiro. 1985. Survival, growth and sterility of induced triploids in cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51(6) : 889-894.
18. 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.
19. Ueda, H., Y. Nagahama, F. Tashiro and L.W. Crim. 1983. Some endocrine aspects of precocious sexual maturation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(4) : 587-596.
20. 김계웅. 1991. 무지개송어의 혈청중 호르몬 농도, 혈청 성분 수준, 유전자형 빈도 및 조직학적 변화에 관한 연구. 건국대학교 대학원 축산학과 박사학위 논문.
21. 東亞日報 1990年 11月 21日 3面.
22. 윤종만, 이상목, 박홍양. 1987. 한국 미꾸리에 있어서 hCG 나 송어의 뇌하수체에 의한 산란유기와 난모세포의 조직학적 변화. 가축번식학회지, 11(3) : 170-180.
23. 이재현, 윤종만, 박홍양. 1989. 이스라엘 잉어 (*Cyprinus carpio*) 난모세포의 계절에 따른 조직학적 변화 및 호르몬 수준의 변화, 한국가축번식학회지 13(3) : 127-133.
24. 이종영. 1991. 수온이 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*) 수정란의 발달과 치어 성장물에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 축산학과 석사학위논문.