

## 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 난소 성숙에 대한 Serotonin, Ecdysone 그리고 HCG의 효과

이재용<sup>1,2</sup> · 김대중<sup>2</sup> · 김대현<sup>2</sup> · 김명희<sup>1</sup> · 김병기<sup>1</sup> · 이복규<sup>1</sup> · 한창희<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 분자생물학과, <sup>2</sup>국립수산과학원

## Effects of Serotonin, Ecdysone and HCG on Ovarian Maturation of the Fleshy Prawn, *Fenneropenaeus chinensis*

Jae-Yong Lee<sup>1,2</sup>, Dae-Jung Kim<sup>2</sup>, Dae-Hyun Kim<sup>2</sup>, Myung-Hee Kim<sup>1</sup>, Byung Ki Kim<sup>1</sup>,  
Bok Kyu Lee<sup>1</sup> and Chang-Hee Han<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Molecular Biology, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>NFRDI, Gijang-gun, Busan 612-902, Korea

**ABSTRACT** : The effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), ecdysone (20-hydroxyecdysone, 20-E) and HCG (human chorionic gonadotropin) on the ovarian maturation of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* were investigated. Adult female fleshy shrimps were injected with 5-HT (5 µg/g body weight (BW) or 20 µg/g BW), 20-E (5 µg/g BW, 10 µg/g BW or 20 µg/g BW) or HCG (5 IU/g BW or 10 IU/g BW) three times at 5-day intervals and were sacrificed 10 days after the last injection. The effects were compared against an intact control group and sham control group which received the injection of sterile saline solution as a vehicle. 20-E and HCG showed no effectiveness on ovarian maturation in fleshy shrimps. However flesh shrimp given 5-HT of 20 µg/g BW showed significant increase in gonadosomatic index (GSI) in early spring. The results suggest that treatment of 5-HT of 20 µg/g BW or more is useful approach for the nursery production of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* aquaculture.

**Key words** : *F. chinensis*, Ovarian maturation, 5-Hydroxytryptamine (5-HT), Ecdysone, HCG.

**요 약** : 대하, *Fenneropenaeus chinensis*의 난소 성숙에 대한 serotonin(5-hydroxytryptamine, 5-HT), ecdysone(20-hydroxyecdysone, 20-E) 그리고 HCG(human chorionic gonadotropin)의 효과를 조사하였다. 대하에 5-HT(체중 g당 5 µg, 20 µg), 20-E(체중 g당 5 µg, 10 µg, 20 µg) 그리고 HCG(체중 g당 5 IU, 10 IU)를 5일 간격으로 3회 주사한 후 10일이 더 지난 시점에 채집하여 성 성숙도지수(GSI)의 변화와 난소의 조직학적 변화를 조사하였다. 호르몬제의 효과를 비교하기 위해 멸균한 생리식염수만을 주사한 대조구와 아무 것도 처리하지 않은 무처리구를 설정하였다. 20-E와 HCG를 처리한 실험구에서는 난소 성숙 효과가 전혀 나타나지 않았으나, 이른 봄에 5-HT를 체중 g당 20 µg으로 처리한 실험구에서는 유의한 난소 성숙효과를 보였다. 본 실험 결과에서 대하에 5-HT를 체중 g당 20 µg 이상 처리하면 난소성숙을 유도할 수 있다는 것을 보여주었으며, 이는 대하의 종묘 생산에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

### 서 론

갑각류에서 생식소의 발달은 일반적으로 두 종류의 상반된 호르몬, 즉 눈자루의 X기관 사이너스선 복합체(X-organ

sinus gland complex, XO-SG)에서 분비되는 생식소 억제 호르몬(gonad inhibiting hormone, GIH)과 뇌와 흉부 신경절에서 분비되어지는 생식소 자극호르몬(gonad stimulating hormone, GSH)에 의하여 조절되어진다고 알려져 있다(Review in Adiyodi, 1985). 이러한 보고들을 이용하여 계류와 새우류에서는 인위적으로 생식소 성숙을 촉진시키기 위하여 눈자루를 절제하는 방법이 오래전부터 사용되어왔다. 그러나

\* 교신저자: 부산광역시 부산진구 엄광로 995번지 동의대학교 분자생물학과. (우) 614-714, (전) 051-890-1524, (팩) 051-890-1521, E-mail: chhan@deu.ac.kr

이러한 눈자루 절제에 의한 생식소의 조기 성숙 유도는 난질의 저하와 모하의 폐사율을 증가시킨다는 단점때문에 대부분의 새우류에서는 보편적으로 사용되지 않고 있다. 오래전부터 안전하게 생식소 성숙 촉진을 유도하여 양질의 수정란을 얻기 위해 생식소 성숙에 관련된다고 알려진 다양한 생리활성 물질들, 즉 5-HT(Vaca & Alfaro, 2000), 20-E(Chan, 1995), HCG(Bomirski & Klek-Kawinska, 1976), 그리고 GnRH(gonadotropin-releasing hormone)(Ngernsoungnern et al., 2008) 등을 이용한 생식소 성숙 촉진 유도에 대한 연구들이 수행되어왔다.

5-HT는 갑각류에서 당대사, 일주 리듬, 행동, 먹이 섭취 그리고 생식과 같은 많은 생리학적 작용에 간접적으로 관여하는 것으로 보고되어 있으며(Arechiga et al., 1990; Fingerman et al., 1994; Fingerman, 1997a,b; Huber et al., 1997; Kravitz, 2000), 생화학적 방법과 면역조직화학적 방법에 의해 5-HT가 뇌와 눈자루 등에 있는 신경조직에 존재하며, 양적인 변화를 보인다고 밝히고 있다(Livingstone et al., 1981; Beltz et al., 1990; Elofsson, 1983; Rodriguez-Sosa, 1997). 5-HT는 가제인 *Procambarus clarkii*와 계의 한 종인 *Carcinus maenas*에서 혈액 림프내의 당 농도를 증가시킨다는 보고도 있으며(Luschen et al., 1993; Lee et al., 2000, 2001), 특히 생식소의 성숙에 관여한다고 보고되었다(Sarojini et al., 1995). 새우류에서 5-HT가 생식소 성숙을 촉진한다는 연구는 큰징거미새우(*Macrobrachium rosenbergii*)(Meeratana et al., 2006), 흰다리새우(*Penaeus vannamei*)(Vaca & Alfaro, 2000), 인도흰새우(*Fenneropenaeus indicus*)(Santhoshi et al., 2009), 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*)(Wongprasert et al., 2006) 등 많은 종에서 이루어져 왔으며, 양질의 수정란을 얻기 위해 수행되어져 왔다.

Ecdysone은 polyhydroxylated ketosteroids의 한 그룹으로써, 모든 절족동물에서 나타나며 기본적으로 탈피호르몬으로 알려져 있다(Bückmann, 1989). 갑각류에서 이 호르몬은 Y-organ에서 합성되어 혈액 중으로 분비되어 여러 주변 조직들에 의해 활성화된 ecdysone, 즉 20-E로 전환되어 탈피를 촉진한다고 알려져 있다(Goodwin, 1978). 그러나 모기류나 진드기류의 곤충에서는 ecdysteroids가 난황 형성에 관여하는 호르몬으로 알려져 있다(Hagedorn, 1994; Nijhout, 1994; Friesen & Kaufman, 2004). 갑각류에서도 암컷의 성 성숙 기간 동안 혈액내의 vitellogenin 수준의 변동과 ecdysteroid

들의 변동이 동일하게 일어난다는 보고들(Blanchet et al., 1979; Blanchet-Tournier, 1982; Okumura et al., 1992)과 Y-organ을 제거했을 때 난황 형성이 억제되어 난소의 발달이 지연된다는 보고(Meusy et al., 1977)가 있어 탈피호르몬인 ecdysteroid와 난황 형성과의 관계에 대해 많은 연구들이 진행되어왔다(Souty et al., 1982; Gohar & Souty, 1984; Lachaise & Lafont, 1984; Vafopoulou & Steel, 1995; Suzuki et al., 1996; Steel & Vafopoulou, 1998). 이들 연구에서 ecdysteroids는 갑각류의 제2차 난황 형성과 깊은 관련이 있다고 설명하고 있다.

HCG는 잘 알려진 peptide hormone으로써 어류 등 척추동물의 성 성숙 유도에 널리 사용되어 왔다. 최근에 GnRH가 척추동물에서 뿐만 아니라 무척추동물에서도 생식소 발달과 생식 기능에 관한다는 것이 알려지면서(Sherwood et al., 1993; Fernald & White, 1999; Gorbman & Sower, 2003; Tsai, 2006) 이와 유사한 peptide가 연체동물(Goldberg et al., 1993; Di Cosmo & Di Cristo, 1998; Pazos & Mathieu, 1999; Young et al., 1999; Zhang et al., 2000; Di Cristo et al., 2002; Tsai et al., 2003; Iwakoshi-Ukena et al., 2004; Zhang et al., 2008), 피낭류(Tsutsui et al., 1998; Di Fiore et al., 2000) 등에서 발견되어져서 갑각류에서도 GnRH 및 LH (leutinizing hormone)와 유사한 물질의 존재와 기능성에 대한 가능성을 예측하고 있다.

대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 발해만과 황해에서만 서식하는 보리새우류으로써 우리나라의 새우 양식 대상종 중 대표종이다. 대하의 인위적 성 성숙을 촉진하기 위하여 눈자루의 절제방법들이 이용되고 있으나, 성 성숙 유도물질로 알려진 5-HT나 20-E 그리고 HCG 등의 투여에 의한 성 성숙 촉진 효과와 이를 이용한 종묘 생산에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 대하의 인위적 성 성숙 촉진을 위한 적절한 방법을 찾기 위하여 눈자루 절제 방법과 5-HT를 비롯한 20-E, HCG 등 성 성숙 유도 호르몬제를 투여하여 생식소의 성숙 유도 효과와 그 영향에 대하여 조사하고자 한다. 또한 대하는 일정기간 동안 겨울철의 저 수온을 경험하지 않으면 생식소 성숙 억제 호르몬을 생성 분비하는 눈자루의 X-기관 복합체의 활성이 떨어지지 않아 수온을 올려도 난소가 발달하지 않는다고 보고하고 있어서(Lee, 2005), 대하의 인위적 성 성숙 촉진을 위한 적절한 시기를 알기 위해 겨울이 시작되는 12월 중순과 겨울철 저 수온 기간이 지난 다음해 2월 초, 그리고 수온이 15°C 이상으로 상승하기 시작하여 자연상

태에서도 난소가 발달하기 시작하는 3월 초 등, 세 차례에 나누어 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

대하의 생식소 성숙을 유도하기 위하여 11월 말에 대하의 주 어획 어장인 보령 외연도 주변 해역에서 월동을 마치고 북상 회유하는 자연 상태의 대하를 간조시에 낭장망으로 채집하였다. 채집되어진 대하는 당일 태안에 위치한 국립수산물과학원 서해특성화연구센터로 옮겨서 사육실험이 시작될 때까지 5톤 원형 콘크리트 수조( $\phi 2.5 \text{ m} \times 1.0 \text{ m}$ ) 2개에 각각 100마리씩을 수용하였다. 매일 자연해수를 교환하여 자연상태의 수온을 유지하였으며, 광주기도 자연조건이 되도록 하였다. 먹이는 하루에 1회 반지락 육편, 갯지렁이 그리고 상업용 보리새우 사료를 급이하였다. 대하의 암수 구별은 배 부분의 외부 생식기 형태로서 구분하였다.

### 2. 눈자루 절제

눈자루의 생식소 성숙억제 요인에 대한 활성 변화를 조사하기 위해 12월 20일과 2월 10일에 2차에 걸쳐 눈자루를 절제하여 수온 10°C 조건에서 각각 30일간 사육하여 난소의 발달 상태를 조사하였다. 눈자루는 한쪽만을 절제한 실험구와 양쪽 모두 절제한 실험구 그리고 눈자루를 절제하지 않은 무처리 실험구로 나누어 조사하였다.

### 3. 호르몬제의 투여

대하의 난소 성숙 유도를 위한 호르몬제로 5-HT, 20-E 그리고 HCG를 사용하였다.

#### 1) 1차 실험

12월 20일부터 다음해 1월 9일까지 교미한 암컷을 대상으로 수온 10°C, 일장 12L 12D의 조건에서 5-HT를 생리식염수에 녹여 체중 g당 5  $\mu\text{g}$  또는 20  $\mu\text{g}$ 을 5일 간격으로 3회에 걸쳐 100  $\mu\text{l}$  microsyringe를 이용하여 두흉갑과 제 1복절 사이의 등쪽 근육에 주사하였다. 20-E는 에탄올에 용해한 후 생리식염수로 희석하여 체중 g 당 5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  또는 20  $\mu\text{g}$ 이 되도록, HCG는 생리식염수에 녹여 체중 g 당 5 IU와 10 IU가 되도록 5일 간격으로 3회 주사하였다. 모든 호

르몬제의 주사 용량은 마리당 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 마지막 주사 후 10일이 지난 다음에 생식소 성숙 상태를 조사하였다. 개체별 구별을 하기 위하여 두흉갑 부분에 번호표를 붙여 사육하였으며, 먹이로는 반지락 육편을 주었다. 각 실험구와 비교를 위해 멸균한 생리식염수(NaCl 0.85%)만을 50  $\mu\text{l}$  주사한 대조구(sham control)와 아무 것도 처리하지 않은 무처리구(intact control)를 설정하였다. 사료는 체중의 3%가 되도록 반지락 육편을 주었으며, 하루에 1회 공급하였다.

#### 2) 2차 실험

2월 10일부터 생식소가 미숙한 단계의 교미한 암컷 대하를 대상으로 호르몬제의 투여, 사육조건 등을 상기한 1차 때의 실험 방법과 동일하게 실시하였다.

#### 3) 3차 실험

8°C 이하에서 월동을 시킨 암컷 대하를 대상으로 3월 5일부터 25일까지 수온을 15°C로 상승시키고 광주기 조건을 12L 12D로 하여 사육실험을 하였다. 5-HT는 체중 g 당 20  $\mu\text{g}$ , 20-E는 20  $\mu\text{g}$  그리고 HCG는 10 IU를 5일 간격으로 3회 주사하였으며, 주사 방법은 상기한 1차 실험 때와 동일하게 하였다. 마지막 주사한 후 10일간 더 사육한 후 생식소 발달 상태를 조사하였다.

### 4. 조직학적 조사

사육 중인 새우들에 대한 생식소의 발달 상태를 보존하기 위해 생식소 체중비(GSI: gonadosomatic index=생식소 중량/체중 $\times 100(\%)$ )를 산출하였으며, 척출된 생식소에 대해 조직학적 조사를 하였다. 생식소를 Bouin's액에 고정된 후, 탈수하여 상법인 Paraffin절편법에 의하여 5~7  $\mu\text{m}$ 의 두께로 절편하여 hematoxyrin-eosin 이중 염색을 한 후 검경하였다.

### 5. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 실험구간의 평균치에 대한 통계 처리는 ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. 눈자루 절제에 의한 난 성숙 촉진 효과

눈자루 내에 있는 생식소 성숙억제 요인에 대한 활성 변화를 조사하기 위해 겨울이 시작된 시점인 12월 20일과 겨울이 끝나가는 시점인 2월 10일 두 차례에 걸쳐 눈자루 절제에 의한 생식소 성숙 유도 효과를 조사하였다.

12월 20일부터 눈자루 절제에 의한 생식소 성숙 유도 실험 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험 개시 때의 대하의 난소는 주변인기의 난모세포(Fig. 3A)를 가지는 성장기의 미숙한 상태에 있었으며, GSI는  $1.52 \pm 0.14\%$ 이었다. 사육 15일 후인 1월 5일에 무처리한 대조구의 GSI는  $1.69 \pm 0.12\%$ 로 실험개시 때와 GSI나 난소의 조직학적 변화는 보이지 않았다. 눈자루를 한쪽만 절제한 실험구에서도 GSI가  $1.76 \pm 0.06\%$ 로 한쪽 눈자루 절제에 의한 생식소 성숙효과는 찾아볼 수 없었다. 양쪽 눈자루를 절제한 실험구에서는 GSI가  $3.27 \pm 1.00\%$ 로 평균치의 상승은 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 조직학적 조사에서는 대조구와 동일한 주변인기의 난모세포로 이루어진 미성숙한 개체들도 일부 있었지만, 대부분은 잘 발달된 여포세포로 둘러 쌓여있는 전난황 형성기의 난모세포(Fig. 3C)를 가지고 있었다. 사육 30일 후인 1월 20일에는 무처리 대조구나 한쪽 눈자루를 절제한 실험구에서는 GSI가 각각  $2.17 \pm 0.13\%$ 과  $2.01 \pm 0.03\%$ 로 나타나 GSI의 상승효과는 전혀 나타나지 않았다. 그러나 양쪽 눈자루를 절제한 실험구에서는 평균 GSI가  $7.73 \pm 1.61\%$ 로 유의하게( $p < 0.05$ ) 상승하였으며, 많은 개체들의 난소는 난황 형성 후기의 표층포를 형성한 완숙 상태의 난모세포(Fig. 3D)로 이루어져 있었다.

겨울철 저 수온시기가 지나 수온이 서서히 상승하기 시작하는 2월 5일부터 눈자루를 절제하여 생식소 성숙 유도 효과를 조사한 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 실험 개시 때 대하의 난소에 있는 난모세포들은 모두 주변인기의 미숙한 상태이었으며, GSI는  $2.07 \pm 0.18\%$ 이었다. 사육 15일 후인 2월 20일에 무처리한 대조구의 GSI는  $2.06 \pm 0.17\%$ 로 실험개시 때와 GSI나 난소의 조직학적 변화는 전혀 찾아볼 수 없었다. 눈자루를 한쪽만 절제한 실험구에서는 GSI가  $3.39 \pm 0.47\%$ 로 대조구에 비해 다소 상승하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 양쪽 눈자루를 절제한 실험구에서는 GSI가  $4.34 \pm 0.42\%$ 로 유의한 상승을 나타내었다. 그리고 사육 30일 후인 3월 7일에는 눈자루를 한쪽과 양쪽 모두를 절제한 실험구들에서 GSI가 각각  $8.14 \pm 1.13\%$ 과  $8.54 \pm 1.15\%$ 로 유의한 상승을 보였다. 조직학적 조사에서도 모두 표층포를 형성하

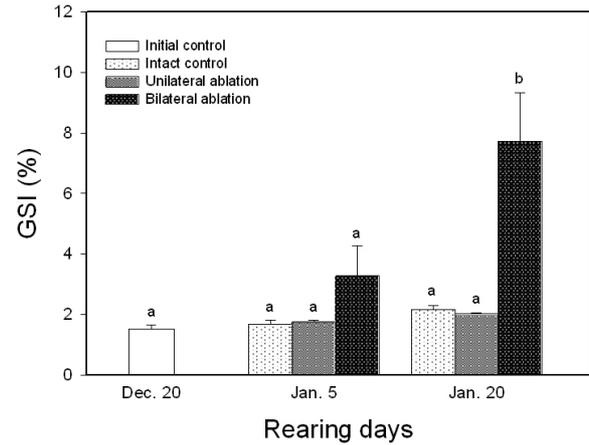


Fig. 1. Changes of GSI on eye-stalk ablation in female fleshy prawn, *F. chinensis* reared at 10°C in early winter. Different letters are significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ).

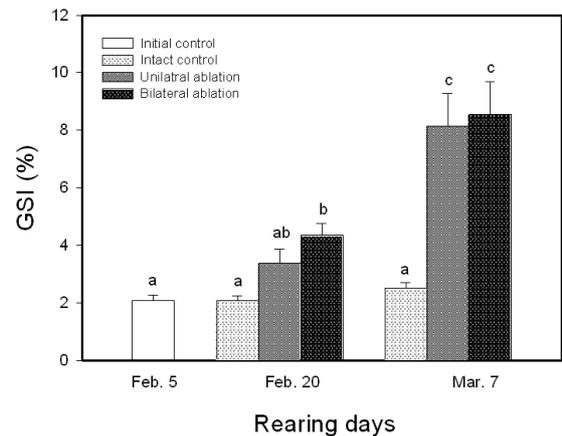
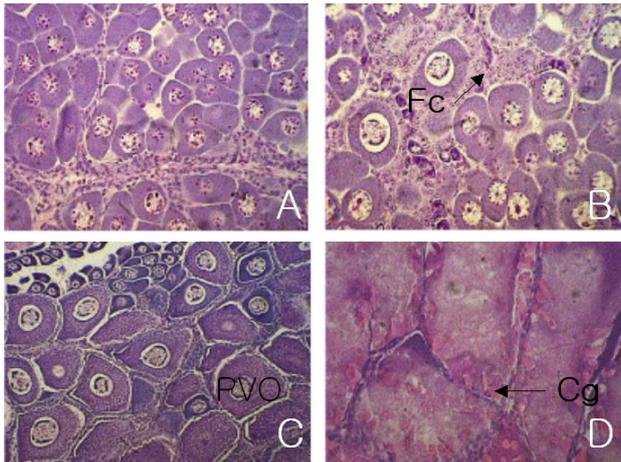


Fig. 2. Changes of GSI on eye-stalk ablation in female fleshy prawn, *F. chinensis* reared at 10°C in early spring. Different letters are significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ).

고 난황구가 축적된 난황 형성 후기의 난모세포들로 이루어져 있었다.

## 2. 호르몬제에 의한 난 성숙 유도

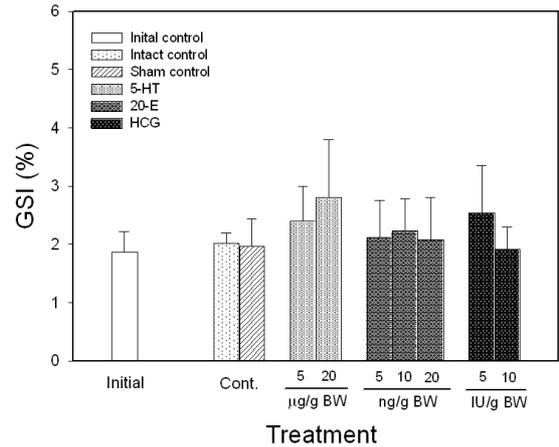
대하가 겨울철의 저 수온을 경험하기 전에 생식소 성숙 유도 호르몬제의 효과를 알아보기 위해 12월 20일부터 고미한 암컷을 대상으로 5-HT, 20-E, HCG를 투여한 후 GSI의 변화를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 실험 개시 때의 GSI는



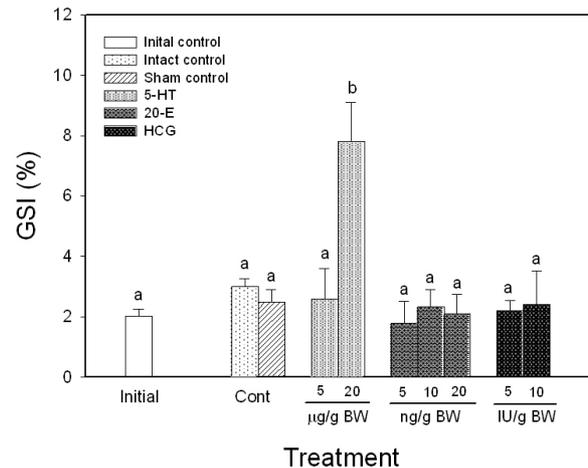
**Fig. 3. Histological changes of ovary of adult female fleshy prawn, *F. chinensis* on eye-stalk ablation during winter (Dec. 20~Jun. 20).** A: Section of ovary in initial control, B and C: Section of ovary in experimental regimes of intact control and unilateral eye-stalk ablation, D: Section of ovary in experimental regimes of bilateral eye-stalk ablation. Fc, follicle cell; PVO, primary vitellogenesis oocyte; Cg, cortical granule.

1.87±0.35%이었으며 모두 미성숙 상태로 난소는 주변인기의 난모세포들로 이루어져 있었다. 사육 20일 후에 무처리구(intact control)와 생리식염수만 주사한 대조구(sham control)의 GSI는 각각 2.02±0.18%와 1.77±0.31%로 유의한 변화가 없었으며, 5-HT를 체중 g당 5 µg과 20 µg을 주사한 실험구의 GSI도 각각 2.40±0.61%와 2.80±1.00%로 약간 상승하는 경향은 있으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그리고 20-E와 HCG를 투여한 모든 실험구에서도 GSI의 유의한 변화는 볼 수 없었다. 조직학적 조사에서도 모든 실험구에서 난모세포들은 모두 주변인기의 상태에 있어서 각 실험구에 따른 차이는 거의 없었다.

겨울철 저수온기를 거친 대하에 대한 성 성숙 유도 호르몬제의 효과를 알아보기 위한 실험 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 2월 10일 실험 개시 때의 GSI는 2.01±0.25%이었으며, 난소 내에는 모두 미성숙 상태의 주변인기의 난모세포들로 이루어져 있었으나, 그 주위에는 잘 발달되어 있는 여포세포로 둘러싸여 있었다. 사육 20일 후에 무처리구와 생리식염수만 주사한 대조실험구의 GSI는 각각 3.01±0.24%와 2.48±0.42%로 유의한 변화가 없었으며, 5-HT를 체중 g당 5 µg을 주사한

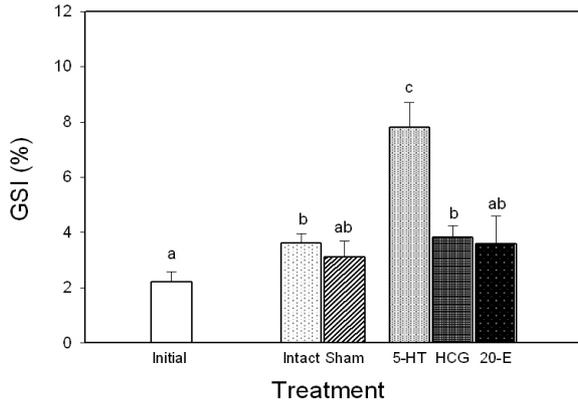


**Fig. 4. Changes of GSI of adult female fleshy shrimps, *F. chinensis* injected with 5-HT, 20-E and HCG.** Rearing experiments were conducted in condition of 10°C and 12L12D photoperiod from December 20 to January 9.



**Fig. 5. Changes of GSI of adult female fleshy shrimps, *F. chinensis* injected with 5-HT, 20-E and HCG.** Rearing experiments were conducted in condition of 10°C and 12L12D photoperiod from February 10 to March 2. Different letters are significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ).

실험구에서도 GSI가 2.60±1.03%로 거의 GSI의 유의한 상승은 보이지 않았다. 그러나 5-HT를 20 µg을 주사한 실험구에서는 GSI가 7.82±1.28%로 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가하였으며, 난소내의 난모세포들도 난황 형성을 활발하게 이루어지고 있는 난황 형성 후기의 난모세포들로 이루어져 있었다. 그러나 20-E와 HCG를 투여한 모든 실험구에서는 GSI의 유의한



**Fig. 6.** Changes of GSI of adult female fleshy shrimps, *F. chinensis* injected with 5-HT (20 µg/g body weight), 20-E (20 µg/g body weight) and HCG (10 IU/g body weight). Rearing experiments were conducted in condition of 15°C and 12L12D photoperiod from March 5 to 25. Different letters are significant difference from initial control ( $p < 0.05$ ).

변화는 볼 수 없었다.

자연상태에서 수온이 10°C 이상으로 상승하기 시작하는 3월 5일부터 수온을 15°C로 올려 체중 g당 5-HT는 20 µg, 20-E는 20 µg 그리고 HCG는 10 IU로 5일 간격으로 3회 주사한 후 10일간 더 사육하여 각 실험구의 GSI 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 3월 5일 실험 개시 때의 GSI는 2.21±0.37%이었으나, 사육 20일 후의 무처리 실험구와 생리식염수만 주사한 대조실험구의 GSI는 각각 3.61±0.34%와 3.02±0.56%로 실험 개시 때의 GSI에 비해 증가하였으며, 무처리구에서는 유의한 증가를 보였다. 조직학적 조사에서도 실험 개시 때에는 주변인기의 전 난황 형성기의 난모세포들로 이루어져 있었으나 사육 20일 후의 무처리 실험구와 생리식염수만 주사한 대조 실험구 모두 난소 내에는 대부분 1차 난황 형성기(primary vitellogenesis stage)의 난모세포들로 이루어져 있었다. 5-HT를 처리한 실험구에서는 GSI가 7.81±0.88%로 유의한 상승을 보였으며, 또한 다른 실험구들의 GSI에 비해 유의하게 높은 값을 나타내었다. 난소 내에는 표층포(cortical granule)를 갖는 2차 난황 형성기(secondary vitellogenesis stage)의 난모세포들로 이루어져 있었다. 20-E와 HCG를 처리한 실험구에서는 GSI가 각각 3.60±0.97%와 3.82±0.29%로 실험 개시 때보다는 유의하게 상승하였으나, 생리식염수만 주사한 대조 실험구와는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 조

직학적 조사에서도 대조구와 동일한 발달 상태를 보였다.

## 고 찰

겨울철 저수온기를 거치기 전 12월에 눈자루를 제거한 실험에서 눈자루 한쪽만 절제하였을 때는 난소의 성숙 촉진 효과가 전혀 없었으나 양쪽 모두를 절제했을 때는 절제 후 15일부터 생식소 성숙 촉진 효과가 나타나기 시작하여 30일 후에는 평균 GSI가 7.73±1.61%로 증가하고 대부분이 완숙상태에 이르렀다(Fig. 1). 그러나 겨울철의 저수온기를 거친 후에는 눈자루 한쪽만 제거해도 사육 30일 후에는 평균 GSI가 8.14±1.13%로 증가하여 완숙상태에 이르렀다(Fig. 2). 이러한 결과는 눈자루 내에서 생식소 억제호르몬(GIH, gonad inhibiting hormone)의 생성 분비가 계절적으로 다르게 나타나고 있다는 것을 보여주고 있다. Panouse(1943; 1944)가 오래전에 새우류의 눈자루를 절제하면 생식소의 발달과 산란이 촉진된다는 보고를 한 이후 많은 새우류에서 인위적인 생식소 성숙을 위한 눈자루 절제 효과를 시도해 왔으며(Anilkumar & Adiyodi, 1980; Herp & Payen, 1991; Menasveta et al., 1993), 그 활성이 계절적으로 다르게 나타난다는 것은 *Parapenaeopsis hardwickii*(Kulkarni & Nagabhushanam, 1980)에서 보도된 바가 있다. 이 보고서에서 눈자루의 생식소 억제 효과는 산란기 이후에 가장 강하고 생식소 성숙 시기에는 거의 효과가 없다고 하였다. 또한 징거미새우, *Macrobrachium nipponense*에서 가을에는 눈자루 양쪽 모두를 절제해야 생식소가 발달하지만, 겨울철을 지나 봄에는 한쪽만 절제해도 가을철의 양쪽 모두를 절제한 것과 같은 효과를 얻을 수 있다고 보고하고 있으며(Han, 1988; Han & Kim, 1993), GIH가 생합성되는 X-기관의 외수(medulla externa)와 종수(medulla terminalis)에 있는 신경분비세포의 수와 크기가 산란기 끝난 직후가 가장 증가하고 겨울이 지나면서 그 수와 크기가 감소한다고 보고하고 있다(Han & Kim, 1993). 본 연구에서 대하의 눈자루 절제 효과의 계절적 변화는 대하 눈자루의 X 기관에서 발달한 GIH의 생성 분비가 겨울철의 저수온기를 거치면서 그 활성이 약화되었기 때문이라고 볼 수 있다. 한편, Kelemen & Smith(1980)와 Yano(1984)는 각각 *P. indicus*와 *P. japonicus*를 대상으로 눈자루 양쪽을 절제한 것과 한쪽만 절제한 것들의 생식소 성숙과 탈피 촉진에 대하여 연구하였다. 이들의 연구에 의하면 눈자루를 양쪽 모두 절제하였을 때는 탈피하

려는 경향이 있고 한쪽만 절제하였을 때는 생식소 성숙을 하려는 경향이 있다고 보고하고 있다. 그러나 본 연구의 실험 기간동안 눈자루 한쪽을 절제한 경우나 양쪽 모두 절제한 경우, 어느 경우든지 탈피한 개체는 한 마리도 없었으며, 이들 종과 같은 결과는 전혀 보이지 않았다.

생식소 성숙 호르몬제에 의한 인위적인 대하의 난소 성숙 촉진 효과를 보기 위한 실험에서 겨울철 저수온기에 들어가기 전인 12월 20일부터 실험한 결과에서는 어느 호르몬제이든 성숙 촉진 효과는 보이지 않았다(Fig. 4). 그러나 겨울철의 저 수온을 거친 후 2월 10일부터 실험한 결과(Fig. 5)에서는 5-HT를 체중 g당 20  $\mu$ g을 처리한 실험구에서 GSI가  $7.82 \pm 1.32\%$ 로 상승하였으나, 5-HT를 체중 g당 5  $\mu$ g과 20-E와 HCG를 처리한 실험구에서는 GSI의 변화가 전혀 없었다. 이러한 결과는 *P. penicillatus*에서 5-HT를 체중 g당 15  $\mu$ g을 처리했을 때 난소의 발달을 유도한다는 결과와 유사하였다. Kulkarni & Fingerman(1992)은 담수산 가재류인 *Procambarus clarkii*를 대상으로 5-HT와 함께 norepinephrine, histamine, dopamine 그리고 octopamine 등을 처리한 실험에서 5-HT가 약 30% 정도의 생식소 성숙 효과를 얻을 수 있다고 하고 있다. 그리고 Sarojini et al.(1995)은 5-HT를 *P. clarkii*에 주사하여 생식소 성숙상태를 조사한 실험에서 5-HT가 뇌와 흉부 신경절에서 GSH를 자극 방출을 하여 생식소 성숙을 유도한다고 보고하고 있다. 또한 Vaca & Alfaro(2000)는 *P. vanamei*에 5-HT를 체중 g당 50  $\mu$ g을 주사한 것과 눈자루 절제 방법을 통한 생식소의 성숙과 산란에 미치는 영향을 조사한 보고에서도 5-HT를 투여한 실험구가 눈자루 절제 방법보다는 생식소의 성숙과 산란 유도 효과를 얻지 못하였지만, 대조 실험구보다는 높은 성숙과 산란을 보였다. 이러한 것은 눈자루에서 분비되는 GIH 호르몬이 제거되고 뇌나 흉부 신경절에서 분비되는 GSH 호르몬만의 작용하였기 때문에 보다 강한 생식소 성숙 유도 효과를 보였다고 추측하고 있다. Wongprasert et al.(2006)도 *P. monodon*에서 5-HT를 체중 g당 50  $\mu$ g을 처리했을 때 난소 성숙과 산란 효과는 눈자루를 절제했을 때와 동일한 효과를 보였다고 하고 있다. 자연상태에서 생식소가 성숙하기 시작하는 3월 초에 실험한 결과(Fig. 6)에서도 대하에 5-HT를 체중 g당 20  $\mu$ g을 처리했을 때 GSI가  $7.80 \pm 0.9\%$ 나 증가하여 눈자루 절제 효과와 동일한 효과를 얻을 수 있었다.

모래에 서식하는 자주새우과에 속하는 *Crangon crangon*

(Bomirski & Klek-Kawinska, 1976)과 등각류에 속하는 *Idotea balthica basteri*(Souty & Picaud, 1984)에서는 HCG를 처리하였을 때 난황 형성에 도움이 된다는 보고가 있다. 그러나 본 실험에서는 대하에 HCG를 처리했을 때 난황 형성을 유도하는 효과는 전혀 찾아볼 수가 없었다.

곤충류나 갑각류의 탈피호르몬으로 널리 알려진 Ecdysone 이 난소 발달과 관련이 있다는 보고는 일부 갑각류와 곤충에서 알려져 있다(Hagedorn et al., 1985). 그리고 Chan(1995)은 *P. vanamei*에서 20-E가 생식소 성숙에 효과적이라고 보고하고 있으나, 본 실험에서는 대하의 암컷에서 20-E를 투여하였을 때 생식소 성숙 촉진 효과는 볼 수 없었다.

대하가 저수온을 거치지 않은 개체에의 실험에서는 5-HT의 처리효과를 얻지 못했지만, 저 수온을 경험한 후 5-HT를 처리한 실험에서는 생식소 성숙 촉진 효과를 얻은 실험들을 종합하여 볼 때, 투여된 5-HT가 눈자루의 OX-SG에서 분비되어지는 GIH 인자의 방출을 억제하는 것이 아니라 뇌나 흉부 신경절 등에서 GSH 등 몇 종류의 호르몬을 방출 자극을 한다는 Fingerman(1997a,b)의 연구와 같은 의미를 가지는 것으로 추측되어진다. 즉, 저 수온에 의해 눈자루에서 분비되는 난소 발달 억제 요인인 생식소 억제 호르몬(Gonad inhibiting hormone, GIH)의 방출이 억제되어 그 양의 완전히 소멸되어져 생식소가 발달하는 것이 아니고, 5-HT가 뇌와 흉부 신경절을 자극하여 분비되는 GSH가 GIH의 기능을 충분히 상쇄시킬 수 있는 양의 자극호르몬이 나와서 생식소 성숙을 유도한다고 생각되어진다.

본 실험의 결과에서 나타났듯이 대하에서는 5-HT를 체중 g당 20  $\mu$ g 이상을 처리하면 생식소 성숙을 유도할 수 있었다. 이러한 결과는 대하의 조기 종묘 생산을 시도할 때 사용하는 눈자루 절제 방법 대신 이용할 수 있을 것으로 보이며, 다른 성숙 유도요인, 즉 수온과 광주기 등과 함께 병행하여 실험을 한다면 더 유용한 결과를 얻을 수 있으리라고 보여진다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 동의대학교 학술연구비지원(2008AA100)에 의해서 이루어졌으며, 본 실험을 수행하는데 사육 시설과 장치의 일부를 제공해 준 국립수산물품질관리원 서해특성화 연구소에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Adiyodi R (1985) Reproductive and Control. In: The Biology of Crustacea, Vol. 9. Bills and Mantel LH (eds.), Academic Press, New York, pp 147-217.
- Anilkumar G, Adiyodi KG (1980) Ovarian growth induced by eyestalk ablation during the prebreeding season is not normal in the crab *Paratelson hydromous*. Int J Invert Reprod 2:95-105.
- Arechiga H, Banuelos E, Frixione E, Picones A, Rodriguez-Sosa L. 1990. Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. J Exp Biol 150:123-143.
- Beltz BS, Pontes M, Helluy SM, Kravitz EA (1990) Patterns of appearance of serotonin and proctolin immunoreactivities in the developing nervous system of the American lobster. J Neurobiol 21:521-542.
- Blanchet MF, Porcheron P, Dray F (1979) Variation du taux des ecdysteroid au cours des cycle de mue et de vitellogenese chez amphipode *Orchestia gammarella*. Int J Interbr Reprod 1:133-139.
- Blanchet-Tournier MF (1982) Quelques aspects des interactions hormonales entre la mue et la vitellogenese chez le crustace Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Reprod Nutr De'velop 22:325-344.
- Bomirski A, Klek-Kawinska E (1976) Stimulation of oogenesis in the sand shrimp, *Crangon crangon*, by a human gonadotropin. Gen Comp Endocrinol 30: 239-242.
- Bückmann D (1989) The significance of ecdysone in comparative physiology. In: Koolman J (Ed.), Ecdysone-From Chemistry to Mode of Action. Thieme, Stuttgart, pp 20-26.
- Chan SM (1995) Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Comp Biochem Physiol 112C: 51-59.
- Di Cosmo A, Di Cristo C (1998) Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-Amide and GnRH immunoreactivity. J Comp Neurol 398:1-12.
- Di Cristo C, Paolucci M, Iglesias J, Sanchez J, Di Cosmo A (2002) Presence of two neuropeptides in the fusiform ganglion and reproductive ducts of *Octopus vulgaris*: FMRFamide and gonadotropin-releasing hormone (GnRH). J Exp Zool 292:267-276.
- Di Fiore MM, Rastogi RK, Cecilian F, Messi E, Botte V, Botte L, Pinelli C, D'Aniello B, D'Aniello A (2000) Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*. PNAS 97: 2343-2348.
- Elofsson R (1983) 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Cell Tissue Res 232: 221-236.
- Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarojini R, Reddy PS (1994) Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. J Crustacean Biol 14(3):413-437.
- Fingerman M (1997a) Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. Physiol Zool 70(3):257-269.
- Fingerman M (1997b) Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. Invertebr Reprod Dev 31:47-54.
- Friesen KJ, Kaufman WR (2004) Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. J Insect Physiol 50:519-529.
- Fernald RD, White RB (1999) Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. Front Neuroendocrin 20:224-240.
- Gohar M, Souty C (1984) Action temporelle d'ecdysteroides sur la synthese proteique ovarienne *in vitro* chez le crustace isopode terrestre *Porcellio dialatus* (Brandt). Reprod Nutr Dev 24:137-145.
- Goldberg JI, Garofalo R, Price CJ, Chang JP (1993) Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivolvis*. J Comp Neurol 336:571-582.
- Goodwin TW (1978) Ecdysteroids: A new generic term. Nature 272:122.

- Gorbman A, Sower SA (2003) Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen Comp Endocrinol* 134:207-213.
- Hagedorn HH (1985) The role of ecdysteroids in reproduction. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 8. Pergamon, Oxford, pp. 205-262.
- Hagedorn HH (1994) The endocrinology of the adult female mosquito. *Adv Dis Vect Res* 10:109-148.
- Han CH (1988) Physiological studies on the reproductive cycle of a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Hann), Ph. D. Thesis, The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.
- Han CH, Kim DJ (1993) Studies on the X-organ of eyestalk and the photoperiod for the control of gonadal maturation in a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Bull Korean Fish Soc* 26(1):76-90.
- Herp FV, Payen GG (1991) Crustacean neuroendocrinology: perspectives for the control of reproduction in aquacultural systems. *Bull Inst Zool Academia Sinica Monograph* 16:513-539.
- Huber R, Smith K, Delago A, Isaksson K, Kravitz EA (1997) Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: altering the decision to retreat. *PNAS* 94:5939-5942.
- Kravitz EA (2000) Serotonin and aggression insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *J Comp Physiol, A Sens Neural Behav Physiol* 186:221-238.
- Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K, Kanda A, Tsutsui K, Minakata H (2004) Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 477:310-323.
- Kelemen J, Smith LR (1980). Induced ovarian development and spawning of *Penaeus indicus* in a recirculating laboratory tank after uni-lateral eyestalk enucleation. *Aquaculture* 21:55-62.
- Kulkarni GK, Fingerman M (1992) Quantitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol Bull* 182:341-347.
- Kulkarni GK, Nagabhushanam R (1980) Role of ovary inhibiting hormone from eyestalks of marine panaeid prawns (*Parapenaeopsis hardwickii*) during ovarian development cycle. *Aquaculture* 19:13-19.
- Lachaise F, Lafont R (1984) Ecdysteroid metabolism in a crab, *Carcinus maenas* L. *Steroids* 43:243-260.
- Lee JY (2005) The study on the reproductive physiology of the flesh prawn, *Fenneropenaeus chinensis*. Ph.D. thesis, Dongeui Univ, pp 24-42.
- Lee CY, Yau SM, Liao CS, Huang WJ (2000) Serotonergic regulation of blood glucose levels in the crayfish, *Procambarus clarkii* site of action and receptor characterization. *J Exp Zool* 286:596-605.
- Lee CY, Yang PF, Zou HS (2001) Serotonergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiol Biochem Zool* 74:376-382.
- Livingstone MS, Schaeffer SF, Kravitz EA (1981) Biochemistry and ultrastructure of serotonergic nerve endings in the lobster: serotonin and octopamine are contained in different nerve endings. *J Neurobiol* 12:27-54.
- Luschen WS, Willig A, Jaros PP (1993) The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comp Biochem Physiol C* 105:291-296.
- Meeratana P, Withyachamnznkul B, Damrongphol P, Wongprasert K, Suseangtham A, Sobhon P (2006) Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 260: 315-325.
- Menasveta P, Piyatiratitivorakula S, Rungsupaa S, Moreea N, Fastb AW (1993) Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman Sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116:191-198.

- Meusy JJ, Blanchet MF, Junera H (1977) Mue et vitellogenese chez le crustace Amphipode *Orchestia gammerella* (Pallas). II. Etude de la synthese de la vitellogénine ('fraction protéique femelle' de l'hémolymphe) après destruction des organes Y. *Gen Comp Endocrinol* 33: 35-40.
- Ngernsoungnern A, Ngernsoungnern P, Weerachatanukul W, Chavadej J, Sobhon P, Sretarugsa P (2008) The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 279:197-203.
- Nijhout HF (1994) *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton NJ.
- Okumura T, Han CH, Suzuki Y, Aida K, Hanyu I (1992) Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and nonreproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Zool Sci* 9:37-45.
- Panouse JB (1943) Influence de l'ablation de pedoncle oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. *C R Acad Sci Paris* 217:535-555.
- Panouse JB (1944) L'action de la glande du sinus sur l'ovaire chez la crevette *Leander*. *C R Acad Sci Paris* 218:293-294.
- Pazos AJ, Mathieu M (1999) Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 113:112-120.
- Rodriguez-Sosa L, Picones A, Rosete G, Arechiga YS (1997) Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk. *J Exp Biol* 200:3067-3077.
- Santhoshi S, Sugumar V, Munuswamy N (2009) Serotonergic stimulation of ovarian maturation and hemolymph vitellogenin in the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 291:192-199.
- Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M (1995) In vivo effects of dopamine and dopaminergic antagonists on testicular maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol Bull* 187(3):340-346.
- Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR (1993) Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrin Rev* 14: 241-254.
- Souty C, Besse G, Picaud JL (1982) Stimulation par l'ecdysone du taux hémolymphe à tique de la vitellogénine chez le crustace isopode terrestre *Porcellio dialatus* (Brandt). *C R Acad Sci Paris Ser III* 294:1057-1059.
- Souty C, Picaud JL (1984) Effet de l'injection d'une gonadotropine humaine sur la synthèse et la libération de la vitellogénine par le tissu adipeux du Crustacé isopode marin *Idotea balthica basteri*. *Audouin Gen Comp Endocrinol* 54(3):418-421.
- Steel CGH, Vafopoulou X (1998) Ecdysteroid titers in haemolymph and other tissues during molting and reproduction in the terrestrial isopod, *Oniscus ascellus* (L.). *Invertebr Reprod Develop* 34:187-194.
- Suzuki S, Yamasaki K, Fugita T, Mamiya Y, Sonobe H (1996) Ovarian and hemolymph ecdysteroids in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). *Gen Comp Endocrinol* 104:129-138.
- Tsai PS (2006) Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol* 148:48-53.
- Tsai PS, Maldonado TA, Lunden JB (2003) Localization of gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and a peripheral chemosensory organ of *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 130:20-28.
- Tsutsui H, Yamamoto N, Ito H, Oka Y (1998) GnRH-immunoreactive neuronal system in the presumptive ancestral Chordate *Ciona intestinalis* (Ascidian). *Gen Comp Endocrinol* 112:426-432.
- Vaca AA, Alfaro J (2000) Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture* 182:373-385.
- Vafopoulou X, Steel CGH (1995) Vitellogenesis in the terrestrial isopod, *Oniscus ascellus* (L.): Characterization of vitellins and vitellogenins and changes in their synthesis throughout the intermolt cycle. *Invertebr*

- Reprod Dev 28:87-95.
- Wongprasert K, Asuvapongpatana A, Poltana P, Tiensuwan M, Withyachumnarnkul B (2006) Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 261:1447-1454.
- Yano I (1984) Induction of rapid spawning in *Kuruma prawn, Penaeus japonicus*, through unilateral eyestalk enucleation. Aquaculture 40:265-268.
- Young KG, Chang JP, Goldberg JI (1999) Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the fresh water snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. J Comp Neurol 404:427-437.
- Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, Tsai PS (2000) Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. Gen Comp Endocrinol 118:77-89.
- Zhang L, Tello JA, Zhang W, Tsai PS (2008) Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. Gen Comp Endocrinol 156:201-209.
- 
- (received 6 November 2009, received in revised form 3 December 2009, accepted 4 December 2009)