

태반성 성선 자극 호르몬 (HCG) 및 잉어 뇌하수체 호르몬 (CPE) 처리에 의한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 인공 산란 유도

박인석 · 김형배* · 최희정* · 이영돈** · 강해원***

군산대학교 해양개발학과
*한국해양연구소 해양생물공학연구그룹
**제주대학교 해양연구소
***동원산업주식회사

Artificial Induction of Spawning by Human Chorionic Gonadotropin (HCG) or Carp Pituitary Extract (CPE) in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

In-Seok PARK, Hyung-Bae KIM*, Hee-Jeng CHOI*, Young-Don LEE** and Hae-Won KANG***

Department of Marine Sciences, Kusan National University, Kusan 573-360, Korea
*Marine Biotechnology Research Group, KORDI, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea
**Marine Research Institute, Cheju National University, Cheju-do 695-810, Korea
***Dongwon Industries Co. Ltd., Cheju-do 699-810, Korea

ABSTRACT

Spawning of matured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* was accelerated by using single injection of human chorionic gonadotropin (HCG 1,000 IU/kg BW) or carp pituitary extract (CPE 10 mg/kg BW). The body weight of HCG or CPE treated group slightly improved with $5.6 \pm 0.4\%$ at 2 days after injection or $6.4 \pm 0.5\%$ at 3 days after injection. Number of eggs spawned increased in the fish treated with HCG or CPE. Surface floating rates of eggs spawned increased in the fish treated with HCG or CPE. Hatching rate also increased in experimental groups compared to the control. Especially superior quality of eggs were obtained 2 and 3 days after injection from HCG treated groups and 3 and 4 days after injection from CPE treated groups at 20°C, respectively.

본 논문은 한국해양연구소 기본 과제 및 해양산업개발연구소(RCOID) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

서 론

호르몬에 의한 산란 유도란 암컷에서는 난자의 배포 (germinal vesicle) 이동과 붕괴를 포함하는 성숙 유도 및 배란을 그리고 수컷에서는 배정을 촉진하는 것이다. 어류에서의 산란 유도는 Houssay (1931)에 의해 공여체 어류인 *Prochilodus platensis*로 부터 뇌하수체 호르몬을 채취하여 *Cnesterdon decemmaculatus*에 주사하여 최초로 산란을 유도한 이래 이제까지 사용되어 오고 있다 (Donaldson and Hunter 1983 ; Lam 1982). 뇌하수체 호르몬에 의한 산란 유도는 여러 어종에 걸쳐 광범위하게 사용되고 있으나, 뇌하수체 공여체 어류의 성, 연령, 공여 시기, 성숙도 및 뇌하수체 종 특이성으로 인해 수여체 어류에서 뇌하수체의 역가가 다양하게 나타나는 단점이 있다(김 등 1992 ; Lam 1982).

포유류 성선 자극 호르몬 중 태반성 성선 자극 호르몬 (human chorionic gonadotropin)은 뇌하수체 호르몬에 비해 그 농도가 표준화되어 정확한 배란 및 배정 유도 효과를 나타내며 태반성 성선 자극 호르몬 자체의 가격도 비교적 저렴하여 많이 사용되고 있으나, 그 효과는 뇌하수체 호르몬과 마찬가지로 사용 대상 어류의 성숙 단계에 기인된다(Lam 1982).

어류 양식 산업에서 성숙 유도 및 배란, 배정의 촉진은 종묘 생산의 동시화를 이루어 동일 시기에 대량의 종묘를 생산할 수 있으며, 산란 시기를 조절하여 종묘 생산의 효율성을 기할 수 있고, 다산란 및 인공 종묘 생산 그리고 유연 관계가 밀접한 종간의 잡종화를 이룰 수 있다(Chaudhuri 1973 ; Sneed 1975 ; Yamamoto *et al.* 1966).

넙치, *Paralichthys olivaceus*는 현재 국내에서 육상 및 가두리 양식으로 사육되며 인공 종묘에 의한 완전 양식이 이루어지고 있는 어종이다. 근래 광 및 온도를 포함한 환경적 요인의 조절로 조기 종묘의 생산이 진행되고 있어 호르몬에 의한 넙치의 성숙 유도 및 배정, 배란의 촉진 등이 아울러 필요하고 특히 넙치를 대상으로 유전 육종 기법의 적용시 인공 종묘의 생산은 기본적인 요소로서 넙치가 산란 시기에 다회 산란 어종임을 고려 호르몬 처리에 의한 동시에 대량의 난 및 정자 획득이 더욱 필요하게 되었다.(박 1992 ; Tabata *et al.* 1986).

이에 본 연구는 태반성 성선 자극 호르몬 및 잉어 뇌하수체 호르몬 처리에 의한 넙치의 인공 산란효과 조사 및 유도를 위하여, 호르몬 처리에 의한 산란 유도를 조사, 호르몬 처리 경과 일수에 따른 체중 증가 효과 및 산란량 조사 그리고 수정난의 부상을 및 부화율 등의 난질 조사를 실시하여 태반성 성선 자극 호르몬 및 잉어 뇌하수체 호르몬의 넙치에서의 종 특이성과 아울러 그 산란 유도 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

양식산 성숙 넙치에서 산란 증진 효과를 조사하기 위하여 산란기에 human chorionic gonadotropin (HCG, Sigma Co. USA), carp pituitary extract (CPE, Sigma Co. USA)를 산란 유도 호르몬으로 사용하였다.

Table 1과 같이 대조군, HCG 처리군, CPE 처리군으로 실험군을 설정하였으며, HCG는 1,000 IU/kg BW로 CPE는 10mg/kg BW로 복강 주사하였다. 대조군은 희석액으로 사용된 생리 식염수 만을 0.1 mg/kg BW로 복강 주사하였다. 대조군은 평균 전장 59.3±2.5 cm, 평균 체중 2.5±0.2 kg의 성숙 암컷 10마리를 사용하였으며 HCG 처리군은 평균 전장 58.1±5.2 cm, 평균 체중 2.8±0.3 kg의 성숙 암컷 12마리를 사용하였고 CPE 처리군은 평균 전장 62.4±7.6 cm, 평균 체중 2.8±0.3 kg의 성숙 암컷 9마리를 사용하였다.

Table 1. Experimental design for induction of spawning of olive flounder by human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE)

Exp. group	Dose of injection	No. of females	Mean total length(cm)*	Mean body weight (g)*
Control		10	59.3±2.5	2,500±200
HCG	1,000 IU/kg BW	12	58.1±5.2	2,300±100
CPE	10 mg/kg BW	9	62.4±7.6	2,800±300

* Mean±SD.

실험시의 수온은 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 이었으며 대조군 및 각 실험군의 호르몬 주사 후 5일까지 매일 체중변화 양상을 200 ppm lidocaine/1,000 ppm NaHCO_3 로 마취 후 조사하였고(박 등 1988), 아울러 복부압박법에 의해 그 산란량을 조사하였다.

채란된 난의 부상을 및 부화율을 조사하기 위하여 채란된 난 중 0.5~1.0 g을 채취한 다음 정액 상태가 양호한 수컷 2 마리로 부터의 정액을 혼합하여 수정시켰다. 수정된 난은 물러가아제로 만든 그물망에 넣어 세척한 뒤 1ℓ 비이커에 수용하였다. 수정란은 배포(germinal vesicle)의 상태를 잘 볼 수 있게 대조군 및 각 실험군을 대상으로 0.6% NaCl : glycerol : glacial acetic acid를 90 : 6 : 4로 섞은 용액에 넣어 보관하여 해부 현미경 하에서 관찰하였다.

부상을 조사는 수정 후 30분에 부상난이 다수 관찰되는 암컷 개체로부터의 수정란 만을 대상으로 하였으며, 침하난을 제거하여 10% 포르말린 용액에 고정 계수 후 부상율을 계산하였다. 부화율은 부화 시기 직전의 배체에 대한 부화 후 치어의 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

뇌하수체 호르몬에 의한 산란 유도는 주로 잉어과 어류에서 성공적으로 이루어지고 있으며 태반성 성선 자극 호르몬에 의한 산란 유도는 비교적 광범위한 종을 대상으로 이루어지고 있다(Fijan 1975; Harvey and Hoar 1979; Pullin and Kuo 1980).

CPE 및 HCG에 의한 넙치에서의 인공 산란 유도시 대조군의 체중 증가는 주사 후 1일에 $0.4\pm 0.2\%$, 주사 후 2일에 $0.2\pm 0.1\%$ 로 다소 증가하였으나, 주사 후 3일, 4일 및 5일에서는 체중 증가가 나타나지 않았다. HCG 처리군은 주사 후 1일에 $1.2\pm 0.2\%$, 주사 후 2일에 $5.6\pm 0.4\%$ 로 체중이 증가하였으나 주사 후 3일에는 $4.2\pm 0.3\%$, 주사 후 4일에는 $4.3\pm 0.4\%$ 로 감소하는 경향을 보였다. CPE 처리군은 주사 후 1일에 체중 증가가 나타나지 않은 반면, 주사 후 2일에는 $2.9\pm 0.3\%$ 주사 후 3일에는 $6.4\pm 0.5\%$ 로 증가하였다. CPE 처리군은 주사 후 4일에는 $4.3\pm 0.4\%$ 로 체중이 감소하였다(Fig. 1).

HCG에 의한 이러한 체중 증가 효과는 문치가자미, *Limanda yokohamae*에서 HCG를 2번에 걸쳐 주사한 결과 산란시에 7.9~13.0%의 체중 증가를 보였으며 생식소 지수도 역시 증가하였다(Hirose et al. 1976, 1979). HCG 처리시 이러한 체중 증가 및 생식소 지수 증가는 은어, *Plecoglossus altivelis*에서도 나타나며 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*의 경우 첫 산란 후 HCG 처리 시 12일에 비만도가 180에서 210으로 증가하였으며, 생식소 지수도 HCG 처리 39일에 생식소 지수가 2에서 10으로 증가 현상을 나타내었다(김 등 1992; Hirose et al. 1977). 본 실험의 HCG에 의한 넙치에서의 체중증가는 산란 유도 호르몬에 의한 생식소의 수화에 의해 난경의 증가를 나타내었다(Hirose et al. 1979).

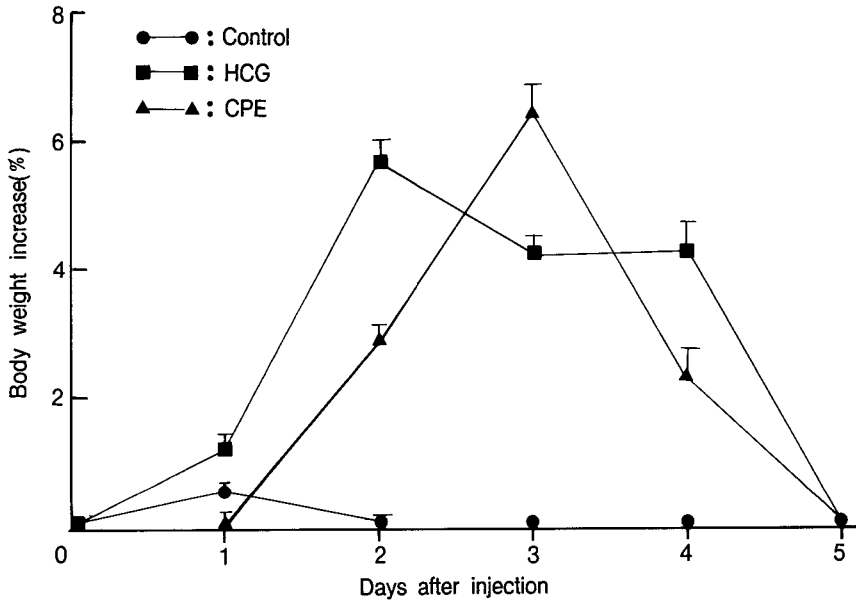


Fig. 1. Daily changes in body weight of olive flounder after injection of human chorionic gonadotropin (HCG) or carp pituitary extract (CPE).

산란 유도시 효과적인 HCG 농도는 미꾸리, *M. anguillicaudatus*와 은어에서는 약 10~12.5IU HCG/g BW이고 미꾸라지인 경우 4~10 IU HCG/g BW에서 76.5~100%의 산란율을 나타낸 바 있다. 문치가자미에서 HCG의 2번 주사에 의한 산란 유도는 1,000+500 IU HCG/kg BW에서 88.9%의 산란율 그리고 1회 주사의 2,000 IU HCG/kg BW 혹은 2,000+1,000 IU HCG/kg BW의 2번 주사에서는 3일 혹은 6일 이내에 100%의 산란율을 보였다 (Hirose et al. 1976). 본 실험의 주사 후 5일까지의 산란율 조사시 대조군은 30.0%의 산란율을 보인 반면 1,000 IU HCG/kg BW 처리군은 66.7%, 10 mg CPE/kg BW 처리군은 44.4%의 산란율을 보였다 (Table 2). 넙치의 산란 유도 농도 1,000 IU HCG/kg BW는 문치가자미의 1번 혹은 2번에 걸친 주사 농도 1,500 IU HCG/kg BW 이상보다 낮게 나타났으며, 이들 넙치 및 문치가자미에서의 산란 유도 적정 HCG 농도는 미꾸리, 미꾸라지 및 은어 등의 온수성 담수산 어류의 산란 유도 적정 HCG 농도보다 낮은 농도를 보여 흥미로웠다. 차후 성숙 넙치에서의 HCG 및 CPE에 의한 산란 유도 증진을 위해 본 실험에서 사용된 HCG, CPE 농도보다 높은 농도로의 처리가 필요하며 아울러 실험시의 넙치 성숙도를 고려 2번에 걸친 호르몬 처리가 필요하다.

Table 2. Spawning success of olive flounder using human chorionic gonadotropin(HCG) and carp pituitary extract (CPE)

Experimental group	No. of fish treated	No. of fish spawned	Percent success
Control	10	3	30.0
HCG	12	8	66.7
CPE	9	4	44.4

대조군, HCG 처리군 및 CPE 처리군의 주사 후 5일까지 매일의 산란량 변화는 Table 3과 같다. 대조군, HCG 처리군 및 CPE 처리군은 실험 시작시 복부 압박법에 의해 산란이 이루어지지 않는 반면 대조군은 주사 후 1일에 85.2 g, 주사 후 2일에 41.9 g의 산란량을 보였고 HCG 처리군은 주사 후 1일에 140.9 g, 주사 후 2일에 168.2 g, 주사 후 3일에 200.7 g, 주사 후 4일에 172.4 g, 주사 후 5일에는 84.0 g의 산란량을 보였다. CPE 처리군은 주사 후 2일에 110.2 g의 산란량을 보였고, 주사 후 3일에 269.4g의 최대 산란량을 보였으며, 주사 후 4일에 103.6 g의 산란량을 보여 넙치에서 HCG

Table 3. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) on spawning in olive flounder

Days after injection	Total weight spawn (g)		
	Control (n=3)	HCG (n=8)*	CPE (n=4)**
0	0	0	0
1	85.2	140.9	0
2	41.9	168.2	110.2
3	0	200.7	269.4
4	0	172.4	103.6
5	0	84.0	0
Mean weight of eggs spawned (g/kg BW)	16.9	41.6	43.1

* 1,000 IU HCG/kg BW, ** 10 mg CPE/kg BW.

CPE 처리시 다회산란을 나타내었다. HCG 처리 후 2일에 5.6±0.4%의 최대 체중증가, CPE 처리 후 3일에 6.4±0.5%의 최대 체중증가 결과를 HCG 처리 후 3일의 200.7g 최대 산란량, CPE 처리 후 3일에 269.4g 최대 산란량 결과와 비교시 호르몬 처리 후의 체중증가와 산란량 증가는 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다. 주사 후 5일까지의 어체 단위 kg체중 당 산란된 g 무게는 대조군이 16.9, HCG 처리군이 41.6 그리고 CPE 처리군이 43.1로서 CPE 처리군이 HCG 처리군보다 단위 kg체중 당 높은 산란량을 보였다.

넙치에서 HCG 처리시 1일 후에 첫 산란이 이루어짐과 미꾸라지의 2~10 IU HCG/g BW에서 산란까지 16~20시간이 소요됨을 비교시 넙치가 미꾸라지에 비해 낮은 산란 반응을 보였으며, 본 실험의 HCG 처리군이 CPE 처리군에 비해 빠른 산란 반응을 보인 것은 경골 어류 암컷의 생식 기작인 시상하부-뇌하수체-난소의 축으로 조절되는 단계에서 HCG 자체의 superovulation 역할에 기인된 것으로 사료되나 정확한 산란 반응 효과 조사를 위하여는 호르몬 수용체 즉 친어 자체의 성숙 상태 조사와 아울러 체내 호르몬 변화 양상에 대한 면밀한 조사가 필요하리라 사료된다(김 등 1992; Donaldson 1973).

산란유도를 보인 개체는 대조군과 HCG 처리군 및 CPE 처리군이 각각 3마리, 8마리, 4마리 이었으나, 이 중 부상을 및 부화율 조사에 사용된 난은 Fig. 2의 a 및 b와 같이 배포붕괴가 이루어지거나 거의 이루어진 완숙난으로 부상을 및 부화율 조사가 가능한 대조군 3마리, HCG 처리군 6마리, CPE 처리군 3마리가 사용되었다. 배포가 붕괴되지 않은 미숙난은 불투명하게 백탁되어 나타났으며 수정 후 수정난과 불투명하게 백탁되어 침하되는 미수정난으로 구별 가능하였다(Fig. 2c & d).

이와 같이 배포의 붕괴는 핵이 점차 난문이 있는 동물극으로 이동하는 핵 이동기에 이루어지는 것으로 sea bass, *Dicentrarchus labrax*에서 LHRHa 1차 처리시 16시간 및 24시간 후에 나타났으며,

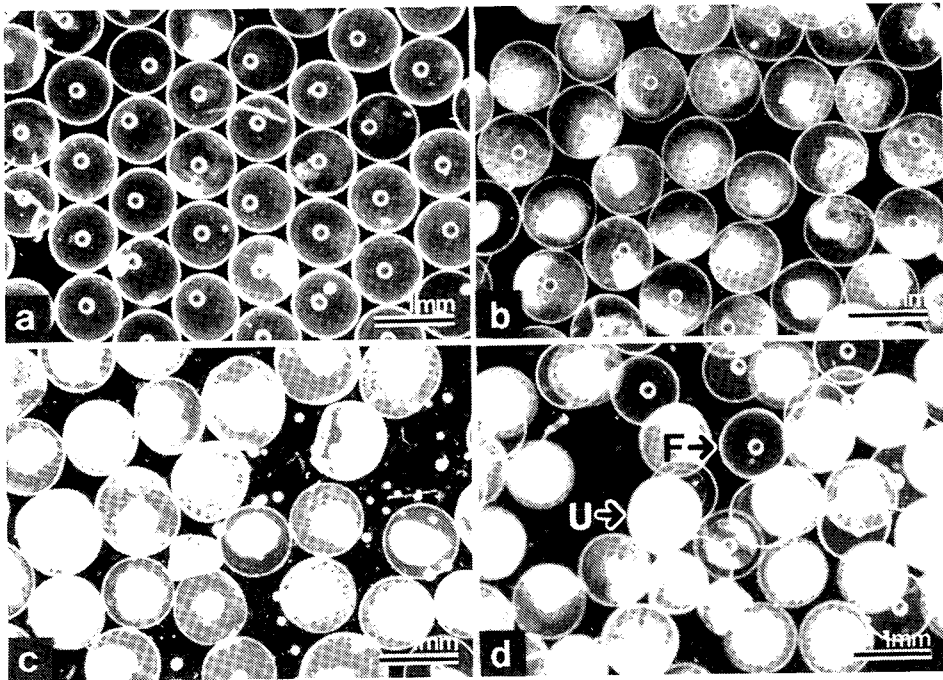


Fig. 2. Various stage of olive flounder eggs spawned in this experiment.

a, transparent ripe eggs after breakdown of germinal vesicle ; b, ripe eggs in breakdown of germinal vesicle ; c, unripe eggs before breakdown of germinal vesicle ; d, development of fertilized eggs (F) and dead unripe eggs (V).

산란은 LHRHa 처리 후 16시간 에서의 배포 붕괴군이 32시간 그리고 LHRHa 처리 후 24시간 배포 붕괴군이 48시간에 거의 산란이 이루어진 바 있다 (Alvarino et al. 1992 ; Matsuyama et al. 1988).

Table 4와 같이 주사 후 2일, 3일에서 대조군의 부상율과 부화율은 각각 35%, 13% 및 33%, 20%를 나타내었다. HCG 처리군에서 주사 후 5일의 부상율과 부화율은 미숙난이어서 조사할 수 없었으며, 주사 후 2일에서 4일까지 부상율 70~88%, 부화율 48~61%를 나타내었다. CPE 처리군은

Table 4. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) on surface floating rates of eggs and hatching rates of olive flounder

Days after injection	Surface floating rate of eggs (%)			Hatching rate (%)		
	Control (n=3)	HCG (n=6)*	CPE (n=3)**	Control (n=3)	HCG (n=6)*	CPE (n=3)**
2	35	70	0	13	48	0
3	33	88	75	20	61	58
4	0	70	93	0	55	76
5	0	0	36	0	0	25

* 1,000 IU HCG/kg BW, ** 10 mg CPE/kg BW.

주사 후 3일에서 5일까지 부상을 36~93%, 부화율 35~76%을 나타내었다. HCG, CPE 처리시 체중 증가 효과 및 산란량 증가 결과와 마찬가지로 HCG 처리군은 처리 후 2일과 3일에 높은 부상율, 부화율을 보였으며 CPE 처리군 역시 처리 후 3일과 4일에 높은 부상율, 부화율을 보였다.

요 약

넙치, *paralichthys olivaceus* 암컷에서 태반성 성선 자극 호르몬 (HCG, human chorionic gonadotropin) 또는 잉어 뇌하수체(CPE, carp pituitary extract)에 의한 산란 유도가 이루어졌다. 대조군은 실험에 사용된 어류중 30%가 산란하였으며, 주사 후 1일에 $0.4 \pm 0.2\%$ 의 체중 증가를 보인 반면 HCG 처리군은 66.7%가 산란하였고 주사 후 2일에 최고 $5.6 \pm 0.4\%$ 의 체중 증가를 나타내었으며 이후 주사 후 5일까지 체중이 감소하는 경향을 보였다. CPE 처리군은 44.4%의 어류가 산란하였으며 주사 후 3일에 $6.4 \pm 0.5\%$ 로 체중이 최고로 증가하였으나, 이후 주사 후 5일까지 체중이 감소하는 경향을 보였다.

총 산란량에 있어 대조군은 주사 후 1일과 2일에 각각 85.2g, 41.9g을 보인 반면 HCG 처리군은 처리 후 3일에 200.7g으로 최대 산란 증가를 보였으며, 주사 후 5일까지 총 산란량이 감소하였다. CPE 처리군 역시 주사 후 3일에 269.4g으로 최대 산란을 보인 이후 주사 후 5일까지 산란량이 감소하는 경향을 보였다.

호르몬 주사 후 2일, 3일에서 대조군의 부상율과 부화율은 각각 35%, 13% 및 33%, 20%를 나타내었다. HCG 처리군은 주사 후 1일에서 4일까지 부상율 37~88%, 부화율 18~61%를 나타내었으며, CPE 처리군은 주사 후 2일에서 4일까지 부상율 36~93%, 부화율 35~76%를 나타내었다. 호르몬 처리시의 체중 증가와 부상율, 부화율을 고려하면 HCG는 처리 후 2일 혹은 3일에 CPE는 처리 후 3일 혹은 4일에 최상의 난질 획득이 가능하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Alvarino, J. M. R., S. Zanuy, F. Part, M. Carrillo, and E. Mananos. 1992. Stimulation of ovulation and steroid secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of time of day. *Aquaculture* 102 : 177~186.
- Chaudhuri, H. 1973. Fertility of hybrids of Indian carps and preliminary studies on the F₂ generation of carp hybrids. *J. Inland Fish. Soc. India* 5 : 195~200.
- Donaldson, E. M. 1973. Reproductive endocrinology of fishes. *Am. Zool.* 13 : 909~927.
- Donaldso, E. M. and G. A. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. p.351~403. In : W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (eds), *Fish Physiology*, Vol. IXB, Academic Press, New York.
- Fijan, N. 1975. Induced spawning, larval rearing and nursery operations *Silurus glanis*. Workshop on Controlled Reproduction of Cultivated Fishes. EIFAC/T 25 : 130~138.
- Harvey, B. J. and W. S. Hoar. 1979. The theory and practice of induced breeding in fish. IDRCPS 21e. 48pp.
- Hirose, K., P. Ishida and K. Sakai. 1977. Induced ovulation of ayu using human chorionic gonadotropin (HCG), with special reference to change in several characteristics of

- eggs retained in the body cavity after ovulation. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43 : 409~416.
- Hirose, K., Y. Machida and E. M. Donaldson. 1979. 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. Jpn. Soc. Sci. Fish 45 : 31~36.
- Hirose, K., Y. Machida and E. M. Donaldson. 1976. Induction of ovulation in the Japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin and salmon gonadotropin. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42 : 13~20.
- Houssay, B. A. 1931. Action sexuelle de l'hypophyse sur les poissons et les reptiles. C. R. Soc. Biol. 106 : 377~378.
- Lam, T. J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39 : 111~137.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama, and S. Matsuura. 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *pagrus major*, during the spawning season. Aquaculture 73 : 357~372.
- Pullin, R. S. V. and C. M. Kuo. 1980. Developments in the breeding of cultured fishes. Symposium on Food Producing System for Arid and semi-arid Lands. Kuwait, April 19~23, 1980.
- Sneed, K. E. 1975. Channel catfish culture methods. Workshop on Controlled Reproduction of Cultivated Fishes. EIFAC/T 25 : 164~173.
- Tabata, K., S. Gorie and N. Taniguchi. 1986. Verification by isozyme gene marker for gynogenetic diploidization and triploidization in hirame, *Paralichthys olivaceus*. Fish Genet. Breed. Sci. 11 : 35~41.
- Yamamoto, K., Y. Nagahama and F. Yamazaki. 1966. A method to induced artificial spawning of goldfish all through the year. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 32 : 977.
- 김동수, 김종현, 박인석. 1992. 태반성 성선 자극 호르몬 (Human Chorionic Gonadotropin) 처리에 의한 미꾸라지의 산란유도 및 연중 다산란 유도를 위한 연구, 한국양식학회지 5 : 109~115.
- 박인석. 1992. 미꾸라지와 미꾸라지의 잡종 및 잡종 3배체에 관한 연구. 부산수산대학교 대학원 박사학위 청구논문 85pp.
- 박인석, 김종만, 김연환, 김동수. 1988. 해산어류에 대한 리도카인의 마취효과, 한국어병학회지 1 : 123~130.