

성 성숙 자극호르몬방출호르몬(GnRH) 투여를 이용한 백점얼룩상어 (*Chiloscyllium plagiosum*)의 성 성숙 유도에 관한 연구

김기혁 · 전지민¹ · 문혜나 · 남궁진 · 여인규*

제주대학교 수산생명의학과, ¹제주 한화 아쿠아리움

Effect of the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) on Induction of Maturation in White-Spotted Bambooshark *Chiloscyllium plagiosum*

Ki-hyuk Kim, Ji-min Jeon¹, Hye-na Moon, Jin Namgung and In-kyu Yeo*

Department of Major of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

¹Hanwha aquaplanet in Jeju, Jeju 63642, Republic of Korea

Shark populations are constantly decreasing owing to environmental destruction and overfishing; thus, sharks are now at risk of extinction, with 30.5% of species classified as endangered on the International Union for Conservation of Nature's Red List. Sharks are apex predators and keystone species in balancing the marine food chain; their extinction would create an imbalance in the entire marine ecosystem. Assisted reproductive technology is a last resort for protecting animals facing extinction. Here, as a proactive effort toward building a hormone-induced artificial insemination protocol for endangered wild sharks, we identified the possibility of germ cell maturation by administration of GnRH, a commercially produced synthetic salmon gonadotropin-releasing hormone, and calculated its optimum dosage and injection timing. The experiment was conducted on one shark species, *Chiloscyllium plagiosum*. Injections were administered in 24 h intervals to *C. plagiosum* females, and 0.2 mL/kg+0.2 mL/kg were the optimal doses. These doses effectively induced maturation and, and ovulation, and oocyte release. Our results confirm that GnRH is a suitable tool for shark hormone-induced artificial insemination and indicate that this method may facilitate the conservation of endangered shark species.

Keywords: GnRH, Sex hormone, Sex maturation, Shark

서 론

어류 성 성숙을 위한 연구는 많은 양식 어종을 대상으로 진행되어 왔다. 최근 종 복원 연구를 위하여 성 성숙 유도법이 사용되고 있으며, 그 방법으로는 광주기 및 수온 등의 자연 사육 환경 변화를 이용한 방법 및 성 호르몬 투여를 통한 방법이 주를 이루고 있다(Kim et al., 2012). 어류의 성 성숙 유도 및 산란의 생리적 특성은 뇌의 시상하부에서 분비하는 생식선 자극호르몬인 방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)이 시상하부에서 방출되어 뇌하수체 전엽에서 생식샘 자극 호르몬을 분비하도록 유도하여 성호르몬 분비를 유발하는 어류에 성 성숙 유도를 위한 호르몬제를 사용하고 있다는 점이다(Ko et al.,

2011). 이와 관련하여 현재까지 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*) 및 어름치(*Hemibarbus mylodon*)등의 다양한 경골어류에서 GnRH 투여를 통해 성 성숙 유도가 되는 것으로 보고되었다(No and Yoon, 2019). 연골어류에 관한 연구는 상대적으로 연구가 부족한 실정으로 현재 국내에서는 까치상어(*Triakis scyllium*) 및 화이트팁리프샤크(*Carcharhinus longimanus*) 두 종에 대해서 보고되었다. 까치상어의 성 성숙 유도 연구에서는 수컷에 GnRH 0.2 mL/kg을 1회 투여, 화이트팁리프샤크에서는 암컷에 24시간 간격을 두고 GnRH 0.2 mL/kg의 용량을 2회 투여 시, 까치상어 수컷은 정액의 양이 많아졌으며 화이트팁리프샤크 암컷에서는 난포 크기가 증가하는 결과를 나타내어 암수 모두 성 성숙 유도의 가능성을 확인할 수 있었다(Kim et

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3474 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: ikyeo99@jejunu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0309>

Korean J Fish Aquat Sci 56(3), 309-314, June 2023

Received 20 February 2023; Revised 17 March 2023; Accepted 30 May 2023

저자 직위: 김기혁(박사 후 연구원), 전지민(대학원생), 문혜나(연구교수), 남궁진(연구교수), 여인규(교수)

al., 2020). 백점얼룩상어(*Chiloscyllium plagiosum*)는 대한민국 연안 토종 어종으로 지정되어 있는 수염상어목 얼룩상어과에 속하며, 얕은 바다에 서식하는 저서성 어종의 난생상어로 알려져 있다. 백점얼룩상어의 번식은 2개월 및 3개월의 연간 산란 주기 동안 6일에서 7일마다 알을 낳는데 암컷은 산란기 동안 반복적인 짝짓기를 필요로 하지 않으며 난자 샘플 저장된 정자를 사용하여 알을 수정할 수 있는 것으로 알려져 있다(Comish et al., 2007; Wyffels et al., 2021). 그러나 현재 무분별한 해양 오염에 의한 서식지 파괴 등으로 백점얼룩상어의 개체수가 급감하여 세계자연보전연맹(International Union for Conservation of Nature, IUCN)에 의해 준위협으로 분류되고 있다(IUCN, 2021). 따라서, 본 연구에서는 백점얼룩상어의 개체 보전을 위해 GnRH 호르몬을 투여한 성 성숙 유도 및 인공 수정 가능성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

본 연구는 제주 한화 아쿠아플라넷의 백점얼룩상어 암컷 및 수컷을 각각 5마리씩 사용하였으며, 각각의 체장 및 체중은 암컷 104.6±3.2 cm, 수컷 100.8±4.2 cm 평균 무게는 암컷 2±87 kg, 수컷 1.57±79 kg으로 사용하였다. 실험어는 제주 성산읍 고성리 연안의 해수를 sand filter (Walmart, Sacramento, CA, USA)로 여과하여 3 ton 사각 수조 중앙에 펜스를 설치하여 두 공간으로 분리 후 암수를 각각 입식하였다.

GnRH 주사 및 혈장 내 호르몬, 혈액 성분 분석

본 연구에 주사한 GnRH는 ovaprim (Sydel and Western, Washington, WA, USA)을 사용하였으며, 1차 복강주사 시점을 기준으로 수컷은 36시간 후, 혈액 샘플링을 실시하였으며, 암컷의 혈액 샘플링은 2차 복강 주사 후 24시간 후 시점에 실시하였다.

백점얼룩상어의 미부정맥으로부터 채취한 혈액 3 mL은 혈청 분리 튜브에 넣어 4°C, 3,000 rpm, 7분간 원심분리하여 -50°C에 보관 후 서울 의과연구소(Hankook General Hospital, Jeju, Korea)에 의뢰하여 estradiol, progesterone 및 testosterone 호르몬 분석을 실시하였다. 혈장을 이용한 혈액 성분 분석은 VefTest Slide (IDEXX, Westbrook, ME, USA)와 생화학분석기(VET TEST 8008; IDEXX)를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), glucose (Glu), phosphorus (PHOS) 및 calcium (Ca²⁺)을 분석하였다.

교미 유도 및 산란 후 난 관찰

호르몬 투여 및 혈액 채취 후, 실험어를 약 5시간 모니터링 하여 안정적인 유영을 확인 후 격리시켜 둔 암수 상어를 한 사육조에 합사하여 교미 및 산란 유도를 위한 조건으로 조도 1,000

lux 이하, 수온 27°C로 50일 동안 유지하였다. 합사 4일 후부터 교미 행동은 암컷의 가슴지느러미 및 수컷의 생식기 상태를 확인을 통해 관찰하였으며 산란 여부는 PVC 파이프에 알 부착 여부로 확인하였다. 합사 4주 후, 총 8개의 난을 획득하여 캘리퍼스(NA-530-300S; Bluebird, China)를 사용하여 난의 크기를 측정하였으며, 난황은 빛 투시 방법으로 측정하였다.

통계

모든 결과는 SPSS version 24 (IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하여 대응표본 검정 T-test로 통계 분석을 실시하였으며, 데이터 값의 유의차는 P<0.05에서 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

백점얼룩상어(*C. plagiosum*)는 고수온 시기인 여름 가을 시점에 교미 및 산란이 활발하게 진행된다고 알려져 있어 본 연구는 야생의 산란시기와 비슷한 시기인 2021년 10월 초에 진행하였다.

본 연구에서 백점얼룩상어 수컷의 testosterone 및 암컷의 progesterone, estradiol의 변화는 Table 1에 나타내었다. Testosterone의 변화는 GnRH 주사 실험구에서 5.16±1.68 ng/mL에서 16.32±2.29 ng/mL로 유의적인 증가를 나타내었으며, progesterone 및 estradiol 변화는 0.10±0.03 ng/mL에서 0.31±0.29 ng/mL, 0.332±100.37 ng/mL에서 0.6166±170.37 ng/mL로 수치는 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았다(Table 1). 이러한 결과는 2020년 아쿠아플라넷에서 실시한 화이트틸리프사크(*C. longimanus*) 및 까치상어(*T. scyllium*)에 대한 연구에서 수컷이 GnRH의 투여 후, testosterone 수치 증가를 나타낸 것(Kim et al., 2020)과 일치하였다. 따라서 GnRH의 투여는 백점얼룩상어 수컷의 성 성숙에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

반면 암컷의 progesterone 및 estradiol 수치 변화는 대조구와 비교에서 수치는 증가하였지만 유의성은 나타내지 않았다. 또한, 백점얼룩상어의 난 채취로 progesterone 및 estradiol 호르몬이 증가하여 성공적인 성 성숙 유도가 이루어졌음을 알 수 있었

Table 1. Hormone concentrations of white-spotted bambooshark *Chiloscyllium plagiosum* prior to GnRH administration and after to GnRH injection

Sex	State	Hormone (ng/mL)	Concentration (Mj%SD)
Male (n=5)	Control	Testosterone	5.16j%1.68
	GnRH injection	Testosterone	16.32j%2.29
Female (n=5)	Control	Progesterone	0.10j%0.03
		Estradiol	0.332j%100.37
	GnRH injection	Progesterone	0.31j%0.29
		Estradiol	0.6166j%170.37

GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

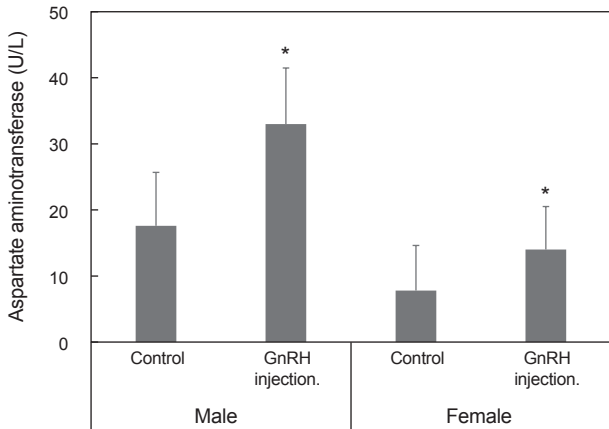


Fig. 1. Analysis of aspartate amino transferase levels in serum of male and female of *Chiloscylidium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values (P<0.05). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

다. 따라서 ovaprim은 백점얼룩상어의 시상하부로부터 생성되는 GnRH의 인위적인 투여로 인한 뇌하수체에서 gonadotropin (Gth) I 및 II가 성공적으로 생성되어 성 성숙 유도를 할 수 있는 것으로 판단되었다.

혈액 생리학적 분석 결과에서 GnRH 투여 후, 수컷의 AST는 대조구와 비교하였을 때, 17±8.0 U/L에서 33±8.4 U/L로 유의적인 증가를 나타낸 반면, 암컷은 7.8±6.8 U/L에서 14±6.5 U/L로 유의적인 증가를 나타내지 않았다(Fig. 1). ALT는 암수 모두 대조구와 비교하였을 때, 수컷은 20.8±4.6 U/L에서 25.2±8.4 U/L, 암컷은 17.2±6.8 U/L에서 20.4±2.3 U/L으로 수치는 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았다(Fig. 2). 일반적으로 AST 및 ALT는 간을 비롯한 체내 장기에 존재하는 아미노산 합성 효소로 간세포 손상 및 간 기능에 장애가 일어났을 경우 증가하는 것으로 보고 되었다(Rao, 1990). 따라서 이러한 결과는 GnRH의 투여로 인한 수컷의 AST 증가로 간 손상 및 스트레스를 유발시킬 수 있을 것으로 생각되었으나 ALT는 유의성을 나타내지 않아 큰 영향은 나타내지 않으며, 암컷 또한 유의성을 나타내지 않아 간 손상 및 스트레스에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

GnRH 복강 투여 후 백점얼룩상어의 수컷 및 암컷에 있어 PHOS는 수컷에서 대조구와 비교하였을 때 3.54±0.23 mg/dL에서 3.64±0.55 mg/dL로 증가하였다. 반면, 암컷에서 대조구와 비교하였을 때 3.34±0.84 mg/dL에서 2.74±0.31 mg/dL로 감소하였으나 모두 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 일반적으로 어류의 PHOS 근육에 저장되며 성어에 비해 자어의 PHOS 산출 비율이 높게 나타난다고 보고 되었다(Cowey, 1995). 양식 해산 어류들의 PHOS 농도변화는 계절적인 영향이 크며, 양식 해산 어류들의 PHOS 농도변화는 계절적인 영향이 크다(Jeon

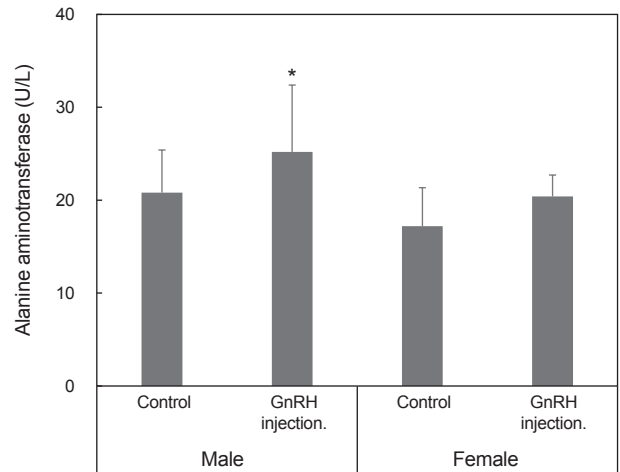


Fig. 2. Analysis of alanine amino transferase levels in serum of male and female of *Chiloscylidium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values (P<0.05). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

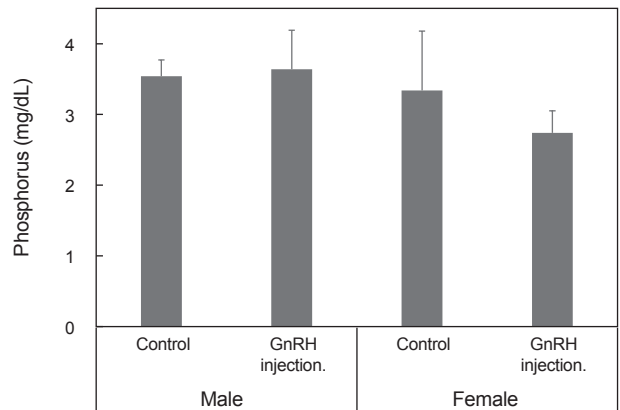


Fig. 3. Analysis of phosphorus levels in serum of male and female of *Chiloscylidium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values (P<0.05). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

and Kim, 1998). 먼저 백점얼룩상어 수컷의 경우 GnRH 투여 후 대조구와 비교하였을 때 수치가 증가한 반면, 암컷의 PHOS 수치는 감소를 나타내었다. 이 결과 GnRH 투여가 백점얼룩상어 암컷의 PHOS 수치에 영향을 미치지 않으며, 수컷과는 달리 계절적인 영향을 받는다는 것으로 판단되었다. GLU는 대조구와 비교하였을 때 수컷은 42.2±6.57 mg/dL에서 52.2±8.52 mg/dL 및 암컷은 36±1 mg/dL에서 38±1 mg/dL로 모두 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았다(Fig. 4). 간 손상이 발생하면 GLU의 수치가 높아진다고 보고 되었으나(Robertson et al.,

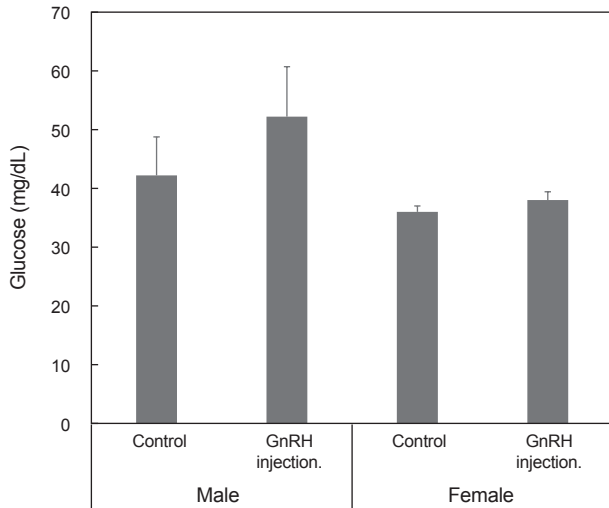


Fig. 4. Analysis of glucose levels in serum of male and female of *Chiloscyllium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P<0.05$). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

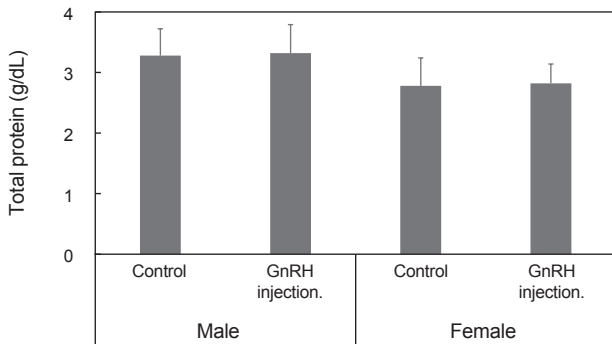


Fig. 5. Analysis of total protein levels in serum of male and female of *Chiloscyllium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P<0.05$). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

1987), 본 실험 결과 백점얼룩상어에 GnRH 투여 시 GLU는 대조구와 비교하였을 때, 암컷 및 수컷 모두 유의성을 나타내지 않았다. 따라서 GnRH 투여는 백점얼룩상어 간 손상에 영향을 주지 않는다고 판단되었다.

일반적으로 TP는 어류의 건강 진단이나 영양 상태, 질병 진단에 이용되고 있으며 정상적인 경골어류의 경우 약 4–7 g/dL 농도 범위로 보고되었다(Turner, 1937). 본 연구에서 백점얼룩상어 혈액 TP 농도는 암수 모두 약 3–4 g/dL 범위로 측정되었다. 또한, 백점얼룩상어의 TP는 공식적으로 발표된 수치가 없어 이 값은 최초 TP 수치라고 할 수 있으며 대조구와 비교하였

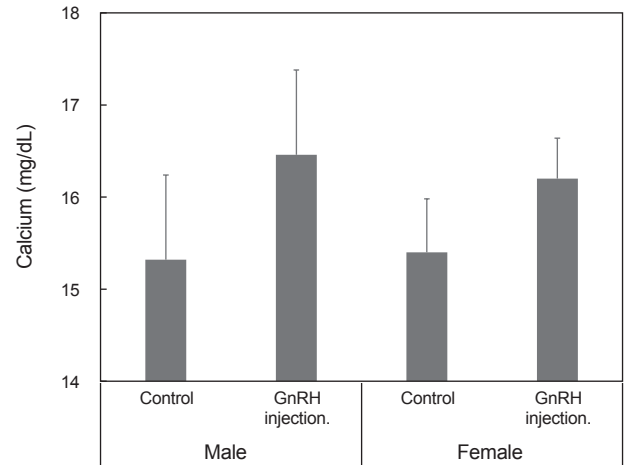


Fig. 6. Analysis of Ca^{2+} levels in serum male and female of *Chiloscyllium plagiosum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P<0.05$). GnRH, Gonadotropin-releasing hormone.

을 때, 유의성은 나타내지 않았다(Fig. 5). 백점얼룩상어 암컷에 GnRH 투여로 인한 칼슘은 대조구와 비교하였을 때, 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 6). Ca^{2+} 같은 2가 이온들은 생체 내에서 단백질 합성이 증가되었을 때 혈중 Ca^{2+} 농도가 증가되며 성숙 시기 역시 농도가 증가한다고 보고 되었다(Waring et al., 1996). 따라서 본 실험에서 혈중 칼슘 농도가 증가한 것은 암컷에 있어 GnRH 투여로 인한 성 성숙에 관련되는 난황 단백질 합성과 같은 작용에 사용되기 위하여 증가된 것으로 판단된다.

백점얼룩상어의 암수 합사 3일 후 수컷 생식기에서 붉게 물들고 벗겨진 환부가 확인되었으며, 암컷 좌측 가슴지느러미에 이빨자국 및 붉게 충혈된 환부가 관찰되어 암수 교미흔으로 추정할 수 있었다(Appendix 1, Appendix 2). 이 결과 총 8개의 난을 획득하였으며 그 중 2개의 난은 난황을 확인할 수 없는 미수정란으로 확인되었다(Appendix 3). 난 형태 관찰 결과 난황이 없는 난의 크기는 평균 9.03 ± 0.31 cm, 난황이 있는 6개의 난은 평균 9.66 ± 0.31 cm로 크기가 유사한 것으로 나타내었다(Appendix 4). 산란된 6개의 난은 2주 후 손상되기 시작하여 둥글지 않고 넓게 터진 듯한 형태를 나타내기 시작하였으며, 산란 4주 후 모두 사라 하였다(Appendix 5).

본 연구 결과 GnRH 투여는 상어에서 인위적으로 난자의 성숙 및 배란을 유도하고 수컷과의 교미를 유도할 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 백점얼룩상어 암수 모두 0.2 mL/kg 용량이(Kim et al., 2020) 성 성숙에 효능이 있음을 나타내었으며, 호르몬 인공수정을 위한 기본적인 조건들이 GnRH 투여를 통해 갖춰질 수 있음을 시사하였다. 하지만, 암컷 백점얼룩상어의 estradiol 수치 차이가 심하여 GnRH 투여가 암컷의 성 성숙 유발 및 성 행동의 유발에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않아 다양한 농도의 GnRH 투여 및 번식행동 실험 등을 통

해 수정까지 이어질 수 있는 실험이 필요하다고 판단된다. 마지막으로 백점얼룩상어의 호르몬 정상수치는 학술적으로 발표되지 않아 Table 1에서 제시하고 있는 호르몬 수치가 앞으로의 연구에 대한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2022학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Cornish AS, Ng WC, Ho VC, Wong HL, Lam JC, Lam PK and Leung KM. 2007. Trace metals and organochlorines in the bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum* from the southern waters of Hong Kong, China. *Sci Total Environ* 376, 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.070>.
- Cowey CB. 1995. Intermediary metabolism in fish with reference to output of end products of nitrogen and phosphorus. *Water Sci Technol* 31, 21-28. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00423-K](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00423-K).
- George RH, Steeil J and Baine K. 2017. Diagnosis and treatment of common reproductive problems in elasmobranchs. In: *The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M and Ezcurra J, eds. Ohio Biological Survey Inc., Columbus, OH, U.S.A., 363-374.
- Grogan D and Lund R. 2004. The origin and relationships of early Chondrichthyes. In: *Biology of Sharks and Their Relatives*. Carrier JC, Musick JA and Heithanus MR, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., 3-31.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org> on on Apr 05, 2022.
- Jeon JK and Kim HB. 1998. Comparison in serum constituents of cultured marine fishes in early summer season. *J Aquac* 11, 574-556.
- Kim CH, Yoon SW, Kim JG, Kim H, Park JS and Park JY. 2012. Embryonic development and early life history of the endangered species *Microphysogobio koreensis* (Pisces: Cyprinidae). *Korean J Ichthyol* 24, 160-166.
- Kim SW, Hong W, Han SJ, Kwon J, Ko H, Lee SB and Park SC. 2020. Use of synthetic salmon GnRH and domperidone (Ovaprim®) in sharks: Preparation for *ex situ* conservation. *Front Mar Sci* 7, 571741. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.571741>.
- Ko MH, Kim WJ, Park SY and Bang IC. 2011. Egg development and early life history of the endangered species *Gobiobotia macrocephala* (Cyprinidae). *Korean J Ichthyol* 23, 198-205.
- Noh CH and Yoon NJ. 2019. Embryonic development of fertilized eggs of convict grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*)♀×giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*)♂. *Korean J Ichthyol* 31, 23-29. <https://doi.org/10.35399/ISK.31.1.4>.
- Rao P. 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. *J Nat Conserv* 2, 133-137.
- Robertson L, Thomas P, Arnold CR and Trant JM. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Prog Fish Cult* 49, 1-12. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1987\)49<1:PCASSR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1987)49<1:PCASSR>2.0.CO;2).
- Turner CL. 1937. Reproductive cycles and superfetation in Poeciliid fishes. *Biol Bull* 72, 145-164. <https://doi.org/10.2307/1537249>.
- Waring CP, Stagg RM and Poxton MG. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J Fish Biol* 48, 161-173. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01110.x>.
- Wyffels JT, Adams LM, Bulman F, Fustukjian A, Hyatt MW, Feldheim KA and Penfold LM. 2021. Artificial insemination and parthenogenesis in the whitespotted bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum*. *Sci Rep* 11, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88568-y>.

부 록



Appendix 1. The clasper of *Chiloscyllium plagiosum*. male after copulation.



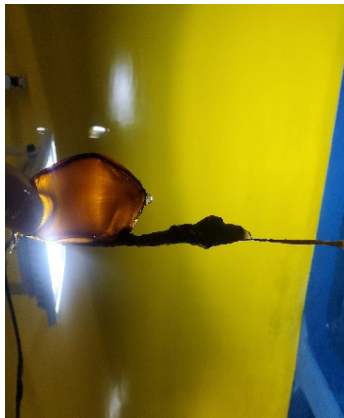
Appendix 4. The measurement of size of egg in *Chiloscyllium plagiosum*.



Appendix 2. The scars on fin of *Chiloscyllium plagiosum*. female after mating.



Appendix 5. The change in the morphology eggs of *Chiloscyllium plagiosum*.



Appendix 3. The shape of inactivated eggs of *Chiloscyllium plagiosum*.