

태반성 성선 자극 호르몬 (Human Chorionic Gonadotropin) 처리에 의한 미꾸라지의 산란 유도 및 연중 다산란 유도를 위한 연구*

김동수·김종현·박인석**

부산수산대학교 양식학과 · **한국해양연구소 해양생물공학실

Induced and Multiple Spawning by Human Chorionic Gonadotropin Injection of the Loach, *Misgurnus mizolepis* (Teleostomi ; Cobitidae)

Dong Soo KIM, Jong Hyun KIM and In-Seok PARK**

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan
Pusan 608-737, Korea

**Marine Biotechnology Lab., KORDI, Ansan 425-600, Korea

ABSTRACT

Effects of intraperitoneal injections of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation and spawning of the loach, *Misgurnus mizolepis*, were investigated. Matured females spawned successfully by a single dose of 6 IU (HCG) per gram body weight.

Spawning usually occurred 13 to 25 hours after hormone injection. Most of the eggs were fertilized and hatched normally. Fertilization rate, hatching percentage and Pseudogonadosomatic index were not correlated with increasing HCG doses. For the study of multiple spawning of this species, fatness, hepatosomatic and gonadosomatic indices of artificially spawned females were checked for 42 days after first spawning. According to this result, females could spawn again 40 days after first spawning.

서 론

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 분류학적으로 잉어목(order Cyprinida), 잉어아목(suborder Cyprinina), 잉어과(family Cyprinidae)의 미꾸리아과(subfamily Cobitinae)에 속하며 중국 대륙 일부, 만주 및 우리 나라 전역에 분포되어 있는 담수어이다(정 1977). 본 종은 미꾸리(*M. anguillicaudatus*)와 더불어 옛부터 식용으로 되어 왔으나 연간 총 생산량은 하천의 오염과 농약의 남용으로 인하여 감소일로에 있고 양식에 의한 생산량도 단지 총 생산량의 1~2% 에 불과한 실정이며, 이것마저도 자연산 치어를 채취하여 양식하는 등 완전 양식에 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 미꾸리속 어류의 생산량 증대를 위하여 필연적으로 안정적인 종묘의 공급에 따른 생산량 증대가 요구되고 있다.

어류 양식에서 우량 종묘의 안정적인 공급은 사육 어종의 전 생활사 조절을 통하여 가능하며 특히 인공 산란 유도는 자연산란이 어려운 종의 종묘를 안정적으로 생산할 수 있게 한다(Lam 1982).

* 본 연구는 한국과학재단 연구비(864-0402-006-2) 및 1992년도 교육부 유전공학 연구비 지원에 의해 수행 되었음.

호르몬에 의한 산란 유도는 Houssay(1930, 1931)가 *Prochilodus platensis*의 뇌하수체를 *Cnesterdon decemmaculatus*에 복강 주사함으로서 산란을 최초로 유도시킨 이래 여러 종을 대상으로 다양한 호르몬에 의한 산란 유도가 이루어지고 있으며 주로 성숙, 산란 유도 및 산란 시간의 조절 등이 중점적으로 연구되어지고 있다(Donaldson and Hunter 1983).

산란 유도 호르몬 중 태반성 성선자극 호르몬(HCG)은 비교적 값이 싸고 표준화가 가능하다는 점 등으로 인해 인공 산란 유도시 많이 사용되고 있으며 유효 농도는 낮게는 어체중 g당 0.1 IU 높게는 40 IU로 나타나고 있다(Gordin and Zohar 1978 ; Shehadeh 1975). 미꾸리속 어류의 HCG에 의한 산란 유도에 관한 연구로는 미꾸리를 대상으로 산란기에 어체중 g당 10 IU HCG 주사 후 산란 시간, 산란 유도 효과 조사와 아울러 비산란기의 산란 유도와 다산란 유도가 이루어진 바 있다(Suzuki 1983 ; Suzuki and Yamaguchi 1977).

본 연구는 미꾸라지 양식시 우량 종묘의 안정적 대량 생산을 위한 연구의 일환으로 미꾸라지에서 HCG의 적정성, 산란 유도 유효 농도 및 산란 유도 시간 등 HCG에 의한 산란 유도 효과를 조사하였다. 또한 연중 안정적인 종묘 생산을 위하여 첫산란이 이루어진 개체들을 사육하면서 배란 후 사육 경과 및 수에 따른 비만도, 간 속도지수 및 생식소 속도지수 변화를 조사하였으며 이 결과를 토대로 배란된 개체를 대상으로 재산란을 유도하여 본 종의 다산란 유도의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

미꾸라지의 채집은 낙동강 수계를 중심으로 그 지류에서 행하였으며 채집 방법은 전기 충격법 및 그물을 사용하였다. 채집된 어류는 연구실로 옮겨 준비된 200 l 용량의 플라스틱 순환 여과 수조에서 인공 사료로 사육하였으며 사육 수온은 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다.

동일 실험 조건하에서 각 개체의 정확한 식별을 위하여 모든 개체들을 tagging 하였으며 본 종의 습성이 서식지의 바닥을 파고들며 어체에 점액질이 많아 취급이 매우 어려운 점을 감안하여 Kim et al. (1988)의 방법에 의거 1,000 ppm NaHCO_3 농도의 지하수에 염산 리도카인 최종 농도가 300 ppm 되게 하여 마취 후 실험에 사용하였다.

미꾸라지 종묘의 대량 생산을 위한 기초 생물학적 연구로서 HCG(Sigma Co. USA)를 성체에 처리하여 인공 산란을 유도하였다. 즉 HCG를 몇 단계 농도로 복강 주사 후 산란 유무를 조사하여 산란에 필요한 최소 농도를 결정하였으며 산란 유도된 각 농도별 위생식소 속도지수(pseudogonadosomatic index), 성숙도, 수정율 및 부화율을 구하여 HCG에 의한 산란 유도 효과를 검토하였고 아울러 적정 산란 유도 농도 내에서 HCG 주사 후 배란까지의 시간을 구하였다. 또한 각 개체의 체중별 산란수 및 난경을 조사하였으며 난경은 정밀자가 부착된 해부현미경(Nikon M-350, Japan)하에서 X 40의 비율로 50개의 난을 측정하였다.

연중 다산란 유도를 위하여 인공 배란 후 방란시킨 개체들을 25°C 로 사육하면서 최초 산란 유도 후 42일까지 3 일 간격으로 매회 3 미씩 해부하여 포란수, 난경, 비만도(fatness index), 간 속도지수(hapatosomatic index, HSI) 및 생식소 속도지수(gonadosomatic index, GSI)를 측정하였다. 포란수 계산은 습중량법에 의하였고 난경 측정은 HCG 산란 유도시 사용된 난경 측정 방법을 사용하였으며 비만도 측정은 Fa-Iton's condition factor(체중 $\times 10^3$ /전장 3)를 사용하였다. 간 속도지수는 간중량 $\times 10^3$ /체중으로 산출하였으며, 생식소 속도지수는 생식소 중량의 체중에 대한 백분비 즉, 생식소 중량 $\times 100$ /체중으로 산출하였다.

다산란 유도의 가능성을 알아 보기 위하여 산란 유도된 미꾸라지 10 마리를 25°C 온도 조건에서 사육하면서 최초 산란 40 일 후에 2 회에 걸쳐 연속적으로 산란을 시도하였다.

통계 처리 결과는 Statistical Analysis System (SAS User's Manual 1985)으로 처리했으며, 유의차의 검정은 T-test 또는 Duncan's Test에 의하였다.

결 과

HCG는 미꾸라지에 있어 2~10 IU/g 체중 농도에서 산란 유도 효과를 나타내었으며 6 IU/g 체중 이상의 HCG에서는 100%의 산란 유도를 나타내었다. 미꾸라지에서의 HCG의 최소 산란 유도 농도는 2 IU/g 체중으로서 23.1%의 산란이 유도 되었다(Table 1).

HCG의 농도에 따른 난질 평가를 위하여 HCG 2~8 IU/g 체중에서 위생식소 속도지수 수정율 및 부화율을 측정 한 결과 위생식소 속도지수는 11.1~21.3%, 수정율은 91.1~94.1% 및 부화율은 49.6~73.6%를 나타내었으나 농도 증가에 따른 유의차는 ($P>0.05$) 보이지 않았다(Table 2).

HCG 주사 후 산란까지 소요되는 시간을 각 농도별로 조사한 결과는 Table 3과 같다. 저농도의 HCG에서 보다 고농도의 HCG에서 산란 시간의 단축이 현저하였으며 복강 주사 후 13~25시간 범위에서 산란이 유도되었다.

Table 4는 HCG 주사시 어체중에 따른 산란된 난의 수 및 난경으로서 어체중이 증가됨에 따라 난의 수는 증가되었으며 어체중 g당 평균 약 500~600개의 난이 산란되었다. 난의 크기는 평균 1.03~1.22 mm로 어체중 증가에 따른 난경 증가 경향은 보이지 않았다.

산란이 이루어진 개체의 난수는 Table 5에 보듯이 체중 1g당 산란 3일 후에는 약 60개에서 3~39일 후에는 약 280개로 계속 증가하다가 42일 후에는 감소하는 경향을 보인다. 그러나 난경은 실험 기간 중 난수의 증가에 관계없이 평균 0.82 ± 0.06 mm로 일정하였다.

Table 1. Ovulation responses of the loach, *Misgurnus mizolepis* after HCG injection at 25°C

Dose (IU/g BW)	No. of females injected	No. of females ovulated	Percentage of females ovulated
0	14	0	0
1	10	0	0
2	13	3	23.1
4	17	13	76.5
6	47	47	100
8	12	12	100
10	32	32	100

Table 2. The effects of injected HCG on the ovulation, pseudogonadosomatic index, fertilization rate, and hatching rate of the loach, *Misgurnus mizolepis* at 25°C

Dose (IU/g BW)	No. of females ovulated	Pseudo GSI (%)**	Fertilization rate (%) ¹	Hatching rate (%) ¹
2	3	16.5 ± 0.7 *	94.1 ± 3.2 *	49.6 ± 38.7 *
4	13	11.1 ± 0.9	92.4 ± 4.1	73.6 ± 20.2
6	47	15.7 ± 7.0	91.1 ± 6.7	54.2 ± 36.6
8	12	21.3 ± 5.7	92.6 ± 3.0	58.7 ± 41.2

¹ ($P>0.05$)

* Standard error

** Pseudogonadosomatic index = $(b/a) \times 100$

a: weight of fish before injection

b: weight of stripped eggs

Table 3. Time until ovulation of the loach, *Misgurnus mizolepis* after HCG injection at 25°C

Dose (IU/g BW)	No. of females examine	Mean ovulation time after HCG injection *
2	3	18 (15~22)
4	10	20 (13~25)
6	10	19 (17~23)
8	10	16 (13~18)
10	10	17 (13~22)

* Hours, ranges in parentheses

Table 4. Relationship between egg numbers and body weight of the loach, *Misgurnus mizolepis*

Body weight class (g)	Mean No. of eggs spawned	No. of eggs/g BW	Egg diameter (mm) *
15.1~18.0	8,500	600	1.03±0.17
18.1~21.0	9,500	500	1.17±0.10
21.1~24.0	10,500	500	1.09±0.23
24.1~27.0	12,000	500	1.22±0.05
27.1~30.0	13,500	500	1.16±0.13

* Means±SD

Table 5. Changes of egg number of the loach, *Misgurnus mizolepis* after first spawning

Days after first spawning	No. of eggs/g BW *
3	60.5±9.5
9	144.0±35.2
15	193.3±68.6
21	195.0±17.3
27	214.7±55.0
33	283.6±75.2
39	283.4±55.9
42	212.6±42.9

* Means±SD

첫 배란 후 42 일까지의 비만도, 간 속도지수 및 생식소 속도지수 변화는 Fig.1에 나타나 있다. 비만도는 배란 3 일 후부터 9 일 후까지는 점진적인 증가를 보이다가 12 일경에는 213으로 최고값을 나타내고 이후에는 점진적인 감소 현상을 보였다. 간 속도지수는 배란 후 점진적 증가를 보여 배란 33 일이 경과하면 2.1%로 최고값에 도달하고 이후에는 감소하였다. 생식소 속도지수는 배란 3 일 후부터 계속 증가하여 39 일 후에 9.9%로 실험 기간 중 계속 증가하는 경향을 나타내었다.

첫 배란 후 42 일까지의 난수, 난경의 변화 및 비만도, 간 속도지수, 생식소 속도지수 변화의 결과를 토대로 평균 체중 18.1±3.0 g의 10마리의 미꾸라지 암컷을 대상으로 첫 배란 40 일 후 재 산란을 시도한 결과 10 마리 모두 산란하였으며 1 마리는 산란 후 사망하였다. 이후 잔존 9 마리를 대상으로 다시 40 일 후 재산란을 유도한 결과 모두 산란하여 다산란의 가능성이 확인되었다.

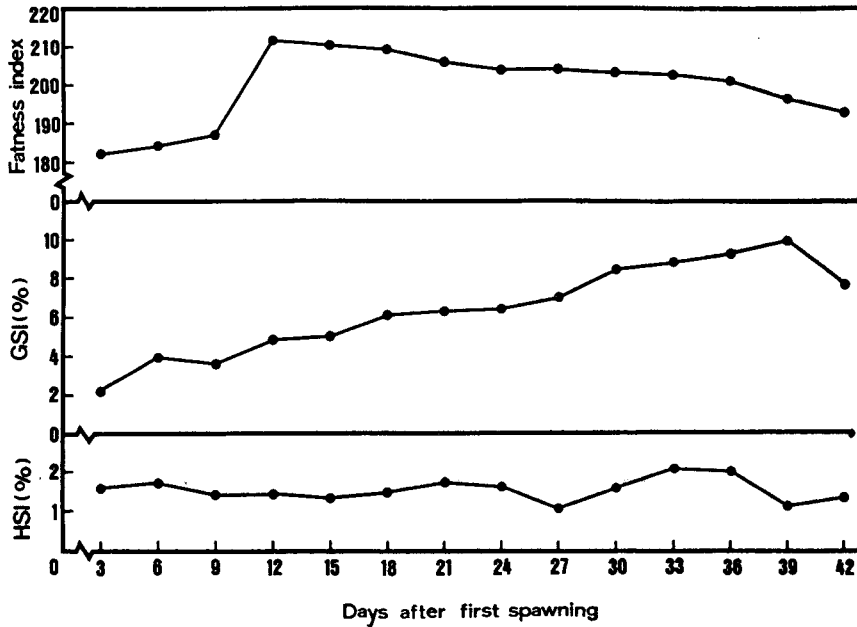


Fig. 1. Changes of the fatness, gonadosomatic and hepatosomatic indices of the loach, *Misgurnus mizolepis* during the experimental period.

논 의

어류에서 산란 유도 기법은 성숙 및 배우자 생산을 위하여 대상어의 산란 시기를 변화시키거나 산란 시기를 동시화 시키는 것으로 연어속 양식 어종을 대상으로 활발히 시도되어 왔다(Donaldson 1973). HCG는 포유류 태반성 기원인 glycoprotein으로써 체내에서 난소 호르몬 즉 $17\alpha, \beta$ -dihydroprogesterone 및 prostaglandin을 공급하는 효과와 아울러 구입이 쉽고 장기 보관이 가능하며 규격화, 표준화가 이루어져 있고 비교적 값싼 점 등으로 인하여 어류의 성숙 및 spermiation에 효과적으로 사용되고 있다(Donaldson and Hunter 1983 ; Lam 1982).

HCG는 이미 담수어류인 *Clarias macrocephalus*, *C. lazera*, 초어(*Ctenopharyngodon idella*) 및 Indian carp(*Labeo rohita*)와 해산어류인 common sole (*Solea solea* L.) 및 grey mullet (*Mugil cephalus*)에서 효과적임이 보고되어 있고 또한 미꾸라지와 동일속 어류인 미꾸리에서도 매우 효과적임이 보고되고 있다(Carreon et al. 1976 ; Kuo et al. 1973 ; Suzuki 1983). 본 연구 결과 미꾸라지도 이들 보고와 마찬가지로 HCG는 본종에 매우 효과적인 산란 유도 호르몬으로 사료되었다.

미꾸라지는 주사된 HCG 6~10 IU/g체중에서는 100% 산란 유도를 보여 여타종에서의 HCG처리시 일반적으로 사용되는 산란 유도 농도인 1 IU/g체중과 비교시 비교적 고농도였으나 미꾸리의 10 IU/g체중 HCG 주사시 80~100%의 산란 유도율과 비교해 볼때 본 실험에 사용된 어종인 미꾸라지가 미꾸리에 비해 HCG에 더욱 민감함을 알 수 있었다(Suzuki and Yamaguchi 1977).

본 연구 결과 HCG 농도 증가에 따르는 위생식소 속도지수, 수정율 및 부화율은 그리 큰 차이를

보이지 않았다. 더우기 HCG 처리시 농도 증가에 따른 산란 소요시간 간의 차이도 크게 나타나지 않아 HCG 처리시 친어의 성숙이 이루어진다면 저농도 HCG 사용도 무방하리라 생각된다. 그러나 *Sparus aurata* 및 common sole의 경우 고농도의 HCG 처리시 난질 저하, 그리고 저농도 HCG 처리시 산란 소요시간의 지연 등이 보고되어 있어 차후 미꾸라지의 환경 조절에 의한 친어의 성숙 상태 유도법 및 친어의 난질 평가 방법이 필요하리라 사료된다(Zohar and Gordin 1979).

미꾸라지 다산란 유도시 포란수는 첫번째 배란 후 시간의 증가에 따른 뚜렷한 증가 현상을 보여 첫번째 산란 후 약 33일째가 되면 최고값에 도달하고 39일 이후에는 감소 현상을 보였다. 비만도도 첫번째 산란 후 9일까지 점진적인 증가를 하다가 이후 급격히 증가하고 12일 이후부터는 감소하는 경향을 보인다. 이것은 산란 12일 이후부터 어체에 공급된 영양분이 어체를 만드는데 쓰이는 양보다 생식소로 공급되는 양이 많음을 알 수 있다. 따라서 충분한 영양 공급이 다산란을 유도하는데 있어 중요할 것으로 생각된다.

생식소 발달에 영향을 미치는 간 속도지수는 배란 후 33일에 최고점에 도달하고 이후 감소하는 것으로 보아 이 시기에 간에 축적된 난 성숙 필요 물질이 최대로 되고 생식소에 전달되어 난의 성숙이 완전히 이루어지는 것으로 사료된다. 생식소 속도지수는 간 속도지수와 마찬가지로 첫번째 배란 후 39일째까지 점진적인 증가를 보이는 것으로 보아 본 종에 다산란의 유도를 위하여는 적어도 첫번째 배란 후 33일 이후가 경과하여야 할 것으로 보인다. 이는 본 종과 같은 속에 속하는 미꾸리의 20~30일에 비하면 약간 오래 걸리나 본 종이 미꾸리에 비하여 성장이 빠르고 대형이며 어체중 g당 500~600개의 난을 포란하는 것을 감안할 때 같은 연령, 같은 수의 친어에서 연중 얻을 수 있는 종묘의 수는 훨씬 많을 것으로 사료된다(Suzuki 1983).

차후 본 연구 결과와 함께 유전육종학적 연구를 병행 실시한다면 미꾸라지 양식에 있어 우량 종묘의 안정적 공급에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

요 약

미꾸라지 양식시 기본 요건인 종묘의 안정적 공급을 위하여 호르몬 처리에 의한 산란 유도 및 연중 다산란 유도 가능성을 조사하였다. 미꾸라지는 어체중 g당 2~10 IU 농도의 태반성 성선자극 호르몬(HCG) 1회 주사로 23.1~100% 산란이 유발되었으며, 특히 6 IU/g의 농도 이상에서는 모든 실험어가 산란하였다. 호르몬 주사 후 산란까지 대개 13~25시간이 소요되었고 HCG 농도 증가에 따른 수정율, 부화율 및 위생식소 속도지수의 변화는 관찰되지 않았다. 어체중 증가에 따라 포란수도 증가하여 어체중 g당 평균 약 500~600개의 난을 산란하는 것으로 나타났다. 다산란 유도를 위해 25°C 조건하에서 사육하면서 첫 산란 후 사육 일수에 따른 비만도, 간 속도지수 및 생식소 속도지수를 조사하고 이를 토대로 재산란을 유도한 결과 미꾸라지 암컷은 최초 산란 후 40일이 경과하면 양질의 난을 재산란하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Carreon, J. A., F. A. Estocapio and F. M. Enderez. 1976. Recommended procedures for induced spawning and fingerling production of *Clarias macrocephalus* Günther. *Aquaculture* 8 : 269~281.

- Donaldson, E. M. 1973. Reproductive endocrinology of fishes. *Am. Zool.* 13 : 909~927.
- and G. A. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. p. 351~403. In : Hoar, W. S., D. Randall and E. M. Donaldson (Editors), *Fish Physiology*, Vol. 9 (B). Academic Press, London.
- Gordin, H. and Y. Zohar. 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* (L.) by means of hormonal treatments. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18 : 985~990.
- Houssay, B. A. 1930. Action sexual de la hipofisis en los perces by reptiles. *Rev. Soc. Arhent. Biol.* 6 : 686~688.
- 1931. Action sexuelle de l'hypophyse sur les poissons et les reptiles. *C. R. Seances Soc. Bilo. Ses Fil.* 106 : 377~378.
- Kim, D. S., I. C. Bang, S. K. Chun, and Y. H. Kim. 1988. Effects of the anaesthetic lidocaine on some fishes. *Bull. Kor. Soc. Fish Pathol.* 1 : 59~64.
- Kuo, C. M., Z. H. Shehader and C. E. Nash. 1973. Induced spawning of captive grey mullet (*Mugil cephalus* L.) females by injection of human chorionic gonadotropin. *Aquaculture* 1 : 429~432.
- Lam, T. J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39 : 111~137.
- SAS. 1985. SAS User's Guide : Statistics. Version 5 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 341 pp.
- Shehadeh, Z. H. 1975. Induced breeding techniques - a review of progress and problems. Workshop on Controlled Reproduction of Cultivated Fishes. EIFAC/T 25 pp. 72~89.
- Suzuki, R. 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 31 : 233~243.
- and M. Yamaguchi. 1977. Effect of temperature on maturation of a cyprinid loach. *Bull. Jpn. Soc. Fish.* 43 : 367~373.
- Zohar, Y. and H. Gordin. 1979. Spawning kinetics in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. after low doses of human chorionic gonadotropin. *J. Fish Bilo.* 15 : 665~670.
- 정문기, 1977. 한국어도보, 일지사, 서울 pp. 220~218.