

## 인간용모성생식선자극 호르몬과 잉어 뇌하수체에 의한 해산송사리, *Oryzias dancena* 인공산란 유도

박인석\*

한국해양대학교 해양과학기술대학 해양생명과학부

### Artificial induction of spawning by human chorionic gonadotropin and carp pituitary extract in marine medaka, *Oryzias dancena*

In-Seok Park\*

Division of Marine Bioscience, College of Ocean Science and Technology, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Republic of Korea

#### \*Corresponding author

In-Seok Park  
Tel. 051-410-4321  
E-mail. [ispark@kmou.ac.kr](mailto:ispark@kmou.ac.kr)

Received: 12 May 2020  
First Revised: 17 June 2020  
Second Revised: 24 June 2020  
Revision accepted: 25 June 2020

**Abstract:** The method of natural spawning is very passive and inconvenient for the study of developmental engineering in marine medaka, *Oryzias dancena*. The optimum concentration of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) for ovulation and spawning, and the injection time for the artificial spawning of marine medaka were analyzed in this study. The success rate, survival rate, and hatching rate were highest with 100 IU HCG kg<sup>-1</sup> BW and 5 mg CPE L<sup>-1</sup> in both male and female marine medaka ( $p < 0.05$ ). After obtaining unfertilized eggs and sperm by the injection of HCG and CPE into the broodstock of marine medaka, artificial fertilization could be successfully achieved any time fertilized eggs are needed in this species. This result should be useful for developing a study program for marine medaka as an experimental animal.

**Keywords:** artificial fertilization, carp pituitary extract, human chorionic gonadotropin, marine medaka

## 서 론

해산송사리 (marine medaka, *Oryzias dancena*)는 담수와 기수에 걸쳐 서식하는 최대 전장이 3.1 cm에 이르는 소형어류로서, 인도를 위시한 지역에서 서식한다 (Abraham 2011; Park 2019). 본 종은 사육이 비교적 수월하고 (Lim *et al.* 2012; Im *et al.* 2016; Park 2019), 광염성 (euryhaline) (Inoue and Takei 2003; Kang *et al.* 2008; Cho *et al.* 2010), 손

쉬운 산란유도 및 인공수정 (Lim *et al.* 2012; Im *et al.* 2016), 부화 후 2~3개월에 생식 가능 (Lim *et al.* 2012) 및 암·수간 뚜렷한 성적이형 (sexual dimorphism: Im *et al.* 2016)으로 인해 우리나라에서는 우수한 실험동물로의 가치성은 인정받고 있어, 다수의 관련 연구 결과가 보고되었다 (Park *et al.* 2011; Park 2019, 2020; Park and Gil 2020).

실험동물로서 가치성을 지닌 해산송사리를 대상으로 한 연구 중 염색체공학 (chromosome engineering)과 관

련 유도 3배체 연구로는, 유도 3배체와 2배체를 대상으로 한, 세포 및 핵 크기 비교(Goo *et al.* 2015b), 성장과 생식소 성숙 비교(Park *et al.* 2016a), 세포유전학적 연구(Park *et al.* 2016b), 그리고 유도 3배체에서의 amitosis-like 핵분열 현상(Park and Choi 2018), 배수화와 sex에 따른 비대칭(Park and Gil 2018), 유도 3배체의 계측형질 특성(Park *et al.* 2018), 유도 3배체와 2배체 조직의 세포주기 비교(Park 2019), 해산송사리 염색체공학을 위한 온도의존적 체세포 분열주기( $\tau_0$ ) 조사(Park and Gil 2020) 및 유도 3배체와 2배체의 체절단면에서의 계측형질 비교 분석(Park 2020) 등이 보고된 바 있다.

수산 양식산업에서의 성숙 유도 및 배란과 배정의 촉진 은 종묘생산의 동시화를 이루어 동일 시기에 대량의 인공 종묘를 생산할 수 있으며, 산란시기를 조절하여 종묘생산의 효율성을 기할 수 있음과 더불어 다산란 및 인공 종묘생산과 유연관계가 밀접한 종간의 잡종화를 이룰 수 있다(Yamamoto *et al.* 1966; Park *et al.* 1994). 호르몬에 의한 산란유도는 Houssay (1930)가 *Prochilodus platensis*의 뇌하수체(pituitary extract)를 *Nesterdon decemmaculatus*에 복강주사 함으로써 산란을 최초로 유도시킨 이래, 현재까지 여러 수산생물 종을 대상으로 다양한 호르몬에 의한 산란유도가 이루어지고 있는 바, 이러한 산란유도 실험은 주로 성숙, 산란유도 및 산란시간의 조절 등에 집중되어지고 있다(Donaldson and Hunter 1983; Park *et al.* 1994; Park 2002; Goo *et al.* 2015a).

인간용모성생식선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin; HCG)은 포유류 태반성 기원인 glycoprotein으로서 체내에서 난소호르몬인  $17^{\alpha}$ -dihydroprogesterone 및 prostaglandin을 공급하는 효과와 더불어 구입이 쉽고, 장기 보관이 가능하며, 규격화, 표준화가 이루어져 있고, 비교적 값싼 점 등으로 인하여 어류에서의 성숙 및 배란과 배정에 효과적으로 사용되고 있다(Lam 1982; Donaldson and Hunter 1983; Park 2002; Goo *et al.* 2015a). 해산송사리의 자연수정에 대한 다수의 연구들이 이미 발표된 바 있고(Goo *et al.* 2015a; Park and Choi 2018; Park and Gil 2018, 2020; Park *et al.* 2018; Park 2019, 2020), 이미 Lim *et al.* (2012)에 의해 해산송사리에서의 인공산란을 위한 산란행위에 대한 조사가 이루어진 바 있다.

해산송사리의 이와 같은 자연수정 후 수정 직후 시간 경과에 따른 실험들이 현재까지 수행하여 왔는 바(Park

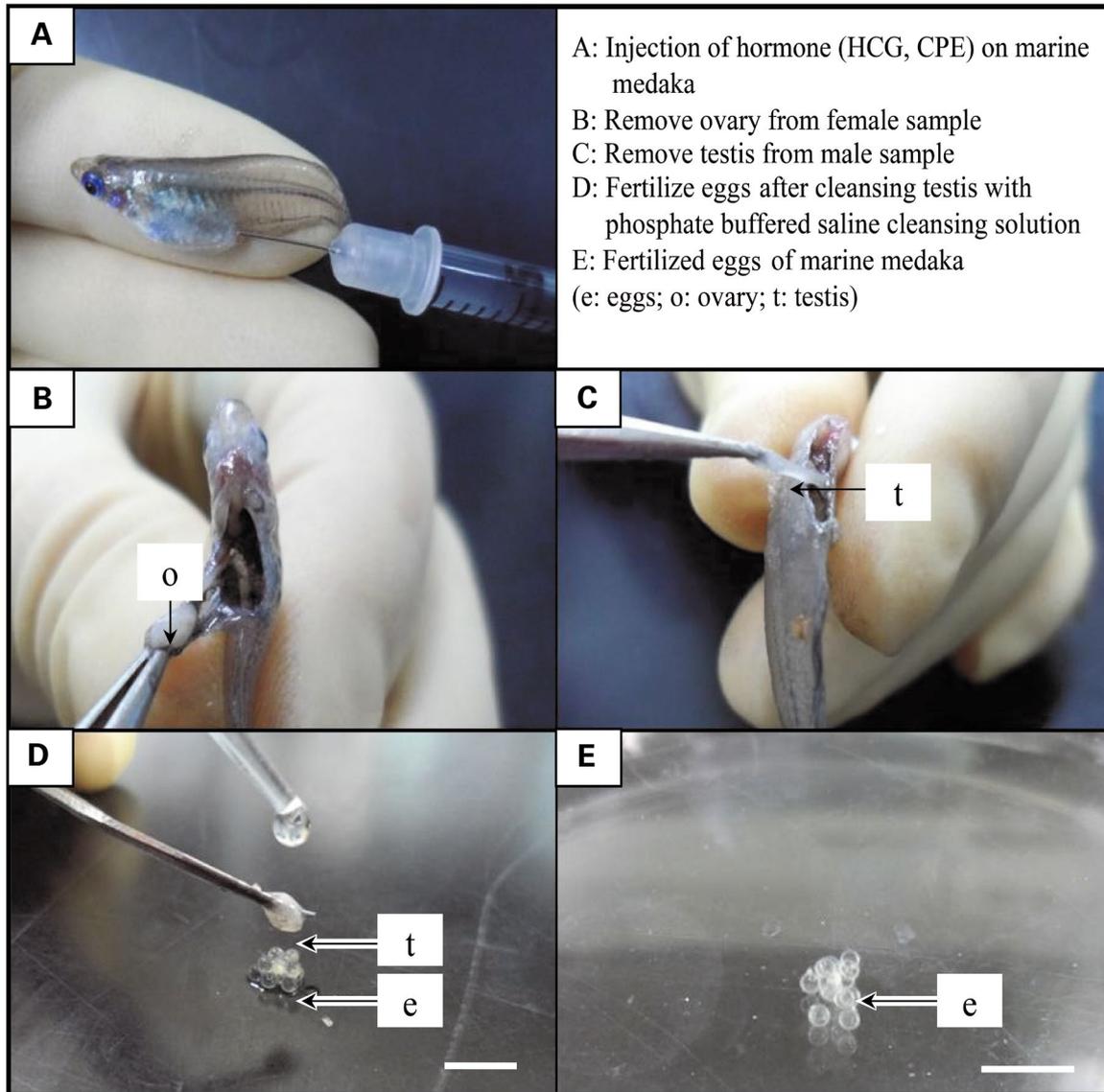
2019; Park and Gil 2020), 해산송사리의 자연수정은 다음과 같다. 실험자의 실험에 적합한 유도 자연산란을 위해 우선, 자연산란 유도일 하루 전에 해산송사리 성숙 암컷 친어 1마리 당 성숙 수컷 친어 3~5마리를 소형수조에 수용 후 screen으로 격막을 설치하여 성숙 암·수 친어를 격리시킨다. 이후 부화 직후의 알테미아, *Artemia salina* nauplii를 충분히 공급하여 섭이시킨다. 이후 다음날 일출시간에 해당하는 오전 6~11시 경에 해당 소형 수조의 screen 격막은 제거하면 Lim *et al.* (2012)이 보고한 바와 같은 산란행위를 관찰할 수 있어 정확한 수정시간 파악과 아울러 산란행위 마감 후 해산송사리 암컷 총배설강에 부착된 해산송사리 수정란을 인위적으로 수거할 수 있다. 그러나 Lim *et al.* (2012)의 방법에 의한 해산송사리에서의 정확한 수정시간 파악이 가능한 유도 자연산란 수정법은 발생과 연관된 실험에는 매우 유용은 하나, 그 실험의 성공률 즉, 각 소형수조별 자연산란 및 수정 성공률에 있어 선택 암·수 친어의 성숙도, 실험시의 각 소형수조 환경 및 짝짓기 구애(courtship)와 추격(chasing) 적절성 문제 등으로 인하여 완벽하지는 못하다는 단점이 있다.

따라서 본 연구는 해산송사리에서 실험동물화 특히, 염색체공학 연구시 이러한 불완전한 자연산란법을 개선하고자 하는 차원에서 기존의 자연산란법을 보완한 산란유도 호르몬에 의한 인공수정법을 개발하고자 하였다. 적정 시간에 인공수정이 가능할 수 있는 해산송사리 인공수정법을 개발하기 위하여 산란유도 호르몬인 잉어(*Cyprinus carpio*) 뇌하수체(carp pituitary extract; CPE)와 HCG를 사용하여 유도 자연산란법에 의해 수정이 이루어지지 않은 성숙 암·수 해산송사리를 대상으로, 각 산란유도 호르몬 농도에 대한 수컷의 정자활성도, 생식소중량지수, 수정란의 생존율 및 수정란의 기형률을 조사하였으며 아울러 수정란의 부화율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

2019년 1월 18일에 100마리의 해산송사리(*O. dancena*)를 무작위로 선택하여 한국해양대학교 수산유전육종학 연구실에서 사육하였다. 사육수조는 공기 공급과 수온 조절( $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ )이 되는 400 L 용량의 순환여과 유리수조



**Fig. 1.** Process of artificial fertilization by human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) in marine medaka, *Oryzias dancena*. White scale bars in Fig. 1D and 1E are 1 cm.

였으며, 사육수로는 탈염소화시킨 담수와 해수를 혼합하여 Refractometer (OxyGuard International, Handy Polaris, Denmark)로 염분 농도  $3.0 \pm 0.1$  ppt를 유지하였다. 광주기는 16/8 hrs (주/야)로 설정하였다. 100마리의 성어 해산송사리로부터 11개월 사육하여 10,000마리의 성어를 획득하였다.

2019년 11월 19일에 Vernier caliper (Mitytoyo CD-20CP, Japan)와 전자저울 (Shimazu, Type AX200, Japan)로 친어 수컷군 ( $n=50$ , 평균 체장  $29.4 \pm 3.21$  mm, 평균 체중

$312.8 \pm 57.38$  mg)과 친어 암컷군 ( $n=50$ , 평균 체장  $28.2 \pm 2.85$  mm, 평균 체중  $305.3 \pm 60.12$  mg)을 무작위로 각각 선별하였다. 선별한 각 군은 30L 용량의 유리 수조에 수용 후 3일간 사육하였으며 사육수의 30% 정도를 매일 환수하였다. 사육시 저녁에 부화기에서 막 부화된 brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii (Inve, Inve premium, Salt Lake city, USA)를 충분히 공급하였으며, 시판 artificial diet (Inve, NRD 3/5, Salt Lake city, USA)를 보충 영양으로 아울러 공급하였다.

## 2. 인간용모성생식선자극 호르몬과 잉어 뇌하수체 처리

실험 기간인 30일 동안 2마리의 암컷과 6마리의 수컷을 각각 10개의 암·수를 격리 수용할 수 있게 장치된 유리수조에 수용 후 매일 아침 산란행위를 관찰하였다. Lim *et al.* (2012)의 기준에 의거 친어의 산란과 사정이 완료됨을 확인 후 친어를 분리하여 암컷에서는 생식공에 부착된 수정란을 제거하였다. 산란행위를 보이는 수컷 친어에 1분 이내에 Fig. 1A와 같이 HCG (Sigma, MO, USA)를 50, 100, 150 및 200 IU kg<sup>-1</sup> BW (body weight), 그리고 잉어 뇌하수체 (Sigma, MO, USA)를 5, 10, 15 및 20 mg L<sup>-1</sup>로 성숙 수컷 친어들에게 각각 복강주사 하였으며 대조군을 아울러 설정하였다.

## 3. 정자 운동성 및 정자활성도 조사

주사 24시간 후 수컷 친어로 부터 정소를 적출하였다 (Fig. 1C). 수컷 친어인 경우 적출된 정소의 각 호르몬 처리에 대한 생식소 중량지수 (gonadosomatic index; GSI)를 계산하였다. 친어 수컷 정소는 적출 후 세척하여 여과하였으며, 여과된 정자는 생물현미경 (CH120, Olympus, Japan)으로 각 호르몬에 대한 정자 운동성 (sperm motility) 및 그 지수인 4단계의 정자활성도 (spermatozoa activity index; SAI)를 조사하였다.

## 4. 산란율, 생존율, 기형률 및 부화율 조사

산란행위를 보이는 성숙 암컷 친어는 산란행위 보임 1분 이내에 100 IU kg<sup>-1</sup> BW의 HCG를 복강주사하였으며 복강주사 24시간 후에 난소를 적출 (Fig. 1B)하였다. 적출 난소에 사용된 암컷은 10마리였다. Fig. 1D에서와 같이 난소로부터 분리된 미수정란은 phosphate buffered saline으로 정소를 세정과 동시에 인공수정시켰다. 수정란은 부화용기에서 부화시키면서 (Fig. 1E) 수정 후 3일에 생존율, 수정 후 7일에 기형률 및 부화율을 조사하였다.

Table 3에서와 같이 각 호르몬 처리에 대한 성숙 암컷 친어의 수정 후 1일에서의 산란율, 수정 후 3일의 난 생존율 및 수정 후 7일의 기형률을 조사하였으며, Fig. 2에서와 같이 부화율을 조사하였다. 각 호르몬 처리에 대한 성숙 암컷 친어로 부터의 채란 (Fig. 1B) 즉시, 수정 (Fig. 1D) 및 수정란의 수용 (Fig. 1E)은 성숙 수컷 친어에 대한 각 호르몬 처리 방법과 동일하게 하였다. 이때 대조군을 설정하였으

**Table 1.** Numerical index for the evaluation of sperm motility in this experiment

Spermatozoa activity index <sup>1)</sup>	Score	Motility characteristics
I	3	Sperm display forward movement rapidly
II	2	Sperm display forward movement slowly
III	1	Sperm display vibrating movement moderately
IV	0	Immobile sperm

<sup>1)</sup>Sperm activity index=(score×% motile sperm)/100 (After Strüssmann *et al.* 1994).

며, 성숙 암컷 친어에 HCG를 50, 100, 150 및 200 IU kg<sup>-1</sup> BW 그리고 잉어 뇌하수체는 5, 10, 15 및 20 mg L<sup>-1</sup>로 Fig. 1A에서와 같이 성숙 암컷 친어에 각각 복강주사하였다.

## 5. 통계처리

해산송사리 성숙 암·수 친어에 대한 HCG와 잉어 뇌하수체의 산란유도 효과를 파악하기 위해 결과 자료를 유의성  $p < 0.05$  수준에서 one-way analysis of variance (ANOVA)를 SPSS 통계 package (SPSS 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 실시하였으며, Duncan's multiple range test (Duncan 1955)로 multiple comparison을 실시하였다. 본 연구의 수행된 모든 실험들은 3반복으로 수행하였다.

## 결 과

해산송사리 (*O. dancena*) 수컷 친어에 산란유도 호르몬인 HCG와 잉어 뇌하수체 주사시 정자활성도, 생식소중량지수, 수정 후 3일에서의 수정란 생존율 및 수정 후 7일에서의 수정란 기형률 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 나타난 바와 같이 정자활성도와 수정 후 3일에서의 수정란 생존에 있어 유의한 차이를 보이지 않는 50, 150 및 200 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군에 비하여 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW (body weight) 처리군은 정자활성도  $1.6 \pm 0.29$ , 수정 후 3일에서의 수정란 생존율  $98 \pm 4.0$ 으로 유의하게 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 아울러 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군은 대조군과는 정자활성도와 수정 후 3일에서의 생존율에 있어 유사하였다 ( $p > 0.05$ ). 반면, 생식소중량지수에서는 대조군을 비롯한 모든 HCG 처리군들이 유의한 차이를 보

**Table 2.** Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) on spawning in male marine medaka, *Oryzias dancena*<sup>1)</sup>

Exp. group	Dose of Injection <sup>2)</sup>	SAI <sup>3)</sup>	GSI (%) <sup>3)</sup>	Survival rate of egg (%) <sup>4)</sup>	Abnormal rate of egg (%) <sup>5)</sup>
Control	-	1.5±0.06 <sup>a</sup>	0.1±0.02 <sup>a</sup>	97±3.7 <sup>a</sup>	0
HCG	50	0.8±0.28 <sup>b</sup>	0.3±0.05 <sup>a</sup>	88±4.2 <sup>b</sup>	0.9±0.21 <sup>a</sup>
	100	1.6±0.29 <sup>a</sup>	1.5±0.04 <sup>a</sup>	98±4.0 <sup>a</sup>	1.2±0.54 <sup>a</sup>
	150	0.9±0.25 <sup>b</sup>	0.8±0.07 <sup>a</sup>	87±4.1 <sup>b</sup>	1.4±0.88 <sup>a</sup>
	200	1.0±0.27 <sup>b</sup>	0.7±0.08 <sup>a</sup>	88±3.8 <sup>b</sup>	0.9±0.34 <sup>a</sup>
CPE	5	1.6±0.43 <sup>a</sup>	1.5±0.03 <sup>a</sup>	85±3.9 <sup>a</sup>	1.0±0.61 <sup>a</sup>
	10	1.1±0.51 <sup>b</sup>	1.0±0.05 <sup>b</sup>	81±3.1 <sup>b</sup>	1.1±0.46 <sup>a</sup>
	15	1.0±0.48 <sup>b</sup>	1.0±0.06 <sup>b</sup>	80±3.6 <sup>b</sup>	1.3±0.64 <sup>a</sup>
	20	1.2±0.44 <sup>b</sup>	1.1±0.08 <sup>b</sup>	82±3.3 <sup>b</sup>	1.2±0.71 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>All samples on each group were injected HCG and CPE at just 1 min after sexual behavior showed, and the spawning times in each group were 24 hrs after injection. Sperm was obtained from testis of one male sample. Female marine medaka was injected 100 IU kg<sup>-1</sup> BW (body weight) of HCG at just 1 min after sexual behavior showed, and eggs were obtained from ovary of ten female samples at 24 hrs after injection. Each values (means of triplicate ± SD) having the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup>Dose of HCG and CPE were IU kg<sup>-1</sup> BW (HCG) and mg L<sup>-1</sup> (CPE), respectively.

<sup>3)</sup>Sperm Activity Index (SAI) = (score × % motile sperm)/100 (shown in Table 1); Gonadosomatic Index (GSI) = (weight of testis/total body weight) × 100.

<sup>4)</sup>Survival rate of egg were analyzed at 3 days after fertilization. Samples of each group were used 200 spawned eggs in this experiment. Survival rate of egg = [(total number of survived egg)/(total number of spawned egg)] × 100.

<sup>5)</sup>Abnormal rate of egg were analyzed at 7 days after fertilization. Abnormal rate of egg = [(total number of abnormal egg)/(total number of survived egg)] × 100.

**Table 3.** Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) on spawning in female marine medaka, *Oryzias dancena*<sup>1)</sup>

Exp. group	Dose of injection <sup>2)</sup>	Success rate of spawn (%) <sup>3)</sup>	Total number of spawn egg	Survival rate of egg (%) <sup>4)</sup>	Abnormal rate of egg (%) <sup>5)</sup>
Control	-	48±1.2 <sup>a</sup>	24	98±3.7 <sup>a</sup>	0
HCG	50	28±2.3 <sup>a</sup>	49	97±1.2 <sup>a</sup>	1.0±0.21 <sup>a</sup>
	100	58±1.5 <sup>a</sup>	87	98±1.4 <sup>a</sup>	1.2±0.74 <sup>a</sup>
	150	53±1.1 <sup>a</sup>	78	87±3.9 <sup>b</sup>	1.4±0.41 <sup>a</sup>
	200	49±2.8 <sup>a</sup>	65	88±4.7 <sup>b</sup>	1.3±0.48 <sup>a</sup>
CPE	5	55±1.9 <sup>a</sup>	90	95±1.8 <sup>a</sup>	1.0±0.51 <sup>a</sup>
	10	50±1.5 <sup>b</sup>	76	91±2.0 <sup>b</sup>	1.1±0.66 <sup>a</sup>
	15	43±2.1 <sup>c</sup>	69	85±3.2 <sup>c</sup>	0.9±0.44 <sup>a</sup>
	20	40±2.7 <sup>c</sup>	59	87±3.6 <sup>c</sup>	1.1±0.50 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>All samples on each group were injected HCG and CPE at just 1 min after sexual behavior showed, and the spawning times in each group were 24 hrs after injection. Spawn eggs were obtained from ovary of ten female samples. Male marine medaka was injected 100 IU kg<sup>-1</sup> BW (body weight) of HCG at just 1 min after sexual behavior showed, and sperm was obtained from testis of one male sample at 24 hrs after injection. Each values (means of triplicate ± SD) having the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup>Dose of HCG and CPE were IU kg<sup>-1</sup> BW (HCG) and mg L<sup>-1</sup> (CPE), respectively.

<sup>3)</sup>Success rate of spawn = [(total number of spawned female)/(total number of female)] × 100.

<sup>4)</sup>Survival rate of egg were analyzed at 3 days after fertilization. Survival rate of egg = [(total number of survived egg)/(total number of spawned egg)] × 100.

<sup>5)</sup>Abnormal rate of egg were analyzed at 7 days after fertilization. Abnormal rate of egg = [(total number of abnormal egg)/(total number of survived egg)] × 100.

이지 않았다 ( $p > 0.05$ ). 수정 후 7일에서의 수정란 기형을 에 있어 HCG 처리군들은 서로간 유의한 차이가 없었으며 ( $p > 0.05$ ), 대조군에서는 수정 후 7일에 기형이 나타나지

않았다 (Table 2).

Table 2에서 나타난 바와 같이 잉어 뇌하수체 주사시 해 산송사리 수컷 친어에서의 정자활성도, 생식소중량지수,

수정 후 3일에서의 수정란 생존율 및 수정 후 7일에서의 수정란 기형률은 다음과 같다. 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup> 처리군과 대조군은 정자활성도, 생식소증량지수 및 수정 후 3일에서의 수정란 생존율에서 서로 유사하였으며, 이들은 서로간 유의한 차이를 보이지 않는 10, 15 및 20 mg L<sup>-1</sup> 처리군들에 비해 정자활성도, 생식소증량지수 및 수정 후 3일에서의 수정란 생존율에 있어 각각 1.6±0.43, 1.5±0.03, 85±3.9로 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.05$ ) (Table 2). 수정 후 7일에서의 수정란 기형률은 잉어 뇌하수체 처리군들 간에서 서로간 유의한 차이가 없었으며( $p > 0.05$ ), 대조군에서는 수정 후 7일에 수정란 기형이 나타나지 않았다 (Table 2).

해산송사리 암컷 친어에서의 산란유도 호르몬인 HCG와 잉어 뇌하수체 주사시 산란율, 수정 후 3일에서의 수정란의 생존율 및 수정 후 7일에서의 수정란 기형률 조사 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 나타난 바와 같이 HCG 처리시 대조군과 각 HCG 처리군들 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ). 수정 후 3일에서의 수정란 생존율은 대조군과 50, 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군들 간 유의한 차이가 없었으며, 50, 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군들의 수정 후 3일에서의 수정란 생존율은 서로간 유의한 차이를 보이지 않는 150, 200 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군들의 생존율에 비하여 각각 97±1.2, 98±1.4로서 유의한 높은 수치를 보였다( $p < 0.05$ ). 수정 후 7일에서의 수정란 기형률은 모든 HCG 처리군들은 서로간 유의하게 차이가 없는 반면( $p > 0.05$ ), 대조군에서는 수정란 기형이 나타나지 않았다.

Table 3에서 나타난 바와 같이 잉어 뇌하수체 주사시 산란율에 있어서 대조군과 모든 잉어 뇌하수체 처리군들 간에는 서로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 수정 후 3일에서의 수정란 생존율은 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup> 처리군과 대조군, 잉어 뇌하수체 15 mg L<sup>-1</sup> 처리군과 잉어 뇌하수체 20 mg L<sup>-1</sup> 처리군에서 서로간 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 수정 후 3일에서의 수정란의 높은 생존율 순은 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup> 처리군과 대조군, 잉어 뇌하수체 10 mg L<sup>-1</sup> 처리군, 잉어 뇌하수체 15 mg L<sup>-1</sup> 처리군과 잉어 뇌하수체 20 mg L<sup>-1</sup> 처리군이었다( $p < 0.05$ ). 수정 후 7일에서의 수정란 기형률은 모든 잉어 뇌하수체 처리군들은 서로간 유의하게 차이가 없는 반면( $p > 0.05$ ), 대조군에서는 기형이 나타나지 않았다.

Fig. 2에서 나타나듯이 부화시의 부화율에 있어 대조

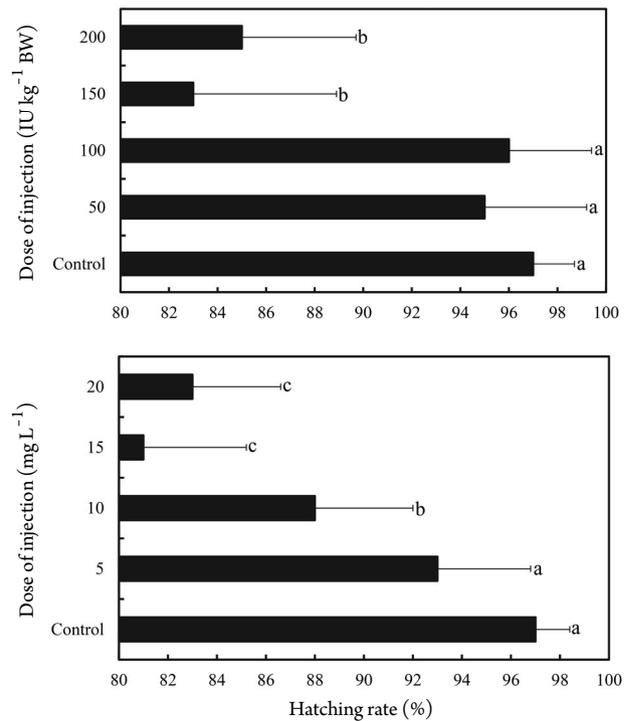


Fig. 2. Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) and carp pituitary extract (CPE) on the hatching rate of eggs in marine medaka, *Oryzias dancena*. The spawning times in each group were 24 hrs after injection. Each value (means of triplicate ± SD) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

군과 50, 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군들은 유사하였으며 서로간 유의한 차이를 보이지 않는 150과 200 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW 처리군들에 비하여 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). Fig. 2에서 나타나듯이 부화시의 부화율에 있어 대조군과 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup> 처리군 서로간, 그리고 잉어 뇌하수체 15, 20 mg L<sup>-1</sup> 처리군 서로간 부화시의 부화율에 있어 각각 서로 유사하였다( $p > 0.05$ ). 부화시의 높은 부화율은 대조군과 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup> 처리군, 잉어 뇌하수체 10 mg L<sup>-1</sup> 처리군, 잉어 뇌하수체 15, 20 mg L<sup>-1</sup> 처리군 순으로 나타났다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

## 고찰

호르몬에 의한 산란유도란 암컷에서는 난자의 배포 (germinal vesicle) 이동과 붕괴를 포함하는 성숙유도 및 배란을 그리고 수컷에서는 배정을 촉진하는 것이다 (Yamamoto *et al.* 1966; Donaldson and Hunter 1983; Park

2002; Goo *et al.* 2015a). 본 연구 결과, 해산송사리 (*O. dancena*)의 산란율, 수정란 생존율 및 부화율에 있어 HCG의 결과가 잉어 뇌하수체의 결과와 비교시 높다는 것은 해산송사리 산란유도에 있어 HCG가 잉어 뇌하수체에 비해 효과적임을 나타낸다. 뇌하수체 호르몬에 의한 산란유도는 여러 어종에 걸쳐 광범위하게 시도되고는 있으나, 뇌하수체 공여체 어류의 성, 연령, 공여시기, 성숙도 및 뇌하수체 종 특이성으로 인해 수여체 어류에서 뇌하수체의 역가가 다양하게 나타나는 단점도 있다(Park *et al.* 1994; Goo *et al.* 2015a).

산란유도 호르몬 중 HCG는 비교적 값이 싸고 표준화가 가능하다는 점 등으로 인해 인공산란유도시 많이 사용되고 있으며, 유효 농도는 낮게는 어체중(body weight; BW) kg 당 100 IU에서 높게는 10,000 IU로 나타나고 있다(Goo *et al.* 2015a). 예전의 연구 결과들과 비교시, 해산송사리가 예전 여타의 연구 실험어류에 비하여 그 크기가 비교적 작음은 물론, 그 산란유도 효과가 HCG 농도 100 IU kg<sup>-1</sup> BW로 예전 연구 실험어류의 산란유도 요구량 HCG 보다 비교적 낮았다(Park 2002; Goo *et al.* 2015a). 해산송사리에서의 HCG의 이러한 산란유도 효과는 해산어류인 송어 (*Mugil cephalus*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 및 복섬 (*Takifugu niphobles*)에서 보고되었으며 담수어류인 미꾸라지 (*Misgurnus anguillicaudatus*), 초어 (*Ctenopharyngodon idellus*) 및 Indian carp (*Labeo rohita*)에서도 보고된 바 있다(Kuo *et al.* 1973; Suzuki 1983; Park *et al.* 1994; Gil *et al.* 2017). 본 연구에서의 해산송사리 수컷 친어에서의 HCG에 의한 배정효과는 금붕어 (*Carassius auratus*), 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*), seabream (*Sparus aurata*), milkfish (*Chanos chanos*), European eel (*Anguilla anguilla*), Japanese eel (*A. japonica*) 및 복섬인 경우 100~10,000 IU kg<sup>-1</sup> BW로 처리시 효과적인 배정효과를 보이고 있다(Donaldson and Hunter 1983; Park *et al.* 1992; Goo *et al.* 2015a).

Kim *et al.* (1992)이 미꾸라지 (*M. mizolepis*)를 대상으로 HCG에 의한 산란유도 효과를 조사한 바, HCG는 특정 농도에서 난질 향상을 보여 미꾸라지 어체중 kg 당 2,000 IU HCG 주사시 수정률이 94%까지 증가하였고 4,000 IU HCG 주사시 수정란의 부화율이 73.6%로 여타 농도에 비하여 20% 높은 부화율을 나타내었다. 이러한 경향은 본 연구에서도 나타나 해산송사리를 대상으로 100 IU HCG kg<sup>-1</sup> BW 주사시 여타 농도에 비하여, 암컷은 높은 수정 후 3일의 수정란 생존율과 수컷은 높은 정자활성도와 높

은 수정 후 3일의 수정란 생존율을 보이고 있다. 잉어 뇌하수체도 마찬가지로 특정 농도에서 산란유도 효과가 높아, 잉어 뇌하수체 5 mg L<sup>-1</sup>인 경우 여타 농도에 비하여 암컷에서는 높은 산란율과 수정 후 3일에서의 높은 생존율을 보이고 수컷에서는 높은 정자활성도, 높은 생식소중량지수 및 수정 후 3일에서의 높은 생존율을 보여주고 있다. 자어의 기형률은 HCG와 잉어 뇌하수체 모두 해산송사리에서 처리 농도와 관계없이 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았는 바, 이는 아마도 해산송사리에서의 사용 산란유도 호르몬의 비교적 낮은 처리 농도에 기인되지 않았나 사료된다. 산란유도 호르몬 처리시의 자어 기형률에 있어서의 본 연구 결과와는 상반되게, black sea bass (*Centropristis striata*)를 대상으로 HCG 처리에 의한 인공산란 유도시 HCG 처리 농도가 증가할수록 수정란의 기형률이 증가한다고 보고된 바 있다(Cerdà *et al.* 1997).

비록, 본 연구 수행시 실험에 사용된 모든 해산송사리 암·수 친어는 성숙 생식소 적출시의 개복으로 인하여 모두 죽었지만, 산란행위를 보이며 유도 자연산란이 이루어지지 않은 성숙 친어들로부터는 정자와 난자를 획득하여 인공수정이 가능하였다. Lim *et al.* (2012)이 언급하였듯이 해산송사리는 산란기 일정 기간에 걸쳐 연속적으로 매일 산란이 가능하며, 통상 본 한국해양대학교 수산유전육종학연구실 조건에서 오전 6시에서부터 오전 11시 경에 걸쳐 유도 산란행위를 보이고 있다. 본 연구 결과 도출된 산란유도 호르몬 처리에 의한 해산송사리에서의 인공산란과 인공배정 유도와 이에 따르는 인공수정 기법은 기존의 유도 자연산란법이 수동적이고 다소 불편한 방법임을 고려시 편리하고, 손쉬운 적극적인 방법이 될 수 있을 것이라 사료되며 차후, 본 연구 결과는 해산송사리 종묘생산, 염색체공학(발생공학) 실험 및 실험동물로서의 관련 연구시 유용하게 사용될 수 있을 것이라 예견된다.

## 적 요

해산송사리 (*Oryzias dancena*)를 대상으로 한 발생공학 연구시, 현재의 자연산란법은 매우 수동적이고 불편하다. 본 연구에서는 적정 시간에 해산송사리의 수정란을 획득하고자 인공산란을 위한 인간용모성생식선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin; HCG)과 잉어 뇌하수체(carp pituitary extract; CPE)의 최적 농도를 조사하

였다. 정자활성도, 산란율, 수정 후 3일에서의 수정란 생존율 및 부화율은 100 HCG IU kg<sup>-1</sup> BW (body weight)와 CPE 5 mg L<sup>-1</sup>에서 가장 높았다( $p < 0.05$ ). 본 종에서의 수정란 필요시, HCG와 잉어 뇌하수체 주사를 통하여 적정 시간에 미수정란과 정자를 획득할 수 있었다. 본 연구 결과는 해산송사리의 실험동물화 개발에 유용하리라 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2020년 부산산업과학혁신원의 「대학 R&D 씨앗기회 사업」 지원에 의해 수행되었습니다. 본 논문의 수정시 건설적이고 도움되는 논평을 주신 익명의 심사자들에게 감사드립니다. 아울러 본 논문의 실험시 수고하신 한국해양대학교 수산유전육종학연구실의 실원들께도 감사드립니다. 본 연구는 교육부의 연구윤리 확보를 위한 지침(교육부 훈령 제153호)과 식품의약품 안전처의 실험동물에 관한 법률(법률 제1527호) 기준을 준수하였으며, 아울러 한국해양대학교 연구윤리를 준수하였습니다.

## REFERENCES

- Abraham D. 2011. "*Oryzias dancena*": The IUCN Red List of Threatened Species. eT172326A6868382. International Union for Conservation of Nature. Gand, Switzerland.
- Cerdà J, K Selman, SM Hsiao and RA Wallace. 1997. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a Serranid teleost, *Centropomus striata*. *Aquaculture* 159:143-157.
- Cho YS, SY Lee, DS Kim and YK Nam. 2010. Tolerance capacity to salinity change in adult and larva of *Oryzias dancena*, a euryhaline medaka. *Korean J. Ichthyol.* 22:9-16.
- Donaldson EM and GA Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. pp. 351-403. In: *Fish Physiology*, Vol. IXB (Hoar WS, DJ Randall and EM Donaldson eds.). Academic Press, New York.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1-42.
- Gil HW, TH Lee and IS Park. 2017. Induction of artificial spawning by human chorionic gonadotropin in the grass puffer, *Takifugu niphobles*. *J. Fish. Mar. Sci. Educ.* 29:409-414.
- Goo IB, IS Park, HW Gil and JH Im. 2015a. Stimulation of spermiation by human chorionic gonadotropin and carp pituitary extract in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *Dev. Reprod.* 19:253-258.
- Goo IB, JH Im, HW Gil, SG Lim and IS Park. 2015b. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*. *Dev. Reprod.* 19:127-134.
- Houssay BA. 1930. Action sexuel de la hypophysie en los perces by reptiles. *Rev. Soc. Arhent. Biol.* 6:686-688.
- Im JH, HW Gill, TH Lee, HJ Kong, CM Ahn, BS Kim, DS Kim, CI Zhang and IS Park. 2016. Morphometric characteristics and fin dimorphism between male and female on the marine medaka, *Oryzias dancena*. *Dev. Reprod.* 20:331-347.
- Inoue K and Y Takei. 2003. Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 136:635-645.
- Kang CK, SC Tsai, TH Lee and PP Hwang. 2008. Differential expression of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of two medaka species (*Oryzias latipes*) and (*Oryzias dancena*), with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* 151:566-576.
- Kim DS, JH Kim and IS Park. 1992. Induced and multiple spawnings by human chorionic gonadotropin injection of the loach, *Misgurnus mizolepis* (Teleostomi: Cobitidae). *J. Aquacult.* 5:109-115.
- Kuo CM, ZH Shehader and CE Nash. 1973. Induced spawning of captive gray mullet (*Mugil cephalus*) females by injection of human chorionic gonadotropin. *Aquaculture* 1:429-432.
- Lam TJ. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:111-137.
- Lim SG, HK Han, KS Kim, BS Kim, HM Baek, IS Park and HW Gil. 2012. Observations on the reproductive behavior of the marine medaka, *Oryzias dancena*. *Korean J. Ichthyol.* 24:220-226.
- Park IS. 2002. Induction of ovulation by HCG, LHRHa and carp pituitary in *Rhynchocypris oxycephalus* (Sauvage and Dabry). *Asian Fish. Sci.* 15:387-393.
- Park IS. 2019. A comparative analysis of cell cycles in diploid and induced triploid tissues in marine medaka (*Oryzias dancena*). *Korean J. Environ. Biol.* 37:735-740.
- Park IS. 2020. Comparative analysis of sectioned-body morphometric characteristics of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. *Korean J. Environ. Biol.* 38:137-145.
- Park IS and CY Choi. 2018. Occurrence of amitosis-like nuclear division in erythrocytes of induced triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus* and marine medaka, *Oryzias dancena*. *J. Fish. Mar. Sci. Educ.* 30:1519-1527.

- Park IS and HW Gil. 2018. Comparative analysis of fluctuating asymmetry between ploidy and sex in marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 22:275–281.
- Park IS and HW Gil. 2020. Temperature-salinity dependence of the mitotic interval ( $\tau_0$ ) for chromosomal manipulation in marine medaka, *Oryzias dancena*. Biomed. J. Sci. Tech. Res. 26:19685–19690.
- Park IS, HB Kim, HJ Choi, YD Lee and HW Kang. 1994. Artificial induction of spawning by human chorionic gonadotropin (HCG) or carp pituitary extract (CPE) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquacult. 7:89–96.
- Park IS, HB Kim, HJ Choi, YD Lee and JK Son. 1992. Stimulation of spermiation by human chorionic gonadotropin (HCG) in mature flatfish, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Mar. Res. Inst. 16:75–82.
- Park IS, HW Gil and DS Kim. 2018. Morphometric characteristics of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 22:183–192.
- Park IS, HW Gil, TH Lee, YK Nam and DS Kim. 2016a. Comparative study of growth and gonad maturation in diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 20:305–314.
- Park IS, HW Gil, TH Lee, YK Nam, MG Ko and DS Kim. 2016b. Cytogenetic study of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J. Ichthyol. 28:215–222.
- Park IS, SJ Park, HW Gil, YK Nam and DS Kim. 2011. Anesthetic effects of clove oil and lidocaine-HCl on marine medaka, *Oryzias dancena*. Lab Anim. 40:45–51.
- Strüssmann CA, P Renard, H Ling and F Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish. Sci. 60:9–13.
- Suzuki R. 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture 31:233–243.
- 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.