



태반성 성선 자극 호르몬 처리에 의한 복섬, *Takifugu niphobles*의 인공 산란유도

길현우*·이태호**·박인석†
(*한국해양대학교 · **부경대학교)

Induction of Artificial Spawning by Human Chorionic Gonadotropin in the Grass Puffer, *Takifugu niphobles*

Hyun Woo GIL* · Tae Ho LEE** · In-Seok PARK†
(*Korea Maritime and Ocean University · **Pukyong National University)

Abstract

Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation and spawning of the grass puffer, *Takifugu niphobles*, were investigated. Matured females spawned successfully by all doses of HCG. Spawning usually occurred 24 hours after hormone injection. Body weight of adult, gonadosomatic index (GSI), pseudo-GSI, body weight of spawned egg, success rate of spawn, fertilization rate, hatching rate, and survival rate of juvenile were correlated with increasing HCG doses. However, abnormal rate of juvenile was not correlated with increasing HCG doses. These results should be useful for developing aquaculture program of grass puffer.

Key words : Artificial spawning, Grass puffer, Human chorionic gonadotropin, Ovulation, *Takifugu niphobles*

I. 서론

복섬(*Takifugu niphobles*)은 복어목, 참복과에 속하며, 우리나라의 동해, 서해와 남해, 일본 중부 이남, 중국 이남 및 대만 등지에 분포한다(Oh et al., 2000; Kato et al., 2010). 우리나라 연안 해역에 서식하는 참복과에 속하는 어류는 주로 강하구 및 연안역에 서식하고, 산란기에는 내만의 조간대에 몰려와 바위 틈새에 알을 낳는 특성을 가지며, 특히 복섬은 이들 복어류 중 가장 작은 어종에 속한다(Oh et al., 2000; Kato et al., 2010). 복섬의 외형은 줄복(*T. pardalis*)과 비슷하나 등쪽과 배 부분에 잔가시가 있고 암녹색 바탕에 연한

흰색의 작은 반점들이 많이 흩어져 있으며, 배쪽은 흰색이다(Kim et al., 2007).

어류 양식에서 우량 종묘의 안정적인 공급은 사육 어종의 전 생활사 조절을 통하여 가능하며 특히 자연산란이 어려운 종의 종묘 생산에 있어서는 다양한 인공 성숙 및 산란 방법을 통해 유도할 수 있다(Kim et al., 1992). 호르몬에 의한 산란 유도란 암컷에서는 난황의 축적 및 배포(germinal vesicle) 이동과 붕괴를 포함하는 성숙 유도 및 배란을, 그리고 수컷에서는 배정을 촉진하는 것이다. 어류에서의 산란 유도는 Houssay (1931)에 의해 최초로 산란을 유도한 이래 현재 까지 사용 되어오고 있다(Donaldson and Hunter,

† Corresponding author : 051-410-4321; ispark@kmou.ac.kr

1983). 뇌하수체 호르몬에 의한 산란 유도는 여러 어중에 걸쳐 광범위하게 사용되고 있으나, 뇌하수체 공여체 어류의 성, 연령, 공여 시기, 성숙도 및 뇌하수체 종 특이성으로 인해 수여체 어류에서 뇌하수체의 역가가 다양하게 나타나는 단점도 있다(Kim et al., 1992; Park et al., 1994).

산란 유도 호르몬 중 태반성 성선 자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, HCG)은 비교적 값이 싸고 표준화가 가능하다는 점 등으로 인해 인공 산란유도시 많이 사용되고 있으며, 유효 농도는 낮게는 어체중 g당 0.1 IU에서 높게는 10,000 IU로 나타나고 있다(Goo et al., 2015). 복섬의 HCG에 의한 산란 유도에 관한 연구로는 수컷 복섬을 대상으로 산란기에 어체중 g당 500~2,000 IU HCG 주사 후 경과시간에 따른 배정 효과 조사가 이루어진 바 있다(Goo et al., 2015).

따라서, 본 연구에서는 HCG 처리에 의한 복섬의 인공 산란 효과 조사 및 유도를 위하여, HCG 처리 농도에 따른 체중 증가 효과 등의 어체 변화 그리고 난의 성공률, 부화율 및 자어의 기형율 등의 조사를 실시하여 인공 산란 유도 효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

복섬(*Takifugu niphobles*)은 2016년 6월에 낚시와 통발로 채집한 후, 연구실로 이동하여 사육·관리하였다. 채집시 복섬의 평균 체장 및 평균 체중은 12±1.3 cm 및 13.7±1.76 g 이었다. 수송 후 실험시까지 15일 동안 사육했으며 사육시 사육수조의 평균 수온(2016년 6월: 25±0.5℃)으로 유지하였으며, 용존산소는 7.0 ml/L 이상, pH는 6.8~7.6으로 유지하였다. 실험 시작시까지 먹이로 낚시용 미끼로 쓰이는 냉동 새우를 공급하였다.

복섬 종묘의 대량 생산을 위한 연구 일환으로 human chorionic gonadotropin (HCG, Sigma, USA)를 암수 친어에 처리하여 인공 산란을 유도하였

다. 정자의 질이 가장 우수하고 수가 많은 정액을 채정하기 위해 Goo et al. (2015)의 연구 결과에 따라 수컷 친어 5마리에 HCG를 1,000 IU의 농도로 복강 주사하여 24시간 후에 채정하였다. 암컷 친어 20마리에 HCG를 500, 1,000, 1,500 및 2,000 IU의 농도로 복강 주사하였다. HCG 주사 후 24시간에 복부압법으로 채란하였으며 연관된 체중, 생식소중량지수(gonadosomatic index, GSI), 위생식소중량지수(pseudo-gonadosomatic index), 간중량지수(hepatosomatic index, HSI), 비만도(condition factor)를 파악하였다.

각 실험군당 채란한 난의 난질을 조사하기 위해 채란한 난 중 2 g을 채취한 다음, 채정한 정액을 습식으로 혼합하여 수정하였다. 수정한 난은 그물망에 넣어 세척한 뒤 2 L 비커에 수용하였다. 수정 1일 후에 수정율을 조사하였고 수정 후 8일에 모든 수정란이 부화하였으며 부화 후 1일에 자어의 생존률을 조사하였다. 부화 후 5일에 자어의 기형율 및 생존률을 재차 조사하였다.

각 측정항목에 대하여 유의성 검증을 위해 one-way ANOVA test를 실시하였으며, P-value를 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

HCG에 의한 복섬(*Takifugu niphobles*)의 인공 산란 유도시 복섬의 체중, GSI, Pseudo-GSI, HSI 및 비만도의 결과는 <Table 1>과 같다. HCG의 농도가 증가함에 따라 체중이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 2,000 IU 처리군이 다른 처리군에 비해 가장 높은 체중을 기록하였다 ($P<0.05$). 아울러, GSI 및 비만도도 HCG 처리 농도가 높을수록 증가하는 경향이 나타났다 ($P<0.05$). Pseudo-GSI는 위생식소중량지수로 불리며 GSI와 같이 어류의 산란행태를 가능하는데 사용된다. Pseudo-GSI는 어류의 500 IU 처리군이

<Table 1> Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on gonadosomatic index (GSI), pseudo-GSI, hepatosomatic index (HSI) and condition factor in female grass puffer, *Takifugu niphobles**¹

	Dose (IU/kg BW)	Body weight (mg)	GSI (%) ^{*2}	Pseudo-GSI (%) ^{*3}	HSI (%) ^{*4}	Condition factor (%) ^{*5}
Control (before Injection)		34.5±2.16 ^a	8±1.2 ^a	-	18±1.7 ^a	10±0.2 ^a
Exp. group	500	35.8±3.54 ^a	13±1.0 ^b	10±2.3 ^a	17±1.2 ^a	10±0.5 ^a
	1,000	36.4±1.45 ^a	14±1.8 ^b	15±1.5 ^b	18±1.4 ^a	12±0.7 ^b
	1,500	36.1±1.87 ^a	16±1.7 ^c	15±1.1 ^b	17±1.5 ^a	14±0.4 ^c
	2,000	37.5±3.19 ^b	18±1.9 ^c	15±2.8 ^b	18±1.7 ^a	13±0.8 ^c

*¹All samples on each group were injected HCG and spawned within 48 hours after injection. Sperm was obtained from testis of one male sample. Each value is means ± SD of triplicate experiment (n=20). Values in same row having the different superscripts are significantly different (P<0.05).

*²Gonadosomatic Index (GSI) = (weight of testis/total body weight) × 100.

*³Pseudo-GSI= (weight of fish before injection/weight of fish before injection) × 100.

*⁴Hepatosomatic Index (HSI) = (weight of liver/total body weight) × 100.

*⁵Condition factor = (body weight/total length³) × 100.

1,000, 1,500 및 2,000 IU 처리군 보다 유의하게 낮게 나타났으며 HSI는 모든 처리군이 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다(P>0.05).

HCG에 의한 이러한 체중 증가 효과는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 및 문치가자미(*Limanda yokohamae*)에서 나타난 바 있다(Hirose et al., 1979). 넙치에서는 HCG 주사 후 2일에 5.6%의 체중 증가 효과가 나타났으며(Park et al., 1994), 문치가자미의 경우, HCG를 2번에 걸쳐 주사한 결과 산란시에 7.9~13.0%의 체중 증가를 보였으며 GSI도 역시 증가하였다(Hirose et al., 1979). 은어(*Plecoglossus altivelis*)에서도 이러한 체중 증가 현상이 나타났으며, 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)의 경우 첫 산란 후 HCG 처리시 처리 후 12일에 비만도가 180에서 210으로 증가하였고 GSI도 HCG 처리 후 39일에 GSI가 2에서 10으로 증가하였다(Hirose et al., 1977; Kim et al., 1992).

HCG 처리 전·후의 pseudo-GSI 변화를 조사한 여타 연구가 없어 비교를 할 수가 없었으나, HCG 처리로 인해 성숙한 난의 수가 증가한 사실은 본 연구를 통해 알 수가 있다.

인공산란 유도시 복섬의 산란 성공률, 산란한 난의 무게, 수정율, 부화율 및 자어의 초기 생존률의 결과는 <Table 2>와 같다. 1,000 IU 처리군이 50마리 중 44마리가 산란에 성공하여 산란 성공률이 87±2.1%로 대조군 및 다른 처리군에 비해 40~60% 높게 나타났다(P<0.05). 산란한 난의 무게도 1,000 IU 처리군에서 11±2.4 g으로 모든 실험군 중 가장 높게 나타났다(P<0.05). 아울러, 1,000 IU 처리군의 난의 수정율, 부화율 및 자어의 초기 생존률도 각각 93±3.5% 및 84±2.1% 및 79±3.7%로, 대조군 및 다른 처리군에 비해 유의하게 높은 경향이 나타났다(P<0.05).

<Table 2> Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on spawning in female grass puffer, *Takifugu niphobles**¹

Exp. group	Dose (IU/kg BW)	Success rate of spawn (%) ^{*2}	Number of spawned egg/g BW	Fertilization rate (%) ^{*3}	Survival rate (%) ^{*4}	Hatching rate (%) ^{*5}
Control (before Injection)	-	4/20, (21±3.3 ^a)	6±1.5 ^a	71±3.4 ^a	52±1.2 ^a	77±1.7 ^b
Exp. group	500	6/20, (28±2.8 ^b)	8±2.3 ^b	77±2.1 ^b	66±3.2 ^c	78±1.2 ^b
	1,000	17/20, (88±1.5 ^d)	11±2.1 ^c	92±3.2 ^d	80±4.4 ^d	85±1.4 ^c
	1,500	9/20, (43±2.1 ^c)	7±1.8 ^a	86±2.7 ^c	64±5.9 ^c	72±1.5 ^a
	2,000	8/20, (40±4.8 ^c)	6±2.6 ^a	79±1.9 ^b	58±3.7 ^b	71±1.7 ^a

*¹Each values are the means±SE of triplicated groups (n=20). Means in rows with the different superscript letter are significantly different (P<0.05).

*²Success rate of spawn = [(total number of spawned female)/(total number of injected female)] × 100.

*³Fertilization rate confirmed 1 days after hatched.

*⁴Survival rate of each group was analyzed at 1day after hatched (n=100). Survival rate=[(number of survived larvi at 1 day after hatched)/(number of hatched larvi)] × 100.

*⁵Hatching rate of each group was analyzed at 144 hours after fertilized (n=600). Hatching rate=[(number of hatched larvi)/(number of eyed eggs)] × 100.

본 실험에서의 HCG 특정 농도에서 복섬 암컷의 산란 성공률과 수정란의 수정율 및 부화율과 같은 난질의 향상 효과는 HCG 처리에 의한 복섬 수컷의 배정 효과 연구에서도 유사하게 나타난 바 있다(Goo et al., 2015). 복섬 수컷에 1,000 IU HCG 농도로 처리한 후 24시간에 정액의 생산량이 어체중 kg당 100 mL로, 대조군 및 여타 처리군에 비해 50 mL 이상 높게 생산하였다(Goo et al., 2015). 아울러, 미꾸라지에서도 HCG의 특정 농도에서의 난질 향상이 나타나고 있어, 미꾸라지에 어체중 g당 2 IU 주사시 수정율이 94%로 증가하였고, 4 IU 주사시 수정란의 부화율이 73.6%로 여타 농도에 비해 20% 높게 나타났다(Kim et al., 1992). 그 외에 미꾸리(*M. anguillicaudatus*), 초어(*Ctenopharyngodon idella*) 및 Indian carp (*Labeo rohita*)와 해산어류인 gray mullet (*Mugil cephalus*)에서도 HCG가 인공 산란 유도에 매우 효과적임이 보고된 바 있다(Kuo et

al., 1973; Carreon et al., 1976; Suzuki, 1983; Park et al., 1994).

Park et al. (1994)의 연구에서는 HCG 처리에 의한 체중 증가 현상을 HCG 처리에 의한 생식소의 수화로 인해 난경의 증가가 원인이라고 보고하였다. 본 연구에서는 HCG 농도가 증가함에 따라 수정란의 무게가 증가하였는데, 이는 앞서 서술한 HCG에 의한 복섬의 체중 증가 효과의 가장 정확한 원인으로 사료된다.

인공 산란 유도시 복섬 자어의 생존률과 기형율의 결과는 <Table 3>과 같다.

1,000 IU 처리군의 자어 생존률은 74±3.6%로 대조군 및 다른 처리군에 비해 10~20% 높게 나타났으나(P<0.05), 기형율은 대조군 및 다른 처리군과 유의한 차이가 나타나지 않았다(P>0.05). 대조군을 비롯한 모든 실험군에서 [Fig. 1-A]와 같이 척추 만곡이 심한 기형 자어가 관찰되었다.

<Table 3> Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) abnormal rate and survival rate of juvenile grass puffer, *Takifugu niphobles**¹

Exp. group	Dose (IU/kg BW)	Abnormal rate of juvenile (%) ^{*2}	Survival rate of juvenile (%) ^{*3}
Control (before Injection)	-	2.3±0.27 ^a	64±3.4 ^c
Exp. group	500	2.6±0.23 ^b	59±2.6 ^b
	1,000	2.1±0.11 ^a	73±3.8 ^d
	1,500	2.3±0.32 ^a	54±3.1 ^a
	2,000	2.8±0.36 ^b	52±2.8 ^a

*¹Each values are the means±SE of triplicated groups (n=20). Means in rows with the different superscript letter are significantly different (P<0.05).

*²Abnormal rate of juvenile=[(number of abnormal larvi at 5 days after hatched)/(number of hatched larvi)] × 100.

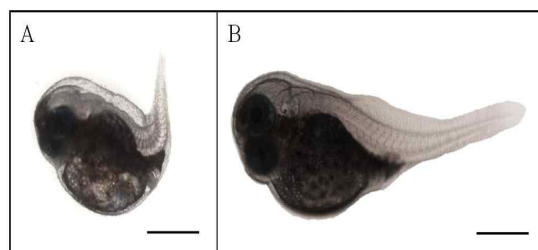
*³Survival rate of juvenile groups was analyzed at 5 days after hatched (n=100). Survival rate of juvenile=[(number of survived larvi at 5 days after hatched)/(number of survived larvi at 1 day after hatched)] × 100.

HCG의 특정 농도에서 자어의 생존율 증가 현상은 pinfish (*Lagodon rhomboides*)의 인공 산란 실험에서도 유사하게 나타난 바, Dimaggio et al. (2013)은 pinfish에 1,000 IU HCG 농도 주사로 인공 산란유도시, 부화 자어의 생존율이 50%로서 500, 2,000 및 4,000 IU 처리군 보다 25% 높게 나타났다고 보고한 바 있다(Dimaggio et al., 2013).

자어의 기형율은 HCG 처리 농도와 관계없이 모든 실험군에서 유의한 차이가 나타나지 않았는 바, 여타 연구 결과와 비교시 본 연구 결과와 다른 경향이 나타났다. 즉, HCG 처리에 의한 black sea bass (*Centropristis striata*)의 인공 산란유도 실험에서는 HCG 처리 농도가 증가할수록 수정란의 기형률이 증가한다고 보고한 바 있다(Cerdà et al., 1997).

산란유도시 효과적인 HCG 농도는 미꾸리과 은어에서는 어체중 g당 약 10~12.5 IU, 미꾸라지는 어체중 g당 4~10 IU에서 76~100%의 산란율을 나타낸바 있다(Hirose et al., 1977; Kim et al., 1992; Park et al., 1994). 본 연구 결과를 토대로 복섬의 인공 산란 유도시 효과적인 HCG 농도는

어체중 g당 1,000 IU로 나타났으며 여타 어종에 비해 비교적 높은 HCG 농도가 요구되었다.



[Fig. 1] External morphology of juvenile in grass puffer, *Takifugu niphobles*. (A): abnormal juvenile; (B): normal juvenile. Bars indicate 20 μ m.

감사의 글

본 논문을 세심하게 지적·교람하여, 본 논문의 질을 향상 시켜준 익명의 심사자님들께 감사드립니다. 본 연구는 현행법(실험동물에 관한 법률, 식품의약품안전처 시행령)과 한국해양대학교의 연구윤리수칙을 준수하였습니다.

References

- Carreon, J. A. · Estocapio, F. A. & Enderez, F. M.(1976). Recommended procedures for induced spawning and fingerling production of *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture* 8(3), 269~281.
- Cerdà, J. · Selman, K. · Hsiao, S. -M. & Wallace, R. A.(1997). Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a Serranid teleost, *Centropristis striata*. *Aquaculture* 159(1), 143~157.
- Dimaggio, M. A. · Broach, J. S. & Ohs, C. L.(2013). Evaluation of ovaprim and human chorionic gonadotropin doses on spawning induction and egg and larval quality of pinfish, *Lagodon rhomboides*. *Aquaculture* 414(15), 9~18.
- Donaldson, E. M. & Hunter, G. A.(1983). Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds), *Fish Physiology*, Vol, IXB, Academic Press, New York, 351~403.
- Goo, I. B. · Park, I.-S. · Gil, H. W. & Im, J. H. (2015). Stimulation of spermiation by human chorionic gonadotropin and carp pituitary extract in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *Dev. Reprod.* 19(4), 253~258.
- Hirose, K. · Ishida, P. & Sakai, K.(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. Fisher.* 43(4), 409~416.
- Hirose, K. · Machida, Y. & Donaldson, E. M.(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. Fisher.* 45, 31~36.
- Houssay, B. A.(1931). Action sexuelle de l'hypophyse sur les poissons et les reptiles. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 106, 377~378.
- Kato, A. · Maeno, Y. & Hirose, S.(2010). Brief migration of the grass puffer, *Takifugu niphobles*. *Ichthyol. Res.* 57(3), 298~304.
- Kim, D. S. · Kim, J. H. & Park, I.-S.(1992). Induced and multiple spawnings by human chorionic gonadotropin injection of the loach, *Misgurnus mizolepis* (Teleostomi; Cobitidae). *Korean J. Ichthyol.* 5(2), 109~115.
- Kim, J. H. · Son, K. T. · Mok, J. S. · Oh, E. K. · Hwang, H. J. · Yu, H. S. & Lee, H. J.(2007). Toxicity of the puffer fish, *Takifugu pardalis* (Jolbok) and *T. niphobles* (Bokseom) from coastal area of Korea. *Korean J. Fisher. Aquat. Sci.* 40(5), 269~275.
- Kuo, C. M. · Shehader, Z. H. & Nash, C. E.(1973). Induced spawning of captive gray mullet (*Mugil cephalus*) females by injection of human chorionic gonadotropin. *Aquaculture* 1(4), 429~432.
- Oh, S. H. · Han, K. H. · Kim, Y. M. · Jung, H. H. · Shin, S. S. & Kim, Y. U.(2000). Spawning behavior and early life history of grass puffer, *Takifugu niphobles* (Jordan et Snyder) (Teleostei : Tetraodontidae). *Korean J. Ichthyol.* 12(4), 236~243.
- Park, I.-S. · Kim, H. B. · Choi, H. J. · Lee, Y. D. & Kang, H. W.(1994). Artificial induction of spawning by human chorionic gonadotropin (HCG) or carp pituitary extract (CPE) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.*, 7(2), 89~96.
- Ryu, C. H. · Kim, D. G. · Kim, J. H. · Jang, J. H. & Lee, J. S.(2003). Toxicity of the grass puffer, *Takifugu niphobles*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutri.* 32(7), 986~990.
- Suzuki, R.(1983). Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 31(2), 233~243.

-
- Received : 10 January, 2016
 - Revised : 13 February, 2017
 - Accepted : 17 February, 2017