



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

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

濟州大學校 産業大學院

海洋生物工學科

田 持 旻

2022 年 8 月



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

指導教授 呂寅圭

田持旻

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2022 年 8 月

田持旻의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이영돈

委員 정준범

委員 여인규



濟州大學校 産業大學院

2022 年 8 月



Effect of the gonadotropin-releasing hormone
(GnRH) on induction of maturation in
White-spotted bamboo shark
(*Chiloscyllium plagiosum*)

Jin-Min Jeon
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2022. 8.

This thesis has been examined and approved.

Department of Marine Life Sciences

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

| | |
|---|-----|
| 목 차 | i |
| List of Figure | iii |
| List of Table | v |
| Abstract | vi |
| I. 서론 | 1 |
| II. 재료 및 방법 | |
| 1. 실험동물 및 사육조건 | 3 |
| 1-1. 실험동물 | 3 |
| 1-2 사육조건 | 3 |
| 2. GnRH 투여 | 4 |
| 3. 혈장 호르몬 분석 방법 | 5 |
| 4. 교미 유도 관찰 및 산란 후 난 관찰 | 6 |
| 4-1 교미 유도 관찰 | 6 |
| 4-2 산란 후 난 관찰 | 6 |
| 5. 통계처리 | 7 |
| III. 결과 | |
| 1. 백점얼룩상어(<i>Chiloscyllium plagiosum</i>)의 성호르몬 수치 변화 | 8 |
| 1-1. 백점얼룩상어 수컷의 testosterone 변화 | 8 |
| 1-2. 백점얼룩상어 암컷의 progesterone 및 estradiol 변화 | 8 |
| 2. 백점얼룩상어의 혈액 생화학적 분석 | 9 |
| 2-1. AST 및 ALT의 변화 | 9 |
| 2-2. PHOS 및 GLU 변화 | 11 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2-3. TP 및 Ca^{2+} 변화 | 13 |
| 3. 교미 및 산란 유도 | 15 |
| 4. 산란된 난의 형태 관찰 | 18 |
| IV. 고찰 | 21 |
| V. 참고 문헌 | 24 |
| VI. 감사의 글 | 28 |

List of Figure

Figure 1. Analysis of aspartate amino transaminase levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

Figure 2. Analysis of alanine amino transaminase levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

Figure 3. Analysis of phosphorus levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

Figure 4. Analysis of glucose levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

Figure 5. Analysis of total protein levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values

($P < 0.05$).

Figure 6. Analysis of Ca^{2+} levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

Figure 7. The Clasper of *C. plagiosum*. male after copulation.

Figure 8. The scars on fin of *C. plagiosum*. female after mating.

Figure. 9. The shape of inactivated eggs of *C. plagiosum*.

Figure. 10. Active and inactive eggs laid after mating.

Figure. 11. Spawned eggs attached to pvc pipe.

Figure. 12. The measurement of size of egg in *C. plagiosum*.

Figure 13. The change in the morphology eggs of *C. plagiosum*.

List of Table

Table 1. Hormone concentrations of *C. plagiosum*. prior to GnRH administration and after to GnRH injection.

Abstract

Shark populations are constantly decreasing owing to environmental destruction and overfishing; thus, sharks are now at a risk of extinction, with 30.5% of shark species classified as endangered on the International Union for Conservation of Nature's Red List. Sharks are apex predators and a keystone species in balancing the marine food chain; their extinction will create an imbalance of the entire marine ecosystem. Assisted reproductive technology is the last resort for protecting animals facing severe 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*. At a 24 h interval for female *Chiloscyllium plagiosum*, and 0.2 ml/kg + 0.2 mL/kg at were optimal dose protocols. These doses effectively induced the maturation and ovulation of oocytes and the release. Our results confirm that GnRH is a suitable tool for shark hormone-induced artificial insemination and indicate that this method may enable the conservation of the endangered shark species.

I. 서론

지금까지 많은 양식 어종을 대상으로 어류 성 성숙을 위한 연구가 진행되어 왔다. 최근에는 종 복원연구를 위해서도 성 성숙 유도법이 사용되고 있다(Kim *et al.*, 2012). 특히 어류의 성 성숙 유도 방법으로는 광주기 및 수온 등의 자연 사육 환경의 변화를 이용한 방법과 성 호르몬 투여를 통한 방법이 주를 이루고 있다(Kim *et al.*, 2021).

지구온난화로 인해 해양생물상의 변화가 초래되어 과거에 많이 어획되었던 명태는 자취를 감추고 새로운 아열대 어종이 한반도 연근해에서 어획되는 등 생태계의 큰 변화가 나타나고 있다. 아울러 바다의 오염으로 인한 생태계 파괴와 무분별한 남획은 가뜰이나 부족한 해양자원을 더욱 황폐화시키고 있다(Ju and Kim, 2008). 따라서 성 성숙 유도 및 멸종위기종의 복원을 위한 인공증식 기술은 매우 중요하다(환경부, 2006, 2009 and 2011; 국토해양부, 2010).

현재까지 수온과 광주기 변화를 이용한 성 성숙 유도 연구에서 사용된 대표적인 어류로는 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*), 대서양 넙치(*Hippoglossus hippoglossus*) 등이 있다. 이외에도 다양한 어종들이 수온과 광주기에 영향을 받아 성 성숙이 유도되는 것으로 보고되고 있다(Ham, 2010; Jonassen, 2000; Kim *et al.*, 2021).

어류의 성 성숙 유도 및 산란의 생리적 특성은 뇌의 시상하부에서 분비하는 생식선 자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)은 시상하부에서 방출되어 뇌하수체 전엽에서 생식샘 자극 호르몬을 분비하도록 유도하여 성호르몬 분비를 유발하므로 어류에 성 성숙 유도를 위한 호르몬제로 사용되고 있다(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(Ko, 2017; No and Yoon, 2019). 반면 연골어류에 관한 연구는 상대적으로 연구가 부족한 실정이다.

현재까지 국내에서는 까치상어(*Triakis scyllium*)와 화이트팁리프샤크(*Carcharhinus longimanus*) 두 종에서만 연구가 진행되었다. 구체적으로 수컷 까치상어

(*riakis scyllium*)에서는 GnRH 0.2 ml/kg을 1회 투여, 암컷 화이트팁리프샤크 (*Carcharhinus longimanus*)에서는 24시간의 간격을 두고 GnRH 0.2 ml/kg의 용량을 2회 투여했을 때 수컷은 정액의 양이 많아지고 암컷은 난포의 크기가 증가하는 결과를 나타내어 암수 모두의 성 성숙이 유도되는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2020).

연골어류인 상어는 지난 4억 년 동안 여러 번의 대량 멸종을 겪은(Grogan and Lund, 2004) 정점 포식자로서 해양 생태계의 구조와 기능에서 핵심 역할을 수행한다(Compagno, 2001; Dill *et al.*, 2003; Baum and Worm 2009). 그러나 현재 환경 파괴 및 남획에 의해 그 개체 수가 지속적으로 줄어들고 있다. 현재 세계자연보전연맹(IUCN)의 red list에 의하면 30.5%의 상어 종이 멸종위기 종으로 분류되고 있다(IUCN, 2021)고 밝혔다. 특히 상어는 긴 임신 기간, 느린 성적 성숙, 작은 한배 새끼로 인해 번식 속도가 매우 느려 자연에서는 개체 수 복원이 어려운 실정이다. 만약 해양 먹이사슬의 균형 유지에 큰 역할을 하는 상어가 멸종될 경우 해당 수역의 생태계에 불균형이 초래되므로, 멸종 위기에 처한 상어종의 자원회복을 위한 노력은 인류를 포함한 자연 생태계의 보전에 매우 중요하다고 할 수 있다(Myers *et al.*, 2007; Ferretti *et al.*, 2010).

한편, 백점얼룩상어(*Chiloscyllium plagiosum*)는 대한민국 연안의 토종 어종으로 지정되어 있는 수염상어목 얼룩상어과에 속한다. 또한 얕은 바다의 바닥에 서식하는 저서성이며 한국·일본·타이완·동중국해·인도차이나·필리핀·싱가포르·스리랑카·인도·아라비아해·홍해 및 멜라네시아 등에 널리 분포하고 알을 낳는 난생상어이다. 2~3개월의 연간 산란주기 동안 6~7일마다 알을 낳는데 암컷은 산란기 동안 빈번하고 반복적인 짝짓기를 필요로 하지 않으며 난자샘에 저장된 정자를 사용하여 알을 수정할 수 있는 것으로 알려져 있다(Cornish *et al.*, 2007; Wyffels *et al.*, 2021). 그러나 현재 무분별한 해양 오염에 의한 서식지 파괴 등으로 백점얼룩상어(*Chiloscyllium plagiosum*)의 개체수가 급감하여 IUCN에 의해 준위협(Near Threatened under criteria)으로 분류되고 있다(IUCN, 2021). 이에 본 연구에서는 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 개체 보전을 위해 GnRH 호르몬을 이용한 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)에 투여한 성 성숙 유도 및 인공 수정 가능성에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육조건

1-1. 실험동물

실험동물로는 백점얼룩상어(*C.plagiosum*) 암컷과 수컷을 각각 사용하였다. 암수 각각 5마리씩 사용하였으며, 실험 전 신체 체장과 체중을 측정하였다. 평균 길이는 암컷 104.6 ± 3.2 cm, 수컷 100.8 ± 4.2 cm 평균 무게는 암컷 2 ± 87 kg, 수컷 1.57 ± 79 kg 이었다. 각 개체는 한화 아쿠아플라넷 제주에서 측양 중이던 개체로 평균 2~3년생 경이었다.

각 개체를 구분하기 위해 상어의 꼬리지느러미 부분에 Tag를 매달고, 수컷의 경우 M1-M5, 암컷의 경우 W1-W5로 지정하였다.

1-2. 사육조건

본 실험은 실험수조에 각각 암컷 수컷 각각 5마리씩 따로 수용하여 실시하였다. 실험수조는 3 ton 사각 FRP 사육조로 수조 중앙에 펜스를 설치하여 두 공간으로 분리한 다음 암수를 각각 입식하였다. 사육수는 제주 성산읍 고성리 연안에서 직접 빨아들여 수중펌프로 이용하여 물리적 화학적 여과를 하는 Sand filter로 여과하여 사용하였다. 이후 여과된 사육수는 수온 조절장치를 이용하여 $23 \pm 0^\circ\text{C}$ 의 수온을 유지하였다.

수질은 용존 산소 농도 (DO), 아질산염 (NO_2^-), 질산염 (NO_3^-), 암모니아 (NH_3^-), 수온, 염분 및 pH를 적어도 일주일에 한 번 측정하여 일정하게 유지되도록 하였다. 먹이는 하루 3회 고등어, 흰다리새우 및 오징어를 반복 급여 하였다. 또한 요오드와 비타민 결핍을 막는 영양제인 Mazuri Vita-Zu Shark/Ray II Tablet (Purina Mills LCC, Mazuri, United States)를 일주일에 한 번 손질된 사료에 삽입하여 경구 투여하여, 총 120일간 실험을 진행하였다.

2. GnRH 투여

실험동물인 백점얼룩상어 암컷 수컷 모두 GnRH 투여 및 혈액 샘플링 전 한 달의 순치 적응기간을 두었으며 대조구로 사용할 혈액을 채취한 뒤 1개월 후, GnRH (Ovaprim R, Sydel and Western, USA)를 kg 당, 0.2 ml 주사하였다. 암컷 수컷 모두 순치 후 2-phenoxyethanol을 80 ppm 의 농도로 마취 후 젖은 수건으로 눈과 아가미를 덮어 고정시킨 다음 1 ml 주사기로 복강 내 주사하였다. 또한 암컷은 수컷과 동일한 방법으로 GnRH를 1차 복강 주사하였으며, 1차 복강주사 후 24 시간 뒤에 2차 복강 주사하였다.

3. 혈장 내 호르몬 및 혈액 성분 분석 방법

수컷은 GnRH 1차 주사 후, 주사 시점 기준으로 36시간이 지난 후 혈액 샘플링을 실시하였으며, 암컷은 혈액 샘플링은 2차 복강 주사 후 24시간이 지난 시점에 실시하였다. 혈액은 꼬리 미부정맥에서 3 ml씩 채취하였으며, 채취한 혈액은 혈청 분리 튜브(SST)에 넣어 4℃, 3,000 rpm에서 원심분리기(GZ-0406, Gyrozen, KOREA)를 사용하여 7분간 원심 분리하였다. 이후 혈장을 분리하여 -50℃ 냉동고에 보관한 후 서울의과학연구소(한국병원, 제주, 대한민국)에 의뢰하여 estradiol, progesterone 및 testosterone 호르몬 분석을 실시하였다.

혈장을 이용한 혈액생화학적 분석은 VetTest Slide(VetTest™, IDEXX, USA)와 생화학분석기(VET TEST 8008, IDEXX, USA)를 이용하였다. 분석 항목으로는 Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), Total protein (TP) 및 Glucose (GLU), Phosphorus (PHOS)와 Calcium (Ca²⁺)을 대상으로 삼았다.

4. 교미 유도 및 산란 후 난 관찰

4-1 교미 및 산란 유도

호르몬 투여가 끝나고 혈액을 채취한 뒤 실험어가 마취에서 깨고 안정을 취할 때까지 약 5시간 동안 모니터링 하였다. 이후 호흡수 및 유영이 안정적으로 돌아오고 난 후 격리시켜 두었던 암, 수 상어를 한 FRP 사육조에 합사 시켰다. 또한 난생상어인 백점얼룩상어는 산란 시 알을 붙일 조형물이 필요하기에 인공 해조류와 구멍이 많은 다공질의 PVC 파이프 3개를 수조에 입식하였다.

백점얼룩상어는 야행성인 상어기 때문에 조도를 1,000 Lux 이하로 낮추어 주었으며, 먹이 공급 등의 필요한 시기를 제외하고는 불필요한 인원의 접근을 금하였다. 또한 수온을 27℃로 유지 시켜 교미 및 산란을 유도했다. 교미 및 산란은 50일 동안 유도했으며, 합사 4일 후부터 교미 행동을 암컷의 가슴지느러미 상태 확인과 수컷의 생식기 상태 확인을 통해 관찰하였다. 산란은 PVC 파이프의 알 부착 여부로 확인하였다.

4-2 산란 후 난 관찰

합사 4주 후 총 8개의 난을 획득하여 캘리퍼스(NA-530-300S, Bluebird, China)를 사용하여 난의 크기를 측정하였으며, 난황의 검경은 빛 투시 방법을 사용하여 검경하였다. 산란된 난은 수조에 생물이 없고 제주도 자연해수가 순환되고 있는 1 ton 수조에 설치된 PE (Polyethylene) 소재의 가두리 (60 cm x 60 cm) 에 입식한 뒤 순환수로부터 최대한 멀리 떨어트려 난과 접촉하는 표면과 수류의 저항을 최소화 하였다. 또한 난의 관찰은 하루 오전 1회, 오후 1회 총 2회로 육안과 빛 투시 검경방법을 사용하였으며 난황이 있는 난을 중심으로 28일간 관찰하였다.

5. 통계 처리

본 실험의 모든 결과는 SPSS version 24 (IBM, Genetricom, USA)을 활용하여 대응표본 검정 T-Test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

III. 결과

1. 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 성호르몬의 수치 변화

1-1. 백점얼룩상어 수컷의 testosterone 변화

백점얼룩상어 수컷의 혈중 호르몬 농도를 측정한 결과 대조구와 GnRH를 주사한 실험구에서 testosterone의 변화는 5.16 ± 1.68 ng/mL 에서 16.32 ± 2.29 ng/mL 로 유의적인 증가를 보였다(Table. 1).

1-2. 백점얼룩상어 암컷의 progesterone 및 estradiol 변화

백점얼룩상어 암컷의 혈중 호르몬 농도를 측정한 결과 대조구와 GnRH를 주사한 실험구에서 progesterone 및 estradiol 변화는 0.10 ± 0.03 ng/mL에서 0.31 ± 0.29 ng/mL, 0.332 ± 100.37 ng/mL에서 0.0616 ± 170.37 ng/mL로 수치는 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다 ($P>0.05$).

Table 1. Hormone concentrations of *C. plagiosum*. prior to GnRH administration and after to GnRH injection

| Sex | State | Hormone | Concentration (M ± SD) |
|-----------------|----------------|----------------------|---------------------------|
| male (n=5) | Control | Testosterone (ng/mL) | 5.16 ± 1.68 |
| | GnRH injection | Testosterone (ng/mL) | 16.32 ± 2.29 |
| Female (n=5) | Control | Progesterone (ng/mL) | 0.10 ± 0.03 |
| | | Estradiol (ng/mL) | 0.332 ± 100.37 |
| | GnRH injection | Progesterone (ng/mL) | 0.31 ± 0.29 |
| | | Estradiol (ng/mL) | $0.616.6 \pm 170.37$ |

2. 백점열룩상어의 혈액 생화학적 변화

2-1. AST 및 ALT의 변화

백점열룩상어에 GnRH 투여 후, 수컷의 AST는 대조구와 비교하였을 때, 17 ± 8.0 U/L에서 33 ± 8.4 U/L로 유의적인 증가를 나타내었다. 반면, 암컷은 7.8 ± 6.8 U/L에서 14 ± 6.5 U/L로 유의적인 증가를 나타내지 않았다(Fig. 1). 다음으로 ALT는 수컷 및 암컷 모두 대조구와 비교하였을 때, 수컷은 20.8 ± 4.6 U/L에서 25.2 ± 8.4 U/L, 암컷은 17.2 ± 6.8 U/L 에서 20.4 ± 2.3 U/L 으로 수치는 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

이러한 결과로 수컷과 암컷 모두 GnRH 투여가 백점열룩상어의 간 손상에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

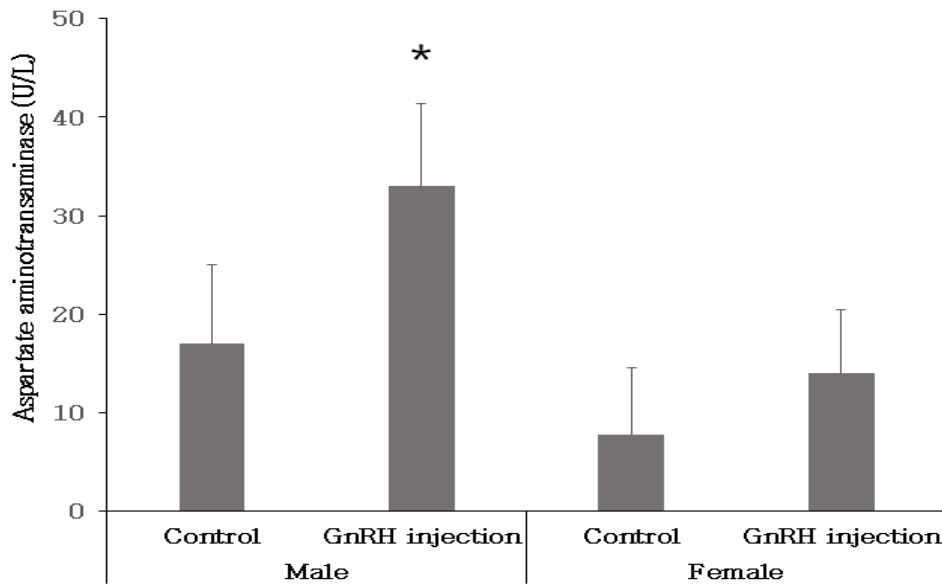


Figure 1. Analysis of aspartate amino transaminase levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

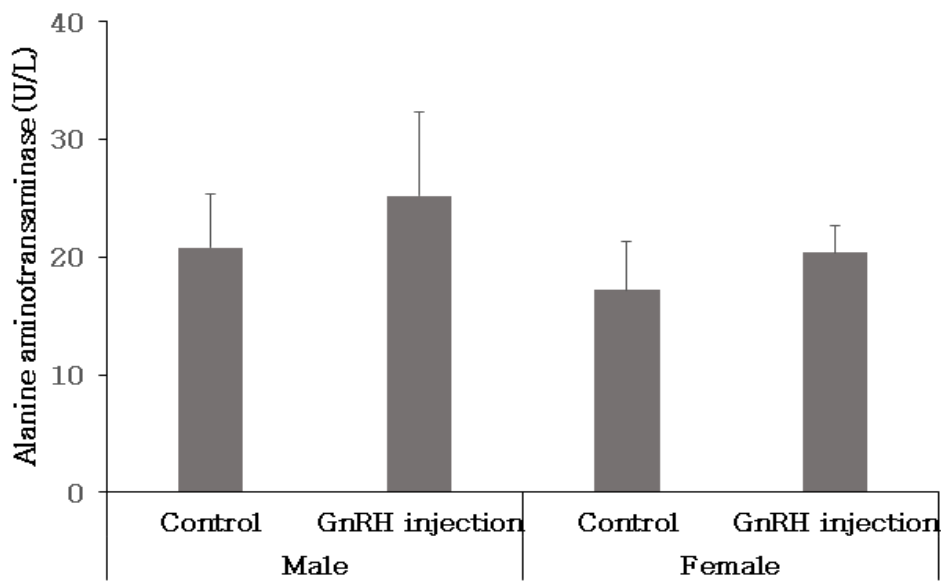


Figure 2. Analysis of alanine amino transaminase levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

2-2. PHOS 및 GLU 변화

백점얼룩상어 수컷 및 암컷에 GnRH 투여 후, 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 보이지는 않았다(Fig. 3).

백점얼룩상어 수컷 및 암컷에 GnRH 투여 후, GLU는 대조구와 비교하였을 때 수컷은 42.2 ± 6.57 mg/dL 에서 52.2 ± 8.52 mg/dL 및 암컷은 36 ± 1 mg/dL 에서 38 ± 1 mg/dL 로 모두 증가하였으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 4).

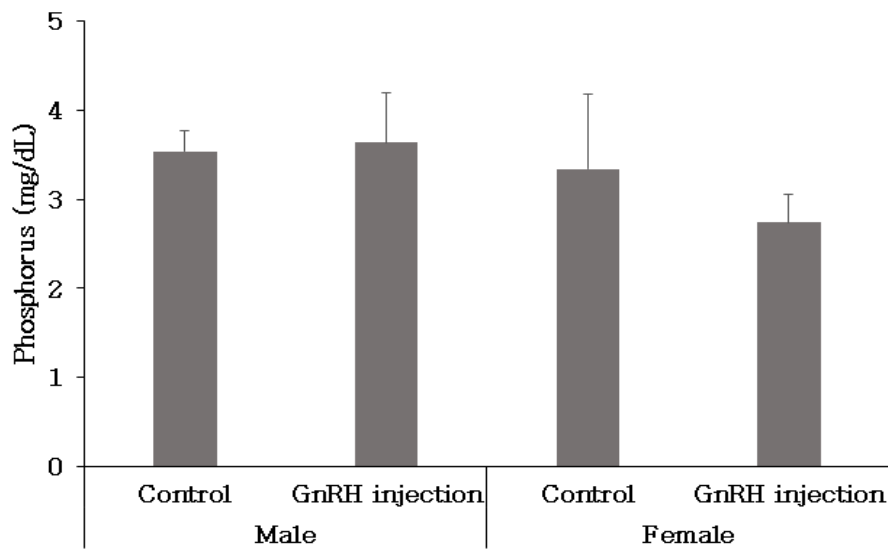


Figure 3. Analysis of phosphorus levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

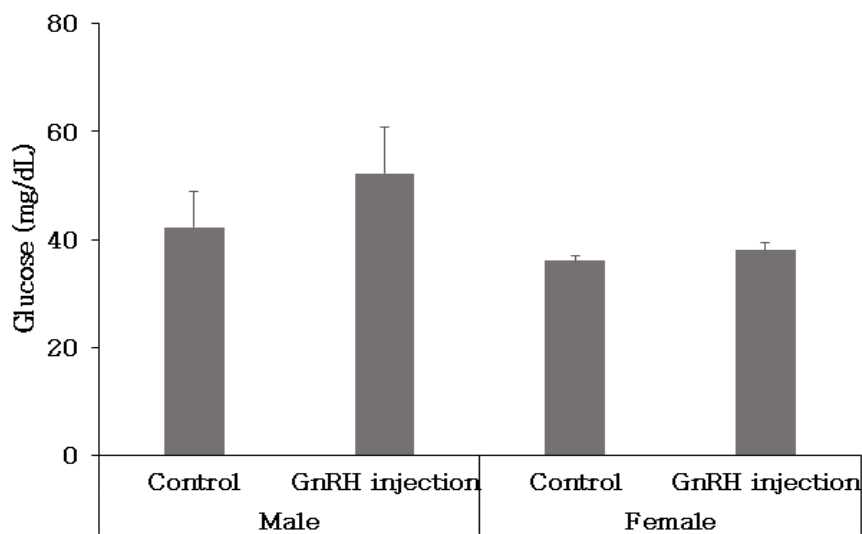


Figure 4. Analysis of glucose levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

2-3. TP 및 Ca^{2+} 변화

백점얼룩상어 수컷 및 암컷의 TP 농도는 대조구 및 실험구 모두 약 3-4 g/dL 의 범위를 나타내며, 대조구와 실험구의 TP 농도는 큰 차이가 나타나지 않았으며, 실험구에서 수컷 및 암컷 모두 소량의 증가를 나타내었으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 5).

백점얼룩상어 수컷의 Ca^{2+} 농도는 대조구와 비교하였을 때 15.4 ± 0.58 mg/dL 에서 16.2 ± 0.44 mg/dL 로 유의성을 보이지 않았다. 반면, 암컷의 Ca^{2+} 농도는 15.3 ± 0.92 mg/dL 에서 16.4 ± 0.92 mg/dL 로 유의적으로 증가를 나타내었다(Fig. 6). 이러한 Ca^{2+} 농도의 상승은 일반적으로 난황형성기에 나타나는 것으로, 암컷의 성성숙 유도가 이루어져 난황 형성이 진행되는 것으로 추정된다.

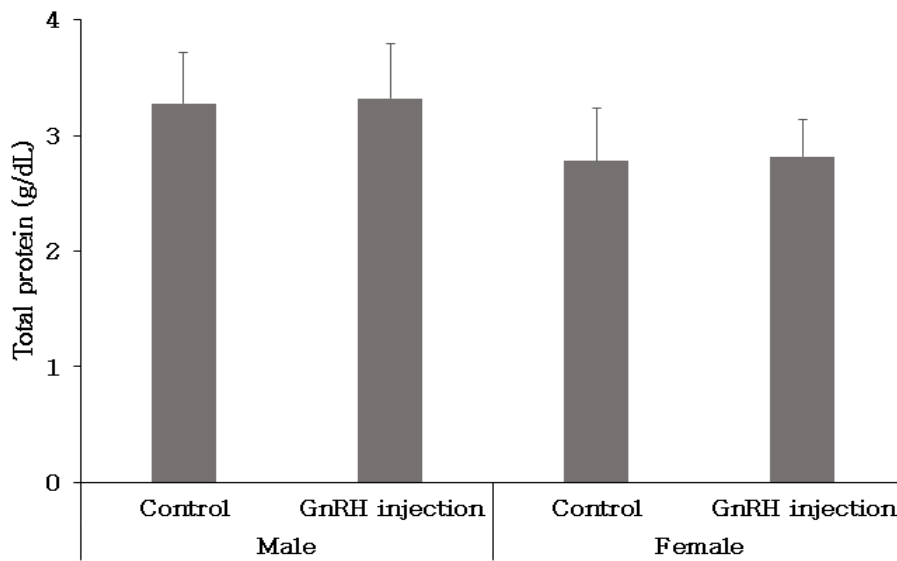


Figure 5. Analysis of total protein levels in serum of male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

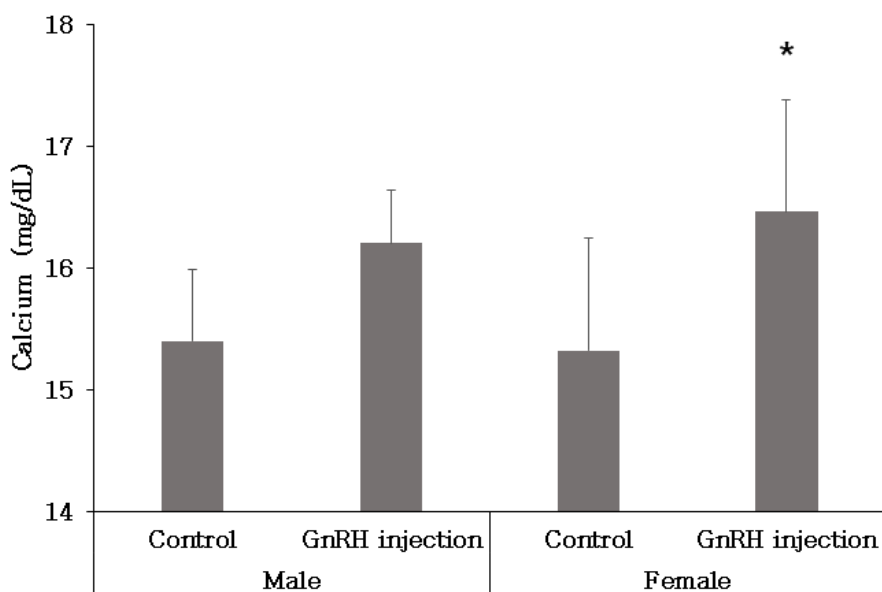


Figure 6. Analysis of Ca^{2+} levels in serum male and female of *C. plagiosum*. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters asterisk indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

3. 교미 및 산란 유도

백점얼룩상어의 수컷 및 암컷의 합사 3일 후 수컷 생식기에서 붉게 물들고 벗겨진 환부가 확인되었다(Fig. 7). 또한 암컷의 좌측 가슴지느러미에 이빨자국 및 붉게 충혈된 환부가 관찰되었다(Fig. 8). 이 상처는 수컷과 암컷이 교미를 했다는 교미흔으로 추정할 수 있으며, 이 결과 PVC 파이프에 난 5구를 획득하였으며, 이를 뒤 추가로 난 3구를 획득하여 총 8개의 난을 획득하였다. 그 중 2개의 난은 난황을 확인할 수 없는 미수정란으로 나타났다(Fig. 9).



Figure 7. The Clasper of *C. plagiosum*. male after copulation.



Figure 8. The scars on fin of *C. plagiosum*. female after mating.



Figure 9. The shape of inactivated eggs of *C. plagiosum*.

4. 산란된 난의 형태 관찰

합사를 통한 산란유도 4주 후, 산란된 난을 불빛을 이용하여 난황의 유무를 판단하였다(Fig. 10, 11). 또한 난 크기 측정 결과 난황이 없는 난은 평균 9.03 ± 0.31 cm, 난황이 있는 6개의 난은 평균 9.66 ± 0.31 cm로 크기가 유사한 것으로 나타났다(Fig. 12).

산란된 난 중 난황이 있는 6개의 난은 2주 후 부터 egg case가 손상되기 시작하여 난황의 형태가 동그랗지 않은 넓게 터진 듯한 형태를 나타내기 시작했다. 2주가 더 지난 시점에는 모든 난에 약취가 나기 시작하였으며 산란 4주 후 모두 사라 되었다(Fig. 13).

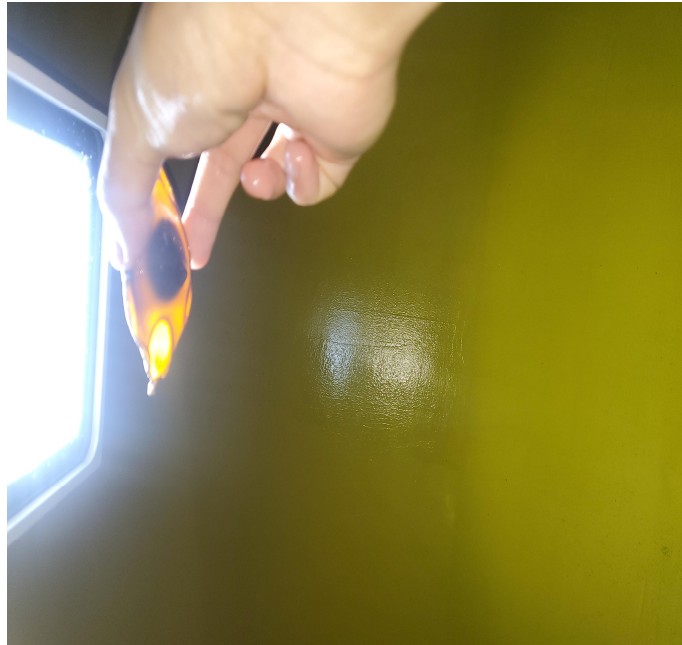


Figure. 10. Active and inactive eggs laid after mating.



Figure 11. Spawned eggs attached to pvc pipe.

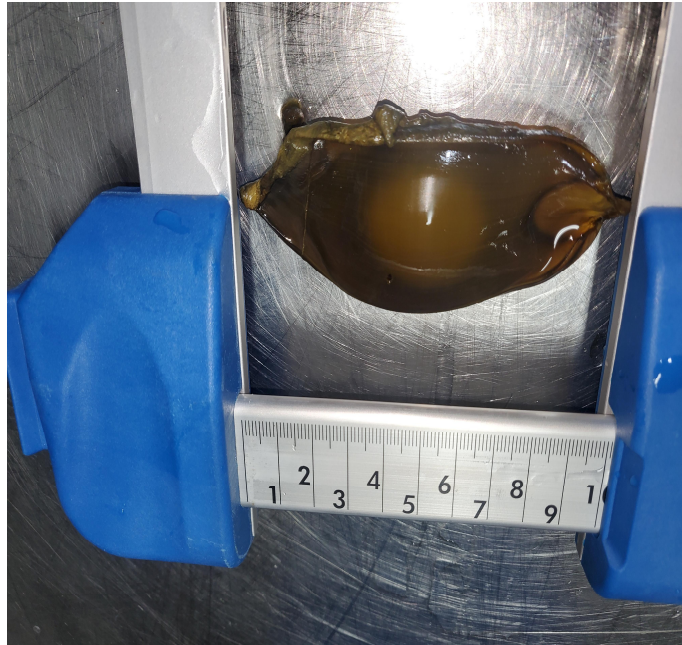


Figure 12. The measurement of size of egg in *C. plagiosum*.

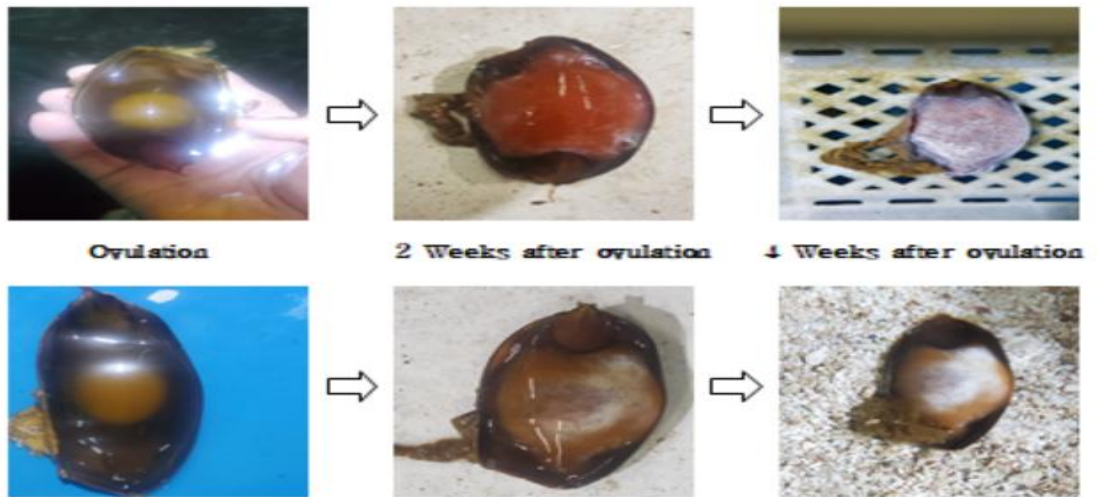


Figure 13. The change in the morphology eggs of *C. plagiosum*.

IV. 고찰

계절적으로 번식하는 상어는 자연적인 난소 및 난포의 성숙이 일 년 내내 점진적으로 모낭 직경의 증가와 함께 발생한다(Sulikowski et al., 2007; George et al., 2017). 특히 백점얼룩상어는 고수온 시기인 여름 가을 시점에 교미 및 산란이 활발하게 진행된다고 알려져 있다. 이에 본 연구는 야생의 산란시기와 비슷한 시기인 2021년 10월 초에 진행하였다.

본 연구에서는 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 수컷 및 암컷에 성 성숙 호르몬 중 하나인 gonadotropin releasing hormone(GnRH)을 인위적인 복강 투여로 성 호르몬 및 혈액 생리학적 변화, 교미 유도 및 배란 촉진을 관찰하였다.

백점얼룩상어 수컷의 testosterone 수치 변화는 대조구와 비교하였을 때, 유의적인 증가를 나타냈다(Fig. 1). 이는 2020년 한화 아쿠아플라넷에서 실시한 화이트팁리프샤크(*Carcharhinus longimanus*) 및 까치상어(*riakis scyllium*)에 대한 연구에서도 두 종의 수컷이 GnRH의 투여 후 testosterone 수치 증가를 나타낸 것(Kim, 2020)과 일치하였다. 따라서 GnRH의 투여는 백점얼룩상어 수컷의 성 성숙에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

반면 암컷은 progesterone 및 estradiol의 수치 변화에 있어 대조구와 비교하였을 때, 수치는 증가하였지만 유의성은 보이지 않았다. 하지만 백점얼룩상어의 난의 채취로 인하여 두 가지의 호르몬이 증가하여 성공적인 성 성숙 유도가 이루어졌음을 알 수 있었다. 따라서 ovaprim은 백점얼룩상어 수컷 및 암컷 모두 성 호르몬을 증가시켜 시상하부로부터 생성되는 GnRH의 인위적인 투여로 인한 뇌하수체에서 Gth I 및 II가 성공적으로 생성되어 성 성숙 유도를 할 수 있는 것으로 판단되었다.

다음으로 백점얼룩상어는 혈액 생리학적 분석 결과를 통해 GnRH 투여 후, alanine amino transferase(ALT), aspartate amino transferase(AST), phosphorus(PHOS), Total protein(TP), glucose(GLU) 및 calcium(Ca²⁺) 변화를 관찰한 결과 전체적으로 증가함을 확인했다. 먼저 AST 및 ALT의 분석 결과 수컷에 있어 AST는 대조구와 비교하였을 때, 유의적인 증가를 보인 반면, 암컷 AST 및 수컷, 암컷의 ALT는 유의성을 보이지 않았다(Fig. 1, 2).

일반적으로 AST 및 ALT는 간을 비롯한 체내의 장기에 존재하는 아미노산 합성 효소로, 간세포 손상 또는 간 기능에 장애가 일어났을 경우 증가하는 것으로 알려져 있다(Rao et al., 1990). 따라서 이러한 결과는 GnRH의 투여로 인하여 수컷의 AST 증가로 간 손상 및 스트레스를 유발시킬 수 있을 것으로 생각되었으나 수컷에서 ALT는 유의성을 나타내지 않아 큰 영향은 나타내지 않으며, 암컷 또한 유의성을 나타내지 않아 간 손상 및 스트레스에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

다음으로 GnRH 복강 투여 후 백점얼룩상어의 수컷 및 암컷에 있어 PHOS 및 GLU는 유의성을 보이지 않았다(Fig 3, 4). 일반적으로 PHOS의 저장소는 어류 조직의 근육이다. 아울러 나이 든 어류보다 어린 어류에서 인 산출 비율이 높게 나타난다(Cowey, C. B, 1995). 또한 양식 해산어류들의 PHOS 농도 변화는 계절적인 영향이 크며, 양식 해산어류들의 PHOS 농도 변화는 계절적인 영향이 크다(Jeon 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 많이 받는다는 것으로 판단되어 진다.

간 손상이 발생하면 GLU의 수치가 높아진다고 보고되었다(Robertson et al., 1987). 하지만 본 실험 결과 백점얼룩상어에 GnRH 투여시 GLU의 분석 결과 GLU는 대조구와 비교하였을 때, 수컷 및 암컷 모두 유의성을 나타내지 않았다. 이에 GnRH의 주사는 백점얼룩상어 간 손상에 영향을 주지 않는다고 할 수 있다.

일반적으로 TP는 어류의 건강 진단이나 영양 상태, 질병 진단에 이용되고 있으며 정상적 경골어류의 경우 약 4-7 g/dL 농도 범위로 알려져 있다(Turner, 1937). 백점얼룩상어 혈액 TP 농도는 수컷 및 암컷 모두 약 3-4 g/dL 범위로 측정되었다. 또한 백점얼룩상어의 TP값은 공식적으로 발표된 수치가 없기에 이 값은 백점얼룩상어의 최초 TP값이라 할 수 있으나 이를 대조구와 비교하였을 때, 유의성은 보이지 않았으며(Fig. 5), 백점얼룩상어 암컷에 GnRH 투여로 인한 칼슘은 대조구와 비교하였을 때, 유의적인 증가를 나타냈다(Fig. 6).

일반적으로 Ca^{2+} 같은 2가 이온들은 생체 내에서 단백질 합성이 증가 되었을

때 혈중 Ca^{2+} 농도가 증가되며 성숙 시기 역시 농도가 증가한다(Waring et al., 1996). 따라서 본 실험에서 혈중 칼슘 농도가 증가한 것은 암컷에 있어 GnRH 주사로 인한 성 성숙에 관련되는 난황 단백질 합성과 같은 작용에 사용되기 위하여 증가된 것으로 판단된다.

본 연구 결과 GnRH 투여는 상어에서 인위적으로 난자의 성숙 및 배란을 유도하고 수컷과의 교미를 유도할 수 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로는 두 성별 모두에서 0.2ml/kg 용량이(Kim, Sang Wha, et al., 2020) 효과적으로 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 성 성숙을 도와준다는 것을 입증했다. 아울러 이는 호르몬 인공수정을 수행하기 위한 기본적인 조건들이 GnRH 투여를 통해 갖춰질 수 있음을 시사한다.

하지만 암컷 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 estradiol의 농도변화와 암컷 개체 간의 estradiol 수치 차이가 심했기 때문에 GnRH 투여가 암컷의 성성숙의 유발, 성행동의 유발에 대해서는 아직까지 불명확한 점이 있는 걸로 보이며, 이는 향후 다양한 농도의 GnRH 투여 및 번식행동 실험 등을 통해 수정까지 이어질 수 있는지는 추가적인 실험이 필요하다 판단된다.

아울러 백점얼룩상어(*C.plagiosum*)의 학술적으로 발표되어 있는 호르몬 정상 수치는 없기 때문에 Table 1에서 제시하고 있는 호르몬 수치가 추후 여타 연구 및 임상에서 학술적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

향후 추가적인 연구를 통해 보다 세부적인 GnRH 투여 수치 조절 및 인공수정 타이밍 조절을 해야 할 것이다. 이를 통해 언젠가 실제로 HAI를 실현시킬 수 있는 Protocol을 구축할 수 있을 것이다(Kim, Sang Wha, et al., 2020).

V. 참고 문헌

Baum, J.K. & Worm, B., 2009. Cascading top-down effects of changing oceanic predator abundances. *Journal of Animal Ecology*, 78(4), pp.699–714.

Compagno, L. J. (2001). *Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date, vol 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes)*. FAO species catalogue for fishery purposes, 1, viii+ -1.

Cornish, A. S., Ng, W. C., Ho, V. C., Wong, H. L., Lam, J. C., Lam, P. K., & Leung, K. M. (2007). Trace metals and organochlorines in the bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum* from the southern waters of Hong Kong, China. *Science of the Total Environment*, 376(1-3), 335–345

Cowey, C. B. (1995). Intermediary metabolism in fish with reference to output of end products of nitrogen and phosphorus. *Water Science and Technology*, 31(10), 21–28.

Dill, L.M. et al., 2003. Behaviorally Mediated Indirect Interactions in Marine Communities and Their Conservation Implications. *Ecology*, 84(5), pp.1151–1157.

Ferretti, F., Worm, B., Britten, G. L., Heithaus, M. R., and Lotze, H. K. (2010). Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecol. Lett.* 13, 1055–1071.

George, R. H., 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, eds M. Smith, D. Warmolts, D. Thoney, R. Hueter, M. Murray, and J. Ezcurra (Columbus, OH: The Ohio State University Printing Services), 363–374.

Grogan, E.D. & Lund, R., 2004. The origin and relationships of early chondrichthyes. *Biology of Sharks and their Relatives*, (January), pp.3–31.

IUCN Red List of Threatened Species 2019. White-spotted bambooshark (*Chiloscyllium plagiosum*).

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <http://www.iucnredlist.org> (2021).

Jonassen, T. M., Imsland, A. K., Kadowaki, S., & Stefansson, S. O. (2000). Interaction of temperature and photoperiod on growth of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research*, 31(2), 219–227.

Kim, W. S., Han, J. S., Jang, M. S., Seo, H. G., Jung, S. J., Park, J. J. & Oh, M. J. (2011). The specific antibody response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* to route of antigen administration and change in environmental conditions. *Journal of fish pathology*, 24(2), 153–160.

Kim, S. W., Hong, W. H., Han, S. J., Kwon, J., Ko, H., Lee, S. B., ... & Park, S. C. (2020). Use of Synthetic Salmon GnRH and Domperidone (Ovaprim®) in Sharks: Preparation for ex situ Conservation. *Frontiers in Marine Science*, 7, 571741.

Myers, R. A., Baum, J. K., Shepherd, T. D., Powers, S. P., & Peterson, C.

H. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science*, 315(5820), 1846-1850.

Rao, P. (1990). Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. *Journal of Nature Conservation*, 2(2), 133-137.

Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C. R., & Trant, J. M. (1987). Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *The Progressive Fish-Culturist*, 49(1), 1-12.

Turner, C. L. 1937. Reproductive cycles and superfetation in poeciliid fishes. *Biol Bull* 72, 145-164.

Waring CP, Stagg RM and Poxton MG. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J Fish Biol* 48, 161-173.

Wyffels, J. T., Adams, L. M., Bulman, F., Fustukjian, A., Hyatt, M. W., Feldheim, K. A., & Penfold, L. M. (2021). Artificial insemination and parthenogenesis in the whitespotted bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum*. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.

국토해양부. 2010. 4대강 수계 멸종위기어종 증식 및 복원. 순천향대학교, 489p

고명훈, 김우중, 박상용, & 방인철. (2011). 멸종위기 어류 꾸구리 *Gobiobotia macrocephala* 의 난발생 및 초기생활사. *한국어류학회지*, 23(3), 198-205.

김치홍, 윤승운, 김재구, 김현태, 박종성 & 박종영. (2012). 멸종위기종 모래주사 *Microphysogobio koreensis* 의 난발생 및 초기생활사. 한국어류학회지, 24(3), 160-166.

김효원, 김정현, 박진우, 백혜자 & 김대중. (2021). 광주기와 수은이 양식산 수컷 참조기 (*Larimichthys polyactis*) 성숙에 미치는 영향. 생명과학회지, 31(3), 314-320.

노충환 & 윤낙진. (2019). 능성어 (*Hyporthodus septemfasciatus*)♀× 대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*)♂ 수정란의 난발생. 한국어류학회지, 31(1), 23-29.

주세종 & 김용서. (2008). 지구온난화에 따른 북태평양 해황변화가 한국해 해양 생태계에 미치는 영향. In 제 1 회 3 개 학회 (한국생태, 하천호수, 환경생물학회) 연합학술대회 (pp. 15-15). 한국생태, 하천호수, 환경생물학회.

전중균 & 김형배. (1998). 주요 양식어류의 하절기 혈액성분 비교. 한국양식학회지, 11(4), 547-556.

환경부. 2006. 멸종위기에 처한 한국특산어류의 종 보존과 복원 및 증식기술개발. 군산대학교, 537pp.

환경부. 2009. 멸종위기어류 미호종개의 유전 다양성 분석, 인공증식 및 생태계 복원기술 개방에 관한 연구. 순천향대학교, 506pp.

환경부. 2011. 멸종위기어류 얼룩새코미꾸리의 인공증식 및 방류 종료 모니터링 체제 구축. 순천향대학교, 250pp.

VI. 감사의 글

그 동안 본 논문이 완성되기까지 학문적인 체계와 격려로 지도해 주신 여인규 교수님께 먼저 머리 숙여 인사를 올립니다. 교수님의 지도와 안내가 있었기에 부족하나마 이 논문을 완성할 수 있었습니다. 정말 감사합니다.

실험실 분들을 이야기 안 하려야 안 할 수 없을 거 같습니다. 먼저 저의 일을 자신의 일처럼 항상 먼저 생각해주시며 주야장천(晝夜長川) 헌신하여 도와주신 김기혁 박사님, 또 저의 자연 행동과 회피 행동을 깨우쳐 주시기도 달래 주시기도 하며 이 논문이 완성되도록 도움 주신 남궁진 박사님, 그리고 항상 상냥한 자세와 상냥한 태도로 팀을 이끌어주신 문혜나 박사님, 이 세분에게는 정말 말로 다 할 수 없는 감사를 보냅니다.

논문을 마무리하면서 부족함과 아쉬움도 많지만 그보다는 너무나 소중한 것을 많이 얻을 수 있었던 대학원 생활이었습니다. 돌이켜보면 학업의 시작부터 논문의 완성까지 너무나 많은 고마운 분들의 도움으로 이 자리에 올 수 있었다고 생각합니다. 학위과정을 계속하고 결실을 맺을 수 있도록 허락하신 한화 아쿠아플라넷 김동완 팀장님, 홍원희 수의사님 그리고 서울대학교 수의학 박사이자, 존경하는 친구인 김상화에게 감사드립니다.

마지막으로 무엇보다 오늘이 있기까지 늘 사랑으로 저를 지켜주시고 제가 하는 일에 깊은 신뢰와 격려를 아끼지 않으시며 아들의 삶에 늘 넘치는 힘을 주시고자 최선을 다하시는 어머니와 아버지 그리고 하나뿐인 나의 형 사랑하고 감사합니다. 앞으로도 지금의 감사한 마음을 간직하고, 더 포용할 수 있는 사람이 되도록 나아가겠습니다.