



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

수산학박사 학위논문

참굴 *Crassostrea gigas*의 3배체 종묘생산을
위한 번식생리학적 연구



수산생물학과

김 정 우

수산학박사 학위논문

참굴 *Crassostrea gigas*의 3배체 종묘생산을
위한 번식생리학적 연구

지도교수 장 영 진

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함



2014년 8월

부경대학교 대학원

수산생물학과

김 정 우

김정우의 수산학박사 학위논문을 인준함

2014년 8월



목 차

Abstract	vii
List of Tables	xi
List of Figures	xiii
I. 서 론	1
II. 생식소 성숙유도	4
1. 서 설	4
2. 재료 및 방법	6
2-1. 실험재료	6
2-2. 모패사육	6
2-3. 환경관리	6
2-4. 연체부중량지수 조사	7
2-5. 생식소지수 조사	7
2-6. 생식소 조직학적 관찰	7
2-7. 방란 및 방정 반응률 조사	9
2-8. 생물학적영도 및 최종성숙 적산수온 조사	9
2-9. 생존율 조사	11
2-10. 통계분석	11
3. 결 과	12
3-1. 연체부중량지수 변화	12
3-2. 생식소지수 변화	12
3-3. 생식소 발달	15

3-4. 방란 및 방정 반응률	21
3-5. 생물학적영도 및 최종성숙 적산수온	21
3-6. 생존율	24
4. 고 찰	28
 Ⅲ. 난모세포의 최종성숙 유도	31
1. 서 설	31
2. 재료 및 방법	33
2-1. 실험재료	33
2-2. 난모세포의 채취	33
2-3. 난모세포의 성숙유도	33
2-4. GVBD을 조사	35
2-5. 통계분석	35
3. 결 과	37
3-1. ACh의 GVBD을	37
3-2. AD의 GVBD을	37
3-3. NA의 GVBD을	37
3-4. DA의 GVBD을	37
3-5. 5-HT의 GVBD을	37
3-6. HA의 GVBD을	42
4. 고 찰	45
 Ⅳ. 산란유발	47
1. 서 설	47
2. 재료 및 방법	49

2-1. 실험재료	49
2-2. 산란유발	49
2-3. 수정률 및 부화율 조사	49
2-4. 통계분석	52
3. 결 과	53
3-1. 방란 및 방정 반응률	53
3-2. 방란 및 방정 개시시간	56
3-3. 방란 및 방정량	59
3-4. 수정률 및 부화율	59
4. 고 찰	64
V. 수정 및 부화	67
1. 서 설	67
2. 재료 및 방법	69
2-1. 실험재료	69
2-2. 배우자의 채취	69
2-3. 수정조건	69
2-3-1. 환경요인별	69
2-3-2. 배우자 방치시간별	71
2-3-3. 배우자 밀도별	71
2-4. 통계분석	72
3. 결 과	73
3-1. 환경요인별 수정 및 부화	73
3-1-1. 수온별 수정 및 부화	73
3-1-2. 염분별 수정 및 부화	73

3-2. 배우자 방치시간별 수정 및 부화	76
3-2-1. 채란 후 경과시간별 수정 및 부화	76
3-2-2. 채정 후 경과시간별 수정 및 부화	76
3-2-3. 배우자 접촉시간별 수정 및 부화	79
3-3. 배우자 밀도별 수정 및 부화	79
3-3-1. 알의 수용밀도별 수정 및 부화	79
3-3-2. 정자와 알의 비율별 수정 및 부화	82
3-3-3. 용기용적별 수정 및 부화	82
4. 고 찰	85

VI. 극체방출 억제처리에 의한 3배체 유도	89
1. 서 설	89
2. 재료 및 방법	90
2-1. 실험재료	90
2-2. 배우자의 채취	90
2-3. 염색체 관찰	91
2-4. 3배체 유도	91
2-4-1. CB와 6-DMAP 처리농도별	91
2-4-2. CB와 6-DMAP 처리조건별	92
2-5. 세란 및 부화	92
2-6. 3배체 유도율 측정	94
2-7. 통계분석	94
3. 결 과	96
3-1. 염색체수	96
3-2. CB와 6-DMAP 처리농도별 발생 및 3배체 유도	96

3-2-1. CB 처리농도별 발생 및 3배체 유도	99
3-2-2. 6-DMAP 처리농도별 발생 및 3배체 유도	99
3-3. CB와 6-DMAP 처리조건별 발생 및 3배체 유도	99
3-3-1. CB 처리조건별 발생 및 3배체 유도	99
3-3-2. 6-DMAP 처리조건별 발생 및 3배체 유도	102
4. 고 찰	109
 VII. 3배체 종묘의 대량생산	112
1. 서 설	112
2. 재료 및 방법	113
2-1. 실험재료	113
2-2. 배우자 채취	113
2-3. 3배체 유도율 측정	113
2-4. 3배체 대량유도	114
2-5. 대량 유생사육	114
2-6. 채묘와 치폐사육	116
2-7. 통계분석	116
3. 결 과	117
3-1. 부화율 및 3배체 유도율	117
3-2. 유생의 성장과 생존율	117
3-3. 치폐의 성장과 생존율	117
4. 고 찰	124
 VIII. 종합고찰	125

IX. 요 약	126
감사의 글	129
참고문헌	131



Studies on Reproductive Physiology for Production of Triploid Seedling in *Crassostrea gigas*

Jing Yu JIN

Department of Fisheries Biology, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

1. Induced gonadal maturation

The gonadal development of female and male for *C. gigas* can be divided into four stages by histological observations: inactive stage, early active stage, late active stage and ripe stage. The gonad index (GI) increased along with increase of water temperature. However, the flesh weight index (FWI) was not relevant to the change of water temperature. Induction of gonadal maturation by heating of *C. gigas* was observed: spawning rates of female and male were respectively 60% and 70%. They were respectively observed at 64 days and 58 days after breeding in fast elevating temperature. Spawning rates of female and male were 80% in slow elevating temperature, and they were respectively observed at 72 days and 66 days after breeding. Using formula $K=H(T-t)$, it obtained that the biological minimum of female and male were respectively $t_F=10.5^{\circ}\text{C}$ and $t_M=10.2^{\circ}\text{C}$, and the accumulative temperature for gonadal maturation of female and male were respectively $K_F=481.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ and $K_M=410.2^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$.

2. Induced oocyte maturation

The effectiveness of neurotransmitter on germinal vesicle breakdown (GVBD) was investigated *in vitro* using the oocytes which are obtained from the *C. gigas*. Among the neurotransmitter tested, serotonin can induce GVBD, however, acetylcholine, adrenaline, noradrenaline, dopamine, and histamine were not effective. The results showed that serotonin concentrations of 10^{-7} – 10^{-3} M can induce GVBD of *C. gigas* oocytes remarkably, and the GVBD rates of oocytes in 10^{-5} M and 10^{-4} M were more than 97% at 60 minutes after treatment.

3. Spawning induction

The effectiveness of acetylcholine, adrenaline, noradrenaline, dopamine, serotonin, and histamine for spawning induction was investigated of *C. gigas*. Dopamine 10^{-3} M and serotonin 10^{-3} M injection can induce the spawning effectively in *C. gigas*, which is more sensitively response to male than female. The response time to initial spawning in the case of dopamine was within 17 minutes in male, however, dopamine was not effective in female. In the case of serotonin, response time of female and male were respectively induced within 29 minutes and 13 minutes. The number of spawned eggs were 2.53 million and number of spawned sperm were 100.1 billion at 10^{-3} M dopamine concentration. The number of spawned eggs were 1.97 million and number of spawned sperm were 143.1 billion at 10^{-3} M serotonin concentration. Fertilization and hatching rate was not different for oocytes obtained from each stimulus.

4. Fertilization and hatching

Improvement of fertilization and hatching rate by the fertilization conditions were investigated of *C. gigas*. Temperatures ranging from 18–24°C had no detrimental effects upon fertilization and hatching, and temperature of 24°C appeared adequate

for optimal fertilization and hatching rate. Fertilization and hatching was not affected at salinities ranging from 25-35 psu. The most effective fertilization and hatching rate were respectively obtained within 4 hours after eggs collection, and within 30 minutes after sperm collection under temperature 24°C. The best sperm to egg ratio for the fertilization and hatching rate of *C. gigas* was 1,000 sperm per egg. The optimal gamete contact time was between 30 and 120 minutes. The best densities for the fertilization and hatching rate of *C. gigas* were 200 per millilitre. The optimal tank volume was between 50 and 5,000 millilitre. 50-5,000 mL volume was no difference for fertilization and hatching rate.

5. Triploid induction

The number of chromosomes for diploid and triploid were respectively $2n=20$ and $3n=30$ in *C. gigas*. The best treatment concentration of CB and 6-DMAP were respectively 0.5 mg/L and 60 mg/L. Different induction conditions of triploid were investigated in *C. gigas* with 0.5 mg/L CB and 60 mg/L 6-DMAP concentration. The longer duration of treatment showed that hatching rate was lower. The highest triploid rate (73.8%) was obtained at 27°C, 30 minutes after fertilization for 10 minutes treatment duration with 0.5 mg/L CB concentration. The highest triploid rate (66.7%) was obtained at 29°C, 10 minutes after fertilization for 20 minutes treatment duration, and 15 minutes after fertilization for 30 minutes treatment duration with 60 mg/L 6-DMAP concentration.

6. Mass production of triploid seedling

This study treated 15 billion of embryos to obtain 21.1 million of D-shaped larvae, and the shell length was $77.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$. Hatching rate was 1.4%, and triploid induction rate of D-shaped larva was 34.5%. After 15 days, D-shaped larva grew to $363.5 \pm 28.6 \mu\text{m}$ in the settlement stage and estimated survival was 4.3%.

Breeding was conducted in the settlement larva (0.9 million) by down wearing method. Shell length and total weight of spat after seed collection grew 4.1 ± 0.9 mm and 15.6 ± 10.5 mg in 30 days, and survival was 12.3%.



List of Tables

Table 1. Spawning response rates of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature	22
Table 2. Spawning response rates of <i>C. gigas</i> in slow elevating temperature	23
Table 3. Size and GDSI of <i>C. gigas</i> used in the treatment of six neurotransmitters	34
Table 4. Number and size of <i>C. gigas</i> used in the spawning induction for acetylcholine, adrenaline and noradrenaline	50
Table 5. Number and size of <i>C. gigas</i> used in the spawning induction for dopamine, serotonin and histamine	51
Table 6. Effect of acetylcholine, adrenaline and noradrenaline on spawning response in <i>C. gigas</i>	54
Table 7. Effect of dopamine, serotonin and histamine on spawning response in <i>C. gigas</i>	55
Table 8. Size and gamete condition of <i>C. gigas</i> used in the eight experiments	70
Table 9. Selected conditions of treatments for inducing triploid <i>C. gigas</i>	93
Table 10. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at different concentrations of treatment with CB	98
Table 11. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at different concentrations of treatment with 6-DMAP	100
Table 12. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C.</i>	

<i>gigas</i> , at 25°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration	101
Table 13. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at 27°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration	103
Table 14. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at 29°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration	104
Table 15. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at 25°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration	105
Table 16. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at 27°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration	107
Table 17. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of <i>C. gigas</i> , at 29°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration	108
Table 18. Treatment conditions of triploid mass induction with 6-DMAP in <i>C. gigas</i>	115
Table 19. D-shaped larval hatching rate and triploid percentage of mass induction with 6-DMAP in <i>C. gigas</i>	118
Table 20. Growth of shell length and survival rate of larva in <i>C. gigas</i>	119
Table 21. Shell length, total weight and survival rate for triploid juvenile of 30 days after breeding in <i>C. gigas</i>	122

List of Figures

Fig. 1. Changes of water temperature and salinity in fast elevating temperature and slow elevating temperature	8
Fig. 2. Schematic diagram for biological minimum temperature and effective accumulative temperature on final maturation	10
Fig. 3. Change of flesh weight index for female and male of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	13
Fig. 4. Change of gonad index for female and male of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	14
Fig. 5. Photomicrographs of gonadal phases in female, <i>C. gigas</i> observed by light microscopy	17
Fig. 6. Photomicrographs of gonadal phases in male, <i>C. gigas</i> observed by light microscopy	18
Fig. 7. Frequency of ovarian development stage of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	19
Fig. 8. Frequency of testicular development stage of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	20
Fig. 9. Regression line of rearing temperature for female of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	25
Fig. 10. Regression line of rearing temperature for male of <i>C. gigas</i> in fast elevating temperature and slow elevating temperature	26
Fig. 11. Change of survival rate in fast elevating temperature and slow elevating temperature	27

Fig. 12. Immature and mature oocytes of <i>C. gigas</i>	36
Fig. 13. Effects of acetylcholine on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	38
Fig. 14. Effects of adrenaline on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	39
Fig. 15. Effects of noradrenaline on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	40
Fig. 16. Effects of dopamine on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	41
Fig. 17. Effects of serotonin on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	43
Fig. 18. Effects of histamine on GVBD in <i>C. gigas</i> oocytes	44
Fig. 19. Effects of six neurotransmitters on egg release time in <i>C. gigas</i>	57
Fig. 20. Effects of six neurotransmitters on sperm release time in <i>C. gigas</i>	58
Fig. 21. Effects of six neurotransmitters on release egg number in <i>C. gigas</i>	60
Fig. 22. Effects of six neurotransmitters on sperm release number in <i>C. gigas</i>	61
Fig. 23. Effect of six neurotransmitters on fertilization rate in <i>C. gigas</i>	62
Fig. 24. Effect of six neurotransmitters on hatching rate in <i>C. gigas</i>	63
Fig. 25. Effect of temperature on fertilization and hatching rate	74
Fig. 26. Effect of salinity on fertilization and hatching rate	75
Fig. 27. Effect of elapsed time after eggs collection on fertilization and hatching rate	77
Fig. 28. Effect of elapsed time after sperm collection on fertilization and hatching rate	78
Fig. 29. Effect of gamete contact time on fertilization and hatching rate	80
Fig. 30. Effect of egg stocking density on fertilization and hatching rate	81

Fig. 31. Effect of sperm to egg ratio on fertilization and hatching rate	83
Fig. 32. Effect of tank volume on fertilization and hatching rate	84
Fig. 33. Flow cytometric analysis of D-shaped larva in <i>C. gigas</i>	95
Fig. 34. Chromosome spreads of diploid and triploid in <i>C. gigas</i>	97
Fig. 35. Flow cytometric analysis of pediveliger larva in <i>C. gigas</i>	120
Fig. 35. Changes of water temperature and salinity in rearing period of juvenile <i>C. gigas</i>	121



I. 서 론

굴(oyster)은 세계적으로 3속 100종 이상이 서식하는 것으로 알려져 있다 (Stauber, 1950). 2012년 양식 생산량은 474만 톤으로 4.3조원 규모에 달하며, 그중에서 참굴 *Crassostrea gigas*의 양식 생산량은 약 61만 톤으로 전체의 12.8%를 차지하고 있다(FAO, 2012). 주생산지는 한국을 비롯한 중국, 일본 등 동북 태평양 연안이며, 미국의 태평양 연안, 프랑스 및 호주 등에서도 양식이 활발하게 이루어지고 있다.

굴 양식에 있어서 배수체의 활용, 특히 3배체 굴 양식이 미국, 프랑스, 호주 및 중국 등 여러 나라에서 성행하고 있다. 미국의 경우 1990년대 말까지 3배체 종묘는 주로 cytochalasin B를 이용하여 극체방출을 억제하는 화학적인 방법으로 생산된 바 있다. 최근에는 4배체 굴이 만들어짐에 따라 2배체 암컷과 4배체 수컷을 교배하여 3배체를 생산하고 있으며, 현재 인공종묘의 3분의 1 이상이 이와 같은 3배체로 생산되고 있는 실정이다. 프랑스의 경우 인공 종묘가 전체 종묘생산량의 약 15%를 차지하는데, 그중 대부분이 3배체 종묘이다 (최, 2012).

굴 양식에 있어서 3배체 굴을 선호하는 이유는 생식세포 감수분열시 3쌍의 염색체가 분리에 이상을 일으켜 불임이 유발되며(Beaumont and Fairbrother, 1991), 이로 인해 성 성숙을 위한 에너지가 성장과 육질부의 비만에 이용되기 때문에 동일 연령의 2배체보다 성장이 빠르고 글리코젠 함량도 높아 부가가치를 높일 수 있다.

한국에서 굴 양식 생산량은 약 24만 톤으로 남·서해안을 중심으로 양식이 이루어지고 있다(2013, 통계청). 그러나 최근에 산업시설의 임해배치, 도시화 및 굴 양식장의 노후화에 따른 연안역의 환경 악화 등으로 단위면적당 생산량의 감소와 육질부의 비만이 떨어지는 현상이 나타나고 있다. 특히 2007년 허

베이스피리트호 유류오염 사고로 인해 태안지역의 굴 양식산업이 유류오염 및 모패자원의 부족 등으로 총생산량의 5%를 차지하던 것이 2008년에는 1%미만으로 급감하였다(Lim et al., 2011). 이를 계기로 해당지역의 어가소득과 서해안 굴 양식의 생산성 증대를 위한 방안으로 갯벌참굴 양식이 도입되었다.

갯벌참굴 양식은 수평망식 시설을 이용하여 개체굴을 생산하는 방식으로, 굴의 주 산란기인 하절기에도 수확이 가능하여 계절에 상관없이 연중생산할 수 있는 특징을 가지고 있다(최, 2012). 따라서 황폐화된 갯벌의 이용을 가능하게 할뿐만 아니라 고소득의 창출 및 수출산업의 한 품종으로서 자리 잡을 수 있어, 서해안의 고부가가치 양식품종으로서 매우 적합하다고 할 수 있다. (국립수산물과학원, 2013). 한국의 갯벌참굴 양식은 2013년 현재 43 ha 양식장에 수평망식 양식시설 23,000세트가 설치되어 있으나 아직 초기단계에 있다. 또 이 양식에서 드러난 가장 큰 문제점은 3배체 굴 종묘의 공급이 원활하지 않다는 점이다. 참굴의 인공종묘 생산은 1990년대 중반에 개발되어 현재에는 매우 보편화되어 있는 기술이지만 3배체 굴 종묘생산의 경우 일부 업체를 제외하고는 생산이 전혀 이루어지지 않는 실정이다. 또한 3배체 종묘의 높은 생산비용 및 특허사용료로 인해 판매단가가 매우 높은 문제점을 안고 있다(Lim et al., 2011). 그러므로 수평망식 갯벌참굴 양식을 확대하기 위해서는 안정적이고 가격이 저렴한 3배체 종묘의 대량 보급이 우선적으로 이루어져야 한다.

굴의 3배체는 버지니아굴 *Crassostrea virginica*에서 cytochalasin B에 의해 최초로 유도(Stanley et al., 1981)된 이후 많은 연구가 수행되었으나 한국에서는 유 등(1990)의 연구뿐이며, 체계적인 3배체 참굴생산에 관한 연구는 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 갯벌참굴 양식에 필요한 3배체 종묘를 안정적으로 생산하기 위한 번식학적 기반 기술을 확보하고, 3배체를 활용한 개체굴 인공종묘의 대량 생산기술을 개발하기 위하여, 모패의 실내 사육에 따른 생식소 성숙 유도방법을 파악하였다. 3배체 유도를 위한 성숙란을 대량으로 확보할 수

있는 난모세포의 성숙유도 및 산란유발 방법을 연구하였다. 또한 양질의 수정란 확보를 위한 알과 정자의 수정방법과 부화에 미치는 다양한 요인에 관하여 조사하였다. 끝으로 극체억제 처리에 의한 3배체 유도조건 및 3배체 종묘의 대량생산에 필요한 기반기술을 개발하고자 하였다.



II. 생식소 성숙유도

1. 서 설

참굴 종묘를 생산하기 위해서는 필요한 시기에 성숙한 모패의 확보가 우선적으로 이루어져야 하며, 이러한 목적을 달성하기 위해서는 모패의 생식소 성숙 유도 기법을 확립하는 것이 필요하다. 또한 인위적 제어 조건에서 조직학적 방법을 통한 모패의 생식소 발달 조사 및 번식생리학적 지표의 파악은 생식소 성숙 유도를 위한 기초지식을 얻는 데 매우 중요하다.

패류의 생식소 성숙 유도에 관한 연구는 참전복 *Haliotis discus hannai* (Uki and Kikuchi, 1984; Hahn, 1994), 해만가리비 *Argopecten irradians* (Zhou, 1991; Zhou et al., 1999; Lu et al., 2008), 바지락 *Ruditapes philippinarum* (Liang et al., 2007; Li et al., 2007), 명주개량조개 *Coelomactra antiquata* (Liu et al., 2002) 등 산업적으로 중요한 종에 대해 보고되고 있다. 또한 굴에 있어서 버지니아굴(Loosanoff and Davis, 1952; Loosanoff and Davis, 1963)과 참굴(Lu et al., 1998; Min et al., 2004)에 대한 보고가 있다.

일반적으로 조개류의 생식소 발달과 성 성숙은 수온, 염분, 먹이생물, 일장 등 외부 요인과 영양물질의 저장, 신경분비 등과 같은 내부 요인의 영향을 받게 되는데(Sastry, 1966; Arellano-Martinez et al., 2004; Simpson, 1982; Barber, 1984; Blake and Sastry, 1979), 그중에서 수온이 가장 중요하게 작용하는 외부 요인으로 알려져 있으며(Mackie, 1984; Rodriguez-Moscoso and Arnaiz, 1988), 주로 체내 대사율의 변화를 일으킴으로써 생식주기에 영향을 미친다(Khalil, 1994). 지금까지 수온과 성 성숙의 관계에 대한 연구로는 새조개 *Fulvia mutica*, 가무락 *Cyclina sinensis*, 바지락, 북방대합 *Spisula sachalinensis*, 비단가리비 *Chlamys farreri* 등 많은 보고가 있다(Chang and

Lee, 1982; Chung et al., 1991; Chung et al., 1994; Lee et al., 1997; Park and Lee, 2008).

패류의 생식소 발달 및 성숙에 있어 생물학적영도(biological minimum temperature)는 생식소 발달이 정지하는 기초수온을 나타낸 것이고, 적산수온(accumulated water temperature)은 생식소 발달과 외부 온도 사이의 상관관계를 나타낸 것으로, 패류 산란시기의 임의조절과 연중 채란을 가능하게 하는 중요한 번식생리학적 지표이다(Kim, 1983). 지금까지 생물학적영도와 최종성숙까지의 적산수온을 밝힌 종으로는 참전복, 해만가리비, 바지락, 명주개량조개 등이 있다(Kikuchi and Uki, 1974; Zhou, 1991; Zhou et al., 1999; Liang et al., 2007; Li et al., 2007; Liu et al., 2002).

따라서 본 연구에서 주된 양식굴 생산지인 남해안 참굴을 대상으로 수온을 인위적으로 제어하는 조건에서의 생식소 발달, 생식소지수와 연체부중량지수의 변화, 방란·방정 반응률 및 생존율 등을 조사하였다. 아울러 참굴의 생물학적영도와 최종성숙을 위한 적산수온을 구명함으로써, 3배체 종묘의 계획적인 생산을 위한 모패의 생식소 성숙유도 기법을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패로서 국립수산물과학원 남동해수산업연구소 남해센터 시험용 가두리에서 수하식으로 22개월 양성한 참굴(각장 67.3 ± 4.1 mm, 전중 190.6 ± 52.7 g) 1,200마리를 사용하였다.

2-2. 모패사육

모패를 실내 사육실로 옮겨 패각에 붙어있는 이물질을 제거한 후, 1.6톤 FRP 사각수조($2.0 \times 1.0 \times 0.8$ m)에 설치한 24개의 플라스틱 사각바구니($50.0 \times 32.0 \times 17.0$ cm)에 각각 25마리씩 수용하여 실험하였다. 모패의 사육은 유수식으로 하였고, 유수량은 15 L/min가 유지되도록 하였으며, 온도조절은 환경조절기(Aquatron, Yoowon, Korea)를 사용하였다. 먹이생물은 *Tetraselmis* sp., *Nitzschia* sp. 및 *Phaeodactylum* sp. 를 2:1:1 (V:V:V)의 비율로 혼합한 후 사육수 중 먹이생물이 $5 \sim 15 \times 10^4$ cells/mL의 농도로 유지되도록 30분 간격으로 15분 씩($2 \sim 3$ L/분) 수중펌프를 이용하여 먹이생물을 공급하였다. 그리고 빵효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 밀가루, 녹말가루, *Spirulina* 분말을 각각 2 g 씩 혼합하여 2 L의 물에 충분히 풀은 다음 하루에 4번씩 공급하였다. 수조바닥의 찌꺼기는 2~3일 간격으로 25 mm 호스를 사용하여 사이폰 배수방식으로 제거해 주었다.

2-3. 환경관리

모패를 안정시키기 위하여 10일간 자연해수를 흘려주었다. 이후 수조1에서는 3~4일 간격으로 $1.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 씩 온도를 빠르게 상승시켰고(fast elevating temperature: FET), 수조2에서는 3~4일 간격으로 $1.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 씩 온도를 느리게 상승시켜(slow elevating temperature: SET) 설정온도 25°C 에 이르게 하였으

며, 이후 실험종료시까지 25℃를 유지하였다. 수온은 온도미니로거(HOBO U22 water temp pro v2, Onset, USA)로 30분 간격으로 측정하였으며, 염분은 YSI 85-10FT 수질측정기(YSI Incorporated, USA)로 매일 오전 10시에 측정하였다. 실험기간 중 FET과 SET의 수온과 염분은 각각 8.4~25.3℃, 8.4~24.7℃ 및 32.6~33.8 psu, 32.4~33.8 psu였다(Fig. 1).

2-4. 연체부중량지수 조사

생식소 발달로 인해 증가되는 생식소 중량의 영향을 파악하기 위하여 7일 간격으로 암·수를 각각 5개체씩 조사하였고, 모든 개체는 각중(shell weight, SW) 및 연체부 중량(flesh weight, FW)을 전자저울(PB4002-S, Mettler Toledo)로 0.01 g까지 측정하였다. 연체부중량지수(flesh weight index, FWI)는 Akashige and Fushimi (1992)의 방법에 따라 산정하였다.

$$FWI = \frac{FW (g)}{FW (g) + SW (g)} \times 100$$

2-5. 생식소지수 조사

산란시기를 간접적으로 추정하기 위하여 7일 간격으로 암·수를 각각 5개체씩 조사하여 생식소 조직표본을 관찰한 후 발달단계별 비활성기(inactive stage, In)는 1, 초기활성기(early active stage, Ea)는 2, 후기활성기(late active stage, La)는 3 및 완숙기(ripe stage, R)는 4로 표시하였다. 생식소지수(gonad index, GI)는 Eversole (1997)의 방법을 일부 수정하여 계산하였다.

$$GI = \frac{(In \text{ 개체수} \times 1) + (Ea \text{ 개체수} \times 2) + (La \text{ 개체수} \times 3) + (R \text{ 개체수} \times 4)}{\text{조사 개체수}}$$

2-6. 생식소 조직학적 관찰

생식소의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 7일 간격으로 암·수를 각각 5개

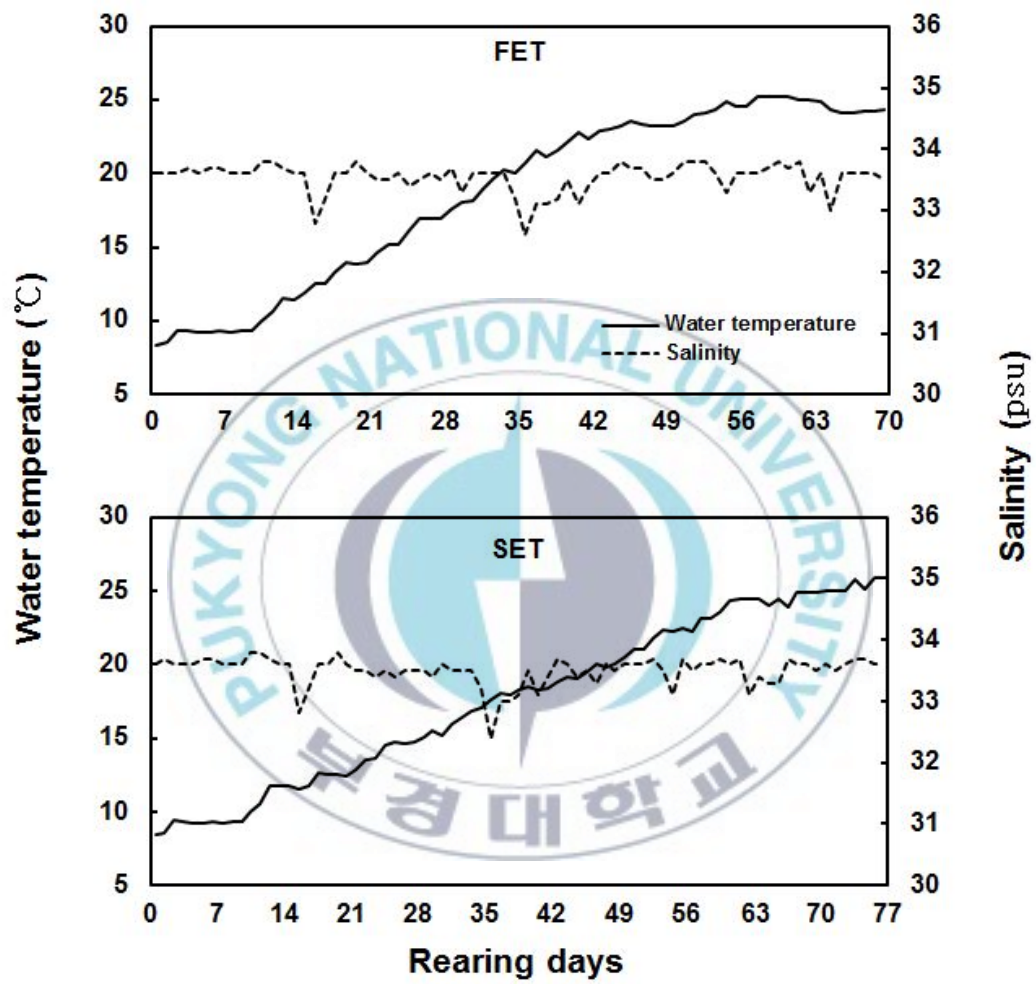


Fig. 1. Changes of water temperature and salinity in fast elevating temperature and slow elevating temperature.

체씩 채집하여 생식소 부위를 절취하고 Bouin용액에 24시간 고정한 후, paraffin상법으로 5~7 μm 두께의 조직표본을 제작하고 Mayer's hematoxylin 과 0.5% eosin으로 비교 염색하였다. 그리고 생식소 조직상을 광학현미경으로 관찰하여 비활성기(inactive stage, In), 초기활성기(early active stage, Ea), 후기활성기(late active stage, La) 및 완숙기(ripe stage, R)의 4단계로 나누었다.

2-7. 방란 및 방정 반응률 조사

생식소의 최종성숙을 확인하기 위하여 생식소 조직상에서 50% 이상이 완숙기에 도달한 개체를 2~3일 간격으로 모패의 좌각을 일부 제거하여 암·수를 구별한 후, 암컷과 수컷을 각각 10개체씩 산란유발한 다음 방란·방정 반응률을 조사하였다. 산란유발은 serotonin을 0.22 μm cellulose acetate membrane 여과해수(32.8~33.2 psu, pH 8.05~8.10)에 녹여 10^{-4} M 농도로 만든 후, 0.5 mL insulin syringe로 100 μL 를 생식소 부위에 주사하였고, 그 다음 2 L 유리 비커에 각각 1마리씩 수용하였다. 반응률은 자극개시 후 3시간까지의 방란 및 방정 개체의 비율로 하였고, 최종 성숙은 50% 이상의 개체가 방란 및 방정 반응이 일어나는 시점으로 하였다.

2-8. 생물학적영도 및 최종성숙 적산수온 조사

생식소 발달상태를 나타내기 위한 생물학적영도 및 최종성숙 적산수온은 Zhou(1991)의 $K = H \cdot (T-t)$ 적산수온 관계식을 사용하여 계산하였다. 여기서 K는 적산수온, H는 생물학적 영도 이상의 사육일수, T는 사육수온, t는 생물학적 영도이다. 적산수온 K가 일정하기에 S_1 과 S_2 의 면적이 같다(Fig. 2). 이를 식으로 나타내면, $\int_{h_1}^{h_1'} L_1 - \int_{h_1}^{h_1'} L_1 = \int_{h_2}^{h_2'} L_2 - \int_{h_2}^{h_2'} L_2$ 와 같다. 여기서 L_1 과 L_2 는 사육수온의 회귀직선이고, h_1 과 h_2 는 생물학적 영도 t를 표시하며, h_1 과는 h_2 는 실험 개시시부터 생물학적 영도에 이르기까지 소요한 사육일수, h_1' 과는 h_2' 는 실험 개시시부터 최종성숙에 이르기까지의 사육일수이다.

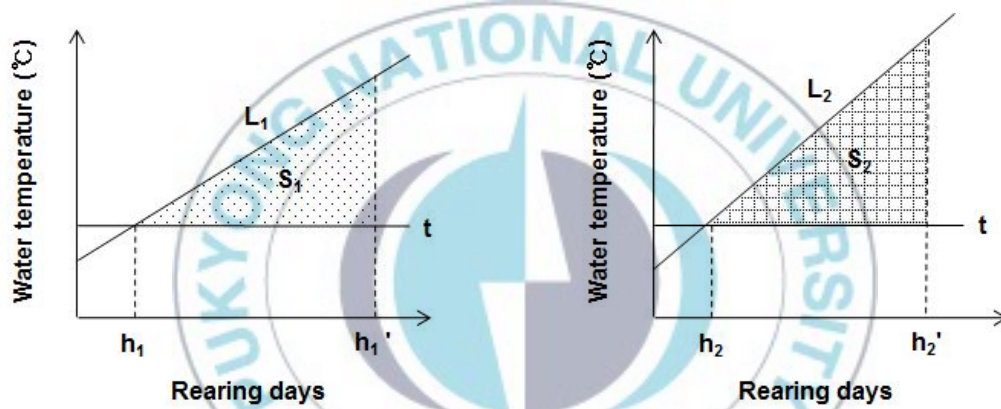


Fig. 2. Schematic diagram for biological minimum temperature and effective accumulative temperature on final maturation.

2-9. 생존율 조사

모패의 생존율은 실험개시 후부터 종료시까지 7일 간격으로 폐사 마리수를 계수하여 생존개체와 총 입식개체의 비율로 하였다.

2-10. 통계분석

실험결과의 통계처리는 PASW program (Ver. 19)을 사용하여 one way-ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성 ($P<0.05$)을 검정하였다.



3. 결 과

3-1. 연체부중량지수 변화

FET과 SET에서 암컷과 수컷의 FWI의 변화는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 암컷의 경우 FET에서 FWI의 변화는 실험개시시 19.2 ± 3.2 이던 것이 28일째에는 23.4 ± 2.5 로 증강하였으나 35일째에는 20.6 ± 1.0 로 감소하였고, 이후 다시 증가하는 경향을 보였다. SET에서 FWI의 변화는 실험개시시 19.2 ± 3.2 이던 것이 7일째에는 20.3 ± 1.5 로 증가한 후, 14일째에는 19.3 ± 3.1 로 약간 감소하였다. 이후 점차 증가하여 42일째에 22.2 ± 2.7 를 보였고, 49일째에 20.5 ± 3.1 로 감소한 후 다시 증가하여 72일째에는 최대값인 22.3 ± 4.9 를 보였다. 수컷의 경우 FET에서 FWI의 변화는 실험개시시 19.2 ± 3.2 이던 것이 14일째에 23.1 ± 3.3 로 증가하여 최대값을 보였고, 이후 점차 감소하여 35일째에는 20.7 ± 2.6 를 보인 후 다시 증가하는 경향을 보였다. SET에서 FWI의 변화는 실험개시시 19.2 ± 3.2 이던 것이 점차 증가하는 경향을 나타나 49일째에 21.5 ± 1.9 을 보였고, 56일째에 20.1 ± 4.9 으로 감소하였으나 이후 다시 증가하였다.

3-2. 생식소지수 변화

FET와 SET에서 암컷과 수컷의 GI의 변화는 Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 암컷의 경우 FET에서 GI의 변화는 실험개시시 1에서 수온 상승과 더불어 서서히 증가하여 35일째 1.8로 증가하였다. 이후 급격하게 증가하여 49일째에 3.4를 보인 후 다시 서서히 증가하여 63일째에는 4로 증가하였다. SET에서 GI의 변화는 실험개시시 1에서 수온 상승과 더불어 서서히 증가하여 35일째 1.4로 증가하였다. 이후 급격하게 증가하여 56일째에는 3.6을 보인 후 다시 서서히 증가하여 70일째에는 4로 증가하였다. 수컷의 경우 FET에서 GI의 변화는 실험개시시 1에서 수온 상승과 더불어 서서히 증가하여 21일째 1.2로 증가하였다. 이후 급격하게 증가하여 49일째에는 3.6을 보였고, 56일째에는 3.8로

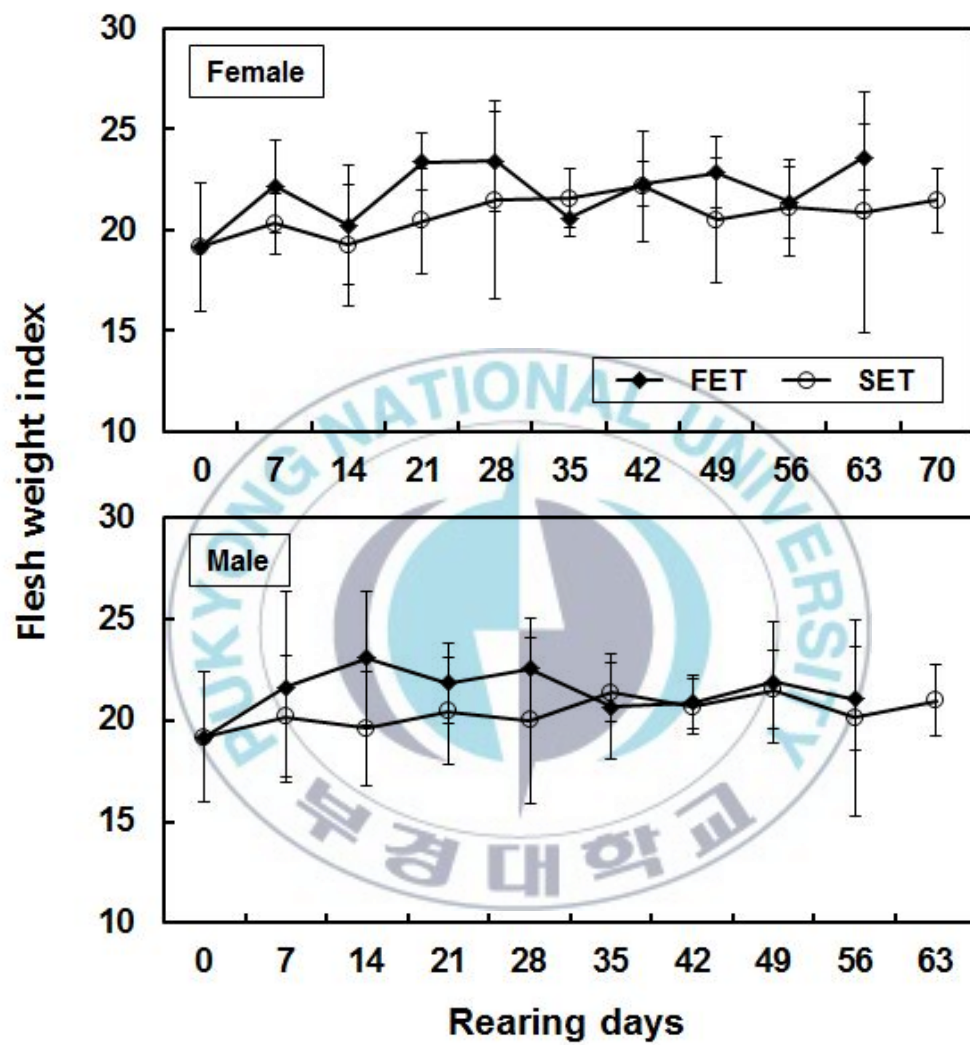


Fig. 3. Change of flesh weight index for female and male of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature. Values are mean $\pm$ SD (n=5).

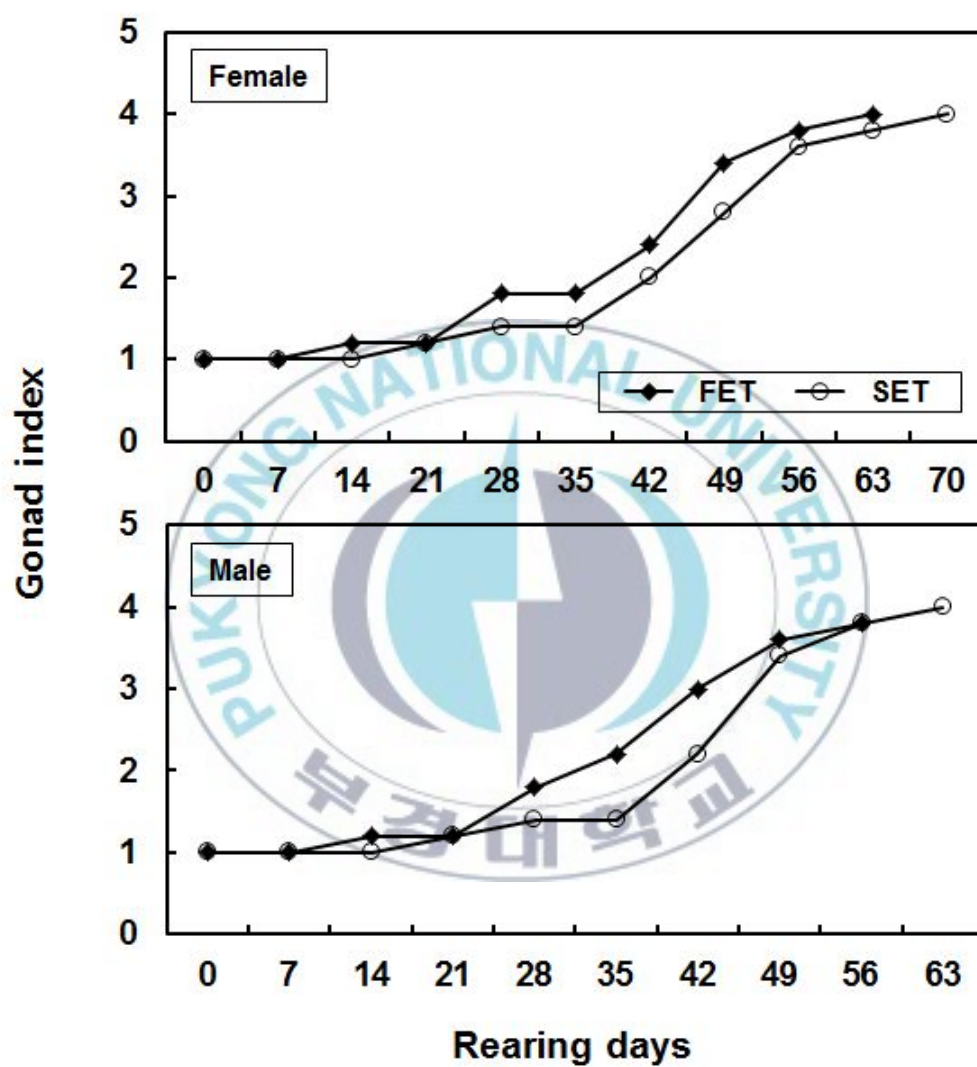


Fig. 4. Change of gonad index for female and male of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature.

증가하였다. SET에서 GI의 변화는 실험 개시시 1에서 수온 상승과 더불어 서서히 증가하여 35일째 1.4로 증가하였다. 이후 급격하게 증가하여 49일째에는 3.4를 보인 후 다시 서서히 증가하여 63일째에는 4로 증가하였다.

3-3. 생식소 발달

실험기간 동안 참굴 생식소의 발달단계를 조직학적으로 관찰한 결과, 암·수 각각 비활성기, 초기활성기, 후기활성기 및 완숙기의 4단계로 구분할 수 있었다.

비활성기(inactive stage, In): 암컷의 난소는 난소소낭(ovarian sac)의 생식상피에 난원세포들이 소수 관찰되었고, 소낭과 소낭사이는 결체조직으로 가득 채워져 있었다(Fig. 5A). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시시부터 35일 사이에 나타났고, 출현율은 각각 100, 100, 80, 80, 20 및 40%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시시부터 42일 사이에 나타났고, 출현율은 각각 100, 100, 100, 80, 60, 60 및 20%였다(Fig. 7). 수컷의 정소는 정소세관(seminiferous tubule)의 생식상피에 난원세포들이 소수 관찰되었고, 세관과 세관사이에는 결체조직으로 가득 채워져 있었다(Fig. 6A). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시시부터 35일 사이에 나타났고, 출현율은 각각 100, 100, 80, 80, 20 및 20%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시시부터 42일 사이에 보였고, 출현율은 각각 100, 100, 100, 80, 60, 60 및 20%였다(Fig. 8).

초기활성기(early active stage, Ea): 암컷 난소는 난소소낭의 생식상피에 따라 난경이 약 10 μm 인 난원세포와 난경이 20~30 μm 인 초기발달 중인 난모세포가 보였으며, 생식상피는 비교적 두텁게 관찰되었다(Fig. 5B). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 14~49일에 나타났고, 출현율은 각각 20, 20, 80, 40, 60 및 20%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시후 21~49일에 보였고, 출현율은 각각 20, 40, 40, 60 및 20%였다(Fig. 7). 수컷의 정소는 정소세관의 생식상피에 따라 크기가 약 10 μm 인 정원세포와 크기가 7~

8 μm 인 정모세포가 다수 관찰되었다(Fig. 6B). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 14~42일에 보였고, 출현율은 각각 20, 20, 80, 40 및 20%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시후 21~49일에 나타났고, 출현율은 각각 20, 40, 40, 40 및 20%였다(Fig. 8).

후기활성기(late active stage, La): 암컷의 난소소낭 내에는 성숙발달 중인 난경 30~40 μm 인 난모세포들이 다수 출현하였고, 난모세포는 난병을 생식상피에 부착하고 소낭의 내강을 향해 발달하였으며, 생식상피는 약간 얇아졌다(Fig. 5C). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 35~56일에 나타났고, 출현율은 각각 20, 40, 20 및 20%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시후 42~63일에 보였고, 출현율은 각각 20, 80, 40 및 20%였다(Fig. 7). 수컷의 정소의 발달과 함께 정소세관 내에 정원세포, 정모세포, 정세포 그리고 변태 중인 정자들이 외층으로부터 내강 쪽으로 배열된 것이 관찰되었다(Fig. 6C). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 35~56일에 보였고, 출현율은 각각 40, 60, 40 및 20%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시후 42~56일에 나타났고, 출현율은 각각 40, 20 및 20%였다(Fig. 8).

완숙기(ripe stage, R): 암컷의 난소 내에는 난경이 45~50 μm 인 완숙된 난모세포들이 난소소낭 내강으로 떨어져서 소낭을 가득 채워져 최대로 비후되었고, 생식상피가 아주 얇아졌다(Fig. 5D). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 49~63일에 보였고, 출현율은 각각 60, 80 및 100%였다. SET에서는 이 시기의 개체들이 실험개시후 56~70일에 나타났고, 출현율은 각각 60, 80 및 100%였다(Fig. 7). 수컷의 정소세관이 비후되었고, 세관의 상피층에 정모세포와 정세포들이 일부 관찰되었으나, 소낭 내에는 변태를 마친 완숙된 정자들로 가득 차있었다(Fig. 6D). FET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 42~56일에 보였고, 출현율은 각각 20, 60 및 80%였다. SET에서 이 시기의 개체들이 실험개시후 49~63일에 나타났고, 출현율은 각각 60, 80 및 100%였다(Fig. 8).

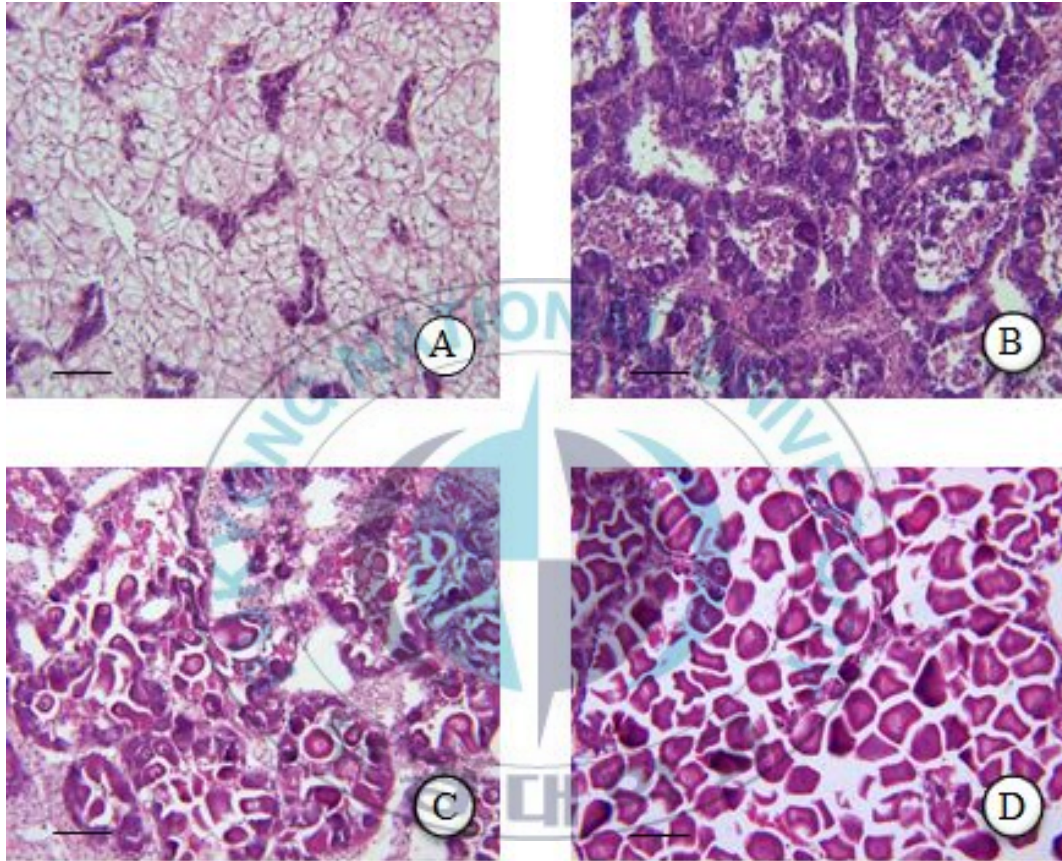


Fig. 5. Photomicrographs of gonadal phases in female, *C. gigas* observed by light microscopy (scale bar=50 μm). ①: inactive stage, ②: early active stage, ③: late active stage, ④: ripe stage.

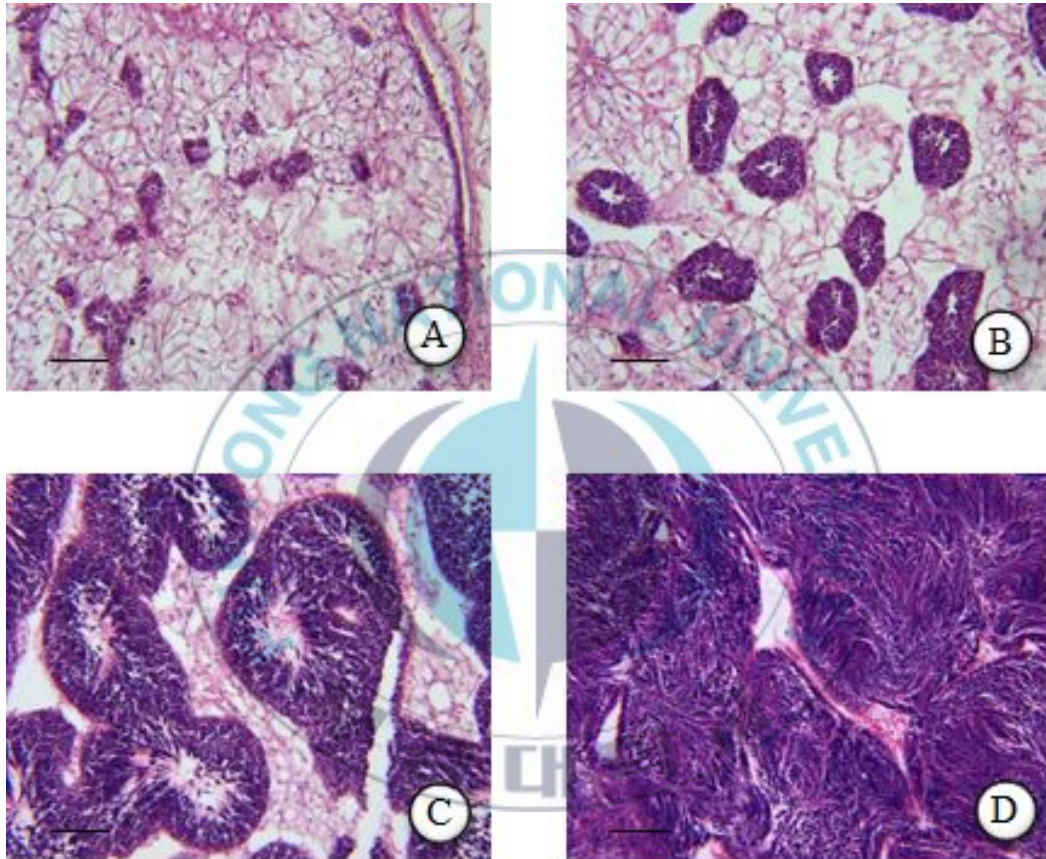


Fig. 6. Photomicrographs of gonadal phases in male, *C. gigas* observed by light microscopy (scale bar=50 μ m). ①: inactive stage, ②: early active stage, ③: late active stage, ④: ripe stage.

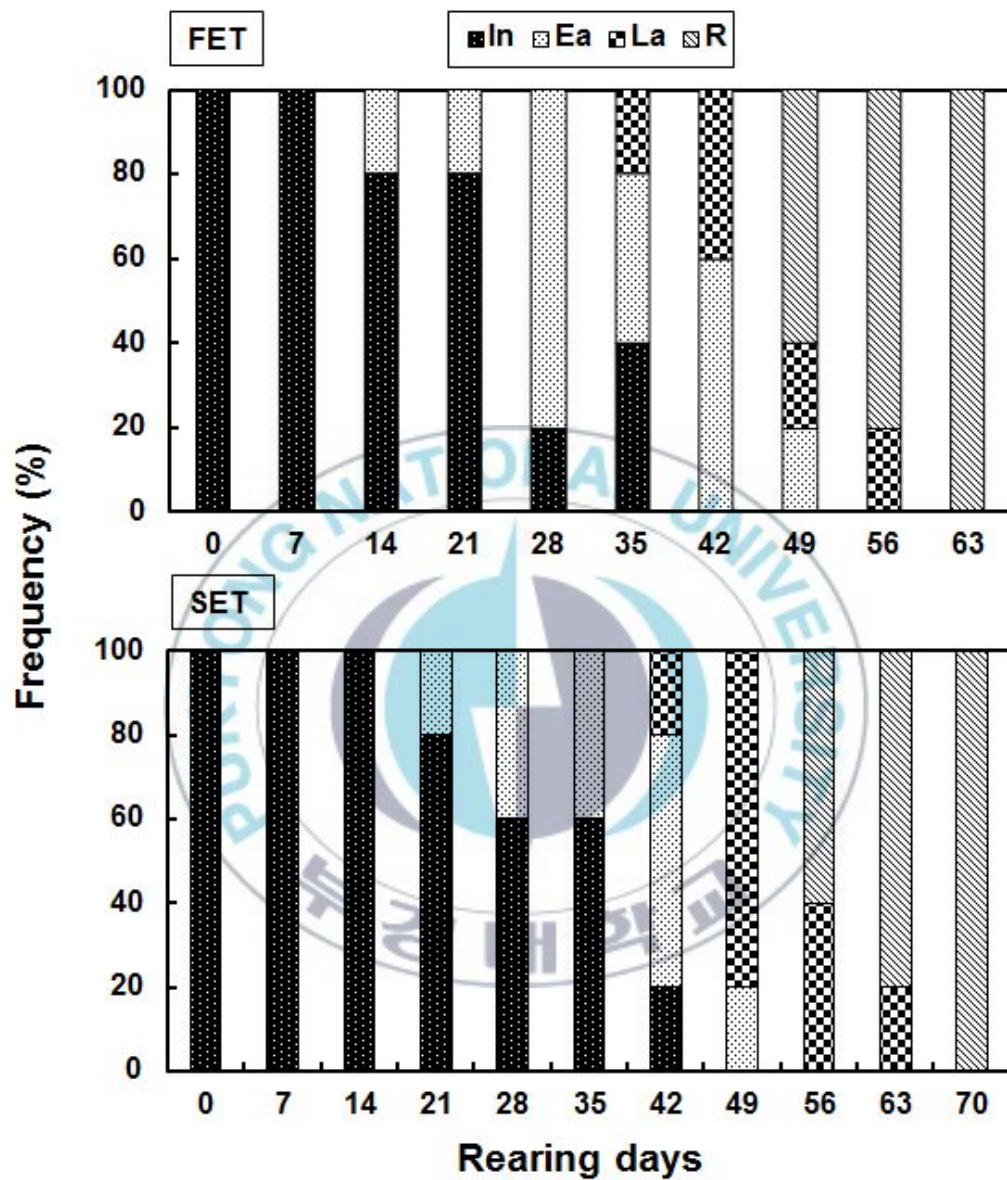


Fig. 7. Frequency of ovarian development stage of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature. In: inactive stage, Ea: early active stage, La: late active stage, R: ripe stage, S: spent stage.

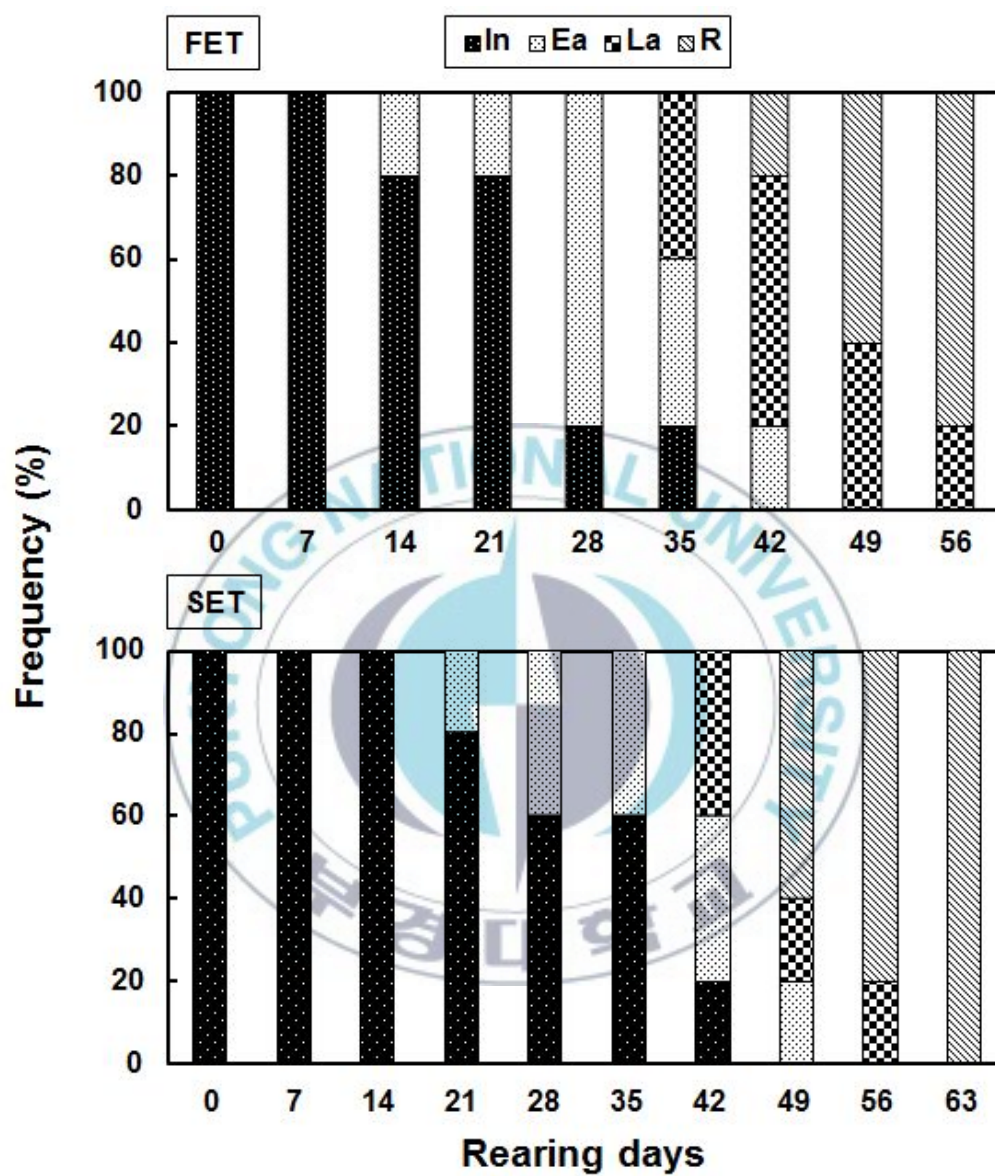


Fig. 8. Frequency of testicular development stage of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature. In: inactive stage, Ea: early active stage, La: late active stage, R: ripe stage, S: spent stage.

3-4. 방란 및 방정 반응률

생식소의 최종 성숙을 조사하기 위하여 산란유발을 실시한 결과, FET 암컷의 경우, 사육 52, 55, 58, 61 및 64일째에 각각 0, 10, 30, 40 및 60%의 개체가 방란하였다. 수컷의 경우, 사육 52, 55 및 58일째에는 각각 10, 30 및 70%의 개체가 방정하였다(Table 1). SET 암컷에서는 사육 58, 61, 64, 66, 69 및 72일째에 각각 0, 10, 20, 20, 40 및 80%의 개체가 방란하였다. 수컷에서는 사육 52, 55, 58, 61, 64 및 66일째에는 각각 0, 20, 30, 40, 30 및 80%의 개체가 방정하였다(Table 2).

3-5. 생물학적영도 및 최종성숙 적산수온

Fig. 9에서 X축은 사육일수(D: day), Y축은 사육수온(WT: °C)을 나타내고 있으며, 이로부터 얻어진 FET과 SET의 암컷의 사육일수와 사육수온의 관계식은 다음과 같다.

$$\text{FET female: } WT_{F, F} = 0.313D_{F, F} + 8.031 \quad (r^2 = 0.955)$$

$$\text{SET female: } WT_{S, F} = 0.255D_{S, F} + 7.813 \quad (r^2 = 0.990)$$

FET에서 암컷의 적산수온 관계식을 $K_{F, F} = H_{F, F} \cdot (T_{F, F} - t_{F, F})$ 로 표시할 수 있고, SET에서 암컷의 적산수온 관계식을 $K_{S, F} = H_{S, F} \cdot (T_{S, F} - t_{S, F})$ 로 표시할 수 있다(Fig. 9). 여기서 $K_{F, F}$ 과 $K_{S, F}$ 는 적산수온, $H_{F, F}$ 와 $H_{S, F}$ 는 생물학적영도에 도달한 후부터 최종성숙까지의 사육일수, $T_{F, F}$ 와 $T_{S, F}$ 는 사육수온, $t_{F, F}$ 와 $t_{S, F}$ 는 생물학적영도이다. 암컷의 적산수온 K_F 가 같기 때문에 $K_{F, F} = K_{S, F}$ 이며, 이로부터 $\int_{h_{F, F}}^{h_{F, F}'} WT_{F, F} - \int_{h_{F, F}}^{h_{F, F}'} t_{F, F} = \int_{h_{S, F}}^{h_{S, F}'} WT_{S, F} - \int_{h_{S, F}}^{h_{S, F}'} t_{S, F}$ 의 관계식을 얻을 수 있다.

여기서 $h_{F, F}$ 와 $h_{S, F}$ 는 실험개시부터 생물학적영도에 이르기까지 소요한 사육일수, $h_{F, F}'$ 와 $h_{S, F}'$ 는 실험개시부터 최종성숙에 이르기까지의 사육일수이다. 생물학적영도가 일정하기에 $t_{F, F} = t_{S, F}$ 이다.

위의 관계식을 이용하여 암컷의 생물학적영도와 최종성숙 적산수온을 구한

Table 1. Spawning response rates of *C. gigas* in fast elevating temperature

Rearing days	Response number *		Response rate (%)	
	♀	♂	♀	♂
52	0/10	1/10	0	10
55	1/10	3/10	10	30
58	3/10	7/10	30	70
61	4/10	–	40	–
64	6/10	–	60	–

* Spawning oyster number/total treated oyster number.

Table 2. Spawning response rates of *C. gigas* in slow elevating temperature

Rearing days	Response number *		Response rate (%)	
	♀	♂	♀	♂
52	–	0/10	–	0
55	–	2/10	–	20
58	0/10	3/10	0	30
61	1/10	4/10	10	40
64	3/10	3/10	20	30
66	2/10	8/10	20	80
69	4/10	–	40	–
72	8/10	–	80	–

* Spawning oyster number/total treated oyster number.

결과, 각각 $t_F=10.5^{\circ}\text{C}$, $K_F=481.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ 이다.

Fig. 10에서 X축은 사육일수(D: day), Y축은 사육수온(WT: $^{\circ}\text{C}$)을 나타내고 있으며, 이로부터 얻어진 FET과 SET에서 수컷의 사육일수와 사육수온의 관계식은 다음과 같다.

$$\text{FET male: } WT_{F, M}=0.341D_{F, M}+7.430 \quad (r^2=0.975)$$

$$\text{SET male: } WT_{S, M}=0.264D_{S, M}+7.591 \quad (r^2=0.994)$$

FET에서 수컷의 적산수온 관계식을 $K_{F, M}=H_{F, M} \cdot (T_{F, M}-t_{F, M})$ 로 표시할 수 있고, SET에서 수컷의 적산수온 관계식을 $K_{S, M}=H_{S, M} \cdot (T_{S, M}-t_{S, M})$ 로 표시할 수 있다(Fig. 10). 여기서 $K_{F, M}$ 와 $K_{S, M}$ 는 적산수온, $H_{F, M}$ 와 $H_{S, M}$ 는 생물학적영도에 도달한 후부터 최종성숙까지의 사육일수, $T_{F, M}$ 와 $T_{S, M}$ 는 사육수온, $t_{F, M}$ 과 $t_{S, M}$ 는 생물학적영도이다. 수컷의 적산수온 K_M 가 같기 때문에 $K_{F, M}=K_{S, M}$ 이며, 이로부터 $\int_{h_F, M}^{h_{F, M}'} WT_{F, M} - \int_{h_F, M}^{h_{F, M}'} t_{F, M} = \int_{h_S, M}^{h_{S, M}'} WT_{S, M} - \int_{h_S, M}^{h_{S, M}'} t_{S, M}$ 의 관계식을 얻을 수 있다.

여기서 $h_{F, M}$ 와 $h_{S, M}$ 는 실험개시부터 생물학적영도에 이르기까지 소요한 사육일수, $h_{F, M}'$ 와 $h_{S, M}'$ 는 실험개시부터 최종성숙에 이르기까지의 사육일수이다. 생물학적영도가 일정하기에 $t_{F, M}=t_{S, M}$ 이다.

위의 관계식을 이용하여 수컷의 생물학적영도와 최종성숙 적산수온을 구한 결과, 각각 $t_M=10.2^{\circ}\text{C}$, $K_M=410.2^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ 이다.

3-6. 생존율

생존율을 조사한 결과, FET에서 7일째까지는 생존율이 100%였고, 35일째에 $97.0\pm0.5\%$ 였으며, 이후 급격하게 낮아져 63일째에는 $85.0\pm1.4\%$ 를 보였다. SET에서 21일째까지는 생존율이 100%였고, 이후 점차 낮아져 사육 70일째에 $89.8\pm1.2\%$ 를 보였다. 실험종료시 FET가 SET에 비해 생존율이 유의하게 낮았다(Fig. 11).

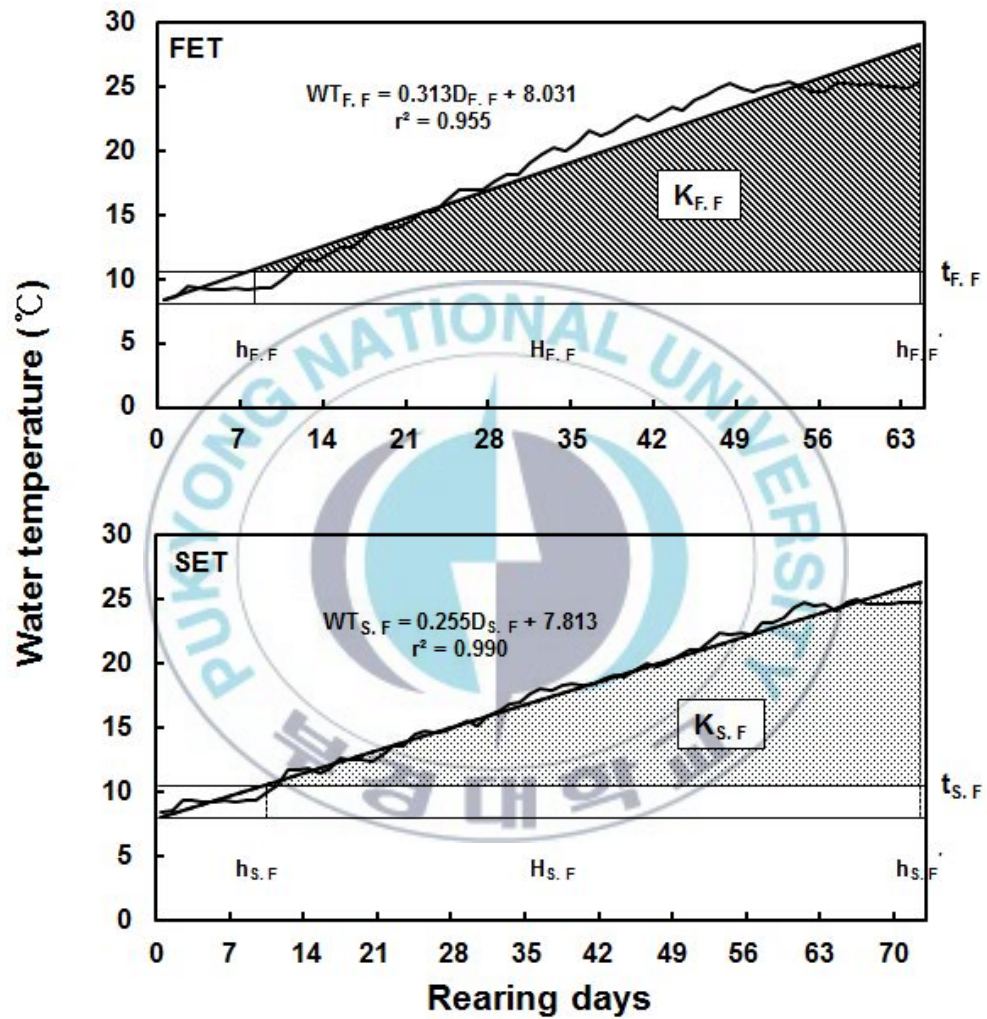


Fig. 9. Regression line of rearing temperature for female of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature.

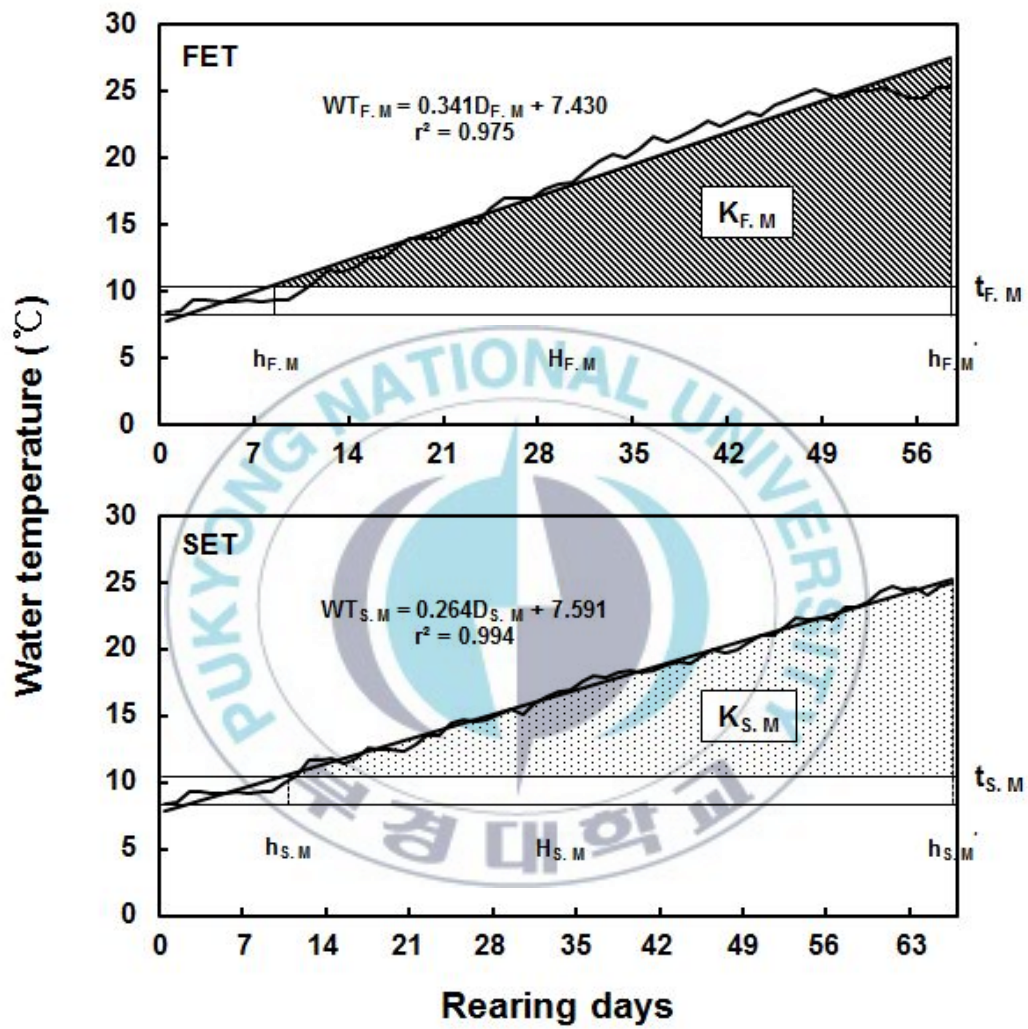


Fig. 10. Regression line of rearing temperature for male of *C. gigas* in fast elevating temperature and slow elevating temperature.

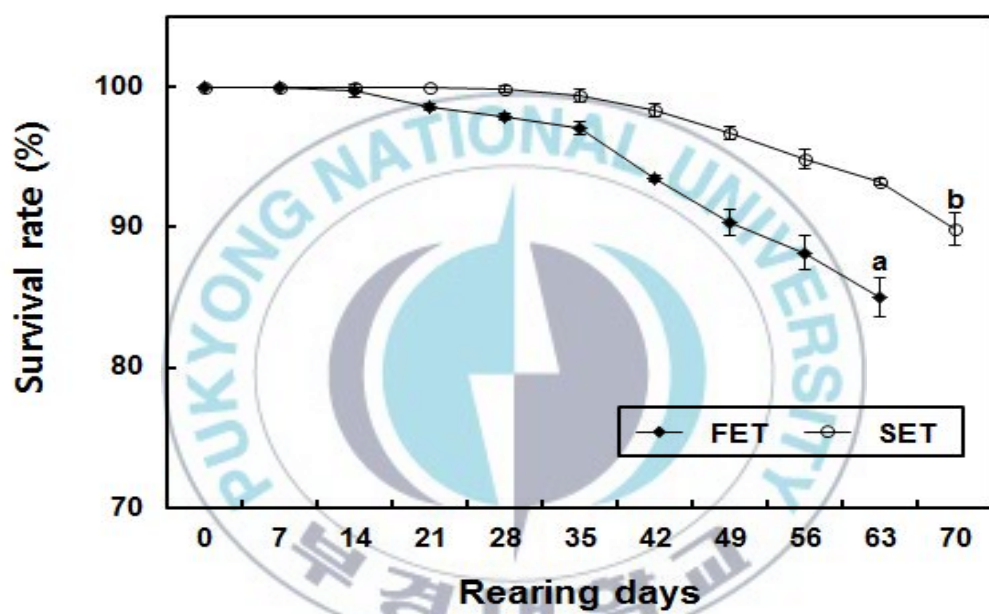


Fig. 11. Change of survival rate in fast elevating temperature and slow elevating temperature.

4. 고 찰

일반적으로 조개류의 성숙과 산란은 수온이나 먹이생물과 같은 서식지의 다양한 환경요인의 영향을 받는데, 그중에서 가장 중요한 요인은 수온으로 알려져 있다(Kennedy et al., 1996). 본 연구에서 실험기간 동안 충분한 양의 먹이생물을 공급하였기에 먹이생물에 따른 생식소 발달의 차이가 없었다고 생각되며, 또한 염분은 32.4~33.8 psu로 생식소의 발달과 관련성을 보이지 않았다. 그러나 수온이 상승됨에 따라 생식세포의 분열, 증식 및 성숙이 관찰되었고, 이는 온대지방에 서식하는 조개류들은 수온이 급격히 상승하는 시기 이후부터 성숙한 난모세포를 관찰할 수 있었다(Chang and Lee, 1982; Chung et al., 1991; Chung et al., 1994; Lee et al., 1997; Park and Lee, 2008)는 연구결과와 유사하여 참굴의 배우자 형성과 성 성숙 또한 수온의 상승과 밀접한 관련성이 있는 것으로 판단된다.

조개류의 산란시기를 추정하기 위해 비만도, 연체부중량지수(FWI), 생식소중량지수(GSI) 및 생식소지수(GI) 등 생체지수 조사에 따른 간접적인 추정방법을 사용되어 왔으며, 대부분 이들의 값이 최대치에 도달할 때에 산란기인 것으로 알려져 있다(Chang and Lee, 1982; Chung et al., 1991; Chung et al., 1994; Lee et al., 1997; Chung et al., 2002; Oh et al., 2002; Chung et al., 2005; Son and Chung, 2005; Chung et al., 2006; Lee et al., 2006; Park and Lee, 2008). Min et al. (2004)에 따르면 거제와 남해산 참굴의 FWI는 각각 비산란기인 4월과 2월에 최대값을 보인 후 점차 감소하였는데, 본 연구에서 FWI의 변화는 19.2~23.6으로 생식소 최종성숙시에도 뚜렷하게 높은 값을 보이지 않았다. 이러한 결과들로 참굴의 최종성숙과 산란시기를 추정하는데 FWI는 적합하지 않다고 판단된다. 이는 고수온기에 연체부의 중량이 증가되는 동시에 패각도 성장이 이루어져서 상대적으로 FWI의 값이 뚜렷하게 증가하지 않았던 것으로 생각되어 진다(Oh et al., 2002).

참굴의 생식소는 내장괴(visceral mass)에 둘러싸여 있어 독립된 기관으로 존재하지 않기에 생식소만을 정확히 떼어내어 산란기를 추정하기 어려웠다. 본 연구에서는 조직학적 관찰에 의해 산정된 GI를 사용하였으며, 암·수의 GI는 실험개시시 1.0이었던 것이 수온 상승과 더불어 증가하여 실험 종료시까지 암컷은 4.0, 수컷은 3.8~4.0을 보여, 꼬막 *Tegillarca granosa*, 개조개 *Saxidomus purpuratus*, 키조개 *Atrina pectinata* 및 홍합 *Mytilus coruscus*과 유사하였다(Kim et al., 2009; Shin et al., 2007; Lee et al., 2006; Wi et al., 2003).

대부분의 조개류는 외형이나 생식소 색깔에 의한 암·수의 성 구별이 어려우며, 성숙한 참굴의 생식소 역시 암·수 모두 유백색으로 생식소 색깔에 의한 구별이 어렵다. 조직학적으로 관찰한 결과, 모든 개체는 난소 또는 정소의 존재에 따라 암·수로 구분되었고, 난소와 정소를 함께 가지는 자웅동체형 개체 없이 자웅이체인 것으로 조사되었다.

Min et al. (2004)은 거체와 남해산 참굴의 생식주기를 조사한 결과 초기발달기, 후기발달기, 완숙기, 부분산란기 및 퇴화/휴지기의 연속적인 5단계로 구분할 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서는 비활성기, 초기활성기, 후기활성기 및 완숙기의 4단계로 구분할 수 있었다.

본 연구에서 실험 개시시 수온이 8.4℃일 때 모든 개체들이 비활성기로 암·수 구분이 어려웠고, 그 후 생식세포의 분열증식이 일어나 수온 11.9℃ 및 12.9℃에서 초기활성기 개체가 나타났다. 수온 15.0℃ 이상에서 생식세포가 급격히 성장하여 수온 18.8℃ 및 20.7℃에서 후기활성기 개체가 관찰되었다. 완숙기 개체는 암컷에서는 수온 22.3℃ 이상, 수컷에서는 20.5℃ 이상에서 나타났다. Lu et al. (1998)에 따르면, 실내에서 가온 사육한 참굴은 수온 1.0℃에서는 비활성기였고, 수온이 10.0℃로 상승한 후 초기활성기로 발달하다가 14.0~20.0℃에서 생식세포가 빠르게 성장하여 23.0℃에서는 성숙한 난모세포들이 다수 관찰되었으며, 수온 23.0~25.0℃에서 산란유발시 방란·방정이 일어났다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다.

본 연구에서 연중 수온이 가장 낮은 2월에 모패를 가온사육 방법을 통하여 생식소 성숙을 유도한 결과, FET에서 암컷은 64일째에 60%의 개체가 방란을 하였고, 수컷은 58일째에 70%의 개체가 방정하였다. 한편, SET에서 암컷과 수컷은 각각 72일째와 66일째에 80%의 개체가 방란·방정을 하여 가온사육 방법으로 생식소 최종성숙이 유도되었다. 이는 가온사육에 의한 생식소 성숙유도가 가능하다는 다른 연구결과와 일치하였다(Loosanoff and Davis, 1952; Loosanoff and Davis, 1963; Lu et al., 1998; Min et al., 2004).

본 연구에서 참굴 암·수의 생물학적영도가 각각 10.5℃와 10.2℃로 조사되었다. 이는 초기활성기 개체(11.9℃)가 관찰된 수온보다 낮았고, 또한 버지니아굴은 수온 10.0℃에서 35일간 사육한 후 생식소가 발달하지 않았다(Loosanoff and Davis, 1952)는 결과를 종합하면 본 연구에서 구한 생물학적영도가 합당하다고 생각된다. 한편, 암컷의 적산수온 관계식으로 구한 최종성숙 적산수온은 481.5℃·d이고, FET와 SET에서 실제 사육환경의 적산수온은 각각 500.0℃·d와 478.3℃·d이다. 그리고 수컷의 적산수온 관계식으로 구한 최종성숙 적산수온은 410.2℃·d이고, FET와 SET에서 실제 사육환경의 적산수온은 각각 407.8℃·d와 391.4℃·d이다. FET 암컷과 SET 수컷에서 관계식으로 구한 적산수온과 실제 사육환경의 적산수온 사이에 다소 차이가 보이지만, 그러나 25℃의 사육환경에서 18.5℃·d와 18.8℃·d의 차이는 하루 정도의 차이로서 생식소 성숙유도시 본 연구 결과의 적용이 충분히 가능하다고 생각된다. 참굴의 최종성숙 적산수온에 있어서 Min et al. (2004)과 Lu et al. (1998)는 10.0℃를 기준으로 최종성숙까지의 적산수온이 각각 441.3℃·d와 628.8℃·d라고 보고하였는데, 이러한 차이는 모패의 서식지역의 차이에서 기인된 것으로 생각된다(Liang et al., 2007; Li et al., 2007).

III. 난모세포의 성숙유도

1. 서 설

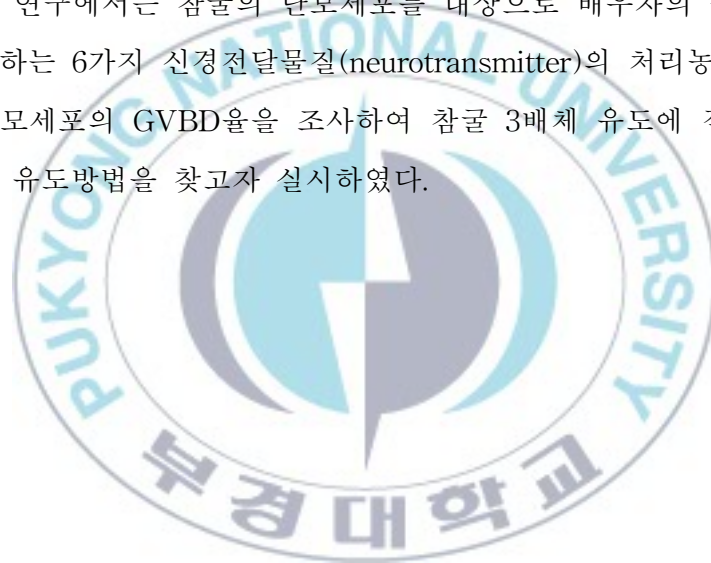
일반적으로 약품 처리에 의한 3배체를 유도하는 과정에서 일시적으로 대량의 수정란을 확보하기 위해 절개법으로 알과 정자를 채취한다. 그러나 수정시 알의 성숙도의 차이로 인해 발생 속도가 큰 차이를 보여 3배체의 유도율을 저하시키는 원인으로 작용하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 적절한 난모세포의 체외 성숙 유도를 통하여 수정 후 발생단계의 일치성을 높이는 것이 필요하다.

조개류에 있어 난소에서 적출한 난모세포는 제1감수분열 전기에 머물러 있으며 난모세포의 중앙에 위치해 있는 상대적으로 투명한 난핵포(GV: germinal vesicle)를 관찰할 수 있다. 그러나 난핵포는 성숙분열인자에 의해 감수분열이 재개되면서 난핵포의 핵막이 소실되고 염색질이 세포질과 섞임으로써 사라지게 된다. 이러한 난핵포의 소실과정을 난핵포붕괴(GVBD: germinal vesicle breakdown)라고 하며, 이는 난모세포의 최종성숙(final maturation)의 형태적인 지표이다(Eppig, 1982; Hirai et al., 1988; Osanai, 1985; Osanai and Kuraishi, 1988). 한편, 조개류의 알의 수정 시기는 크게 두 가지 유형으로 나눌 수 있는데 즉, 바지락이나 가리비와 같이 GVBD가 일어난 후에 수정이 가능한 종과 참굴, 개량조개 및 북방대합과 같이 난모세포의 GVBD와 상관없이 수정이 가능한 종으로 나누어진다. 그러나 참굴에 있어서 최종적으로 GVBD가 일어나지 않는 알들은 정핵과 난핵의 융합이 이루어질 수 없어 발생을 하지 않는 것으로 알려져 있다(Longe et al., 1993; Ren et al., 2000).

조개류의 난모세포 성숙유도에 관한 연구는 바지락류 *Ruditapes decussatus*,

백합류 *Mercenaria mercenaria*, 북방대합류 *Spisula solidissima*, 참가리비, 비단가리비, 참굴 등이 있다(Hamida et al., 2004; Wang et al., 2008; Dubé and Eckberg, 1997; Osada et al., 1998; Di et al., 2011; Wang et al., 1997a; Kyoizuka et al., 1997). 그리고 KCl, 암모니아해수, 비타민 및 serotonin 등 외인성 물질이 적출된 난모세포의 GVBD에 효과적이라고 보고되고 있다(Dubé and Guerrier, 1982; Di et al., 2011; Wang et al., 1997a; Osada et al., 1998; Hamida et al., 2004; Wang et al., 2008). 그러나 지금까지 3배체 굴의 종묘생산을 위한 난모세포 최종성숙에 관한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

따라서 본 연구에서는 참굴의 난모세포를 대상으로 배우자의 증식, 성숙 및 산란에 관여하는 6가지 신경전달물질(neurotransmitter)의 처리농도별 및 처리시간별로 난모세포의 GVBD율을 조사하여 참굴 3배체 유도에 적합한 난모세포 최종성숙 유도방법을 찾고자 실시하였다.



2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패는 국립수산물과학원 남동해수산연구소 남해센터 시험용 가두리에서 수하식으로 14개월 양성한 참굴(Table 3)을 사용하였다. 모패는 실내 사육실로 옮겨 이물질을 제거한 다음, 1.6톤 FRP 사각수조(2.0×1.0×0.8 m)에서 24시간 동안 안정시킨 후 실험에 사용하였다. 실험간 동안 수온은 $18.3 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$, 염분은 31.1 ± 1.3 psu였다.

2-2. 난모세포의 채취

난모세포는 난소를 얇게 저민 다음 인공해수(pH 7.0)에 풀어 각각 $55\ \mu\text{m}$ 와 $16\ \mu\text{m}$ 의 필터로 여과한 후, 충분한 양의 인공해수로 씻어 찌꺼기를 제거하고, 500 mL 비커에 옮겨 수용밀도를 10,000개/mL로 조절하여 실험에 사용하였다. 인공해수는 2차 증류수에 각각 NaCl (423 mM), CaCl_2 (9.3 mM), KCl (9 mM), MgCl_2 (23 mM), MgSO_4 (25.5 mM), NaHCO_3 (2.15 mM) 및 Pipes (5 mM)를 녹인 후 1 M 염산으로 pH를 7.0으로 조절하였다.

2-3. 난모세포의 성숙유도

Acetylcholine(ACh), adrenaline(AD), noradrenaline(NA), dopamine(DA), serotonin(5-HT) 및 histamine(HA)을 인공해수(pH 7.0)에 녹여 각각 2×10^{-9} M, 2×10^{-8} M, 2×10^{-7} M, 2×10^{-6} M, 2×10^{-5} M, 2×10^{-4} M 및 2×10^{-3} M 농도의 신경전달물질해수를 만들었다. 그 다음, 각 well (24-well plate)에 난모세포해수와 신경전달물질해수를 각각 0.5 mL씩 넣어 신경전달물질의 최종농도를 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M로 조절하였고, 대조구는 같은 양의 인공해수(pH 7.0)를 넣었다. 침지시간은 실험개시 15, 30, 45 및 60분으로 하였다. 난모세포 수용밀도는 5,000개/mL, 배양온도는 20°C 였다.

Table 3. Size and GDSI of *C. gigas* used in the treatment of six neurotransmitters

Treatment	Shell length (mm)	Flesh weight (g)	GD weight (g)	GDSI	Number
ACh	53.3±1.7	15.5±3.0	7.0±1.8	45.0±2.6	3
AD	54.3±5.1	18.0±4.0	8.1±1.6	45.1±1.8	3
NA	50.6±7.9	13.6±3.2	6.1±1.8	44.2±2.9	3
DA	48.9±3.8	14.0±4.3	6.2±1.6	44.9±2.5	3
5-HT	52.2±11.8	16.7±5.9	7.4±2.5	44.9±1.0	3
HA	49.5±1.3	13.9±0.7	6.3±0.2	45.7±3.4	3
Average	51.5±5.8	15.3±3.7	6.9±1.6	44.9±2.2	18

ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine, GD: gonad and digestive diverticula. GDSI=gonad and digestive diverticula weight/flesh weight. Data presented as mean±SD (n=3).

2-4. GVBD을 조사

신경전달물질의 종류, 농도 및 침지시간에 따른 난모세포의 성숙유도 효과를 조사하기 위하여 각 well에 0.1 mL의 GF고정액(glutaraldehyde:formalin:natural seawater=2:5:13)을 넣었다. 그 다음, 도립현미경 200배에서 난모세포의 GVBD(Fig. 12) 여부를 확인하였다. GVBD율은 전체 난모세포에서 GVBD한 난모세포가 차지하는 백분율로 표시하였다.

2-5. 통계분석

모든 실험결과는 PASW 통계프로그램(Ver. 19)을 사용하여 one way-ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.



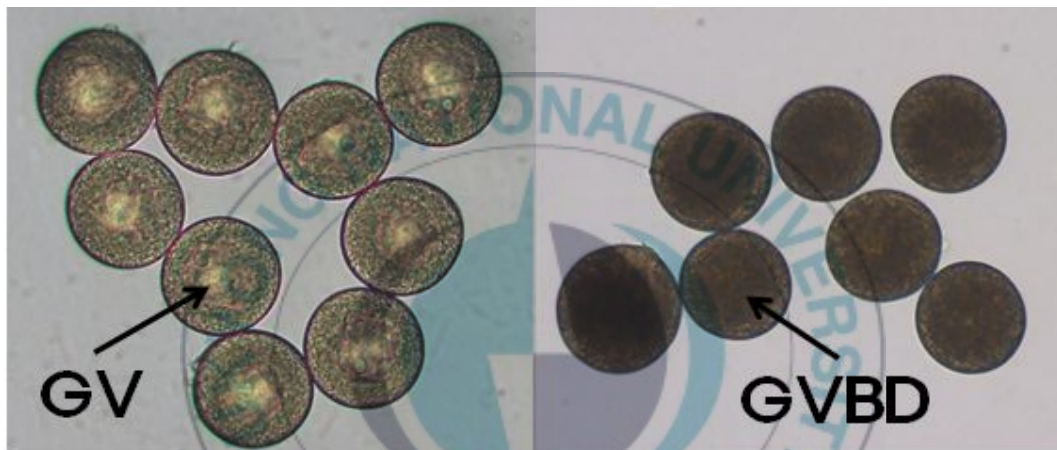


Fig. 12. Immature and mature oocytes of *C. gigas*. GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown.

3. 결 과

3-1. ACh의 GVBD율

ACh의 경우 모든 농도에서 15, 30, 45 및 60분 처리시 GVBD율은 각각 1.5~3.5, 1.7~4.0, 1.8~4.0 및 1.3~4.7%로 농도 및 처리시간에 따른 차이가 없어($P>0.05$), 난모세포의 GVBD에 비효과적인 것으로 나타났다(Fig. 13).

3-2. AD의 GVBD율

AD에 있어 모든 농도에서 15, 30, 45 및 60분 처리시 GVBD율은 각각 1.3~4.2, 2.5~5.8, 3.2~8.3 및 2.2~9.7%였다. 농도가 높을수록 그리고 처리시간이 길수록 GVBD율이 높아지는 경향을 보였으나, 실험구간에 차이가 없어($P>0.05$), 난모세포의 GVBD에 효과가 없었다(Fig. 14).

3-3. NA의 GVBD율

NA는 모든 농도에서 15, 30, 45 및 60 처리시 GVBD율은 각각 1.8~3.2, 2.2~6.7, 0.8~4.3 및 2.0~5.5%로 농도 및 처리시간에 따른 차이가 없어($P>0.05$), 난모세포의 GVBD에 비효과적이었다(Fig. 15).

3-4. DA의 GVBD율

DA에 있어서 모든 농도에서 15, 30, 45 및 60분 처리시 GVBD율은 각각 1.7~4.0, 3.3~7.7, 3.7~8.7 및 3.0~11.0%였다. 10^{-3} M의 높은 농도에서는 처리시간이 길수록 GVBD율이 높아지는 경향을 보였으나, 실험구간에 차이가 없어($P>0.05$), 난모세포의 GVBD에 효과가 없었다(Fig. 16).

3-5. 5-HT의 GVBD율

5-HT 처리에 따른 난모세포의 GVBD율은 Fig. 17에 나타낸 바와 같다.

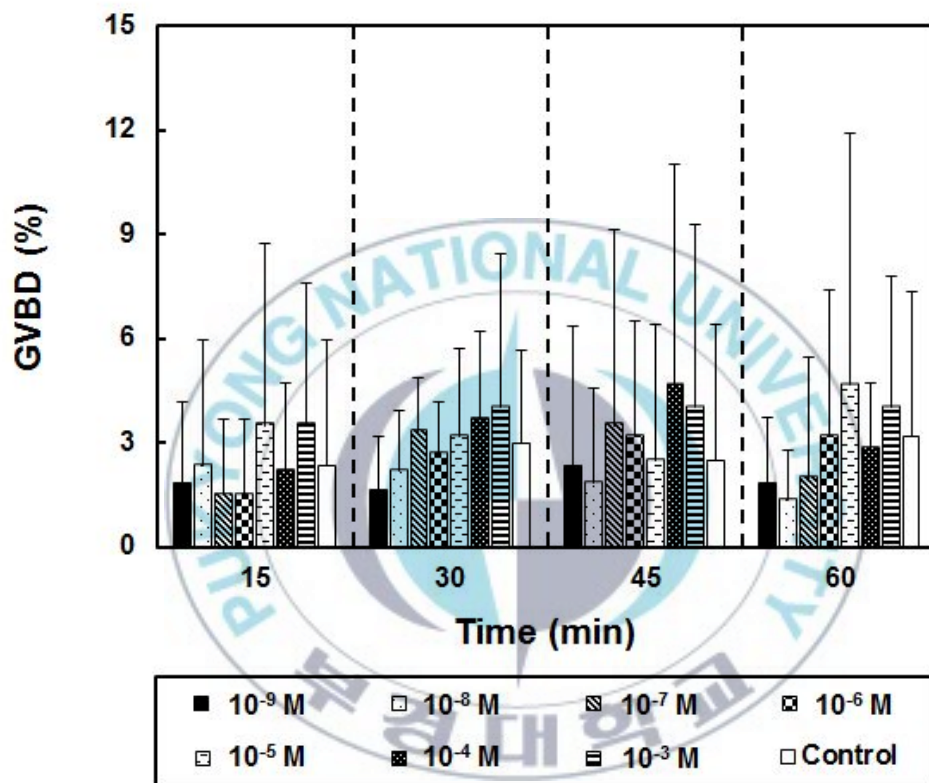


Fig. 13. Effects of acetylcholine on GVBD in *C. gigs* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of acetylcholine, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3).

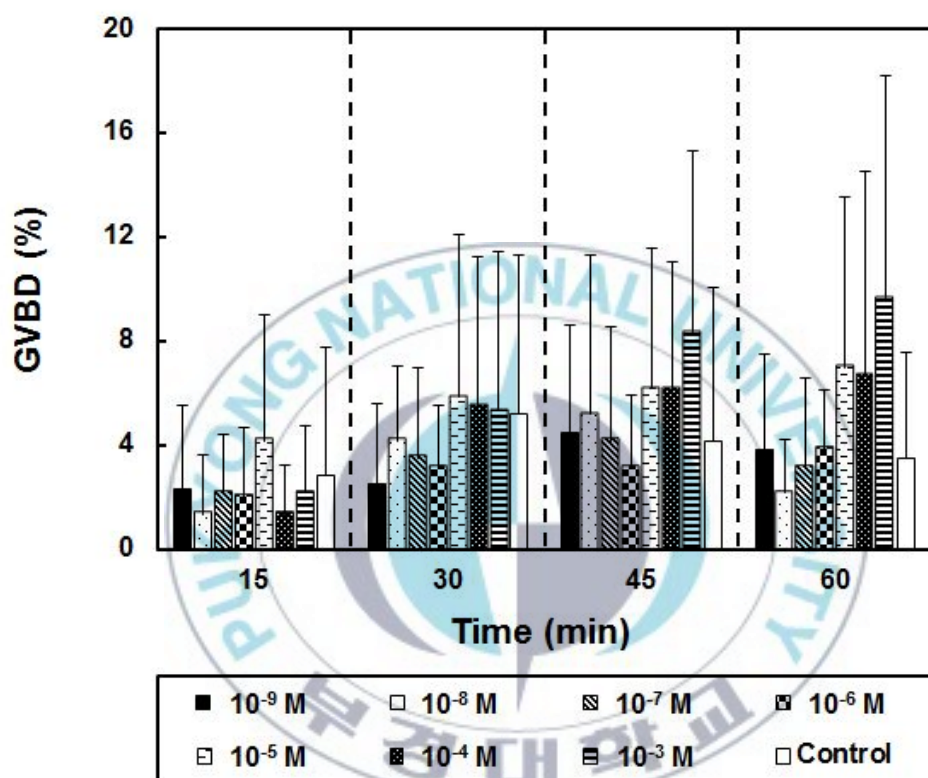


Fig. 14. Effects of adrenaline on GVBD in *C. gigs* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of adrenaline, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3).

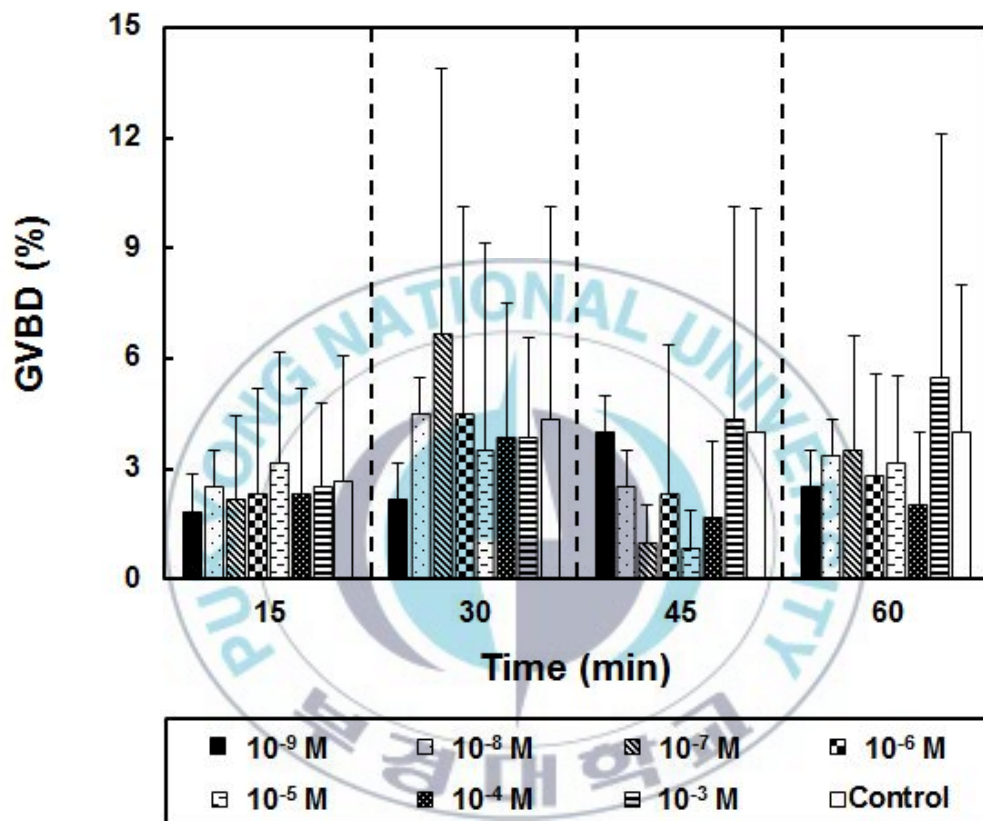


Fig. 15. Effects of noradrenaline on GVBD in *C. gigs* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of noradrenaline, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3).

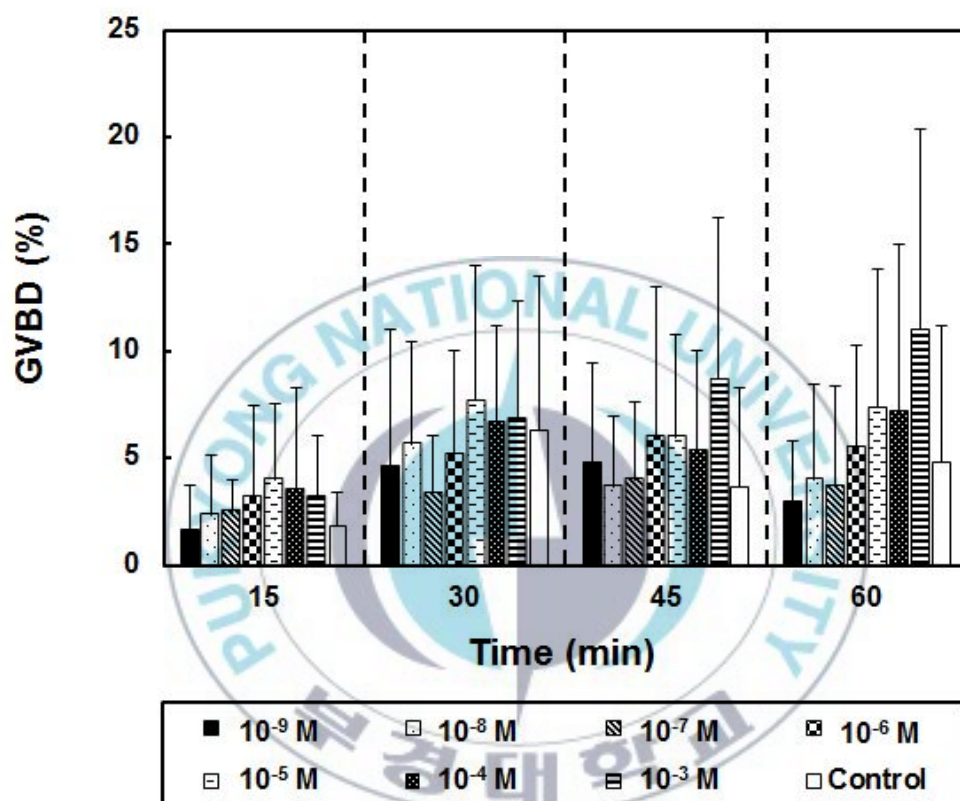


Fig. 16. Effects of dopamine on GVBD in *C. gigas* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of dopamine, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3).

10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M의 농도로 난모세포를 15분 처리시 GVBD율은 각각 3.8 ± 3.8 , 5.2 ± 5.4 , 41.7 ± 34.9 , 71.5 ± 27.6 , 75.8 ± 29.3 , 74.5 ± 33.1 및 $57.7 \pm 38.1\%$ 였다. $10^{-6} \sim 10^{-3}$ M에서 실험구간의 차이가 없었으나($P > 0.05$), 10^{-9} M, 10^{-8} M 및 대조구보다 유의하게 높은 GVBD율을 보였다($P < 0.05$). 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M의 농도에서 난모세포를 30분 처리시 GVBD율은 각각 6.8 ± 6.3 , 11.8 ± 13.4 , 49.0 ± 34.8 , 92.8 ± 7.8 , 96.7 ± 3.1 , 88.2 ± 16.8 및 $74.2 \pm 22.5\%$ 였다. $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M에서 실험구간의 차이가 없었으나($P > 0.05$), $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M 및 대조구보다 유의하게 높은 GVBD율을 보였다($P < 0.05$). 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M의 농도로 난모세포를 45분 처리시 GVBD율은 각각 7.0 ± 5.8 , 14.0 ± 14.3 , 51.7 ± 38.0 , 88.5 ± 11.3 , 96.5 ± 3.3 , 96.0 ± 6.1 및 $72.0 \pm 24.4\%$ 였다. $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M에서 실험구간의 차이가 없었으나($P > 0.05$), $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M 및 대조구보다 유의하게 높은 GVBD율을 나타냈다($P < 0.05$). 60분 처리시 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M에서 난모세포의 GVBD율은 각각 6.7 ± 5.8 , 13.8 ± 13.6 , 51.7 ± 33.3 , 89.0 ± 9.6 , 97.7 ± 4.0 , 97.5 ± 4.3 및 $80.5 \pm 19.8\%$ 였다. $10^{-6} \sim 10^{-3}$ M에서 실험구간의 차이가 없었으나($P > 0.05$), $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M 및 대조구보다 유의하게 높은 GVBD율을 보였다($P < 0.05$). 15~60분 처리시 10^{-5} M의 농도에서 가장 높은 GVBD율을 나타냈고, 처리시간이 길수록 GVBD율이 높아지는 경향을 보였으나, 처리시간에 따른 차이는 확인되지 않았다(Fig.17).

3-6. HA의 GVBD율

HA는 모든 농도에서 15, 30, 45 및 60분 처리시 GVBD율은 각각 2.0~4.0, 3.5~5.5, 2.7~5.0 및 3.3~4.0%로 농도 및 처리시간에 따른 차이가 없어($P > 0.05$), 난모세포의 GVBD에 비효과적인 것으로 나타났다(Fig. 18).

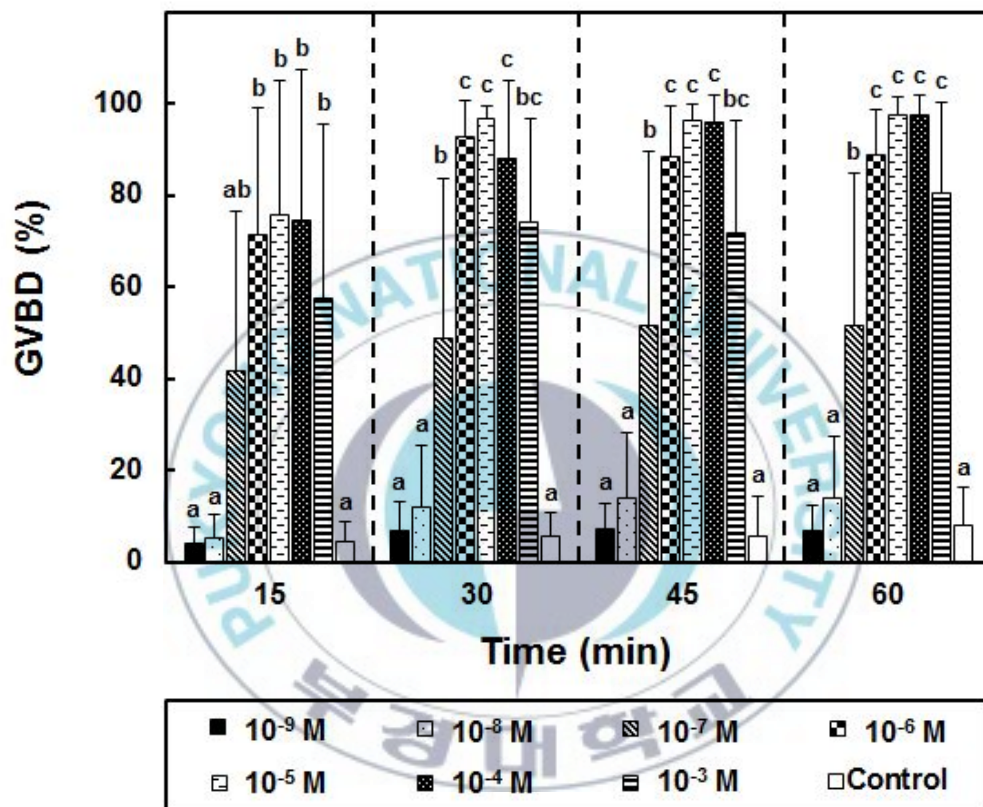


Fig. 17. Effects of serotonin on GVBD in *C. gigs* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of serotonin, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

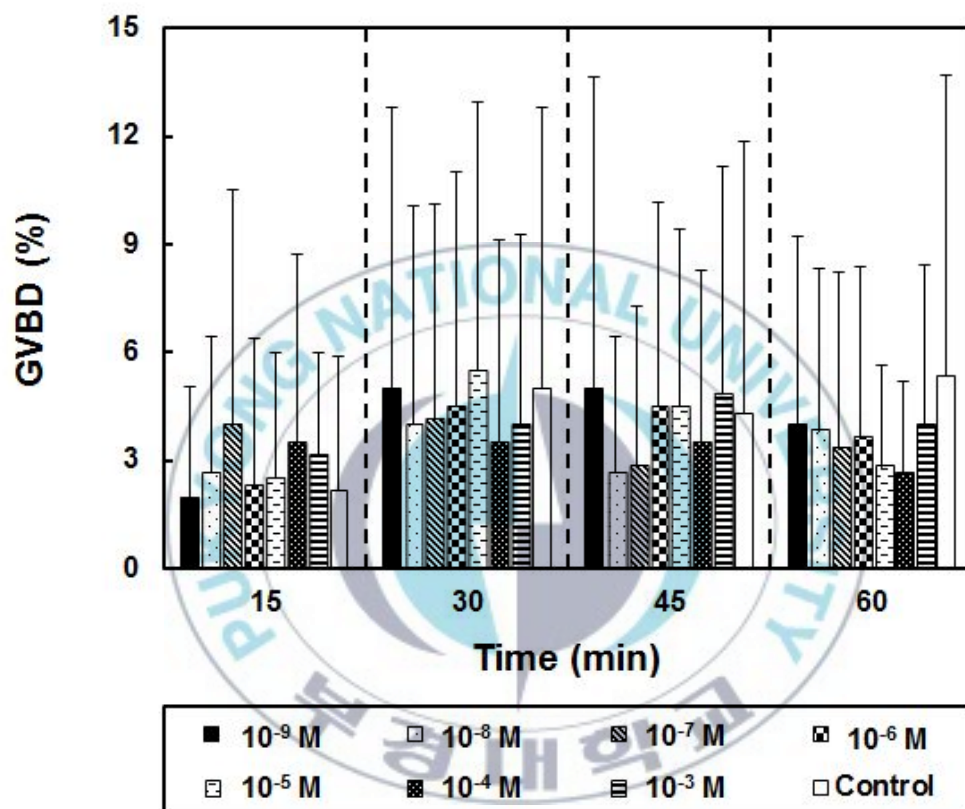


Fig. 18. Effects of histamine on GVBD in *C. gigas* oocytes. Oocytes were incubated in ASW (pH 7.0) containing different concentrations of histamine, and percentage of GVBD was scored after 15, 30, 45 and 60 min. Values are means $\pm$ SD (n=3).

4. 고 찰

난모세포의 최종성숙은 조개류의 수정 및 발생에 있어 매우 중요한 과정이다. 참굴의 알은 GVBD와 상관없이 수정은 가능하나(Osanai, 1985; Stephano and Gould, 1988; Longo et al., 1993) GVBD가 일어나지 않는 미성숙란은 성숙란에 비해 수정 후 발생속도가 느린 것으로 알려져 있다(Wang et al., 1997a). 또한, GVBD가 일어나지 않는 알들은 수정 후 발생을 할 수 없기 때문에 정상적인 발생을 위해서 GVBD가 필수적인 과정이라고 보고하였다(Longo et al., 1993; Wang et al., 1997a; Ren et al., 2000). 그러나 참굴 난소를 절개하여 적출한 알은 대부분 제1차 감수분열 전기의 상태에 머물고 있다(Ren et al., 2001).

본 연구에서 ACh, AD, NA, DA 및 HA는 처리농도와 처리시간에 따른 난모세포 GVBD율의 차이가 보이지 않아, 이와 같은 신경전달물질은 난모세포의 최종성숙에 비효과적인 것으로 판단된다. 그러나 DA의 경우 여과해수에 녹여 실시한 예비실험에서 10^{-5} M 이상의 고농도에서는 대조구보다 높은 GVBD율을 보였다. 또한, 본 연구에서도 DA의 농도가 높을수록 그리고 처리시간이 길수록 GVBD율이 높아지는 경향을 보였다. 본 연구에서는 DA의 활성이 억제되었는데, 이는 낮은 pH (7.0)에서 기인된 것으로 생각된다(Osanai, 1985). 따라서 pH에 따른 DA의 난모세포 최종성숙 유도효과에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각되어 진다.

5-HT는 조개류의 생식소, 소화맹낭 및 폐각근 등 조직에 분포되어 있는 신경전달물질(López-Sánchez et al., 2009)로서 배우자의 증식, 성숙 및 산란 등 일련의 번식생리 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Fong et al., 1994). 특히, 조개류 난모세포의 GVBD 자극물질로 알려져 있으며(Dubé and Eckberg, 1997; Kyojuka et al., 1997; Osada et al., 1998; Hamida et al., 2004; Wang et al., 2008; Di et al., 2011), 난모세포 표면에 존재하는 G단백질결합수

용체와 결합한 후, 세포막의 신호전달경로를 자극하여 2차전달자를 활성화시킴으로써 난모세포 내에 일련의 반응을 일으켜 최종성숙이 일어난 것으로 알려져 있다(Wang et al., 2008). Kyoizuka et al. (1997)에 따르면, 참굴의 난모세포를 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M의 5-HT로 1시간 처리시 90%의 GVBD율을 보였다. 본 연구에서도 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M의 5-HT로 30분 이상 처리시 90% 이상의 GVBD율을 나타내, 5-HT가 참굴 난모세포의 최종성숙에 효과 있는 것으로 판단된다. 본 연구에서 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M의 고농도에서 10^{-8} M 이하의 저농도보다 높은 GVBD율을 보여 농도에 따른 차이를 보였으나, 처리시간에 따른 차이는 확인되지 않았다. 그러나 백합류 *M. mercenaria*에서는 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ M의 5-HT로 난모세포 처리시 농도에 따른 GVBD율의 차이는 없었으나, 처리시간에 따른 차이가 있었다고 보고하였다(Wang et al., 2008). 또한, Di et al. (2011)은 비단가리비의 난모세포를 $10^{-3} \sim 4 \times 10^{-3}$ M의 5-HT로 처리하였을 때 GVBD를 유도되지 않았다고 보고하였다. 이러한 결과들로 조개류 난모세포의 GVBD 기구는 종의 특이성이 매우 큰 것으로 판단된다.

IV. 산란유발

1. 서 설

참굴의 방출란이 적출란에 비해 수정시 정상 발생률이 높고(Stephano and Gould, 1988), 특히 발생 속도가 일정하여 3배체 유도시 보다 높은 유도율과 부화율을 얻을 수 있다. 이러한 이유로 성숙한 어미로부터 일시적으로 대량의 알을 안정적으로 얻기 위하여 최적 산란유발 방법을 조사하는 것이 필요하다.

조개류에 있어 산란은 내부와 외부의 요인에 의해 조절된다. 지금까지 패류의 산란유발 자극에는 물리적 자극(Loosanoff and Davis, 1963), 화학적 자극(Kikuchi and Uki, 1974; Gibbons and Castagna, 1984; Lee et al., 1996) 및 생물적 자극(Matsutani and Nomura, 1982) 등이 있으며, 산란유발시 이러한 방법들을 단독 또는 병행하여 사용하였다. 그러나 물리적 자극은 서식지의 환경이나 모패의 사육조건에 따라 유발률 및 소요시간이 큰 차이를 보여 계획적인 채란이 어렵다. H_2O_2 나 NH_4OH 등 화학물질 침지자극은 반응개시까지 소요된 시간이 길고, 게다가 화학물질의 독성으로 인해 수정 및 부화에 부정적인 영향을 미친다(Lee et al., 1996). 굴에서 정자현탁액의 첨가가 효과적인 산란유발 방법이라고 보고하였으나(Loosanoff and Davis, 1963), 이와 같은 자극에 의해 방출된 알은 방출과 동시에 수정이 이루어지기에 3배체 유도에는 적합하지 않는다. 5-HT를 비롯한 신경전달물질이 조개류의 산란에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀짐(Matsutani et al., 1982; Fong et al., 1996)에 따라, 이와 같은 물질을 사용하여 안정적인 채란·채정이 가능하다는 것이 여러 연구에서 보고되고 있다(Gibbons and Castagna, 1984; Braley, 1985; Alcazar et al., 1987; Vélez et al., 1990; O'Connor and Heasman, 1995; Velasco et al., 2007). 그러나 이러한 연구들은 대부분 산란시기나 산란가능성에 대한 조사로

서 종묘생산을 위한 산란유발 방법에 관한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

따라서 본 연구에서는 참굴을 대상으로 신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 효과적인 산란유발 방법을 파악하고, 이로부터 얻어진 알과 정자를 수정시켜 수정률 및 부화율을 조사하여 참굴 3배체 유도에 적합한 산란유발 방법을 찾고자 실시하였다.



2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패로서 국립수산물과학원 남동해수산연구소 남해센터 시험용 가두리에서 수하식으로 12-14개월 양성한 참굴(Table 4, Table 5)을 사용하였다. 모패는 실내 사육실로 옮겨 이물질을 제거한 다음, 1.6톤 FRP 사각수조(2.0×1.0×0.8 m)에서 24~48시간 동안 안정시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 수온은 20.2±1.7℃, 염분은 31.3±1.5 psu였다.

2-2. 산란유발

모패의 좌각을 일부 제거한 후, 성숙상태를 확인하고 암·수를 구별하였다. 실험용액은 acetylcholine, adrenaline, noradrenaline, dopamine, serotonin 및 histamine을 0.22 μ m cellulose acetate membrane 여과해수(32.3~33.2 psu, pH 8.05~8.08)에 녹여 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} M 농도로 만든 후 실험에 사용하였다. 산란유발은 0.5 mL insulin syringe로 실험용액 100 μ L를 생식소 부위에 주사한 후, 2 L 유리 비커에 각각 1개체씩 수용하여 실시하였다. 대조구로서 같은 양의 인공해수를 주사하였고, 수온은 18.0~20.0℃였다. 산란유발 효과는 주사 후부터 3시간까지의 반응률, 반응 개시시간, 산란·방정량을 조사하였다.

2-3. 수정률 및 부화율 조사

방출된 알의 난질을 파악하기 위하여 동일한 처리로 얻어진 알과 정자를 수정시켜 수정률과 부화율을 조사하였다. 수정 및 부화는 100 mL 비커에서 실시하였다. 알의 수용밀도는 100개/mL, 정자와 알의 비율은 500~2,000:1, 수온은 25℃, 염분은 31.3~32.5 psu였다. 수정률은 2세포기까지 발생한 알의 백분율로 계산하였고, 부화율은 수정란에서 D상유생까지의 발생률로 계산하였다. 그리고 형태적으로 기형을 나타내는 것은 죽은 것으로 간주하였다.

Table 4. Number and size of *C. gigas* used in spawning induction for injection of acetylcholine, adrenaline and noradrenaline

Stimulus	Dose (M)	Sex	Number	Shell length (mm)	Total weight (g)
ACh	10^{-6}	♀	15	49.2±5.1	60.9±14.5
		♂	15	49.6±6.7	54.1±12.7
	10^{-5}	♀	15	47.6±7.5	53.8±16.9
		♂	15	51.3±8.2	56.0±18.7
	10^{-4}	♀	15	50.0±8.2	56.6±16.4
		♂	15	53.6±7.3	58.9±18.8
	10^{-3}	♀	15	48.6±8.2	53.4±16.1
		♂	15	54.3±6.8	65.5±18.0
	Control	♀	15	50.7±9.2	57.9±15.1
		♂	15	50.8±6.4	54.9±11.6
AD	10^{-6}	♀	20	53.3±7.3	62.2±21.0
		♂	20	51.7±7.0	60.6±15.5
	10^{-5}	♀	20	52.4±8.2	64.3±22.8
		♂	20	53.6±6.9	64.3±16.1
	10^{-4}	♀	20	53.6±7.2	65.8±19.7
		♂	20	51.6±6.3	66.9±23.6
	10^{-3}	♀	20	55.7±4.8	66.7±18.1
		♂	20	56.5±5.9	66.7±15.6
	Control	♀	20	51.0±5.7	60.6±18.3
		♂	20	56.7±5.3	64.2±10.2
NA	10^{-6}	♀	15	54.0±10.2	67.1±26.7
		♂	15	54.9±6.2	72.1±17.6
	10^{-5}	♀	15	57.2±5.9	66.6±9.5
		♂	15	55.0±5.9	73.4±24.5
	10^{-4}	♀	15	53.2±7.2	62.0±15.4
		♂	15	56.8±6.2	67.5±8.7
	10^{-3}	♀	15	60.2±8.3	71.1±16.8
		♂	15	54.6±6.3	70.1±19.9
	Control	♀	15	51.7±9.4	63.6±19.3
		♂	15	52.0±7.5	66.7±22.3

ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline.

Table 5. Number and size of *C. gigas* used in spawning induction for injection of dopamine, serotonin and histamine

Stimulus	Dose (M)	Sex	Number	Shell length (mm)	Total weight (g)
DA	10^{-6}	♀	40	51.9±8.4	58.6±19.3
		♂	40	55.4±8.0	68.6±21.4
	10^{-5}	♀	40	52.7±7.0	63.6±18.5
		♂	40	54.3±7.8	62.8±16.4
	10^{-4}	♀	40	51.2±7.4	60.6±21.9
		♂	40	53.8±6.0	68.4±19.8
	10^{-3}	♀	40	53.5±6.3	62.3±13.6
		♂	40	55.1±7.6	65.5±17.8
	Control	♀	40	54.7±6.8	69.7±19.6
		♂	40	52.9±7.6	67.1±23.7
5-HT	10^{-6}	♀	40	52.1±8.5	64.3±20.2
		♂	40	52.5±8.6	63.5±21.6
	10^{-5}	♀	40	54.0±7.0	67.2±21.8
		♂	40	50.7±7.3	60.6±21.8
	10^{-4}	♀	40	54.3±8.1	67.1±18.4
		♂	40	53.1±5.7	62.3±14.7
	10^{-3}	♀	40	52.5±7.9	62.7±20.5
		♂	40	55.0±7.9	68.9±19.8
	Control	♀	40	52.3±7.9	65.6±22.8
		♂	40	53.4±6.1	64.8±17.5
HA	10^{-6}	♀	15	53.8±8.5	66.2±21.9
		♂	15	54.6±6.3	70.1±19.9
	10^{-5}	♀	15	51.7±5.2	64.3±11.6
		♂	15	55.0±5.3	65.7±19.7
	10^{-4}	♀	15	52.9±7.4	62.1±12.3
		♂	15	50.3±6.8	57.8±18.5
	10^{-3}	♀	15	52.4±7.5	60.5±15.8
		♂	15	49.7±6.5	62.3±20.7
	Control	♀	15	58.3±10.0	70.5±17.5
		♂	15	53.2±7.2	62.0±15.4

DA: dopamine; 5-HT: serotonin; HA: histamine.

2-4. 통계분석

실험 결과는 PASW 통계프로그램(Ver. 19)을 사용하였고, 반응률, 반응 개시 시간 및 방란·방정량은 one way-ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.



3. 결 과

3-1. 방란 및 방정 반응률

신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 방란·방정 반응률은 Table 6과 Table 7에 나타낸 바와 같다.

ACh를 주사한 결과, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 53.3 ± 46.2 , 46.7 ± 41.6 , 40.0 ± 40.0 , 46.7 ± 30.6 및 $20.0 \pm 34.6\%$ 였고, 농도에 따른 차이는 없었다($P > 0.05$). 수컷의 반응률은 각각 73.3 ± 23.1 , 80.0 , 86.7 ± 11.6 , 100.0 및 $66.7 \pm 30.6\%$ 였고, 농도가 높을수록 반응률이 높았으나, 농도에 따른 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

AD에서는 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 40.0 ± 28.3 , 20.0 ± 23.1 , 35.0 ± 34.2 , 15.0 ± 10.0 및 $30.0 \pm 25.8\%$ 였고, 실험구간의 차이는 없었다($P > 0.05$). 수컷의 반응률은 각각 60.0 ± 43.2 , 35.0 ± 19.2 , 50.0 ± 30.0 , 35.0 ± 11.6 및 $65.0 \pm 10.0\%$ 였고, 방정이 억제된 경향을 보였으나, 농도에 따른 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

NA를 조사한 결과, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 40.0 ± 20.0 , 26.7 ± 23.1 , 26.7 ± 23.1 , 6.7 ± 11.6 및 $13.3 \pm 11.6\%$ 였고, 수컷의 반응률은 각각 46.7 ± 41.6 , 53.3 ± 46.2 , 73.3 ± 30.6 , 20.0 ± 20.0 및 $33.3 \pm 11.6\%$ 로 암·수 모두 농도에 따른 차이는 없었다($P > 0.05$).

DA에서는 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 5.7 ± 29.9 , 31.4 ± 34.4 , 25.7 ± 22.3 , 48.6 ± 25.5 및 $5.7 \pm 15.1\%$ 였고, 농도가 높을수록 반응률이 높게 나타났으며, 10^{-3} M은 대조구에 비해 유의하게 높았다($P < 0.05$). 수컷의 반응률은 각각 28.6 ± 15.7 , 60.0 ± 30.6 , 82.9 ± 21.4 , 88.6 ± 10.7 및 $11.4 \pm 15.7\%$ 였고, 농도가 높을수록 반응률이 높게 나타났다. $10^{-5} \sim 10^{-3}$ M은 대조구에 비해 반응률이 높게 나타났고($P < 0.05$), 10^{-4} M와 10^{-3} M은 10^{-5} M보다 유의하게 높은 반응률을 나타내, 농도에 따른 차이를 보였다($P < 0.05$).

Table 6. Effects of acetylcholine, adrenaline and noradrenaline on spawning response in *C. gigas*

Stimulus ¹	Dose (M)	Response number ²		Response rate (%)	
		♀	♂	♀	♂
ACh	10 ⁻⁶	8/15	11/15	53.3±46.2	73.3±23.1
	10 ⁻⁵	7/15	12/15	46.7±41.6	80.0
	10 ⁻⁴	6/15	13/15	40.0±40.0	86.7±11.6
	10 ⁻³	7/15	15/15	46.7±30.6	100.0
	Control	3/15	10/15	20.0±34.6	66.7±30.6
AD	10 ⁻⁶	8/20	12/20	40.0±28.3	60.0±43.2
	10 ⁻⁵	4/20	7/20	20.0±23.1	35.0±19.2
	10 ⁻⁴	7/20	10/20	35.0±34.2	50.0±30.0
	10 ⁻³	3/20	7/20	15.0±10.0	35.0±11.6
	Control	6/20	13/20	30.0±25.8	65.0±10.0
NA	10 ⁻⁶	6/15	7/15	40.0±20.0	46.7±41.6
	10 ⁻⁵	4/15	8/15	26.7±23.1	53.3±46.2
	10 ⁻⁴	4/15	11/15	26.7±23.1	73.3±30.6
	10 ⁻³	1/15	3/15	6.7±11.6	20.0±20.0
	Control	2/15	5/15	13.3±11.6	33.3±11.6

ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline. ¹Stimulus were injected with 100 µL of various doses acetylcholine, adrenaline and noradrenaline into the gonads. ²Number of the spawning oyster/total number of the oyster treated. Values are mean±SD (ACh, n=3; AD, n=4; NA, n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

Table 7. Effects of dopamine, serotonin and histamine on spawning response in *C. gigas*

Stimulus ¹	Dose (M)	Response number ²		Response rate (%)	
		♀	♂	♀	♂
DA	10 ⁻⁶	9/40	10/40	25.7±29.9 ^{ab}	28.6±15.7 ^a
	10 ⁻⁵	11/40	21/40	31.4±34.4 ^{ab}	60.0±30.6 ^b
	10 ⁻⁴	9/40	29/40	25.7±22.3 ^{ab}	82.9±21.4 ^c
	10 ⁻³	17/40	31/40	48.6±25.5 ^b	88.6±10.7 ^c
	Control	2/40	4/40	5.7±15.1 ^a	11.4±15.7 ^a
5-HT	10 ⁻⁶	21/40	13/40	52.5±32.0 ^a	32.5±30.1 ^a
	10 ⁻⁵	27/40	27/40	67.5±44.0 ^{ab}	67.5±32.0 ^b
	10 ⁻⁴	30/40	36/40	75.0±36.7 ^{ab}	90.0±10.7 ^b
	10 ⁻³	35/40	36/40	87.5±28.2 ^b	90.0±15.1 ^b
	Control	4/40	3/40	10.0±15.1 ^c	7.5±10.4 ^c
HA	10 ⁻⁶	0/15	8/15	–	53.3±46.2
	10 ⁻⁵	2/15	9/15	13.3±23.1	60.0±52.9
	10 ⁻⁴	6/15	9/15	40.0±40.0	60.0±52.9
	10 ⁻³	3/15	9/15	20.0±34.6	60.0±52.9
	Control	3/15	7/15	20.0±20.0	46.7±41.6

DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. ¹Stimulus were injected with 100 µL of various doses dopamine, serotonin and histamine into gonads. ²Number of the spawning oyster/total number of the oyster treated. Values are mean±SD (DA, n=8; 5-HT, n=8; HA, n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

5-HT를 주사한 결과, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 52.5 ± 32.0 , 67.5 ± 44.0 , 75.0 ± 36.7 , 87.5 ± 28.2 및 $10.0 \pm 15.1\%$ 였고, 수컷의 반응률은 각각 32.5 ± 30.1 , 67.5 ± 32.0 , 90.0 ± 10.7 , 90.0 ± 15.1 및 $7.5 \pm 10.4\%$ 였다. 5-HT 주사시 암·수 모두 농도가 높을수록 반응률이 높게 나타났고, 모든 처리구가 대조구보다 유의하게 높았으며($P < 0.05$), 수컷이 암컷보다 민감하게 반응하였다.

HA에서는 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 암컷의 반응률은 각각 0.0, 13.3 ± 23.1 , 40.0 ± 40.0 , 20.0 ± 34.6 및 $20.0 \pm 20.0\%$ 였고, 수컷의 반응률은 각각 53.3 ± 46.2 , 60.0 ± 52.9 , 60.0 ± 52.9 , 60.0 ± 52.9 및 $46.7 \pm 41.6\%$ 로 암·수 모두 농도에 따른 차이는 없었다($P > 0.05$).

3-2. 방란 및 방정 개시시간

신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 방란 개시시간은 Fig. 19에 나타낸 바와 같다. ACh, NA, DA 및 HA에서 방란개시까지의 소요시간은 각각 23~58분, 35~75분, 35~62분 및 42~81분으로 나타났고, 모든 실험구간의 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 5-HT의 경우 10^{-4} M와 10^{-3} M의 농도에서 각각 29분과 24분으로 10^{-6} M와 대조구에 비해 짧은 방란개시 소요시간을 보였다($P < 0.05$). 그러나 AD를 주사하였을 때 농도가 높을수록 방란개시에 소요된 시간이 길었고, 10^{-3} M의 농도에서는 137분으로 다른 처리구에 비해 방란개시에 소요된 시간이 길었다($P < 0.05$).

신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 방정 개시시간은 Fig. 20에 나타낸 바와 같다. AD, DA 및 5-HT에서는 농도가 높을수록 방정개시 소요시간이 짧았다. 10^{-3} M의 AD 주사시 방정 소요시간이 5분으로 대조구보다 유의하게 짧았다($P < 0.05$). DA와 5-HT에서는 방정 소요시간이 각각 3~17분과 2~13분으로 대조구보다 유의하게 짧았다($P < 0.05$).

NA를 제외한 다른 신경전달물질에서는 수컷이 암컷에 비해 소요시간이 짧았다.

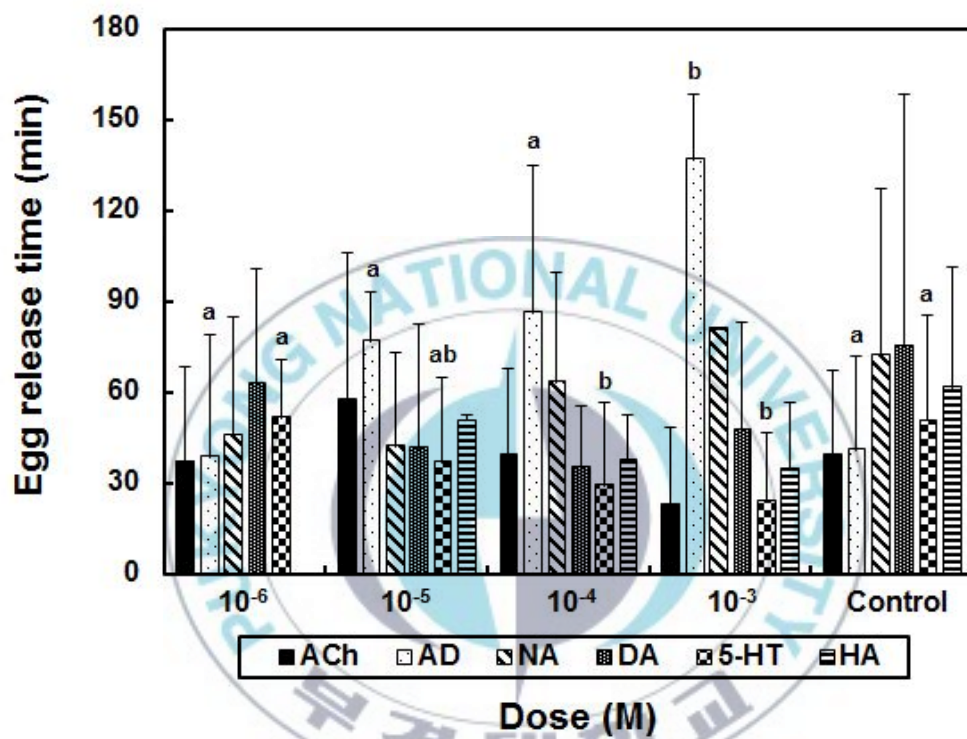


Fig. 19. Effects of six neurotransmitters on egg release time in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

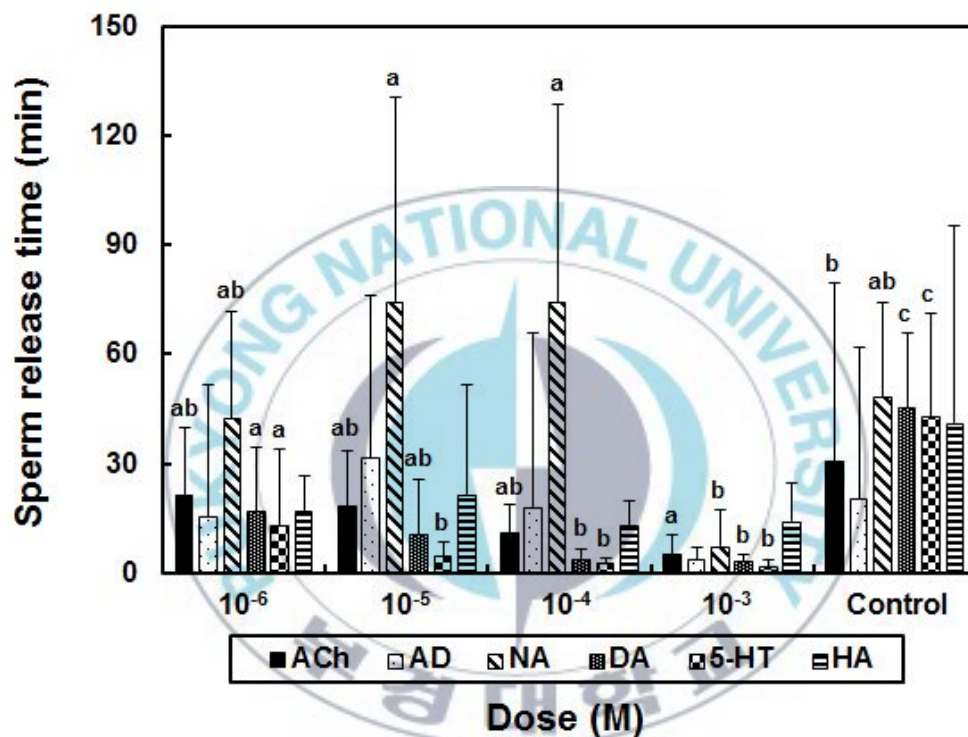


Fig. 20. Effects of six neurotransmitters on sperm release time in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

3-3. 방란 및 방정량

신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 방란양은 Fig. 21에 나타낸 바와 같다. DA의 경우 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 한 개체 당 방란양이 각각 188.0만, 224.0만, 268.8만, 253.1만 및 17.5만개였다. 10^{-5} ~ 10^{-3} M에서 10^{-6} M와 대조구보다 유의하게 많은 방란양을 나타나, 처리농도에 따른 차이를 보였다($P<0.05$). 5-HT의 경우 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M 및 대조구에서 한 개체 당 방란양이 각각 14.7만, 181.1만, 154.5만, 196.9만 및 12.1만개였다. 10^{-3} M에서 10^{-6} M와 대조구보다 많은 방란양을 나타나, 처리농도에 따른 차이를 보였다($P<0.05$). 그러나 ACh, AD, NA 및 HA를 주사하였을 때 한 개체 당 방란양이 4.5~14.9만개로 대조구의 2.8~8.2만개에 비해 차이가 없었다($P>0.05$).

신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 방정량은 Fig. 22에 나타낸 바와 같다. 10^{-6} ~ 10^{-4} M의 농도에서 모든 처리구는 대조구와 차이는 없었으나($P>0.05$), 10^{-3} M의 농도에서 ACh, DA 및 5-HT에서는 한 개체 당 각각 21.4, 100.1 및 143.1억개로 대조구보다 유의하게 많았다($P<0.05$).

3-4. 수정률 및 부화율

자극방법별 방출된 알의 수정률과 부화율은 Fig. 23과 Fig. 24에 나타낸 바와 같다. 수정률에 있어서 ACh, AD, NA, DA, 5-HT 및 HA 처리구는 각각 82.8~85.4, 82.3~88.5, 82.4~83.9, 81.9~88.5, 81.9~84.6 및 78.9~81.7%로 신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 수정률의 차이는 없었다($P>0.05$). 한편, 부화율에서는 ACh, AD, NA, DA, 5-HT 및 HA 처리구는 각각 76.5~82.2, 67.3~75.6, 67.9~76.8, 56.2~63.7, 73.1~76.0 및 69.1~75.4%였다. DA 처리구에서 부화율이 다소 낮게 나타났으나, 신경전달물질의 종류 및 농도에 따른 부화율의 차이는 확인되지 않았다($P>0.05$).

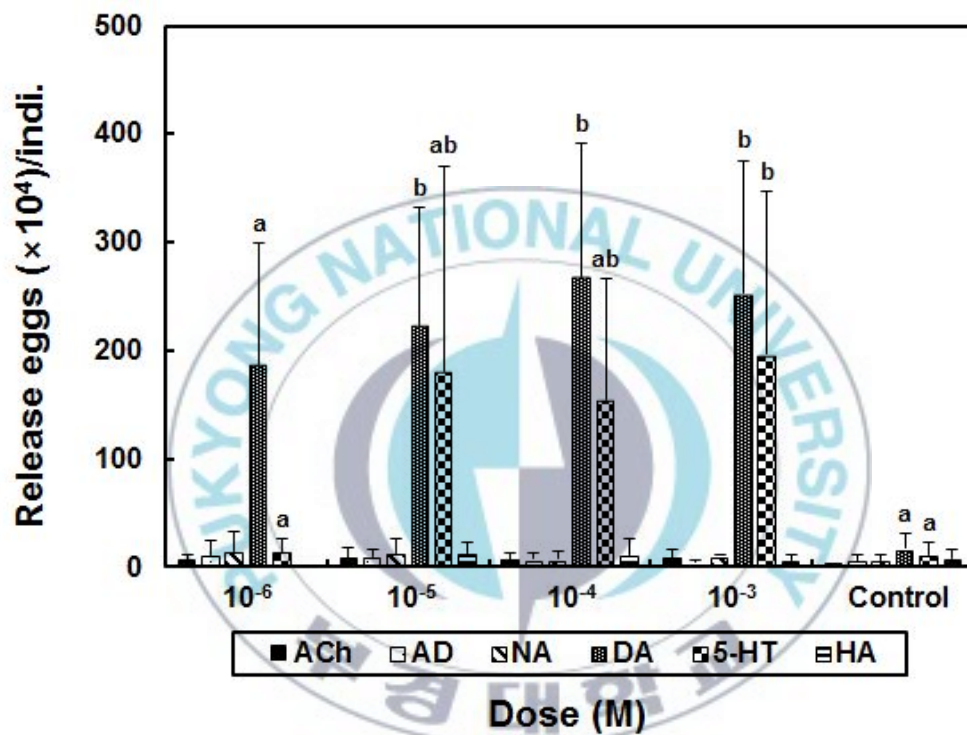


Fig. 21. Effects of six neurotransmitters on release egg number in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

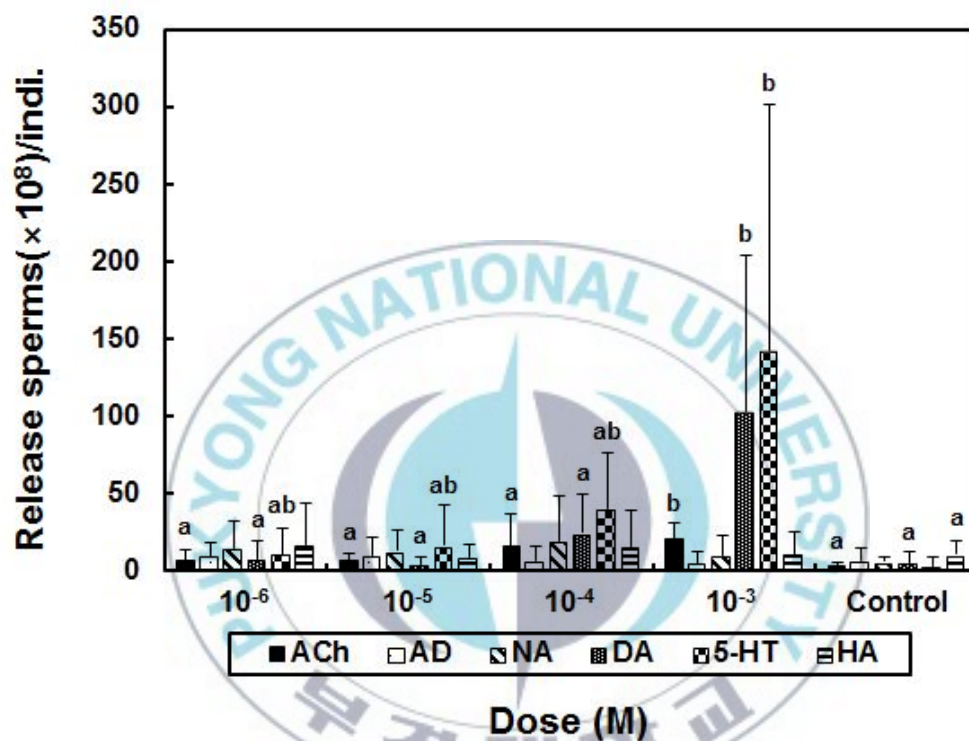


Fig. 22. Effects of six neurotransmitters on sperm release number in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

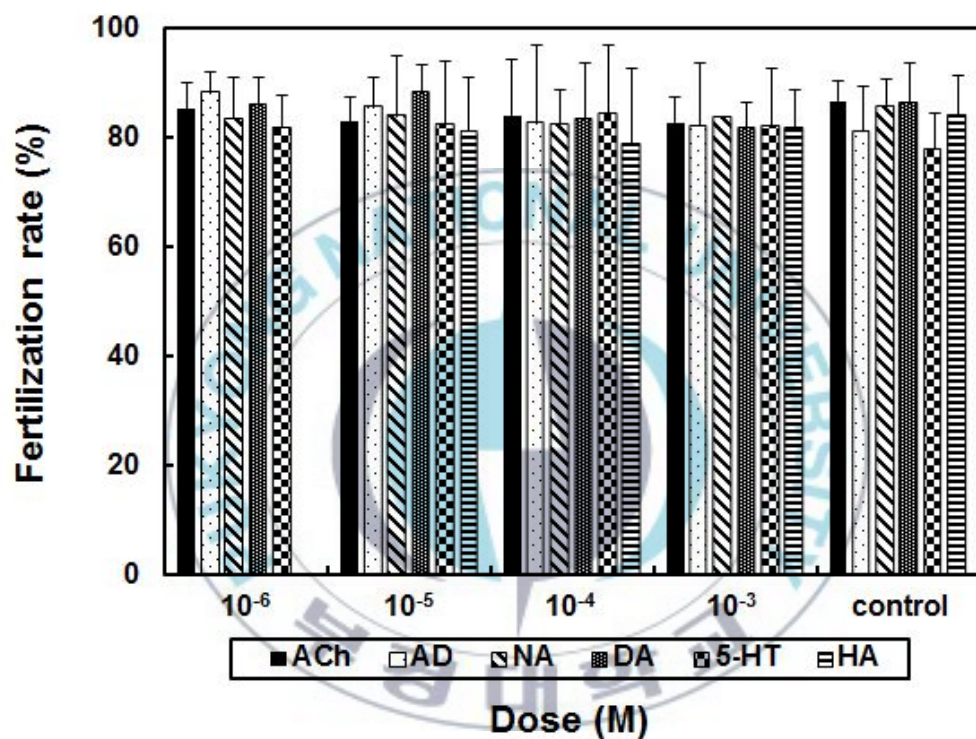


Fig. 23. Effect of six neurotransmitters on fertilization rate in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

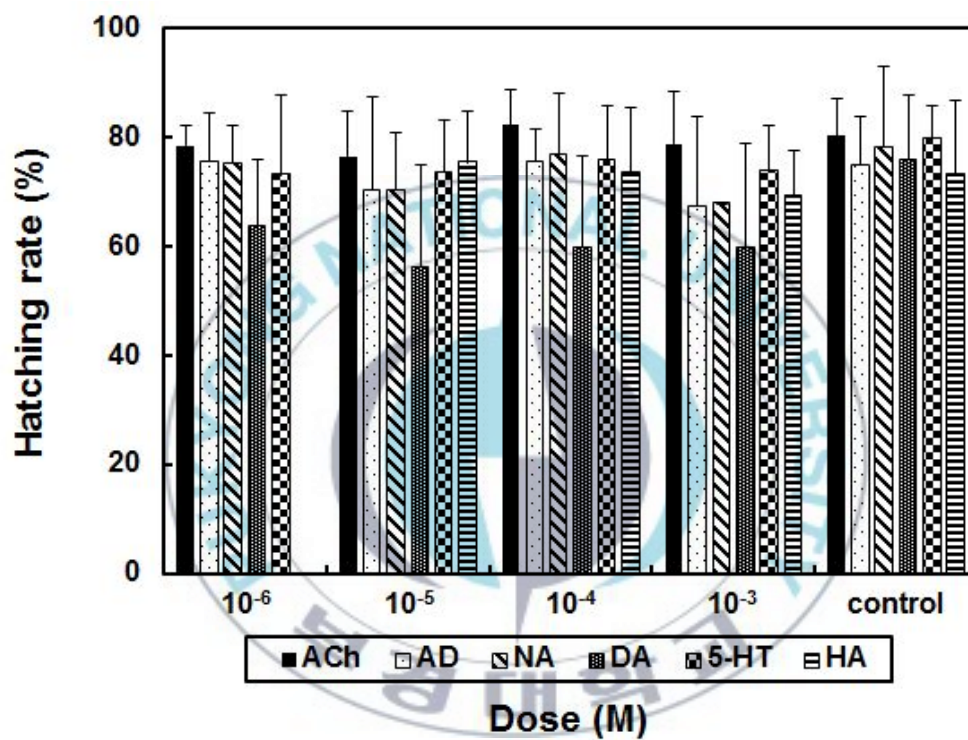


Fig. 24. Effect of six neurotransmitters on hatching rate in *C. gigas*. ACh: acetylcholine, AD: adrenaline, NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, HA: histamine. Values are means $\pm$ SD. Different letters refer to significantly different results ($P < 0.05$).

4. 고 찰

신경전달물질은 조개류의 중추신경계를 비롯한 심장, 아가미 및 생식소 등 조직에 분포되어 있다(Stefano and Aiello, 1975; Stefano and Catapane, 1977; Elliott, 1980; Matsutani et al., 1982; Matsutani and Nomura, 1984, 1986; Krantic et al., 1993; Pani and Croll, 1995). 특히, 아민류의 DA와 5-HT는 배우자의 증식, 난황형성, 에너지 저장 및 산란 등 일련의 번식생리과정에 관여한다고 알려져 있다(Osada et al., 1987; Mathieu et al., 1991; Lubet and Mathieu, 1990; Paulet et al., 1993; Mathieu, 1994; Pazos and Mathieu, 1999).

본 연구에서 ACh로 처리시 방란유발에 효과가 없는 반면, 높은 농도에서 방정유발에 효과가 있는 것으로 나타났다. Chang et al. (2005)은 다슬기와 고체다슬기에서 각각 10^{-9} M와 10^{-12} M의 ACh로 처리하였을 때 출산 반응률은 66.7%와 100%였고, 출산개시 소요시간은 모두 10분으로 가장 효과적인 출산 유도 방법이라고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 일반적으로 ACh는 평활근의 무스카린성 수용체에 작용하여 근육의 긴장도, 수축 및 연동운동을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 참굴의 방정유발에서 이와 관련성이 있는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각되어 진다.

본 연구에서 10^{-3} M의 DA로 처리시 방란·방정 반응률은 각각 48.6%과 88.6%였고, 방란양은 253.1만개, 방정량은 100.1억마리로 참굴의 산란유발에 효과적이었다. 이는 카리브해산 가리비 *Argopecten nucleus*와 *Nodipecten nodosus*에서 2×10^{-3} M의 DA로 처리하였을 때 산란유발에 효과가 있었다는 결과와 일치하였다(Velasco et al., 2007). 그러나 *Spisula solidissima*과 *Pecten ziczac*에서 2×10^{-3} M의 DA로 처리시 방란을 유발하지 못하는(Hirai et al., 1988; Vélez et al., 1990) 결과와 차이를 보여 DA의 산란유발 효과는 종의 특이성이 매우 큰 것으로 판단된다.

본 연구에서 10^{-4} M와 10^{-3} M의 5-HT로 처리하였을 때 방란개시 소요시간

은 각각 29분과 24분, 방정개시 소요시간은 2~13분, 10^{-3} M에서 방란양과 방정량은 각각 196.9만개와 143.1억개로 참굴의 방란 및 방정유발에 아주 효과적인 것으로 나타났다. Lee et al. (1996)에 따르면, 북방대합에서 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ M 농도의 5-HT로 처리한 결과, 암·수 모두 5분 이내에 방란·방정이 유발되었고, 10^{-4} M와 10^{-3} M 농도에서 반응률은 암·수 모두 100%, 방란양은 200만개 이상을 보였다. 또한, 이와 유사종인 *S. solidissima*에서는 2×10^{-5} M 이상의 농도로 처리하였을 때 2~3분 이내에 방란이 유발되었다고 보고되고 있다(Hirai et al., 1988). 버지니아굴, 가리비류의 *A. irradians*, *A. nucleus*, 비단가리비, *C. farreri*, *N. nodosus*, 참가리비 및 *P. ziczac* 홍합류의 *Dreissena polymorpha*와 *Geukensia demissa*, 그리고 clam류의 *Arctica islandica*, *Hippopus porcellanus*, *H. hippopus*, *M. mercenaria*, *Tridacna gigas*, *T. derasa*, *T. maxima*, *T. crocea* 및 *T. squamosa* 등 많은 조개류에서 5-HT 주사가 산란유발에 효과적이었다고 보고되고 있다(Matsutani and Nomura, 1982; Gibbons and Castagna, 1984; Braley, 1985; Alcazar, 1987; Vélez et al., 1990; Fong et al., 1993; Fong et al., 1994; O'Connor and Heasman, 1995; Kang, 1996; Park et al., 2005; Velasco et al., 2007). 5-HT는 난모세포 표면에 존재하는 5-HT 수용체를 자극하여 일어난 것으로 알려져 있으나, 5-HT의 이러한 작용은 prostaglandin (PG)의 생합성 저해제인 aspirin에 의해 억제되고 PG E₂에 의해 유발된다(Lee et al., 1996). 이러한 결과는 5-HT가 생식소 내의 PG E₂ 생합성을 촉진함으로써 PG E₂가 직접적으로 방란 및 방정에 작용하는 것을 시사한다(Vélez et al., 1990; Lee et al., 1996).

본 연구에서 AD, NA 및 HA 처리구에서 방란·방정 반응률, 반응개시 소요시간 및 방란·방정량이 대조구에 비해 차이가 없어, 참굴의 산란유발에는 적합하지 않는다고 생각되어 진다.

모든 종류의 신경전달물질과 처리농도에서 얻은 알의 수정률과 부화율은 차이가 없었는데, 이는 신경전달물질이 알의 난질에 부정적인 영향을 미치지 않

았다는 것으로 사료된다. DA가 다른 신경전달물질에 비해 다소 낮은 부화율을 보였는데, 이는 DA 주사시 생식소 내에 성숙이 완전히 이루어지지 않는 미성숙란의 방출 때문에 기인된 것으로 생각된다.



V. 수정 및 부화

1. 서 설

3배체 유도 생산성을 극대화하기 위해서는 수정에서 부화단계까지의 초기 발생률을 높여야 한다. 그러나 동일한 모패에서 얻은 알과 정자를 수정시켜도 수정조건 및 방법에 따라 초기 발생률에 큰 차이를 보인다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 초기발생에 영향을 미치는 다양한 요인에 관한 기초적인 자료가 필요하다.

체외수정을 하는 조개류는 수정과 발생이 수서환경에서 진행되기 때문에 다양한 외부요인의 영향을 받게 되는데, 그중에서 수온과 염분이 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다(Imai, 1953; Sagara, 1958; Ventilla, 1982; Santos and Nascimento, 1985; Kalyanasundaram and Ramamoorthi, 1987; Clotteau and Dubé, 1993; Chang et al., 2000; Lee et al., 2002b; Moon et al., 2004; O'Connor and Lawler, 2004; Kim et al., 2011). 조개류의 알과 정자는 어류에 비해 보다 긴 수명(age)을 가진다(Wang et al., 1997; Lee et al., 2002a; Song et al., 2009). 그러나 방출된 후, 일정시간 내에 수정을 이루어지지 못하면 시간이 경과됨에 따라 수정능력 및 운동성이 점차 상실되어, 수정 및 부화에 부정적인 영향을 미친다(André and Lindegarth, 1995; O'Connor and Heasman, 1995; Wang et al., 1997; Lee et al., 2002a; Song et al., 2009). 정상적인 수정을 이루어지기 위해서는 정자가 난막을 뚫고 알의 내부에 진입해야 하는데, 이러한 과정은 알과 정자가 일정시간 이상의 접촉이 필요하다는 것으로 알려져 있다(Levitan et al., 1991; Babcock and Keesing, 1999; Baker and Tyler, 2001; Hodgson et al., 2007; Song et al., 2009). 정자와 알의 비율도 수정 및 부화에 영향을 미치는 요인이다. 수정시 낮은 정자와 알의 비율은

수정률을 저하(André and Lindegarth, 1995)시키는 반면, 높은 비율의 정자와 알의 비율은 다수정을 초래하여 발생배의 기형과 폐사를 일으킨다(Longo, 1973; Santos and Nascimento, 1985; Stephano and Gould, 1988; Lee et al., 2002a; Song et al., 2009). 부화시 수정란의 높은 수용밀도는 용존산소와 pH의 감소를 초래하여 부화율을 저하시킨다고 보고되고 있다(Lee et al., 2002a; Suquet et al., 2007; Song et al., 2009).

지금까지 참굴의 수정방법에 관한 연구(Suquet et al., 2007; Song et al., 2009)가 있었으나, 이러한 연구들은 배우자 품질 평가나 실험기준에 관한 연구로서 인공종묘 생산을 위한 수정조건 연구는 찾아볼 수 없었다.

따라서 본 연구에서는 참굴의 초기발생률 향상을 위한 최적의 수정조건을 찾고자 알과 정자를 다양한 조건으로 수정시켜 수정률과 부화율을 조사하였다.



2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패로서 국립수산물과학원 남동해수산업연구소 남해센터 시험용 가두리에서 수하식으로 13개월 양성한 참굴(Table 8)을 사용하였다. 모패는 실내 사육실로 옮겨 패각에 붙어있는 이물질을 제거한 다음, 1.6톤 FRP 사각수조에서 24시간 동안 안정시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 수온은 $21.2 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$, 염분은 32.1 ± 0.5 psu였다.

2-2. 배우자의 채취

알과 정자의 채취는 충분히 성숙한 모패로부터 Chang et al. (2000)의 방법으로 생식소 부위를 얇게 저민 다음, $0.22\ \mu\text{m}$ cellulose acetate membrane 여과해수(24.0°C , 31.7 psu, pH 8.07) 속에 풀어 난해수와 정자해수를 만들었다. 난해수는 $55\ \mu\text{m}$ 와 $16\ \mu\text{m}$ 의 필터로 여과한 후, 충분한 양의 여과해수로 씻어 찌꺼기를 제거하였고, 정자해수는 $16\ \mu\text{m}$ 의 필터로 여과하였다. 그 다음, 알과 정자를 각각 20,000개/mL과 10×10^8 개/mL의 밀도로 500 mL 비커에 수용하여 실험에 사용하였다. 알은 채란 30분 후에 GVBD가 50% 이상 일어난 개체를 실험에 사용하였고, 정자는 채정 5분 후에 95% 이상의 정자가 운동하는 개체를 실험에 사용하였다. 그리고 개체간의 차이를 최소화하기 위하여 각 실험에 암·수를 각각 3마리씩 사용하였다.

2-3. 수정조건

2-3-1. 환경요인별

수온별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 15, 18, 21, 24, 27, 30 및 33°C 에서 수정한 후, 동일한 수온에서 부화를 실시하였다. 수정 및 부화는 모두 100 mL 비커에서 실시하였다. 알과 정자는 각각 채란 1시간 후와 채정 10분 후에 사

Table 8. Size and gamete condition of *C. gigas* used in the eight experiments

Exp.	Sex	Shell length (mm)	Total weight (g)	GVBD (%)	Motility (%)
Tem	♀	49.7±14.0	56.0±14.9	62.7±7.0	–
	♂	53.9±4.4	60.8±7.9	–	97.7±1.5
Sal	♀	50.7±2.9	60.8±9.9	60.0±12.2	–
	♂	48.1±6.8	60.0±5.2	–	98.3±1.5
ET	♀	51.8±13.1	60.8±12.0	64.7±5.0	–
	♂	54.2±3.8	53.3±4.9	–	98.3±2.9
ST	♀	48.4±5.5	58.2±9.3	74.0±9.2	–
	♂	52.3±6.0	51.5±12.8	–	97.3±2.1
CT	♀	51.3±2.7	58.2±5.5	67.3±11.4	–
	♂	58.8±2.6	61.5±5.5	–	98.7±1.5
Den	♀	62.9±7.0	66.3±7.8	70.7±17.9	–
	♂	62.3±12.7	66.2±14.7	–	97.7±2.5
Rat	♀	60.6±12.5	78.0±16.9	64.0±15.9	–
	♂	59.0±6.5	69.2±9.7	–	98.3±1.5
Vol	♀	59.6±8.3	68.5±12.1	66.7±6.4	–
	♂	60.5±9.3	72.9±6.3	–	99.3±0.6
Average		55.2±8.6	59.7±9.1	66.3±11.2	98.2±1.7

Tem: temperature, Sal: salinity, ET: elapsed time after egg collection, ST: elapsed time after sperm collection, CT: gamete contact time, Den: egg stocking density, Rat: sperm to egg ratio, Vol: tank volume, GVBD: germinal vesicle breakdown. Data presented as mean±SD (n=3).

용하였다. 수정시 알의 수용밀도는 200개/mL, 정자와 알의 비율은 1,000:1, 그리고 수정 1시간 후에 세란하였다. 부화는 세란한 후 동일한 비커에 넣어 incubator에서 실시하였으며, 부화 밀도는 200개/mL였다. 해수는 여과해수를 사용하였고, 염분은 31.7 psu였다.

염분별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 20, 25, 30, 35, 40 psu 및 대조구인 자연해수(31.7 psu)에서 수정한 후, 동일한 염분에서 부화를 실시하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다. 염분은 증류수와 천일염을 이용하여 조절하였다.

2-3-2. 배우자 방치시간별

채란 후 경과시간별 알의 수정능력을 파악하기 위하여 채란 30분, 1시간, 2시간, 3시간 및 4시간 후에 수정하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

채정 후 경과시간별 정자의 수정능력을 파악하기 위하여 채정 10분, 20분, 30분, 40분, 60분 및 120분 후에 수정하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

배우자 접촉시간별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 수정 1, 5, 10, 20, 30, 60 및 120분 후에 세란하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

2-3-3. 배우자 밀도별

알의 수용밀도별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000개/mL의 밀도로 수용하여 수정한 후, 동일한 밀도에서 부화를 실시하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

정자와 알의 비율별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 10:1, 100:1, 500:1,

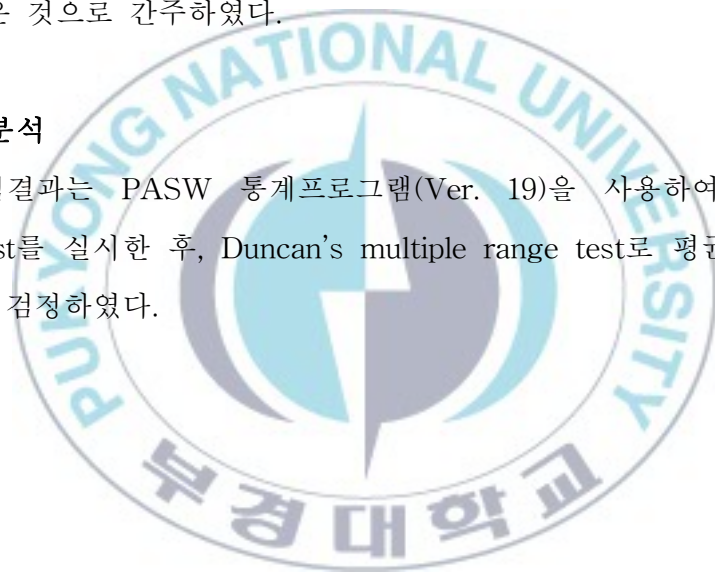
1,000:1, 5,000:1 및 10,000:1의 비율로 수정하였다. 수정 및 부화 수온은 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

용기용적별 수정 및 부화를 조사하기 위하여 50, 100, 500, 1,000, 2,000 및 5,000 mL의 유리 비커에서 수정한 후, 동일한 비커에서 부화를 실시하였다. 수정 및 부화 수온 24.0℃였고, 기타 조건은 수온별 실험과 동일하게 처리하였다.

수정률은 2세포기까지 발생한 알의 백분율로 계산하였고, 부화율은 수정란에서 D상유생까지의 발생률로 계산하였다. 그리고 형태적으로 기형을 나타내는 것은 죽은 것으로 간주하였다.

2-4. 통계분석

모든 실험결과는 PASW 통계프로그램(Ver. 19)을 사용하여 one way-ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.



3. 결 과

3-1. 환경요인별 수정 및 부화

3-1-1. 수온별 수정 및 부화

수온별 수정률 및 부화율은 Fig. 25에 나타난 바와 같다. 수정률은 15, 18, 21, 24, 27, 30 및 33℃에서 각각 $73.3\pm5.0\%$, $90.7\pm2.3\%$, $92.7\pm1.2\%$, $95.3\pm3.1\%$, $90.7\pm6.4\%$, $87.3\pm1.2\%$ 및 $75.3\pm4.6\%$ 였다. 15~24℃에서는 온도가 높을수록 수정률이 증가하는 반면, 24℃ 이상에서는 온도가 높을수록 다시 낮아지는 경향을 보였다. 18℃에서 27℃까지는 실험구간의 차이가 없었으나($P>0.05$), 15℃와 33℃에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 부화율은 15, 18, 21, 24, 27, 30 및 33℃에서 각각 $57.3\pm3.1\%$, $67.3\pm11.0\%$, $68.7\pm7.0\%$, $72.0\pm4.0\%$, $38.0\pm3.5\%$, 0.0% 및 0.0% 였다. 15~24℃에서는 온도가 높을수록 부화율이 증가하였으나, 24℃ 이상에서는 온도가 높을수록 급격히 감소하여 30 및 33℃에서는 부화된 개체가 없었다. 18~24℃에서는 실험구간의 차이를 보이지 않았으나($P>0.05$), 15℃와 27℃에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 이러한 결과들을 종합하여 참굴의 수정 및 부화의 적수온은 18~27℃이고 최적은 24℃로 나타났다.

3-1-2. 염분별 수정 및 부화

염분별 수정률 및 부화율은 Fig. 26에 나타난 바와 같다. 수정률은 20, 25, 30, 35, 40 psu 및 자연해수(31.7 psu)에서 각각 $49.3\pm3.1\%$, $90.0\pm2.0\%$, $85.3\pm3.1\%$, $86.7\pm9.5\%$, $9.3\pm4.2\%$ 및 $86.7\pm1.2\%$ 였다. 25~35 psu에서는 실험구간의 차이가 없었으나($P>0.05$), 20 psu와 40 psu에 비해 유의하게 높은 수정률을 보였다($P<0.05$). 부화율의 경우 20, 25, 30, 35, 40 psu 및 자연해수(31.7 psu)에서 각각 $23.3\pm6.1\%$, $70.0\pm5.3\%$, $84.7\pm1.2\%$, $64.7\pm6.1\%$, 0.0% 및 $80.0\pm3.5\%$ 였다. 20~30 psu에서는 염분이 높을수록 부화율이 증가하는 반면, 30 psu 이상에서는 염분이 높을수록 다시 낮아지는 경향을 보였다. 30 psu와

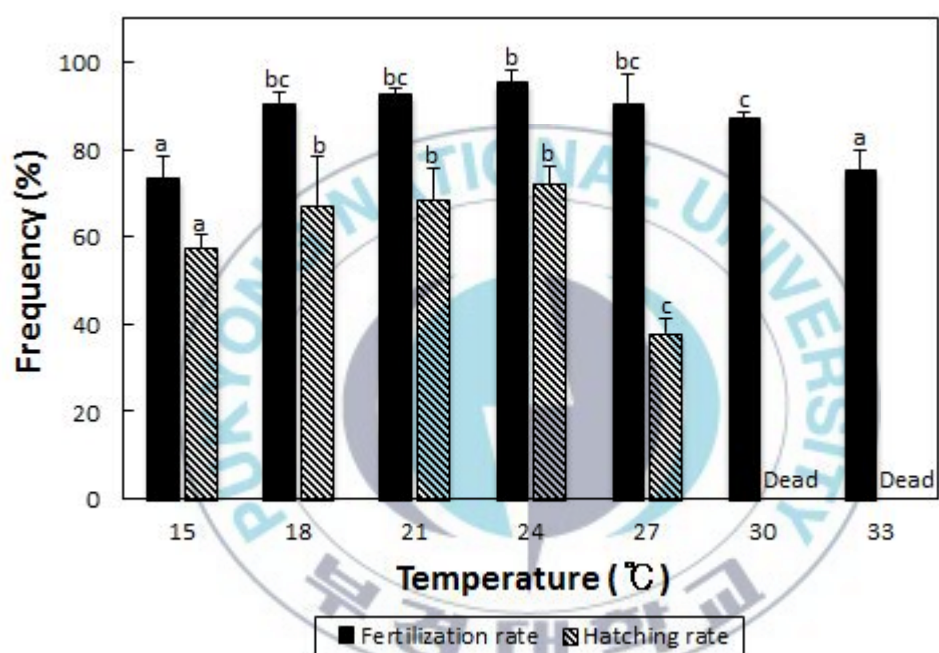


Fig. 25. Effect of temperature on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

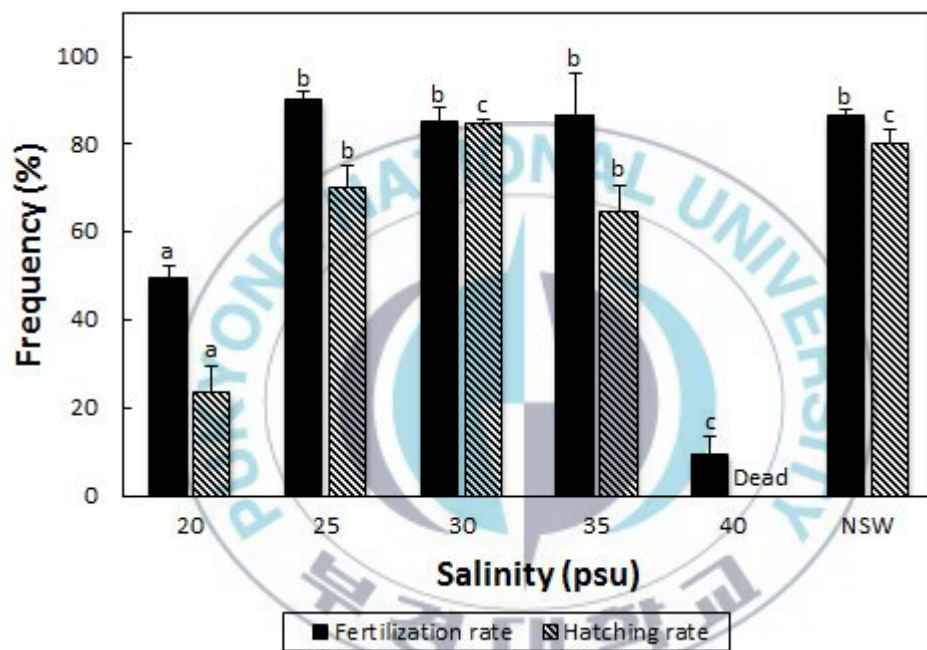


Fig. 26. Effect of salinity on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

자연해수(31.7 psu)에서는 다른 실험구에 비해 유의하게 높은 부화율을 나타냈다($P<0.05$). 따라서 참굴의 수정 및 부화의 적염분은 25~35 psu로 나타났다.

3-2. 배우자 방치시간별 수정 및 부화

3-2-1. 채란 후 경과시간별 수정 및 부화

채란 후 경과시간별 수정률 및 부화율은 Fig. 27에 나타낸 바와 같다. 수정률은 채란 30분, 1시간, 2시간, 3시간 및 4시간에서는 각각 $84.7\pm4.6\%$, $80.0\pm3.5\%$, $79.3\pm3.1\%$, $76.0\pm7.2\%$ 및 $76.7\pm8.1\%$ 였다. 채란 30분 후에 수정률이 가장 높았고, 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 채란 4시간 후까지는 경과시간에 따른 수정률의 차이가 없었다($P>0.05$). 부화율에서 채란 30분, 1시간, 2시간, 3시간 및 4시간에서는 각각 $64.0\pm5.3\%$, $73.3\pm4.6\%$, $66.7\pm9.0\%$, $65.3\pm9.5\%$ 및 $67.3\pm6.1\%$ 였다. 채란 1시간 후에 부화율이 가장 높았으나, 채란 4시간 후까지는 경과시간에 따른 부화율의 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 따라서 수온 24℃에서 채란 4시간 내에 수정시 수정 및 부화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

3-2-2. 채정 후 경과시간별 수정 및 부화

채정 후 경과시간별 수정률 및 부화율은 Fig. 28에 나타낸 바와 같다. 수정률에 있어서 채정 10분, 20분, 30분, 40분, 60분 및 120분 후에는 각각 $86.7\pm5.0\%$, $86.0\pm4.0\%$, $83.3\pm3.1\%$, $75.3\pm3.1\%$, $71.3\pm3.1\%$ 및 $47.3\pm6.1\%$ 였고, 수정률은 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 채정 10~30분 후에는 실험구 간의 차이가 없었으나($P>0.05$), 채정 40~120분 후보다 유의하게 높게 나타났다($P<0.05$). 부화율은 채정 10분, 20분, 30분, 40분, 60분 및 120분후에는 각각 $83.3\pm3.1\%$, $71.3\pm3.1\%$, $66.0\pm8.7\%$, $62.7\pm3.1\%$, $66.7\pm6.4\%$ 및 $50.7\pm6.1\%$ 였다. 부화율은 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였고, 채정 10분 후에

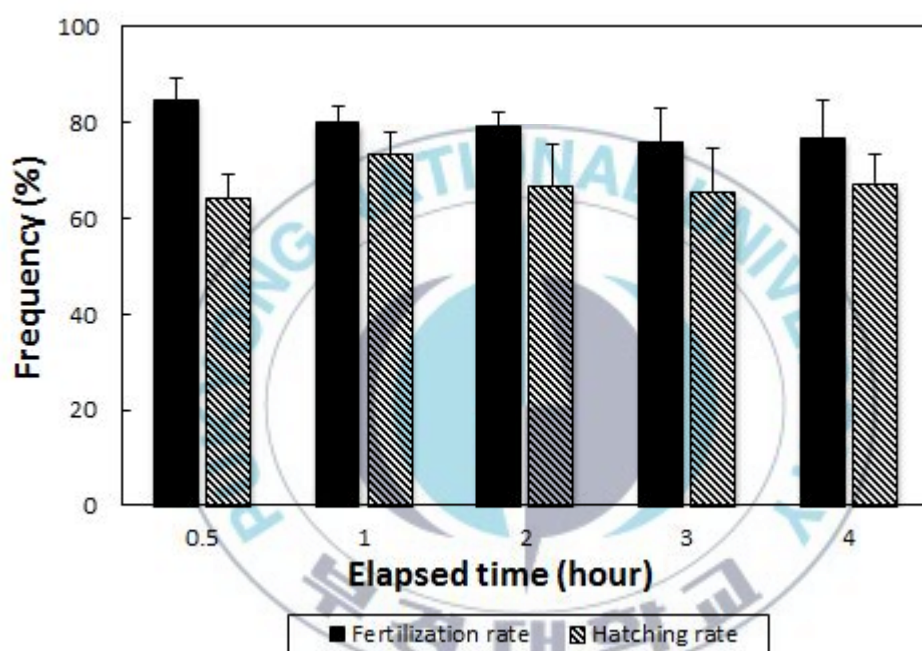


Fig. 27. Effect of elapsed time after eggs collection on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3).

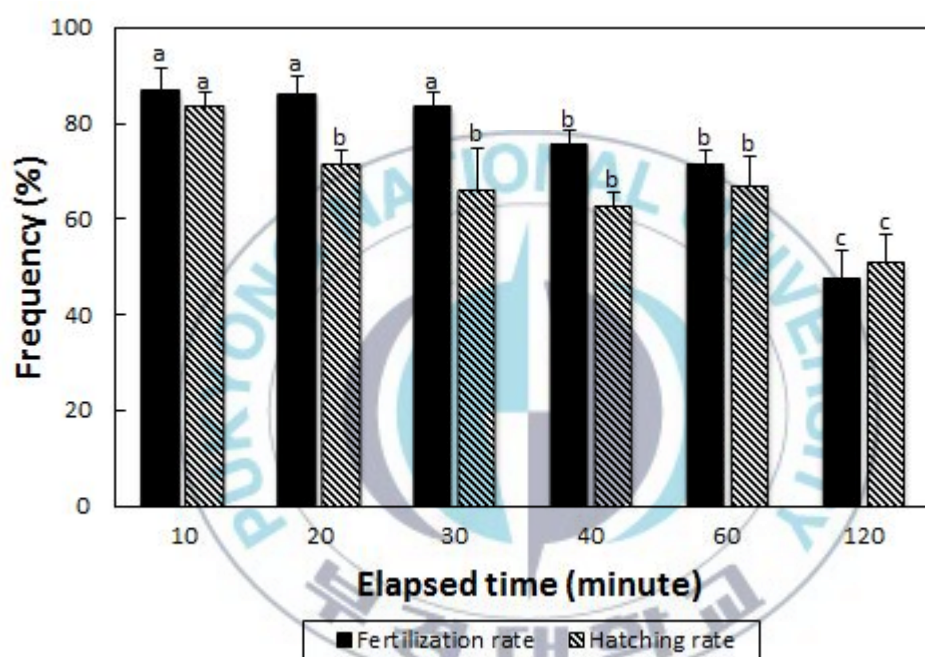


Fig. 28. Effect of elapsed time after sperm collection on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

는 다른 실험구보다 유의하게 높은 부화율을 나타냈다($P<0.05$). 따라서 효율적인 수정 및 부화를 위해서 채정 후 30분 내에 수정시키는 것이 좋은 것으로 나타났다.

3-2-3. 배우자 접촉시간별 수정 및 부화

알과 정자의 접촉시간별 수정률 및 부화율은 Fig. 29에 나타낸 바와 같다. 수정률의 경우 알과 정자의 접촉시간이 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 60분 및 120분 후에는 각각 $0.7\pm1.2\%$, $35.3\pm6.4\%$, $50.0\pm3.5\%$, $60.7\pm15.5\%$, $70.7\pm 9.9\%$, $80.0\pm2.0\%$ 및 $81.3\pm4.2\%$ 였다. 알과 정자의 접촉시간이 길수록 수정률이 높게 나타났고, 접촉시간 60분과 120분은 1~20분보다 유의하게 높은 수정률을 나타냈다($P<0.05$). 부화율에 있어서 알과 정자의 접촉시간이 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 60분 및 120분 후에는 각각 0.0% , $42.0\pm5.3\%$, $60.0\pm7.2\%$, $63.3\pm5.0\%$, $65.3\pm4.2\%$, $60.7\pm5.0\%$ 및 $62.0\pm4.0\%$ 였다. 알과 정자의 접촉시간이 10~120분에서는 실험구간의 유의한 차이가 없었으나($P>0.05$), 1~5분보다 유의하게 높은 부화율을 보였다($P<0.05$). 따라서 높은 수정과 부화율을 얻기 위해서 매정시간은 30분이상 유지되는 것이 좋을 것으로 나타났다.

3-3. 배우자 밀도별 수정 및 부화

3-3-1. 알의 수용밀도별 수정 및 부화

알의 수용밀도별 수정률 및 부화율은 Fig. 30에 나타낸 바와 같다. 알의 수용밀도별 수정률의 경우 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000개/mL에서 각각 $51.3\pm1.2\%$, $63.3\pm11.4\%$, $76.7\pm8.1\%$, $75.3\pm6.4\%$, $80.0\pm7.2\%$ 및 $80.0\pm3.5\%$ 였다. 50~200개/mL에서는 밀도가 높을수록 수정률이 증가하였고, 200~2,000개/mL은 50개/mL과 100개/mL에 비해 유의하게 높은 수정률을 나타냈다($P<0.05$). 부화율은 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000개/mL에서 각각 $62.0\pm5.3\%$, $66.7\pm7.0\%$, $68.0\pm4.0\%$, $42.0\pm5.3\%$, $22.7\pm7.6\%$ 및 $18.0\pm6.0\%$ 였다.

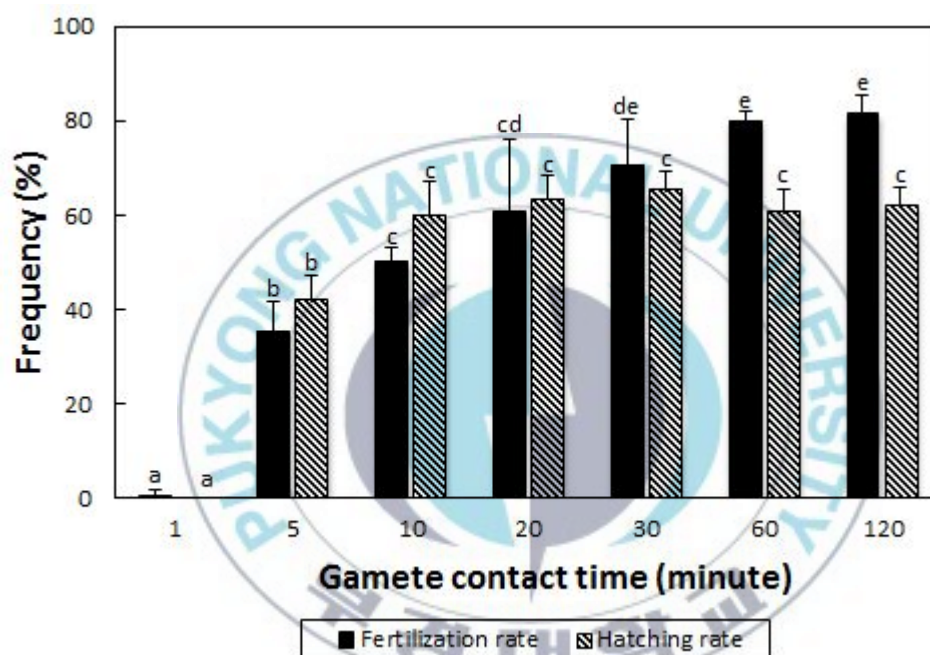


Fig. 29. Effect of gamete contact time on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

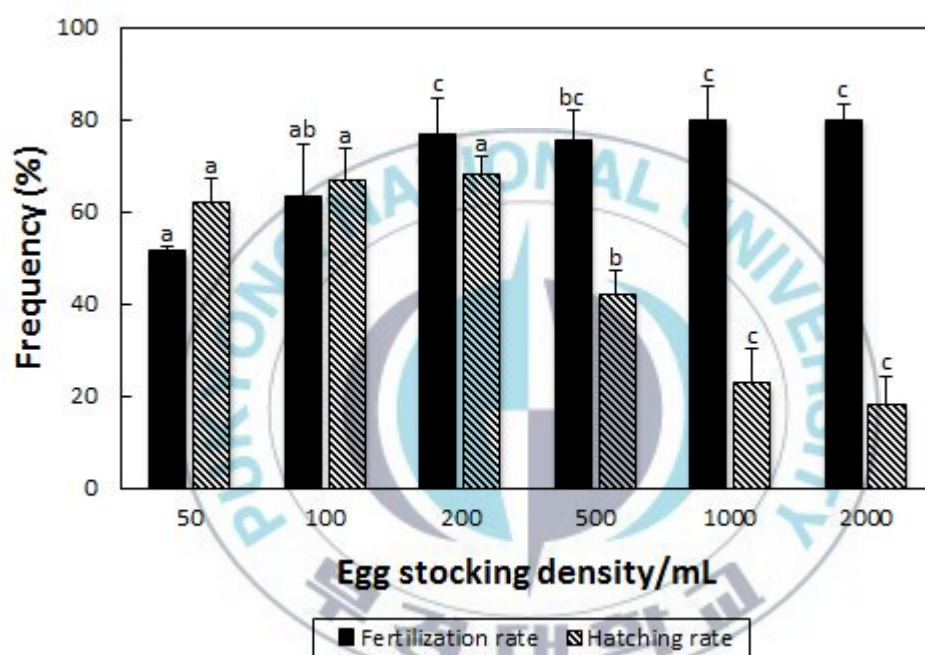


Fig. 30. Effect of egg stocking density on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

50~200개/mL의 저밀도에서는 실험구간의 차이는 없었으나($P>0.05$), 500~2,000개/mL의 고밀도에 비해 유의하게 높은 부화율을 나타냈다($P<0.05$). 따라서 정상적인 수정 및 부화를 위해서 100~200개/mL의 밀도로 수용하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

3-3-2. 정자와 알의 비율별 수정 및 부화

정자와 알의 비율별 수정률 및 부화율은 Fig. 31에 나타낸 바와 같다. 정자와 알의 비율별 수정률은 10:1, 100:1, 500:1, 1,000:1, 5,000:1 및 10,000:1에서 각각 $4.7\pm2.3\%$, $57.3\pm9.5\%$, $85.3\pm3.1\%$, $94.7\pm1.2\%$, $94.0\pm3.5\%$ 및 $96.0\pm2.0\%$ 였다. 1,000~10,000:1은 실험구간의 차이가 없었으나($P>0.05$), 10~500:1보다 유의하게 높은 수정률을 보였다($P<0.05$). 부화율은 10:1, 100:1, 500:1, 1,000:1, 5,000:1 및 10,000:1에서 각각 $14.7\pm2.3\%$, $44.7\pm3.1\%$, $65.3\pm3.1\%$, $64.7\pm4.2\%$, $53.3\pm3.1\%$ 및 $36.0\pm2.0\%$ 였다. 10~500:1에서는 정자와 알의 비율이 높을수록 수정률이 증가하는 반면, 500:1 이상에서는 비율이 높을수록 다시 낮아지는 경향을 보였다. 500:1과 1,000:1은 다른 실험구에 비해 유의하게 높은 부화율을 보였다($P<0.05$). 따라서 높은 수정률 및 부화율을 얻기 위해서는 정자와 알의 비율을 500~1,000:1로 수정하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

3-3-3. 용기용적별 수정 및 부화

용기용적별 수정률 및 부화율은 Fig. 32에 나타낸 바와 같다. 수정률은 50, 100, 500, 1,000, 2,000 및 5,000 mL에서 각각 $93.3\pm1.2\%$, $96.0\pm4.0\%$, $94.7\pm2.3\%$, $94.7\pm2.3\%$, $93.3\pm2.3\%$ 및 $92.7\pm1.2\%$ 였고, 모든 실험구간의 차이는 없었다($P>0.05$). 부화율에 있어서 50, 100, 500, 1,000, 2,000 및 5,000 mL에서 각각 $73.3\pm1.2\%$, $76.7\pm3.1\%$, $74.7\pm2.3\%$, $73.3\pm2.3\%$, $74.7\pm2.3\%$ 및 $72.7\pm5.0\%$ 였고, 모든 실험구간에 차이를 보이지 않았다($P>0.05$).

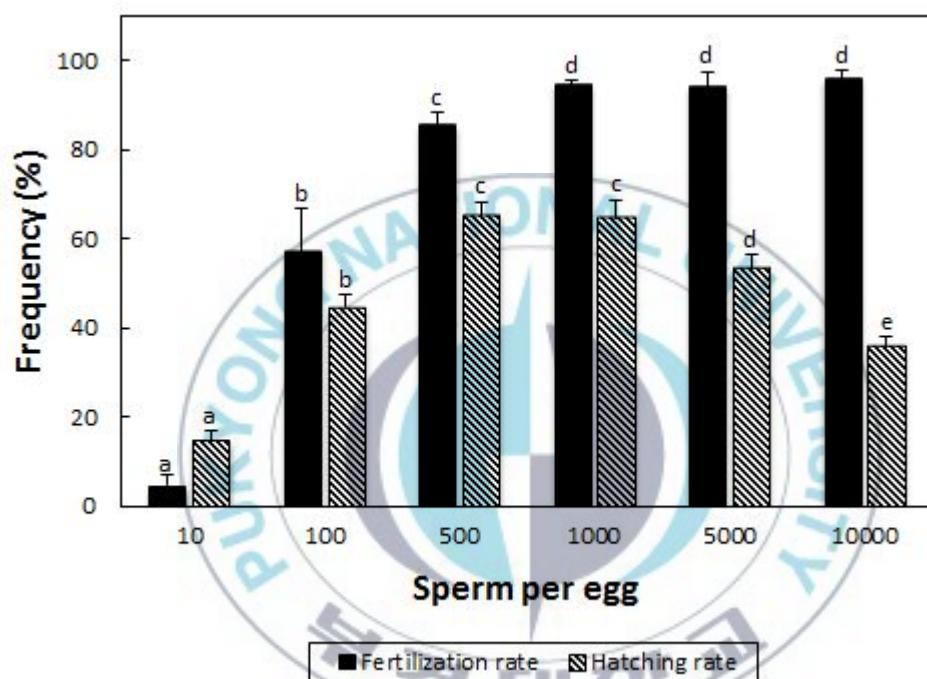


Fig. 31. Effect of sperm to egg ratio on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

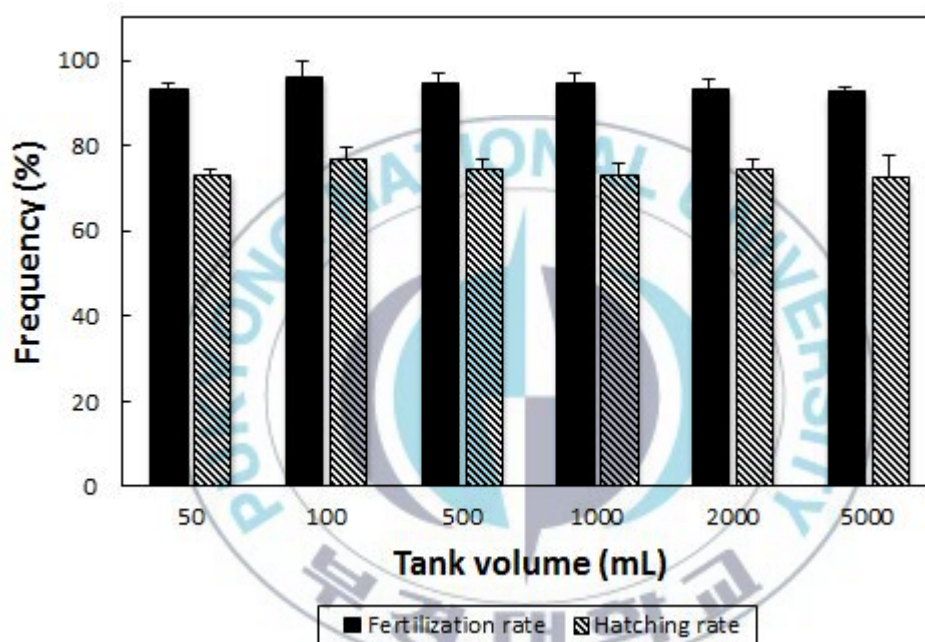


Fig. 32. Effect of tank volume on fertilization and hatching rate. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

4. 고 찰

수온은 조개류의 초기 난할기의 세포분열과 유생의 발생에 영향을 미치며 (Ventilla, 1982), 적수온 이하에서는 난발생이 정지되고(Chang et al., 2000; Lee et al., 2002b), 그 이상에서는 비정상적인 난할로 인해 기형률과 폐사율이 증가된다(Chang et al., 2000; Kim et al., 2011; Lee et al., 2002b). 본 연구에서는 수정률이 70% 이상인 수온은 15~33℃로써 한해성 종인 대서양 북방대합의 8~24℃(Clotteau and Dubé, 1993)에 비해 적수온이 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서 부화율은 18~24℃에서 67% 이상이었고, 30℃ 이상에서는 부화된 개체가 관찰되지 않았으며, 24℃에서 부화율이 72.0%로 가장 높았다. 이는 Chang et al. (2000)이 참굴의 수정란으로부터 D상유생까지 폐사가 없는 발생 수온은 15~25℃이고, 난발생을 위한 최적 수온은 25℃라고 보고(Chang et al., 2000)하여 본 연구 결과와 유사하였다. 또한, 유사한 연구 결과들은 여러 조개류에서 보고된 바 있다(Sagara, 1958; Santos and Nascimento, 1985; O'Connor and Lawler, 2004; Kim et al., 2011).

염분은 해양생물의 서식분포를 제한하는 환경요인으로서 초기 발생과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Tettelbach and Rhodes, 1981). Clotteau and Dubé (1993)는 대서양 북방대합의 알을 15 psu 이하의 저염분 해수에서 10분 배양시 알이 커지거나 터진 반면, 35~50 psu의 고염분 해수에서는 알이 수축되었는데, 형태적인 변화가 관찰되지 않는 염분은 15~35 psu라고 보고하였다. 본 연구에서 염분 25~35 psu에서 수정률이 85% 이상으로 대서양 북방대합(Clotteau and Dubé, 1993) 및 말뚝성게(Hwang et al., 2009)와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서 염분 25~35 psu에서 부화율이 64% 이상으로 나타나, 다른 조개류의 부화 적염분과 유사하였다(Imai, 1953; Sagara, 1958; Kalyanasundaram and Ramamoorthi, 1987; Kim et al., 2011).

북방대합은 수온 20℃에서 채란 4시간까지는 수정률이 94% 이상으로 채란

후 경과시간에 따른 수정률의 차이가 없었다고 보고하였다(Lee et al., 2002a). 또한, Wang et al. (1997)에 따르면, 참굴은 수온 22~24℃에서 채란 6시간까지는 94% 이상의 높은 수정률을 보였고, 알의 분해는 채란 18시간 후부터 시작하였다. 이러한 결과들은 24℃에서 채란 4시간까지는 경과시간에 따른 수정률의 차이가 없었다는 본 연구 결과를 뒷받침해주었다. Stephano and Gould (1988)는 참굴의 적출란을 채란 15분 내에 수정하였을 때에는 54%의 높은 다수정률을 나타내는 반면, 해수 중에 1시간 배양한 후에 수정하였을 때에는 다수정률이 7% 이하로 낮아졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 수정란의 다수정률에 대해서 검토하지 않았으나, 채란 1시간 후의 부화율이 채란 30분 후보다 높게 나타나, 다수정의 가능성을 배제할 수 없었다. 본 연구에서 채란 4시간까지는 채란 후 경과시간에 따른 부화율의 차이가 없었으며, 이는 다른 연구와 유사하였다(Lee et al., 2002a; Williams, 2002; Hodgson et al., 2007; Song et al., 2009). 그러나 말백합의 경우 수온 30℃에서 채란 직후 수정시 부화율이 61.9%였던 것이 채란시간이 경과됨에 따라 급격히 감소하여 채란 4시간 후에는 0.0%라고 보고하였다(Kim et al., 2011). 이는 수온이 낮을수록 발생배의 외형은 정상적인 반면, 수온이 높을수록 기형률과 폐사율이 증가된 결과라고 생각된다(Chang et al., 2000).

참굴의 정자가 체외에 방출된 후 해수 중에 있는 Na^+ 와 K^+ 이온에 의해 운동이 개시된다(Li et al., 2002). 그러나 미토콘드리아에 저장되어 있는 ATP (adenosine triphosphate)의 소모에 따라 운동성이 점차 감소되고 일정시간 후에는 운동성을 완전 잃어 수정능력을 상실한다(O'Connor and Heasman, 1995; Wang et al., 1997; Lee et al., 2002a; Narvarte and Pascual, 2003; Shi et al., 2008). 본 연구에서는 채정 후 30분 내에 수정시 83%의 높은 수정률을 보였고, 그 후 시간이 경과됨에 따라 수정률이 감소하였는데, 이는 북방대합과 tropical abalone의 결과와 유사하였다(Encena et al., 1998; Lee et al., 2002a). 해산 무척추동물에 있어서 채정 후 일정시간 내에 수정하였을 때에는 비교적

높은 부화율을 얻을 수 있는 반면, 일정시간 지나서 수정하였을 때에는 시간이 경과할수록 부화율이 점차 감소하는 것으로 알려져 있다(Santos and Nascimento, 1985; André and Lindegarth, 1995; Encena et al., 1998; Lee et al., 2002a; Williams, 2002; Hodgson et al., 2007).

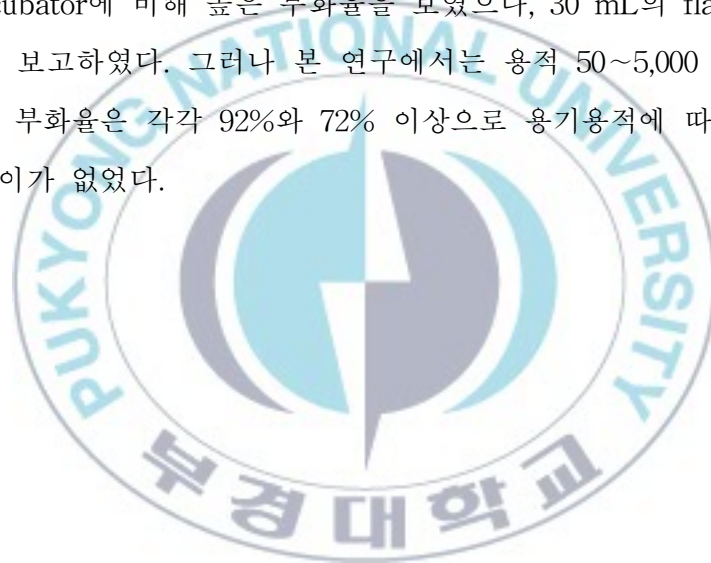
극피동물의 수정은 매정 5분 내에 이루어지고(Levitan, 1991; Babcock and Keesing, 1999), 복족류는 매정 30분 내에 이루어진 것으로 알려져 있다(Hodgson et al., 2007). 본 연구에서 매정 10분 후 수정률과 부화율은 각각 50.0%와 60.0%로 대부분의 알이 수정되었는데, 이는 프랑스산 참굴의 결과와 유사하였다(Song et al., 2009).

본 연구에서 알의 수용밀도에 따른 수정률은 밀도가 높을수록 수정률이 높게 나타나거나 차이가 없어, 북방대합의 결과(Lee et al., 2002a)와 유사하였다. 그리고 저밀도 실험구의 낮은 수정률은 본 연구의 정자 첨가량이 알과의 비율로 결정하였기에 해수 중의 낮은 정자 농도에 의해 기인된 것으로 생각되어진다. 본 연구에서 부화율은 50~200개/mL의 저밀도로 수용하였을 때 62% 이상의 높은 부화율을 보인 반면, 500개/mL 이상의 고밀도로 수용하였을 때 밀도가 높을수록 부화율이 낮게 나타나 다른 연구결과와 유사하였다(Rampersad et al., 1994; Lee et al., 2002a; Suquet et al., 2007; Song et al., 2009). 이는 수정란을 고밀도로 수용시 해수 중의 Do와 pH의 감소(Suquet et al., 2007) 및 수용성 독성물질의 증가(Boldt et al., 1981; Rampersad et al., 1994) 등 유해요인들이 부정적인 영향으로 기인한 것으로 사료된다.

본 연구에서 정자와 알을 10:1의 비율로 수정하였을 때 4.7%의 낮은 수정률을 보인 반면, 대서양 북방대합과 북방대합은 각각 30%와 99.0%의 높은 수정률을 나타내(Clotteau and Dubé, 1993; Lee et al., 2002a), 본 연구 결과와 큰 차이를 보였다. 1,000~10,000:1의 높은 비율로 수정시 정자와 알이 만날 확률이 높아 수정률이 높게 나타난 것으로 생각된다(O'Connor and Heasman, 1995). 본 연구에서 500~1,000:1의 비율로 수정하였을 때 64% 이상의 부화율

을 보인 반면, 비율이 높을수록 부화율이 감소되어 mangrove oyster의 결과와 유사하였다(Rampersad et al., 1994; Santos and Nascimento, 1985). 이는 굴의 수정란은 정자의 진입을 방지하는 구조적인 변화가 없어(Alliegro and Wright, 1983; Stephano and Gould, 1988), 높은 정자비율에서 다수정을 초래하여 정상적인 발생에 영향을 미친 것으로 판단된다(Staeger and Horton, 1976; Alliegro and Wright, 1983; Santos and Nascimento, 1985; Stephano and Gould, 1988).

Suquet et al. (2007)는 1.8 L의 비커가 0.3 mL의 plates나 1 L의 원추형 fish egg incubator에 비해 높은 부화율을 보였으나, 30 mL의 flasks와는 차이가 없었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 용적 50~5,000 mL의 비커에서 수정률과 부화율은 각각 92%와 72% 이상으로 용기용적에 따른 수정률 및 부화율의 차이가 없었다.



VI. 극체방출 억제처리에 의한 3배체 유도

1. 서 설

최근 배수체의 활용, 특히 3배체를 이용한 굴 양식은 미국, 프랑스, 호주, 중국 등 여러 나라에서 성행하고 있다. 그 이유로는 생물학적으로 3배체는 불임이기 때문에 성 성숙에 필요한 에너지를 체성장으로 돌려 빠른 성장과 육질개선을 기하고, 특히 굴의 주 산란기인 여름에도 수확이 가능하다는 점을 들 수 있다. 뿐만 아니라, 생물 이식 등에 따른 유전적 오염을 방지할 수 있기 때문에 지역 고유종을 보호하는 데도 매우 유용하다(Guo et al., 1996).

1990년대 말까지 3배체 굴 종묘는 주로 극체방출을 억제하는 화학적인 방법으로 생산되었는데, 4배체 굴이 만들어짐에 따라 2배체 암컷과 4배체 수컷을 교배하는 방법으로 3배체를 생산하고 있다. 그러나 이와 같은 3배체 생산기술은 대부분 특허 등록되어 있는 실정이다.

굴의 3배체는 버지니아굴에서 CB에 의해 최초로 유도된(Stanley et al., 1981) 이후 많은 연구가 이루어졌다. 물리적인 방법으로는 온도 충격과 저삼투압, 화학적인 방법으로는 CB, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) 및 caffeine 처리, 그리고 생물적인 방법으로는 2배체와 4배체의 교배에 따른 3배체 유도 방법 등이 보고된 바 있다(Quillet and Penelay, 1986; Downing and Allen, 1987; Barber et al., 1992; Desrosiers et al., 1993; Gérard et al., 1996; Tian et al., 1998; Gérard et al., 1999; Guo et al., 1996; Yu et al., 2001; Kong et al., 2011). 그러나 한국에서는 유 등(1990)의 연구결과만 있을 뿐이다.

따라서 본 연구에서는 최종목표인 4배체 어미를 작성하기 위한 전 단계 기술로서 지금까지 빈번하게 사용된 CB와 6-DMAP에 의한 극체방출 억제의 최적 3배체 유도기술을 개발하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패로서 국립수산물과학원 남동해수산업연구소 남해센터 시험용 가두리에서 수하식으로 11개월 양성한 참굴 400마리, 어의도에서 17개월 양성한 참굴 400마리, 그리고 거제·한산만에서 19개월 양성한 참굴 500마리 등 총 1,300마리를 확보하였다. 모패를 실내 사육실로 옮겨 패각에 붙어있는 이물질을 제거한 후, 1.6톤 FRP 사각수조(2.0×1.0×0.8 m)에 설치한 24개의 플라스틱 사각바구니(50.0×32.0×17.0 cm)에 각각 25마리씩 수용하고 가온 사육하면서 실험에 사용하였다.

2-2. 배우자의 채취

알과 정자를 채취하기 위하여 모패의 오른쪽 패각을 제거한 다음, 1 mL syringe로 생식소 조직을 0.05 mL 정도 채취하여 슬라이드 글라스에 도말한 후, 광현미경으로 성숙상태를 확인하고 암·수를 구분하였다. 자웅동체 개체로 인한 수정을 방지하기 위하여 성숙한 암컷으로 구분된 개체들을 Chang et al. (2000)의 방법으로 생식소 부위를 얇게 저민 다음, 여과해수를 담은 190 mL 일회용 종이컵 속에 풀어 난해수를 만든 후, 광학현미경으로 재확인하였다. 확인이 완료된 난해수는 각각 55 μm 와 16 μm 의 필터로 여과한 후, 충분한 양의 여과해수로 씻어 찌꺼기를 제거하였다. 그 다음, 알 1억개를 20 L 원형 플라스틱 용기에 수용한 후, 여과해수를 10 L까지 채워 난해수의 밀도가 10,000개/mL 되도록 하였다. 난해수를 25±1℃에서 60~90분 동안 배양시켜 70~80%의 알이 GVBD가 일어난 후에 실험에 사용하였다. 정자해수는 정소를 얇게 저민 다음, 16 μm 의 필터로 여과하여 찌꺼기를 제거하고 2 L 비커에 50×10⁸개/mL로 만든 후, 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2-3. 염색체 관찰

참굴의 염색체수를 조사하기 위한 염색체표본 제작은 다음과 같은 방법으로 하였다. 부화 직후의 담륜자(trochophore)유생 약 1,000마리를 300 mg/L의 6-DMAP해수(25℃)가 담긴 15 mL tube에 수용하고 3시간 동안 처리하였다. 이후 3,000 rpm로 3분간 원심 분리하고 상등액을 제거한 다음, 0.075 M KCl 용액을 10 mL 첨가해서 1시간 저장 처리하였다. 그 다음, 3,000 rpm으로 3분간 원심 분리한 후, 상등액을 버리고 냉장된 Carnoy용액을 넣어 30분 이상 고정하였다. 고정 처리된 담륜자유생을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 피펫으로 상등액을 버리고 25%의 빙초산용액을 첨가하였다. 그 다음, 1 mL syringe로 뽑고 넣고를 반복하여 세포현탁액 만든 다음, 25 μ m의 거름망으로 찌꺼기를 제거하였다. 그리고 세포현탁액을 피펫으로 뽑아서 50℃로 가열한 슬라이드 글라스에 도말한 후 공기 건조하였다. 염색은 2% orcein염색액(2 g orcein을 100 mL 45% 빙초산에 녹인 후 여과)에 3~5분 염색하고 수세, 건조한 후, 1,000배의 광학현미경에서 염색체를 관찰하였다.

2-4. 3배체 유도

2-4-1. CB와 6-DMAP 처리농도별

CB와 6-DMAP의 최적 처리농도를 조사하기 위하여 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 및 3.2 mg의 CB를 2 mL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 4 L의 여과해수가 들어있는 사각 플라스틱 용기(6 L)에 넣어 최종농도를 각각 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L로 만들어 실험에 사용하였다. 그리고 160, 200, 240, 280 및 320 mg의 6-DMAP를 4 L의 여과해수가 들어있는 사각 플라스틱 용기(6 L)에 녹여 최종 농도를 각각 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L로 만들어 실험에 사용하였다. 대조구로서 사각 플라스틱 용기(6 L)에 4 L의 여과해수를 넣었다. 수정은 5 L 해수가 들어있는 투명 플라스틱 용기(10 L)에서 실시하였고, 수용 밀도는 10,000개/mL, 정자와 알의 비율은 1,000~5,000:1이었다. 극체방출 억제처리는 수정 10분 및

20분 후에 바닥 부분에 16 μm 의 거름망이 붙여져 있는 750 mL의 투명 플라스틱 용기에 수정란을 100만개씩 넣어 여과해수로 3회 세란한 후 실시하였다. 처리시간 20분, 수온 25°C, 염분 32.5 psu였으며, 3반복 처리하였다.

2-4-2. CB와 6-DMAP 처리조건별

온도, 수정시간 및 처리시간의 3가지 요인에 따른 최적의 3배체 유도조건을 조사하기 위하여 온도는 25.0, 27.0 및 29.0°C, 수정시간은 수정 5분, 10분, 15분, 20분, 25분 및 30분 후로 설정하였다. 그리고 처리시간은 10분, 15분, 20분, 25분 및 30분(Table 9), CB와 6-DMAP의 처리농도는 각각 0.5 mg/L과 60 mg/L로 하였으며 염분은 32.2-32.8 psu였다. CB 처리에서 CB의 용매인 DMSO에 따른 배수체의 영향을 조사하기 위하여 수정 15분 후, 0.05% V/V의 DMSO를 첨가한 여과해수에서 20분 처리하였다. 대조구로서 수정 15분 후에 여과해수에서 20분 수용하였다. 그리고 수정조건, 처리조건, 부화조건 및 부화율과 유도율의 조사방법 등은 농도별 실험과 동일하게 실시하였다.

2-5. 세란 및 부화

CB는 처리 완료 후, 먼저 여과해수로 3회 세란하고 수정란을 15 L 0.05% V/V의 DMSO 여과해수가 들어있는 원형 플라스틱 용기(20 L)에 20분 동안 수용하여 CB의 독성을 제거하였다. 그 다음, 여과해수로 3회 세란한 후 50 L의 여과해수가 들어있는 원형 플라스틱 용기(75 L)에 수용하여 부화를 실시하였다. 6-DMAP는 처리 완료 후, 여과해수로 3회 세란하여 50 L의 여과해수가 들어있는 원형 플라스틱 용기(75 L)에 수용하여 부화를 실시하였다. 부화 밀도 20개/mL, 수온 25 $\pm$ 1°C, 염분 32.5 psu였다. 그리고 수용 24시간 후 전체 유생을 40 μm 의 거름망으로 수거하여 부화율을 조사하였다. 부화율은 농도별 실험에서는 전체 수거된 유생수와 알의 백분율로 계산하였고, 처리조건별 실험에서는 대조구에 대한 실험구의 비율로 계산하였다.

Table 9. Selected conditions of treatments for inducing triploid *C. gigas*

Agent	Treatment temperature (°C)	Start time * (min.)	Duration of treatment (min.)
C B 0.5 mg/L or 6-DMAP 60 mg/L	25°C	5	10
		10	15
		15	20
		20	25
		25	30
		30	30
	27°C	5	10
		10	15
		15	20
		20	25
		25	30
		30	30
	29°C	5	10
		10	15
		15	20
		20	25
		25	30
		30	30

* Time after fertilization.

2-6. 3배체 유도율 측정

3배체의 유도율을 조사하기 위하여 Chation and Allen (1985)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 각 실험구별로 1,000마리 이상의 D상유생 시료를 1.5 mL의 microcentrifuge tube에 넣어 3,000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 그 다음, phosphate buffered saline (PBS)용액 1 mL를 첨가하여 3,000 rpm로 3분간씩 3회 원심분리하여 세척하였다. 이후, PBS용액을 0.5 mL 첨가하여 1,500~2,000 rpm으로 1분간 균질하고 세포를 충분히 분리시킨 후, 30 μ m의 거름망으로 찌꺼기를 제거하였다. 그 다음, ethanol를 0.5 mL 첨가하여 -20℃에서 4시간 이상(-80℃에서 1시간 이상) 방치하였다. 그리고 4℃에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 1 mL의 propodium iodide (PI)용액(50 μ g/mL in 0.1 % sodium citrate)을 넣어 실온 상태에서 30분간 염색하였다. 3배체 유도율은 Flow Cytometer (BD science Accuri[®] C6, USA)를 이용하여 측정하였다(Fig. 33).

2-7. 통계분석

모든 실험결과는 PASW 통계프로그램(Ver. 19)을 사용하여 one way-ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성 ($P<0.05$)을 검정하였다.

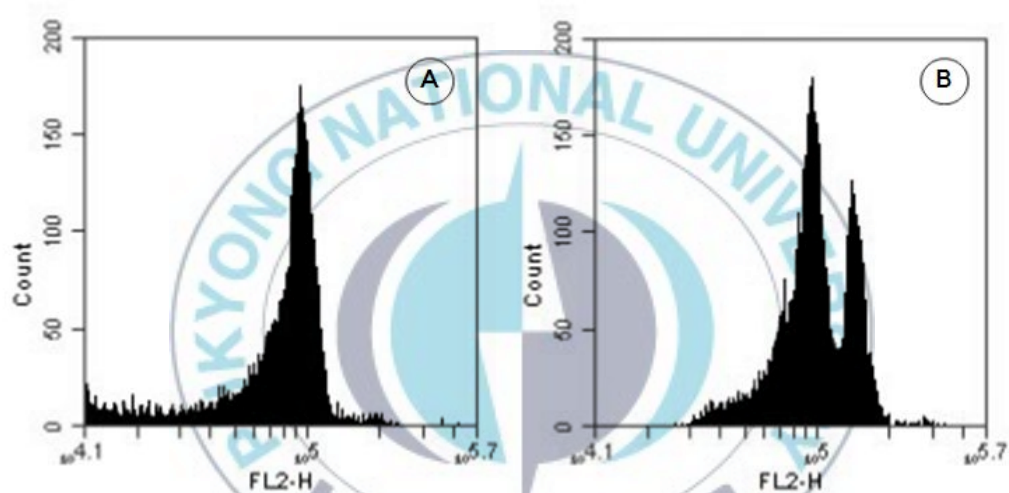


Fig. 33. Flow cytometric analysis of D-shaped larvae in *C. gigas*. A: diploid standard, B: treatment.

3. 결 과

3-1. 염색체수

2배체의 염색체수는 $2n=20$ 으로 나타났고(Fig. 34A), 3배체의 염색체수는 $3n=30$ 으로 나타나(Fig. 34B), 2배체 염색체수의 1.5배를 보였다.

3-2. CB와 6-DMAP 처리농도별 발생 및 3배체 유도

3-2-1. CB 처리농도별 발생 및 3배체 유도

CB 처리농도에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율은 Table 10에서 나타낸 바와 같다. 부화율에 있어서 수정 10분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L의 농도에서 각각 6.4 ± 2.4 , 4.8 ± 1.2 , 1.9 ± 0.8 , 1.2 ± 0.4 및 $0.7\pm0.2\%$ 였고, 농도가 높을수록 부화율이 낮게 나타났다. 0.4 mg/L와 0.5 mg/L는 다른 농도에 비해 부화율이 유의하게 높았다($P<0.05$). 수정 20분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mg/L의 농도에서 부화율은 각각 31.4 ± 10.0 , 50.7 ± 1.2 , 20.8 ± 11.0 , 38.5 ± 4.6 및 29.9 ± 2.8 였고, 0.5 mg/L가 다른 농도에 비해 유의하게 높은 부화율을 보였다($P<0.05$). 수정 10분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L의 농도에서 3배체 유도율은 각각 36.2 ± 8.2 , 42.1 ± 5.4 , 37.6 ± 4.9 , 30.0 ± 10.0 및 $48.2\pm23.3\%$ 였고, 농도에 따른 차이는 보이지 않았다($P>0.05$). 수정 20분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L의 농도에서 3배체 유도율은 각각 24.9 ± 3.7 , 17.6 ± 7.8 , 20.0 ± 6.2 , 4.0 ± 5.4 및 $15.7\pm5.8\%$ 였고, 0.4~0.8 mg/L에서 0.7 mg/L을 제외한 모든 실험구간의 차이가 없었다($P>0.05$). 수정 10분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L의 농도에서 3배체 생산율은 각각 2.3, 2.0, 0.7, 0.4 및 0.3%였고, 농도가 높을수록 생산율이 낮게 나타났다. 수정 20분 후 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 및 0.8 mg/L의 농도에서 각각 7.8, 8.9, 4.2, 1.5 및 4.7%의 3배체 생산율을 보였다. 수정 10분과 20분 후의 총3배체 생산율은 0.5 mg/L에서 10.9%로 가장 높게 나타났다.



Fig. 34. Chromosome spreads of diploid and triploid in *C. gigas*. A: diploid ($2n=20$), B: triploid ($3n=30$).

Table 10. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at different concentrations of treatment with CB

Concentration (mg/L)	Hatching (%)		Triploid (%)			Triploid yield ^{IV} (%)		Total triploid yield ^V (%)
	Start time ^I (min.)		Start time ^I (min.)			Start time ^I (min.)		
	10 ^{II}	20 ^{III}	10 ^{II}	20 ^{III}	20 ^{III}	10 ^{II}	20 ^{III}	
0.4	6.4±2.4 ^a	31.4±10.0 ^{ac}	36.2±8.2 ^a	24.9±3.7 ^a	2.3	7.8	10.1	
0.5	4.8±1.2 ^a	50.7±1.2 ^b	42.1±5.4 ^a	17.6±7.8 ^{ab}	2.0	8.9	10.9	
0.6	1.9±0.8 ^b	20.8±11.0 ^a	37.6±4.9 ^a	20.0±6.2 ^a	0.7	4.2	4.9	
0.7	1.2±0.4 ^b	38.5±4.6 ^c	30.0±10.0 ^a	4.0±5.4 ^{bc}	0.4	1.5	1.9	
0.8	0.7±0.2 ^b	29.9±2.8 ^{ac}	48.2±23.3 ^a	15.7±5.8 ^{ab}	0.3	4.7	5.0	
Control	95.3±1.9 ^c	52.5±2.5 ^b	0.0 ^b	0.0 ^c	0.0	0.0	0.0	

^ITime after fertilization, ^{II}Inhibition of releasing first polar body, ^{III}Inhibition of releasing second polar body, ^{IV}Triploid rate×hatching rate/100, ^VTriploid yield of 10 min after fertilization+triploid yield of 20 min after fertilization. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

3-2-2. 6-DMAP 처리농도별 발생 및 3배체 유도

6-DMAP의 처리농도에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율은 Table 11에서 나타낸 바와 같다. 부화율에 있어서 수정 10분 후 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L의 농도에서 각각 38.1 ± 6.0 , 36.3 ± 15.5 , 21.9 ± 3.3 , 18.5 ± 6.1 및 $18.0 \pm 2.0\%$ 였고, 농도가 높을수록 부화율이 낮게 나타났다. 40 mg/L와 50 mg/L는 60~80 mg/L보다 높은 부화율을 나타냈다($P < 0.05$). 수정 20분 후 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L의 농도에서 부화율은 각각 37.3 ± 2.4 , 38.4 ± 14.3 , 62.6 ± 7.0 , 54.6 ± 13.5 및 $36.9 \pm 3.4\%$ 였고, 60 mg/L는 70 mg/L를 제외한 다른 농도보다 높은 부화율을 보였다($P < 0.05$). 수정 10분 후 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L의 농도에서 3배체 유도율은 각각 15.0 ± 2.0 , 13.1 ± 2.0 , 19.5 ± 0.4 , 22.6 ± 10.3 및 $35.4 \pm 9.6\%$ 였고, 농도가 높을수록 유도율이 높게 나타났다. 80 mg/L가 40~60 mg/L보다 높은 3배체를 보였다($P < 0.05$). 수정 20분 후 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L의 농도에서 3배체 유도율은 각각 0.0, 15.5 ± 4.5 , 11.1 ± 3.1 , 9.5 ± 1.3 및 $0.7 \pm 0.3\%$ 였고, 50 mg/L는 60 mg/L를 제외한 다른 농도에 비해 유의하게 높은 3배체 유도율을 나타냈다($P < 0.05$). 3배체 생산율의 경우 40, 50, 60, 70 및 80 mg/L의 농도에서 수정 10분 후 각각 5.7, 4.8, 4.3, 4.2 및 6.4%였고, 수정 20분 후에는 각각 0.0, 6.0, 6.9, 5.2 및 2.6%를 보였다. 수정 10분과 20분 후의 총3배체 생산율은 60 mg/L의 농도에서 11.2%로 가장 높게 나타났다.

3-3. CB와 6-DMAP 처리조건별 발생 및 3배체 유도

3-3-1. CB 처리조건별 발생 및 3배체 유도

25℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 12에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 0.9~53.9, 1.1~23.9, 1.6~21.4, 1.1~53.2, 0.3~50.0 및 0.0~48.3%였고, 처리시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 유도율은 각각 23.0~51.1, 38.0~60.4, 36.1~50.0,

Table 11. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at different concentrations of treatment with 6-DMAP

Concentration (mg/L)	Hatching (%)		Triploid (%)			Triploid yield ^{IV} (%)			Total triploid yield ^V (%)
	Start time ^I (min.)		Start time ^I (min.)			Start time ^I (min.)			
	10 ^{II}	20 ^{III}	10 ^{II}	10 ^{III}	20 ^{III}	10 ^{II}	10 ^{III}	20 ^{III}	
40	38.1±6.0 ^a	37.3±2.4 ^a	15.0±2.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	5.7	0.0	0.0	5.7
50	36.3±15.5 ^a	38.4±14.3 ^{ab}	13.1±2.0 ^{ac}	15.5±4.5 ^b	4.8	4.8	6.0	6.0	10.8
60	21.9±3.3 ^b	62.6±7.0 ^c	19.5±0.4 ^a	11.1±3.1 ^{bc}	4.3	4.3	6.9	6.9	11.2
70	18.5±6.1 ^b	54.6±13.5 ^{bc}	22.6±10.3 ^{ab}	9.5±1.3 ^c	4.2	4.2	5.2	5.2	9.4
80	18.0±2.0 ^b	36.9±3.4 ^a	35.4±9.6 ^b	0.7±0.3 ^a	2.6	6.4	2.6	2.6	9.0
Control	92.1±6.0 ^c	85.6±7.2 ^d	0.0 ^c	0.0 ^a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^ITime after fertilization, ^{II}Inhibition of releasing first polar body, ^{III}Inhibition of releasing second polar body, ^{IV}Triploid rate×hatching rate/100, ^VTriploid yield of 10 min after fertilization+triploid yield of 20 min after fertilization. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

Table 12. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 25°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration

D&T	DT (min.)	25°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	53.9±10.0 ^a	23.9±5.6 ^a	21.4±4.6 ^a	53.2±16.0 ^a	50.0±10.7 ^a	48.3±16.1 ^a
	15	21.3±3.4 ^b	10.1±2.9 ^{ab}	13.9±3.3 ^a	44.9±9.8 ^a	41.9±3.3 ^a	11.4±11.7 ^b
	20	11.6±4.0 ^{bc}	6.8±4.5 ^{ab}	6.0±4.7 ^a	14.3±2.7 ^b	9.5±8.4 ^b	4.5±5.9 ^b
	25	3.0±1.3 ^c	2.4±2.9 ^b	4.1±3.6 ^a	3.4±2.0 ^b	2.4±2.1 ^b	2.2±1.2 ^b
	30	0.9±0.4 ^c	1.1±1.1 ^b	1.6±1.8 ^a	1.1±1.1 ^b	0.3±0.6 ^b	0.0 ^b
	DMSO	43.0±5.5 ^a	50.2±12.0 ^c	75.3±11.7 ^b	44.3±10.4 ^a	99.3±10.3 ^c	42.8±16.9 ^a
	Control	100.0±5.7 ^d	100.0±7.1 ^d	100.0±17.0 ^c	100.0±9.7 ^c	100.0±14.5 ^c	100.0±9.3 ^c
TR (%)	10	23.0±7.5 ^{ac}	38.7±6.8 ^a	44.4±10.3 ^a	23.8±7.2 ^{ab}	29.0±3.4 ^{ab}	5.4±4.2 ^{ab}
	15	26.8±4.9 ^{ac}	47.6±12.3 ^a	50.0±13.1 ^a	31.3±7.6 ^{bc}	15.6±7.7 ^a	14.5±3.8 ^{ab}
	20	42.5±15.1 ^{ab}	38.0±7.3 ^a	48.8±21.2 ^a	17.4±14.8 ^{ab} _d	17.3±6.4 ^{ab}	41.5±35.4 ^a
	25	51.1±31.4 ^b	39.0±9.2 ^a	36.1±5.4 ^a	51.4±8.4 ^c	30.9±5.1 ^b	15.3±6.4 ^{ab}
	30	50.0±17.2 ^b	60.4±18.0 ^a	48.8±7.8 ^a	32.6±6.5 ^{bc}	28.2±7.3 ^{ab}	–
	DMSO	4.8±3.2 ^{ac}	0.0 ^b	4.1±1.9 ^b	0.0 ^d	0.0 ^c	1.8±2.4 ^b
	Control	0.0 ^c	2.3±2.3 ^b	2.2±2.5 ^b	2.0±0.8 ^{ad}	0.0 ^c	0.0 ^b
TYR ^{III} (%)	10	12.4	9.2	9.5	12.7	14.5	2.6
	15	5.7	4.8	7.0	14.1	6.5	1.7
	20	4.9	2.6	2.9	2.5	1.6	1.9
	25	1.5	0.9	1.5	1.7	0.7	0.3
	30	0.5	0.7	0.8	0.4	0.1	–
	DMSO	2.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.8
	Control	0.0	2.3	2.2	2.0	0.0	0.0

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

17.4~51.4, 15.6~30.9 및 5.4~41.5%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 0.5~12.4, 0.7~9.2, 0.8~9.5, 0.4~14.1, 0.1~14.5 및 0.3~2.6%였고, 처리시간이 길수록 3배체 생산율이 낮아지는 경향을 보였다. 수정 20분 후 처리 15분에서 14.1%의 가장 높은 3배체 생산율을 보였다.

27℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 13에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 3.1~36.2, 1.1~28.6, 1.9~15.3, 0.6~30.2, 0.9~17.9 및 0.5~14.2%였고, 처리시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 유도율은 각각 10.4~64.2, 14.3~47.5, 2.5~50.0, 0.0~62.5, 43.5~70.4 및 37.5~73.8%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 1.0~7.4, 0.0~9.8, 0.1~8.1, 0.0~18.0, 0.4~10.1 및 0.2~6.1%였고, 수정 20분 후 처리 10분시 18.0%의 가장 높은 3배체 생산율을 나타냈다.

29℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 14에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 0.0~10.4, 0.8~31.9, 0.4~7.9, 0.0~10.9, 0.3~14.4 및 1.4~13.0%였고, 처리시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 유도율은 각각 0.0~34.8, 5.6~58.8, 0.0~10.8, 16.0~32.4, 2.4~47.8 및 7.5~38.1%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 0.0~2.4, 0.0~14.2, 0.0~0.8, 0.3~3.5, 0.0~3.2 및 0.2~2.7%였고, 수정 10분 후 처리 10분시 14.2%의 가장 높은 3배체 생산율을 보였다.

3-3-2. 6-DMAP 처리조건별 발생 및 3배체 유도

25℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상 유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 15에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 2.9~67.6, 0.3~39.2, 0.4~35.6, 0.0~48.5, 0.0~32.5 및 0.2~6.7%였고, 처리 시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15,

Table 13. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 27°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration

D&T	DT (min.)	27°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	36.2±13.2 ^a	28.6±6.2 ^a	15.3±3.4 ^a	30.2±9.8 ^a	17.9±5.0 ^a	14.2±5.2 ^a
	15	22.1±6.2 ^{ab}	20.7±4.5 ^{ab}	16.1±4.5 ^a	12.6±3.8 ^{ab}	14.3±3.7 ^a	7.8±4.5 ^a
	20	10.5±2.7 ^{bc}	8.9±4.1 ^{bc}	8.2±3.1 ^a	4.5±2.8 ^b	4.6±3.7 ^a	2.3±2.8 ^a
	25	7.5±3.2 ^{bc}	3.1±2.0 ^c	1.9±1.2 ^a	2.9±1.1 ^b	1.4±1.6 ^a	0.9±1.3 ^a
	30	3.1±1.3 ^c	1.1±1.2 ^c	2.5±4.4 ^a	0.6±1.1 ^b	0.9±0.6 ^a	0.5±0.8 ^a
	DMSO	85.2±5.5 ^d	96.0±10.5 ^d	82.4±10.2 ^b	66.1±14.5 ^c	89.6±7.6 ^b	62.4±12.2 ^b
	Control	100.0±5.8 ^d	100.0±3.1 ^d	100.0±13.5 ^b	100.0±6.6 ^d	100.0±15.9 ^b	100.0±11.8 ^c
TR (%)	10	10.4±4.0 ^{ad}	14.2±2.2 ^{ac}	29.0±9.0 ^{abc}	59.5±14.4 ^a	45.0±7.0 ^a	43.0±10.3 ^a
	15	33.3±5.8 ^{ab}	47.5±12.0 ^b	50.0±12.6 ^b	62.5±15.0 ^a	70.4±26.4 ^a	73.8±17.3 ^a
	20	64.2±21.9 ^c	30.9±17.1 ^{ab}	45.0±22.8 ^{ab}	52.5±20.8 ^a	65.8±6.6 ^a	63.6±17.9 ^a
	25	48.6±12.3 ^{bc}	30.0±10.6 ^{ab}	15.3±17.2 ^{ac}	0.0 ^b	50.0±15.5 ^a	60.8±19.6 ^a
	30	31.9±11.3 ^{ab}	0.0 ^c	2.5±4.3 ^c	42.5±17.0 ^a	43.5±12.8 ^a	37.5±13.2 ^{ab}
	DMSO	0.0 ^d	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^b	4.8±4.2 ^b	0.0 ^b
	Control	0.0 ^d	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^b	2.3±1.2 ^b	0.0 ^b
TYR ^{III} (%)	10	3.8	4.1	4.4	18.0	0.8	6.1
	15	7.4	9.8	8.1	7.9	10.1	5.8
	20	6.7	2.8	3.7	2.4	3.0	1.5
	25	3.6	0.3	0.3	0.0	0.7	0.5
	30	1.0	0.0	0.1	0.3	0.4	0.2
	DMSO	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

Table 14. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 29°C, different start times and durations of treatment with 0.5 mg/L CB concentration

D&T	DT (min.)	29°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	10.4±3.0 ^a	31.9±12.1 ^a	5.0±1.6 ^a	10.9±4.0 ^a	14.4±3.4 ^a	13.0±2.4 ^a
	15	5.9±2.8 ^a	21.8±6.8 ^{ab}	7.9±5.3 ^a	6.6±2.9 ^a	4.6±2.6 ^{ab}	12.8±4.3 ^a
	20	1.8±1.8 ^a	9.2±4.8 ^{bc}	6.6±2.7 ^a	1.8±0.7 ^a	1.0±1.7 ^b	7.0±5.1 ^a
	25	0.5±0.5 ^a	4.2±3.9 ^{bc}	1.2±1.1 ^a	0.0 ^a	1.1±0.5 ^b	2.5±2.5 ^a
	30	0.0 ^a	0.8±0.6 ^c	0.4±0.4 ^a	0.0 ^a	0.3±0.3 ^b	1.4±0.9 ^a
	DMSO	96.8±11.1 ^b	86.2±7.0 ^d	53.7±6.2 ^b	65.6±11.6 ^b	58.6±6.8 ^c	62.6±12.1 ^b
	Control	100.0±9.4 ^b	100.0±4.6 ^d	100.0±7.5 ^c	100.0±13.9 ^c	100.0±8.4 ^d	100.0±6.3 ^c
TR (%)	10	23.5±7.9 ^a	44.4±3.8 ^a	0.0	32.4±8.2 ^a	22.5±5.8 ^{ac}	4.8±3.5 ^a
	15	34.8±10.3 ^a	42.9±7.1 ^a	10.5±2.7	32.0±6.8 ^a	24.4±5.8 ^a	20.5±7.7 ^{ab}
	20	27.3±7.8 ^a	58.8±15.2 ^a	10.8±4.5	16.0±5.0 ^b	47.8±17.7 ^b	38.1±9.1 ^b
	25	0.0 ^b	19.4±6.4 ^b	7.7±6.9	–	25.0±4.0 ^a	7.5±4.4 ^{ab}
	30	–	5.6±4.5 ^b	8.0±5.3	–	2.4±2.8 ^{cd}	27.5±26.8 ^{ab}
	DMSO	0.0 ^b	0.0 ^b	6.9±5.0	2.3±0.7 ^c	0.0 ^d	0.0 ^a
	Control	2.9±2.9 ^b	2.9±1.0 ^b	0.0	0.0 ^c	0.0 ^d	0.0 ^a
TYR ^{III} (%)	10	2.4	14.2	0.0	3.5	3.2	0.6
	15	2.1	9.4	0.8	2.1	1.1	2.6
	20	0.5	5.4	0.7	0.3	0.5	2.7
	25	0.0	0.8	0.1	–	0.3	0.2
	30	–	0.0	0.0	–	0.0	0.4
	DMSO	0.0	0.0	3.7	1.5	0.0	0.0
	Control	2.9	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

Table 15. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 25°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration

D&T	DT (min.)	25°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	67.6±7.2 ^a	39.2±9.0 ^a	35.6±8.4 ^a	48.5±9.7 ^a	32.5±8.6 ^a	2.5±1.2 ^a
	15	38.6±7.5 ^b	0.3±0.1 ^b	8.0±4.3 ^b	39.3±6.6 ^{ab}	20.5±3.0 ^{ab}	6.7±5.1 ^a
	20	16.4±3.6 ^c	12.2±8.1 ^{ab}	1.6±0.9 ^b	22.7±5.0 ^b	10.3±17.9 ^{ab}	5.0±5.7 ^a
	25	10.1±5.0 ^c	5.9±2.0 ^b	1.6±1.0 ^b	0.0 ^c	0.5±0.4 ^b	1.6±0.6 ^a
	30	2.9±1.6 ^c	2.0±1.8 ^b	0.4±0.2 ^b	0.0 ^c	0.0 ^b	0.2±0.1 ^a
	Control	100.0±10.9 ^d	100.0±23.2 ^c	100.0±12.8 ^c	100.0±8.3 ^d	100.0±8.3 ^c	100.0±5.4 ^b
TR (%)	10	12.1±2.4 ^a	8.8±3.2 ^a	15.2±3.0 ^a	17.1±4.0 ^a	17.1±3.9 ^a	23.7±4.4 ^a
	15	17.1±1.9 ^{ac}	0.0 ^d	27.5±4.4 ^b	55.0±11.5 ^b	14.6±8.3 ^a	22.9±4.8 ^a
	20	20.6±4.4 ^{bc}	26.5±4.7 ^b	17.5±3.0 ^a	35.9±4.1 ^c	0.5±0.9 ^b	28.2±5.0 ^a
	25	25.7±3.4 ^b	14.3±4.3 ^{ac}	15.0±4.2 ^a	–	20.8±3.1 ^a	33.3±4.5 ^a
	30	16.7±1.5 ^{ac}	17.5±3.1 ^c	19.4±1.7 ^{ab}	–	–	27.3±2.1 ^a
	Control	0.3±0.4 ^d	0.0 ^d	0.3±0.6 ^c	0.2±0.3 ^d	0.0 ^b	0.2±0.2 ^b
TYR ^{III} (%)	10	8.2	3.4	5.4	8.3	5.6	0.6
	15	6.6	0.0	2.2	21.6	3.0	1.5
	20	3.4	3.2	0.3	8.1	0.1	1.4
	25	2.6	0.8	0.2	–	0.1	0.5
	30	0.5	0.4	0.1	–	–	0.1
	Control	0.3	0.0	0.3	0.2	0.0	0.2

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

20, 25, 30분 후에 3배체 유도율은 각각 12.1~25.7, 0.0~26.5, 15.0~27.5, 17.1~55.0, 0.5~20.8 및 22.9~33.3%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 0.5~8.2, 0.0~3.4, 0.1~5.4, 8.1~21.6, 0.1~5.6 및 0.1~1.5%였고, 수정 20분 후 처리 15분시 21.6%의 가장 높은 3배체 생산율을 나타냈다.

27℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 16에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 1.0~52.5, 0.4~15.7, 0.4~12.0, 0.0~31.8, 0.0~19.2 및 0.0~23.4%였고, 처리시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 유도율은 각각 17.5~52.5, 13.5~32.5, 16.7~27.5, 16.4~23.5, 0.2~10.7 및 0.0~13.3%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 0.5~20.5, 0.1~2.1, 0.1~2.1, 0.1~5.2, 0.0~2.0 및 0.0~2.3%였고, 수정 5분 후 처리 10분시 20.5%의 가장 높은 3배체 생산율을 보였다.

29℃에서 처리개시시간 및 처리시간에 따른 D상유생의 부화율, 3배체 유도율 및 생산율을 조사한 결과는 Table 17에서 나타낸 바와 같다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 부화율은 각각 5.5~94.1, 0.1~39.2, 0.6~36.2, 0.3~10.5, 0.0~17.0 및 0.0~55.0%였고, 처리시간이 길수록 부화율이 낮았다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 유도율은 각각 0.0~43.5, 32.0~66.7, 54.2~66.7, 0.0~53.3, 57.5~64.3 및 0.8~56.8%였다. 수정 5, 10, 15, 20, 25 및 30분 후에 3배체 생산율은 각각 0.0~23.2, 0.0~12.5, 0.4~22.5, 0.0~3.1, 2.6~10.4 및 0.0~15.2%였고, 수정 5분 후 처리 15분시 23.2%의 가장 높은 3배체 생산율을 나타냈다.

Table 16. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 27°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration

D&T	DT (min.)	27°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	52.5±13.7 ^a	15.7±3.1 ^a	12.0±3.0 ^a	31.8±4.2 ^a	19.2±3.0 ^a	23.4±5.6 ^a
	15	17.3±3.8 ^b	3.6±0.3 ^b	7.0±1.9 ^{ab}	31.8±2.0 ^a	6.8±11.7 ^{ab}	6.2±3.4 ^b
	20	13.9±1.7 ^b	0.7±0.4 ^b	7.0±2.0 ^{ab}	9.0±1.9 ^b	2.8±2.5 ^b	1.5±1.0 ^b
	25	5.9±2.4 ^b	0.4±0.2 ^b	1.5±1.2 ^{bc}	0.4±0.2 ^b	0.6±0.5 ^b	0.0 ^b
	30	1.0±0.8 ^b	0.4±0.1 ^b	0.4±0.2 ^c	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b
	Control	100.0±11.7 ^c	100.0±7.6 ^c	100.0±3.8 ^d	100.0±10.2 ^c	100.0±4.3 ^c	100.0±11.9 ^c
TR (%)	10	39.0±2.9 ^{ab}	13.5±1.2 ^a	17.8±3.6 ^a	16.4±2.8 ^a	10.6±1.5 ^a	10.0±1.4 ^a
	15	17.5±1.9 ^{ac}	32.5±4.3 ^b	20.0±1.3 ^a	15.7±0.8 ^a	0.8±1.4 ^b	13.3±2.4 ^b
	20	51.3±9.6 ^b	28.6±3.2 ^b	27.5±1.0 ^b	16.4±2.2 ^a	0.2±0.2 ^b	0.0 ^c
	25	52.5±20.9 ^b	22.2±6.6 ^{ab}	25.7±3.6 ^b	23.5±3.7 ^b	10.7±1.8 ^a	–
	30	48.8±12.3 ^b	26.1±4.4 ^b	16.7±2.7 ^a	–	–	–
	Control	0.0 ^c	0.0 ^c	0.8±1.4 ^c	0.0 ^c	0.0 ^b	0.0 ^c
TYR ^{III} (%)	10	20.5	2.1	2.1	5.2	2.0	2.3
	15	3.0	1.2	1.4	5.0	0.1	0.8
	20	7.1	0.2	1.9	1.5	0.0	0.0
	25	3.1	0.1	0.4	0.1	0.1	–
	30	0.5	0.1	0.1	–	–	–
	Control	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

Table 17. Hatching, triploid and triploid yield rate in D-shaped larva of *C. gigas*, at 29°C, different start times and durations of treatment with 60 mg/L 6-DMAP concentration

D&T	DT (min.)	29°C					
		Start time ^I (min.)					
		5	10	15	20	25	30
HR ^{II} (%)	10	94.1±10.2 ^a	39.2±3.8 ^a	36.2±7.3 ^a	10.5±4.5 ^a	17.0±3.7 ^a	55.0±18.2 ^a
	15	57.4±7.9 ^b	20.3±5.1 ^b	10.9±2.7 ^b	10.5±2.0 ^a	12.8±2.2 ^{ab}	26.4±3.4 ^b
	20	26.2±2.8 ^c	4.1±4.2 ^{bc}	3.6±1.5 ^b	3.6±1.9 ^a	4.0±0.8 ^{ab}	3.1±1.8 ^c
	25	20.7±2.2 ^{cd}	1.0±1.4 ^c	1.4±0.5 ^b	0.3±0.2 ^a	0.0 ^b	0.0 ^c
	30	5.5±3.6 ^d	0.1±0.1 ^c	0.6±0.4 ^b	0.3±0.1 ^a	0.0 ^b	0.3±0.6 ^c
	Control	100.0±10.3 ^a	100.0±12.6 ^d	100.0±7.0 ^c	100.0±10.6 ^b	100.0±11.1 ^c	100.0±4.1 ^d
TR (%)	10	0.0 ^a	32.0±2.1 ^a	62.2±5.4 ^a	29.8±9.5 ^{ab}	61.1±17.5 ^a	27.7±9.3 ^a
	15	40.4±15.3 ^b	59.6±4.7 ^{bc}	63.8±16.8 ^a	26.8±5.8 ^{ab}	57.5±9.9 ^a	13.3±0.8 ^a
	20	40.4±25.3 ^b	66.7±13.9 ^b	66.0±9.5 ^a	53.3±15.6 ^b	64.3±8.5 ^a	56.8±23.5 ^b
	25	33.3±6.6 ^{ab}	37.8±2.6 ^{ac}	54.2±20.2 ^a	50.0±18.8 ^b	–	–
	30	43.5±23.9 ^b	35.7±19.1 ^{ac}	66.7±12.9 ^a	0.0 ^a	–	0.8±1.4 ^a
	Control	0.2±0.3 ^a	2.3±3.9 ^d	0.7±0.8 ^b	0.6±0.6 ^a	0.9±1.2 ^b	0.0 ^a
TYR ^{III} (%)	10	0.0	12.5	22.5	3.1	10.4	15.2
	15	23.2	12.1	7.0	2.8	7.4	3.5
	20	10.6	2.7	2.4	1.9	2.6	1.8
	25	6.9	0.4	0.8	0.2	–	–
	30	2.4	0.0	0.4	0.0	–	0.0
	Control	0.2	2.3	0.7	0.6	0.9	0.0

D&T: development and triploidization, DT: duration of treatment, HR: hatching rate, TR: triploid rate, TYR: triploid yield rate. ^ITime after fertilization, ^{II}Defining the control as 100%, ^{III}Triploid rate×hatching rate/100. Values are means±SD (n=3). Different letters refer to significantly different results ($P<0.05$).

4. 고 찰

일반적으로 조개류의 방출란은 제1감수분열 중기의 단계에 머물러 있으며, 수정 후 제1극체를 방출하고 곧이어 제2극체를 방출한다. 따라서 조개류의 3배체는 제1극체의 방출을 억제하거나 또는 제2극체의 방출을 억제하는 방법으로 유도할 수 있다.

CB와 6-DMAP 처리에 의한 3배체 유도에서 부화율 및 3배체 유도율에 가장 중요하게 작용하는 요인은 처리농도라고 보고된 바 있다(Downing and Allen, 1987; Barber et al., 1992; Desrosiers et al., 1993; Gérard et al., 1996; Gérard et al., 1999; Tian et al., 1999a; Tian et al., 1999b; Lin et al., 2001). *Panopea abrupta*에서 0.48, 1.0 및 1.48 mg/L 농도의 CB로 처리하였을 때 1.0 mg/L에서 가장 높은 3배체 유도율을 보였고(Vadopalas and Davis, 2004), 버지니아굴에서 0.1, 0.25 및 0.5 mg/L의 농도의 CB로 처리시 최적 처리농도가 0.25 mg/L라고 보고하였다(Barber et al., 1992). 한편, 참굴에 있어서 Downig and Allen (1987)은 0.1, 0.5 및 1.0 mg/L 농도의 CB를 사용하였을 때 0.5 mg/L에서 가장 높은 3배체 유도율을 보였고, 또한 Lin et al. (2001)은 0.25, 0.4 및 0.5 mg/L의 농도에서 최적 처리농도는 0.4 mg/L라고 보고하여, 본 연구의 0.5 mg/L와 잘 부합한다. Desrosiers et al. (1993)와 Lin et al. (2001)은 6-DMAP 처리에 의한 참굴의 3배체 유도에서 가장 효과적인 처리농도는 각각 49.0 mg/L와 65.3 mg/L라고 보고하였다. 한편, Tian et al. (1999a; 1999b)은 참굴의 극체방출 억제처리에 의한 3배체 유도에서 제1극체의 방출과 제2극체의 방출을 억제하는 6-DMAP의 최적 처리농도는 각각 97.9 mg/L와 73.4 mg/L라고 보고한 바 있다. 따라서 6-DMAP의 최적 처리농도에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각되어 진다.

본 연구의 처리조건별 실험에서 CB 사용시 수온 27℃, 수정 20분 후에 10분 처리구에서 가장 높은 3배체 생산율을 나타냈는데, 이는 참굴에서 제1극체

가 30% 방출한 시기에 CB로 10분 처리하는 것이 가장 효과적이었다는 결과 (Lin et al., 2001)와 유사하였다. 본 연구에서 6-DMAP 사용시 수온 29℃, 수정 5분 후에 15분 처리구와 수정 15분 후에 10분 처리구에서 가장 높은 3배체 생산율을 보였다. Tian et al. (1999a)은 본 연구와 동일종인 참굴의 3배체 유도에서 제1극체 방출억제시 수온 25.0~25.5℃, 수정 10분 후에 15분 처리하는 것이 가장 효과적이라고 하였고, 제2극체 방출억제시에는 30%의 제1극체 방출하는 시기에 10분 처리하는 것이 가장 효과적(Tian et al., 1999b)이라고 하여, 본 연구결과를 뒷받침해주고 있다. 3배체 유도에서 처리개시시간은 유도율에 큰 영향을 미치는 요인이고, 처리지속시간은 유도율보다 부화율에 더 큰 영향을 미친다고 많은 연구에서 보고(Downing and Allen, 1987; Barber et al., 1992; Desrosiers et al., 1993; Tian et al., 1999a; Tian et al., 1999b; Lin et al., 2001; Vadopalas and Davis, 2004)된 바 있어, 본 연구의 결과가 더욱 신빙성을 얻었다고 판단된다. 본 연구의 CB와 6-DMAP 처리에서 모두 온도가 높을수록 D상유생의 부화율이 감소되고 기형률이 증가하였다. 이는 굴에 있어서 3배체 유도시 CB와 고온처리는 수정란의 발생을 더디게 하고, 유생의 기형률을 증가시킨다는 결과(Stanley et al., 1984; Quillet and Pennelay, 1986; Downing and Allen, 1987; 유 등, 1990)와 유사하였다.

본 연구에서 제1극체 및 제2극체 방출 억제 2가지 방법으로 3배체 유생을 유도할 수 있었고, 전반적으로 제1극체 방출 억제의 D상유생 크기가 제2극체 방출 억제의 D상유생 크기보다 큰 경향을 나타냈다. Arai et al. (1986)은 제1극체 방출 억제형 3배체와 제2극체 억제형 3배체의 차이점은 제1극체 방출 억제로 유도된 3배체들이 제2극체 방출 억제로 유도된 3배체보다 heterozygosity가 크다고 보고하였다.

일반적으로 약품 처리에 의한 3배체 유도에 있어서 3배체 생산율에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로서는 처리농도, 처리개시시간 및 처리지속시간 등이 있다(Downing and Allen, 1987; Barber et al., 1992; Desrosiers et al., 1993;

Tian et al., 1999a; Tian et al., 1999b; Lin et al., 2001; Vadopalas and Davis, 2004). 이외에도 배우자의 성숙도, 난발생 속도, 환경요인(온도, 염분 및 pH 등) 및 수정방법 등 다양한 요인의 영향을 받는다. 본 연구에서 일부 처리구 간에서 부화율 및 3배체 유도율의 편차가 컸었는데, 이러한 결과는 난질이나 난발생 속도의 차이에서 인해 기인된 것으로 생각된다. 따라서 실험구간의 편차를 줄이기 위해서 난질이나 난발생 속도가 부화율 및 3배체 유도율에 미치는 영향에 대한 세부적인 연구가 필요하다.



VII. 3배체 종묘의 대량생산

1. 서 설

최근 3배체를 이용한 굴 양식은 미국, 프랑스, 호주, 중국 등 여러 나라에서 성행하고 있다. 미국의 경우 인공종묘의 3분의 1 이상이 3배체로 생산되고 있는 실정이고, 프랑스의 경우 전체 종묘의 약 15%가 인공종묘인데 그중 대부분이 3배체로 생산되고 있다(최, 2012).

2007년 허베이스피리트호 유류오염 사고로 인해 총생산량의 5%를 차지하던 태안지역의 참굴 양식생산량이 2008년에는 1% 미만으로 급감하였다(Lim et al., 2011). 이를 계기로 해당지역의 어가소득과 굴 양식의 생산성 증대를 위해 갯벌참굴 양식이 도입되었다. 갯벌참굴 양식은 성장이 빠르고 부가가치가 높은 3배체굴 양식을 기본으로 하고 있다(최, 2012). 그러나 3배체 종묘의 높은 생산비용과 특허사용료 등으로 인해 일부 업체에서만 생산이 이루어지고 있어, 판매 단가가 매우 높고 종묘의 공급이 원활하지 않는 문제점을 안고 있다(Lim et al., 2011).

지금까지 참굴 3배체 종묘 대량생산에 있어서 저온 쇼크, 6-DMAP 처리 및 2배체와 4배체의 교배 등 방법으로 얻어진 유생과 치패의 성장 및 생존에 관한 연구가 보고되고 있다(Li et al., 2000; Yu et al., 2003; Guo et al., 1996; Wang et al., 2004). 그러나 국내에서는 참굴 3배체 종묘생산에 관한 연구는 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 3배체 종묘를 안정적으로 생산하기 위한 최적의 3배체를 유도조건을 활용하여 대량으로 3배체를 유도한 후, 유생사육 및 채묘 등 인공종묘생산 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험용 모패로서 거제·한산만에서 수하식으로 19개월 양성한 참굴(각장 57.3 ± 7.1 mm, 전중 68.7 ± 16.5 g) 200마리를 실험에 사용하였다.

2-2. 배우자 채취

알과 정자를 채취하기 위하여 모패의 오른쪽 패각을 제거한 다음, 1 mL syringe로 생식소 조직을 0.05 mL 정도 채취하여 슬라이드 글라스에 도말한 후, 광현미경으로 성숙상태를 확인하고 암·수를 구분하였다. 자웅동체 개체로 인한 수정을 방지하기 위하여 성숙한 암컷으로 구분된 개체들을 Chang et al. (2000)의 방법으로 생식소 부위를 얇게 저민 다음, 여과해수를 담은 190 mL 일회용 종이컵 속에 풀어 난해수를 만든 후, 광학현미경으로 재확인하였다. 확인이 완료된 난해수는 각각 55 μ m와 16 μ m의 필터로 여과한 후, 충분한 양의 여과해수로 씻어 찌꺼기를 제거하였다. 그 다음 알 5억개를 75 L 원형 플라스틱 용기에 수용한 후, 여과해수를 50 L까지 채워 난해수의 최종밀도가 10,000 개/mL 되도록 하였다. 그리고 난해수를 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 60~90분 동안 배양시켜 70~80%의 알이 GVBD가 일어난 후에 실험에 사용하였다. 정자해수는 정소를 얇게 저민 다음, 16 μ m의 필터로 여과하여 찌꺼기를 제거하고 20 L 원형 플라스틱 용기에 10×10^8 개/mL로 만들어 실험에 사용하였다.

2-3. 3배체 유도율 측정

3배체의 유도율을 조사하기 위하여 Chation and Allen (1985)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 각 실험구별로 1,000마리 이상의 D상유생 시료를 1.5 mL의 microcentrifuge tube에 넣어 3,000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 그 다음, phosphate buffered saline (PBS)용액 1 mL를 첨가하여

3,000 rpm로 3분간씩 3회 원심분리하여 세척하였다. 이후, PBS용액을 0.5 mL 첨가하여 1,500~2,000 rpm으로 1분간 균질하고 세포를 충분히 분리시킨 후, 30 μm 의 거름망으로 찌꺼기를 제거하였다. 그 다음, ethanol를 0.5 mL 첨가하여 -20°C 에서 4시간 이상(-80°C 에서 1시간 이상) 방치하였다. 그리고 4°C 에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 1 mL의 propidium iodide (PI)용액(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.1 % sodium citrate)을 넣어 실온 상태에서 30분간 염색하였다. 3배체 유도율은 Flow Cytometer (BD science Accuri[®] C6, USA)를 이용하여 측정하였다.

2-4. 3배체 대량유도

3배체의 대량유도를 위해 3배체 유도 실험결과에 따라, 29°C 에서 수정 5분 후에 60 mg/L의 6-DMAP 해수(29°C)에서 15분 처리하였다(Table 18). 수정은 50 L 해수가 들어있는 원형 플라스틱 용기(75 L)에서 실시하였고, 알의 수용밀도는 10,000개/mL, 정자와 알의 비율은 1,000:1였다. 극체억제 처리는 $\varnothing 50$ cm 망목 16 μm 의 거름망에 수정란을 약 5억개씩 넣어 40 L의 6-DMAP해수가 들어있는 $\varnothing 60 \times h 25$ cm의 원형 플라스틱 용기에서 실시하였으며, 총 15억개의 수정란을 처리하였다. 처리가 완료된 후, 수정란을 여과해수로 3회 세란한 다음, 15톤 사각 콘크리트수조에 수용하였다. 부화 밀도는 100개/mL, 수온은 26°C , 염분은 32.3 psu였다. 부화 24시간 후 전체 유생을 40 μm 의 거름망으로 수거하여 부화율과 D상 유생의 크기를 조사하였다.

2-5. 대량 유생사육

대량 유생사육은 D상유생 2,110.5만마리를 15톤 사각 콘크리트수조에 수용하여 실시하였다. 수온은 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 염분은 31.3~32.5 psu, 사육밀도는 0.1~1.4마리/mL, 먹이생물은 *Isochrysis galbana*, *Pheodactylum* sp., *Tetraselmis* sp., *Chlorella* sp.를 혼합하여 매일 3,000~5,000 cells/mL을 4회로 나누어 공급하였

Table 18. Treatment conditions of triploid mass induction in *C. gigas* with 6-DMAP

Concentration (mg/L)	Temperature (°C)	Time after fertilization (min.)	Duration of treatment (min.)
60	29	5	15

다. 수질관리는 3일 간격으로 전량환수를 실시하였고, 매 3일 간격으로 망목크기를 달리하여 3단계 크기로 선별하여 성장이 저조한 맨 아래 단계의 유생을 계수한 후 폐기하였다. 그리고 순수한 3배체 부착기 유생을 얻기 위해 12일째에 250 μm 의 거름망으로 선별하여 선두 그룹을 실험에 사용하였다. 유생 크기는 현미경 (Nikon MM-400, Japan)과 Data processor DP-E1/Data processing software E-MAX를 이용하여 0.1 μm 까지 측정하였다. 생존율은 사육수조에서 50 mL씩 3회 측정하여 평균을 낸 후 용적법으로 계산하였다.

2-6. 채묘와 치패사육

치패를 생산하기 위하여 사용된 유생은 각장 $363.5 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 크기의 부착기 유생이었다. 채묘는 바닥 부분에 180 μm 의 거름망이 붙여져 있는 Ø50×h20 cm의 원형 플라스틱 용기에 0.53±0.20 μm 의 굴 패각가루를 800 mL 넣어 얇게 깔은 후, 부착기 유생을 20만마리 수용하였다. 먹이생물은 *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp.를 혼합하여 5,000~10,000 cells/mL가 유지되도록 하였으며, 수질관리는 유수식(2 L/분)으로 하였다. 치패의 성장 및 생존율은 실험종료시 전체를 수거하여 측정하였다.

2-7. 통계분석

모든 실험결과로부터 얻어진 측정값들은 평균±표준편차로 표시하였다.

3. 결 과

3-1. 부화율 및 3배체 유도율

6-DMAP를 이용한 참굴의 3배체 대량유도 실험결과는 Table 19에서 나타낸 바와 같다. 수정란 15억개를 3배체 유도하여 부화한 결과, 각장 $77.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$ 의 D상유생을 2,110.5만마리 얻었으며, 부화율은 1.4%였다. 그중 3배체 D상유생은 728.1만마리로 3배체 유도율은 34.5%였다.

3-2. 유생의 성장과 생존율

3배체 대량 유생사육은 15톤 사각 콘크리트 수조에서 부착기 유생까지 사육한 결과, 각장은 3, 6, 9, 12 및 15일째 각각 89.6 ± 5.3 , 142.0 ± 15.4 , 194.2 ± 13.0 , 335.8 ± 18.4 및 $363.5 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 였고, 3일째까지는 성장이 다소 느렸으나 3~12일에서는 성장이 빨랐으며, 부착기 유생으로 성장하기 전인 12~15일사이에 성장이 다시 느려지는 경향을 나타냈다(Table 20). 한편, 유생의 생존율은 3, 6, 9, 12 및 15일째 각각 38.7, 29.4, 18.2, 10.8 및 4.3%로 3일째까지의 초기 D상유생 단계에서 폐사율이 높았고, 그 후 점차 감소하였으며, 부착기 유생으로 발생한 15일째에 90.8만마리가 생존하였다(Table 20). 유세포분석기를 활용하여 부착기 유생의 배수체 검사를 실시한 결과, 100% 3배체인 것으로 확인되었다(Fig.35).

3-3. 치패의 성장과 생존율

사육기간 동안 수온은 $22.3 \sim 26.3^\circ\text{C}$, 염분은 31.0~32.2 psu였다(Fig. 36). 각장 $363.5 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 의 부착기 유생 90.8만마리를 down wearing 방식으로 30일간 사육한 결과, 각장 $4.1 \pm 0.9 \text{ mm}$, 전중 $15.6 \pm 10.5 \text{ mg}$ 의 개체화된 치패 11.1만마리를 생산하였으며, 생존율은 12.3%였다(Table 21).

Table 19. D-shaped larval hatching rate and triploid percentage of mass induction in *C. gigas* with 6-DMAP

Number of egg ($\times 10^8$)	D-shaped larva				
	Shell length (μm)	Total number ($\times 10^4$)	Hatching (%)	Number of triploid ($\times 10^4$)	Triploid (%)
15	77.1 $\pm$ 3.0	2,110.5	1.4	728.1	34.5

Shell length values are means $\pm$ SD (n=30).

Table 20. Growth of shell length and survival rate of larva in *C. gigas*

Elapsed days	Shell length (μm)	Number of larvae ($\times 10^4$)	Survival (%)
0	77.1 $\pm$ 3.0	2,110.5	100.0
3	89.6 $\pm$ 5.3	816.8	38.7
6	142.0 $\pm$ 15.4	620.5	29.4
9	194.2 $\pm$ 13.0	384.1	18.2
12	335.8 $\pm$ 18.4	227.9	10.8
15	363.5 $\pm$ 28.6*	90.8	4.3

*All-triploid pediveliger larva. Shell length values are means $\pm$ SD (n=30).

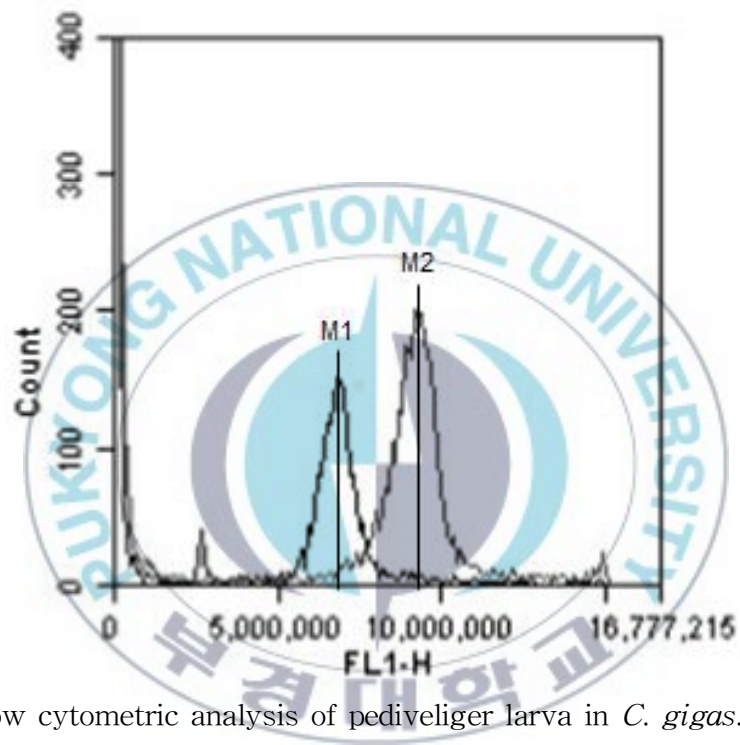


Fig. 35. Flow cytometric analysis of pediveliger larva in *C. gigas*. M1: diploid standard, M2: pediveliger larva of triploid.

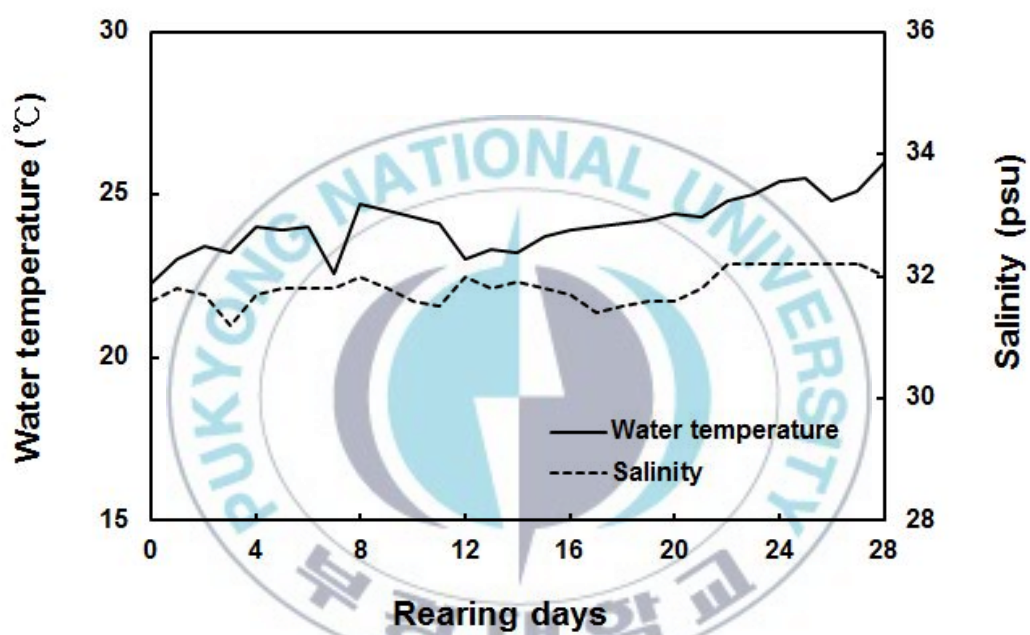


Fig. 36. Changes of water temperature and salinity in rearing period of juvenile *C. gigas*.

Table 21. Shell length, total weight and survival rate for triploid juvenile of 30 days after seedling collection in *C. gigas*

Number of pediveliger larvae ($\times 10^4$)	Juvenile			Survival (%)
	Shell length (mm)	Total weight (mg)	Number ($\times 10^4$)	
90.8	4.1 $\pm$ 0.9	15.6 $\pm$ 10.5	11.2	12.3

Shell length and total weight values are means $\pm$ SD (n=30).

4. 고 찰

본 연구에서 3배체 유생의 대량생산 시스템을 구축하고자 15억개의 수정란을 유도한 결과, D상유생의 부화율은 1.4%(2,110.5만 마리)였고, 3배체 유도율은 34.5%(728.1만 마리)였다. Yu et al. (2003)는 수온 23~24℃에서 제1극체가 50% 방출된 시기에 70 mg/L 농도의 6-DMAP를 사용하여 15분간 처리하는 조건으로 6억개의 수정란을 처리한 결과, D상유생 부화율은 71.0%, 3배체 유도율은 85.6%였다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구에 비해 매우 높은 부화율을 보였는데, 이는 29℃에서 6-DMAP의 독성으로 인해 수정란의 발생을 더디게 하고, 유생의 기형률을 증가시킴으로써 부화에 부정적인 영향을 미친 것으로 판단된다(Quillet and Pennelay, 1986; Downing and Allen, 1987).

본 연구에서 D상유생과 부착기유생의 각장은 각각 $77.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$ 와 $363.5 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 로서 Hur et al. (2008)가 보고한 2배체 참굴 D상유생($73.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$)과 부착기유생($311.0 \pm 10.8 \mu\text{m}$)의 각장에 비해 큰 편이다. Guo et al. (1996)와 Wang et al. (2004)은 참굴에 있어서 3배체 유생은 2배체 유생에 비해 성장이 빠르고, 크기도 크다고 하였는데, 이는 3배체 굴의 heterozygosity가 2배체에 비해 높음에서 기인된 것이라고 보고(Stanley et al., 1984)되어, 본 연구의 결과를 뒷받침해주고 있다. 한편, Wang et al. (2004)에 따르면, 2배체 암컷과 4배체 수컷을 교배하여 생산한 3배체 유생의 부착기까지의 생존율은 42.3%로서 본 연구의 4.3%에 비해 매우 높았는데, 이는 6-DMAP의 잔류 독성으로 인해 생존율이 낮은 것이라고 생각되어 진다(Kong et al., 2011).

본 연구에서 3배체 부착기 유생 90.8만마리를 down wearing 방식으로 30일간 사육하여 치패 11.1만마리를 생산하여 12.3%의 생존율을 보였다. Yu et al. (2008)는 3배체 부착기 유생을 물러가제, 비닐 및 염화비닐과판으로 채묘한 후, 10일간 사육하였을 때 생존율은 각각 11.24, 8.9 및 6.53%라고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다.

VIII. 종합고찰

갯벌참굴 양식산업을 확대·발전시키기 위하여 3배체 종묘의 공급이 안정적으로 이루어져야 하며, 안정적인 종묘공급을 위해서는 3배체 인공종묘 생산 기술의 확립이 필요하다.

3배체의 인공종묘 생산을 위해서는 생식소 성숙 유도 기법에 대한 기초적 연구가 필요하며, 획득한 알의 최종성숙 유도 및 채란방법에 대해서도 충분한 검토가 뒤따라야 한다. 또한 양질의 수정란 확보 및 부화에 미치는 요인에 관한 연구도 필요하다. 그리고 3배체 유도 및 대량사육 방법은 경제성을 고려하여 매우 시급한 문제이다.

따라서 본 연구에서는 갯벌참굴 양식용 3배체 종묘의 원천기술을 개발하고, 3배체를 활용한 개체굴 인공종묘 대량생산의 기반을 구축하기 위하여 모패의 성숙유도 기법, 난모세포의 성숙유도 및 산란유발 방법에 관하여 연구하였다. 또한 양질의 수정란 확보를 위한 알과 정자의 수정방법과 부화에 미치는 다양한 요인을 구명하였다. 그리고 cytochalasin B와 6-dimethylaminopurine의 처리에 따른 3배체 유도 및 3배체의 대량생산에 대한 기술을 획득함으로써, 3배체 인공종묘 대량생산에 관한 번식생물학적 지식을 축적하였다.

먼저 실내 인위적 제어 하에서 모패 생식소의 성숙을 유도하였고, 연체부중량지수, 생식소지수 조사 및 생식소의 조직학적 관찰을 통하여 산란기를 간접적으로 추정하였다. 다음으로, 생식소 조직관찰에 의해 50% 이상이 완숙기에 도달한 모패에 대하여 2~3일 간격의 연속 산란유발 실험을 통하여 정확한 산란시기를 파악하였다. 이 결과들에 의해 참굴의 생식소 성숙유도에 있어 가장 중요한 생식소 발달의 생물학적영도 $t_F=10.5^{\circ}\text{C}$ 와 $t_M=10.2^{\circ}\text{C}$, 최종성숙 적산수온 실험을 통하여 $K_F=481.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ 와 $K_M=410.2^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ 를 밝혀냄으로써 계획적인 3배체 종묘생산의 기틀을 마련하였다.

3배체를 유도하는 과정에서 절개법으로 채취한 알과 정자는 성숙도의 차이로 인해 발생 속도가 큰 차이를 보여 3배체의 유도율을 저하시키는 원인으로 작용하고 있어 체외에서 난모세포의 성숙유도를 통하여 수정란 발생의 일치성을 높이는 것이 필요하다. 본 연구에서는 6가지 신경전달물질의 처리 농도별 및 처리 시간별로 난모세포의 최종 성숙의 지표인 GVBD율을 조사한 결과, serotonin이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 이를 활용함으로써 조개류 3배체 종묘생산의 생산성 향상에 도움이 될 것으로 판단된다.

참굴의 방출란은 적출란에 비해 수정시 정상 발생률이 높다(Stephano and Gould, 1988). 특히, 발생 속도가 일정하여 3배체 유도시 보다 높은 유도율과 부화율을 얻을 수 있어 최적의 산란유발 방법을 모색하는 것이 필요하다. 그러나 이는 산란기구에 관한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구에서 serotonin과 dopamine이 가장 효과적인 산란유발제인 것으로 나타났고, 이들의 처리에 의해 얻은 알과 정자는 수정률 및 부화율에서 모두 차이가 없는 것으로 파악됨으로써 안정적인 3배체 종묘생산에 가능할 것으로 판단된다.

그리고 알과 정자의 수정 및 수정란의 발생 연구는 초기 생존율 향상에 직접적으로 작용하므로 조개류의 양식생산이나 조개류의 초기 발생에 관한 번식생물학적 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구는 최종 4배체 모패를 확보하기 위한 전 단계 조건인 3배체를 확보하기 위해 지금까지 많이 이용된 CB와 6-DMAP를 활용하여 극체방출 억제 조건의 구명을 통해 최적의 3배체 유도기술을 개발하여 참굴의 성장 부진 및 생산성 향상에 기여할 수 있을 것으로 전망된다.

본 연구에서는 3배체 대량 유도, 대량 유생사육 및 체묘 등 3배체 종패 대량 생산시스템을 구축함으로써 갯벌참굴 양식에 필요한 3배체 종묘를 안정적으로 공급하여 어가의 안정적인 고소득원이 될 것이다.

IX. 요 약

1. 생식소 성숙유도

참굴 모패의 생식소 발달은 암·수 모두 비활성기, 초기활성기, 후기활성기 및 완숙기의 4단계로 구분되었다. 생식소지수(GI)는 수온이 상승함에 따라 증가하였다. 그러나 연체부중량지수(FWI)는 수온의 변화와 관련성이 없었다. 생식소의 성숙유도 결과, 빠른 온도상승에서 암컷은 사육 64일 후에 60%의 개체가 방란을 하였고, 수컷은 사육 58일 후에 70%의 개체가 방정을 하였다. 느린 온도상승에서는 암컷은 사육 72일 후, 수컷은 사육 66일 후에 모두 80%의 개체가 방란·방정을 하였다. 적산수온 관계식 $K=H(T-t)$ 를 이용하여 구한 암컷과 수컷의 생물학적영도와 최종성숙 적산수온은 각각 $t_F=10.5^{\circ}\text{C}$, $t_M=10.2^{\circ}\text{C}$ 및 $K_F=481.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$, $K_M=410.2^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ 이었다.

2. 난모세포 성숙유도

난모세포의 최종성숙(GVBD) 유도를 위한 6종 신경전달물질의 효과에 대하여 *in vitro* 실험한 결과, acetylcholine, adrenaline, noradrenaline, dopamine, serotonin 및 histamine 중에서 serotonin은 GVBD 유도에 효과적이었다. 이외 신경전달물질들은 난모세포의 GVBD를 유도할 수 없었다. $10^{-7}\sim 10^{-3}$ M의 serotonin이 난모세포의 GVBD 유도에 효과적이었으며, 10^{-5} M과 10^{-4} M에서 60분 처리시 난모세포의 GVBD율이 97% 이상이었다.

3. 산란유발

신경전달물질별로 모패에 대한 산란유발 효과를 조사하였다. 산란유발 자극에서 10^{-3} M의 dopamine과 serotonin이 효과적이었으며, 수컷이 암컷보다 민

감하게 반응하였다. 반응개시 시간에 있어서 dopamine은 방란에 효과가 없었고, 방정은 17분 내에 개시되었다. Serotonin에 의한 방란은 29분 내에 방정은 13분 내에 개시되었다. 10^{-3} M의 dopamine에서 방란량은 253.0만개, 방정량은 100.1억개였고, 10^{-3} M의 serotonin에서 방란량은 197.0만개, 방정량은 143.1억개였다. 각 자극에서 얻은 알의 수정률과 부화율은 차이가 없었다.

4. 수정 및 부화

수정률과 부화율 향상을 위한 수정 조건에 대하여 조사한 결과, 참굴의 수정 및 부화의 적온도는 $18\sim 24^{\circ}\text{C}$, 최적은 24°C 였고, 적염분은 $25\sim 35$ psu였다. 알은 수온 24°C 에서 채란 4시간 이내에, 정자는 24°C 에서 채정 30분 이내에 수정하는 것이 효과적이었다. 최적의 정자와 알의 비율은 1,000:1이고, 매정시간은 30분~120분이었다. 그리고 최적의 수용밀도는 200개/mL이며, 용적에 따른 수정률과 부화율은 $50\sim 5,000$ mL에서 차이가 없었다.

5. 극체방출 억제처리에 의한 3배체 유도

참굴 2배체의 염색체수는 $2n=20$ 이었고, 3배체의 염색체수는 $3n=30$ 이었다. CB와 6-DMAP의 최적 처리농도는 각각 0.5 mg/L와 60 mg/L였다. 여러 처리 조건으로 3배체 유도 실험한 결과, 처리지속시간이 길수록 부화율이 낮았다. CB의 경우 가장 높은 3배체 유도율은 27°C 에서 수정 30분 후에 10분 처리한 실험구로서 73.8%였다. 6-DMAP의 경우 가장 높은 3배체 유도율은 29°C 에서 수정 10분 후에 20분 처리구와 수정 15분 후에 30분 처리구로서 66.7%였다.

6. 3배체 종묘의 대량생산

수정란 15억개를 처리하여 각장 77.1 ± 3.0 μm 의 D상유생을 2,110.5만마리 얻었으며, 부화율 1.4%, 3배체 유도율 34.5%였다. D상유생은 15일째 각장 363.5 ± 28.6

μm 의 부착기 유생으로 성장하였고, 생존율은 4.3%였다. 이후 부착기 유생 90.8만 마리를 down wearing 방식으로 사육한 결과, 30일째 평균 각장 $4.1 \pm 0.9 \text{ mm}$, 전중 $15.6 \pm 10.5 \text{ mg}$ 로 성장하였고, 생존율은 12.3%였다.

이상의 연구결과를 종합적으로 정리해보면, 참굴의 3배체 종묘의 대량생산을 위한 번식생물학적 기초지식을 획득한 가운데, 극체방출 억제처리에 의한 3배체 치패를 대량으로 생산하는 데 성과를 얻었다고 할 수 있다. 이는 향후 4배체 생산에 의해 2배체와 수정을 통한 3배체굴의 안정적 생산에 기여할 것으로 기대된다.



감사의 글

박사과정을 무사히 마칠 수 있게 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전합니다. 적응하기 힘든 시기에 저에게 항상 학문적 소양과 논리적 사고를 가질 수 있도록 이끌어 주시고, 이 논문이 완성될 수 있도록 지도해 주신 장영진 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 논문의 세심한 부분까지 자상하게 다듬어 주신 김동수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 특히 심사를 맡아주시고 많은 조언을 아끼지 않으신 국립수산물과학원의 지영주 연구관님, 김태익 연구관님, 허영백 연구관님께 깊은 감사를 드립니다.

대학원 과정동안 학문적 가르침과 인생의 바른 길을 찾을 수 있도록 가르쳐 주신 조재운 교수님, 허성범 교수님, 배승철 교수님, 김창훈 교수님, 김종명 교수님, 남윤권 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구실 선배로서 언제나 따뜻한 격려와 위로를 아끼지 않으신 선문대학교 권준영 교수님, 목포대학교 임한규 교수님, 국립수산물과학원 명정인 과장님, 이정용 박사님, 강덕영 박사님, 민병화 박사님, 정민환 박사님, 노경연 박사님, 해양수산부 김성희 사무관님께서 자리를 빌어 감사의 마음을 전합니다.

논문실험을 할 수 있도록 도움을 주신 국립수산물과학원 문태석 소장님, 조기채 소장님, 정춘구 연구관님, 변순규 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 5년이 넘는 긴 기간 동안 함께 생활하고 관심과 충고를 아끼지 않았던 국립수산물과학원 남해센터의 임영섭 주사님, 김숙경 주사님, 조현호 반장님, 권상훈 반장님, 김봉심 여사님, 정은정 여사님, 박윤환 형님께 감사의 마음을 전합니다.

대학원과정을 같이 동고동락하며 힘들고 어려울 때 제 모든 것들을 이해해 준 정종균, 김원진, 박진우, 도용현 님께 감사를 드립니다. 또한 번식생리학 연구실의 김기태, 류준형 님께도 감사의 마음을 전합니다.

5년이 넘는 긴 시간 동안 공부하는 데에만 전념할 수 있도록 아낌없이 지원 해주신 아버님, 그리고 부족한 아들 챙기시느라 언제나 고생하시는 어머님께 감사의 마음을 전하며, 두 분의 건강을 진심으로 기원합니다. 그리고 옆에서 항상 지켜보며 안스러워하던 오명의 눈빛을 머릿속 깊이 새기며 감사하고 사랑한다는 말을 드립니다.



참고 문헌

- Akashige, C., Fushimi, T., 1992. Growth, survival and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 1063-1071.
- Alcazar, S.N., Solis, E.P., Alcala, A.C., 1987. Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hippopus porcellanus* rosewater (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture 66, 359-368.
- Alliegro, M.C., Wright, D.A., 1983. Polyspermy inhibition in the oyster, *Crassostrea virginica*. J. Exp. Zool., 227, 127-137.
- André, C., Lindegarth, M., 1995. Fertilization efficiency and gamete viability of a sessile, free-spawning bivalve, *Cerastoderma edule*. Ophelia 43, 215 - 227.
- Arai, K., Naito, F., Fujino, K., 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52, 417-422.
- Arellano-Martinez, M., Racotta, I.S., Ceballos-vazquez, B.P., 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lions paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna ojo de liebre Baja California sur, Mexico. J. Shellfish Res. 23, 15-23.
- Babcock, R., Keesing, J., 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: Laboratory and field studies. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 1668 - 1678.
- Baker, M.C., Tyler, P.A., 2001. Fertilization success in the commercial gastropod *Haliotis tuberculata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 211, 205-213.

- Barber, B.J., 1984. Reproductive energy metabolism in the bay scallop *Argopecten concentricus* (Say). Ph. D. Thesis, Uni. of South Florida, Tempa. 122pp.
- Barber, B.J., Mann, R., Allen, S.K., 1992. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Aquaculture 106, 21-26.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. J. Shellfish Res. 10, 1-18.
- Blake, N.J., Sastry, A.N., 1979. Neurosecretory regulation of oogenesis in the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). Cyclic Phenomena in Mar. Plan. and Ani. Pergamon Press, New York. 181-190.
- Boldt, J., Schuel, H., Schuel, R., Dandekar, P.V., Troll, W., 1981. Reaction of sperm with egg-derived hydrogen peroxide helps prevent polyspermy during fertilization in the sea urchin. Gamete Res. 4, 365-377.
- Braley, R.D., 1985. Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture 47, 321-325.
- Chation, J.A., Allen, S.K., 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. Aquaculture 48, 35-43.
- Chang, H.J., Min, B.H., Bang, I.C., Kim, Y.J., Chang, Y.J., 2005. Parturition induction on melania snails, *Semisulcospira libertina libertina* and *Semisulcospira gottschei*. Dev. Reprod. 9, 7-13.
- Chang, Y.J., Choi, Y.H., Chang, Y.J., Choi, S.W., 2000. Effect of water temperature on the egg development of pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Kor. Fish. Soc. 33(6),

559-564.

- Chang, Y.J., Lee, T.Y., 1982. Gametogenesis and reproductive cycle of the cockle, *Fulvia mutica* (Reeve). J. Fish. Sci. Tech. 15, 241-253.
- Chung, E.Y., Lee, T.Y., An, C.M., 1991. Sexual maturation of the venus clam, *Cyclina sinensis* on the west coast of Korea. J. Med. Appl. Malacol. 3, 125-136.
- Chung, E.Y., Kim, S.Y., Park, K.H., Park, G.M., 2002. Sexual maturation, spawning, and deposition of the egg capsules of the female purple shell, *Rapana venosa* (*Gastropoda: Muricidae*). Malacologia 44, 241-257.
- Chung, E.Y., Kim, S.Y., Park, G.M., Yoon, J.M., 2006. Germ cell differentiation and sexual maturation of the female *Neptunea* (*Barbitonia*) *arthritica cumingii* (Crosse, 1862) (*Gastropoda: Buccinidae*). Malacologia 48, 65-76.
- Chung, E.Y., Park, Y.J., Lee, J.Y., Ryou, D.K., 2005. Germ cell differentiation and sexual maturation of the hanging cultured female scallop *Patinopecten yessoensis* on the east coast of Korea. J. Shellfish Res. 26, 1-10.
- Chung, E.Y., Ryou, D.K., Lee, J.H., 1994. Gonadal development, age and growth of the shortnecked clam, *Ruditapes philippinarum* (*Pelecypoda: Veneridae*), on the coast of Kimje, Korea. Kor. J. Malacol. 42, 38-54.
- Clotteau, G., Dubé, F., 1993. Optimization of fertilization parameters for rearing surf clams (*Spisula solidissima*). Aquaculture 114, 339 - 353.
- Desrosiers, R.R., Gérard, A., Peignon, J.M., 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 170, 29-43.
- Di, W.P., Wang, Z.P., Yu, R.H., Zhou, S.S., Gu, L.L., Li, ning, 2011. Effect

- of ammonia seawater and 5-HT on maturation of oocyte stripped from scallop, *Chlamys farreri* (Jones et Preston). Period. Ocean Univ. China 41, 46-50.
- Downing, S.L., Allen Jr., S.K., 1987. Induction triploidy in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatment with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture 60, 1-15.
- Dubé, F., Eckberg, W.R., 1997. Intracellular pH increase driven by an Na^+/H^+ exchanger upon activation of surf clam oocytes. Dev. Biol. 190, 41-54.
- Dubé, F., Guerrier, P., 1982. Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm or KCl, but not by NH_4Cl , requires a calcium influx. Dev. Biol. 92, 408-417.
- Elliott, B.E.J., 1980. Three types of acetylcholine response in bivalve heart muscle cells. J. Physiol. 300, 283-302.
- Encena II, V.C., Capinpin Jr, E.C., Bayona, N.C., 1998. Optimal sperm concentration and time for fertilization of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné 1758. Aquaculture 165, 347 - 352.
- Eppig, J.J., 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. Dev. Biol. 89, 268-272.
- FAO, 2012. <http://fao.org/fishery/statistics/en>
- Fong, P.P., Deguchi, R., Kyojuka, K., 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinesis* from central Japan. Biol. Bull. 191, 27-32.
- Fong, P.P., Duncan, J., Ram, J.L., 1994. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena*

- polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50, 506–509.
- Fong, P.P., Wall, D.M., Ram, J.L., 1993. Characterization of serotonin receptors in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.* 267, 475–482.
- Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., Naciri-Graven, Y., 1999. The induction of M I and M II triploids in the oyster *Crassostrea gigas* with 6-DAMP or CB. *Aquaculture* 174, 229–242.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Peignon, J.M., Ledu, C., Phélipot, P., 1996. Optimization of triploid induction by the use of 6-DAMP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquac. Res.* 25, 709–719.
- Gibbons, M.C., Castagna, M., 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189–191.
- Guo, X.M., Debrosse, G.A., Allen Jr., S.K., 1996. All-triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142, 149–161.
- Hahn, K.O., 1994. Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai* during conditioning with effective accumulative temperature. *Aquaculture* 122, 227–236.
- Hamida, L., Medhioub, M.-N., Cochard, J.C., Pennec, M.L., 2004. Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture* 239, 413–420.
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245, 318–321.
- Hodgson, A.N., Le Quesne, W.J.F., Hawkins, S.J., Bishop, J.D.D., 2007. Factors affecting fertilisation success in two species of patellid limpet

- (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilisation kinetics models. Mar. Biol. 150, 415 - 426.
- Hwang, U.K., Rhee, C.W., Kim, K.S., An, K.H., Park, S.Y., 2009. Effects of salinity and standard toxic metal (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). J. Environ. Toxicol. 24, 9-16.
- Hur, Y.B., Min, K.S., Kim, T.E., Lee, S.J., Hur, S.B., 2008. Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. J. Aquacult. 21, 203-212.
- Imai, T., 1953. Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. Venus 25, 157-167.
- Kadam, A.L., Koide, S.S., 1990. Stimulation of *Spisula* sperm motility by 5-hydroxytryptamine analogs. Invert. Reprod. Develop. 17, 33-37.
- Kalyanasundaram, M., Ramamoorthi, K., 1987. Larval development of the clam *Meretrix meretrix* (Linnaeus). Mahasagar 20, 115-120.
- Kang, K.H., Baik, K.K., Chang, Y.J., Yoo, S.K., 1996. Spawning induction according to stimulating treatment and spat rearing of scallop, *Patinopecten yessoensis*. Korean J. Malacol. 12, 99-104.
- Khalil, A.M., 1994. Influence of starvation, body size and temperature on ammonia excretion in the marine bivalve *Tapes decussatus* (L.). Aquacutl. Fish. Manag. 25, 839-847.
- Kikuchi, S., Uki, N., 1974. Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* I. Relation between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus hannai*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 33, 69-78.
- Kim, T.I., Ko, C.S., Hur, Y.B., Jin, Y.G., Chang, Y.J., 2011. Effect of water

- temperature, salinity and rearing density on the egg development of the hard clam, *Meretrix petechialis* (Lamarck). Kor. J. Malacol. 27, 167-173.
- Kim, Y.S., 1983. An inquiry into accumulative temperature on maturation of the abalone, *Haliotis discus hannai*. Bull. Kor. Fish. Soc. 16, 410-412.
- Kim, S.Y., Moon, T.S., Shin, Y.K., Park, M.S., 2009. Gonadal development and reproductive cycle of the granular ark, *Tegillarca granosa* (Bivalvia: Arcidae). J. Kor. Fish. Soc. 22, 34-41.
- Kong, J. Wang, Z.P., Yu, R.H., Liu, J., Zhang, Y.H., 2011. Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods. J. Fish. Sci. China 18, 581-587.
- Krantic, S., Dubé, F., Guerrier, P., 1993. Evidence for a new subtype of serotonin receptor in oocytes of the surf clam *Spisula solidissima*. Gen. Comp. Endocr. 90, 125-131.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N., Yamashita, M., 1997. Change in intracellular Ca^{2+} is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. Dev. Biol. 182, 33-41.
- Levitan, D.R., Sewell, M.A., Chia, F.S., 1991. Kinetics of fertilization in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: interaction of gamete dilution, age, and contact time. Biol. Bull. 181, 371 - 378.
- Lee, J.Y., Chang, Y.J., Chun, M.J., Chang, H.J., 2002a. Optimal method for fertilization of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Kor. Fish. Soc. 35, 135-139.
- Lee, J.Y., Chang, Y.J., Kim, Y.S., Choi, Y.H., 2002b. Influence of water

- temperature on egg development of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Aquacult. 15, 39-42.
- Lee, J.Y., Chang, Y.J., Lee, C.S., 1997. Reproductive cycle of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Kor. Fish. Soc. 30, 132-138.
- Lee, J.Y., Chang, Y.J., Park, Y.J., 1996. Spawning induction and egg development of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Aquacult. 9, 419-427.
- Lee, S.J., Min, K.S., Kim, B.K., An, C.M., Ju, S.M., Lee, J.S., 2006. Gonad development and gametogenic cycle of the pen shell, *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae). J. Kor. Fish. Soc. 39, 398-403.
- Li, X., Liang, J., Yan, X.W., Zhang, G.F., 2007. The relationship between water temperature and periodic variation of histology with gonad development of manila clam *Ruditapes philippinarum* in different regions. J. Fish. China. 31, 853-859.
- Li, X., Liu, S.F., Kang, L., Xu, D.X., 2002. The influence of environmental factors on sperm motion and fertilization of the abalone and oyster. J. Dalian Fish. Univ. 17, 25-30.
- Li, Y., Yu, R.H., Wang, Z.P., Wang, R.C., Zheng, X.D., 2000. Comparison on inducing methods of large-scale production of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). High Tech. Lett. 10, 1-3.
- Liang, J., Yan, X.W., Li, X., Zhang, G.F., 2007. Biological zero point of gonad development of *Ruditapes philippinarum*. Mar. Sci. 31, 67-72.
- Lim, H.J., Lee, T.S., Cho, P.G., Back, S.H., Byun, S.G., Choi, E.H., 2011. The production efficiency of cupped oyster *Crassostrea gigas* spats according to clutch and growth comparing diploid and triploid oyster in off-bottom culture for tidal flat utilization. Kor. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 259-266.

- Lin, Z.H., Cai, X.L., Mou, Z.S., Zhang, J.M., Fan, J., 2001. Study on seedling production of triploid oyster *Crassostrea gigas*. J. Ningbo Univ. 14, 31-37.
- Liu, D.J., Huang, T.H., Xiao, S.Q., Chen, W.G., 2002. Study on the thermal sum beneficial and biological zero of gonad development of *Coelomactra antiquata* (Spengler). Spe. Wild Eco. Anim. Pla. Res. 33, 33-34.
- Longo, F.J., 1973. An ultrastructural analysis of polyspermy in the surf clam, *Spisula solidissima*. J. Exp. Zool. 183, 153-180.
- Longo, F.J., Lori, M., Dennis, H., 1993. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation. Biol. Bull. 185, 197-214.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. J. Biol. Bull. 103, 80-86.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve molluscs. Advanced Mar. Biol. 1, 1-136.
- López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Croll, R.P., Acosta-Salmón, H., 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Comp. Biochem. Physiol. Part A 154, 425-428.
- Lu, H., Li, D.C., Gong, X.J., Yu, D.Z., 1998. Gonadal development of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the relationship between condition index and accumulative temperature. J. Fish. Sci. China. 5, 18-24.
- Lu, H., Li, X., Dong, Y.C., Zhang, G.F., 2008. The relation between effective accumulated temperature and gonad development period of

- scallop, *Argopecten irradians*. Mar. Sci. 32, 57-60.
- Lubet, P., Mathieu, M., 1990. Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves. Ann. Biol. 29, 235 - 252.
- Mackie, G.L., 1984. Bivalves. In: The mollusca, Vol. 7. Reproduction. (ed. By Tompa, A.S., Verdonk, N.H. and Van Den Biggelaar, J.A.M). Academic Press, New York., 351-418.
- Mathieu, M., 1994. Endocrine control of carbohydrate metabolism in molluscs. Perspect. Comp. Endocrinol. 471 - 474.
- Mathieu, M., Robbins, I., Lubet, P., 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. Aquaculture. 94, 213 - 223.
- Matsutani, T., Nomura, T., 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). Mar. Biol. Lett. 3, 353-358.
- Matsutani, T., Nomura, T., 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and the gonad of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50, 425-230.
- Matsutani, T. Nomura, T., 1986. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and the gonad of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Cell Tissue Res. 244, 515-517.
- Min, K.S., Kim, B.S., Kim, T.I., Hur, Y.B., Chung, E.Y., 2004. Reproductive cycle and induced sexual maturation of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Kor. J. Malacol. 20, 75-84.
- Moon, T.S., Jung, M.M., Shin, Y.K., Yang, M.H., Ko, C.S., Chang, Y.J., 2004. Spawning inducement, egg development and early larval rearing of ark shell (*Tegillarca granosa*) (L.). J. Kor. Fish. Soc. 37, 485-491.
- Narvarte, M.A., Pascual, M.S., 2003. Fertilization, larval rearing and post-larval growth of the tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus*

- D'Orb., 1846. Aquaculture 217, 259-274.
- O'Connor, W.A., Heasman, M.P., 1995. Spawning induction and fertilisation in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. Aquaculture 136, 117 - 129.
- O'Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. Aquaculture 229, 493 - 506.
- Oh, B.S., Jung, C.G., Kim, S.Y., Kim, S.Y., Chung, E.Y., 2002. Reproductive cycle of the bay scallop, *Argopecten irradians* transplanted from China. J. Kor. Fish. Soc. 35, 201-206.
- Osada, M., Matsutani, T., Nomura, T., 1987. Implication of catecholamine during spawning in bivalve molluscs. Int. J. Invert. Reprod. Dev. 12, 241-252.
- Osada, M., Nakata, A., Matsumoto, T., Mori, K., 1998. Pharmacological characterization of serotonin receptor in the oocyte membrane of bivalve molluscs and its formation during oogenesis. J. Exprim. Zool. 281, 124-131.
- Osanai, K., 1985. *In vitro* induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18, 1-9.
- Osanai, K., Kuraishi, R., 1988. Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi Tohoku Univ. 18, 45 - 56.
- Pani, A.K., Croll, R.P., 1995. Distribution of catecholamines, indoleamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). Cellu. Molec. Neurobio. 15, 371-386.
- Park, K.Y., Lee, K.Y., 2008. Germ cell differentiations during oogenesis and

- reproductive cycle in female jicon scallop, *Chlamys farreri* on the west coast of Kor. Dev. Reprod. 12, 195-202.
- Park, K.Y., Kim, S.K., Seo, H.C., Ma, C.W., 2005. Spawning and larval development of the jicon scallop, *Chlamys farreri*. J. Aquacult. 18, 1-6.
- Paulet, Y.M., Donval, A., Vekhadra, F., 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, preliminary approach. Inv. Repro. Dev. 23(2) 3, 89-94.
- Pazos, A.J., Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. Gen. Comp. Endocrinol. 113, 112 - 120.
- Quillet, E., Penelay, P.J., 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 57, 271-279.
- Rampersad, J.N., Agard, J.B.R., Ammons, D., 1994. Effects of gamete concentration on the in vitro fertilisation of manually extracted gametes of the oyster (*Crassostrea rhizophorae*). Aquaculture 123, 153 - 162.
- Ren, S.L., Sheng, X.Z., Wang, R.C., Feng, P., Xu, H., 2001. Studies on ectogenesis of eggs stripped from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Mar. Sci. 25, 35-38.
- Ren, S.L., Wang, D.X., Sheng, X.Z., Wang, R.C., 2000. Cytology of fertilization in the *Crassostrea gigas* (Thunberg) eggs by promoted maturation in sea water. Trans. Ocean. Limnol. 4, 34-38.
- Rodriguez-Moscoso, E., Arnaiz, R., 1988. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linne, 1787) in northwest Spain. Aquaculture 162, 125-139.
- Sagara, J., 1958. On the optimum temperature and salinity for the

- development of hard clam, *Meretrix meretrix* lusoria. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 32, 27-31.
- Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. Aquaculture 47, 335 - 352.
- Sastry, A.N., 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck. Biol. Bull. 130, 118-134.
- Shi, K.T., Wang, Z.P., Yu, R.H., 2008. Comparison on survival time of spermatozoon between diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. Mar. Sci. 32, 52-56.
- Shin, Y.K., Choi, N.J., Oh, B.S., Jung, A.J., Kim, S.Y., 2007. Gonad development and reproductive cycle of the purplish washington clam, *Saxidomus purpuratus* (Bivalvia: Veneridae) from Gangjin Bay. Korean J. Malacol. 23(2), 165-172.
- Simpson, R.D., 1982. Reproduction and lipids in the subantartic limpet *Nacella (Patinigera) macquensis* Finlay, 1927. J. Exp. Mar. Biol. Eco. 56, 33-48.
- Son, P.W., Chung, E.Y., 2005. Gonadal development, first sexual maturity and sex ratio of the sun and moon scallop *Amusium japonicum japonicum* on the coastal waters of Jeju, Korea. Dev. Reprod 9, 95-103.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311-314.
- Staeger, W.H., Horton, H.F., 1976. Fertilization method quantifying gamete concentrations and maximizing larvae production in *Crassostrea gigas*.

- US Natl. Mar. Fish. Serv. Fish Bull. 74, 698-701.
- Stanley, J.G., Allen Jr., S.K., Hidu, H., 1981. Polyploid induced in the American oyster, *Crassostrea virginica* with cytochalasin B. *Aquaculture* 23, 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H., Allen, Jr.S.K., 1984. Growth of american oyster increased by polyploid induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture* 37, 147-155.
- Stauber, L.A., 1950. The problem of physiological species with special reference to oysters and oyster drills. *Ecology* 31, 109-118.
- Stefano, G.B., Aiello, E., 1975. Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Biol. Bull.* 148, 141-156.
- Stefano, G.B., Catapane, E.J., 1977. Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia* 33, 1341-1342.
- Stephano, J.L., Gould, M., 1988. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 73, 295 - 307.
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Aquaculture* 273, 503 - 508.
- Tettelbach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249-256.
- Tian, C.Y., Liang, Y., Wang, R.C., Yu, R.H., Wang, Z.P., 1999a. Triploid of *Crassostrea gigas* induced with 6-dimethylamiopurine: blocking polar body I. *J. Fish. China* 23, 128-132.

- Tian, C.Y., Wang, R.C., Liang, Y. Yu, R.H., Wang, Z.P., 1998. Triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as induced by cold shock. Mar. Sci. 1, 54-55.
- Tian, C.Y., Wang, R.C., Liang, Y. Yu, R.H., Wang, Z.P., 1999b. Triploid of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: by blocking the second polar body of the zygotes. J. Fish. Sci. China 6, 1-4.
- Uki, N., Kikuchi, S., 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. Aquaculture 39, 247-261.
- Vadopalas, B., Davis, J.P., 2004. Optimal chemical triploid induction in geoduck clams, *Panopea abrupta*, by 6-dimethylaminopurine. Aquaculture 230, 29-40.
- Velasco, L.A., Barros, J., Acosta, E., 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture 266, 153-165.
- Vélez, A., Alifa, E., Aguaje, O., 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic scallop *Pecten ziczac*. Aquaculture 84, 307 - 313.
- Ventilla, R.F., 1982. The scallop industry in Japan. Adv. Mar. Biol. 20, 309-382.
- Wang, Z.P., Jiang, B., Kong, L.F., Yu, R.H., Wang, R.C., Guo, X.M., 2004. Large-scale production of all-triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) seeds by crossing tetraploids and diploids. Period. Ocean Univ. China 34, 742-746.
- Wang, Z.P., Wang, R.C., Li, H.G., Zheng, X.D., 1997a. Improving maturation of eggs stripped from oyster, *Crassostrea gigas*. Trans. Ocean. Limn.

2, 70-75.

- Wang, Z.P., Wang, R.C., Wen, J., Zheng, X.D., 1997. Surviving time and fertilizing ability of stripped gametes in oyster, *Crassostrea gigas*. Mar. Sci. 21, 5-6.
- Wang, Q., Zhang, T., Zhang, L.B., 2008. Fuction of cAMP signaling pathway in serotonin-induced oocyte maturation of hard clam *Mercenaria mercenaria*. High Tech. Lett. 18, 91-96.
- Wi, C.H., Chang, Y.J., Lee, S.J., Hur, Y.B., Lee, J.S., 2003. Sexual maturation and gametogenic cycle of the hard shelled mussel, *Mytilus coruscus* (Bivalvia: Mytilidae). J. Kor. Fish. Soc. 16, 245-251.
- William, M.E., Bentley, M.G., 2002. Fertilization success in marine invertebrates: the influence of gamete age. Biol. Bull. 202, 34 - 42.
- Yu, R.H., Wang, Z.P., Shi, K.T., Kong, L.F., Mu, Z.B., Ma, H.L., 2008. Studies on large-scale culture technique in production of cultchless all-triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) seeds. Tran. Ocean. Limn. 13, 115-120.
- Yu, R.H., Wang, Z.P., Tian, C.Y., Wang, R.C., 2001. Induced triploid in the Pacific oyster using caffeine combined with thermal shock. J. Ocean Univ. Qingdao 518-522.
- Yu, R.H., Wang, Z.P., Wang, R.C., Tian, C.Y., Zheng, X.D., 2003. Comparison of economic efficiency of triploidy induction in Pacific oysters, *Crassotrea gigas* by two methods. Tran. Ocean. Limn. 8, 57-61.
- Zhou, W., 1991. The biological zero of gonad development of bay scallop (*Argopecten irradians*). J. Fish. China 15, 82-84.
- Zhou, W., Sun, J.W., Li, W.J., Wang, J., 1999. The effective accumulative

temperature of *Argopecten irradians* spawning. Ocean. Limnol. Sci. 30, 564-567.

국립수산물과학원, 2013. 갯벌참굴 종묘생산 기술개발 연구. 131-132.

최석훈, 2012. 갯벌참굴사업 활성화 전략. 어항어장. 4(1,2), 19-22.

유명숙, 이정미, 김일봉, 1990. 참굴의 3배체 생산에 관한 연구. 수진연보 44, 127-136.

