



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

수산학석사 학위논문

참굴(*Crassostrea gigas*) 미수정란 및
유생의 냉동보존



2012년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

김 기 태

수산학석사 학위논문

참굴(*Crassostrea gigas*) 미수정란 및
유생의 냉동보존

지도교수 장 영 진

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함



2012년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

김 기 태

김기태의 수산학석사 학위논문을 인준함

2011년 12월



주 심 수산학박사 임 한 규



위 원 농 학 박 사 공 승 표



위 원 농 학 박 사 장 영 진



목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 미수정란의 냉동보존	3
(1) CPA 침지와 침지 후 수정률 및 부화율	3
(2) 냉동 및 해동 후 수정률	7
(3) 냉동 전후 미수정란의 형태비교	11
2. 유생의 냉동보존	12
(1) CPA 농도별 해동 후 생존율 및 LAI	12
(2) 냉동보존 기간별 해동 후 생존율 및 LAI	12
(3) 냉동 전후 유생의 형태비교	15
(4) 해동유생의 사육시간별 생존율 및 LAI	15
3. 통계처리	15
III. 결 과	16
1. 미수정란의 냉동보존	16
(1) CPA 침지와 침지 후 수정률 및 부화율	16
(2) 냉동 및 해동 후 수정률	16
(3) 냉동 전후 미수정란의 형태비교	16
2. 유생의 냉동보존	21

(1) CPA 농도별 해동 후 생존율 및 LAI	21
(2) 냉동보존 기간별 해동 후 생존율 및 LAI	26
(3) 냉동 전후 유생의 형태비교	26
(4) 해동유생의 사육시간별 생존율 및 LAI	30
IV. 고 찰	33
V. 요 약	36
감사의 글	38
참고문헌	41



Cryopreservation of Unfertilized Eggs and Larvae in Pacific Oyster *Crassostrea gigas*

Ki Tae Kim

*Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Abstract

This study was performed to find out the tolerance against the cryoprotective agent (CPA) and to determine the optimal CPA of unfertilization egg for cryopreservation. Also cryopreservation of larvae, structure of pre-freezing and post-thawed larvae, long-term storage of cryopreserved larvae and rearing of thawed larvae were investigated.

In the cryopreservation of unfertilized eggs, fertilization rates and hatching rate were increased with decreasing the concentration of CPA and also were decreased with increasing time of immersion.

10% ethylene glycol was determined as an appropriate CPA through immersion test on unfertilized eggs, but the post-thawed fertilization rates were 0% in all freezing methods.

Morphological shape of unfertilized egg at pre-freezing and

post-thawing was observed with transmission electron microscopy. Post-thawed unfertilized eggs showed mitochondria, yolk granules and lipid droplet were irregularly arranged and destroyed.

In the cryopreservation of larvae, after that, when 50% of embryos reached to trochophore, D-shaped and early umbo larvae showing the active motion were used in each experiment. Trochophore, D-shaped and early umbo larvae were used in 0.2 M sucrose and final concentrations of 2.0 M and 2.5 M ethylene glycol. Each CPA with all concentrations was 10 minutes of equilibration time. The survival rates of each larva post-thawed were 63.8% in trochophore, 84.1% in D-shaped larva and 56.3% in early umbo larva.

Morphological shape of trochophore, early umbo larva at pre-freezing and post-thawing was observed with transmission electron microscopy. Early umbo larva showed irregularly arranged cilia, nucleus and had rough surface shell.

Immediately after thawing, the survival rates of trochophore larvae in Pacific oyster was 63%. However, survival rate of trochophore larvae after one hour was decreased rapidly 28% and then no trochophore larvae were alive until 24 hours in the rearing experiment. After thawing, the survival rate of D-shape larvae in Pacific oyster reared in seawater was 87%, and then 12 hours 79%, 24 hours 68%. However, all of them could not alive until 75 hours in rearing experiment. After thawing, the survival rate of early umbo larvae in Pacific oyster reared in seawater was 56%, and then 12 hours 47%, 24 hours 36%. However, all of them could not alive until 57 hours in rearing experiment. Moreover, developmental rate was also 0%.

I. 서론

유용양식 대상종인 참굴 *Crassostrea gigas*은 인공먹이 공급없이 자연 생태계의 생산력에 의해 키워지는 조개류로서, 연안의 환경오염으로 수질환경의 악화와 집약적 양식으로 인해 품질이 떨어지고 있다. 그에 따른 어미굴의 생리적 활성과 유생의 건강도가 저하되는 등 대량폐사 현상도 빈발하고 있다. 이에 대한 대책의 일환으로서 자연채묘 보다는 인공 종묘생산에 의한 양식용 종패의 확보방법이 부각되고 있다. 이를 위해서는 무엇보다 유전적으로 우수한 어미와 함께 우량형질을 지닌 유생의 공급이 원활히 이루어져야 하며, 한가지로서 미수정란 및 발생배의 대량 냉동보존기술을 고려해 볼 수 있다.

발생배의 냉동보존은 의학, 축산, 양식 분야에서 그 중요성이 인정되고 있으며, 척추동물, 특히 포유류를 대상으로 기술개발이 촉진되고 있다(Arii et al., 1987). 하등 척추동물인 어류에서는 송사리 *Oryzias latipes* (Arii et al., 1987), 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss* (Ahammad et al., 1998) 등의 알과 발생배를 냉동보존하기 위한 연구가 이루어진 바 있으나, 만족할 만한 성과는 없었다. 이는 경골어류의 알은 크기가 크고, 난황의 양이 많으며(Mazur, 1984), 두 개의 다른 막 즉, 원형질막과 난황막이 존재할 뿐만 아니라, 막을 통과하는 물의 투과성이 낮기 때문이다(Wallace and Selman, 1990). 한편, 무척추동물에서는 성체를 사용하여 최초로 발생배 냉동보존이 시작되었다(Asahina and Takahashi, 1978). 특히, 참굴을 포함한 조개류에서는 어류에 비해 발생배의 크기가 작을 뿐만 아니라 소황란(microlecithal egg)으로 난황의 양이 적어 냉동보존 기술개발이 비교적 용이한 것으로 알려져 있다.

현재까지 조개류의 발생배를 대상으로 한 연구는 blue mussel *Mytilus galloprovincialis* (Toledo et al., 1989), 참굴 *Crassostrea gigas* (Renard, 1991;

McFadzen, 1992; Gwo, 1995; Chao et al., 1997; Naidenko, 1997), Manila clam *Tapes philippinarum* (McFadzen, 1992), 백합 *Meretrix lusoria* (Chao et al., 1997), 진주조개 *Pinctada fucata martensii* (Chang et al., 1999), 북방대합 *Spisula sachalinensis* (Chang et al., 2001), 피조개 *Scapharca broughtonii* (Jo et al., 2002) 등이 있다.

냉동보존에 있어서 발생배의 생존력은 크기나 발생단계, 결빙억제제 (cryoprotective agent, CPA)의 종류와 농도 및 냉동률에 따라 달라진다. 특히, 조개류 발생배의 냉동에서 담륜자와 D형유생은 2~4세포기나 포배기 보다 높은 해동 후 생존율을 나타냈다(Gwo, 1995). 이와 같이 조개류 유생의 냉동보존시 고려되어야 하는 여러가지 요소 중에서도 보존에 적합하고 냉동에 대한 내성이 보다 강한 유생의 발생단계를 찾아내기 위하여 심도있는 연구가 필요한 실정이다.

위의 발생단계와 CPA 등의 요인들을 고려하여 냉동보존에 성공할지라도, 이것이 실험실내 연구로서만이 아니라 산업적인 수준으로 발전할 수 있어야만 한다. 이를 위해서 먼저, 냉동보존한 조개류 유생을 이용하여 장기간 보존 뒤 해동 후 발생재개 및 변태성장에 관한 연구가 진행되어야 한다.

본 연구에서는 유용종 양식 패류인 참굴의 미수정란 및 유생을 이용하여 장기간 보존 후 해동시 발생 및 성장에 관한 연구의 기초자료를 제공하기 위해, 사육을 통한 유생의 발달단계 및 생존율을 파악하고자 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 미수정란의 냉동보존

(1) CPA 침지와 침지 후 수정률 및 부화율

채란·채정용 모패는 1~2년생 양식참굴 *Crassostrea gigas*로서 20개체를 15℃의 ice box에 수용하여 실험실로 수송한 후, 패각에 붙어 있는 오염물질 및 이물질을 제거하고, 수온 20℃의 사육시스템에서 하루동안 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 패류 사육수조는 5개의 사각수조(수용적 45 L)와 3개의 여과수조(숨, 산호사, 모래 여과조)로 구성되었다(Fig. 1). 실험용 모패는 4개체로서 각장 58.0 ± 4.6 mm, 각고 104.9 ± 13.4 mm, 전중 62.5 ± 15.5 g, 육중 9.4 ± 3.0 g이었다(Table 1).

먼저 생식소와 인접한 껍질을 파쇄하여 구멍을 낸 후(Fig. 2A), 1 mL 실린지를 이용하여 미수정란을 채취하였다(Fig. 2B). 이 후 미수정란을 필터가재 망목 140 μ m, 65 μ m, 20 μ m의 3중 체로 여과한 뒤, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독하고, 자외선 유수살균기(Jebo, China)를 거친 깨끗한 해수에 보관하면서 CPA 침지실험에 사용하였다. 침지 실험에 사용되어진 CPA의 종류는 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), methanol, polyethylene glycol (PEG)이었으며, 농도 및 침지시간은 각각 5, 10, 15, 20%, 10, 20, 30, 40분으로 실시하였다.

인공수정 전 수컷 참굴의 모패를 개각하여 생식소로부터 얻은 정액을 인공해수와 1:5비로 희석하여 준비한 다음, 침지시간이 각각 10, 20, 30, 40분씩 침지한 미수정란 CPA액을 인공해수와 1:10의 비율로 희석하여 30분간 두면서 CPA를

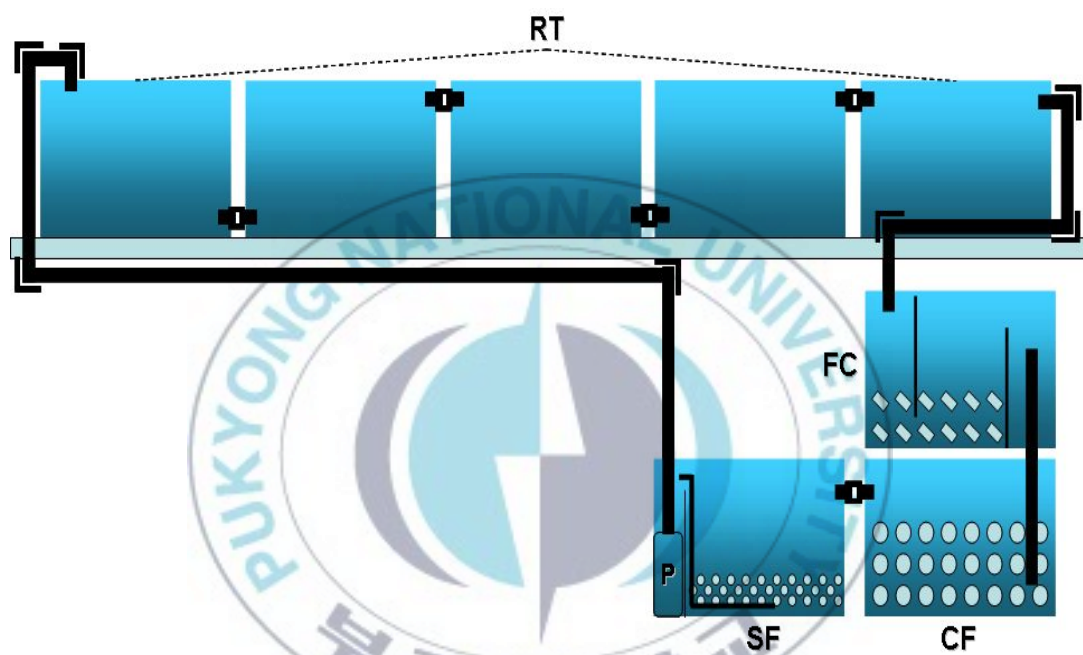


Fig. 1. Recirculating water system designed for Pacific oyster *Crassostrea gigas* rearing. CF: coral sand filter, FC: filtration cotton, P: pump, RT: rearing tanks, SF: sand filter.

Table 1. Pacific oysters *Crassostrea gigas* used in the CPA immersion experiment

Sex	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Total weight (g)	Meat weight (g)
Male	65.1	88.4	49.1	4.6
	52.4	104.5	46.3	9.2
Female	58.4	125.6	70.8	12.7
	56.1	101.2	83.6	11.7
Average	58.0±4.6	104.9±13.4	62.5±15.5	9.4±3.0

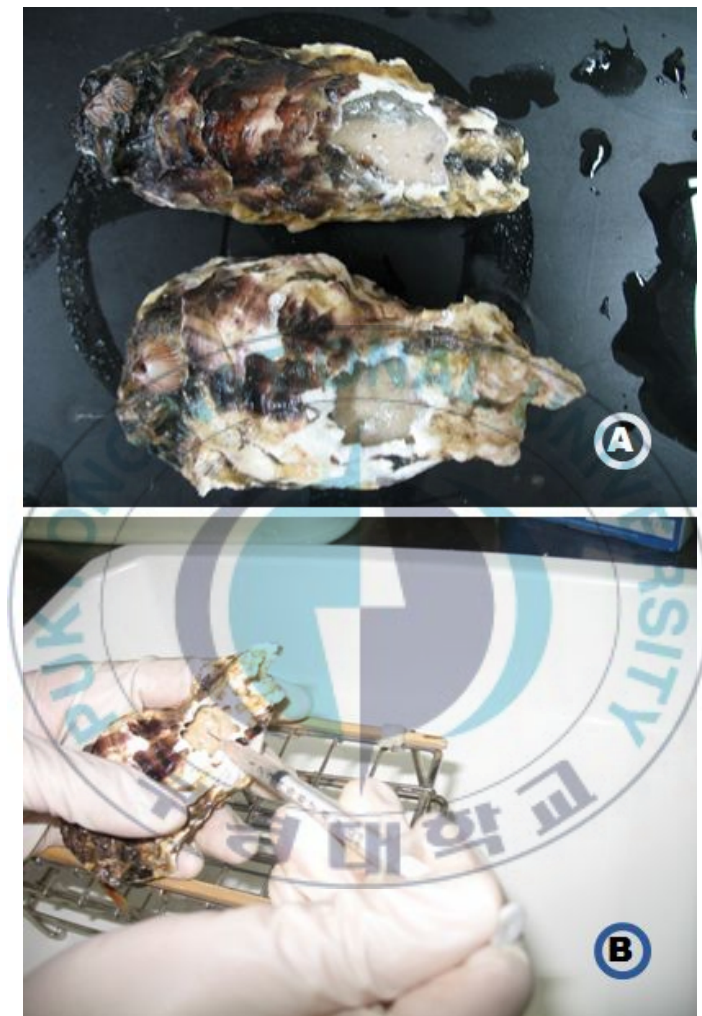


Fig. 2. Shell breaking and making hole (A) faced to the gonad for the collection of unfertilized eggs by 1 mL syringe (B).

용출시켰다. 이어서 기 준비해 둔 정액과 섞어 3분간 잘 저어 망목 30 μm 체로 걸른 다음, 100개/mL의 밀도로 20 mL well에 넣어 20℃에서 매정 후 경과시간에 따른 수정률, 부화율 및 형태이상률을 조사하였다. 이때 수정여부는 광학현미경($\times 100$) 한 시야당 2~4세포의 발생배 수로 판정하였으며, 부화율은 담륜자로 발생한 개체의 비율로 나타냈다.

(2) 냉동 및 해동 후 수정률

채란·채정용 모패는 1~2년생 양식 참굴로서, 실험에 사용된 8개체의 모패는 각각 $58.1 \pm 4.5\text{mm}$, 각고 $98.5 \pm 9.8\text{ mm}$, 전중 $56.5 \pm 9.3\text{ g}$, 육중 $8.2 \pm 2.5\text{ g}$ 이었다(Table 2).

충분히 성숙한 암수의 생식소 부위를 절개하여 각각 채란·채정하고, 이 후 미수정란을 필터가제 망목 140 μm , 65 μm , 20 μm 의 3종 체로 여과한 뒤, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독하고, 자외선 유수살균기(Jebo, China)를 거친 깨끗한 해수에 넣어 사용하였다. 냉동 실험에서는 인공해수(NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO_3 0.05 g, CaCl_2 0.12 g, MgCl_2 0.46 g, Milli-Q water 100 mL)에 각각 DMSO, EG, methanol, PEG의 최종농도가 5, 10, 15, 20% 되도록 첨가한 다음, 여기에 빙냉상태의 미수정란을 혼합하여 냉각하였다.

각 용액의 삼투질 농도는 삼투압측정기(The Advanced Osmometer)를 사용하여 측정하였고(Table 3), 평형시간은 모두 20분씩 설정하였다. CPA에 미수정란을 희석한 후 0.5 mL straw (FHK, Japan)에 넣어 봉입하였으며, 이후 냉동률이 설정된 프로그램냉동기(Samwon Freezing Engineering Co., Korea)에 의해 Table 4와 같은

Table 2. Pacific oysters *Crassostrea gigas* used in the freezing experiment

Sex	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Total weight (g)	Meat weight (g)
Male	61.5	100.3	69.2	11.3
	64.2	121.4	68.9	11.8
	58.4	99.3	49.7	6.7
	53.6	87.5	46.9	5.5
Female	53.2	95.6	52.3	6.9
	63.5	114.6	70.1	12.8
	52.8	84.3	47.2	6.6
	63.4	107.6	60.3	7.8
Average	58.1±4.5	98.5±9.8	56.5±9.3	8.2±2.5

Table 3. Osmolalities of four CPAs used in these experiments

CPA	Concentration (%)	Osmolality (mOsm/kg)
Dimethyl sulfoxide	5	1690±19.6
	10	2685±30.9
	15	>3000
	20	>3000
Ethylene glycol	5	1265±14.5
	10	2084±17.4
	15	2739±38.7
	20	>3000
Polyethylene glycol	5	1565±8.7
	10	2863±16.2
	15	>3000
	20	>3000
Methanol	5	1573±11.3
	10	2771±36.5
	15	>3000
	20	>3000

Table 4. Protocols used in freezing and thawing of unfertilized eggs in Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Protocol I	Protocol II	Protocol III
Initial temperature 0°C	Initial temperature 0°C	Liquid vapor-76°C
↓	↓	↓
Freezing rate (-1°C/min)	Holding 5 min	Holding 3 min
↓	↓	↓
Temperature -12°C	Freezing rate (-1°C/min)	LN ₂ (-196°C)
↓	↓	
Seeding	Temperature -10°C	
↓	↓	
Freezing rate (-1°C/min)	Holding 5 min	
↓	↓	
Final temperature -35°C	Freezing rate (-0.3°C/min)	
↓	↓	
Holding 30 min	Final temperature -35°C	
↓	↓	
LN ₂ (-196°C)	LN ₂ (-196°C)	
Thawing		
	LN ₂ (-196°C)	
	↓	
	25°C fresh water	

3가지 냉동방법(protocol I, II, III) 및 1가지 해동방법을 사용하였다. 해동 후 미수정란을 인공해수의 비를 1:10으로 CPA를 30분간 용출시킨 뒤 이어서 기 준비해 둔 정액과 섞어 3분간 잘 저은 후, 망목 30 μm 체로 걸른 다음, 100개/mL의 밀도로 20 mL well에 넣어 20°C에서 매정 후 경과시간에 따른 수정률, 부화율 및 형태이상률을 조사하였다. 이때 수정여부는 광학현미경($\times 100$) 한 시야당 2~4세포기의 수로 판정하였고, 부화율은 담륜자로 발생한 개체의 비율로 나타냈으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

(3) 냉동 전후 미수정란의 형태비교

참굴 미수정란의 해동 후 형태학적 손상여부를 파악하기 위하여 외형관찰에는 광학현미경($\times 100$)을 사용하였고, 미세구조 관찰비교에는 다음과 같은 투과전자현미경 시료가 제작되었다. 참굴 미수정란을 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, PH 7.2)으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 2시간 동안 1차고정하였다. 이어 PBS로 10분간 세척한 후, 1% osmium tetroxide (OSO_4)로 4°C에서 2시간동안 2차고정하였다. 고정이 끝난 시료는 PBS로 세척하고 50~100% ethanol에서 10~20분씩 탈수하였다. 탈수된 시료는 propylene oxide와 epon (A+B)의 혼합물에 넣어 1~3시간 동안 중합시킨 다음, epon 812에 포매하였다. 포매된 미수정란의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)에 의해 두께 0.5~1.0 μm 로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포매시료는 다시 60~90 nm 두께로 박절하여 200 mesh copper grid에 부착하였다. 이 후 절편을 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM 1200 E-XII, 60~80 Kv, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

2. 유생의 냉동보존

(1) CPA 농도별 해동 후 생존율 및 LAI

채란·채정용 모패는 1~2년생 양식 참굴 8개체로서, 각장 52.5 ± 4.1 mm, 각고 106.0 ± 7.4 mm, 전중 62.0 ± 10.1 g, 육중 11.1 ± 2.5 g이었다(Table 5).

충분히 성숙한 암수의 생식소 부위를 절개하여 각각 채란·채정하고 이후 미수정란을 필터가제 망목 $140 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ 의 3중 체로 여과한 뒤, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독하고, 자외선 유수살균기(Jebo, China)를 거친 깨끗한 해수에 넣어 사용하였다.

인공수정 후 발생배의 50%가 담륜자, D형유생, 초기각정기 유생으로 발달한 유생을 냉동보존 실험에 사용하였다. 희석액은 전술한 인공해수에 녹여 만든 0.2 M sucrose였으며, 여기에 EG를 희석액에 첨가하여, 최종농도가 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M 되도록 한 다음, 여기에 빙냉상태의 유생을 혼합하여 냉각하였다. 평형시간은 모두 10분씩 설정하였으며, CPA에 유생을 희석한 후 0.5 mL straw (FHK, Japan)에 넣어 봉입하여 냉동률이 설정된 프로그램냉동기(Samwon Freezing Engineering Co., Korea)에 의해 -35°C 까지 1차 냉동한 다음 -196°C 의 액체질소통(MVE, USA)에 넣어 2차 냉동하였다. 참굴 유생의 냉동 및 해동을 위해 Table 4의 Protocol I 및 해동방법을 사용하였다.

해동한 유생의 생사여부 및 운동성을 관찰은 광학현미경($\times 100$)의 한 시야에서 움직이는 유생을 Table 6의 평가표에 따라 유생활성지수(larval activity index, LAI)를 산정하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

(2) 냉동보존 기간별 해동 후 생존율 및 LAI

보존기간에 따른 해동 후 유생의 생존율 및 LAI를 살펴보기 위하여, 희석액으로 0.2 M sucrose 와 2.0 M EG를 사용하여 냉동한 다음, 1개월 동안 액체질소통에서 보

Table 5. Pacific oysters *Crassostrea gigas* used in the freezing experiment

Sex	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Total weight (g)	Meat weight (g)
Male	55.3	98.7	52.1	6.7
	48.4	115.1	47.7	10.2
	54.7	110.7	62.5	13.7
	53.4	107.3	59.5	8.8
Female	59.4	111.6	69.8	14.2
	49.1	89.2	53.6	13.8
	53.6	108.3	73.4	11.5
	45.7	107.2	77.6	9.7
Average	52.5±4.1	106.0±7.4	62.0±10.1	11.1±2.5

Table 6. Numerical method for evaluation of ciliated larval activity index

Index	Score	Motility characteristics
I	4	Larva display spiral movement rapidly
II	3	Larva display spiral movement slowly
III	2	Larva display a little movement
IV	1	Larva display ciliary movement only
V	0	Immobile larva

존한 후 검경하였다. 우선 실온 20℃에서 각 단계별 유생이 들어있는 straw를 꺼내어 20℃ 지하수에 급속해동한 다음, 유생의 생존율 및 LAI를 광학현미경(×100)으로 관찰하였다.

(3) 냉동 전후 유생의 형태비교

냉동 전후 유생의 미세구조를 파악하기 위하여 앞서 참굴 미수정란의 투과전자현미경 시료 제작법에 따라 제작·관찰하였다.

(4) 해동유생의 사육시간별 생존율 및 LAI

해동 후 유생 사육에 따른 생존율 및 LAI를 알아보기 위하여 해동유생의 사육실험을 실시하였다. 앞의 실험에서 적정 냉동방법으로 파악된 CPA 농도와 프로토콜에 따라 냉동한 담륜자, D형유생, 및 초기각정기 유생을 사용하였다.

25℃의 지하수에서 급속해동한 다음 여과해수에 담구어 15분간 CPA를 용출시킨 해동유생을 2 L 비커에 수용하였으며, 그 밀도는 담륜자 800개체/mL, D형유생 600개체/mL, 초기각정기 유생 600/mL로 하여 최후의 유생이 생존할 때까지 사육하였다. 사육수는 1일 1회 전량 환수하였고, 해동유생의 먹이로는 *Isochrysis galbana*를 1일 2회 주되, 매회 20,000 cells/mL로 10 mL 공급하였다.

3. 통계처리

각 실험결과로부터 얻어진 자료값(mean±SD) 사이의 유의차 유무는 SPSS 통계패키지(version 18.1)에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 미수정란의 냉동보존

(1) CPA 침지와 침지 후 수정률 및 부화율

참굴 미수정란 침지 및 인공수정 후 수정률, 부화율 및 형태이상률을 CPA 별, 농도별 및 침지시간별로 관찰한 결과, methanol, DMSO, EG 및 PEG는 농도가 높아짐에 따라 수정률 및 부화율이 낮아졌고, 형태이상률은 높아짐을 알 수 있었다(Figs. 3, 4 & 5). 침지시간 별로 조사해 본 결과에서는 10분과 20분에서 서로 차이를 보이지 않았으나, 30분 이 후부터는 수정률 및 부화율이 낮아진 반면, 형태이상률은 높아졌다. 침지시간 40분에서는 수정률 및 부화율이 매우 낮았다. 특히, PEG는 독성으로 인해 전반적으로 수정률 및 부화율이 낮게 나타남을 알 수 있었다.

(2) 냉동 및 해동 후 수정률

모든 냉동방법에서 미수정란의 해동 후 수정률은 0%로 나타났으며, 부화율 및 형태이상률 역시 0%였다(Table 7).

(3) 냉동 전후 미수정란의 형태비교

참굴 미수정란을 냉동방법에 따라 보존한 다음 해동하여 투과전자현미경으로 구조를 관찰한 결과, 미수정란의 세포내의 미토콘드리아가 냉동 후 파괴가

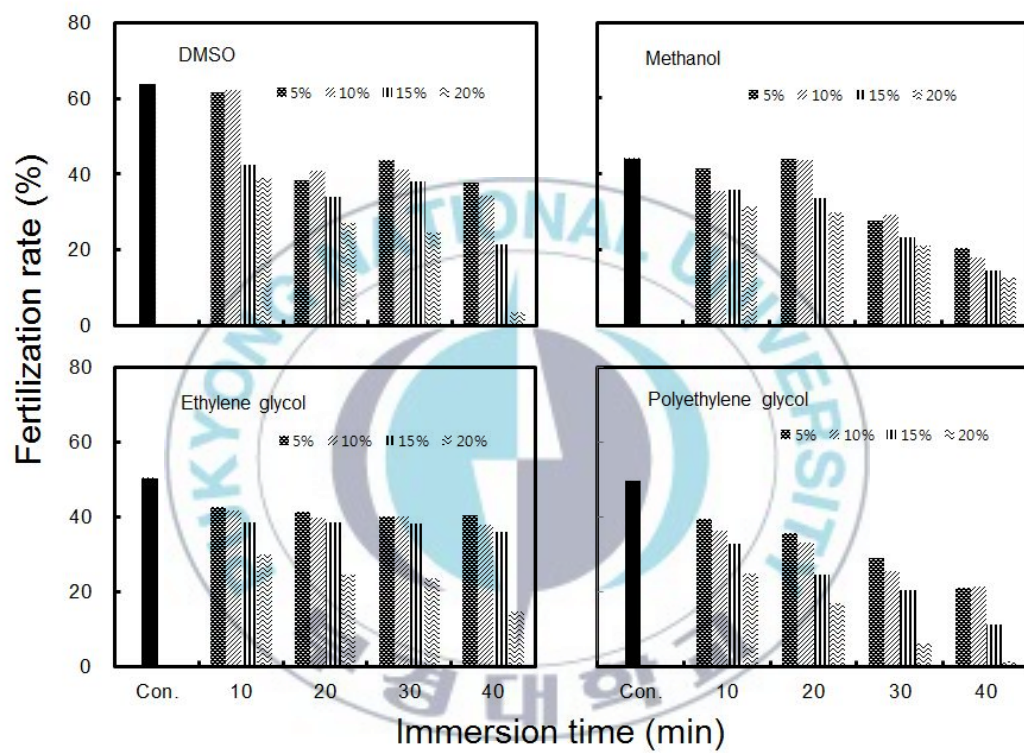


Fig. 3. Effects of CPAs and concentrations on post-immersion fertilization rates of *Crassostrea gigas* eggs.

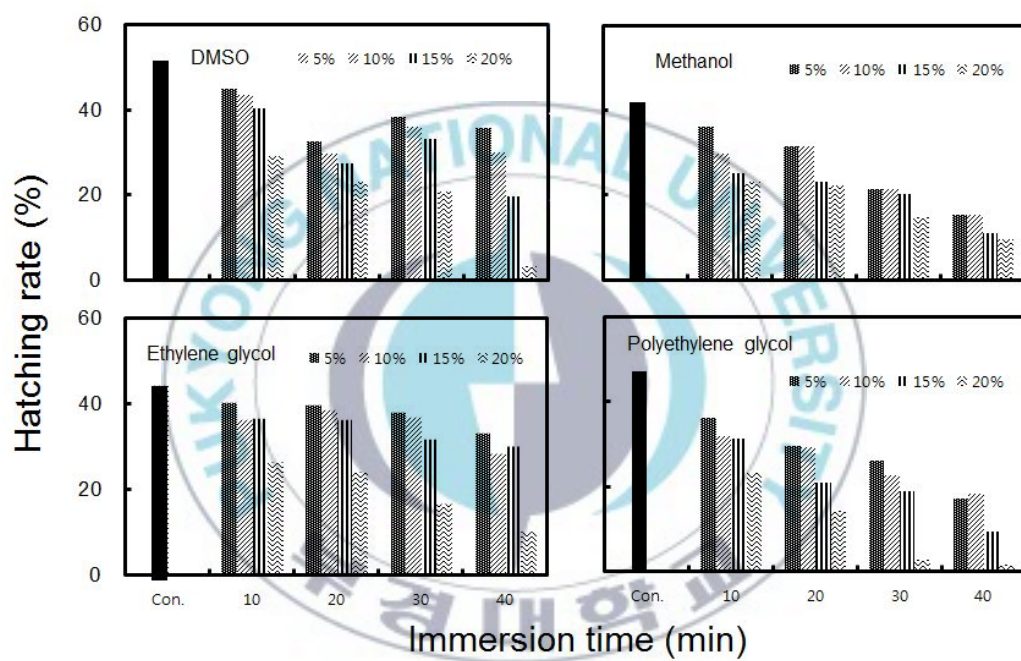


Fig. 4. Effects of CPAs and concentrations on post-immersion hatching rates of *Crassostrea gigas* eggs.

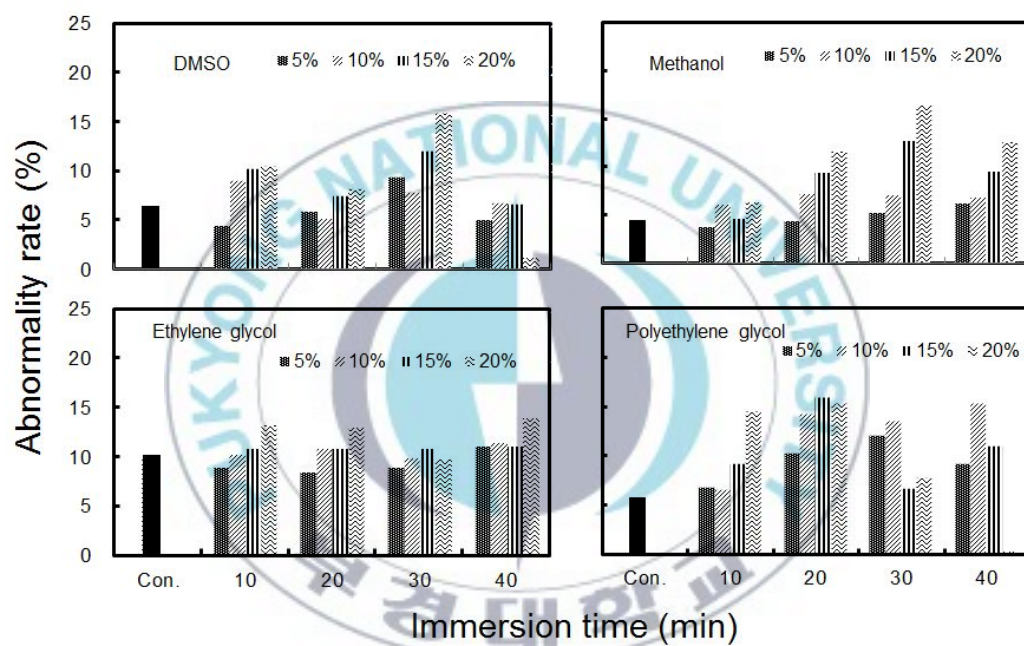


Fig. 5. Effects of CPAs and concentrations on post-immersion abnormality rate of *Crassostrea gigas* eggs.

Table 7. Fertilization rate, hatching rate and abnormality rate unfertilized eggs Pacific oyster *Crassostrea gigas* in three CPAs and concentrations with freezing protocol I, II and III

CPA	Concentration (%)	Freezing protocol	Equilibration time (min)	Fertilization (%)	Hatching (%)	Abnormality (%)
DMSO	5	I, II, III	20	0	0	0
	10	I, II, III		0	0	0
	15	I, II, III		0	0	0
EG	5	I, II, III	20	0	0	0
	10	I, II, III		0	0	0
	15	I, II, III		0	0	0
Methanol	5	I, II, III	20	0	0	0
	10	I, II, III		0	0	0
	15	I, II, III		0	0	0

된 것을 알 수 있었고, 세포질내의 밀집되어있던 난황과립 및 지방과립은 냉
동시 세포막 등의 파열로 인해 흩어져있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

2. 유생의 냉동보존

(1) CPA 농도별 해동 후 생존율 및 LAI

담류자 유생은 0.2 M sucrose와 CPA로는 EG 농도를 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M를 사용한 결과, 생존율은 $63.8 \pm 1.3\%$, 0.2 M 농도가 가장 높았다 (Fig. 7). LAI는 0.5 M 농도에서 낮았으며, 다른 실험구에서는 유의한 차이는 없었다(Fig. 8). 형태이상률은 0.5 M 농도에서 높았으며, 다른 실험구에서는 유의한 차이는 없었다(Fig. 9).

D형 유생은 2.0 M, 2.5 M에서 각각 $84.0 \pm 1.9\%$, $84.1 \pm 1.5\%$ 로 다른 실험구에 비해 높은 생존율을 보였으며(Fig. 7), LAI는 2.0 M 과 2.5 M 에서는 3.3 ± 0 , 3.4 ± 0 으로 다른 농도에 비해 유의하게 높았다(Fig. 8). 형태이상률은 0.5 M 농도에서 $13.4 \pm 0.6\%$ 로 다른 농도에 비해 유의하게 높았으며 점차 감소하여 2.0 M과 2.5 M 농도에서 각각 $9.3 \pm 0.4\%$, $9.4 \pm 4\%$ 로 다른 실험구에 비해 낮았다 3.0 M 농도에서는 다시 높아지는 경향을 나타내었다(Fig. 9).

초기각정기 유생은 2.0 M과 2.5 M에서 각각 56.3 ± 0.6 , 55.1 ± 1.4 로 다른 실험구들에 비해 생존율이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 7). LAI는 2.0 M 2.8 ± 0.1 로 가장 높았고(Fig. 8), 형태이상률은 0.5 M에서 $6.5 \pm 0.2\%$ 로 높았다(Fig. 9).

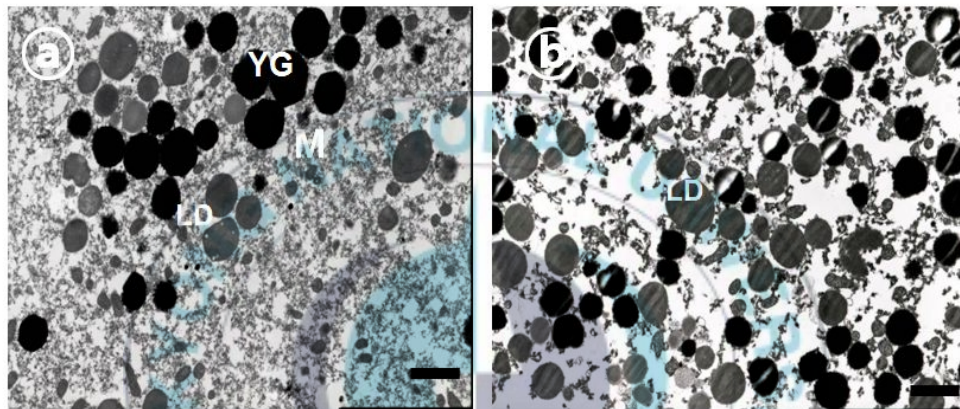


Fig. 6. Electron micrographs of cytoplasmic organelles of unfertilized eggs in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. (a): Pre-freezing, (b): Post-thawing, YG: yolk granule, LD: lipid droplet, M: mitochondrion, Bar=1 μ m.

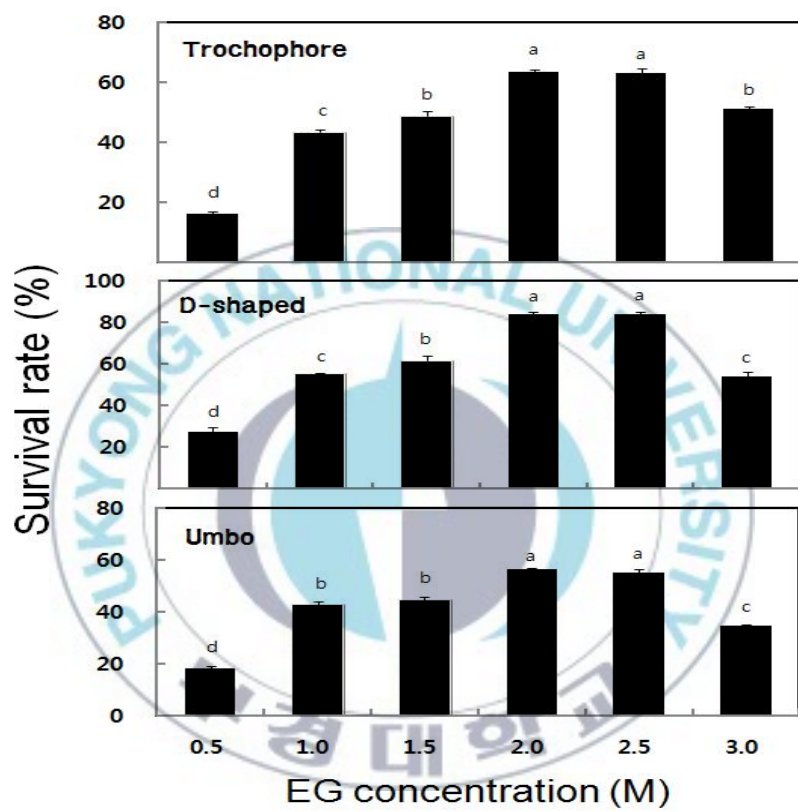


Fig. 7. Effect of ethylene glycol (EG) concentrations on survival rate post-thawed larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

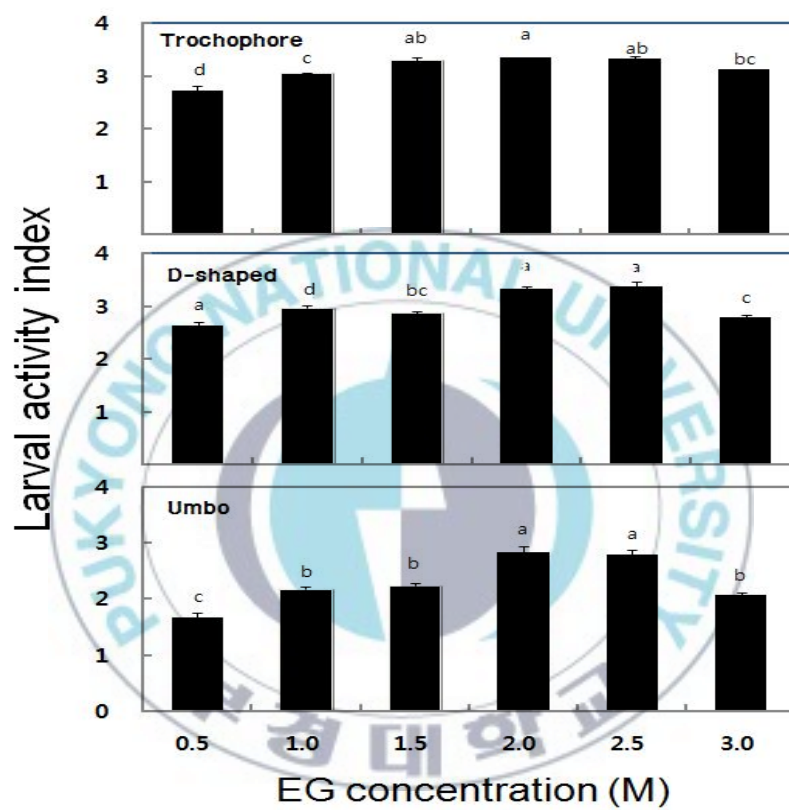


Fig. 8. Effect of ethylene glycol (EG) concentrations on larval activity index of post-thawed larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

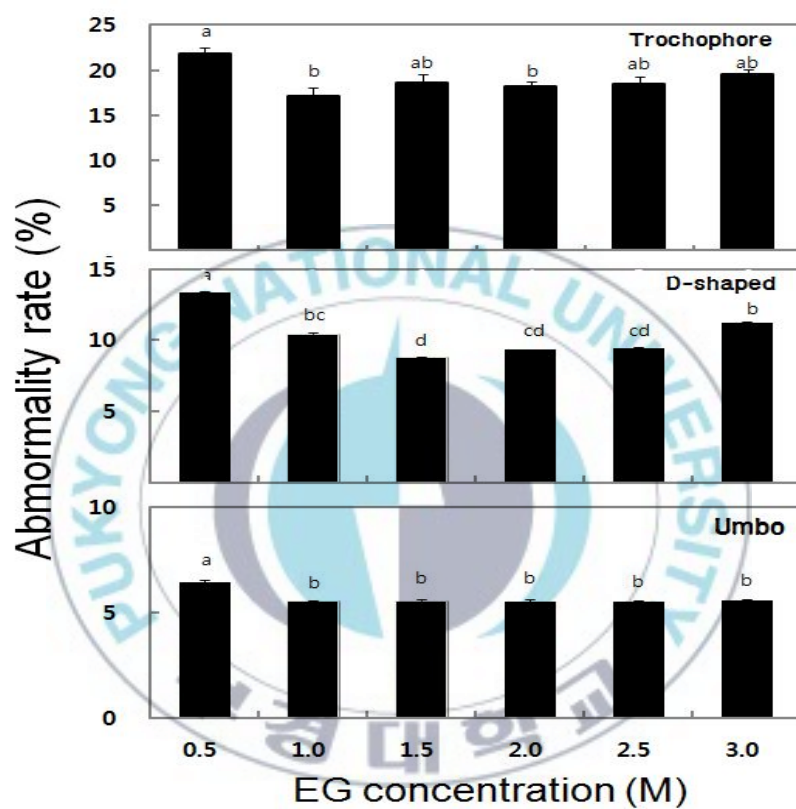


Fig. 9. Effect of ethylene glycol (EG) concentrations on abnormality of post-thawed larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

(2) 냉동보존 기간별 해동 후 생존율 및 LAI

0.2 M sucrose와 CPA로는 2.0 M EG에서 담륜자 유생을 냉동한 다음, 1시간, 24시간, 3일, 5일, 7일, 1개월째에 해동하여 생존율을 관찰한 결과, 각각 $60.9 \pm 1.7\%$, $59.6 \pm 2.9\%$, $60.1 \pm 0.7\%$, $60.5 \pm 1.2\%$, $60.3 \pm 0.8\%$, $59.6 \pm 0.9\%$ 로 보존기간 경과에 따른 유의한 차이는 없었다($P < 0.05$)(Fig. 10). LAI 역시 각각, 3.5 ± 0.1 , 3.4 ± 0 , 3.5 ± 0.1 , 3.4 ± 0.1 , 3.4 ± 0.1 로 보존 기간별 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$)(Fig. 11).

D형유생은 각각 $86.3 \pm 0.8\%$, $87.8 \pm 0.7\%$, $88.0 \pm 1.2\%$, $86.5 \pm 0.4\%$, $87.3 \pm 1.2\%$, $87.4 \pm 0.8\%$ 로 보존기간 경과에 따른 차이는 없었다($P < 0.05$)(Fig. 10). LAI 역시 각각, 3.1 ± 0.1 , 3.1 ± 0.1 , 3.2 ± 0.2 , 3.3 ± 0.1 , 3.4 ± 0.1 , 3.2 ± 0.1 로 보존기간별 차이는 보이지 않았다($P < 0.05$)(Fig. 11).

초기각정기 유생은 각각, $55.3 \pm 1.2\%$, $55.1 \pm 0.6\%$, $54.9 \pm 1.2\%$, $55.1 \pm 0.9\%$, $54.9 \pm 0.7\%$, $55.5 \pm 0.5\%$ 로 보존기간 경과에 따른 차이는 없었다($P < 0.05$)(Fig. 10). LAI 역시 각각, 2.9 ± 0.1 , 2.8 ± 0.1 , 2.8 ± 0.1 , 2.8 ± 0 , 2.9 ± 0.1 , 2.9 ± 0.1 로 보존기간별 차이는 보이지 않았다($P < 0.05$)(Fig. 11).

(3) 냉동 전후 유생의 형태비교

초기각정기 유생의 냉동방법에 따라 보존한 다음 해동하여 투과전자현미경으로 구조를 관찰한 결과, 유생의 세포질 내의 모습이 냉동 전 핵이나 세포막 등 정상적이나 냉동 후 빙결정 등에 의해 변형이 되었고, 냉동 전 세포내 소기관들이 편중됨없이 조밀하게 차 있었으나 해동 후 세포내 소기관들이 파괴된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

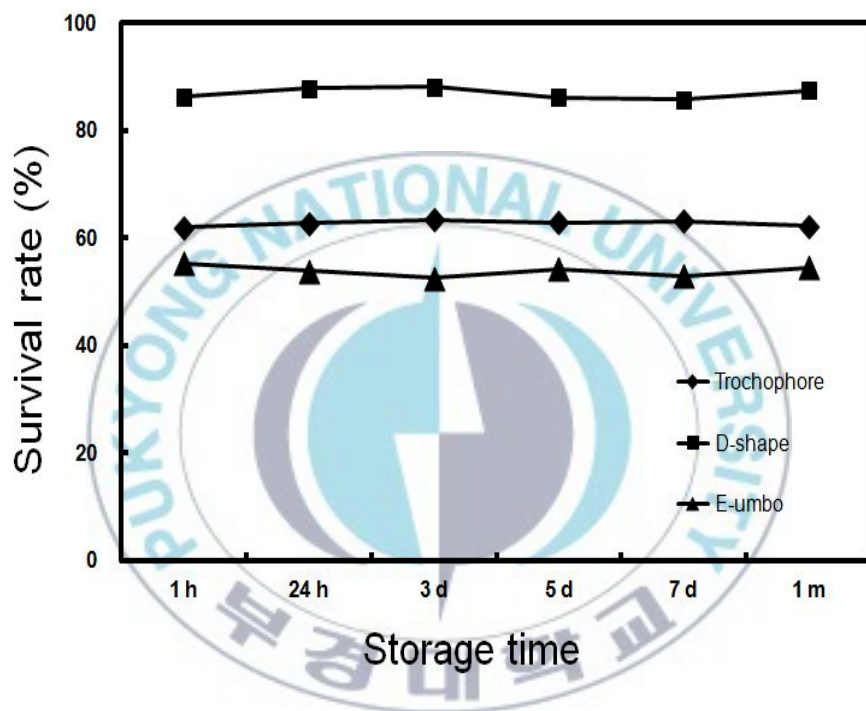


Fig. 10. Effects of storage time on survival rate of post-thawed larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

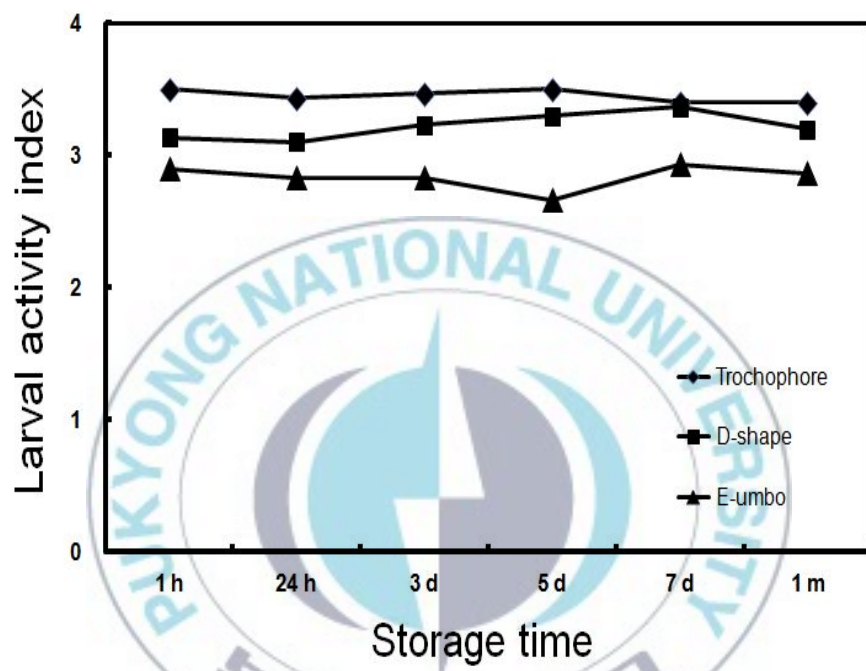


Fig. 11. Effects of storage time on larval activity index of post-thawed larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

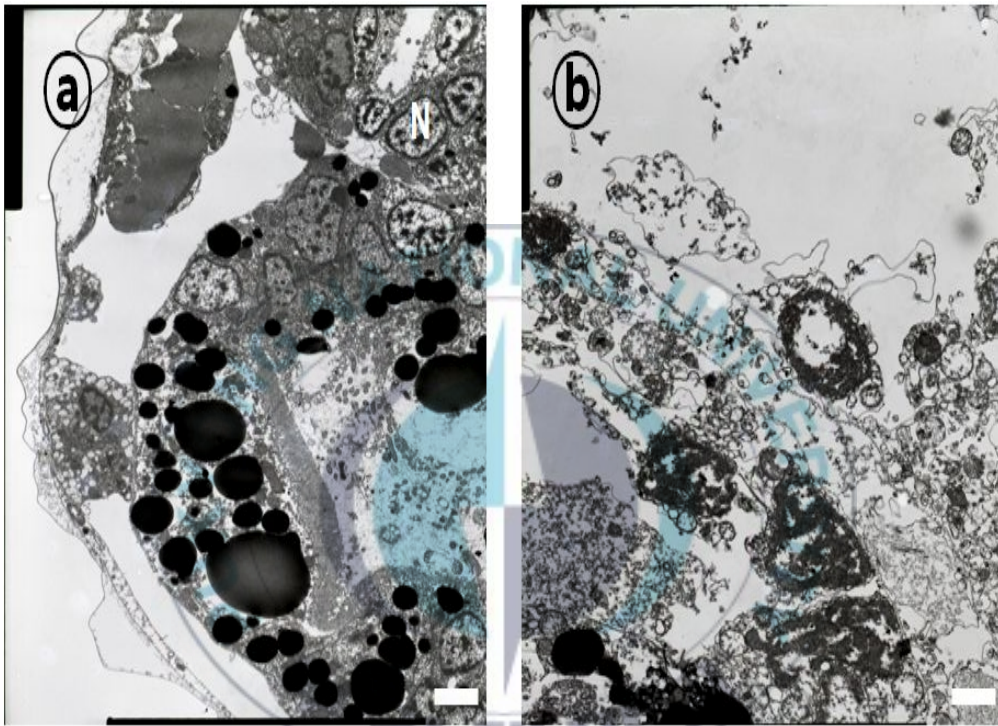


Fig. 12. Electron micrographs of inside structure of early umbo larva in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. (a): pre-freezing, (b): post-thawing, N: nucleus, Bar=2 μ m.

(4) 해동유생의 사육시간별 생존율 및 LAI

냉동 발생배의 해동 후 사육기간에 따른 생존율은 Fig. 13에서 보는 바와 같이, 담류자는 초기 생존율 63.3%로부터 시간경과에 따라 생존율이 낮아졌다. 12시간째에는 28.2%로 낮아졌고, 24시간째에는 전량 폐사하였다. 한편 D형유생은 초기 생존율 87.4%로부터 12시간째 78.9%, 24시간째 68.0%, 54시간째 37.4%로 서서히 낮아지다가 이후 급격히 떨어져 66시간째 3%로 낮아졌다가 75시간째에 생존율 0%를 나타냈다. 초기각정기 유생의 사육에서도 D형유생과 비슷한 경향을 보였으며, 초기 생존율 55.5%로부터 12시간째 47.3%, 24시간째 36.2%, 48시간째 22.6%로 서서히 떨어지다가 57시간째에 모두 폐사하였다.

해동 후 생존한 발생배의 경시별 LAI는 Fig. 14에서와 같이, 담류자는 초기 LAI 3.4로부터 시간경과에 따라 낮아졌다. 12시간째에는 2.6으로 낮아졌고, 24시간째에는 운동성이 없었다. 한편 D형유생은 초기 LAI 3.4로부터 12시간째 3.3, 48시간째 2.3으로 서서히 낮아지다가 72시간째 1.1로 급격히 떨어져 75시간째에는 운동성이 없었다. 초기각정기의 사육에서도 초기 LAI는 2.9로 낮았지만 D형유생과 비슷한 경향을 보였으며, 12시간째 2.7, 48시간째 1.7로 서서히 낮아지다가 이후 48시간째부터 급격히 떨어져 57시간째에 모든 유생의 운동성은 0%였다.

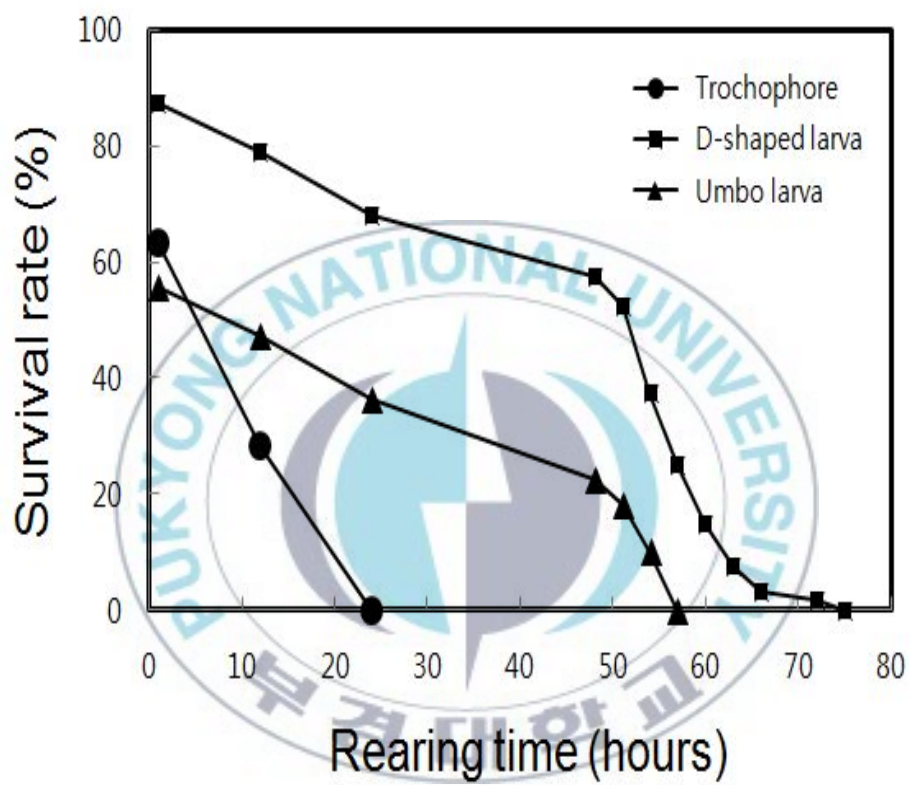


Fig. 13. Effects of rearing time on survival rates of post-thawed larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

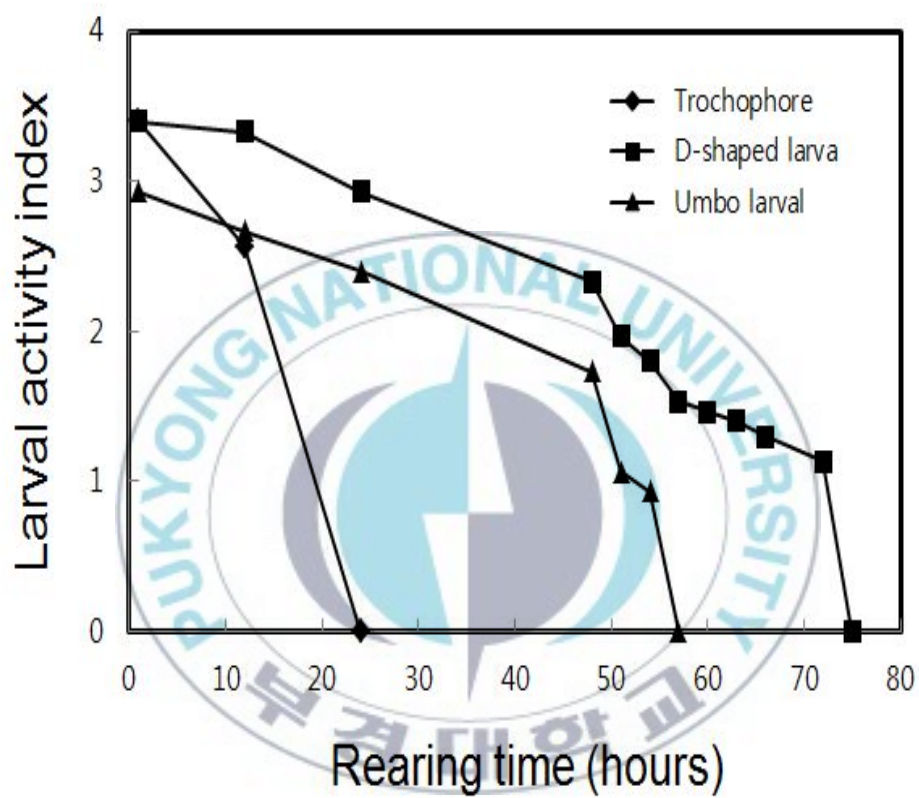


Fig. 14. Effects of rearing time on larval activity indices of post-thawed larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

IV. 고 찰

유용 조개류의 발생배 냉동보존에 있어서 배의 CPA의 독성에 대한 발생배의 내성은 살아있는 세포를 냉동보존하기 위한 최적의 과정을 결정하는 중요한 요인이다. 특히 냉동하기 전 평형시간동안 낮은 온도에서 CPA에 노출할 때 CPA의 독성을 감소시킨다는 보고가 있다(Kasai et al., 1981). 또한 CPA는 냉동에 의한 손상을 막기 위해 첨가하는 물질로 세포내 전해질의 농축이나 삼투압의 상승과 세포내외의 빙결정 형성 등, 냉동·해동 후 발생배의 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 한다(한국수정란이식학회, 1995). 본 연구의 참굴 미수정란 침지실험에서 CPA로 DMSO, EG, methanol, PEG를 사용해 조사한 결과, 침지시간이 경과할수록 CPA의 농도가 높아질수록 수정률 및 부화율이 낮아졌으며, 형태이상률은 높아지는 경향을 나타내었다. CPA 농도 20%, 침지시간 40분에서 형태이상률이 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 CPA의 독성으로 인해 수정률 및 부화율이 낮아진 데에 기인하는 것으로 생각된다. Renard and Cochard (1989)는 CPA 독성으로 인한 배의 손상이 CPA의 높은 삼투압과 생화학적 영향에 의한 것으로 CPA 분자량과 관계가 있다고 하여 본 연구결과와 부합된다고 할 수 있다. EG 및 methanol에서는 다른 CPA보다 수정률 및 부화율이 유의하게 높았으나, DMSO는 CPA농도 10%부터 다른 CPA농도에 비해 낮음을 알 수 있었으며, PEG는 다른 CPA에 비해 수정률 및 부화율이 매우 낮았다. 이는 기존의 연구중 참굴이 다른 조개류에 비해 DMSO에 대한 강한 내성을 나타낸다는 결과(Renard and Cochard, 1989)와 부합되지 않는다. 이는 두 CPA의 종 특이성이 있다고 판단된다.

참굴의 미수정란은 모든 냉동방법에서 해동 후 수정률은 0%였다. 이는 투과

전자현미경으로 구조를 관찰한 결과, 미수정란의 세포내의 미토콘드라아가 냉동전과 비교하였을때, 냉동 후 파괴된 것을 관찰할 수 있었고, 난황과립 및 지방과립은 냉동 전 촘촘히 모여 있었지만 냉동 후 세포막 등의 파열로 인해 흩어져 있었다. 이는 냉동보존시 빙결정 등에 의해 손상을 입었음을 알 수 있었으며, 아울러 비보존시와 냉동보존시 물리·화학적, 환경적인 요인이 다르기 때문에 비보존 침지실험의 결과와 냉동보존의 결과는 같을 것이라고 단정지을 수는 없다. 따라서, 냉동보존시 CPA의 독성에 대한 미수정란의 내성실험과 냉동방법, 해동방법 보다 구체적인 실험이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

효과적인 냉동보존을 위해서 요구되는 또 다른 요인은 해당 종 발생단계의 적절한 선택이다. 지금까지의 조개류 발생배 냉동보존 연구에서 사용된 발생단계는 세포분열 초기의 배가 대부분이었다. Toledo et al. (1989)은 진주담치의 발생단계 중 2~8세포와 담륜자를 사용한 냉동보존에서 담륜자의 냉동보존이 가능함을 밝혔다. Renard (1991)는 2~4세포기에 있는 참굴 배의 냉동보존시 내성을 밝혔는데, 양질의 발생배를 사용하는 것이 단계적 냉동방법과 유리화(vitrification) 방법에서 보다 높은 생존율을 보였다고 한다. 또한 쥐의 발생배 중 2세포기, 4~8세포기, 상실배, 포배를 이용하여 냉동한 결과, 포배기에서 80%의 높은 생존율을 보였으며(Cseh et al., 1997), 소에서도 포배기의 발생배를 이용한 것이 해동 후 높은 생존율을 얻었다(Carvalho et al., 1996; Im et al., 1997). 본 연구에서는 참굴의 담륜자, D-shape 및 초기각정기 유생을 이용하여 냉동보존 후 생존율을 살펴본 결과, 담륜자 63.8%에 비해 D형유생은 84.1% 매우 높았음을 알 수 있었다. 초기각정기 유생은 다시 56.8%로 다시 낮아졌다. 이는 각 유생의 단계마다 CPA의 독성이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 그리고, Gwo (1995)는 참굴의 발생단계 중 상실배, 낭배 및 담륜자를 이용한 냉동보존 실험에서 담륜자가 상실배, 낭배에 비해 CPA에 대한 내성이 높

다고 하였으며, 또한 Chao et al. (1994)은 적어도 4시간 이상의 후기 발생배와 초기 유생이 동해방지제에 대해 내성을 가지는 이상적인 단계라고 보고하였다.

현재 종묘생산장의 생산에 따른 부화장 내의 공간과, 유지보수에 따른 비용이 많이 들어가는 동시에 질병에 대한 노출, 열성화, 환경오염 등으로 인해 우량종묘의 대량생산이 위협을 받고 있어 질 좋은 우량종의 냉동보존 방법이 절실히 요구된다(Paniagua-Chavez et al., 1998). 본 연구에서 담륜자는 24시간 만에 폐사하였으며, D형유생은 75시간, 초기각정기 유생은 57시간째 전량 폐사하였다. 이는 형태학적 손상이 유전적 또는 생리적 요인의 손상으로 나타나고 결국 폐사로 이어진다고 볼 수 있다(Paniagua-Chavez et al., 1998). 그리고 해동 후 유생의 사육에 있어 냉동방법도 중요하지만, 적정 재료로서 산란시기에 충분히 성숙한 배우자의 구득이 매우 중요하다(Culliney, 1974).

본 연구에서 참굴의 유생냉동에 있어서 0.2 M sucrose, 0.2 M EG를 사용하고, 담륜자, D형유생, 초기각정기 유생을 냉동률 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ 로 하였을 때, 최고의 해동 후 생존율을 나타냄으로써, 1차적으로 적정 냉동보존 조건이 구명된 셈이다. 그러나 냉동 전 유생의 건강도 평가와 냉동 후 유생의 사육 그리고 미수정란 및 해동 후 유생사육의 있어 성공적인 연구로 이끌기 위해서는 보다 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 요약

참굴 미수정란 침지 및 인공수정 후 수정률, 부화율 및 형태이상률을 관찰한 결과, CPA 농도가 높아 짐에 따라 수정률 및 부화율이 낮아 졌고, 형태이상률은 높아 짐을 알 수 있었다. 침지시간에 30분 이후부터 수정률 및 부화율이 급격히 낮아 졌고, 형태이상률은 높아졌다. 특히 PEG의 경우는 CPA의 독성으로 인해 전체적으로 수정률 및 부화율이 낮게 나타남을 알 수 있었다.

냉동실험 결과 모든 실험구간에서 인공수정 후 발생을 하지 않는 것으로 확인되었다.

유생의 CPA 농도별 유생의 생존율 및 LAI를 관찰한 결과 담류자의 생존율은 $63.8 \pm 1.3\%$, 0.2 M 농도가 가장 높았다. LAI는 0.5 M 농도에서 낮았으며, 형태이상률은 0.5 M 농도에서 높았다.

D형유생은 2.0 M, 2.5 M에서 각각 $84.0 \pm 1.9\%$, $84.1 \pm 1.5\%$ 로 다른 실험구 에 비해 높은 생존율을 보였으며, LAI 역시 3.3 ± 0 , 3.4 ± 0 으로 다른 농도에 비해 높았다. 형태이상률은 0.5 M 농도에서 $13.4 \pm 0.6\%$ 로 다른 농도에 비해 높았으며, 3.0 M 농도에서는 다시 높아지는 경향을 나타내었다.

초기각정기 유생은 2.0 M과 2.5 M에서는 각각 56.3 ± 0.6 , 55.1 ± 1.4 로 두 농도 구간에서는 다른 실험구들에 비해 생존율이 높은 것으로 확인되었다. LAI는 2.0 M 2.8 ± 0.1 로 가장 높았고, 형태이상률은 0.5 M에서 $6.5 \pm 0.2\%$ 로 높았다.

담류자, D형유생 초기각정기 유생을 냉동보존 기간별 생존율 및 LAI를 한 시간 후, 24시간, 3일, 5일, 7일, 한달 간격으로 검경한 결과, 차이는 나타나지 않았다.

해동유생의 사육시간별 생존율 및 LAI를 관찰한 결과, 담류자는 초기 생존율 63.3%로부터 시간경과에 따라 생존율이 낮아졌다. 12시간째에는 28.2%로

낮아졌고, 24시간째에는 전량 폐사하였다. 한편, D형유생은 초기 생존율 87.4%로부터 54시간째 37.4%로 서서히 낮아지다가 이후 급격히 떨어져 66시간째 3% 낮아졌다가 75시간째에 전량 폐사하였다. 초기각정기의 사육에서도 D형유생과 비슷한 경향을 보였으며, 초기 생존율 55.5%로부터 48시간째 22.6%로 서서히 떨어지다가 57시간째에 모두 폐사하였다. LAI 또한 담륜자는 초기 LAI 3.4로부터 시간경과에 따라 낮아지다 24시간째에는 운동성이 없었다. 한편 D형유생은 초기 LAI 3.4로부터 서서히 낮아지다가 72시간째 1.1로 급격히 떨어져 75시간째에는 운동성이 없었다. 초기각정기 유생의 사육에서도 초기 LAI는 2.9로 낮았지만 D형유생과 비슷한 경향을 보였으며, 12시간째 2.7 서서히 낮아지다 57시간째에 모든 유생의 운동성은 0%였다.



감사의 글

학부를 졸업하고 대학원에 진학해서 처음으로 연구실 생활을 시작한 지가 엇그제 같은데, 벌써 2년이라는 시간이 흘렀습니다. 석사과정 잘 마칠수 있도록 도움을 주신 분들께 감사의 말씀을 드리고자 합니다. 먼저 과학적이며, 창의적이고 논리적인 사고방식과 항상 용기와 질타를 통해 석사과정을 지도해 주신 장영진 교수님께 감사드립니다. 그리고 바쁜 와중에도 석사학위 논문을 교정해 주시고 심사해 주신 임한규 박사님, 공승표 교수님께도 감사드립니다. 또한 학부 및 대학원 과정동안 학문적 가르침을 주신 허성범 교수님, 조재운 교수님, 김동수 교수님, 배승철 교수님, 남윤권 교수님, 김종명 교수님께 감사드립니다.

대학원 과정동안 언제나 따뜻한 격려와 조언을 해주시고 많은 도움을 주신 국립수산물연구원 김성희 사무관님, 이정용 박사님, 민병화 박사님, 정민환 박사님께 제 마음을 전합니다.

언제나 함께 동고동락하며, 선배로서 진심어린 관심과 충고를 아끼지 않았던 변식생리학연구실의 노경언 박사님, 김영수 선배님, 그리고 호주로 유학을 간 정종균 선배님, 처음이자 마지막 후배인 류준형 그리고 멀리 떨어진 곳에서도 항상 응원과 격려로 북돋아주신 도용현 선배님, 김원진 선배님, 박진우 선배님들에게도 고맙다는 말 전합니다. 석사과정의 실험을 무사히 마칠 수 있게 물심양면으로 도와주신 남해양식연구센터에 계시는 지영주 센터장님, 김정우 선배님께 감사의 말씀 전합니다.

힘들고 어려울 때, 즐거울 때 항상 곁에 있어준 나의 친구 권효준, 최우조, 김형상, 김정치, 이원기, 박동엽, 정상영, 박성우에게도 고맙습니다. 아울러, 언제나 친누나 처럼 따뜻하게 대해주신 강경립 선배님, 최수희 선배님에게도 저

의 마음 전합니다.

마지막으로, 부족한 아들 챙기시느라 언제나 고생하시는 아버님, 어머님, 나의 동생에게도, 그동안 너무 고생 많았고, 사랑한다는 말 전하고 싶습니다. 그리고 힘들고, 지칠때 옆에서 힘을 북돋아준 지정이에게도 제 마음을 전합니다. 끝으로, 저를 아껴주시고 도움을 주신 모든 분들께 다시 한번 감사드리며 이 논문을 바칩니다.



참고문헌

- Ahammad, M.M., D. Bhattacharyya and B.B. Jana. 1998. Effect of different concentration of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos *Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala* stored at low temperature. *Cryobiology* 37, 318~324.
- Arii, N., K. Nami, F. Gomi and T. Nakazawa. 1987. Cryoprotection of medaka embryos during development. *Zool. Sci.* 4, 813-818.
- Asahina, E. and T. Takahashi. 1978. Freezing tolerance in embryos and spermatidia of the sea urchin. *Cryobiology* 15, 122-127.
- Carvalho, R.V., M.R. Campo, A.T. Palasz, Y. Plante and R.J. Mapletoft. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology* 45, 489~498.
- Chang, Y.J., Y.H. Choi and Y.J. Chang. 1999. Selection of cryoprotectants for cryopreservation of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* trochophore. *Dev. Reprod.* 3, 107-111 (in Korean).
- Chang, Y.J., Y.S. Kim and Y.H. Choi and J.Y. Lee. 2001. Survival rates of frozen-thawed surf clam *Spisula sachalinensis* larvae in five developmental stages. *Dev. Reprod.* 3, 107-111 (in Korean).
- Chao, N.H., C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai and T.T. Lin. 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Res.* 7, 99~104.

- Chao, N.H., T.T. Lin, Y.J. Chen, H.W. Hsu and I.C. Liao. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture* 155, 31~44.
- Choi, Y.H. and Y.J. Chang. 2003. The influence of cooling rate, developmental stage and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 46(2), 190-193.
- Cseh, S., j. Corselli, S.L. Nehlsin-Cannarella, L.L. Bailey and A.A. Szalay. 1997. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozed at different preimplantation stages. *Theriogenology* 48, 43~50.
- Culliney, J.L. 1974. Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol. Bull.* 147, 321~332.
- Gwo, J.C. 1995. Cryopreservation of oyster *Crassostrea gigas* embryos. *Theriogenology* 43, 1163-1174.
- Jo, P.G., Y.H. Choi, K.H. Kang, K.H. Kho, C.S. Go, B.H. Kim, H.K. Lim, C.Y. Choi and Y.J. Chang. 2002. Compositon of cryopreservation effects on D-shaped larvae of arkshell *Scapharca broughtonii* by the kinds of additive and the concentration of cryoprotectant. *Korean J. Malacol.* 18, 77-82 (in Korean).
- Im, K.s., J.K. Kang, and H.S. Kim. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine

- oocytes. *Theriogenology* 47, 881~891.
- Kasai, M., E. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 63, 175~180.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cell; Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 274, C125~C142.
- McFadzen, IRB. 1992. Growth and survival of cryopreserved oyster and clam larvae along a pollution gradient in the German Bight. *MAR. ECOL. PROG. SER.* 91, 215~220.
- Paniagua-Chavez, C.G., J.T. Buchanan, J.E. Supan and T.R. Tiersch. 1998. Settlement and growth of eastern oyster produced from cryopreserved larvae. *Cryo-Letter*, 19, 283~292.
- Naidenko, T. 1997. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. *Cryo-Letter* 18, 375~382.
- Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryo of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : methanol and sucrose effects. *Aquaculture* 92, 43-57.
- Renard, P. and J.C. Cochard. 1989. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* thunberg, Manila clam, *Ruditapes philiooinarum* Reeve and King scallop, *Pecten maximus* (L) embryo: influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-Letters* 10, 169-180.

Toledo, J.D. and H. Kurokura and S. Kasahara. 1989. Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 1661.

Wallace, R.A. and K. Selman. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J. Electron Microsc. Tech. 16, 175~201.

한국수정란이식 학회. 1995. 소 수정란 이식. 정문각. 290pp.

