



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](#)

수산학석사 학위논문

참굴 *Crassostrea gigas* 및 참전복 *Haliotis discus hannai*
발생배 냉동보존을 위한 결빙억제제의 탐색



부경대학교 대학원

수산생물학과

정 종 균

수산학석사 학위논문

참굴 *Crassostrea gigas* 및 참전복 *Haliotis discus hannai*
발생배 냉동보존을 위한 결빙억제제의 탐색

지도교수 장 영 진

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함



2011년 8월

부경대학교 대학원

수산생물학과

정 종 균

정종균의 수산학석사 학위논문을 인준함

2011년 6월



주	심	이학박사	김 동 수	인
위	원	이학박사	고 강 희	인
위	원	농학박사	장 영 진	인

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 난발생 및 발생단계 조사	5
(1) 참 굴	5
(2) 참전복	5
2. 결빙억제제 침지후 발생배의 활성화	8
(1) 참 굴	8
(2) 참전복	12
3. 냉동·해동후 발생배의 생존율	12
(1) 참 굴	12
(2) 참전복	16
4. 통계처리	20
III. 결 과	21
1. 난발생 및 발생단계 조사	21
(1) 참 굴	21
(2) 참전복	21
2. 결빙억제제 침지후 발생배의 활성화	26
(1) 참 굴	26
(2) 참전복	26

3. 냉동·해동후 발생배의 생존율	31
(1) 참 굴	31
(2) 참전복	37
IV. 고 찰	39
V. 요 약	42
감사의 글	44
참고문헌	46



**Investigation of Cryoprotective Agents for
Cryopreservation of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and
Abalone *Haliotis discus hannai* Embryos**

Jong Kyun Chung

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



Abstract

This study was performed to find out egg development of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and abalone *Haliotis discus hannai* and tolerance against the cryoprotective agents (CPAs) and cryopreservation method by using their embryos.

Egg development

The optimum ranges of water temperature for egg development were 20°C in Pacific oyster and abalone. The required times for development of trochophore were 13 hours at same temperature, development of D-shaped larvae were 18 hours at 20°C in Pacific oyster, veliger were 36 hours at 20°C in abalone.

Tolerance of embryos against CPAs toxicity

The tolerance of embryos against CPAs was determined by using dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), polyethylene glycol (PEG) with each of four different concentrations 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 M with 0.2 M sucrose.

The range of larval activity index (LAI) in Pacific oyster and abalone were 1.68 ± 0.2 to 3.44 ± 0.4 and 1.02 ± 0.2 to 3.05 ± 0.3 , respectively. Also, LAI were increased with decreasing the concentrations of CPA. Especially, EG showed 3.44 ± 0.4 regardless of its concentrations. The range of development rates (DRs) to 4-cell, morula, trochophore and veliger larvae in abalone were $80.8 \pm 1.5\%$, $99.1 \pm 0.6\%$, $96.7 \pm 0.2\%$ and $96.3 \pm 0.3\%$, respectively. DRs were increased with decreasing the concentrations of CPAs, however, the DRs were decreased with increasing immersion time.

Cryopreservation

When 50% of embryos reached to trochophore and D-shaped larvae with active motility were used in each experiment. Trochophores and D-shaped larvae in Pacific oyster *Crassostrea gigas* and trochophores and veliger larvae in abalone *Haliotis discus hannai* were immersed in different concentrations of DMSO, EG, PG (0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 M) with 0.2 M sucrose. The ranges of survival rate were $8.0 \pm 1.5\%$ to $88.8 \pm 4.2\%$, respectively. However, the thawed abalone trochophore and veliger were all died in freezing process.

I. 서론

현재 전 세계적으로 어업생산량이 감소함에 따라 기르는 어업인 양식업이 중요시되고 있음에도 불구하고 국내 양식업은 계속되는 경기부진 및 수출입 개방으로 인해 불황에 빠져 있다. 더욱이 생사료를 많이 사용하고 있는 어류 양식은 최근 어황변동에 따라 생사료 수급이 불안정한 양상을 보이고 있으며, 양식장 노화, 해양오염으로 인해 양식 피해액은 해마다 증가하고 있는 실정이다.

한편, 먹이를 주지 않아도 바다에서 자연 발생하는 먹이만으로 양식이 이루어지는 천해양식업 가운데 조개류 양식에서도 최근 양식장 수질이 부영양화되고 저질환경이 악화되는 등 해양오염이 가중되고 있다. 이로 인해 주요 채묘 가능 해역이 축소되는 데다가 어미조개의 생리적 활성과 유생의 건강도가 저하되고 부착치패마저도 대량 폐사하여 조개류 양식자체가 성립될 수 없는 지경에 이르고 있다.

조개류 양식에 있어 이러한 어려움을 극복하기 위해서는 우선적으로 종묘가 확보되어야 하며, 앞으로의 종묘의 수급은 자연에 분포하고 있는 유생을 채묘하는 것 보다 인공 종묘생산을 통해 이루어지는 방향으로 전개될 전망이다.

인공 종묘생산의 확립을 위해서는 건강하고 우량형질을 지닌 어미와 함께 원활한 유생의 공급이 이루어져야 한다. 그 한 가지 방법으로서 발생배의 대량 냉동보존을 들 수 있다. 이미 축산업에서는 가축의 수정란을 보존·이식하는 기술이 1930년대부터 발달하기 시작하여 몇몇 국가에서 수정란은행 (embryo bank)을 설립·가동함으로써, 보존된 수정란으로 멸종위기에 있는 품종이나 우량계통의 가축을 보존하는 데 유용하게 활용하고 있다. 소, 돼지, 말, 염소와 같은 가축 발생배의 냉동보존에서는 dimethyl sulfoxide (Somgsasen et al., 1995), ethylene glycol (Tervit and Gold, 1984; Somgsasen et al., 1995),

glycerol (Merry et al., 1984; Ware and Boland, 1987; Cocero et al., 1988; Schiewe et al., 1991, Shelton, 1992; Sakul et al., 1993), propylene glycol (Tervit and Gold, 1984; Schiewe et al., 1991) 및 glycerol에 sucrose를 혼합한 것(Shelton, 1992) 등 각 결빙억제제(CPA)의 효과가 평가되어 왔다. 그리고 2~4세포기에서 포배기에 이르기까지 각 발생단계에 따른 냉동보존 효과(Otoi et al., 1995; Carvalho et al., 1996; Dinnyes et al., 1996; Naitana et al., 1996; Im et al., 1997)와 쥐(Shaw et al., 1995), 소(Niemann, 1984; Im et al., 1997)의 발생배에 다양한 냉동물을 적용한 냉동보존 결과가 보고된 바 있다.

축산에서와 같이 양식패류의 알과 정자 즉, 배우자 및 발생배의 냉동보존 기술이 확립된다면, 연중 종묘생산과 선발육종이 가능해지고 우량종의 유전자를 보존할 수 있으며, 질병에 걸린 어미의 유생생산을 막을 수 있다. 그리고 절멸상태에 있는 종의 gene pool을 조성할 수 있으며, 재래종의 유전자 보존이 가능해진다. 또한 보존된 알과 발생배는 입 크기가 작은 양식어류의 종묘 생산시 자어의 생먹이로 사용될 수 있을 것이다.

그러나 조개류, 새우류와 같은 해양 무척추동물에서의 발생배 냉동보존 기술의 개발은 Table 1에서와 같이 가축에 비해 상대적으로 미진한 실정이며, 배를 성공적으로 냉동보존하여 번식에 활용한 연구는 버지니아굴 *Crassostrea virginica*에서만 시도된 바 있다(Paniagua-Chaves and Tiersch, 2001).

이와 같이 패류 발생배의 냉동보존에 관한 연구가 이루어지고 있지만, 대부분 굴과 같은 조개류로 종 및 연구항목에 있어 다양성이 부족한 실정이다. 특히, 전복과 같이 수정란의 크기가 큰 고등류 발생배의 냉동보존에 관한 연구는 Roux et al. (2008)에 의해 냉동보존의 기반지식이 파악되기는 하였으나, 여전히 발생배를 냉동보존하는 데 있어 그 기초자료가 되는 여러 요인들에 관한 연구가 절실하다. 따라서 패류의 인공종묘를 효과적이고 안정적으로 생산하기

Table 1. Post-thaw survival rate of frozen shellfish embryos and larvae

Species	Stage	Diluent	CPAs	Survival(%)	Reference
Oyster1	Oocyte	None	EG (10%)	51 ¹	Tervit et al.(2005)
	T	None	PGC (10%)	60 ²	Gwo(1995)
	T	Trehalose(0.06M)	DMSO (2.0M)	75	Chao et al.(1997)
	D	Trehalose(0.15M)	DMSO (1.0M) ³	50	Nidenko(1997)
Oyster2	T	None	PG (10%)	~100	Chavez and Tiersch (2001)
	D	None	PG (15%)	24	Chavez et al.(1998)
Pearl oyster	T	Sucrose (0.2M)	DMSO (1.0M)	97	Chang et al.(1999)
	T	Sucrose (0.2M)	EG (1.0M)	90	Chang et al.(1999)
	Late-D	Sucrose (0.2M)	DMSO (2.0M)	87	Choi and Chang (2003)
Surf clam	T	Sucrose (0.2M)	DMSO (2.0M)	97	Chang et al.(2001)
	T	Sucrose (0.2M)	EG (2.0M)	85	Chang et al.(2001)
	Early-D	Sucrose (0.2M)	DMSO (2.0M)	79	Chang et al.(2001)
	Late-D	Sucrose (0.2M)	DMSO (2.0M)	61	Chang et al.(2001)
Hard clam	T	Glucose (0.06M)	DMSO (2.0M)	84	Chao et al.(1997)
Arkshell	D	Sucrose (0.5M)	EG (2.0M)	52	Jo et al.(2002)
Abalone ⁴	Embryo	None	PEG (5%)	94	Roux et al.(2008)

Abalone: *Haliotis midae*, Arkshell: *Scapharca broughtonii*, Hard clam: *Meretrix lusoria*, Oyster1: *Crassostrea gigas*, Oyster2: *C. virginica*, Pearl oyster: *Pinctada fucata martensii*, Surf clam: *Spisula sachalinensis*. ¹post-thaw fertilization rate, ²% of Control, ³ treatment of antifreeze protein before diluent and cryoprotective agent (CPA), ⁴(southern African abalone) is not cryopreservation report, but cytotoxicity test. D: D-shaped larvae, DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PEG: polyethylene glycol, PG: propylene glycol, PGC: propylene glycerol, T: trochophore.

위해서는 의학이나 축산업에서 보편화되어있는 것처럼 패류의 배우자 보존에 관한 생리활성 요인의 연구와 실제 종묘생산시 효과적으로 활용할 수 있는 기반기술의 확보가 우선되어야 할 것이다.

본 연구에서는 산업적으로 중요한 위치를 점하고있는 참굴 *Crassostrea gigas* 및 참전복 *Haliotis discus hannai*의 발생배의 반영구적 보존을 위해 2종의 적정 난발생 및 발생단계를 조사하고, 양질의 수정란을 획득하여 냉동보존 시 적정 발생단계를 탐색하였다. 아울러 적정 CPA를 밝히기 위해 용액별, 농도별, 침지시간별 발생배의 활성을 조사하여, 적정 평형시간, 적정 냉동속도 그리고 해동속도 파악 등 일련의 냉동보존 실험을 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 난발생 및 발생단계 조사

(1) 참 굴

채란·채정용 모패는 2년생 참굴로서 껍질에 붙어있는 이물질을 제거한 후 계측하였다(Fig. 1). 모패의 생식소 성숙상태를 조사한 결과, 성숙기 및 방출기에 이른 것을 확인하였다(Fig. 2). 참굴의 알은 난핵포붕괴(GVBD) 이전에 수정이 가능하기 때문에, 충분히 성숙한 암수 어미조개를 개각한 다음, 생식소 일부를 적출하여 채란·채정하였다. 이들을 미리 준비해둔 여과해수에 섞어 수정란을 얻었다.

인공수정 및 수정란의 세란에는 25 μm 필터로 1차 여과하고, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독한 깨끗한 해수를 사용하였다.

참굴의 난발생 과정을 파악하기 위하여 수정란을 20 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지한 수조에 각각 46개/mL의 밀도로 수용한 다음, 극체방출, 2세포, 포배, 담륜자 및 D형 유생에 도달한 시간을 조사하였다.

수정여부는 제1극체가 방출된 알로 판정하였으며, 각 발생단계에 이르기까지의 소요시간과 생존율은 광학현미경(x100)에 의해 1시간 간격으로 조사하였다. 각 발생단계의 구분은 발생배의 50% 이상이 해당 발생단계에 달했을 때로 하였고, 이때까지의 소요시간을 측정하였다.

(2) 참전복

채란·채정용 모패는 4년생 참전복으로서 채집후 껍질에 붙어있는 이물질을 제거한 다음 계측하였다. 모패의 생식소 성숙상태를 관찰한 결과, 성숙기 및



Fig. 1. External shape of Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

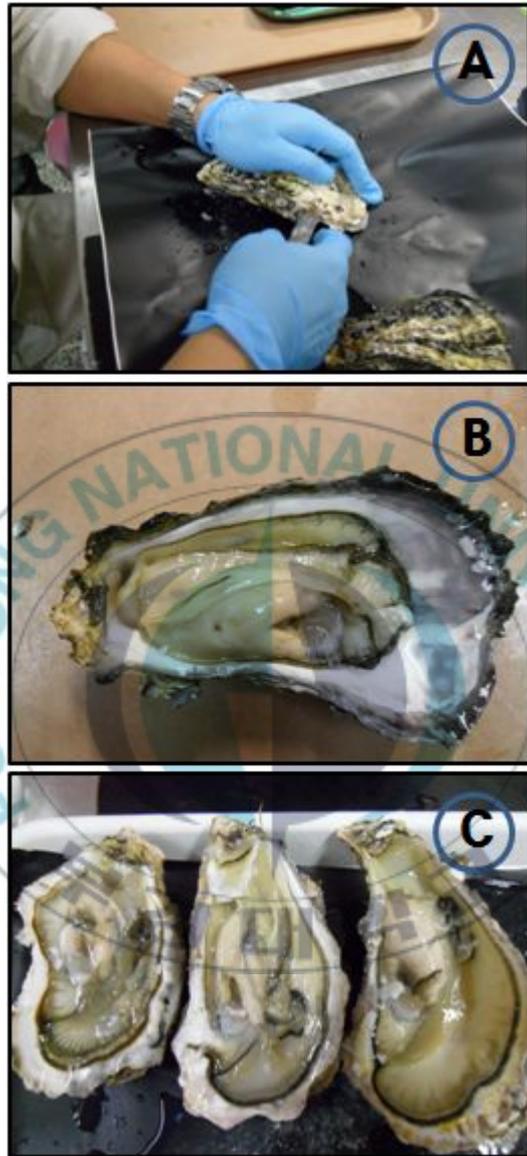


Fig. 2. Shell opening (A), fully matured gonad (B), spent stage (C) in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

방출기에 이른 것을 확인하였다(Fig. 3). 산란유발 자극으로는 공기노출과 자외선조사해수 자극의 2가지 방법을 병용하였는데, 먼저 어미를 실내에서 2.5시간 동안 노출한 다음, 자외선조사해수 자극에 의해 채란·채정하여 난발생 관찰용 수정란을 얻었다. 인공수정 및 수정란의 세란에는 10 μm , 5 μm 필터로 1, 2차 여과한 해수를 사용하였다(Fig. 4).

참전복의 난발생 과정을 파악하기 위하여 수정란을 18 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지한 수조에 각각 46개/mL의 밀도로 수용한 다음, 극체방출, 2세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생에 이른 시간을 조사하였다.

수정여부는 제1극체가 방출된 알로 판정하였으며, 각 발생단계에 이르기까지의 소요시간과 생존율은 광학현미경(x100)에 의해 1시간 간격으로 조사하였다. 각 발생단계의 구분은 발생배의 50% 이상이 해당 발생단계에 달했을 때로 하였고, 이때까지의 소요시간을 측정하였다. 수정직후부터 극체방출, 2세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생에 이르기까지의 시간을 조사하였다.

2. 결빙억제제 침지후 발생배의 활성화

(1) 참 굴

CPA의 독성이 참굴의 담륜자와 D형 유생의 활성화에 미치는 영향을 파악하기 위해, 0.2 M sucrose를 희석액으로 하고, 여기에 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) 및 propylene glycol (PG)을 최종농도 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 M 되도록 혼합한 다음, 담륜자 및 D형 유생을 각각 10분간씩 침지하였다(Fig. 5).

10분 경과후 침지한 발생배를 인공해수에 옮겨 CPA를 용출시킨 다음, 20분 동안 5분 간격으로 유생의 생사여부 및 운동성을 관찰하였다. 이때 광학현미



Fig. 3. Fully matured female (A) and male (B) of abalone *Haliotis discus hannai*.



Fig. 4. Air exposed abalones *Haliotis discus hannai* (A), ultra violet ray apparatus (B) for the spawning induction, sperm (C) and eggs (D) waters after spawning.

경($\times 100$)의 한 시야에서 움직이는 유생을 Table 2의 평가표에 따라 유생활성지수 (larval activity index, LAI)를 산정하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

(2) 참전복

CPA의 독성이 참전복의 담륜자와 피면자 유생의 활성화에 미치는 영향을 파악하기 위해, 0.2 M sucrose를 희석액으로 하고 여기에 DMSO, EG 및 PG을 최종농도 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 M되도록 혼합한 다음, CPA별, 농도별로 유생을 30분간 침지한 후, 인공해수로 희석하여 운동성을 관찰하였다(Fig. 6).

30분 경과후 발생배를 인공해수에 옮겨 CPA를 용출시킨 다음, 30분 동안 5분 간격으로 Table 2에 의해 유생의 생사여부 및 운동성을 관찰하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

CPA의 독성, 침지시간이 침지후 참전복의 발생배의 발생진행률에 미치는 영향을 파악하기 위해, 0.2 M sucrose를 희석액으로 하고, 여기에 DMSO, EG, PG, polyethelene glycol (PEG)을 최종농도 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 M되도록 혼합한 다음, 4세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생을 10, 20, 30분간 침지하였다(Fig. 7). 침지후 30분 경과시 발생배를 인공해수로 옮겨 CPA를 용출시킨 다음, 발생진행률을 관찰하였다.

3. 냉동·해동후 발생배의 생존율

(1) 참 굴

발생배의 50%가 담륜자 및 D형으로 발달한 참굴의 유생을 냉동보존 실험에 사용하였다. 희석액은 인공해수(NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO₃ 0.05 g,

Table 2. Numerical calculation for evaluation of larval activity index

Index	Score	Movement characteristics
I	4	Embryo display spiral movement rapidly
II	3	Embryo display spiral movement slowly
III	2	Embryo display a little movement
IV	1	Embryo display ciliary movement only
V	0	Immobile embryo



Fig. 6. Tolerance test of abalone *Haliotis discus hannai* embryos to cryoprotective agents.



Fig. 7. Experiment on developmental rate of abalone *Haliotis discus hannai* embryos in various concentrations of cryoprotective agents.

CaCl₂ 0.12 g, MgCl₂ 0.46 g, Milli-Q water 100 mL)에 녹여 만든 0.2 M sucrose였으며, 여기에 DMSO, EG, PG의 3종 CPA를 희석액에 첨가하여 최종농도가 각각 0.1, 0.5, 1.0과 2.0 M되도록 한 다음 냉동실험을 실시하였다.

각 용액의 삼투질농도는 삼투압측정기(The Advanced™ Osmometer)를 사용하여 측정하였고(Table 3), 평형시간은 모두 10분씩으로 설정하였다. 희석 후 평형시간을 둔 유생을 0.5 mL straw (FHK, Japan)에 넣어 봉입하였으며, 이후 냉동률이 설정된 프로그램냉동기(Samwon Freezing Engineering Co., Korea)에 의해 -35℃까지 1차냉동한 다음 -196℃의 액체질소통(MVE, USA)에 넣어 2차냉동하였다. 참굴 담륜자 및 D형 유생 냉동보존을 위해 Table 4와 같은 2가지 냉동방법(protocols I, II) 및 해동방법을 사용하였다.

(2) 참전복

발생배의 50%가 담륜자 및 피면자로 발달한 참전복의 유생을 냉동보존 실험에 사용하였다. 희석액은 인공해수(NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO₃ 0.05 g, CaCl₂ 0.12 g, MgCl₂ 0.46 g, Milli-Q water 100 mL)에 녹여 만든 0.2 M sucrose였으며, 여기에 DMSO, EG, PG의 3종 CPA를 희석액에 첨가하여 최종농도가 각각 0.1, 0.5, 1.0과 2.0 M되도록 한 다음 냉동실험을 실시하였다.

평형시간은 모두 30분씩으로 설정하였다. 희석 후 평형시간을 둔 유생을 0.5 mL straw (FHK, Japan)에 넣어 봉입하였으며, 이후 냉동률이 설정된 프로그램냉동기(Samwon Freezing Engineering Co., Korea)에 의해 -35℃까지 1차냉동한 다음 -196℃의 액체질소통(MVE, USA)에 넣어 2차냉동하였다. 참전복 담륜자 및 피면자 유생 냉동보존을 위해 Table 5와 같은 냉동방법 및 해동방법을 사용하였다.

Table 3. Osmolalities of three cryoprotectants with 0.2 M sucrose used in experiments

Kind	Concentration (M)	Osmolality (mOsm/kg)
Dimethyl sulfoxide	0.1	1434.3±9.1
	0.5	2624.7±43.5
	1.0	> 3000
	2.0	> 3000
Ethylene glycol	0.1	1322.0±10.6
	0.5	1799.0±22.6
	1.0	2397.9±6.7
	2.0	> 3000
Propylene glycol	0.1	1411.23±8.7
	0.5	2137.0±3.6
	1.0	2858±17.0
	2.0	> 3000

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

Freezing protocol I	Freezing protocol II	Thawing protocol
Initial temperature 0°C	Initial temperature 0°C	Liquid nitrogen (-196°C)
↓	↓	↓
Freezing rate -1°C/min.	Freezing rate -1°C/min.	25°C water bath
↓	↓	
Temperature -12°C	Temperature -12°C	
↓	↓	
Seeding	Seeding	
↓	↓	
Holding 10 min.	Freezing rate -1°C/min.	
↓	↓	
Freezing rate -1°C/min.	Final temperature -35°C	
↓	↓	
Final temperature -35°C	Holding 30 min.	
↓	↓	
Holding 30 min.	Liquid nitrogen (-196°C)	
↓		
Liquid nitrogen (-196°C)		

Table 5. Protocols used in freezing and thawing of abalone *Haliotis discus hannai* embryos

Freezing protocol	Thawing protocol
Initial temperature 0°C	Liquid nitrogen (-196°C)
↓	↓
Freezing rate -1°C/min.	25°C water bath
↓	
Temperature -12°C	
↓	
Seeding	
↓	
Freezing rate -1°C/min.	
↓	
Final temperature -35°C	
↓	
Holding 30 min.	
↓	
Liquid nitrogen (-196°C)	

4. 통계처리

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



Ⅲ. 결 과

1. 난발생 및 발생단계 조사

(1) 참 굴

채란·채정용 참굴의 크기는 각고 129.1 ± 14.6 mm, 각장 65.5 ± 6.7 mm, 전중량 82.3 ± 9.4 g, 육중량 13.7 ± 4.2 g이었다(Table 6). 모패당 채란량은 750,000~6,000,000립($3,588,000 \pm 1,999,492$)이었다.

수정란은 직경 $50 \mu\text{m}$ 였으며, 수온 20°C 에서 2시간 만에 극체 방출, 2시간 10분째 2세포기로 진행되어, 6시간째 포배기로 되면서 세포의 할구마다 섬모가 형성되어 움직이기 시작하였다. 13시간째 담륜자 유생으로 부화, 18시간째는 각장 $70 \mu\text{m}$ 의 D형 유생으로 발달하였다(Fig. 8).

(2) 참전복

채란·채정용 참전복의 크기는 각장 144.81 ± 4.98 mm, 각고 46.42 ± 5.45 mm, 전중량 78.74 ± 6.58 g이었다(Table 7). 모패당 채란량은 550,000~2,000,000립($4,536,000 \pm 1,695,492$)이었다. 수정란은 직경 $200 \mu\text{m}$ 였으며, 수온 18°C 에서 1시간 40분 만에 분열을 시작하였다. 7시간 후에는 상실배로 되고 13시간째 부화되어 담륜자 유생이 관찰되면서 세포의 할구마다 섬모가 형성되어 움직이기 시작하였다. 수정후 36시간째는 각장 $290 \mu\text{m}$ 의 피면자 유생으로 발달하였다(Fig. 9).

Table 6. Size of Pacific oyster *Crassostrea gigas* used in the experiments

Sex	Shell height (mm)	Shell length (mm)	Toatal weight (g)	Meat weight (g)
Male	145.2	57.1	89.7	15.2
	134.3	54.5	97.1	12.4
	135.0	62.2	85.9	14.7
	116.7	75.0	93.2	21.2
	150.0	65.3	76.6	7.9
Female	115.6	71.1	66.9	9.3
	130.1	70.0	84.7	14.5
	137.5	72.8	77.6	9.6
	102.1	64.3	75.1	18.7
	124.6	62.7	75.9	13.5
Average	129.1±14.6	65.5±7.0	82.3±9.4	13.7±4.2

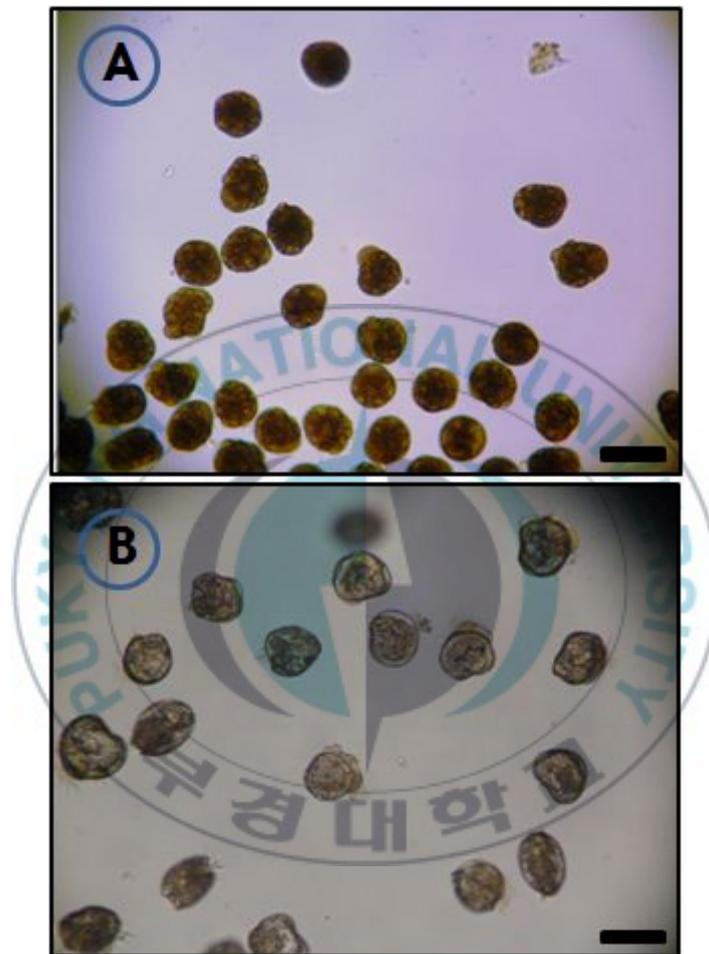


Fig. 8. Blastula (A) and D-shaped larvae (B) of Pacific oyster *Crassostrea gigas* used in developmental experiment. Bar=100 μ m.

Table 7. Size of abalone *Haliotis discus hannai* used in the experiments

Sex	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Toatal weight (g)
Male	147.5	45.7	85.7
	146.7	54.7	90.8
	150.7	38.6	79.1
	138.6	43.5	70.5
	150.1	47.5	73.5
Female	137.5	48.1	70.1
	143.5	43.2	80.4
	147.6	39.4	83.0
	147.6	53.5	79.0
	138.5	50.1	76.0
Average	144.8±5	46.4±5.5	78.7±6.6

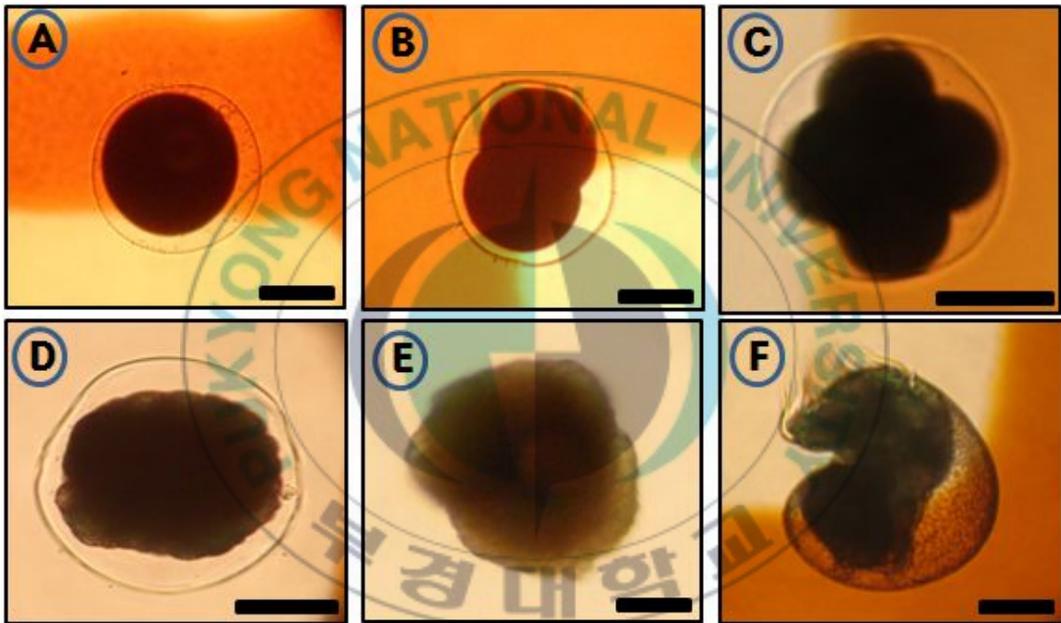


Fig. 9. 1st polar body (A), 2-cell (B), 4-cell (C), morula (D), trochophore (E) and veliger (F) stages of abalone *Haliotis discus hannai* used in developmental experiment. Bar=100 μm .

2. 결빙억제제 침지후 발생배의 활성화

(1) 참 굴

참굴의 발생 중 섬모운동을 시작하는 단계인 담륜자 및 D형 유생을 사용하여 CPA별, 농도별 침지에 따른 발생배의 활성을 관찰한 결과, Fig. 10에서 보는 바와 같이 각 유생의 LAI는 모든 CPA의 0.1 M 농도에서 높았으며, 농도가 높을수록 LAI가 낮아짐을 알 수 있었다.

그러나, CPA 종류별 담륜자 및 D형 유생의 LAI는 서로 차이를 보였다. DMSO와 PG에서 담륜자 및 D형 유생의 LAI는 EG에서 보다 낮았다(Fig. 10).

전체적으로, D형 유생의 침지후 LAI가 담륜자 보다 높아 CPA에 대한 내성이 D형 유생에서 강한 것을 알 수 있었다.

침지농도별 유생의 반응은 농도가 낮은 실험구에서 비대칭 나선운동이 멈추었으나, 농도가 높아질수록 섬모운동도 정지하고 움직이지 않는 채로 심장박동만 하였다.

(2) 참전복

참전복의 발생 중 섬모운동을 시작하는 단계인 담륜자 및 피면자 유생을 사용하여 CPA별, 농도별 침지에 따른 발생배의 활성을 관찰한 결과, Fig. 11에서 보는 바와 같이 각 유생의 LAI는 모든 CPA의 0.1 M 농도에서 높았으며, 농도가 높을수록 LAI가 낮아짐을 알 수 있었다. 또한 CPA 침지 후, 시간경과에 따른 유생의 활성화는 침지시간이 길어질수록 운동성이 점차 감소되었으며, 침지 후, 30분째 인공해수로 희석한 후 운동성이 점차 회복됨을 알 수 있었다.

그러나, 침지 직후의 운동활성까지는 회복되지 않았다(Figs. 12, 13). CPA

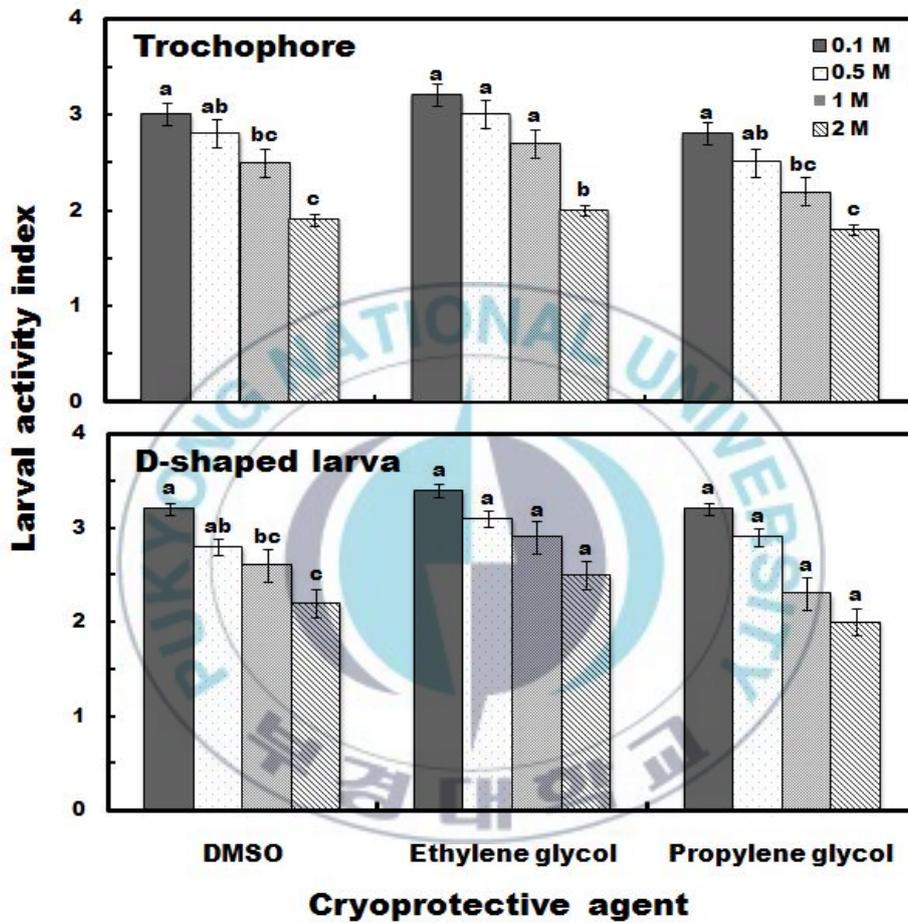


Fig. 10. Larval activity index of Pacific oyster *Crassostrea gigas* trochophores and D-shaped larvae according to CPAs. Same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide.

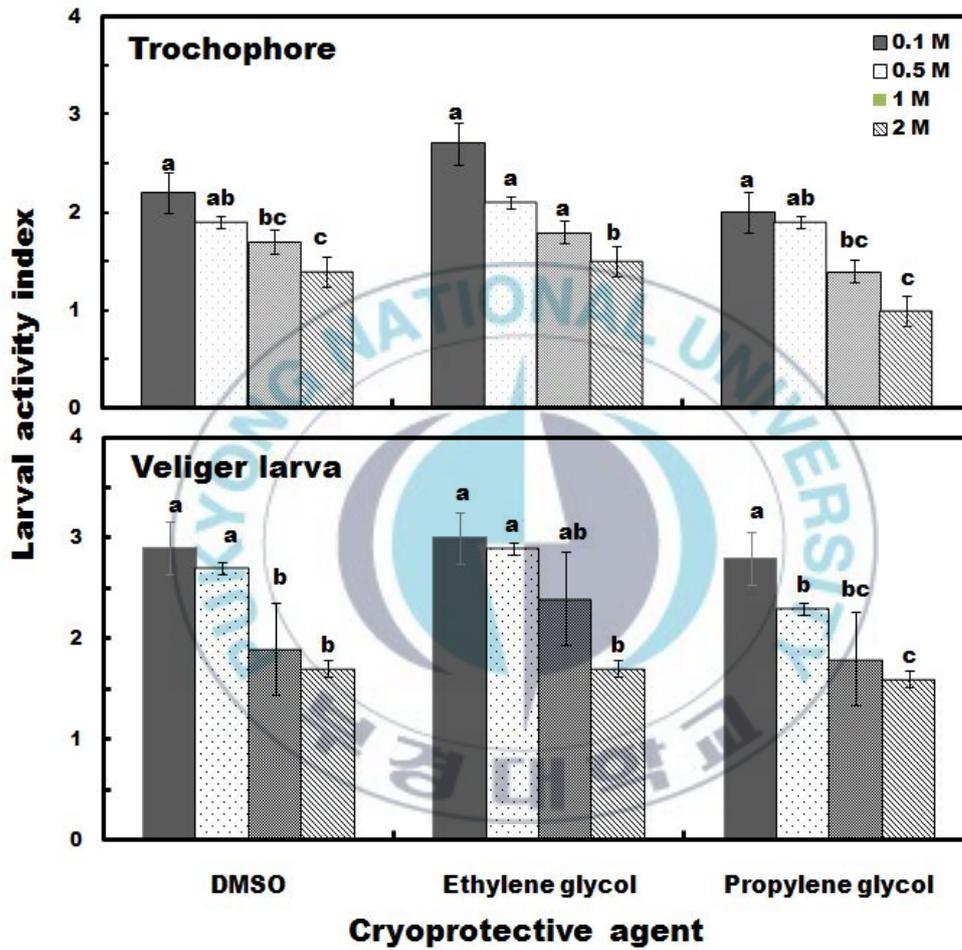


Fig. 11. Larval activity index of abalone *Haliotis discus hannai* trochophores and veliger larvae according to CPAs. Same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide.

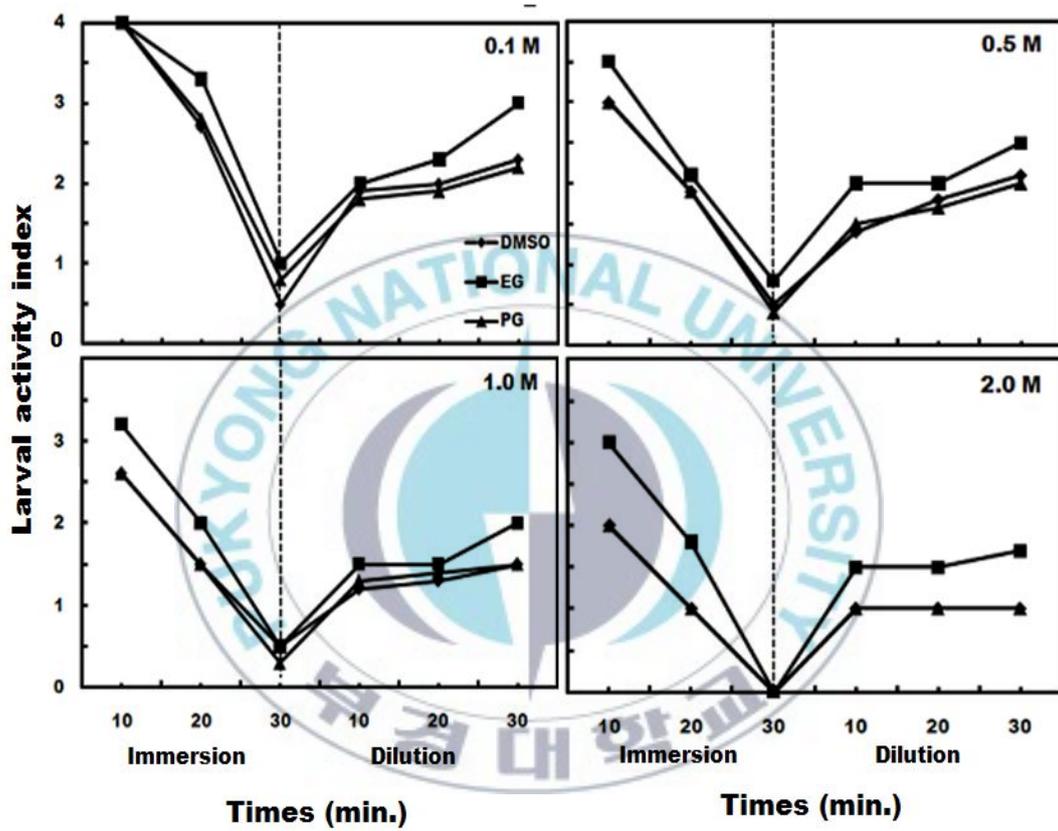


Fig. 12. Time course of larval activity index of abalone *Haliotis discus hannai* trochophores according to cryoprotective agents immersion and ASW dilution.

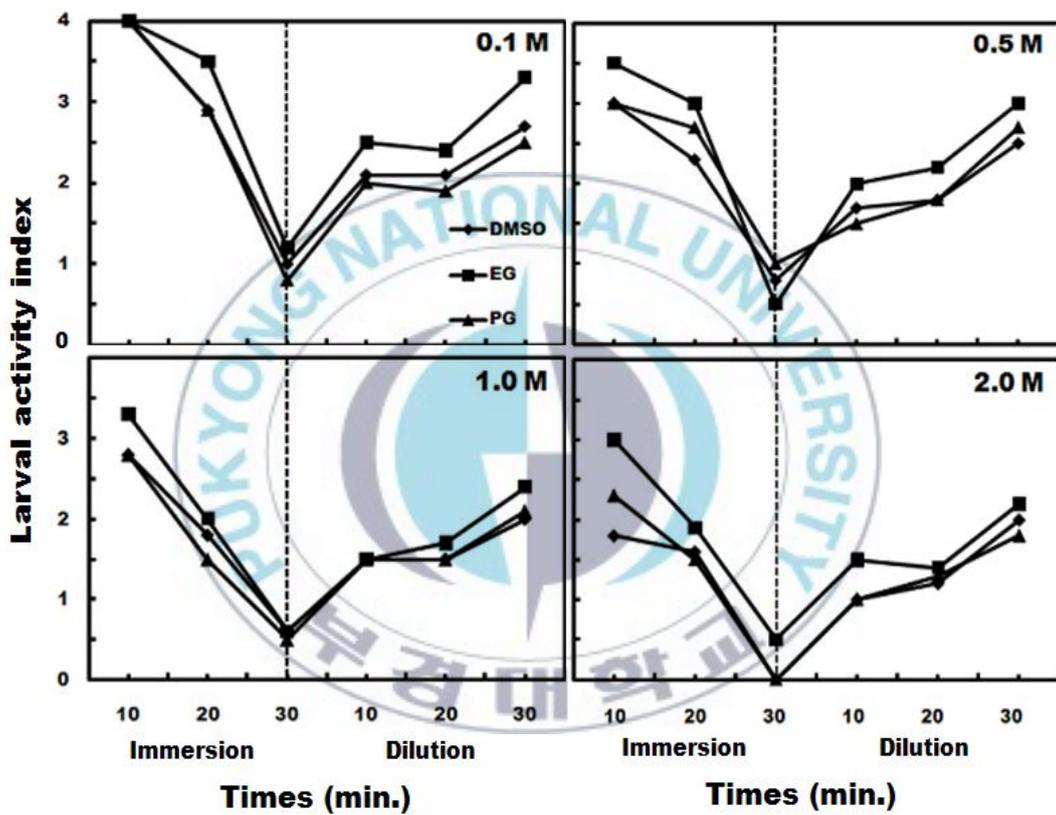


Fig. 13. Time course of larval activity index of abalone *Haliotis discus hannai* veliger larvae according to cryoprotective agents immersion and ASW dilution.

의 침지농도별 유생의 반응은 농도가 낮은 실험구에서 비대칭 나선운동이 멈추었으나, 농도가 높아질수록 섬모운동도 정지하고 움직이지 않는 채로 심장박동만 하였다. 전체적으로 피면자유생의 침지후 LAI가 담륜자 보다 높아 CPA에 대한 내성이 피면자 유생에서 강한 것으로 알 수 있었다. 그리고 각각의 CPA에서 EG 침지후 유생의 LAI가 다른 CPA보다 높아, EG이 참전복 발생배의 활성화에 영향을 덜 미치는 것으로 판단된다.

CPA에 4세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생을 침지하였을 때, 농도가 낮을수록, 침지시간이 짧을수록, 발생진행률이 높아지는 경향을 보였으며, CPA의 종류 및 배의 발생단계에 따라 발생진행률이 달랐다.

CPA의 종류별 침지후 발생진행률에서는 DMSO와 PG에서 4세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생의 발생진행률이 EG, PEG의 발생진행률보다 낮게 나타났다. 또한, PEG에서 4세포(Fig. 14), 상실배(Fig. 15), 담륜자(Fig. 16) 및 피면자 유생(Fig. 17)의 발생진행률이 가장 높게 나타났다. 배의 발생단계에 따른 발생진행률은 발생단계 중 4세포, 피면자 유생에서의 발생진행률이 가장 높게 나타났다.

3. 냉동·해동후 발생배의 생존율

(1) 참 굴

9회에 걸친 실험결과, 모든 실험구의 CPA농도가 높아짐에 따라 냉동·해동후 생존율이 높았다(Table 9). 담륜자에서는 DMSO와 PG에서의 냉동·해동후 발생배의 생존율 보다 EG에서 냉동·해동후 발생배의 생존율이 유의하게 높았다.

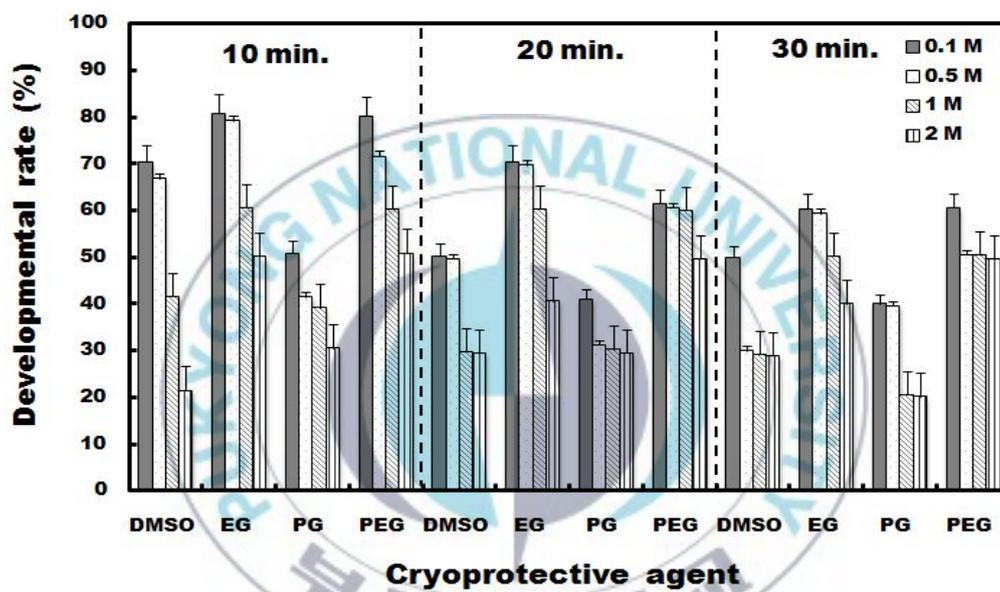


Fig. 14. Developmental rates from 4-cell to morula of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in several cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol, PEG: polyethylene glycol.

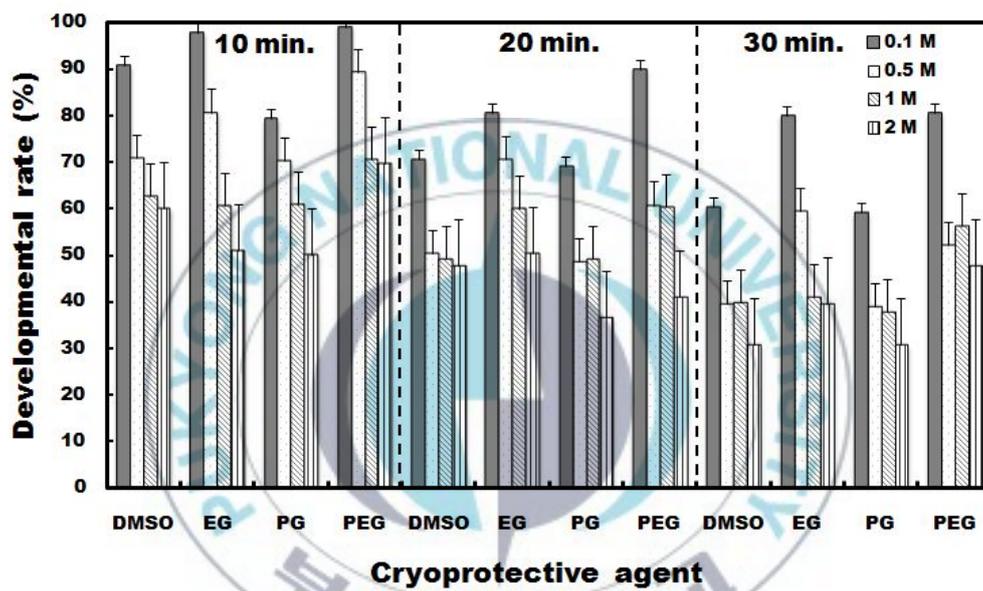


Fig. 15. Developmental rates from morula to trochophore of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in several cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol, PEG: polyethylene glycol.

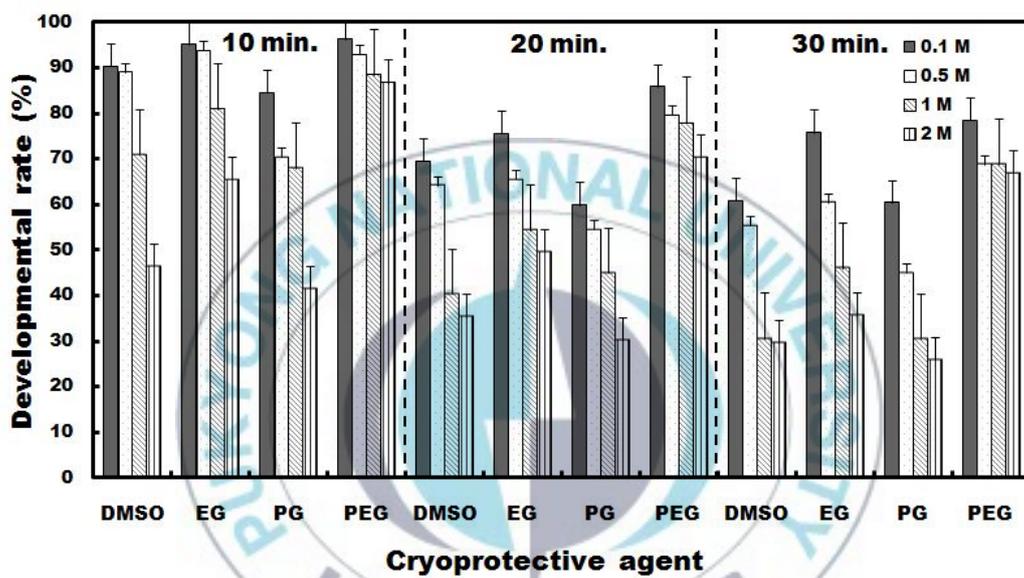


Fig. 16. Developmental rates from trochophore to veliger of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in several cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol, PEG: polyethylene glycol.

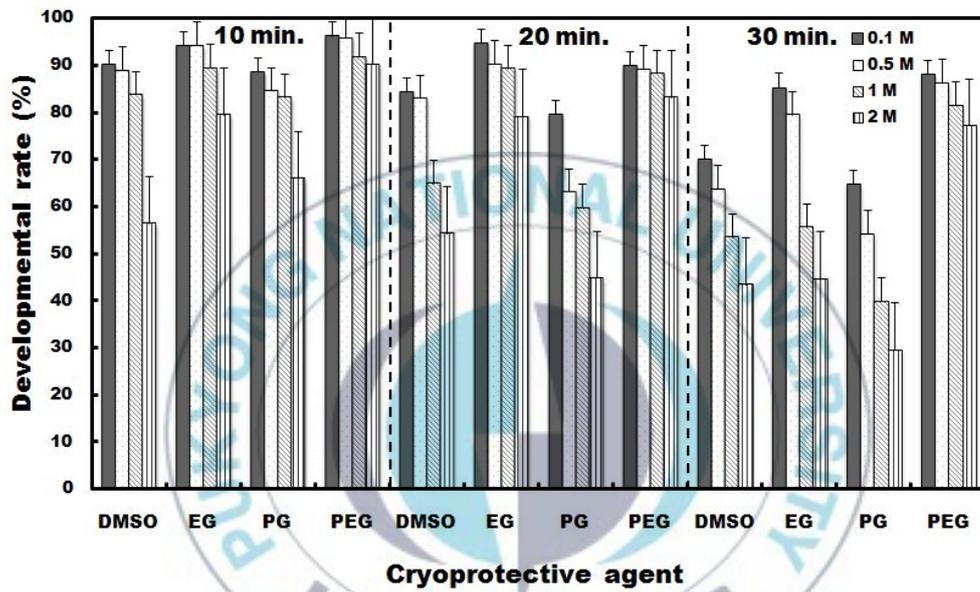


Fig. 17. Developmental rates from veliger to before torsion of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in several cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol, PEG: polyethylene glycol.

Table 9 Survival rates of embryos of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in three CPAs with freezing protocol I and II

Exp.	Stage	CPA (M)	Diluent (M)	Freezing protocol	Equilibration time (min.)	Survival rate (%)
1	Trochophore	EG 2.0	Sucrose 0.2	I	10	0
2	Trochophore	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	I	10	0
3	D-shaped larva	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	I	10	0
4	D-shaped larva	EG 2.0	Sucrose 0.2	I	10	0
5	D-shaped larva	EG 2.0	Sucrose 0.2	II	10	0
		DMSO 2.0				0
6	Trochophore	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	II	10	0
7	D-shaped larva	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	II	10	10
		EG 2.0				63
8	Trochophore	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	II	10	10
		PG 2.0				0
		EG 2.0				88
9	D-shaped larva	DMSO 2.0	Sucrose 0.2	II	10	40
		PG 2.0				10

CPA: cryoprotective agent, DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

또한, EG 1.0, 2.0 M에서 각각 $54.12 \pm 3.3\%$ 와 $63.0 \pm 12.3\%$ 의 생존율을 보였으나, EG 0.1, 0.5 M에서는 50% 미만의 생존율이 관찰되었다. D형 유생도 담륜자에서의 결과와 비슷하였다. EG 2.0 M에서 D형 유생은 $88.8 \pm 4.2\%$ 의 가장 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 18). 또한 담륜자와 D형 유생의 냉동·해동후 생존율을 비교하였을 때, D형유생의 생존율이 담륜자의 생존율 보다 더 높았다(Fig. 18).

(2) 참전복

CPA침지에 따른 냉동·해동후 발생배의 생존율 조사에서는, 참전복 담륜자 및 피면자 유생을 사용한 모든 실험구에서 0%의 생존율을 나타냈다.

담륜자에서, 세포의 외부형태는 CPA의 삼투질 농도 차와, 동해에 의한 세포막의 손상은 보이지 않았지만, 섬모의 운동이나 심장 박동이 관찰되지 않았다.

피면자 유생에서는, 유각이 떨어져 나가거나 세포막의 손상을 관찰할 수 있었다. 또한 CPA별, 농도별로 보았을 때, DMSO에서 다른 용액들에 비해 상대적으로 세포막의 손상이 컸다.

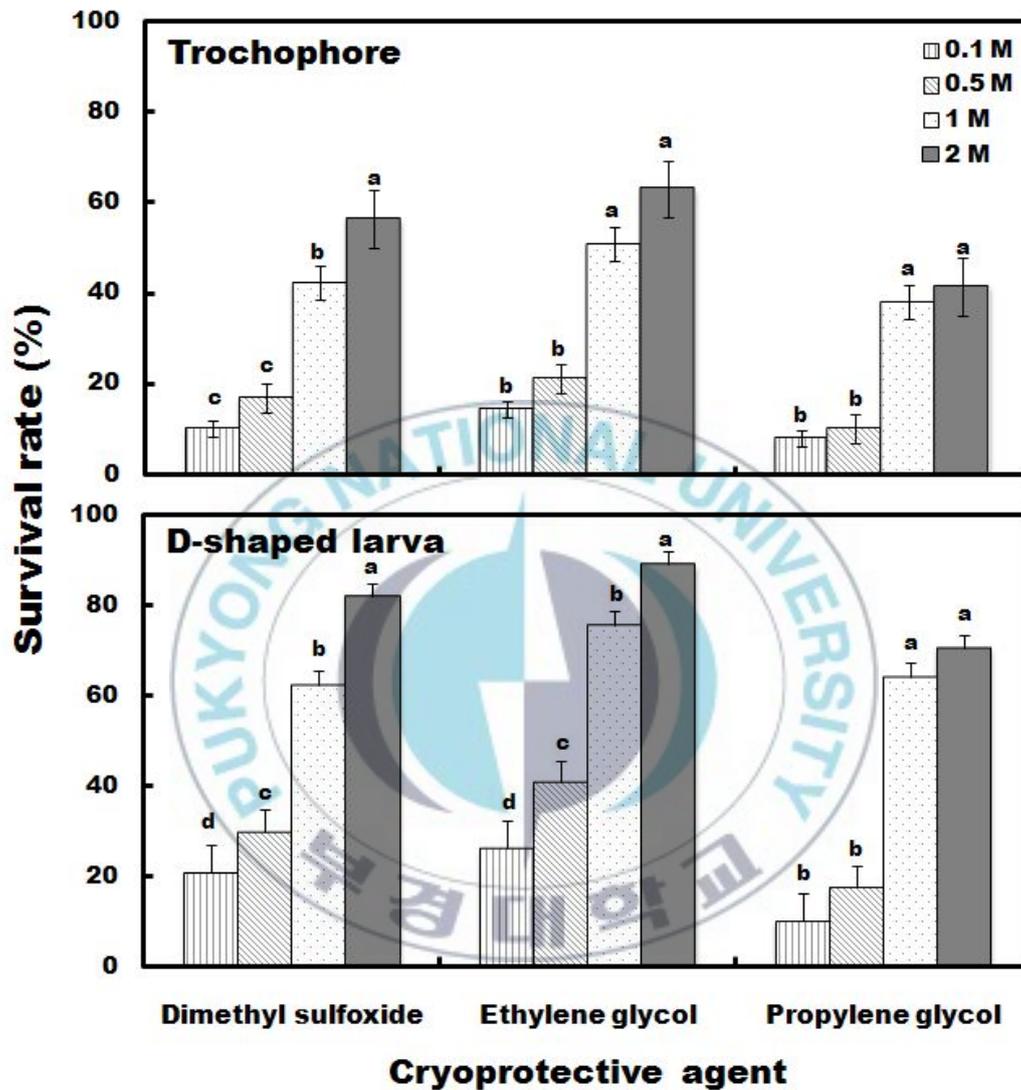


Fig. 18. Survival rate of trochophore and D-shaped larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas* according to cryoprotective agents. Same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$).

IV. 고찰

냉동보존에 있어서 CPA독성에 대한 발생배의 내성은 살아있는 세포를 성공적으로 보존하기 위해 우선적으로 고려해야 하는 중요한 요인이다(Kasai et al., 1981). 냉동보존에 사용되는 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 결과로 보아, 세포가 높은 삼투질 농도를 가지는 CPA에 노출되면 세포막이 파괴될 가능성이 높다고 판단된다. 이는 Renard and Cochard (1989)의 CPA독성으로 인한 배의 손상이 CPA의 높은 삼투압과 생화학적 영향에 의한 것으로 CPA의 분자량과 관계가 있다는 것과 부합된다고 할 수 있다.

DMSO의 경우, 송사리(Arii et al., 1987), 무지개송어(Arii et al., 1992), 초어 *Ctenopharyngodon idella* (Zhang et al., 1992)와 참굴(Chao et al., 1997)에서 효과적인 CPA로 보고된 바 있다.

그러나 본 연구의 결과, DMSO와 PG에서 발생배 활성화 및 발생진행률이 EG에 비해 저조한 결과를 나타내었다. 특히, 참굴 및 참전복에서, D형유생 및 피면자 유생의 LAI는 EG 0.1 M에 침지하였을 때, 각각 3.4 및 2.9로 가장 높게 나타났다. 따라서 DMSO가 가지는 독성이 참굴 및 참전복 발생배에 미치는 영향이 크다고 판단되며, 기존의 연구 중 참굴이 다른 조개류에 비해 DMSO에 대한 강한 내성을 나타낸다는 결과(Renard and Cochard, 1989)와 부합되지 않아, 종 특이성이 있다고 판단된다.

본 연구에서 효과적인 냉동보존을 위해 요구되는 또 다른 요인은 종에 따른 발생 단계의 적절한 선택이다. 참전복의 4세포와 상실배 그리고 담륜자와 피면자 유생을 사용하여 EG, PEG에 10분간 침지하였을 때 발생진행률이 각각 97.8 ± 1.4 , $99.1 \pm 0.1\%$ 로 가장 높게 나타났던 것은 EG과 PEG가 세포내로의 투과성이 높고 빙

핵 형성을 제한한다는 Cseh et al. (1997)의 Roux et al. (2008)의 실험에서 PEG를 사용한 경우 남아프리카 전복 *Haliotis midae* 발생배의 부화율이 90% 이상으로 높았다는 것과 부합된다. 그리고 발생진행률은 초기 발생단계인 4세포와 상실배 보다 후기단계인 담륜자 및 피면자에서의 발생진행률이 더 높았으며, CPA침지 시간이 짧을수록, 발생진행률이 높아짐을 알 수 있었다. 이는 발생배를 냉동한 다음, 해동하였을 때의 생존율이 배의 발생단계, 희석액, CPA, 평형시간, 냉동률 및 해동률에 영향을 입는다는 기존의 냉동보존의 원리와 부합되며, 진주조개의 2~4세포기, 8시간째 담륜자와 16시간째 담륜자를 이용하여, 냉동·해동후 2~4세포에서는 모두 폐사하였으나, 담륜자에서는 생존하였으며, 특히 16시간째 담륜자의 생존율이 월등히 높아졌다는 Choi and Chang (1999)의 연구 결과와도 부합된다.

또한, 참굴 및 참전복의 유생을 이용하여 냉동실험을 실시한 결과, 참굴에서 D형 유생을 EG 2.0 M에 침지한 다음, 냉동·해동후 80% 이상의 높은 생존율을 얻었다. 이는 Gwo (1995)는 참굴의 발생단계 중 상실배, 낭배 및 담륜자 를 이용한 냉동보존 실험에서, 담륜자가 상실배, 낭배에 비해 CPA에 대한 내성이 높다고 하였으며, 발생단계, CPA농도와 종류, 평형시간, 냉동률이 성공적인 냉동보존을 위해 중요한 요인이라고 강조하였다는 결과와 부합된다. 그리고 적어도 4시간 이상의 후기 발생배와 초기 유생이 CPA에 대해 내성을 가지는 이상적인 단계라고 보고한 Chao et al. (1994)의 연구결과와도 부합된다.

하지만 참전복의 경우, 냉동·해동후 발생배의 생존율을 조사한 결과, 담륜자 및 피면자 유생 모두 폐사하였다. 현재까지의 해양 무척추동물 발생 배 냉동보존에 관한 연구는 조개류가 대부분이었다. Renard (1991)는 참굴의 2~4세포기 발생 배를 이용하여 냉동실험을 실시하였으며, Gwo (1995)는 참굴의 발생단계 중 상실배, 낭배 및 담륜자를 이용하여 냉동실험을 실시하여 PGC 10%를 사용하여 냉동·해동후 60%의 생존율을 얻었다. 국내의 해양 무척추동물 발생배 냉동보존의 연구는 진

주조개와 북방대합 유생의 냉동보존에 관한 연구에서 담륜자의 경우, CPA로 DMSO를 사용하였을 때 97%의 높은 생존율을 얻었으며(Chang et al., 1999, 2001), 피조개 유생의 냉동보존 연구에서 D형 유생의 경우, EG 2.0 M을 사용하였을 때, 52%의 생존율을 나타낸 결과를 볼 수 있었다(Jo et al., 2002).

그러나 조개류가 아닌 고등류 및 복족류의 발생배 냉동보존에 관한 연구는 전 세계적으로 미비한 실정이다. 이와 같은 원인으로 기존의 연구에 사용되어진 조개류의 초기 발생배는 50~100 μm 내외이지만, 참전복과 같은 복족류의 경우, 100~250 μm 로 세포의 크기 차를 보이며 또한, 참전복의 경우 세포막이 다른 조개류에 비해 현저히 두껍기 때문에 CPA침투 시 적정 평형시간을 산정하기 어려움에 있다고 판단된다. 이러한 문제점들을 극복하여 기초적인 지식을 얻어 체계적이고 성공적인 발생배 냉동보존 연구를 위해, 전술한 사전 실험이 필요하다고 판단된다.

본 연구에서 참굴과 참전복의 CPA침투후 발생배의 활성 실험결과는 유사한 경향을 나타내었지만, 냉동실험에서 CPA종류, 농도, 냉동방법 및 해동방법에 따른 결과는 다르게 나타났다. 그리고 비보존시와 냉동보존시의 물리적·화학적, 환경적 요인이 다르기 때문에 비보존 독성 실험의 결과와 냉동보존의 결과는 같을 것이라고 단정지을 수는 없다. 따라서, 냉동보존시 발생배에 미치는 CPA독성에 대한 내성실험이 체계적으로 병행되어야 할 것으로 판단된다. 참굴에서, 냉동·해동후 높은 생존율을 얻을수 있었지만, 참전복에서는 모두 폐사하였다.

이는 조개류와 복족류간의 종 특이성에 따른 결과라고 판단되어지며, 이를 토대로 하여 앞으로의 연구에 있어 종간의 특이성을 파악하여 체계적인 발생배 냉동보존의 적정방법을 탐색하여, 치패생산의 수준까지의 지속적인 연구와 복족류의 발생배 냉동보존의 기반지식 마련과 체계적인 실험이 이루어져야 할 것이다.

IV. 요약

본 연구에서는 참굴 및 참전복 발생배의 냉동보존을 위한 기초자료를 제공하기 위해, 난발생, CPA침지후 발생배 활성화 조사, 발생진행률 및 냉동실험을 실시하였다.

CPA별, 농도별 침지후 발생배의 활성을 조사한 결과, 먼저 참굴에서 EG 0.1 M에 D형 유생에 침지하였을 때, LAI가 3.4 ± 1.4 로 가장 높았으며, DMSO 2.0 M에서 1.9 ± 0.2 로 가장 낮게 나타났다. 참전복에서는, 담륜자를 침지하였을 때, DMSO 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 M의 LAI가 각각 2.2 ± 0.2 , 1.9 ± 0.1 , 1.7 ± 0.1 및 1.4 ± 1.4 로 나타났으며, EG에서, 2.7 ± 1.3 , 2.1 ± 0.1 , 1.8 ± 0.1 및 1.5 ± 1.4 로 전체적으로 높게 나타났다. 또한 모든 실험구에서 이와 같은 경향을 나타내어, LAI는 CPA의 농도가 높을수록 LAI가 낮아지는 경향을 보였다.

CPA침지후 참전복 발생배의 발생단계별 발생진행률을 파악하기 위한 실험의 결과, 각각의 CPA에 4세포, 상실배, 담륜자 및 피면자 유생을 침지하였을 때, CPA농도가 낮을수록, 침지시간이 짧을수록, 발생진행률이 높아지는 경향을 보였으며, CPA종류 및 발생단계에 따라 발생진행률이 다르게 나타났다.

CPA별 침지후 발생진행률은 DMSO와 PG에서 발생진행률이 각각 90.8 ± 0.4 , $84.6 \pm 0.6\%$ 로 EG, PEG의 발생진행률인 97.8 ± 1.4 , $99.1 \pm 0.1\%$ 보다 낮았다. 또한, CPA중 PEG에 상실배를 10분간 침지한 후의 발생진행률이 $99.1 \pm 0.1\%$ 로 가장 높았다. CPA침지 시간별 발생진행률의 결과, EG 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 M에 10분간 침지 시, 발생진행률이 80.8 ± 1.5 , 97.8 ± 1.4 , 95.1 ± 0.5 및 $94.3 \pm 1.1\%$ 로, 30분간 침지 시 발생진행률 60.5 ± 0.4 , 80.0 ± 0.9 , 75.8 ± 1.1 및 $85.4 \pm 1.2\%$ 보다 높음을 알 수 있어, CPA 침지시간이 짧을수록, 발생진행률이 높아지는 경향을 보였다.

그리고 CPA침지후 발생단계에 따른 발생진행률 결과, PG의 경우 4세포, 상실

배, 담륜자 및 피면자 유생의 평균 발생진행률이 각각 51.2 ± 0.8 , 79.3 ± 1.3 , 84.6 ± 0.6 및 $88.7\pm 0.9\%$ 로 발생이 점점 진행될수록 발생진행률이 높았다.

냉동·해동후 참굴 및 참전복 발생배의 생존율을 파악하기 위한 실험에서, 참굴에서, 담륜자를 사용한 실험구는 CPA농도가 높아짐에 따라, 냉동·해동후 발생배의 생존율이 높았다. 그리고 DMSO와 PG를 사용한 실험구보다 EG를 사용한 실험구가 CPA농도에 상관없이 발생배의 생존율이 유의하게 높았다. 또한, 담륜자를 사용한 실험구에서 EG 1.0, 2.0 M에서, 각각 $54.1\pm 3.3\%$ 와 $63.1\pm 2.3\%$ 의 생존율을 보였으나, 그 외의 농도 EG 0.1, 0.5 M에서는 50% 미만의 생존율이 관찰되었다. D형 유생에서도 담륜자의 결과와 유사한 경향을 보였다. 특히, D형 유생에서 EG 2.0 M에서 $88.8\pm 4.2\%$ 의 가장 높은 생존율을 나타내었다. 또한, 담륜자와 D형 유생의 냉동·해동후 생존율을 비교하였을 때, D형 유생의 생존율이 담륜자 보다 더 높음을 알 수 있었다. 하지만, 참전복의 경우, 담륜자 및 피면자 유생을 사용한 모든 실험구에서 냉동·해동후 발생배가 모두 폐사하였다.

감사의 글

이렇게 석사과정을 무사히 마칠 수 있게 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전합니다. 학부 편입을 하여, 처음 연구실 문을 두드릴 때가 생각이 납니다.

적응하기 힘든 시기에 저에게 항상 학문적 소양과 논리적 사고를 심어주시고, 때로는 아버지와 같이 따뜻한 격려와 배려로 인성을 가르쳐 주신 장영진 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 석사학위논문을 교정해 주시고 심사해주신 김동수 교수님, 고강희 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 아울러 학부 및 대학원 과정동안 학문적 가르침을 주신 허성범 교수님, 조재운 교수님, 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 김종명 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님께 진심으로 감사드립니다.

학부 및 대학원 과정동안 그리고 잠시 일을 하는 동안 항상 조언과 가르침을 해주시고, 석사논문을 무사히 마칠 수 있도록 많은 도움을 주신 국립수산과학원 임한규 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 언제나 연구실을 방문 해주셔서 친형님처럼 아껴주시고, 때로는 질타와 용기를 분돋아 주신 국립수산과학원 민병화 박사님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한, 언제나 실험을 할 수 있도록 모패를 구하는데 도움을 주신 국립수산과학원 명정인 센터장님, 문태석 과장님께 깊은 감사를 드립니다.

언제나 함께 생활하며 선배로서 관심과 충고를 아끼지 않았던 번식생리학 연구실의 노경언 선배님, 김영수 선배님과 국립수산과학원 정민환 연구원님 등 여러 선배님들께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학부과정부터 대학원과정까지 같이 동고동락했던 나이 어린 선배 도용현 선배님, 힘든 대학원과정에서 같이 눈물 흘리며 시간을 보냈던 김원진, 박진우 선배님께 감사의 마음을 전합니다. 또한 멀리 중국에서 왔지만, 패류에 대해 많은 지식을 가르쳐주었던

김정우 선배님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 연구실은 다르지만, 선배로서 형님으로서 조인을 아끼지 않았던 교수근 선배님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 또한, 실험 재료를 구하는 데 있어 많은 도움을 주신 부경수산 교수성님과 국립수산물품질관리원 임영섭 기사님께 진심으로 감사드립니다.

힘들고 어려울 때, 소주 한 잔으로 제 모든 것들을 이해해준 친구들 이현욱, 손상우, 허원섭, 김효겸, 최정원군에게 너무 감사드립니다.

그리고 언제나 저를 위해 밤새 기도해주시고, 아껴주시고, 키워주신 할머니, 새벽부터 가게를 나가시면서도 힘든 내색하시지 않고 항상 웃어주시며 저를 아껴주신 이모님, 늘 인자하신 모습으로 아껴주신 큰삼촌, 이분들께 항상 고맙고, 미안하고, 진심으로 감사하고, 사랑한다 말 전하고 싶습니다.

마지막으로, 이 부족한 아들 챙기시느라 당신의 모든 것을 바치며 언제나 고생하시는 사랑하는 어머님께 그동안 너무 고생하셨고 감사하고 사랑한다 말 전하고 싶습니다. 그리고 제게 때론 친구 같고, 때론 선배 같은, 세상에 하나 밖에 없는 동생에게도 너무 사랑하고 고맙단 말 전합니다. 그리고 제가 인생을 살아가는데 있어 목표와 기준이 되시는 버팀목이자, 인생의 스승이신 아버지께 그동안 너무 고생하셨고 사랑한다 말 전하고 싶습니다. 사랑합니다.

저를 아껴주시고 도움을 주신 모든 분들께 다시 한번 감사드리며, 그리고 지금도 하늘에서 손주의 앞날을 걱정하며, 기도하고 계실 너무나 사랑하는 할아버지께 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

- Arii, N., K. Nami, F. Gomi and T. Nakazawa. 1987. Cryoprotection of maedaka embryos during development. *Zool. Sci.* 4, 813-818.
- Arii, K., T. Suzuki, R. Takai and T. Kozima. 1992. Tolerance of fish eggs to dimethyl sulfoxide as the cryoprotectant. *J. Tokyo Univ. Fish.* 79, 121-126.
- Carvalho, R.V., M.R. Campo, A.T. Palasz, Y. Plante and R. J. Mapletoft. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryo frozen at different development 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, Y.H. Choi and J.Y. Lee. 2001. Survival rates of frozen-thawed surf clam *Spisula sachalinensis* larvae in five developmental stages. *Dev. Reprod.* 5, 35-38 (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 Resour.* 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.
- Chavez, C.G. and T.R. Tiersch. 2001. Laboratory studies cryopreservation of

- sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43, 211-223.
- Chavez, C.G., J.T. Buchanan, J.E. Supan and T.R. Tiersch. 1998. Settlement and growth of eastern oysters produced from cryopreserved larvae. *Cryo-Letters* 19, 283-292.
- Choi, Y.H. and Y.J. Chang. 1999. Survival rates of trochophores from pearl oyster *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* immersed in four kinds of cryoprotectant. *J. Korean Fish. Soc.* 32, 476-480 (in Korean).
- 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, 190-193.
- Cocero, M.J., P. Procureur, De La J. Fuente and D. Chupin. 1988. Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology* 29, 238.
- 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 frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology* 48, 43-50.
- Dinnyes, A., C. Carolan, P. Lonergan, A. Massip and P. Mermilod. 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology* 46, 1425-1439.

- Gwo, J.C. 1995. Cryopreservation of oyster *Crassostrea gigas* embryos. *Theriogenology* 43, 1163-1174.
- 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.
- 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. Comparison of cryopreservation effects on D-shaped larvae of arkshell *Scapharca broughtonii* by the kinds of additive and the concentrations of cryoprotectant. *Korean Journal of Malacol.* 18, 77-82 (in Korean).
- Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 63, 175-180.
- Merry, D.A., K.R. Bondioli, R.L. Allen and R.W. Wright. 1984. One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology* 22, 433-443.
- Naidenko, T. 1997. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocyte embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. *Cryo-Letters* 18, 375-382.
- Naitana, S., P. Loi, S. Ledda, P. Cappai, M. Dattena, L. Bogliolo and G. Leoni. 1996. Effect of biopsy and vitrification on in vitro survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology* 46,

813-824.

- Niemann, H. 1984. Theoretical and practical of deep freezing cattle embryos. *Am. Res. Dev.* 19, 83-97.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa and T. Suzuki. 1995. The development of immature bovine oocyte cryopreserved by 1,2-propanediol. *J. Reprod. Develop.* 41, 361-366.
- Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos 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 philippinarum* Reeve and king scallop *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-Letters* 10, 169-180.
- Roux, A., L. Sandenbergh and R. Roodt-Wilding. 2008. Preliminary investigation to determine the cryotoxicity of various cryoprotectants on southern African abalone *Haliotis midae* embryos. *Cryobiology* 57, 308-311.
- Sakul, H., G.E. Bradford, R.H. Bondurant, G.B. Anderson and S.E. Donahue. 1993. Cryopreservation of embryos as means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology* 39, 401-409.
- Schiewe, M.C., W.F. Rall, L.D. Stuart and D.E. Wildt. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenol-*

ogy 36, 279-293.

Shaw, J.M., C. Ward and A.O. Trounson. 1995. Survival of mouse blastocysts slow cooled in propanediol or ethylene glycol is influenced by the thawing procedure, sucrose and antifreeze proteins. *Theriogenology* 43, 1289-1300.

Shelton, J.N. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology* 37, 713-721.

Somgsasen, N., B.C. Buckrell, C. Plante and S.P. Leibo. 1995. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32, 78-91.

Tervit, H.R. and P.G. Gold. 1984. Deep-freezing of sheep embryos. *Theriogenology* 21, 268.

Tervit, H.R., S.L. Adams, R.D. Roberts, L.T. McGowan, P.A. Pugh, J.F. Smith, A.R. Janke. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* oocytes. *Cryobiology* 51, 142-151.

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

Ware, C.B. and M.P. Boland. 1987. Effect of varying glycerol and sucrose concentrations combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. *Theriogenology* 27, 721-728.

Zhang, L., X. Liu, D. Lu, S. Chen and J. Fang. 1992. Effects of several factors on the survival rate of fish embryo before it cryopreserved.

Freshwat. Fish. Danshui. Yuye. 1, 20-24.

한국수정란이식학회. 1995. 소 수정란 이식. 장문각. 290pp.

