

북방대합, *Spisula sachalinensis* 유생의 발생단계별 냉동-해동후 생존율

장영진[†] · 김영신 · 최윤희 · 이정용¹

부경대학교 수산과학대학 양식학과¹·국립수산진흥원 강릉수산종묘시험장

Survival Rates of Frozen-thawed Surf Clam, *Spisula sachalinensis* Larvae in Five Developmental Stages

Young Jin Chang[†], Young Sin Kim, Youn Hee Choi and Jeong Yong Lee¹

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

¹Kangnung Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Kangnung 210-800, Korea

요약 : 동해안산 북방대합의 유생을 냉동보존하기 위한 적절한 유생단계를 선택하기 위해, 답륜자, 초기 D상 유생, 후기 D상 유생, 초기 각정기, 후기 각정기 유생에 대한 냉동실험을 실시하였다. 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide와 ethylene glycol를 사용하였다. 동해방지제에 각 단계의 유생을 10분간 두어 평형상태에 달하게 한 다음, 냉동하여 액체질소에 보존하였다. 해동결과, 가장 높은 생존율을 나타낸 유생은 답륜자로서 동해방지제 2.0 M DMSO와 2.0 M ethylene glycol에서 생존율은 각각 97.4%와 85.0%였다. 발생이 진행된 유생일수록 생존율이 낮아지는 경향을 보였다.

ABSTRACT : This study was performed to find out the optimum larval stage among trochophore, early D-shaped larva, late D-shaped larva, early umbo and late umbo stages for cryopreservation of surf clam, *Spisula sachalinensis* larvae. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol were used as cryoprotectant. The larvae were immersed to cryoprotectants for 10 minutes and thereafter, cryopreserved in liquid nitrogen. Survival rates of trochophores frozen-thawed in 2.0 M dimethyl sulfoxide and 2.0 M ethylene glycol were the highest as 97.4% and 85.0%, respectively and post-thaw survival rates were decreased with the larval growth.

Key words : Surf clam, *Spisula sachalinensis*, Larva, Developmental stage, Cryopreservation, Survival rate.

서론

냉동보존에 관한 연구는 효과적인 냉동보존을 위해 요구되는 동해방지제의 종류와 농도, 냉동·해동률, 다양한 발생단계 등의 요인들로 연구되고 있다. 특히 이전의 연구에서는 초기단계의 발생배를 이용한 연구가 주를 이루고 있으며, 그중 수서동물의 발생배를 이용한 냉동보존은 어류에 중점을 두어 왔다 (Stoss et al., 1983). 어류 중에서도 송사리, *Oryzias latipes* (Arii et al., 1987), 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (Arii et al., 1992), zebrafish, *Brachydanio rerio* (Zhang et al., 1993; Hagedorn et al., 1997)와 인도산 잉어류, *Laboe rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala* (Ahammad et al., 1998) 등의 발생배가 냉동보존 연구의 대상으로 되고 있다

한편, 무척추동물의 발생배를 대상으로 한 냉동보존 연구는 성계를 시작으로 이루어져 왔으나 (Asahina and Takahashi, 1978), 그 내용이 기초적인 연구에 불과하고 종에 있어서도 한정적이었다. 따라서 최근에는 조개류인 참굴, *Crassostrea gigas* 발생배의 냉동보존 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 발생단계에 따른 냉동내성과 해동 후 생존율 확인으로 냉동보존의 유용성이 알려지고 있다. 이러한 조개류의 발생단계별 특징에 따라 냉동보존의 이용 가능성을 파악할 수 있다. 조개류의 발생단계는 수정 후 제1극체가 방출된 후 난할이 개시되어 부등분열에 의해 2세포, 4세포, 8세포 및 포배기까지 분열한다. 그 후 섬모로 회전운동을 시작하는 낭배기를 거쳐, 입의 원기가 생기고 몸 표면이 섬모와 섬모환으로 덮여 방향감각을 가지고 부유생활을 하는 중 모양의 답륜자 (trochophore)기가 된다. 답륜자 다음 단계인 피면자 (veliger) 유생은 답륜자의 섬모환 부분이 면반이 되어 수중 유영생활을 하며, 태각(胎殼)이 형성된다. 외부로부터 영양을 흡수하며, 패각을 형성하는 D상 유생으로 발생한 후, 피면자 유생의 태각과는 또 다른 각정이 형성되는 각정 (umbo)기를 거친

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호: 2000-1-22300-001) 지원으로 수행되었음.

[†]교신저자: 부산광역시 남구 대연 3동 599-1, 부경대학교 수산과학대학 양식학과. (우) 608-737, (전) 051-620-6135, (팩) 051-628-7430, e-mail: yjchang@pknu.ac.kr

다. 그 후 유생은 성장과 변태를 거듭하면서 면반이 퇴화되고 기질에 착저하여 성체형이 된다.

참굴의 발생단계별 연구 이후, Renard (1991)는 2~4세포의 발생단계를 이용하여 냉동보존시 발생단계에 따른 냉동내성에 대해 보고하고 있으며, Chao et al. (1997)은 후기 발생배와 초기 유생을 냉동보존하여 냉동보존에 적절한 발생단계를 밝히고자 하였다. 이와 같이 조개류 유생의 냉동보존시 고려되어야 하는 다양한 요소 중에서도 보존에 적합하고 냉동내성이 보다 강한 유생의 발생단계를 찾아내기 위한 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 북방대합, *Spisula sachalinensis* 유생의 냉동보존에 적합한 발생단계를 파악하기 위하여 담륜자기부터 후기 각정기까지 5단계로 나누어 냉동하고, 해동후 생존율을 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 자연산 북방대합은 산란기인 6월에 채집하

여 유수식 수조에서 사육하면서 안정된 것만을 사용하였다. 채란·채정용 어미의 크기는 각장 100.4 ± 5.2 mm, 각고 80.8 ± 4.5 mm, 각폭 58.1 ± 7.0 mm, 전중 262.3 ± 39.2 g이었다 (Table 1).

북방대합의 알은 난핵포 붕괴 (germinal vesicle breakdown) 이전이라도 수정이 가능한 종이므로, 성숙한 암수의 생식소 부위를 절개하여 암수 3:1의 비율로 각각 채란·채정하였다. 채취한 알과 정자를 미리 준비해 둔 여과해수 (17°C , 34‰)에 넣어 수정 후 세란하였다.

이후, 실험을 위해 담륜자 (수정 후 19.5시간), 초기 D상 유생 (수정 후 25.5시간), 후기 D상 유생 (수정 후 2일), 초기 각정기 (수정 후 5일), 후기 각정기 (수정 후 15일)에 달한 유생을 각각 재료로 하여 실험하였다 (Fig. 1). 냉동보존에 사용한 희석액으로는 인공해수 (NaCl 2.7g, KCl 0.07g, NaHCO_3 0.05g, CaCl_2 0.12g, MgCl_2 0.46g, 증류수 100mL)에 녹여 만든 0.2 M sucrose를, 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol을 사용하였다. 희석액으로 사용한 0.2 M sucrose에 2가지 동해방지제를 각각 첨가하여 최종농도가 2.0 M이

Table 1. Measurements of surf clam, *Spisula sachalinensis* used in spawning induction

Sex	Number	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Shell width (mm)	Total weight (g)
Female	26	100.1 ± 3.6	80.3 ± 3.6	58.8 ± 8.9	259.7 ± 27.8
Male	26	100.6 ± 6.5	81.3 ± 5.2	57.4 ± 4.4	265.0 ± 48.5
Average	52	100.4 ± 5.2	80.8 ± 4.5	58.1 ± 7.0	262.3 ± 39.2

Data presented as mean \pm SD.

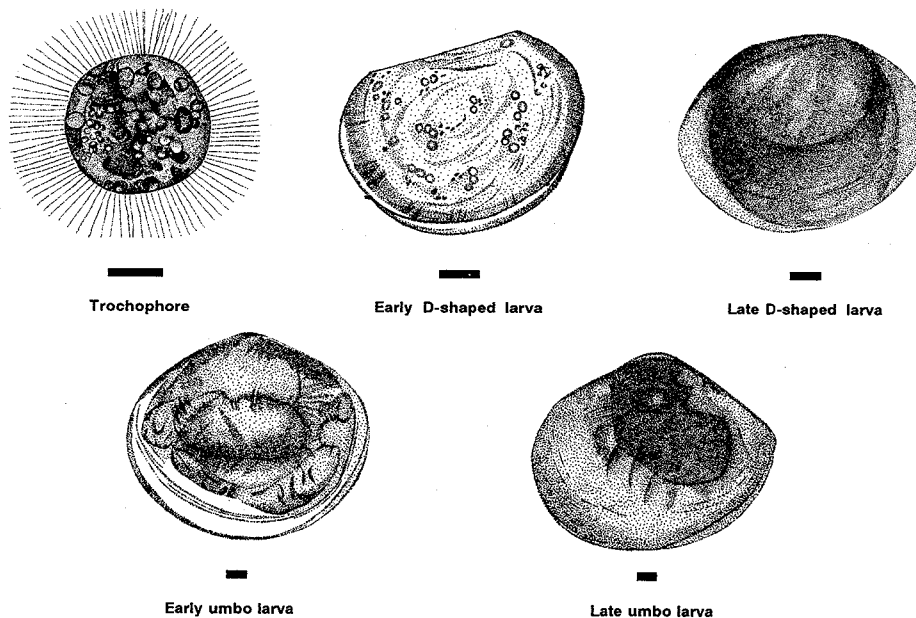


Fig. 1. Larval development stages of surf clam, *Spisula sachalinensis* used in the cryopreservation experiments. Bar= 20 μm .

되도록 한 다음 냉동보존 실험을 실시하였다. 발생단계별 냉동을 위한 5종류의 유생을 실온 (23°C)에서 각 용액에 10분 동안 침지한 후 0.5 mL straw (Japan, FHK)에 봉입하여 최종 온도 0°C로 설정되어 있는 프로그램냉동기 (Samwon Freezing Engineering Co., Korea)로 옮겼다. 이어서, 냉동률 -1°C/분으로 -12°C까지 냉동한 후 -12°C에서 10분 동안 식빙 (seeding)한 다음, 앞과 동일한 냉동률로 -35°C까지 냉동하였다. 냉동된 유생은 -196°C의 액체질소통 (USA, MVE)에 옮겨 보관하였으며, 보관 1시간 후 25°C의 담수에서 급속해동하여 인공해수로 희석한 다음, 광학현미경에 의해 섬모운동과 심장박동 여부로 생존율을 조사하였다.

모든 자료는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Min. USA)로 ANOVA를 실시하여 최소 유의차 검정으로 평균간의 유의차 유무를 판정하였다.

결 과

1. DMSO

0.2 M sucrose가 첨가된 2.0 M DMSO를 사용하여 각각의 발생단계에 따라 냉동보존한 결과, 담륜자 97.4±0.5%, 초기 D상 유생 78.9±9.4%, 후기 D상 유생 61.3±12.0%, 초기 각정기 유생 24.4±1.9%, 후기 각정기 유생 13.9±6.3%의 순으로 발생단계가 진행될수록 낮아지는 해동후 생존율을 보였다. 이중 담륜자가 다른 발생단계에 비해 생존율이 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 2). 또한 동일한 발생단계에서의 초기와 후기 유생은 서로 유의한 생존율 차이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$).

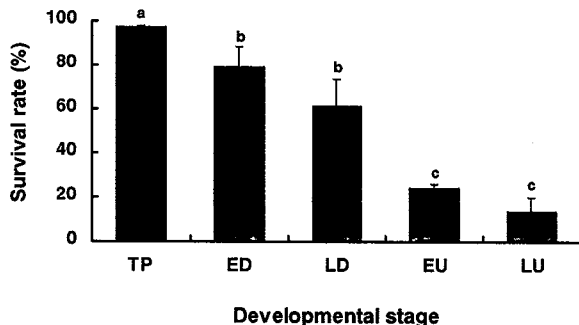


Fig. 2. Survival rate of frozen-thawed larvae in each developmental stage cryopreserved with 2.0 M DMSO and 0.2 M sucrose. TP: trochophore, ED: early D-shaped larva, LD: late D-shaped larva, EU: early umbo larva, LU: late umbo larva. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

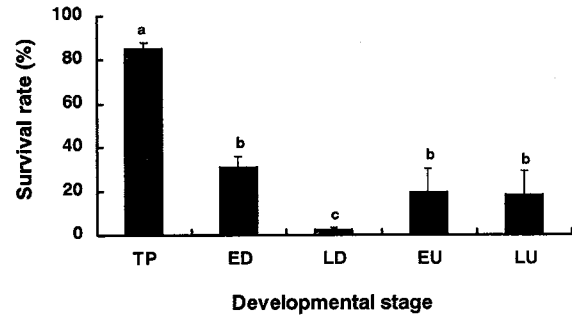


Fig. 3. Survival rate of frozen-thawed larvae in each developmental stage cryopreserved with 2.0 M ethylene glycol and 0.2 M sucrose. TP: trochophore, ED: early D-shaped larva, LD: late D-shaped larva, EU: early umbo larva, LU: late umbo larva. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

2. Ethylene glycol

0.2 M sucrose에 첨가된 2.0 M ethylene glycol을 사용하여 냉동보존한 경우, 각각의 발생단계에 따라 유의한 차이가 나타났다. D상 유생과 각정기 유생에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 담륜자는 85.0±2.5%, 초기 D상 유생은 31.2±4.9%, 후기 D상 유생은 2.7±0.9%, 초기 각정기 유생은 19.7±10.5%, 후기 각정기 유생은 18.3±10.7%의 생존율을 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 3).

고 찰

기존의 조개류 발생배의 냉동보존 연구에서 사용된 발생단계는 세포분열 초기의 배가 대부분이었다. Toledo et al. (1989)은 진주담치, *Mytilus edulis*의 발생단계 중 2~8세포기와 담륜자기를 이용하여 냉동보존한 결과, 담륜자도 냉동보존이 가능함을 파악하였다. Renard (1991)는 참굴의 2~4세포기 발생배로 실험을 실시하여 냉동에 대한 내성이 온도와 저장기간에 의존하며, 배의 질에 따라 다양해진다고 보고하였다. 그리고, Gwo (1995)는 참굴의 발생단계 중 2~8세포기의 냉동보존은 성공하지 못하였으나, 상실배, 낭배 및 담륜자를 이용한 냉동보존 실험에서는 담륜자가 상실배, 낭배보다 동해방지제의 노출에 더 냉동내성이 강한 것으로 보고하였다. 또한 발생단계, 동해방지제의 농도와 종류, 평형시간, 냉동률이 성공적인 냉동보존을 위해 중요한 요인이라고 강조하였다. 또한, Chao et al. (1994)은 적어도 4시간 이상의 후기 발생배와 초기 유생이 높은 독성에 대해 내성을 가지는 이상적인 단계라고 보고하였다. 그 후 Chao et al. (1997)은 참굴과 백합, *Meretrix lusoria*의 냉동보존에서도 후기 발생배와 초기

유생을 이용하여 냉동보존하였다. 이 연구에서 Chao 연구진은 냉동보존시 다른 어떤 요소들 보다 양질의 발생배를 사용하는 것이 생존율을 높이는 데 기여한다고 하였다. Liu and Robinson (1997)은 성공적인 냉동보존을 위한 주요 요인을 발생배에 동해방지제가 미치는 독성으로 인한 충격의 완화라 하였으며, 담륜자기가 2~4세포기보다 냉동보존시 독성에 대한 내성이 강하다고 하였다.

포유류의 경우, Polge and Willadsen (1978)은 돼지의 발생배 중 후기단계가 냉동에 따른 내성이 증가하며, 초기단계(2~16세포기) 발생배는 냉동에 매우 민감하다고 하였다. 또한 대부분의 다른 가축에서도 이와 비슷한 결과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 반면에 Massip et al. (1984)은 쥐의 발생배를 이용한 냉동보존에서 급속 냉동·해동후 초기 발생배가 후기 발생배 보다 더 나은 생존율을 보였다고 보고하였다.

앞서 연구결과와 같이 후기 발생배와 유생은 초기 발생배에 비해 더 나은 냉동보존의 가능성을 제시하고 있으나, 유생을 이용한 냉동보존에서는 그 기법이 아직 미흡하여 유생의 발생단계별 적정 냉동요인들과 냉동내성 정도를 파악하기란 쉽지 않은 것이 현실이다.

본 연구에서는 북방대합 후기 발생배인 담륜자와 유생을 이용하여 냉동실험을 실시한 결과, 발생단계에 따라 생존율에 유의한 차이가 나타났으며, 발생이 진행될수록 생존율이 낮아지는 경향을 보였다. 이는 변태과정에 있는 유생이 점차 세포수가 증가하고 외골격의 형성이 진행됨으로써, 개체 내 외부의 냉동속도가 다른 데에 기인한 것으로 추정되는 바, 냉동보존시 고려해야 하는 요인들 중 이 부분에 관한 보다 세밀한 연구가 필요할 것으로 보인다. 특히, 생존율에 큰 영향을 미친다고 보고하고 있는 발생배의 질, 발생단계와 냉동률과의 관계, 동해방지제의 투과성 여부와 관련한 평형시간 등 복합요인의 작용에 대한 보다 세밀한 검토도 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

- Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB (1998) Effect of different concentrations 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, Nami K, Gomi F, Nakazawa T (1987) Cryoprotection of medaka embryos during development *Zool Sci* 4: 813-818.
- Arii K, Suzuki T, Takai R, Kozima T (1992) Tolerance of fish eggs to dimethyl sulfoxide as the cryoprotectant *J Tokyo Univ Fish* 79: 121-126.
- Asahina E, Takahashi T (1978) Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin *Cryobiology* 15: 122-127.
- Chao NH, Chiang CP, Hsu HW, Tsai CT, Lin TT (1994) Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants *Aquat Living Res* 7: 99-104.
- Chao NH, Lin TT, Chen YJ, Hsu HW, Liao IC (1997) Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam *Aquaculture* 155: 31-44.
- Gwo JC (1995) Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos *Theriogenology* 43: 1163-1174.
- Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE (1997) New approaches for studying the permeability of fish embryos; Toward successful cryopreservation *Cryobiology* 34: 335-347.
- Liu X, AM Robinson (1997) Impact of cryoprotectants dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, glycerol, sucrose and polyvinylpyrrolidone on oyster (*Crassostrea gigas*) embryos before freezing *J Shell Res* 16: 310.
- Massip A, Van P, Zwalmen Der, Leroy F (1984) Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly *Cryobiology* 21: 574-577.
- Polge C, Willadsen SM (1978) Freezing eggs and embryos of farm animals *Cryobiology* 15: 370-373.
- Stoss J, Hoar WS, Randall DJ (1983) In "Fish Physiology" Academic Press New York 9B: pp. 305-350.
- Toledo JD, Kurokura H, Kasahara S (1989) Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1661p.
- Renard P (1991) Cooling and freezing tolerance in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : methanol and sucrose effects *Aquaculture* 92: 43~57.
- Zhang T, Rawson DM, Morris GJ (1993) Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) *Aquat Living Resour Vivanties Aquat* 6: 145-153.