

## 광염성 송사리 *Oryzias dancena* 성체 및 자어의 염분도 변화에 대한 내성

조영선 · 이상윤<sup>1</sup> · 김동수<sup>1</sup> · 남윤권<sup>1,\*</sup>

부경대학교 해양수산형질전환생물연구소, <sup>1</sup>부경대학교 해양바이오신소재학과

**Tolerance Capacity to Salinity Changes in Adult and Larva of *Oryzias dancena*, a Euryhaline Medaka by Young Sun Cho, Sang Yoon Lee<sup>1</sup>, Dong Soo Kim<sup>1</sup> and Yoon Kwon Nam<sup>1,\*</sup>** (Institute of Marine Living Modified Organisms (IMLMO); <sup>1</sup>Department of Marine Bio-Materials & Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea)

**ABSTRACT** Osmoregulatory capabilities of a euryhaline medaka, *Oryzias dancena* (Beloniformes; Teleostei), was examined with a particular emphasis on adult and larval viability during direct salinity changes. *O. dancena* adults were highly capable for hyper-osmoregulation as well as hypo-osmoregulation, as evidenced by no adverse effect on their viability during the direct transfer either from complete freshwater (0‰) to 40‰ salinity, or from 70‰ to 0‰. Furthermore, the phased increase of external salinity with acclimation periods allowed them to survive at a salinity as high as 75‰. However, tolerant capability to acute salinity increase in early larval stage was much less than in adult stage, based on the finding that the tolerance range of salinity increase was only 15‰ from freshwater, indicating that the hyper-osmoregulation system might not be fully developed in the early larval stage. On the contrary, the hypoosmoregulation system could be more solidified in *O. dancena* larvae, as evidenced by their good survival even after direct transfer from 45‰ to 0‰. Knowledge achieved in this study could form the basis for a wide scope of researches including ecotoxicogenomics and geneexpression assay using this model species.

**Key words** : Salinity tolerance, viability, osmoregulation, marine medaka, *Oryzias dancena*

### 서 론

광염성(euryhaline) 어류들은 다양한 외부 염분도 환경에 적응할 수 있는 능력으로 인해 어류의 삼투압 조절 및 이온 항상성(ion homeostasis) 유지에 관한 유용한 실험동물로 여겨지고 있다(Kato *et al.*, 2005; Kültz *et al.*, 2007). 이중 일본산 송사리(Japanese medaka, *Oryzias latipes*)로 대표되는 *Oryzias* 속에 속하는 송사리과 어류들은 투명한 난 발생, 작은 성체 크기, 실험실 사육의 용이함 그리고 연중 다산란(year-round multiple spawning) 특징과 같은 장점들에 힘입어 척추동물의 발생 및 유전체 연구 등에 매우 유용한 실험 모델 동물로

활용되고 있다(Wittbrodt *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2008). 또한 송사리 어종들은 같은 속(genus)에 속하는 근연 종들임에도 불구하고 어종간 서로 크게 다른 삼투압 조절 능력 및 염분도 내성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있어, 경골 어류의 해수 적응에 관한 중요한 실험 재료로도 인정받고 있다(Inoue and Takei, 2003). 뿐만 아니라 이들 광염성 송사리 종들은 해양생태계 독성 및 위해성 평가 연구를 위해 해수 조건에서 발생 및 생식 등의 장애가 있는 담수산 *O. latipes*의 대체 또는 보완 모델로서도 주목 받고 있다(Sakamoto *et al.*, 2001; Inoue and Takei, 2002; 송 등, 2009a).

이중 *O. dancena*는 담수부터 해수조건까지 정상적인 생존이 가능한 광염성의 송사리 종으로서 일부 선행 연구들을 통해 담수에서 해수까지 급격한 외부 염분도의 변화에 큰 장애 없이 생존과 생식이 가능한 삼투압 조절 능력을 갖고

\*교신저자: 남윤권 Tel: 82-51-629-5918, Fax: 82-51-629-5908,  
E-mail: yoonknam@pknu.ac.kr

있으며 (hypo- 및 hyper-osmoregulation) (Inoue and Takei, 2002, 2003), 최근의 연구결과를 통해 이들 송사리 종들간의 삼투압 조절 능력은 다른 광염성 어류들에서와 마찬가지로 아가미의  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase의 차등 발현과 관련이 있음이 보고된 바 있다 (Lin *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008). 그러나 그간의 *O. dancena*의 해수 적응 능력에 관한 중요한 관찰에도 불구하고 아직 이들의 급격한 염분도 변화에 대한 적응 능력의 최대치 등에 관한 연구는 거의 수행되지 못하였으며, 대부분의 선행연구들은 *O. dancena* 성체가 담수 및 일반 해수 염분도 모두에서 생존을 할 수 있으며 담수, 기수 및 일반 해수 염분도 사이에서 염분도의 급격한 변화에 큰 생존 장애가 없다는 점 그리고 이들 염분도 농도에서 생식과 발생이 가능하다는 점에 주된 연구 결과들만을 보고하고 있다. 따라서 경골어류의 삼투압 조절 모델로서 그 중요성에도 불구하고 아직 본 종을 대상으로 적응 가능한 염분도의 최고 점 및 급격한 염분도 최대 변화 폭에 대한 조사는 이루어진 바 없다. 뿐만 아니라 대부분 선행 연구들은 염분도 적응 능력을 평가하기 위해서 성체를 이용하였기 때문에 이러한 염분도 적응 능력이 부화 자·치어 초기 발달상태에서부터 획득되는지의 여부 역시 아직 불투명한 상태이다.

따라서 본 연구는 *O. dancena*를 경골어류의 염분도 적응 기작 연구뿐만 아니라, 아울러 본 광염성 어종을 다양한 염분도 조건에서 ecotoxicogenomic 연구에 활용할 수 있는 실험실 모델로 개발하기 위한 연구의 일환으로 수행되었으며, 이를 위해 광범위 염분도 변화 조건에서의 본 종의 생존 능력, 최대 순치 가능 염분도 및 부화 자·치어 시기에서의 염분도 변화에 대한 적응 능력을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

실험에 이용한 *O. dancena*는 부경대학교 해양수산형질전환생물연구소 (Institute of Marine Living Modified Organisms)에서 사육하고 있는 계통들로서 특정 염분도 노출 처리를 제외한 실험어의 일반적인 유지는 송 등 (2009)의 방법에 따라 실시하였다. 실험 이전의 일반적인 어류 사육은 5 $\mu\text{m}$  필터를 이용하여 여과한 10‰ 기수를 이용하였고, 알테미아 유생 (*Artemia nauplii*)과 넙치 치어용 상품 사료 (150~500 $\mu\text{m}$  크기; 우성사료, 대한민국)를 공급하였다. 사육 온도는 25 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고, 광주기는 명암 14L:10D 조건을 설정하여 관리하였다. 사육 수조는 순환 여과식 여과기를 장착한 유리 또는 플라스틱 재질의 수조를 이용하였고, 일일 환수는 20~40% 범위에서 실시하였다.

### 2. 염분도 증가에 대한 성체의 생존 능력

어체중 (body weight) 평균 0.35 $\pm$ 0.11 g의 암컷 성체 50 개체와 평균 0.46 $\pm$ 0.13 g의 수컷 50 개체를 2주일간 100L 용량의 수조를 이용하여 담수에 순치시켰고, 순치된 개체들로부터 암수 각각 48 개체씩을 재선발하여 증류수 (0‰)에서 1일간 추가로 순치시켰으며, 이때 온도와 용존 산소는 25 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$  및 5 $\pm$ 1 ppm을 유지하였다. 염분도 0‰에 순치된 개체들을 대상으로 급격한 염분도 증가에 따른 생존 특징을 조사하기 위해서 암수 각 12 개체씩을 무작위로 선별하여 서로 다른 염분도의 사육수가 준비된 20L의 수조로 이동시켰다. 이때 염분도는 상품 인공 해수염 (synthetic sea salt; Kent Marine, Georgia, USA)을 이용하여 제조사의 권고 방법대로 제조하였고, 실험 설계에 의해 최종 염분도 10, 20, 30, 40, 50 및 60‰은 염분도 측정기 (Atago, Japan)를 이용하여 확인하였다. 이때 처리 대조군으로서 동일 염분도로의 이동 (즉, 0‰에서 0‰로의 이동) 군을 설정하였으며, 각 실험군 별로 2반복 관찰 수조를 설정하여 염분도 처리 후 48시간 동안 생존 유무를 관찰하였다.

### 3. 성체의 최대 순치 가능 염분도 조사

예비 실험을 통해 10‰ 유지군으로부터 무작위로 선별한 암수 개체들을 일반 해수 염분도와 유사한 30‰로 이동시켜 2주간의 순치를 실시하였다. 순치된 개체들로부터 상기와 동일한 어체 크기의 암수 각각 12 개체씩을 선별하여 20L 수조에 수용하였으며, 매주 5‰씩 사육수의 염분도를 증가시켰다. 염분도 증가는 앞서 수행된 방법과 같이 인공 해수염을 이용하였고 각 염분도 증가 시마다 1주일 간의 순치 기간을 설정하였다. 전 실험 구간 동안 상기와 동일한 온도와 용존 산소 조건을 유지하였으며 사료는 앞서 언급한 바와 같이 상품 넙치 치어 사료를 공급하였다. 염분도 증가 후 순치기간 동안 20% 이상의 누적 폐사가 관찰되는 시점을 본 연구의 최대 순치 가능 염분도로 판단하였다. 실험은 3반복 그룹을 설정하여 실시하였다.

### 4. 염분도 감소에 대한 성체의 생존 능력

급격한 염분도 감소에 대한 적응 능력, 즉 hypo-osmoregulation 능력을 평가하기 위해서 일반 해수 이상의 염분도 조건에 순치된 성체들을 대상으로 급격한 염분도 감소 처리를 실시하였다. 첫째, 앞서 급격한 염분도 증가 실험 결과를 바탕으로 *O. dancena* 성체들 (암컷 0.38 $\pm$ 0.09 및 수컷 0.45 $\pm$ 0.12 g, 각 50 개체)을 인공 해수염을 이용하여 순차적인 염분도 증가를 통해 50‰까지 순치시켰다. 염분도 그룹별 2반복 실험 수조 (10L)를 이용하여 순치 2주 후에 염분도의 급격한 감소 처리를 위해서 암수 각 10 개체를 준비된 염분도

0, 10, 20, 30 및 40‰로 이동시켰다. 이동 후 24시간 동안 생존 유무를 관찰하여 생존 가능한 최대 염분도 감소 폭을 조사하였다. 둘째, 앞서 순치 가능 최고 염분도 조사 실험의 결과를 토대로 염분도 감소 폭을 보다 증가시켜 실험을 실시하였다. 생존 가능 최고 염분도에 근접한 농도인 70‰을 최고 농도로 설정하여 2주간 순치를 시켰으며, 이후 준비된 0 및 10‰의 2반복 수조(10L)로 실험어를 옮겨 생존 유무를 24시간 동안 관찰하였다.

#### 5. 염분도 증가에 대한 부화 자어의 생존 능력

성체에서 관찰되는 염분도 급변화에 대한 적응 능력이 자어 시기에서도 획득되어 있는지를 평가하기 위하여 부화 자어를 대상으로 염분도 증가 및 감소 시 생존율을 조사하였다. 첫째, 증류수에서 동일한 시기에 부화한 자어들을 서로 다른 염분도에 직접 노출시켜 염분도의 증가에 대한 생존율을 평가하였다. 산란 및 부화는 송 등(2009b)의 방법에 따라  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 증류수를 이용하여 수행하였고, 부화 자어 각 12 개체씩을 무작위로 선발하여 15, 30, 45 및 60‰에 노출시키고 48시간 동안 생존 개체 수를 측정하였다. 이때 앞서 수행된 실험과 마찬가지로 증류수와 인공 해수염을 이용하여 각 염분도의 자어 수용을 위한 용기를 마련하였고, 이때 용기는 1L 투명 플라스틱 재질을 사용하였다. 각 처리구 당 2반복 그룹을 설정하여 조사하였으며, 또한 자어의 이동 시 발생하는 스트레스로 인한 폐사 가능성에 대한 보정을 위해 처리 대조군(handling control, 즉 0‰에서 0‰로의 이동) 역시 설정하여 생존율을 측정하였다.

둘째, 염분도 증가에 대한 자어의 생존 특징에 서로 다른 염분도의 출발점이 영향을 미치지 유무를 확인하기 위해서 서로 다른 염분도에서 부화한 자어들을 이용하여, 염분도의 증가 처리를 실시하였다. 염분도 10‰에서 수정된 수정란들을 수거하여 0, 15, 30 및 45‰의 부화조로 옮겨 부화를 유도하였으며, 역시 동일 일자에 부화한 자어들을 대상으로 염분도 증가 처리를 실시하였다. 증류수(0‰)에서 부화한 자어의 경우, 15, 30, 45 및 60‰로 염분도 증가 처리를 수행하였고, 15‰에서 부화한 자어들은 30, 45 및 60‰로, 30‰에서 부화한 자어는 45 및 60‰로, 그리고 45‰에서 부화한 자어는 60‰로 염분도 증가 처리를 실시하였다. 앞서와 마찬가지로 각 출발 염분도(부화 염분도)별로 동일 염분도로의 이동 그룹(handling control)을 설정하였으며, 각 염분도 처리 그룹별 2반복 실험을 실시하였고 염분도 증가 처리 후 부화 후 7일째까지 누적 생존율을 평가하였다. 모든 실험 기간 중 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며, 부화 7일째까지 자·치어의 사육은 넉치 상품사료와 알테미아 유생을 공급하였고, 매일 각 염분도로 조정된 20%의 수량을 환수하였다.

#### 6. 염분도 감소에 대한 부화 자어의 생존 능력

자어의 염분도 감소에 대한 생존 능력을 조사하기 위해서 고염분 조건에서 부화한 자어들을 대상으로 급격한 염분도 감소 처리를 실시한 후 생존율을 조사하였다. 앞서 수행한 실험과 같이 15, 30 및 45‰에서 부화를 유도하였고, 이때 60‰의 경우 부화 지연 및 낮은 부화율로 인해 실험 그룹의 설정에서 제외하였다. 동일 시기에 부화한 자어를 이용하여 15‰에서 부화한 자어들의 경우 증류수(0‰)로, 30 및 45‰에서 부화한 자어들의 경우 각각 0 및 15‰, 그리고 0, 15, 30‰로 이동 시킨 후 역시 7일간의 누적 생존율을 평가하였다. 앞서와 마찬가지로 동일 농도로 이동시키는 대조군(handling control)을 설정하였으며, 역시 각 처리군 별로 2반복 실험을 실시하였다. 그 외 수조 용기, 온도 및 자·치어의 사육은 앞서 염분도 증가 실험과 동일한 조건을 실시하였다.

#### 7. 통계 처리

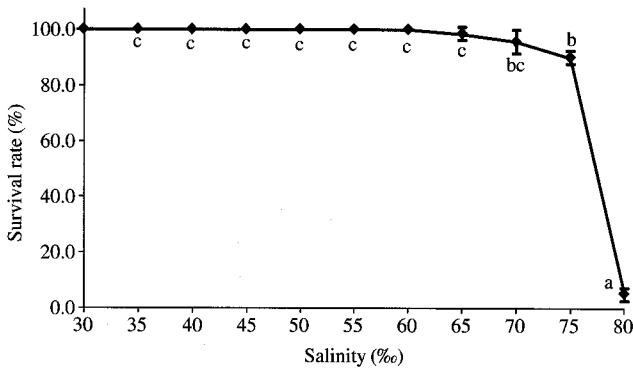
염분도 변화에 대한 성체 및 자어의 생존율에 대한 평균들간 유의차를 검정하기 위해 SPSS 통계처리 프로그램(ver. 10.1.3)을 이용하여 분산분석(ANOVA 및 Duncan's multiple range test) 또는 Student's t-test를 실시하였고,  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 평가하였다.

## 결 과

#### 1. 성체의 염분도 증가 내성 및 생존 가능 최대 염분도

증류수에 순치된 *O. dancena* 성체를 0, 10, 20, 30, 40, 50 및 60‰의 염분도 조건에 직접 노출시켰을 때 40‰ 범위까지는 본 어종의 생존율에 전혀 영향을 미치지 않았으며 염분도 증가 처리 이후 각 반복군에서 정상적인 사료 섭취 행동이 관찰되었다. 그러나 50 및 60‰로 이동 시킨 노출 처리 그룹에서는 어체의 지느러미 끝이 괴사하고, 호흡 횟수가 급격히 증가하며, 비정상적인 유행을 보이는 등 심각한 스트레스 반응이 관찰되었으며 두 그룹 모두에서 노출 30분 이내 50% 이상의 개체가 폐사하였고 4시간 이내 모든 개체가 폐사하였다. 폐사의 양상에 있어 암수간의 눈에 띄는 차이는 관찰되지 않았다.

상기와 같이 급격한 염분도 증가에 대하여 *O. dancena*가 생존 가능한 염분도는 약 40‰로서 일반 해수 염분도보다 크게 높지 않지만 순차적인 염분도 증가를 거칠 경우 그 순치 가능 염분도 폭은 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). *O. dancena* 성체가 적응 가능한 최고 염분도 농도를 확인하기 위해서 단계적인 염분도 증가를 수행한 결과, 증류수(0‰)에서 60‰까지 순차적인 염분도 증가를 통할 경우 모



**Fig. 1.** Survival rate (%) of *O. dancena* adults with phased increase of external salinity up to 80‰. Adults were pre-acclimated at 30‰ and then the salinity was increased as 5‰ per week. Mean±SDs were based on the triplicate observations and means with different letters were statistically significant at  $P < 0.05$  based on ANOVA.

든 반복 처리 그룹(3반복)에서 100% 생존율을 나타내었다. 이후 60‰에서 65‰로의 증가 직후 1 개체, 그리고 65‰에서 70‰로의 증가처리에서 2 개체의 폐사가 관찰되었다. 반면 70‰에서 75‰로의 염분도 증가의 경우 각 반복 처리에서 각 1 또는 2 개체의 폐사가 일어났다. 본 실험에서 관찰된 폐사는 모두 염분도 증가 직후 6시간 이내 관찰된 것이며, 이후 각 염분도 조건에서의 순치 기간(7일)에는 정상적인 사료 섭취와 유영 등을 나타내었다. 이들 폐사 개체들의 경우 암수에 따른 특이적인 차이는 관찰되지 않았다. 반면 동일한 방법으로 75‰에서 80‰로의 염분도를 증가시켰을 때에는 앞서 실험에서 언급한 바와 같이 꼬리지느러미의 괴사, 호흡곤란 및 유영 장애 등의 심각한 스트레스 반응이 관찰되었고 90% 이상의 개체들이 48시간 내 폐사하였으며, 48시간 이후 일부 개체들이 생존하였다. 그러나 정상적인 먹이 섭취 행동을 보이지 않아, 결국 처리 후 7일째까지 대부분의 개체들이 폐사하였다.

### 2. 성체의 염분도 감소에 대한 내성

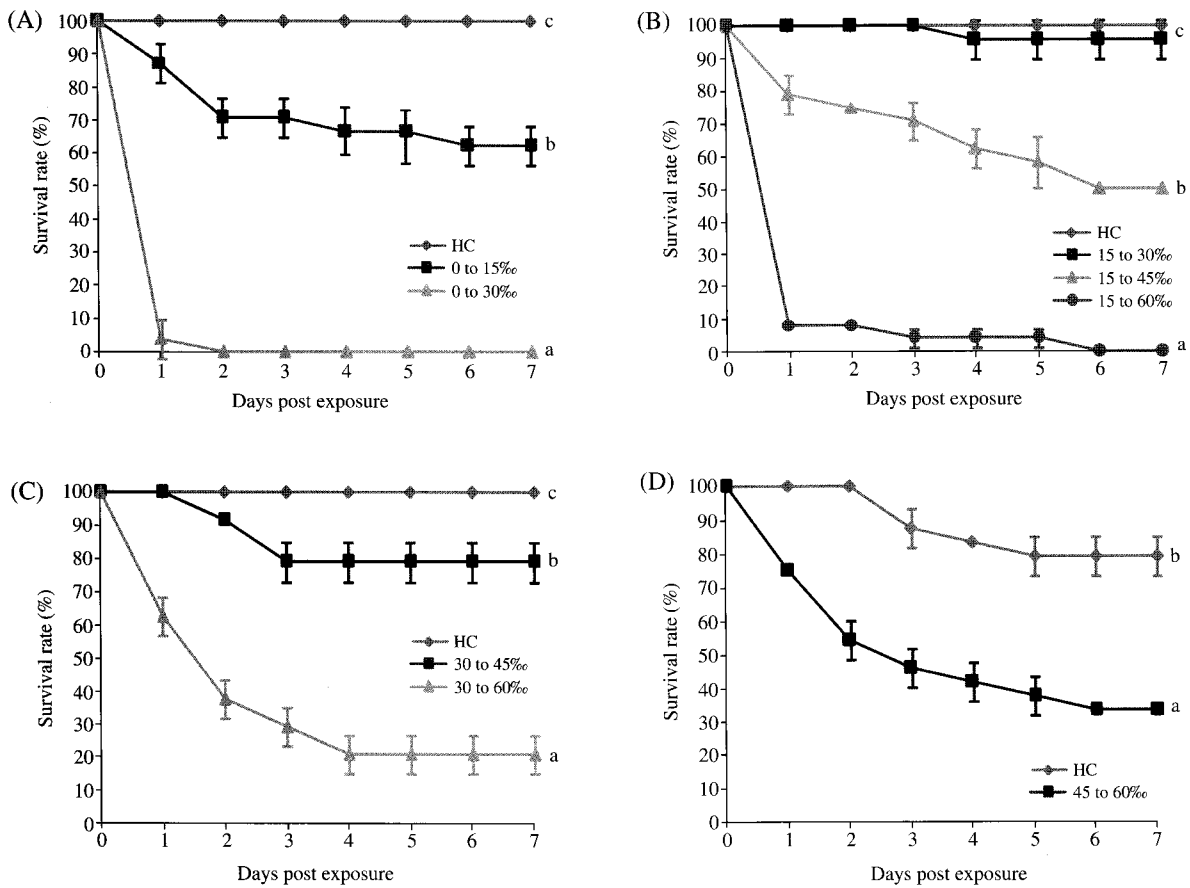
*O. dancena*는 급격한 염분도의 변화에 대하여 염분도의 증가보다는 염분도의 감소에 보다 내성을 갖는 것으로 나타났다. 앞서 염분도의 급격한 증가 시 *O. dancena* 성체는 증류수에서 50% 이상으로의 염분도 증가 그룹에서는 대부분 폐사하는 것으로 나타났지만, 반대로 50‰에 순치된 *O. dancena*를 증류수로 직접 이동시킨 그룹에서는 폐사 개체들이 관찰되지 않았다. 증류수로의 노출 직후 약 10분 가량 동안 약간의 스트레스 반응(유영속도 저하, 사료 섭취 거부 등)이 육안으로 관찰되었을 뿐 폐사 또는 심각한 생리 장애 등은 전혀 관찰되지 않았고, 이후 곧 안정되는 경향을 나타내어 먹이 섭취 및 활발한 유영 능력을 회복하는 것으로 나타났다. 나머지 10, 20, 30 및 40‰로의 이동 그룹에서는 이동 직

후에도 정상적인 먹이 섭취 등 외견상 스트레스 반응을 관찰할 수 없었다. 염분도 감소 폭을 보다 증가시킨 두 번째 처리 실험에서 (70‰ 순치 그룹에서 0 또는 10‰ 염분도로의 이동)도 역시 유사한 경향을 나타내어 저염분 농도로의 이동한 모든 개체들은 큰 폭의 변화에도 5~10분 가량의 외견상 스트레스 반응이 관찰되었을 뿐 이후 빠르게 안정되어 정상적인 유영과 먹이 섭취가 가능한 것으로 관찰되었다.

### 3. 자어의 염분도 증가에 대한 생존

부화 자어의 염분도 증가에 따른 생존능력에 관한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 자어를 대상으로 한 1차 염분도 증가 실험에서 동일 염분도로의 이동(handling control)에서는 48시간 동안 전혀 폐사 개체가 관찰되지 않아 물리적인 스트레스에 의한 자어의 폐사 효과는 없는 것으로 나타났다. 반면 증류수에서 발생 및 부화한 *O. dancena* 자어의 경우 45 및 60‰로 직접 노출시켰을 때 모든 반복 그룹에서 전 개체가 2시간 이내 폐사하였다. 또한 30‰로 노출 시킨 그룹에서 역시 24시간 이내 전체 노출 자어의 4%만이 생존하였고, 이 역시 48시간 이내 적응하지 못하고 폐사하였다. 증류수 부화 그룹을 15‰로 노출시켰을 때 24시간째 88% 개체가 생존하였으며 노출 기간이 지속되면서 추가적인 폐사가 관찰되어 노출 4일째에는 67%, 그리고 노출 7일째에는 63%의 생존율을 나타내었다.

본 실험 결과를 바탕으로 동일 염분도 변화 폭에 대한 최초 염분도의 효과를 평가하기 위한 제2차 염분도 증가 실험에서는 증류수를 최초 염분도로 설정한 실험과 자어의 생존율에 있어 유의적인 차이가 관찰되었다. 앞서 제1차 실험에서와 같이 증류수에서 부화한 그룹을 30, 45 및 60‰로 옮겼을 때 모든 개체가 적응하지 못하는 것으로 나타나 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 15‰에서 발생 및 부화한 자어를 30‰로 노출시켰을 때(변화 폭 15‰) 관찰한 기간 동안 폐사가 거의 일어나지 않고 부화 후 7일째 96%의 생존율을 보였다. 동일한 15‰ 부화 자어 그룹을 45‰ 조건에 노출하였을 때(변화 폭 30‰), 노출 1일째 79%의 생존율을, 그리고 마지막 7일째 50%의 생존율을 나타내었다. 한편 최고 염분도인 60‰ 조건으로 노출한 처리 그룹에서는 처리 5일째까지 약 4%의 낮은 생존율을 나타내었고 당시 생존한 모든 개체들 역시 이후 모두 폐사하였다. 최초 염분도 조건을 30‰로 설정한 그룹의 부화 자어를 45‰(변화 폭 15‰)로 노출하였을 때 100%(처리 1일째)에서 최종 79%까지의 생존율을 나타내었고, 60‰로 노출하였을 때는 처리 1일째 63%의 생존율을 보였으나 점차 생존율이 감소하여 부화 7일째에는 21%의 개체들이 생존하였다. 마지막으로 45‰에서 부화한 자어를 60‰로 처리한 결과 처리 1일째 75%의 개체들이 생존하였으나 점차 감소하여 부화 7일째 34%의 개체들



**Fig. 2.** Percent cumulative survival of *O. dancena* larvae after abrupt exposure to higher salinities. Just hatched larvae developed from 0 (A), 15 (B), 30 (C) or 45‰ (D) were directly transferred to 15, 30, 45 or 60‰, and their viabilities were examined for 7 days based on two replicate treatments. Data for groups transferred from 0 to 45‰ and 0 to 60‰ were not provided in (A) because all the larvae were dead within 1 day post exposure. HC indicates the handling control in which the larvae were transferred to the same salinity level. Statistical evaluation was shown only for means at 7 days after exposure based on ANOVA or student's t-test ( $P < 0.05$  for different letters).

이 생존하였다. 부화 7일째까지 고 염분도 조건하에서 상대적으로 낮은 생존율이 관찰되었으나 이후 생존한 개체들은 더 이상의 유의적인 폐사에 의한 감소 없이 안정적인 생존율을 유지하였다.

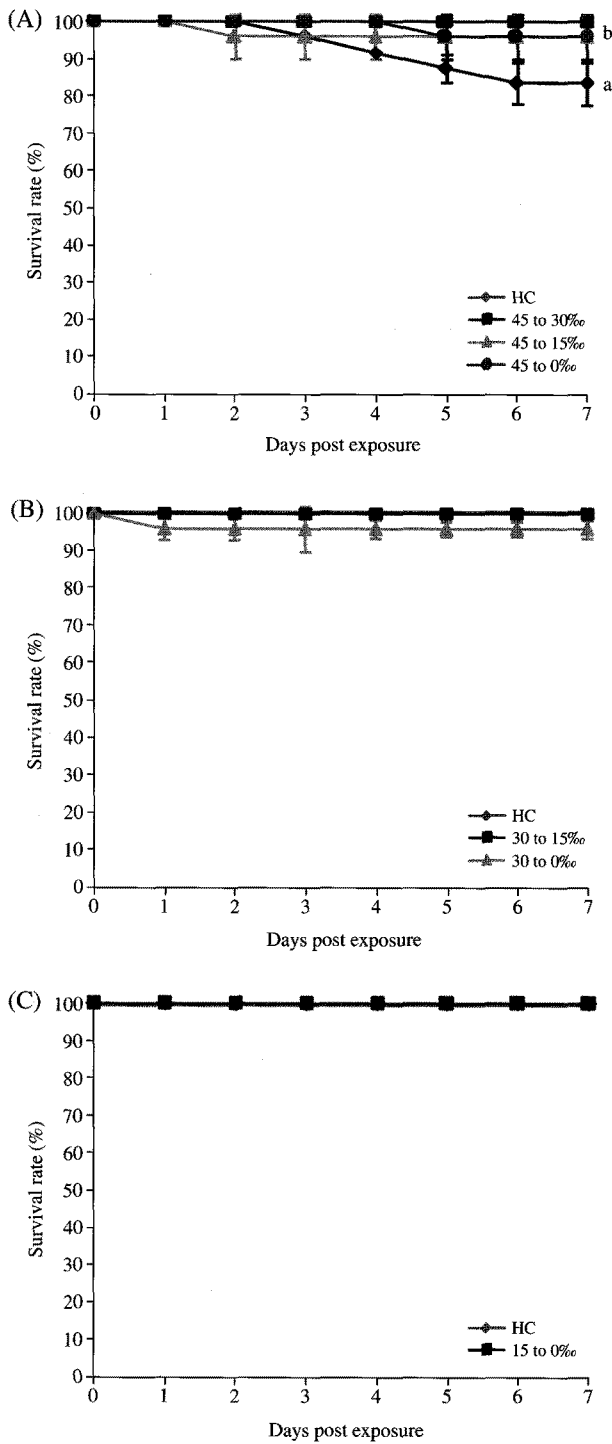
4. 자어의 급격한 염분도 감소에 대한 생존

*O. dancena* 자어는 성체와 마찬가지로 급격한 염분도 증가에 비해 염분도 감소에 대해서 보다 우수한 생존율을 나타내었다 (Fig. 3). 고 염분도 조건(45‰)에서 발생 및 부화시킨 자어를 30, 15 및 0‰의 염분도에 직접 노출시킨 결과 Fig. 3에서 보듯이 모든 그룹에서 처리 1일째에는 전 개체들이 생존하였고 처리기간이 지속되더라도 더 이상의 유의적인 폐사는 관찰되지 않았으며 최종 처리 7일째에서 각 그룹에서 평균 95% 이상의 생존율을 나타내었다. 최초 염분도 농도를 30‰로 설정 후 급격한 염분도 처리를 수행한 그룹들에서도 역시 유사한 결과를 나타내어 15 및 0‰로의 노출 처

리에서 두 처리 그룹 모두에서 7일째에 95% 이상의 생존율을 나타내었다. 또한 15‰에서 부화한 자어를 증류수(0‰)로 노출시킨 그룹에서는 전 실험 기간 동안 모든 반복 처리 그룹에서 단 1마리의 폐사 개체 없이 100% 생존율을 나타내었다.

고찰

본 연구결과를 통해 *O. dancena*는 앞서의 보고들(Inoue and Takei, 2002, 2003)에서와 마찬가지로 담수 및 해수 조건 모두에서 전혀 생존에 관한 장애가 없는 것으로 나타났음은 물론, 나아가 담수로부터 일반 해수의 염분도 조건(30~35‰) 이상의 염분도로 직접 이동 시에도 생존이 가능한 것으로 나타났으며 본 실험에서 생존 장애가 발생하지 않는 급격한 최대 염분도 증가 폭은 40~50‰ 범위로 판단된다. 또한 급격한 염분도의 증가가 아니라 순차적이고 단계적인 염



**Fig. 3.** Percent cumulative survival of *O. dancena* larvae after abrupt exposure to lower salinities. Just hatched larvae developed from 45 (A), 30 (B) or 15‰ (C) were directly transferred to 30, 15 or 0‰, and their viabilities were examined for 7 days based on two replicate treatments. HC indicates the handling control in which the larvae were transferred to the same salinity level. Statistical evaluation was shown only for means at 7 days after exposure based on ANOVA ( $P < 0.05$ ) for different letters in (A). The groups in (B) and (C) showed no statistically significant difference among or between groups ( $P > 0.05$ ) based on ANOVA or student's t-test.

분도 증가를 유도할 경우 본 어종은 일반 해수 염분도의 2 배 이상에서도(본 연구의 경우 75‰) 생존 및 순치가 가능한 것으로 나타났다. 현재까지 *O. dancena* 및 여타 송사리 종들을 이용한 종래의 모든 염분도 순치 실험은 최대 염분도 조건을 일반 해수 조건(약 35‰)으로 설정하여 수행되었기 때문에(Inoue and Takei, 2002, 2003; Kang et al., 2008) 염분도 증가 시 삼투압 조절 능력(hyper-osmoregulation)에 관한 이전의 결과와 본 연구의 결과치를 직접적으로 비교하기는 어렵다. 하지만 본 연구를 통해 *O. dancena*의 삼투압 조절 능력이 종래 *Oryzias* 속 송사리 어류들에서는 거의 보고된 바 없음을 고려할 때 앞으로 *Oryzias* 속 송사리 종들의 염분도 적응 능력에 대한 새로운 조사가 필요할 수 있음을 시사하고 있다. 특히 *O. dancena*와 마찬가지로 해수에서 정상적인 성장과 생식 능력을 보인다고 알려져 있는 여타 다른 송사리 종들(예를 들어 *O. javanicus* 등)에 대한 순치 가능 염분도 측정 및 삼투압 조절 능력에 대한 재평가 등이 이루어질 필요가 있다고 판단된다(see Inoue and Takei, 2002). 본 연구에서 *O. dancena*는 염분도 증가시의 삼투압 조절 능력(hyper-osmoregulation)과 염분도 감소시의 삼투압 조절 능력(hypo-osmoregulation)에 차이를 나타냄으로써, 생존 가능한 급격한 염분도 증가 폭은 50‰을 넘지 못하였지만, 염분도 감소의 경우 훨씬 더 넓은 폭(70‰)에서도 성체의 경우 생존에 전혀 장애가 없는 것으로 나타났다. 아직 본 어종에서 hypo-osmoregulation 및 hyper-osmoregulation의 차이가 유발되는 원인은 규명되어 있지 못한 상태로서 앞으로 삼투압 조절에 관련하는 유전자 및 단백질의 발굴, 조직 발현 및 염분도 조건별 차등 발현(differential expression)에 관한 유전체 정보들이 수집되어야 할 것이다(Fiol and Kültz, 2007; Takei, 2008). 최근 광염성 goby 종(*Gillichthys mirabilis*)을 이용하여 microarray 분석법을 바탕으로 염분도 변화 자극에 대한 차등 발현 유전자들의 발굴 시도가 이루어진 바 있으며, insulin 관련 신호전달 체계(insulin signaling), signal transduction, mitogen activated protein kinase (MAPK) 및 세포주기(cell cycling) 등에 관여하는 여러 단백질들이 삼투압 조절에 중요한 역할을 담당할 가능성에 대하여 보고한 바 있다(Evans and Somero, 2008).

*O. dancena* 부화 자어를 대상으로 수행한 다양한 염분도 증가 및 감소 처리 결과를 평가하면 다음과 같은 뚜렷한 경향이 관찰되었다. 첫째, 부화 자어는 급격한 염분도 증가에 대하여 성체보다는 상대적으로 약한 적응 및 생존 능력을 보유하는 것으로 나타났고, 둘째, 부화 자어의 경우 염분도의 동일 증가 폭이라 할지라도 최초 염분도 조건(특히, 완전 담수에서 기수 또는 해수로의 이동 시)이 그 생존 능력에 대하여 영향을 크게 끼치는 것으로 나타났으며, 셋째, 부화 자어의 경우 일반 해수 범위를 넘어선 높은 염분도 조건에서는 소폭의 염분도 증가에도 생존율이 저하되거나 또는 염

분도 변화가 없더라도 고염분 조건 그 자체가 생존에 부정적인 영향을 끼칠 수 있음이 관찰되었다. 마지막으로 넷째, *O. dancena* 자어는 성체에서와 마찬가지로 염분도 감소에 대한 내성 폭이 훨씬 큰 것으로 관찰됨으로써, hyper-osmoregulation 능력보다는 hypo-osmoregulation 능력이 월등히 우수한 것으로 나타났다. 이상의 연구결과를 미루어볼 때 *O. dancena* 자어는 부화 후 초기 발달 단계 (early ontogenesis)에서는 아직 충분한 염분도 적응 능력, 특히 hyper-osmoregulation 능력을 획득하지 못한 것으로 판단되는데, 이러한 불완전한 수준의 삼투압 조절 능력은 추후 아가미를 비롯한 관련 조직들의 완전한 분화를 통해 추후 성체 수준에 도달할 것으로 사료되며, 삼투압 조절에 관여하는 주요 호르몬들의 체내 수준의 변화가 성장 단계에 따라 수반될 것으로 예상된다 (Takei, 2008). 때문에 *O. dancena*의 부화 자어의 자연계 내 서식지 환경은 완전한 해수 등 높은 염분도 조건보다는 비교적 담수/기수 영역에 보다 근접한 지역에 국한될 것으로 추정되며, 삼투압 조절 능력 획득이 완성되는 발달 후기에 다양한 염분도 영역으로의 이동이 가능할 것으로 예상된다 (Naruse *et al.*, 1993; Robert, 1998).

이에 본 연구를 통해 확보된 광염성 *O. dancena* 자어 및 성체의 염분도 변화 내성 및 적응에 관한 결과는 앞으로 본 종을 이용한 유전자 조작, 독성 유전체 연구 및 분자생리 연구 등을 위한 다양한 실험 설계에 유용한 기초 자료로 활용될 수 있다고 판단된다. 앞으로 광범위 염분도 조건하에서의 발생, 초기 생존율, 성장 등 기초 생물학적인 연구와 함께 염분도 변화 등이 본 광염성 송사리 종의 생리 등에 미치는 영향에 대한 유전자 발현 평가 연구 (transcription profiling 등)가 뒤따라야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 국토해양부 해양환경복원기술개발사업 (과제번호 20088033-1)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 요 약

본 연구에서는 광염성 송사리 *Oryzias dancena* 성체 및 자어의 염분도 변화에 대한 내성 및 생존 능력을 평가하고자 다양한 염분도 변화 처리를 수행하였다. 담수로부터 고 염분도 조건으로의 급격한 염분도 증가 노출 처리에 대하여 *O. dancena* 성체는 40% 염분도 변화 폭까지 생존의 장애 없이 빠르게 적응할 수 있는 것으로 관찰되었으며, 단계적인 순치를 통한 경우 최대 75%의 염분도 조건까지 생존이 가능하였다. 염분도의 감소 처리에서 *O. dancena* 성체는 60% 이상

의 급격한 감소 폭에서도 우수한 생존율을 나타내었다. 성체와 달리 *O. dancena* 자어는 급격한 염분도 증가에 대한 삼투압 조절 능력 (hyper-osmoregulation)이 유의적으로 낮아 약 15% 이상의 염분도 증가에서는 생존에 큰 장애를 겪는 것으로 나타났다. 그러나 초기 발달 단계에 있는 자어의 염분도 변화에 대한 내성은 최초 염분도 처리 농도에 따라 염분도 변화에 대한 내성 폭이 크게 영향을 받는 것으로 관찰되었다. 초기 발달 단계에서 *O. dancena* 자어는 염분도 증가보다는 염분도 감소 시 삼투압 조절 능력 (hypo-osmoregulation)이 더 높은 것으로 나타나 45%에서 완전 담수로의 염분도 변화에서도 우수한 생존 능력을 보였다.

## 인 용 문 헌

- 송하연 · 남윤권 · 방인철 · 김동수. 2009a. 해산 송사리 *Oryzias dancena*의 초기 생식소 형성 및 성분화. 한국어류학회지, 21: 141-148.
- 송하연 · 남윤권 · 방인철 · 김동수. 2009b. 바다 송사리 *Oryzias dancena*의 난발생 및 자치어의 형태 발달. 한국어류학회지, 21: 227-238.
- Evans, T.G. and G.N. Somero. 2008. A microarray-based transcriptomic time-course of hyper- and hypo-osmotic stress signaling events in the euryhaline fish *Gillichthys mirabilis*: osmosensors to effectors. J. Exp. Biol., 211: 3636-3649.
- Fiol, D.F. and D. Kültz. 2007. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. FEBS J., 274: 5790-5798.
- Inoue, K. and Y. Takei. 2002. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. Zool. Sci., 19: 727-734.
- Inoue, K. and Y. Takei. 2003. Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation. Comp. Biochem. Physiol., 136B: 635-645.
- Kang, C.K., S.C. Tsai, T.H. Lee and P.P. Hwang. 2008. Differential expression of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. Comp. Biochem. Physiol., Part 151A: 566-575.
- Kato, A., H. Doi, T. Nakada, H. Sakai and S. Hirose. 2005. *Takifugu obscurus* is a euryhaline fugu species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation. BMC Physiol., 5: 18.
- Kong, R.Y.C., J.P. Giesy, R.S.S. Wu, E.X.H. Chen, M.W.L. Chiang, P.L. Lim, B.B.H. Yuen, B.W.P. Yip, H.O.L. Mok and D.W.T. Au. 2008. Development of a marine fish model for studying *in vivo* molecular responses in ecotoxicology. Aquatic Toxicol., 86: 131-141.
- Kültz, D., D. Fiol, N. Valkova, S. Gomez-Jimenez, S.Y. Chan and J. Lee. 2007. Functional genomics and proteomics of the cellular stress response in 'non-model' organisms. J. Exp. Biol., 210: 1593-1601.

- Lin, Y.M., C.N. Chen, T. Yoshinaga, S.C. Tsai, I.D. Shen and T.H. Lee. 2006. Short-term effects of hyposmotic shock on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143A: 406-415.
- Naruse, K., A. Shima, M. Matsuda, M. Sakaizumi, T. Iwamatsu, B. Soeroto and H. Uwa. 1993. Description and phylogeny of rice fish and their relatives belonging of the suborder Adri-*anichthyoidei* in Sulawesi, Indonesia. *Fish. Biol. J. MEDAKA*, 5: 11-15.
- Roberts, T.R. 1998. Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of the genus *Oryzias* with descriptions of four new species. *Ichthyol. Res.*, 45: 213-224.
- Sakamoto, T., T. Kozaka, A. Takahashi, H. Kawauchi and M. Ando. 2001. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture*, 193: 347-354.
- Takei, Y. 2008. Exploring novel hormones essential for seawater adaptation in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 157: 3-13.
- Wittbrodt, J., A. Shima and M. Scharl. 2002. Medaka-a model organism from the far East. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 53-64.