

Serotonin 처리 농도에 따른 굴, *Crassostrea gigas*의 산란유발 효과

김기태, 박미선, 임한규¹

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹국립목포대학교 해양수산자원학과

Effects of serotonin concentration on spawning induction in Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Ki Tae Kim, Mi Seon Park and Han Kyu Lim¹

Southeast Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, 398-68, Sanyangilju-ro, Sangyang-Up Tongyeong, Gyeongnam 650-943, Korea
¹Mokpo National University, 1666 Youngsan-ro, Muan, Jeonnam, 534-729, Korea

ABSTRACT

In order to obtain a large number of fertilized eggs for seedling production, experiment was carried out examine effects of serotonin on spawning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The shorter response time to initial spawning in case of serotonin injection showed, the higher serotonin injected with 7.6-27 min. The response time to initial sperm releasing showed the same tendency with female. The highest response rates and eggs amount spawned were showed in the highest concentration. The serotonin injection had no effect on frequency of germinal vesicle breakdown (GVBD), fertilization and hatching rate.

Key Words: serotonin, spawning induction, pacific oyster, *Crassostrea gigas*

서 론

굴 (*Crassostrea gigas*)의 채묘 부진은 산란 가능한 어미 자원의 부족과 연작에 의한 양식장의 노후화 및 연안 환경오염 등에 따른 부유 유생의 생존률 저하 등 여러 가지 요인들의 상호 복합적인 작용으로 추정되고 있지만, 이에 대한 원인은 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 최근 각종 연안 개발에 따른 간척 사업과 환경 파괴로 인해 확보된 굴 채묘 해역마저도 점차 그 기능을 상실하고 있는 실정이기 때문에 자연채묘에 의한 굴 종패의 확보는 더욱 어려움이 있을 것으로 전망된다. 그러므로 우량형질의 종패를 확보하기 위해서는 체계적인 모패 관리와 이로부터 얻어지는 알과 정자의 구득을 통한 초기 난할기의 세포분열과 유생의 발생 및 사육관리 기술의 재정립이 요구된다.

또한 대량 종묘생산을 위해 일시에 많은 양의 수정란을 얻어야 균일한 크기의 종패를 얻을 수 있고 유생사육 시 식물먹이생물 관리도 단순하여 대량 생산이 쉬워진다.

이때패류에 있어 산란은 내부와 외부의 요인에 의해 조절된다. 지금까지 패류의 산란유발 자극에는 물리적 자극, 화학적 자극 및 생물적 자극 등이 보고되어 있으며, 현장에서 산란유발 시 이러한 방법들은 단독 또는 병행하여 적용되고 있다 (Loosanoff and Davis, 1963; Kikuchi and Uki, 1974; Matsutani and Nomura, 1982; Gibbons and Castagna, 1984; Lee, 2001; Chang, 2015). 그러나 물리적 자극은 서식지의 환경이나 모패의 사육조건에 따라 유발률 및 산란까지 소요되는 시간에서 큰 차이를 보여 계획적인 채란이 어려운 단점이 있다. H₂O₂나 NH₄OH 등 화학물질 침지자극은 화학물질의 독성으로 인해 수정 및 부화에 부정적인 영향을 미치는 경우가 많다 (Lee *et al.*, 1996). Serotonin을 비롯한 신경전달물질은 기존의 화학물질보다 안전하며 조개류에서 산란유발 효과가 있다고 보고 (Matsutani *et al.*, 1982; Fong *et al.*, 1996) 됨에 따라 이들 신경전달물질을 사용하여 이때패류에서 안정적인 채란 및 채정이 가능하다는 것이 여러 연구에서 보고되었다 (Gibbons and Castagna, 1984; Braley, 1985; Alcazar *et al.*, 1987; Vélez *et al.*, 1990; O'Connor and

Received: June 1, 2016; Revised: June 25, 2016; Accepted: June 30, 2016

Corresponding author : Han Kyu Lim

Tel: +82 (61) 450-2395, e-mail: limhk@mokpo.ac.kr
1225-3480/24612

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

Heasman, 1995; Velasco *et al.*, 2007). 비록 굴은 생식소 부위에서 외과적으로 적출된 알도 수정이 가능하지만 산란에 의해 방출된 알이 적출된 알과 비교하여 수정 시 정상 발생률이 높고, 난 발생 속도가 일정하여 높은 수정률과 부화율을 얻을 수 있다고 보고되었다 (Stephano and Gould, 1988). 따라서 본 연구는 굴의 인공 종패생산 시 질 좋은 수정란을 대량으로 얻기 위하여 성숙한 굴 어미를 대상으로 신경전달 물질인 serotonin의 최적 산란유발 농도를 파악하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

산란유발 실험에 사용된 굴 어미는 경상남도 남해에 위치한 국립수산물과학원 남해양식연구센터에서 수하식으로 양성중인 개체들을 채집하여 사용하였다. 굴은 실험에 사용하기 전에 패각에 붙어 있는 부착생물 및 해적생물을 제거하였고, 수온 16°C의 사육시스템에서 하루 동안 적응시켰다. 실험에 사용된 굴 어미는 모두 150개체였으며, 평균 각고 및 전중은 Table 1과 같다.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, C₁₀H₁₂N₂O; Sigma, USA) 주사에 따른 산란유발 효과를 조사하기 위하여 굴의 좌각을 제거한 다음, 성숙도 및 암·수를 구별하였고, 2 L 비커에 1개체씩 암·수를 분리 수용하였다. Serotonin은 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ 및 10⁻² M 농도로 각각 여과해수에 희석하여 0.5 ml syringe로 0.1 ml를 생식소에 주사하였다. 각 농도별로 암·수 각각 15마리씩 주사하였으며, 실험 수온은 18-20°C였다. 수정률을 파악하기 위하여 산란유발 자극에 의해 얻어진 알과 정자를 혼합하여 30분간 저온 후, 망목 140 μm, 65 μm 및 20 μm의 필터가재 3중망으로 거른 뒤, 다시 망목 30 μm 망으로 여러 번 세란하였다. 세란 한 수정란은 여과해수를 담은 100 ml 비커에 약 150 개/ml 밀도로 수용하여 수정률과 부화

율 및 발생진행률을 조사하였다. 이때 발생 수온과 염분은 각각 25°C와 33 psu로 조절하였다. 수정률은 전체 수정란 중 2-4세포기로 발생이 진행된 배의 수로 계산하였으며, 부화율은 답륜자 유생 수, 발생진행률은 D형 유생이 50% 이상 발생되었을 때 전체 수정란에 대한 답륜자 유생과 D상 유생의 수로 산정하였다. Serotonin 주사 후 농도에 따른 방란과 방정까지 소요되는 시간과 산란 반응률을 조사하였으며, 암컷의 방란 개시 후 2시간까지의 산란량 및 방출된 알의 난핵포 붕괴율 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 을 조사하였다.

모든 실험결과 값들은 평균 ± 표준 오차 (mean ± S.E.) 로 표시하였으며, 결과 값들 사이의 유의차 유무는 SAS 통계패키지 (ver. 9.1) 를 이용하여 95% 신뢰구간에서 One-way ANOVA test를 실시한 후 최소유의차 검정을 실시하였다.

결 과

Serotonin 주사 농도에 따라 방란과 방정까지 소요되는 시간을 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 방란 소요시간은 serotonin 농도 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ 및 10⁻² M 에서 7.6분부터 27분까지 소요되었다. 농도가 낮아짐에 따라 소요시간은 유의하게 길어졌다 (P < 0.05). 방정시간 역시 방란시간과 비슷한 경향을 보였으며, 농도가 낮아짐에 따라 소요시간은 길어졌다. 10⁻² M 의 serotonin을 사용하였을 때, 방란과 방정 소요시간이 각각 7.6 ± 1.0분, 3.4 ± 0.4분으로 가장 빨랐으며, 방란에 소요되는 시간보다 방정에 소요되는 시간이 짧았다.

Serotonin 농도에 따른 반응률은 Table 2와 같다. 10⁻⁵ M 의 경우 암·수의 반응률은 각각 60.0%, 66.7%였으며, 10⁻⁴ M 은 각각 66.7%, 86.7%였고, 10⁻³ M 은 각각 80%, 100%였다. 10⁻² M 에서는 각각 86.7%, 100%로 나타나 농도가 높을수록 반응을 또한 높아졌다. Serotonin 주사 농도에 따른 산란량을 조사한 결과, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ 및 10⁻² M 에서 한 개

Table 1. Number and size of Pacific oyster *Crassostrea gigas* used for the experiment

Stimulus	Dose (M)	Number	Sex	Shell height (mm)	Total weight (g)
Serotonin	Control	15	Male	138.0 ± 5.1	100.1 ± 8.5
		15	Female	135.1 ± 4.9	104.0 ± 8.2
		15	Male	116.9 ± 5.6	90.7 ± 6.1
		15	Female	111.0 ± 5.1	95.9 ± 6.7
	10 ⁻⁵	15	Male	104.6 ± 2.8	93.2 ± 5.9
		15	Female	113.9 ± 3.3	93.9 ± 5.6
		15	Male	115.5 ± 2.5	81.3 ± 4.7
		15	Female	117.7 ± 4.1	123.9 ± 7.6
	10 ⁻³	15	Male	121.6 ± 4.0	117.9 ± 7.8
		15	Female	129.2 ± 2.9	110.4 ± 7.1

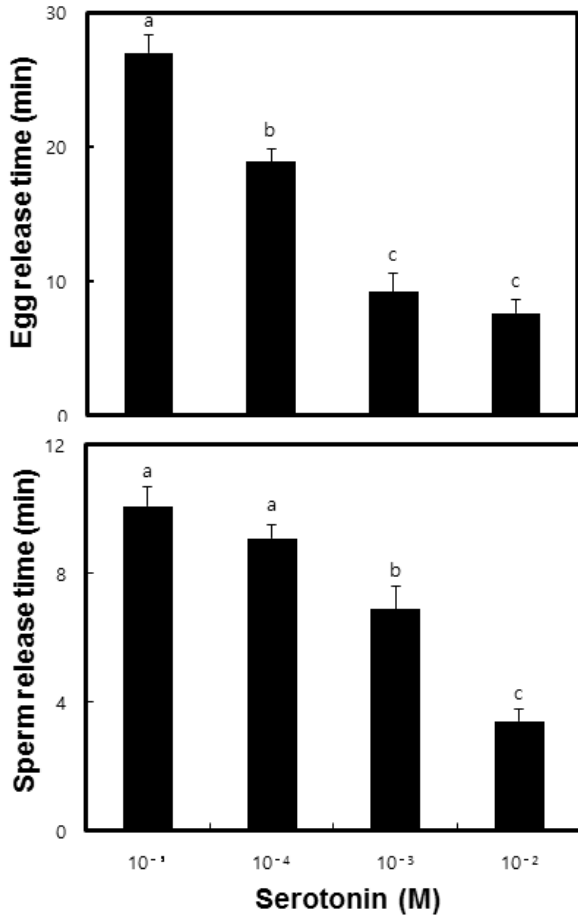


Fig. 1. Egg release and sperm release time by serotonin injection in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

체당 산란량은 각각 1,008천개, 1,471천개, 1,503천개, 2,664천개였다. 10⁻² M 이 10⁻⁵ M 농도에 비해 유의하게 높은 산란량을 나타내었으며 ($P < 0.05$), 10⁻⁴과 10⁻³ M 과는 유의한 차이를 나타내지 않았고 ($P > 0.05$), serotonin 농도가 증가할수록 산란량이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 2).

Serotonin 농도에 따라 방출된 알의 성숙도를 비교하기 위

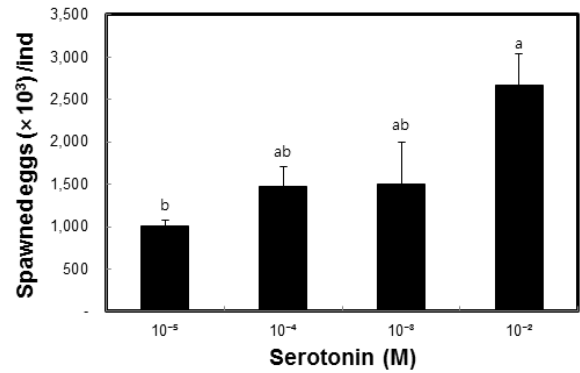


Fig. 2. Number of spawned eggs by serotonin injection in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

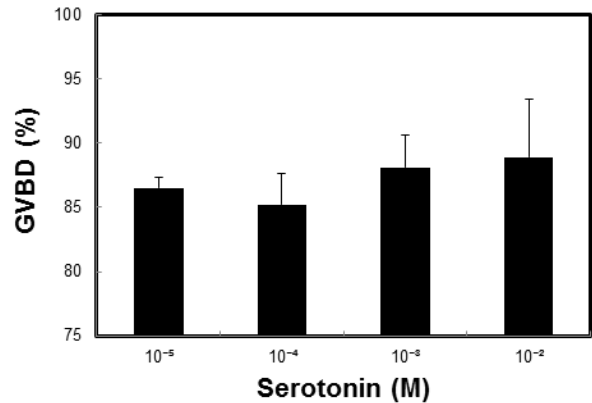


Fig. 3. Frequency of germinal vesicle breakdown (GVBD) induced by serotonin concentration in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Each value represents mean ± S.E.

하여 방출 2시간 후 알의 GVBD율을 조사한 결과, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ 및 10⁻² M 농도에서 따라 각각 86.5 ± 2.4%, 85.2 ± 2.5%, 88.1 ± 4.5% 및 88.9 ± 1.9%로 농도에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($P > 0.05$) (Fig. 3). 그리고 serotonin 을 주사하지 않은 대조구에서 일부 산란된 개체의 GVBD율을 조사한 결과 85.1 ± 0.8%로 serotonin 처리구와 유의적인 차

Table 2. Effect of serotonin injection on the spawning of Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Stimulus	Dose (M)	Response number		Response rate (%)	
		Female	Male	Female	Male
Serotonin	10 ⁻⁵	9/15	10/15	60.0	66.7
	10 ⁻⁴	10/15	13/15	66.7	86.7
	10 ⁻³	12/15	15/15	80.0	100
	10 ⁻²	13/15	15/15	86.7	100

이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$) (data not show).

방출된 알의 수정률 및 부화율을 조사한 결과, 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} 및 10^{-2} M 에서 수정률은 각각 $84.7\% \pm 1.4\%$, $83.1 \pm 1.7\%$, $84.3 \pm 1.7\%$ 및 $83.2 \pm 0.8\%$ 였으며, 부화율은 각각 $73.1 \pm 1.3\%$, $76.5 \pm 0.8\%$, $74.6 \pm 1.9\%$ 및 $71.9 \pm 0.8\%$ 로 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($P > 0.05$). 또한 대조구에서 얻은 알과 정자의 수정률 및 부화율도 각각 $82.4 \pm 0.6\%$ 와 $70.6 \pm 0.6\%$ 로 serotonin을 주사 개체들과 유의한 차이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$) (data not show).

고 찰

패류의 종자생산에 있어 수정란은 원료에 해당하며, 일시에 많은 양의 수정란을 구해야 동일 발달단계 및 균일한 크기의 종자를 얻을 수 있고 식물성 먹이생물 공급도 단순하여 대량 생산이 쉬워진다. 따라서 패류 종자생산 시 자연환경에 관계없이 일시에 대량의 알과 정자를 얻기 위하여 인위적으로 산란 유발 자극을 주고 있다. 패류에게 많이 적용되었던 산란유발 자극으로는 수온, 공기 노출, 전기, KCl, NH_4OH , KNO_3 , KBr, K_2SO_4 , 난과 정자 현탁액, 신경절 현탁액, 아세틸콜린 (acetylcholine), serotonin, 자외선 해수, 오존, 과산화수소, prostaglandin 등이 있다 (Chang, 2015). 굴류의 경우 수온, NH_4OH , 난과 정자 현탁액, serotonin, 과산화수소 자극이 방란·방정 유발에 효과적이라고 알려져 있다 (Galtsoff, 1938; Yoo and Kang, 1996; Chang, 2015). 본 연구에서도 serotonin 처리 시 굴 암컷과 수컷이 모두 아주 민감한 방란·방정 반응을 보였고, serotonin 농도가 높을수록 방란·방정까지 소요되는 시간은 짧아지는 것으로 나타났다. 또한 10^{-2} M 에서 높은 반응률과 많은 산란량이 확인되어 해당 농도가 산란유발에 효과적인 것으로 판명되었다. 이때패류에서 serotonin의 산란유발 연구로는 버지니아굴 *Crassostrea virginica*, 가리비류의 *Argopecten irradians*와 *A. nucleus*, 비단가리비류의 *Chlamys farreri*와 *Nodipecten nodosus*, 홍합류의 *Dreissena polymorpha*와 *Geukensia demissa*, 그리고 clam류의 *Arctica islandica*, *Hippopus porcellanus*, *Hippopus hippopus*, *Mercenaria mercenaria*, *Tridacna gigas*, *T. derasa*, *T. maxima*, *T. crocea* 및 *T. squamosa* 등이 있다 (Matsutani and Nomura, 1982; Gibbons and Castagna, 1984; Braley, 1985; Alcazar et al., 1987; Vélez et al., 1990; Fong et al., 1993; Fong et al., 1994; O'Connor and Heasman, 1995; Kang, 1996; Park et al., 2005; Velasco et al., 2007). 이러한 serotonin의 산란유발 효과는 serotonin이 난모세포 표면에 존재하는 serotonin 수용기를 자극함으로써 산란이 일어난다고 보고되었다 (Osada

et al., 1992). Lee et al. (1999) 은 북방대합의 경우 serotonin과 prostaglandins (PGs) 에 의한 산란유발은 aspirin에 의해 억제되었는데, 이것을 serotonin이 생식소 내의 PG 생합성에 관여하는 것으로 판단하였으며, PG가 북방대합의 방란·방정에 직접적으로 작용하는 요인이 된다고 생각하였다. 이러한 결과는 serotonin이 생식소내의 PG E_2 생합성을 촉진함으로써, PG E_2 가 직접적으로 방란 및 방정에 작용하는 것을 시사한다 (Vélez et al., 1990; Lee et al., 1996).

본 연구에서 serotonin 주사에 의해 방출된 알은 농도에 관계없이 85% 이상의 높은 GVBD율을 보였다. 이것은 Matsutani and Nomura (1987) 가 언급한 것처럼 serotonin이 굴의 GVBD를 유발한 것으로 해석이 가능하다. 그러나 Stephano and Gould (1988) 는 굴의 난소로부터 분리한 난모세포의 난핵포는 완전하였으며, 정자 없는 해수에서 배양하는 동안 자연적으로 GVBD가 일어나는 난모세포가 나타나고, 산란된 알에서 더욱 높은 비율의 GVBD가 나타남으로써 GVBD는 산란기내의 난 성숙 단계와 관계 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 농도별로 serotonin 주사 후 방란된 알에 대해서만 GVBD율을 관찰하였으나, serotonin을 처리하지 않은 대조구에서 산란된 알에서도 85% 이상의 높은 GVBD율이 관찰된 점과 기존의 연구를 종합해 볼 때 serotonin의 처리나 처리 농도보다 난 성숙단계가 GVBD의 유발과 관계가 깊다고 판단되며 향후 이에 관한 보다 세밀한 연구가 요구된다.

본 연구의 결과는 굴의 인공 종묘생산 시 대량 산란유발 방법을 위한 유용한 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료되지만, 앞으로 굴을 포함한 패류의 산란기구를 체계적으로 밝히기 위해 더욱 세밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

요 약

굴의 종묘생산 시 수정란을 대량으로 얻기 위하여 성숙한 굴 어미를 대상으로 신경전달 물질인 serotonin의 최적 처리 농도를 파악하기 위한 연구가 수행되었다.

Serotonin 주사 후 방란까지 소요되는 시간은 7.6분부터 27분까지였으며, 농도가 낮아짐에 따라 소요시간은 유의하게 길어졌다 ($P < 0.05$). 방정시간 역시 방란시간과 비슷한 경향을 보였다. Serotonin 농도에 따른 반응률 역시 처리 농도가 높을수록 반응률이 높아졌다. Serotonin 처리 후 산란량을 조사한 결과, 10^{-2} M 에서 2,664천개로 10^{-5} M 농도에 비해 유의하게 많았으나 ($P < 0.05$), 10^{-4} 나 10^{-3} M 처리구는 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($P > 0.05$). Serotonin 처리 후 산란된 알의 GVBD율, 수정률 및 부화율은 농도에 영향을 받지 않았다.

사 사

이 논문은 2016년 국립수산물과학원 수산과학연구소사업 (R2016015) 의 지원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Alcazar, S.N., Solis, E.P., and Alcala, A.C. (1987) Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hippopus porcellanus rosewater* (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture*, **66**: 359-368.
- Brale, R.D. 1985. Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture*, **47**: 321-325.
- Chang, Y.J. (2015) Overview of Physio-Aquaculture. pp. 93-105. Aqua Info Company, Seoul. [in Korean]
- Fong, P.P., Wall, D.M., and Ram, J.L. (1993) Characterization of serotonin receptors in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.*, **267**: 475-482.
- Fong, P.P., Duncan, J., and Ram, J.L. (1994) Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia*, **50**: 506-509.
- Fong, P.P., Deguchi, R., and Kyojuka, K. (1996) Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central J. *Biol. Bull.*, **191**: 27-32.
- Galtsoff, P. S. (1938). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* I. Spawning reaction of the female and male. *Biol. Bull.* 74: 461.
- Gibbons, M.C., and Castagna, M. (1984) Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, **40**: 189-191.
- Kang, K.H., Baik, K.K., Chang, Y.J., and Yoo, S.K. (1996) Spawning induction according to stimulating treatment and spat rearing of scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Kor. J. Malacol.*, **12**: 99-104. [in Korean]
- Kikuchi, S., and Uki, N. (1974) Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* I. Relation between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus hannai*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **33**: 69-78.
- Lee, J.Y. (2001) Reproductive cycle and seedling production of surf clam, *Spisula sachalinensis*. Ph.D. thesis, pp. 142. Pukyong National University, Korea. [in Korean]
- Lee, J.Y., Chang, Y.J., and Park, Y.J. (1996) Spawning induction and egg development of surf clam, *Spisula sachalinensis*. *J. Aquacult.*, **9**: 419-427. [in Korean]
- Lee, J.Y., Park, Y.J., and Chang, Y.J. (1999). Gonadal development reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (Bivalve; Veneridae). *J. Korean Fish. Soc.*, **32**: 198-203. [in Korean]
- Loosanoff, V.L., and Davis, H.C. (1963) Rearing of bivalve molluscs. *Advanced Marine Biology*, **1**: 1-136.
- Matsutani, T., and Nomura, T. (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Mar. Biol. Lett.*, **3**: 353-358.
- O'Connor, W.A., and Heasman, M.P. (1995) Spawning induction and fertilisation in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture*, **136**: 117-129.
- Osada, M., Mori, K., and Nomura, T. (1992). *In vitro* effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **58**: 223-227.
- Park, K.Y., Kim, S.K., Seo, H.C., and Ma, C.W. (2005) Spawning and larval development of the jicon scallop, *Chlamys farreri*. *J. Aquacult.*, **18**: 1-6. [in Korean]
- Stephano, J.L., and Gould, M. (1988). Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, **73**: 295-307
- Velasco, L.A., Barros, J., and Acosta, E. (2007) Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture*, **266**: 153-165.
- Vélez, A., Alifa, E., and Aguaje, O. (1990) Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic scallop *Pecten ziczac*. *Aquaculture*, **84**: 307-313.
- Yoo, S.K., and Kang, K.H. (1996) Spawning induction according to stimulating treatment and influence of water temperature on egg development and larvae rearing of oyster, *Crassostrea gigas*. *Korean J. Malacol.*, **12**: 91-97. [in Korean]